



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**Influencia de la harina de sangre en  
el crecimiento de microorganismos  
para la biorremediación de un suelo  
contaminado con hidrocarburos**

**TESIS**

Que para obtener el título de

**Ingeniera Civil**

**P R E S E N T A**

Andrea Moreno Resendiz

**DIRECTORA DE TESIS**

Dra. María del Rosario Iturbe Argüelles



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2024

## ÍNDICE

RESUMEN.....	6
GLOSARIO.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
I. ANTECEDENTES.....	10
II. OBJETIVO.....	11
II.1 OBJETIVO GENERAL.....	11
II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
II.3 HIPÓTESIS.....	11
III. MARCO TEÓRICO.....	11
IV. METODOLOGÍA.....	18
IV.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO.....	18
IV.2 CONTEO DE BACTERIAS.....	21
IV.3 PRIMERA ETAPA DEL EXPERIMENTO 1.....	23
IV.4 SEGUNDA ETAPA DEL EXPERIMENTO 1.....	25
IV.5 EXPERIMENTO 2: VOLATILIZACIÓN.....	27
IV.6 EXPERIMENTO 3: FOTÓLISIS.....	27
IV.7 EXPERIMENTO 4.....	28
IV.7.1 Carbono orgánico total.....	28
IV.7.2 Obtención de proteínas totales a partir del método de nitrógeno Kjeldahl.....	28
IV.7.3 Obtención de sólidos totales volátiles (STV).....	31
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
V.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO.....	33
V.2 PRIMERA ETAPA DEL EXPERIMENTO 1.....	34
V.3 SEGUNDA ETAPA DEL EXPERIMENTO 1.....	36
V.3 CONTEO DE BACTERIAS.....	41
V.4 EXPERIMENTO 2: VOLATILIZACIÓN.....	42
V.5 EXPERIMENTO 3: FOTÓLISIS.....	43
V.6 EXPERIMENTO 4.....	43
V.6.1 Carbono orgánico total.....	43
V.6.2 Obtención de proteínas totales a partir del método de nitrógeno Kjeldahl.....	45
V.6.3 Obtención de sólidos totales volátiles (STV).....	46

VI.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
VI.1	CONCLUSIONES.....	47
VI.2	RECOMENDACIONES.....	48
	REFERENCIAS .....	49
	ANEXOS.....	54

## **Agradecimientos**

A mi asesora, la Dra. María del Rosario Iturbe Argüelles, por su paciencia, su confianza, su orientación y por los conocimientos que me compartió durante la realización de este trabajo.

A la Quím. Adriana Ramírez González, por su tiempo y ayuda en la elaboración de los experimentos realizados, así como en la revisión de este escrito.

A los Ing. Berenice E. García e Ing. Arnold M. González, por su ayuda en los experimentos de conteo de bacterias y nitrógeno Kjeldahl para la obtención de proteínas; así como su compañía y orientación durante mi estadía en el Instituto de Ingeniería.

Al Dr. Daniel de los Cobos Vasconcelos, por sus recomendaciones en el análisis de los resultados de las pruebas de proteínas, sólidos totales volátiles y carbono orgánico total, que enriquecieron el contenido de este trabajo.

A la M. I. Ana Alejandrina Castro Rodríguez, por su tiempo, orientación y asesoramiento en la revisión de este trabajo.

A mis sinodales, Dra. Michiko Amemiya Ramírez y Dra. Ana Beatriz Carrera Aguilar, por su tiempo, orientación y comentarios para mejorar este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ingeniería y al Instituto de Ingeniería, por permitirme crecer y aprender de profesionales y compañeros que me proporcionaron un sinfín de sabiduría y experiencias inolvidables.

## **Dedicatoria**

A mis padres, María y Andres, por permitirme tener una vida feliz y cómoda, por brindarme un hogar lleno de amor y aprendizaje, por proporcionarme las herramientas para poder llegar a concluir mis estudios, por sus enseñanzas, regaños y sacrificios que me permitieron convertirme en la persona que soy hoy en día, no hay palabras suficientes para agradecerles. Los amo.

A mi hermana Samantha, por apoyarme incondicionalmente, por tus regaños y consejos, por estar para mí cuando ni siquiera sabía que te necesitaba, eres mi inspiración. Gracias y te amo.

A mi hermanita Barbara, por su compañía, por permitirme compartir mis hobbies y gustos contigo, y por ser una persona de confianza con la que puedo compartir cualquier cosa. Gracias y te amo.

A mi mascota Canela, que ha estado conmigo y me ha permitido experimentar un amor tan incondicional, te amo.

A mis amigas Erika, Lucero, Deni, Gemma, Victoria, Sinaí y Fátima que me permitieron compartir experiencias inolvidables, por brindarme su apoyo, su conocimiento y sobre todo porque no me dejaron sola cuando pensé que ya no podía, muchas gracias.

## RESUMEN

El trabajo que se presenta tiene como objetivo conocer el efecto que la harina de sangre tiene en el crecimiento y actividad de los microorganismos para el tratamiento de suelos de tipo vertisol contaminados con hidrocarburos; y, de esta manera, confirmar que la harina de sangre es una solución factible para reducir los efectos contaminantes de pasivos ambientales que se presentan en el país.

En este trabajo, se llevaron a cabo un total de seis experimentos, donde el experimento 1 consistió en comprobar que la harina de sangre es favorable para el crecimiento de los microorganismos y, en consecuencia, aumenta la biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos. Para la realización de este primer experimento, se utilizó el método de biolabranza a nivel laboratorio, donde se emplearon un total de 9 charolas de plástico de diferentes tamaños para contener un kilogramo de suelo contaminado en cada una, con diferentes cantidades de harina de sangre (HS) para realizar el experimento, estas se mantuvieron con aireación y agua constante.

En el segundo experimento, se probó la posible influencia de la volatilización y en el tercero el de la fotólisis. Para la realización de estos experimentos se utilizaron muestras de suelo contaminado, colocadas en 12 frascos de vidrio de 100 ml de capacidad. Para el experimento de volatilización, se utilizaron 6 frascos, de los cuales tres se expusieron al ambiente manteniéndose abiertos y, los frascos restantes, permanecieron cerrados. En el caso del experimento de fotólisis, tres frascos se colocaron en un sitio donde las muestras estaban exhibidas al ambiente; y las tres restantes, se cubrieron con papel de aluminio y se colocaron dentro de una caja para evitar la exposición a la luz.

Para analizar la actividad de los microorganismos del suelo del experimento 1, en sus diferentes etapas, se realizaron tres experimentos adicionales que consistieron en analizar el nitrógeno Kjeldahl para la obtención de proteínas, sólidos totales volátiles y carbono orgánico total.

Los resultados indican que la adición de harina de sangre al suelo contaminado y el mantenimiento de una oxigenación continua y del contenido de agua, influyen en que la población de microorganismos crezca, observando una remoción constante de los hidrocarburos de fracción media e hidrocarburos aromáticos policíclicos.

## **Abstract**

This work aimed to assess the effect that blood meal has on the growth and activity of microorganisms in a vertisol soil contaminated with hydrocarbons; and to confirm that blood meal is a feasible solution to reduce the adverse effects in this type of polluted soils.

A total of six experiments were carried out, where experiment 1 consisted of proving that blood meal is favorable for the growth of microorganisms and, consequently, increases the biodegradation of soils contaminated with hydrocarbons. For the realization of this first experiment, the biolab method was used at laboratory level. Nine plastic trays were used to contain one kilogram of contaminated soil in each one, with different amounts of blood meal (BM) to carry out the experiment, always with enough aeration and water content.

In the second and third experiments, volatilization and photolysis were tested. In these experiments, samples of contaminated soil were used, six for volatilization and six for photolysis, with a capacity of 100 ml. For the first experiment, three were exposed to the environment but remaining vials remained close. In the case of the photolysis experiment, three vials were placed in contact with light and the remaining three were covered with aluminum foil and placed inside a box to avoid exposure to light.

To analyze the activity of the soil microorganisms of experiment 1, in its different stages, three additional experiments were carried out that consisted of analyzing Kjeldahl nitrogen for protein, total volatile solids and total organic carbon.

The results indicate that the addition of blood meal to the contaminated soil and the maintenance of continuous oxygenation and water content, influence the growth of the microorganisms population, observing a constant removal of medium fraction hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons.

## GLOSARIO

- Bacterias. Organismos microscópicos unicelulares.
- Contaminantes. Materia, sustancia o combinaciones, de origen químico o biológico que genera alteración o modificación en cualquier elemento del ambiente o la salud.
- Coquización. Procesamiento de conversión térmica de carbón.
- Desequilibrio ecológico. Alteración en las relaciones de interdependencia entre elementos de la naturaleza que afecta negativamente el desarrollo de los seres vivos.
- Diésel. Hidrocarburo líquido obtenido mediante destilación de petróleo a temperaturas entre 200 °C y 380 °C.
- Dilución primaria. Solución o suspensión obtenida después de pesar o medir una cantidad de producto bajo examinación y mezclarla con una cantidad nueve veces en proporción al diluyente.
- Diluciones decimales adicionales. Soluciones o suspensiones obtenidas al mezclar un volumen determinado de dilución primaria con el volumen nueve veces un diluyente y que, por repetición de esta acción con cada dilución preparada, se obtiene una serie de diluciones decimales adicionales.
- Electrodo. Metal o semiconductor, la cual lleva a cabo una reacción de oxidación o reducción en su superficie.
- Fertilizante. Sustancias ricas en nutrientes, utilizadas para mejorar características del suelo para la mejora de cultivos.
- Hidrocarburos de fracción media. Hidrocarburos con moléculas que contienen entre 10 y 28 átomos de carbono.
- Humedad. Cantidad de agua que se encuentra en los poros del suelo o en su superficie.
- Materia orgánica. Elemento del suelo compuesto por diferentes fuentes orgánicas como desechos animales, vegetales o producto de actividades humanas.
- Microorganismos. Organismos microscópicos que participan en diversos procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos.
- Muestra compuesta. Muestra que se forma por diferentes submuestras simples representativas de un suelo.
- Nitrógeno total Kjeldahl. Suma del nitrógeno amoniacal y orgánico, que son convertidos en sulfato de amonio.
- NMP (Número más probable). Valor aproximado de bacterias en una muestra.
- NMX (Norma Mexicana). Documentos técnicos de ámbito voluntario elaboradas por un organismo nacional de normalización o Secretaría de Economía.
- NOM (Normas Oficiales Mexicanas). Regulaciones técnicas de carácter obligatorio emitidas por dependencias competentes.
- Remediación. Medidas que se toman para eliminar o reducir contaminantes de sitios alterados.
- Permeabilidad. Capacidad de un material de transmitir un fluido a través de sus partículas.
- UFC (Unidades formadoras de colonias). Unidad con la que se reportan los resultados obtenidos del conteo de bacterias aerobias en placa.
- Volátil. Propiedad de sustancias para cambiar de un estado líquido a uno gaseoso.

## INTRODUCCIÓN

A partir del crecimiento poblacional en México, fue necesario el incremento en las industrias textiles, generación de energía eléctrica, construcción, minería, agua, gas, entre otras, para satisfacer las necesidades básicas de las personas y, como consecuencia, el aumento de manera desmesurada del consumo de los recursos naturales de los cuales dispone el país, así como la generación exagerada de residuos de todas estas industrias. La combinación de estos sucesos tiene efectos graves tanto en el medio ambiente como en la salud de las personas. Es por esta razón que a partir de la década de 1970, en México se comenzaron a implementar leyes y normas para regular los temas relacionados a la contaminación en el país, aunque, debido a la tardía respuesta política acerca de temas ambientales e implementación de estas, se presentaron problemas como los pasivos ambientales que al ser sitios con un área de afectación grande, contaminados generalmente con residuos peligrosos y que no fueron remediados para impedir la dispersión de los contaminantes.

El suelo es un elemento principal para el desarrollo de procesos como la agricultura, ganadería, vivienda, entre otros procesos. Por lo tanto, es necesario mantenerlo en condiciones óptimas para su buen desempeño; por lo que, la prevención y remediación de emergencias y pasivos ambientales se ha vuelto un tema de gran importancia en la actualidad. El desarrollar, llevar a cabo, concluir y verificar la limpieza de sitios contaminados se volvió una tarea obligatoria para cuidar la salud de la población, ya que en los últimos años se han estudiado y observado los efectos negativos que los diferentes contaminantes tienen sobre el medio ambiente y la salud de las personas.

En este trabajo se consideró un suelo proveniente de un pasivo ambiental altamente contaminado con hidrocarburos, para el cual se decidió probar el proceso de biorremediación con la ayuda de harina de sangre que es un polvo producto del procesamiento de sangre de res y que se utiliza como abono, para mezclas de fertilizantes, cultivos agrícolas o alimento de animales no rumiantes. La harina de sangre ha sido utilizada con anterioridad para la degradación de toxafeno y dicloro difenil tricloroetano (DDT), que son componentes de insecticidas, en ensayos de laboratorio y ensayos a gran escala, mostrando resultados favorables (USEPA, 2010); así mismo, Wang, et al (2017) estudiaron el comportamiento de un suelo contaminado con DDT y HAP con el agregado de harina de sangre, concluyendo que el agregado del fertilizante mejora la remediación del suelo contaminado; por lo que, a pesar de que es poca la implementación o información de este fertilizante, el uso de este material como fuente de nutrientes para los microorganismos heterótrofos se expone como una opción viable para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Con los antecedentes antes mencionados, el presente escrito tuvo la finalidad de comprobar la efectividad y desempeño de la harina de sangre por medio del análisis del suelo contaminado durante y después del agregado del abono, mediante el análisis de los hidrocarburos de fracción media (HFM) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), así como del análisis del conteo de bacterias, proteínas, sólidos totales volátiles y carbono orgánico total.

## I. ANTECEDENTES

En este trabajo se considera un experimento con suelo proveniente de una zona minera, al norte del país, considerado un pasivo ambiental altamente contaminado con hidrocarburos. Debido a la falta de normatividad, en la época de operación, se volvió un pasivo ambiental que representa un gran problema, no solo para el medio en el cual se encuentra el contaminante, sino también para la salud y calidad de vida de las personas con viviendas aledañas a la zona contaminada.

El suelo de la zona consta de un tipo llamado vertisol, el cual se caracteriza por ser un suelo de tipo arcilloso generalmente de color oscuro, siendo suelos mineralizados que tienen un elevado contenido de arcillas que se expanden. En estado seco son muy compactos y pueden llegar a presentar grietas; contrario a esto, en estado húmedo, llegan a ser muy plásticos, aumentando el volumen de las arcillas, por lo que trabajar con este tipo de suelo es muy complicado (Gisbert, et al., 2011). Aunque es difícil trabajar con este tipo de suelos, su buen manejo y alta fertilidad natural, lo hacen un suelo ideal para cultivos.

Las características del suelo utilizado fueron obtenidas en un estudio previo realizado en el Instituto de Ingeniería en el grupo de Saneamiento de Suelos y Acuíferos, que se presentan en la siguiente table:

Tabla I.1 Resultados de la caracterización del suelo

<b>Parámetro</b>	<b>Valor (suelo)</b>
pH	8.03
Conductividad Eléctrica [dS/m]	1.19
Materia Orgánica [%]	5.87
Densidad Real ( $\rho_s$ ) [g/cm <sup>3</sup> ]	2.39
Densidad Aparente ( $\rho_a$ ) [g/cm <sup>3</sup> ]	1.4
Porosidad	0.41
Capacidad de Campo [%]	42.04
Conteo de bacterias [NMP]	1,200,000
Nitrógeno (N) [mg/kg]	46.65
Fósforo (P) [mg/kg]	4.03

Dentro de la información obtenida acerca de la zona minera, se sabe que las actividades realizadas dentro del área contaminada eran el proceso de coquización y el manejo de diésel; por lo que, en este trabajo, dado los componentes contaminantes de estos compuestos, se decidió analizar los hidrocarburos de fracción media (HFM) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).

## **II. OBJETIVO**

### **II.1 OBJETIVO GENERAL**

Verificar que el uso de harina de sangre es un factor de influencia en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

### **II.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Verificar que el número de bacterias se incrementa con la cantidad de harina de sangre agregada.

Evaluar los efectos de la volatilización y la fotólisis en la remoción de hidrocarburos.

Confirmar que el crecimiento de bacterias y su actividad para la biorremediación se debe al agregado de harina de sangre en el suelo, mediante el estudio de proteínas, sólidos totales volátiles y el porcentaje de carbono orgánico.

### **II.3 HIPÓTESIS**

En un suelo contaminado con hidrocarburos, la harina de sangre propicia el incremento de microorganismos y, por tanto, favorece la biodegradación.

## **III. MARCO TEÓRICO**

### Contaminación del suelo

Según la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (2013) en la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, el suelo se define como: “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”; por lo que se considera un sistema dinámico que, gracias a los factores formadores de suelo, se pueden determinar las propiedades fundamentales que contribuyen al control, cantidad y calidad de vida de la actividad biótica que se encuentra en el suelo, ya que están relacionadas con el contenido de agua y la aireación (Aguilar, 2023).

La contaminación se puede definir como la presencia de sustancias o contaminantes que pueden ser nocivos para la salud tanto del medio ambiente como para seres vivos causando un desequilibrio ecológico. Estas pueden tener diferentes orígenes pudiendo ser físicos, químicos o biológicos, así como también pueden variar en sus concentraciones. También es importante considerar que hay elementos que se encuentran en la naturaleza de manera natural que pueden ser considerados contaminantes si se encuentran fuera de un límite de concentración, generalmente alterada por actividades humanas. Los límites de concentración son llamados límites máximos permisibles en la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, que es la norma oficial mexicana que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la

caracterización y especificaciones para la remediación por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, 2013).

Según la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR, 2003), un sitio contaminado es definido como: “lugar, espacio, suelo, cuerpo de agua, instalación o cualquier combinación de éstos que ha sido contaminado con materiales o residuos que, por sus cantidades y características, pueden representar un riesgo para la salud humana, a los organismos vivos y el aprovechamiento de los bienes o propiedades de las personas”. Y, considerando que el suelo es un recurso natural no renovable y que un gran número de actividades se realizan en este, tanto para la realización de funciones naturales como para el día a día de los seres vivos; es muy importante conservarlo de manera limpia y saludable.

Las actividades humanas son una de las principales razones por las que se presentan sitios contaminados en México, según el Programa Nacional de Remediación de Sitios Contaminados, (SEMARNAT, 2021), algunas de las actividades antropogénicas, son:

- i. Actividades mineras
- ii. Actividades del sector hidrocarburos
- iii. Actividades agrícolas
- iv. Actividades industriales
- v. Instalaciones de servicio
- vi. Uso de aguas residuales en irrigación de campos agrícolas
- vii. Depósito de residuos de manera irregular (a cielo abierto)

Muchas de las operaciones realizadas por estas industrias no cuentan con un manejo adecuado de sus residuos producidos o de la utilización de materiales peligrosos que se utilizan en sus procesos, generando un gran daño en los recursos suelo y agua que se encuentran en las inmediaciones de los sitios donde se realizan estas actividades, reduciendo la efectividad del suelo en la agricultura, degradando la biodiversidad y causando enfermedades en los seres vivos.

Debido a estas actividades, se da la contaminación del suelo cuando una sustancia o compuesto ingresa a él y cambia una o más de sus características físicas o químicas que puede representar un riesgo para la salud y el medio ambiente. Asimismo, la extensión del contaminante en el suelo dependerá de diversos factores como el tipo de fuente de contaminación, el tipo de contaminante y sobre todo de las características del suelo.

### Pasivo Ambiental

Según la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2021), se considera como pasivo ambiental “aquellos sitios contaminados por la liberación de materiales o residuos peligrosos, que no fueron remediados oportunamente para impedir la dispersión de contaminantes y que implican una obligación de remediación”. Donde se entiende que un pasivo ambiental es producido por la actividad constante del hombre y que, al cesar esta productividad, ha impactado desfavorablemente el sitio en el que se realiza el trabajo; donde, al no presentar un control de los residuos o materiales peligrosos, por desconocimiento o negligencia, se presenta actualmente como un riesgo al ambiente y a los seres vivos. También se consideran pasivos ambientales a

las emergencias ambientales que, al concluir sus actividades de remediación, no hayan alcanzado los límites máximos permisibles establecidos.

### Hidrocarburos

La Secretaría de Energía de México (2015) define a los hidrocarburos como: “un grupo de compuestos orgánicos que contienen principalmente carbono e hidrógeno. Son los compuestos orgánicos más simples y pueden ser considerados como las sustancias principales de las que se derivan todos los demás compuestos orgánicos”; pudiéndose encontrar de manera líquida, gaseosa o sólida. Algunas de sus características principales son: no suelen ser biodegradables; son insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos (Noguera, 2020). Estos han sido aprovechados por la industria energética, utilizándolo para la creación de combustibles, así como por la industria petroquímica ya que, al procesarlo, se puede utilizar como materia prima para la producción de plásticos, fibras, disolventes, productos químicos industriales, entre otros. Pueden ser clasificados según el enlace químico de sus átomos como:

- Alifáticos: Compuesto orgánico derivado de la degradación química de grasas y aceites, que forman cadenas abiertas y ramificadas de carbono. Estos al mismo tiempo se clasifican como:
  - Alcanos. Estos son hidrocarburos saturados, unidos con enlaces sencillos de carbono e hidrógeno. Es muy utilizado como metano, que es el principal elemento del gas natural; así como el propano, siendo el componente más usado para la creación del gas LP; o el butano, que es generalmente utilizado para encendedores (Pizaña, 2013).
  - Alquenos. Son hidrocarburos no saturados que presentan enlaces sencillos dobles de carbono-carbono debido a la pérdida de hidrógenos; comúnmente encontrados en la naturaleza, donde su uso más común es en el polietileno de las bolsas plásticas (Pizaña, 2013).
  - Alquinos. Se describen como hidrocarburos no saturados que presentan enlaces triples de carbono-carbono; donde el uso más común es el del acetileno o etino, que es un gas utilizado en soldaduras, ya que se pueden alcanzar altas temperaturas con este (Pizaña, 2013).
- Aromáticos: son hidrocarburos que tienen uno o más anillos aromáticos, siendo el benceno el más simple y estable, continuando con los hidrocarburos aromáticos polinucleares o policíclicos (HAP), que incrementan el número de anillos dependiendo de sus propiedades; estos últimos con compuestos orgánicos que son, generalmente, producto de una combustión incompleta; tienden a ser no volátiles y tienen pesos moleculares altos. También, estos pueden reaccionar a algunos contaminantes que se encuentran en el ambiente como lo son el ozono, óxido de nitrógeno y dióxido de sulfato; pudiendo ser degradados por algunos microorganismos que se encuentran en el suelo (Speight, 2017).

### Biorremediación

Para el tratamiento de suelos contaminados, existen técnicas de remediación que pueden ser biológicas, fisicoquímicas y térmicas. En este trabajo se refiere únicamente a las biológicas, que implican la biorremediación.

Según Iturbe, R. (2014), la biorremediación es un tratamiento biológico que “utiliza la actividad metabólica de los microorganismos presentes en el suelo, como bacterias y hongos, para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos”. Siendo una técnica que biodegrada los contaminantes orgánicos, transformándolos en un producto no tóxico con ayuda de los microorganismos autóctonos del sitio para degradar los contaminantes presentes en él; estos pueden ser realizados *in situ* o fuera del sitio. Donde las ventajas más destacadas de este tipo de remediación son: menores costos, tecnologías amigables con el medio ambiente, generalmente los contaminantes se destruyen y el tratamiento posterior a la implementación es, muchas veces, mínimo o nulo. En cuanto a las desventajas, se tiene: largos tiempos para el tratamiento, se debe realizar una verificación de la toxicidad de intermediarios y/o productos utilizados en el suelo a tratar; además, no se puede realizar en cualquier tipo de suelo, ya que este debe favorecer el crecimiento de los microorganismos.

Con la finalidad de que las técnicas de biorremediación sean más efectivas, se realizan dos procesos llamados bioestimulación y bioaumento; el primero se refiere a la ayuda que se le da a los microorganismos para que puedan reproducirse, realizando la degradación del contaminante mucho más eficiente, donde es necesario tener un control en la cantidad de agua, temperatura, pH, oxígeno y nutrientes, entre otros. En el caso del bioaumento, se trata de la adición de microorganismos externos al sitio contaminado, donde este proceso se realiza, mayormente, cuando los microorganismos autóctonos es deficiente y la degradación del contaminante insatisfactoria; este tipo de proceso presenta una desventaja notoria y es que el implemento de microorganismos externos puede afectar la competencia de los nativos que ya se encuentran adaptados al suelo y al sustrato, pudiéndose presentar una disminución en la población que se adiciona o que no puedan adaptarse adecuadamente.

La técnica de biorremediación puede ser aplicada de diferentes formas, donde las principales son las biopilas, biolabranza y fitorremediación. En este trabajo se refiere únicamente a la biolabranza.

### Biolabranza

La biolabranza se trata de la estimulación de la actividad microbiana aeróbica mediante la aireación, la adición de nutrientes y agua; ya que el movimiento de oxígeno a través del suelo promueve la degradación de los contaminantes orgánicos (USEPA, 2004).

Para que la técnica aplicada sea efectiva, es necesario tener en cuenta estos factores:

La densidad de población microbiana debe ser de  $10^3$  UFC/g como mínimo, aunque este factor puede ser solucionado realizando los procesos de bioestimulación o bioaumento si se presenta una menor densidad.

El valor de pH del suelo a trabajar debe estar entre 6 y 8 para facilitar el crecimiento bacteriano, ya que al estar fuera de estos límites se tiene un efecto en la movilidad de los metales, la estructura del suelo y la disponibilidad de nutrientes; por lo que se tendrán que hacer ajustes de no presentarse el pH requerido (USEPA, 2017).

La temperatura ideal que se debe mantener en el suelo para promover la actividad microbiana debe estar en el rango de 10 a 45 °C, ya que fuera de este rango, los microorganismos suelen disminuir considerablemente.

Aunque es importante considerar que, según Al-Hawash, et al. (2018), la biodegradación disminuye a medida que lo hace la temperatura, por lo que las tasas más altas de degradación se encuentran cuando la temperatura se encuentra en un rango de 30 y 40 ° C.

Para el buen crecimiento de las bacterias es necesario un adecuado nivel de humedad en el suelo, ya que un exceso de agua puede impedir el movimiento del aire sobre el suelo, lo cual reduce la disponibilidad de oxígeno que es necesario para el metabolismo de los microorganismos. Por lo que el porcentaje de humedad ideal debe encontrarse entre 40 y 85% de la capacidad de campo o entre el 12 y 30% del peso del suelo. Durante el proceso de biolabranza, el suelo suele secarse por la evaporación y la aireación de éste, por lo que es importante mantener constante la humedad en el suelo (USEPA, 2017).

Otro aspecto para considerar es la textura del suelo, ya que afecta la permeabilidad, humedad y densidad del suelo, por lo que es necesario conocer el tipo de suelo con el que se trabajará; por ejemplo, los suelos arcillosos, que tienden a agruparse cuando están húmedos, son difíciles de airear y de distribuir uniformemente los nutrientes. En el caso de suelos con grava, la humedad y nutrientes no son retenidos por el alto volumen de aire en este tipo de suelos, por lo que no son adecuados para la biorremediación (USEPA, 2017).

Los microorganismos requieren de nitrógeno y fósforo para poder mantener su crecimiento y hacer posible la biodegradación; por lo que, a pesar de que el suelo tenga los nutrientes suficientes, en muchas ocasiones es necesario agregar nutrientes adicionales; por lo que es recomendable tener un rango de relación de nutrientes carbono:nitrógeno:fósforo de 100:10:1 o 100:10:0.5, dependiendo de lo que se necesite a partir de un análisis de muestras del suelo (USEPA, 2017).

### Harina de sangre (HS)

Con el fin de realizar un proceso de bioestimulación en el suelo contaminado, se llevará a cabo el agregado de harina de sangre en el suelo. Según Scandroglio, R. y Barrionuevo, M. E. (2020), la harina de sangre (HS) es un polvo seco, producto del procesamiento de sangre bovina mediante la vaporización o hervido con el fin de eliminar patógenos u otras impurezas que puedan encontrarse en la sangre. Este es generalmente utilizado como abono o para mezclas de fertilizantes para cultivos agrícolas, de igual manera se emplea para la alimentación de animales no rumiantes, ya que proporciona una gran cantidad de hierro y nitrógeno; siendo una de las mejores opciones como fertilizante, ya que su concentración de nitrógeno (generalmente de 14%) es similar a la de fertilizantes químicos y muchas veces superior a otros residuos orgánicos de origen animal.

### Volatilización

Durante el proceso de biolabranza es importante tener en cuenta la posible volatilización de los contaminantes que se puedan encontrar en el suelo, ya que, durante el proceso de aireación del suelo, los componentes volátiles tienden a evaporarse teniendo un efecto directo con el ambiente. Algunos productos del petróleo, como la gasolina, queroseno y diésel, presentan componentes con un peso ligero que presentan diferentes grados de volatilidad. Por lo que, si se presenta volatilización del contaminante, es importante detectar el porcentaje para posteriormente considerarlo en el porcentaje de biodegradación al final de la experimentación;

además de considerar el tratamiento específico para las emisiones por volatilización que se puedan producir (USEPA, 2017).

### Fotólisis

Según Fraga, I. (2016), “la fotoquímica estudia las reacciones químicas inducidas por la radiación electromagnética”; donde sólo se analizan los efectos producidos por la absorción de radiación en el espectro visible y ultravioleta; generalmente este estudio es realizado en agua, ya que se trata de un medio transparente por el cual la luz solar es mejor transmitida.

Conociendo que las energías asociadas a los fotones de 700, 400 y 300 nm, que son las longitudes de onda de la radiación que llega a la superficie de la tierra, son 170, 300 y 390 kJ/mol, respectivamente; y que las energías de enlaces como C-C y C-H son de 420 y 340 kJ/mol; se considera que la energía producida puede, a su vez, producir cambios en los enlaces químicos de los hidrocarburos, convirtiendo a la luz en un reactivo limpio y abundante que puede ser de ayuda para la degradación de los compuestos contaminantes (Fraga, 2016). Conociendo estos datos, es importante conocer el porcentaje de degradación de hidrocarburos por fotólisis en el suelo de estudio para realizar las correcciones necesarias una vez obtenidos los resultados finales de biodegradación.

### Carbono orgánico

El carbono orgánico es definido como “la cantidad de carbono en varios estados de oxidación” (DOF, 2020). Según Fernández, L. C., et al. (2006) el carbono orgánico se considera como el 50% del peso seco de la materia orgánica, siendo esta última la fracción orgánica que incluye residuos vegetales y animales, células y tejidos de organismos que se encuentran en el suelo y de sustancias producidos por estos; así como de compuestos orgánicos que provienen de la actividad del hombre. Este parámetro, al exponerse como una serie variada de componentes de la materia orgánica, donde una parte de este se relaciona con la actividad microbiana, es importante enriquecer este factor, proporcionando estudios que nos ayuden a determinar con más precisión la labor de las colonias.

Como se mencionó anteriormente, se presenta una relación entre la cantidad de microorganismos y la concentración de carbono orgánico en el suelo; Liang, C., et. al. (2019) proporciona los datos iniciales para realizar el estudio cuantitativo de la contribución de necromasa microbiana a la materia orgánica del suelo, donde se expone la influencia de los diferentes factores que pueden impedir o influenciar la medición de microorganismos o necromasa a partir del carbono orgánico; permitiendo que se pueda afirmar que existe la influencia de la masa microbiana en la concentración de carbono orgánico del suelo.

### Proteínas

Las proteínas se relacionan en general con la comida, ya que son muy importantes en el metabolismo de los organismos, por lo que, para conocer la efectividad de la harina de sangre y su relación con el crecimiento de las colonias de los microorganismos presentes en el suelo estudiado, es necesario determinar este parámetro. Para conocerlo es común obtener, en primera instancia, el valor del nitrógeno total mediante la realización del

método de nitrógeno Kjeldahl para, a continuación, multiplicar el valor porcentual obtenido en la experimentación con un factor de conversión de 6.25, que es el factor generalizado para la mayoría de las proteínas.

El nitrógeno Kjeldahl representa la suma de los valores de nitrógeno orgánico y amoniacal, siendo este un elemento indispensable para plantas, animales y microorganismos. Para que una población microbiana pueda ser eficiente, es necesario que el nitrógeno esté presente y en un equilibrio recomendado de Carbono:Nitrógeno cercana a 10:1 para que no se afecte el crecimiento de los microorganismos presentes en el suelo.

### Sólidos totales volátiles

La norma NMX-AA-034-SCFI-2015 establece el método para la medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas, donde define a los sólidos totales volátiles como la materia orgánica e inorgánica que se volatiliza por calcinación a 550 °C; y aunque estos son principalmente calculados para el estudio de agua, lodos o biosólidos y su tratamiento; permitirá relacionar y comparar los resultados obtenidos de las muestras analizadas, ya que, la materia orgánica está directamente relacionada con el movimiento de los microorganismos y puesto que no existe un método exacto para poder calcular el porcentaje del resultado de la actividad microbiana que se presenta en la materia orgánica del suelo, es importante relacionar los resultados obtenidos de diferentes métodos o prácticas que proporcionen valores relacionados a la materia orgánica presente en el suelo.

## IV. METODOLOGÍA

### IV.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO

Las propiedades y características de un suelo se ven definidas por el tipo de material del cual está compuesto, el clima, la vegetación que crece en él y el tiempo que tardó en formarse (Miguel, 2003), estos elementos representan un factor importante al momento de estudiar el suelo, por lo cual, para poder comenzar con el análisis del suelo con el que se experimentaría, se realizaron las siguientes pruebas para caracterizar el suelo:

#### IV.1.1 Obtención de pH

Este parámetro cuantifica que tan ácido o básico es un líquido, sustancia acuosa o suelo, transformando los valores de la concentración de los iones de hidrógeno en números que van del 0 al 14. Por lo que, se hace uso de la tabla IV.1:

TABLA IV.1 Clasificación de los valores de pH (NOM-021-RECNAT-2000)

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

Para conocer el pH en el suelo contaminado se utilizó el método descrito en la norma NOM-021-RECNAT-2000, que permite hacer la determinación del pH en muestras de suelo en una solución de agua pura utilizando un electrodo. El método se inicia con el pasado de 10 gramos de suelo en un matraz de 50 ml de capacidad, posteriormente se agregan 20 ml de agua destilada y se pone en agitación mecánica durante 30 minutos, para después dejarlo reposar 15 minutos; una vez pasado este tiempo y, calibrado el medidor de pH con soluciones reguladoras y enjuagado con agua destilada, se comienza la medición, realizando dos mediciones: una del agua suspendida que se encuentra en el frasco después del reposo de la suspensión y otro después de agitar la suspensión. Las lecturas que se deben registrar son las que aparecen en el medidor una vez que el dispositivo se encuentra estabilizado. Para tener un control de las pruebas, el experimento se realizó por duplicado.



FIGURA IV.1 Lectura de medidor de pH para muestras de suelo

#### IV.1.2 Densidad real

Esta se define como la relación entre el peso y el volumen de la fase sólida del suelo, se puede conocer a partir de dos parámetros: la masa y el volumen de una cierta cantidad de suelo.

Para determinar la densidad real del suelo, se utilizó el método del picnómetro descrito en la norma NOM-021-RECNAT-2000. Para poder realizar este procedimiento es necesario someter la muestra a una destrucción de la materia orgánica, pero ya que se trata de un suelo contaminado con hidrocarburo, este pretratamiento no fue llevado a cabo. Continuando con el experimento, se inicia con el pesado de un picnómetro limpio y seco (1), anotando el valor para poder agregar 5 gramos de suelo con ayuda de un embudo (2), se debe tratar de evitar el contacto directo del picnómetro con las manos, manteniéndolo lo más limpio que se pueda durante el proceso. Posteriormente, se agrega agua destilada recientemente hervida y fría hasta la mitad del volumen del picnómetro, girándolo entre los dedos para unificar el agua con el suelo y colocarlo en un desecador de vacío; en este, se hace vacío durante 15 minutos para eliminar el aire retenido en el suelo, realizando este procedimiento de manera paulatina para evitar pérdidas de material.



FIGURA IV.2 Agregado de agua a picnómetro



FIGURA IV.3 Picnómetros en desecador

Luego, se deja reposar en el desecador por 30 minutos, eliminando el vacío del desecador paulatinamente; una vez transcurrido este tiempo, se saca el picnómetro del desecador para poder llenarlo hasta aforo con agua destilada hervida y fría, secando el exterior lo mejor que se pueda para poder pesarlo en una balanza analítica (3), anotando este valor. Se toma la temperatura de la suspensión. Después de terminar las mediciones antes descritas, se vacía el picnómetro y se limpia adecuadamente para poder llenarlo con agua destilada hervida y fría; y a continuación, pesar el picnómetro (4) y tomar la temperatura, anotando los valores.

Una vez realizado el experimento, se realizan los cálculos para poder obtener la densidad real del suelo:

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

Donde:

$$\rho_s = (2) - (1)$$

ps: peso de las partículas del suelo

$$V_s = \frac{(4) - (1)}{\rho_w} - \frac{(3) - (2)}{\rho_w}$$

Vs: Volumen de las partículas del suelo

pw: Densidad del agua

### IV.1.3 Densidad aparente

Se define como el peso de una unidad de volumen del suelo, con este es posible conocer el movimiento del aire, agua y compactación en un suelo.

Para la obtención de este parámetro se utilizó como referencia el manual de prácticas de Edafología de la Universidad de la Rioja (Andrades, et al., 2015). En este se describe el procedimiento necesario para la estimación de la densidad aparente con el método aproximado de la probeta.



FIGURA IV.4 Agregado de agua en bureta para estimación de densidad aparente

Se comienza con el pesado de 10 gramos de suelo seco, lo cuales se introducen en una probeta de 10 ml, agregando el suelo paulatinamente procurando que no queden espacios sin rellenar en la probeta, una vez se comprueba que la muestra se encuentra homogénea, se anota el volumen que ocupa la muestra ( $V_1$ ). A continuación, poco a poco se agregan 0.5 ml de agua con ayuda de una bureta al centro de la probeta; una vez agregada el agua, se cubren las probetas con aluminio para evitar la evaporación. Se deja reposar un periodo de 24 horas para dejar que el agua drene adecuadamente, cuando haya transcurrido este tiempo, se mide el volumen de suelo seco en la probeta ( $V_2$ ) y se puede continuar con el cálculo numérico.

Para conocer el valor estimado de la densidad aparente en el suelo, se realizan los siguientes cálculos:

$$d_a = \frac{\text{Peso del suelo seco} \left[ \frac{g \text{ de suelo}}{cm^3 \text{ de suelo}} \right]}{V_1}$$

\*Ya que en este método la medición de los volúmenes  $V_1$  y  $V_2$  son tomados a partir de los criterios de las personas que realizan el experimento, estos pueden no ser exactos.

A partir de la siguiente tabla, se puede interpretar la valoración obtenida con base en el experimento:

TABLA IV.2 Clasificación del suelo a partir de su densidad aparente (NOM-021-RECNAT-2000)

Tipos de suelos		[g/cm <sup>3</sup> ]
Orgánicas y volcánicos		< 1.00
Minerales		
	Arcillosos	1.0 - 1.19
	Francosos	1.20 - 1.32
	Arenosos	> 1.32

#### IV.1.4 Porosidad

Según el manual de prácticas de Edafología de la Universidad de la Rioja, es posible estimar el porcentaje de porosidad del suelo a partir del conocimiento de la densidad aparente y real, por lo que se puede calcular como:

$$\%P = \left(1 - \frac{d_a}{\rho_s}\right) \times 100$$

#### IV.1.5 Materia Orgánica

De acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000, la materia orgánica del suelo se determina a través del contenido de carbono orgánico; por lo que, a partir de los resultados obtenidos en el apartado 5.6.2 *Carbono Orgánico Total* de este escrito, se tiene que:

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

Donde el valor 1.724 es el factor de Van Benmelen, que supone que la materia orgánica contiene un aproximado de 58% de carbono en su composición.

### IV.2 CONTEO DE BACTERIAS

Para el experimento principal no es necesario conocer la variedad de microorganismos que se encuentran presentes en el suelo, ya que se sabe que el suelo contiene una cantidad variada de microorganismos heterótrofos y que entre esta diversidad se encuentran bacterias biodegradadoras que, al aumentarlas, harán posible el proceso de biodegradación. Por lo que, la realización del conteo de bacterias se desarrolló a partir del procedimiento descrito en la norma NOM-092-SSA1-1994, que proporciona el método para estimar la cantidad de microorganismos presentes en distintos medios por la cuenta de colonias en un medio sólido incubadas aeróbicamente y el procedimiento descrito en la NOM-110-SSA1-1994, que proporciona las guías generales para la preparación de diluciones para el análisis microbiológico (DOF, 1995).

Como primer paso, se deben tener preparados los medios de cultivo, que son hechos con una mezcla de extracto de levadura, triptona, dextrosa, agar y agua; donde se disuelven los ingredientes en un litro de agua que se lleva a hervor, vertiendo la mezcla en recipientes de vidrio esterilizados hasta la mitad de su capacidad; para después esterilizarlos en autoclave a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Como segundo procedimiento, se debe realizar la solución diluyente, la cual se distribuye en tubos de ensayo con tapa, esterilizados y limpios, con ayuda de una pipeta se vierten 9 mililitros en cada tubo, para, a continuación, esterilizarlos durante 15 minutos.

Una vez teniendo estos dos componentes, se colocan las cajas en la mesa de trabajo para realizar la inoculación, marcando las tapas de éstas de manera que se identifique la dilución que se realizará. Para obtener la dilución primaria, se pesa 1 gramo de muestra a analizar, que será agregado al tubo de ensayo con la solución diluyente, tapándola y sosteniendo firmemente la tapa para, con ayuda de un agitador, homogeneizar por un minuto y medio hasta que se tenga una suspensión completa, procurando tomar la parte líquida de la suspensión para las diluciones restantes, dejando que las partículas grandes de la muestra se sedimenten. Una vez que se tiene la dilución primaria, se preparan las diluciones decimales adicionales; para la primera dilución adicional, se agrega un mililitro de la dilución primaria en un tubo con solución diluyente con ayuda de una pipeta, procurando que la pipeta no toque el diluyente; con ayuda del agitador, homogeneizar por un minuto y medio. Las diluciones decimales adicionales restantes se realizan de la misma manera, utilizando pipetas diferentes para cada dilución.



FIGURA IV.5 Homogenización de diluciones



FIGURA IV.6 Dilución primaria y diluciones decimales adicionales

Ya que el tiempo máximo para la inoculación del medio de cultivo con las diluciones preparadas es de 20 minutos, la inoculación se realiza una vez terminado el proceso de homogeneización de cada dilución. La inoculación se realiza con ayuda de una pipeta, agregando 1 mililitro de dilución en las cajas Petri, donde se encuentra el medio de cultivo, y mezclándolo con 6 movimiento de derecha a izquierda, 6 en sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, logrando la completa incorporación del inóculo con el medio de cultivo. Los procedimientos descritos anteriormente se realizaron de manera que los medios de cultivo no se vieran contaminados.

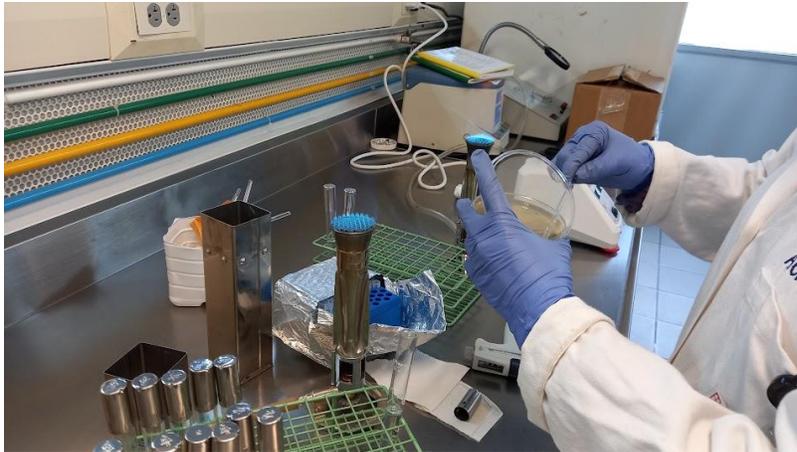


FIGURA IV.7 Inoculación del medio de cultivo

Después de realizar las inoculaciones necesarias, las cajas Petri se colocan dentro de una incubadora con termostato durante 24 horas; una vez transcurrido este tiempo, se realiza el conteo de las colonias en las placas, realizando el conteo hasta llegar a un máximo de 250 unidades formadoras de colonias (UFC).



FIGURA IV.8 Conteo de colonias en placas

### IV.3 PRIMERA ETAPA DEL EXPERIMENTO 1

El suelo extraído del sitio y trasladado al sitio del experimento, se trituro y tamizó con una malla número 4; después de homogeneizarlo, se obtuvieron tres muestras, a las cuales se les realizó un análisis de hidrocarburos fracción media (HMF), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y conteo de bacterias. Posteriormente, este suelo se distribuyó en nueve recipientes plásticos de diferente tamaño, colocando 1 kilogramo en cada uno.

Los recipientes se denominaron, de acuerdo con el tratamiento que se realizaría en el suelo de cada recipiente, de la siguiente manera:

A1, A2 y A3; contenedores con 1 kg de suelo con hidrocarburo;

A4, A5 y A6; contenedores con 1 kg de suelo contaminado con adición de 50 gramos de HS; y

A7, A8 y A9; contenedores con 1 kg de suelo contaminado y adición de 100 gramos de HS.

Antes del inicio del experimento, se tomó una muestra de cada contenedor para realizar análisis de HFM, HAP y conteo de bacterias.



FIGURA IV.9 Contenedores con 1 kg de suelo contaminado

Los contenedores tienen dimensiones de 14 x 13.7 cm y 11.5 cm de alto; 44 x 24 cm con una altura de 15 cm; y 33.5 x 20.2 cm de base y 11.5 cm de altura. En todos ellos se agregó la misma cantidad de suelo.

Posteriormente, con ayuda de una espátula y un vaso de precipitados de 150 ml, cada 3 días se agregaron 100 ml de agua a cada contenedor, mezclando el suelo con la espátula para distribuir uniformemente el líquido y mantener la humedad en el suelo.

Antes de agregar el bioestimulante (HS) al suelo, se tomaron muestras para conocer las concentraciones iniciales de HFM y HAP de cada charola con las que se iniciaría el experimento. Posteriormente, se agregó la cantidad correspondiente de harina de sangre a los contenedores A4 a A9; agregando 50 g de HS a los primeros tres contenedores, y adicionando 100 g de HS a los recipientes A7 a A9, continuando con la aireación y mantenimiento de humedad.



FIGURA IV.10 Contenedores al iniciar el experimento



FIGURA IV.11 Equipo utilizado para airear y mantener humedad en el experimento

Tres semanas después, se realizó una segunda toma de muestras para conocer las concentraciones de HFM y HAP, así como realizar el conteo de bacterias.

#### IV.4 SEGUNDA ETAPA DEL EXPERIMENTO 1

Después de realizar la segunda toma de muestras y obtener los resultados de las concentraciones de los hidrocarburos, se decidió realizar una adición de harina de sangre a los recipientes A4 a A9; agregando 50 g de HS a los primeros tres contenedores que, para fines prácticos, se renombraron como A2-4, A2-5 y A2-6; de igual manera, se adicionaron 100 g de HS a los contenedores A7 a A9, a los que también se renombraron (A2-7, A2-8 y A2-9). Se continúa con la aireación y mantenimiento de humedad en el suelo de los contenedores.



FIGURA IV.12 Contenedores A1, A2 y A3



FIGURA IV.13 Contenedores A2-4, A2-5 y A2-6



FIGURA IV.14 Contenedores A2-7, A2-8 y A2-9

Después de 15 días del inicio de la segunda etapa del experimento, se realiza la tercera toma de muestras para conocer las concentraciones finales del hidrocarburo, analizando los valores de las concentraciones de HFM, HAP y conteo de bacterias.

#### IV.5 EXPERIMENTO 2: VOLATILIZACIÓN

Este experimento consistió en agregar el suelo con la concentración inicial de HFM en 6 frascos donde se colocaron 100 gramos de suelo en cada uno. Tres de los frascos se mantuvieron abiertos en un lugar ventilado; mientras que los tres restantes se conservaron cerrados con aluminio en la boca del frasco para evitar el ingreso de aire. Una semana después, se recolectaron los frascos para analizarlos y determinar las concentraciones de HFM y HAP finales, corroborando si existió algún cambio debido a la volatilización.



FIGURA IV.15 Frascos para experimento 2

#### IV.6 EXPERIMENTO 3: FOTÓLISIS

Este experimento se realizó al mismo tiempo que el experimento 2, tanto en su inicio como en su término. Utilizando 6 frascos de vidrio donde se agregó 100 gramos de suelo contaminado en cada uno. Estos frascos se mantuvieron cerrados con sus tapas correspondientes, pero tres de estos fueron envueltos en papel aluminio, colocados en una caja para evitar la exposición a la luz; los tres restantes fueron colocados a la intemperie expuestos a la luz. Al terminar el experimento, los frascos fueron enviados al laboratorio para la determinación de los valores de HFM y HAP para conocer si existe efecto por fotólisis.



FIGURA IV.16 Frascos expuestos a luz para experimento 3



FIGURA IV.17 Frascos ocultos de la luz para experimento 3

#### IV.7 EXPERIMENTO 4

El experimento 4, tiene como objetivo verificar que ha existido biodegradación, para lo cual, se determinaron los siguientes parámetros: carbono orgánico total, proteínas y sólidos totales volátiles. Cada uno de estos parámetros indican la presencia de bacterias y su vinculación con la biodegradación mediante su actividad en el suelo, pero ya que estudiar estos parámetros por sí solos no proporciona la información necesaria para conocer la influencia de los microorganismos en la biorremediación del suelo contaminado, es necesario realizar estas tres pruebas en conjunto que permiten tener una representación más certera en los resultados obtenidos.

##### IV.7.1 Carbono orgánico total

Este parámetro se analizó en el Laboratorio de Edafología Ambiental del Laboratorio Nacional de Geoquímica y Mineralogía del Instituto de Geología de la UNAM, que realizó la destrucción de los carbonatos presentes en el suelo con ayuda de HCl 5N y utilizando un analizador elemental CNHS/O, Thermo Scientific Flash 2000. Se analizaron las siguientes cinco muestras de 100 g cada una:

- 1: suelo con hidrocarburo con concentración inicial;
- 2: suelo con hidrocarburo y el equivalente a 50 gramos de HS;
- 3: suelo con hidrocarburo y el equivalente a 100 gramos de HS;
- 4: suelo con hidrocarburo y 100 gramos de HS, muestra compuesta de recipientes A2-4, A2-5 y A2-6; y
- 5: suelo con hidrocarburo y 200 gramos de HS, muestra compuesta de contenedores A2-7, A2-8 y A2-9

##### IV.7.2 Obtención de proteínas totales a partir del método de nitrógeno Kjeldahl

Para la realización de este experimento, se utilizó como base el método Micro-Kjeldahl mencionado en el *Manual de técnicas de análisis de suelos* de Fernández, L. C., et al. (2006), así como una adaptación de la norma NMX-AA-026-SCFI-2010 proporcionada por académicos del instituto de ingeniería. El método consta de dos etapas: digestión, que consiste en la transformación de compuestos nitrogenados en nitrógeno amoniacal.; y destilación, para el cual se utiliza el método de determinación de amonio por destilación.

Para iniciar con el experimento, se prepararon las siguientes soluciones: solución de sulfato de cobre al 10% ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), solución de NaOH al 32%, solución indicadora mixta con ácido bórico, solución estándar de ácido sulfúrico 0.02 N y una solución de carbonato de sodio 0.05 N. Una vez preparadas las soluciones requeridas, se inicia con la preparación de la muestra; se utilizaron un total de 11 muestras de suelo, que fueron trituradas con un mortero, las cuales se describen a continuación:

0: blanco necesario para el cálculo del nitrógeno;

1 y 2: suelo con hidrocarburo con concentración inicial;

3 y 4: suelo con hidrocarburo y el equivalente a 50 gramos de HS;

5 y 6: suelo con hidrocarburo y el equivalente a 100 gramos de HS;

7 y 8: suelo con hidrocarburo y 100 gramos de HS, muestra compuesta de suelo de las charolas A2-4, A2-5 y A2-6; y

9 y 10: suelo con hidrocarburo y 200 gramos de HS, muestra compuesta de suelo de las charolas A2-7, A2-8 y A2-9.

Se agregan 0.5 g de cada muestra en un tubo BÜCHI; se agrega 1 g de reactivo de selenio y 5 ml de solución de sulfato de cobre al 10% para, a continuación, introducir el tubo BÜCHI a un digestor por un aproximado de 2 horas o hasta que la muestra cambiara a un color verde esmeralda; una vez transcurrido este tiempo, se dejó enfriar la muestra.



FIGURA IV.18 Tubos BÜCHI con muestras y reactivos



FIGURA IV.19 Tubos BÜCHI con muestras en digestor

Mientras la muestra se enfriaba, se preparó un matraz con 25 ml de solución indicadora de ácido bórico. Ya enfriado el tubo BÜCHI, se introdujo en el destilador, el cual se configuró para agregar 50 ml de agua destilada, 50 ml de solución de carbonato de sodio al 32%, y que el proceso de destilación tuviera una duración de 4 minutos. Ya que el matraz contiene el destilado del proceso, se tituló con la solución de ácido sulfúrico 0.02 N, donde la solución debe virar a un color violeta, anotando el volumen gastado.



FIGURA IV.20 Destilado de muestras



FIGURA IV.21 Titulación de destilado

Para obtener el valor del porcentaje del nitrógeno Kjeldahl contenido en cada muestra, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Nitrógeno Kjeldahl } [\%] = \frac{(T - B) \times N \times 1.4}{S}$$

Donde:

T: ml de ácido sulfúrico gastado en la muestra

B: ml de ácido sulfúrico gastado en el blanco

N: normalidad exacta el ácido sulfúrico

S: peso de la muestra de suelo

Con ayuda de la tabla IV.3, se puede interpretar el valor obtenido de nitrógeno Kjeldahl:

TABLA IV.3 Clasificación del suelo a partir de su contenido de nitrógeno total (manual de técnicas de análisis de suelos, 2006)

Categoría	Valor (%) de nitrógeno en suelo
Extremadamente pobre	< 0.032
Pobre	0.032 - 0.063
Medianamente pobre	0.034 - 0.095
Medio	0.096 - 0.126
Medianamente rico	0.127 - 0.158
Rico	0.159 - 0.221
Extremadamente rico	> 0.221

Una vez obtenido el valor porcentual del nitrógeno Kjeldahl, como se mencionó anteriormente, es necesario multiplicar por el factor de conversión de 6.25, por lo tanto:

$$\text{Proteína total} = \text{Nitrógeno Kjeldahl} [\%] \times 6.25$$

#### IV.7.3 Obtención de sólidos totales volátiles (STV)

Según la norma NMX-AA-034-SCFI-2015, como primer paso para iniciar con el experimento, se deben acondicionar las cápsulas de porcelana; para esto, las cápsulas deben estar limpias para poder introducirlas a un horno a una temperatura aproximada de 105 °C durante 30 minutos; posteriormente se introducen a una mufla con una temperatura de 550 °C ± 50 °C durante 30 minutos. Después de transcurrido ese tiempo, se introducen nuevamente al horno por 30 minutos; luego, para que estas se enfríen, se dejan en un desecador por 30 minutos como mínimo; pasado este tiempo, se pesan las cápsulas. Este método se debe repetir hasta que, al pesar las cápsulas, sólo haya una diferencia de ± 0.0005 gramos, y se registra la última pesada como m<sub>1</sub>. Durante todo el procedimiento es necesario utilizar pinzas, ya que se debe evitar tocar las cápsulas con las manos para evitar que estas se manchen con la grasa de los dedos o para prevenir accidentes.



FIGURA IV.22 Pesado de capsulas de porcelana

Se utilizaron un total de 10 muestras para realizar este método, las cuales fueron:

1 y 2: suelo con hidrocarburo con concentración inicial;

3 y 4: suelo con hidrocarburo y el equivalente a 50 gramos de HS;

5 y 6: suelo con hidrocarburo y el equivalente a 100 gramos de HS;

7 y 8: suelo con hidrocarburo y 100 gramos de HS, muestra compuesta de suelo de charolas A2-4, A2-5 y A2-6; y

9 y 10: suelo con hidrocarburo y 200 gramos de HS, muestra compuesta de suelo de charolas A2-7, A2-8 y A2-9.

Una vez obtenido  $m_1$ , se pesó 1 g de muestra de suelo contaminado en la cápsula, el cual se registra como  $V$ , para introducirlo al horno a una temperatura de  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, una vez transcurrido este tiempo, se dejó enfriar en un desecador al menos 30 minutos para posteriormente pesar la cápsula con la muestra. Se registró el peso y se repitió el procedimiento nuevamente hasta que se obtuvo una diferencia de  $\pm 0.0005\text{ g}$  entre pesadas; el último registro se denominó  $m_3$ .

Continuando con el experimento, se introdujo la cápsula de porcelana a un horno durante 30 minutos y, posteriormente, se colocó en una mufla a  $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos; transcurrido este tiempo, con ayuda de unas pinzas, se colocó la cápsula una vez más en el horno durante 30 minutos y, finalmente, se dejó enfriar en un desecador por 30 minutos aproximadamente. Finalmente, se pesó la cápsula con el suelo, registrando el valor como  $m_4$ .



FIGURA IV.23 Muestras calcinadas

Se realizó el siguiente cálculo para conocer el contenido de sólidos totales volátiles:

$$STV = \frac{(m_3[g] - m_4[g])}{V[g]} \times 1000000$$

Donde:

$m_3$  es la masa de la cápsula con el residuo después de la evaporación

$m_4$  es la masa de la cápsula con el residuo después de la calcinación

$V$  que en este caso es la masa de la muestra pesada al inicio del experimento

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO

Los resultados obtenidos a partir del análisis del suelo para su caracterización son:

TABLA V.1 Parámetros iniciales del suelo para su caracterización

Parámetro	Valor obtenido
pH	6.4
Densidad Real ( $\rho_s$ ) [g/cm <sup>3</sup> ]	2.20
Densidad Aparente ( $d_a$ ) [g/cm <sup>3</sup> ]	1.17
Porosidad [%]	46.96
Conteo de bacterias [NMP]	1,200,000
Nitrógeno Kjeldahl [%]	0.16
Carbono orgánico [%]	6.46
Materia orgánica [%]	11.14

A partir de los resultados obtenidos en las pruebas y de acuerdo con la norma NOM-021-RECNAT-2000, se interpreta que el valor de pH clasifica al suelo como moderadamente ácido. Asimismo, el valor de la densidad aparente corresponde a un suelo arcilloso, y de acuerdo con el manual de técnicas de análisis de suelos, se clasifica como rico en nitrógeno. Con respecto al valor de carbono orgánico, se tiene un suelo con una concentración muy alta de materia orgánica.

Analizando los resultados de la tabla I.1 y tabla V.1, se tiene una disminución de pH de 1.6, la densidad real disminuyó 0.19 y la densidad aparente 0.23. La porosidad aumentó más del 5%; y la materia orgánica aumentó 5.27%, que se considera como un suelo con alto contenido de materia orgánica. Analizando los resultados, se observa que las características en el suelo son diferentes en ambos casos, debiéndose a que, según Martínez, E., et al. (2008), la concentración de materia orgánica del suelo tiene influencia en el comportamiento de las características físicas y químicas del mismo; disminuyendo el valor de pH cuando el suelo es alcalino, ya que se menciona que al mezclarse el CO<sub>2</sub> de la atmósfera con agua se forma ácido carbónico que, al disolverse, genera H<sup>+</sup> que lo acidifica; lo cual pudo presentarse ya que el suelo se mantuvo expuesto al ambiente y con un agregado de agua constante antes de la toma de muestras en las que se obtuvieron los resultados presentados en la tabla V.1 antes mencionada. Martínez también menciona que la materia orgánica del suelo tiene efectos en la porosidad de este, aumentando esta característica, pues se sabe que la porosidad se obtiene mediante la relación de la densidad real y la densidad aparente, conociendo que la materia orgánica disminuye ambos parámetros. El aumento de la materia orgánica en el suelo se debe a la actividad de los microorganismos, ya que, a pesar de registrarse que el conteo de bacterias en las tablas I.1 y V.1 no presentaron cambios, las bacterias dentro del suelo después de realizar su trabajo en el suelo, mueren y se convierten en parte de la materia orgánica del suelo, pero al mismo tiempo, se siguen reproduciendo, debido a que, antes de tomar las muestras, como se mencionó anteriormente en la metodología del experimento 1, se inició con el triturado y tamizado del suelo, este proceso tuvo una duración de aproximadamente 2 semanas,

tiempo en el cual el suelo se mantuvo expuesto al ambiente, permitiendo una oxigenación limitada, pero que contribuyo al mantenimiento de los microorganismos existentes en el suelo a pesar de su almacenamiento antes del inicio del experimento.

## V.2 PRIMERA ETAPA DEL EXPERIMENTO 1

Como se mencionó en la metodología del experimento 1, después del tamizado del suelo, se recolectaron un total de 3 muestras, cuya concentración se muestra en la siguiente tabla:

TABLA V.2 Concentraciones inicial de hidrocarburos

	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>PROMEDIO</b>
	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>
<b>HFM</b>	16176.0	16036.3	17252.5	16488.3
<b>HAP</b>				
<b>Benzo(a)antraceno</b>	235.85	319.33	262.79	272.66
<b>Benzo(a)pireno</b>	299.33	253.31	322.18	291.61
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	409.66	441.31	415.6	422.19
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	154.41	157.8	144.31	152.17
<b>Dibenzo(a,h)antraceno</b>	79.5	75.29	80.33	78.37
<b>Indeno(1,2,3,c-d)pireno</b>	264.39	276.57	265.14	268.70
<b>Conteo de bacterias [NMP]</b>	1,200,000			

En la tabla V.2, se observa que los resultados de HFM para M1 y M2 son similares, al contrario de M3 que presenta un aumento de más de 1,000 [mg/kg]; esto puede deberse a que, a pesar de procurar la uniformidad en las muestras mezclando el suelo tamizado, es posible que éstas fueran extraídas de zonas distintas y no se obtuvo una homogeneización completa de las muestras de suelo. Es evidente que las concentraciones tanto para HFM como para HAP sobrepasan los límites máximos permisibles establecidos en la norma NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.

Partiendo de lo descrito anteriormente en la metodología, se tiene que las concentraciones iniciales de HFM, HAP y conteo de bacterias son las siguientes:

TABLA V.3 Resultados obtenidos antes del inicio del experimento<sup>1</sup>

	<b>Contenedores A1, A2 y A3</b>	<b>Contenedores A4, A5 y A6</b>	<b>Contenedores A7, A8 y A9</b>
	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>
<b>HFM</b>	13165.0	13631.3	11283.9
<b>HAP</b>			
<b>Benzo(a)antraceno</b>	285.99	266.95	232.78

<sup>1</sup> Los resultados de HFM y HAP de los contenedores A1 a A9, se pueden consultar en el anexo 1.

<b>Benzo(a)pireno</b>	332.76	346.81	246.89
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	496.73	525.38	345.92
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	133.65	137.51	103.40
<b>Dibenzo(a,h)antraceno</b>	84.73	96.45	60.27
<b>Indeno(1,2,3,c-d)pireno</b>	269.73	304.24	200.34
<b>Conteo de bacterias [NMP]</b>		2,700,000	1,600,000

La diferencia de las concentraciones promedio de HFM entre las tablas V.2 y V.3 es de 3794 [mg/kg]; como se mencionó anteriormente, puede deberse a la heterogeneidad del suelo de estudio, pero también es muy probable que las variaciones presentadas se deban a la oxigenación constante y el mantenimiento de la humedad en el suelo durante el proceso de mezclado en la distribución del suelo en los nueve recipientes. Las variaciones para HAP son menores, por lo que se puede decir que no se presenta un cambio significativo.

Una vez iniciado el experimento y agregada la harina de sangre en los contenedores correspondientes, se observa un incremento en la cantidad de microorganismos, principalmente en los contenedores en los que se agregaron 50 g de HS, observándose una preferencia de los microorganismos por la cantidad más pequeña de HS, ya que el crecimiento es más notorio en los contenedores A4, A5 y A6.

En el transcurso del experimento, después de unos días de agregar agua y remover el suelo con el contaminante y la harina de sangre, es perceptible un cambio en el olor y color de las muestras, percibiendo el aroma incluso en los cultivos que se realizaron para el conteo de bacterias, esto se le atribuye a la harina de sangre, ya que al ser un producto de origen animal y tener un color tan característico e intenso, modificó estas características del suelo.

Continuando con el experimento, se realiza la toma de muestras 3 semanas después del agregado de la harina de sangre en las charolas correspondientes donde se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA V.4 Concentraciones de hidrocarburos después de 3 semanas de iniciar el experimento<sup>2</sup>

	<b>Muestras testigo (A1, A2 y A3)</b>	<b>Muestras con 50 g de HS (A4, A5 y A6)</b>	<b>Muestras con 100 g de HS (A7, A8 y A9)</b>
	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>
<b>HFM</b>	10657.2	10492.5	8756.2
<b>HAP</b>			
<b>Benzo(a)antraceno</b>	213.09	219.12	209.38
<b>Benzo(a)pireno</b>	242.40	244.78	224.79
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	321.74	316.47	291.07
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	94.85	92.32	83.14
<b>Dibenzo(a,h)antraceno</b>	55.65	61.40	54.61

<sup>2</sup> En el anexo 2 se muestran las concentraciones de HFM y HAP de cada contenedor.

<b>Indeno(1,2,3,c-d)pireno</b>	177.87	195.15	175.62
<b>Conteo de bacterias [NMP]</b>		1,800,000,000	910,000,000

En la tabla V.5, se presentan los resultados de porcentaje de remoción del experimento después de tres semanas de duración del experimento, comparando los resultados de las tablas V.3 y V.4, durante el cual se mantuvieron la humedad y la aireación en el suelo.

TABLA V.5 Porcentaje de remoción después de 3 semanas del inicio del experimento

	<b>Muestras testigo (A1, A2 y A3)</b>	<b>Muestras con 50 g de HS (A4, A5 y A6)</b>	<b>Muestras con 100 g de HS (A7, A8 y A9)</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
<b>HFM</b>	19.0	23.0	22.4
<b>HAP</b>			
<b>Benzo(a)antraceno</b>	25.5	17.9	10.1
<b>Benzo(a)pireno</b>	27.2	29.4	8.9
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	35.2	39.8	15.9
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	29.0	32.9	19.6
<b>Dibenzo(a,h)antraceno</b>	34.3	36.3	9.4
<b>Indeno(1,2,3,c-d)pireno</b>	34.1	35.9	12.3

En la tabla V.5, se observa mayor remoción en las muestras con 50 g de HS, tanto en HFM como en HAP. De igual manera, se observa una relación entre la cantidad de microorganismos presentes en el suelo de los contenedores de control y el porcentaje de remoción de HFM ya que, al presentarse un mayor número de microorganismos en las muestras con 50 gramos de HS, se espera un mejor rendimiento de los microorganismos. Aunque es notable que, a pesar de tener un mayor porcentaje de remoción y casi el doble de microorganismos presentes en el suelo, la diferencia de remoción entre los contenedores con 50 g de HS y 100 g de HS es de 0.6%, por lo que, es notable que la actividad microbiana es muy activa en las muestras de suelo con 100 g de HS.

### V.3 SEGUNDA ETAPA DEL EXPERIMENTO 1

Los resultados obtenidos hasta este punto del experimento 1 indican valores aún muy por encima del límite permisible establecido en la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, por lo que, para intentar aumentar el porcentaje de remoción en el suelo, se decidió realizar un aumento de la cantidad de harina de sangre en el suelo de cada contenedor. En la tabla V.6 se muestran los resultados:

TABLA V.6 Resultados obtenidos 7 semanas después de iniciar el experimento<sup>3</sup>

	<b>Muestras testigo (A1, A2 y A3)</b>	<b>Muestras con 100 g de HS (A2-4, A2-5 y A2-6)</b>	<b>Muestras con 200 g de HS (A2-7, A2-8 y A2-9)</b>
	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>
<b>HFM</b>	12198.5	10342.4	6313.0
<b>HAP</b>			
<b>Benzo(a)antraceno</b>	206.60	183.58	113.53
<b>Benzo(a)pireno</b>	228.63	209.56	122.96
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	289.56	255.09	156.21
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	98.14	83.49	52.21
<b>Dibenzo(a,h)antraceno</b>	50.44	55.29	33.34
<b>Indeno(1,2,3,c-d)pireno</b>	153.18	129.58	72.52
<b>Conteo de bacterias [NMP]</b>	2,200,000	2,200,000,000	4,000,000,000

Calculando el porcentaje de remoción respecto a las concentraciones presentadas en la tabla V.3, se tiene:

TABLA V.7 Porcentaje de remoción después de 7 semanas del inicio del experimento

	<b>Muestras testigo (A1, A2 y A3)</b>	<b>Muestras con 100 g de HS (A2-4, A2-5 y A2-6)</b>	<b>Muestras con 200 g de HS (A2-7, A2-8 y A2-9)</b>
	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
<b>HFM</b>	7.3	24.1	44.1
<b>HAP</b>			
<b>Benzo(a)antraceno</b>	27.8	31.2	51.2
<b>Benzo(a)pireno</b>	31.3	39.6	50.2
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	41.7	51.4	54.8
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	26.6	39.3	49.5
<b>Dibenzo(a,h)antraceno</b>	40.5	42.7	44.7
<b>Indeno(1,2,3,c-d)pireno</b>	43.2	57.4	63.8

Al examinar las tablas V.6 y V.7 se observa que se presenta un cambio de preferencia de los microorganismos, ya que anteriormente la mayor remoción de hidrocarburos ocurrió con la menor concentración de harina de sangre y para este caso se obtiene mayor remoción con 200 gramos de harina de sangre.

Aun cuando no se obtiene la concentración máxima permisible de 5000 mg/kg de HFM, se observa una aproximación con la concentración de 200 gramos de harina de sangre. Esto corresponde, además, al aumento considerable del número de bacterias.

<sup>3</sup> Las concentraciones obtenidas de cada contenedor con suelo se pueden observar en el anexo 3.

En las siguientes figuras, se presentan los resultados de las concentraciones de HFM y la relación con el número de bacterias:

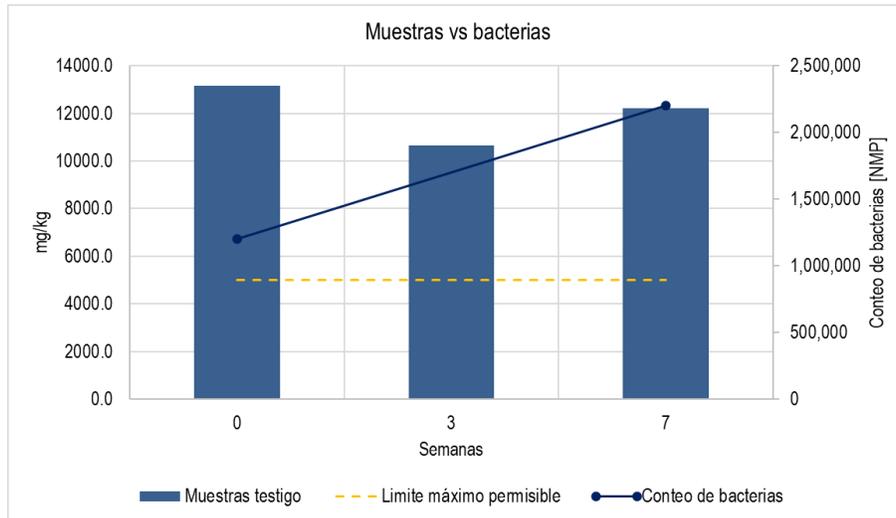


FIGURA V.1 Concentración de HFM y conteo de bacterias para muestras testigo

Se observa en la figura V.1 que se presenta una mayor remoción del hidrocarburo después de 3 semanas de iniciar el experimento y, a pesar de mostrarse remoción en las muestras, al pasar las semanas se observa un repentino aumento en la concentración del contaminante, notándose un cambio en el comportamiento registrado anteriormente, pese a presentarse un aumento en el contenido de microorganismos, por lo que, según De los Cobos, D. (2024), comenta que esto puede deberse al fenómeno de transferencia de los microorganismos o bioacumulación, que se presenta cuando un microorganismo acumula el hidrocarburo y no lo procesa, por lo que se puede observar un incremento en la concentración del contaminante.

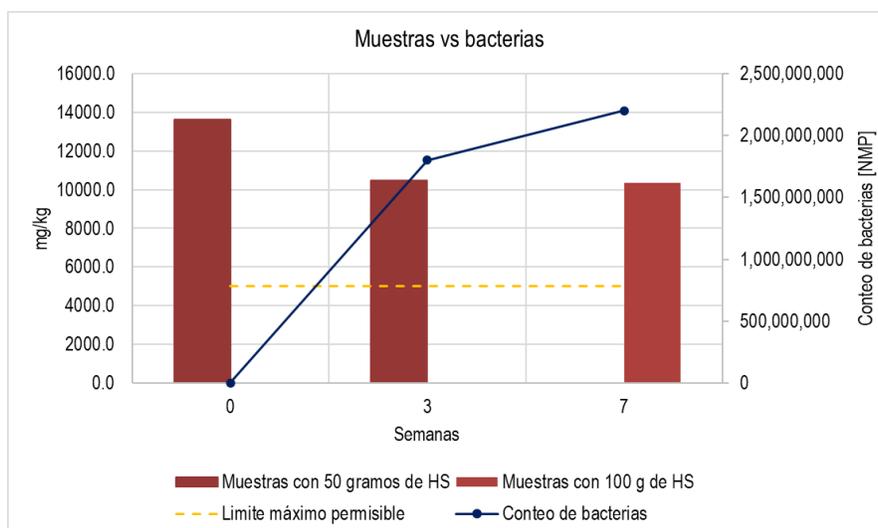


FIGURA V.2 Concentración de HFM y conteo de bacterias con 50 y 100 gramos de harina de sangre

En la figura V.2 se observa que la remoción del contaminante es significativa después de 3 semanas en las que se realizó el experimento, mostrándose el mayor porcentaje de remoción, presentado una congruencia

con el conteo de bacterias realizado, ya que en este triplicado se vio el mayor número de microorganismos; pero al observar el análisis realizado para la semana siete, se ve una disminución en la actividad microbiana, mostrando un bajo rendimiento y, por lo tanto, una menor remoción del contaminante.

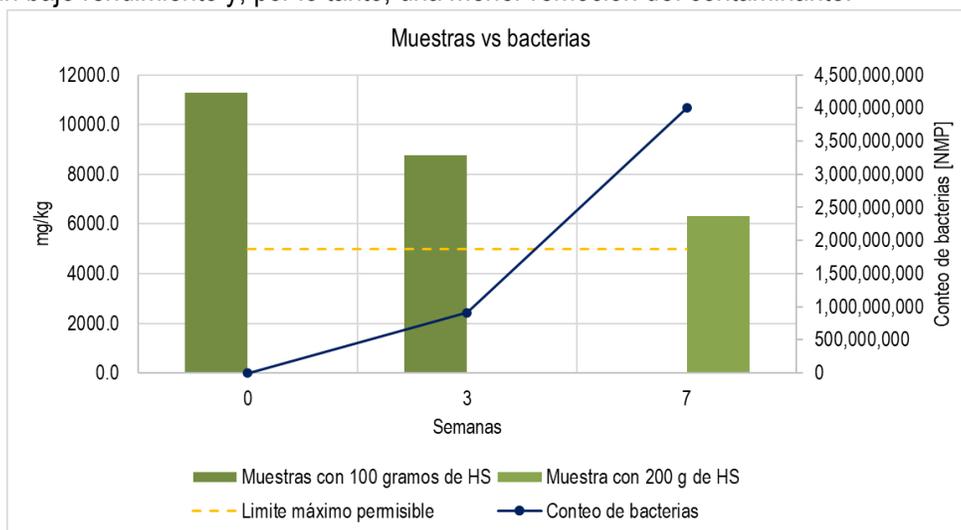


FIGURA V.3 Concentración de HFM y conteo de bacterias con 100 y 200 gramos de harina de sangre

Al observar la figura V.3 se aprecia que el comportamiento del experimento fue el esperado, ya que la remoción del contaminante fue aumentando con el paso de las semanas, mostrando el mayor porcentaje de remoción del contaminante. A pesar de no llegar al límite máximo permisible señalado en la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 se infiere que la concentración del contaminante disminuirá si se realiza el experimento durante un periodo de tiempo más largo.

En el caso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), se tiene:

Tabla V.8 Remoción de HAP: Benzo(a)antraceno

	Remoción de HAP [mg/kg]			REMOCIÓN [%]
	Benzo(a)antraceno			
	INICIAL	3 SEMANAS	7 SEMANAS	
Aireación y humedad	285.99	213.09	206.60	27.8
Adición de 50 g de HS	266.95	219.12	-	
Adición de 100 g de HS	232.78	209.38	183.58	31.2
Adición de 200 g de HS	-	-	113.53	51.2

Tabla V.9 Remoción de HAP: Benzo(a)pireno

	Remoción de HAP [mg/kg]			REMOCIÓN [%]
	Benzo(a)pireno			
	INICIAL	3 SEMANAS	7 SEMANAS	
Aireación y humedad	332.76	242.40	228.63	31.3
Adición de 50 g de HS	346.81	244.78	-	
Adición de 100 g de HS	246.89	224.79	209.56	39.6

Adición de 200 g de HS	-	-	122.96	50.2
------------------------	---	---	--------	------

Tabla V.10 Remoción de HAP: Benzo(b)fluoranteno

	Remoción de HAP [mg/kg]			REMOCIÓN [%]
	Benzo(b)fluoranteno			
	INICIAL	3 SEMANAS	7 SEMANAS	
Aireación y humedad	496.73	321.74	289.56	41.7
Adición de 50 g de HS	525.38	316.47	-	
Adición de 100 g de HS	345.92	291.07	255.09	51.4
Adición de 200 g de HS	-	-	156.21	54.8

Tabla V.11 Remoción de HAP: Benzo(k)fluoranteno

	Remoción de HAP [mg/kg]			REMOCIÓN [%]
	Benzo(k)fluoranteno			
	INICIAL	3 SEMANAS	7 SEMANAS	
Aireación y humedad	133.65	94.85	98.14	26.6
Adición de 50 g de HS	137.51	92.32	-	
Adición de 100 g de HS	103.40	83.14	83.49	39.3
Adición de 200 g de HS	-	-	52.21	49.5

Tabla V.12 Remoción de HAP: Dibenzo(a,h)antraceno

	Remoción de HAP [mg/kg]			REMOCIÓN [%]
	Dibenzo(a,h)antraceno			
	INICIAL	3 SEMANAS	7 SEMANAS	
Aireación y humedad	84.73	55.65	50.44	40.5
Adición de 50 g de HS	96.45	61.40	-	
Adición de 100 g de HS	60.27	54.61	55.29	42.7
Adición de 200 g de HS	-	-	33.34	44.7

Tabla V.13 Remoción de HAP: Indeno(1,2,3,c-d)pireno

	Remoción de HAP [mg/kg]			REMOCIÓN [%]
	Indeno(1,2,3,c-d)pireno			
	INICIAL	3 SEMANAS	7 SEMANAS	
Aireación y humedad	269.73	177.87	153.18	43.2
Adición de 50 g de HS	304.24	195.15	-	
Adición de 100 g de HS	200.34	175.62	129.58	57.4
Adición de 200 g de HS	-	-	72.52	63.8

En las tablas V.8 a V.13, se observa que, en todos los casos analizados, la mayor remoción de HAP se presenta en el suelo con 200 gramos de harina de sangre a las siete semanas de experimentación en la que

se presenta un porcentaje de remoción promedio de 50%, donde se observa el mayor número de población bacteriana. A pesar de que la remoción de HAP fue alta, no cumple con los límites máximos permisibles establecido en la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.

### V.3 CONTEO DE BACTERIAS

En la figura V.4, se aprecia que el crecimiento de microorganismos fue mucho mayor en la muestra A5 después del transcurso de 3 semanas del inicio del experimento, mostrando una preferencia de las bacterias por una cantidad menor de harina de sangre, pero a partir de la segunda etapa del experimento, es notable un cambio por un contenido más grande del fertilizante, donde se observa que A2-8 muestra un incremento de más de cuatro veces el contenido mostrado en el contenedor A8 a las 3 semanas, debido, muy probablemente, a la adaptación de los microorganismos a la harina de sangre y a la aireación que se realizó durante las siete semanas del experimento.

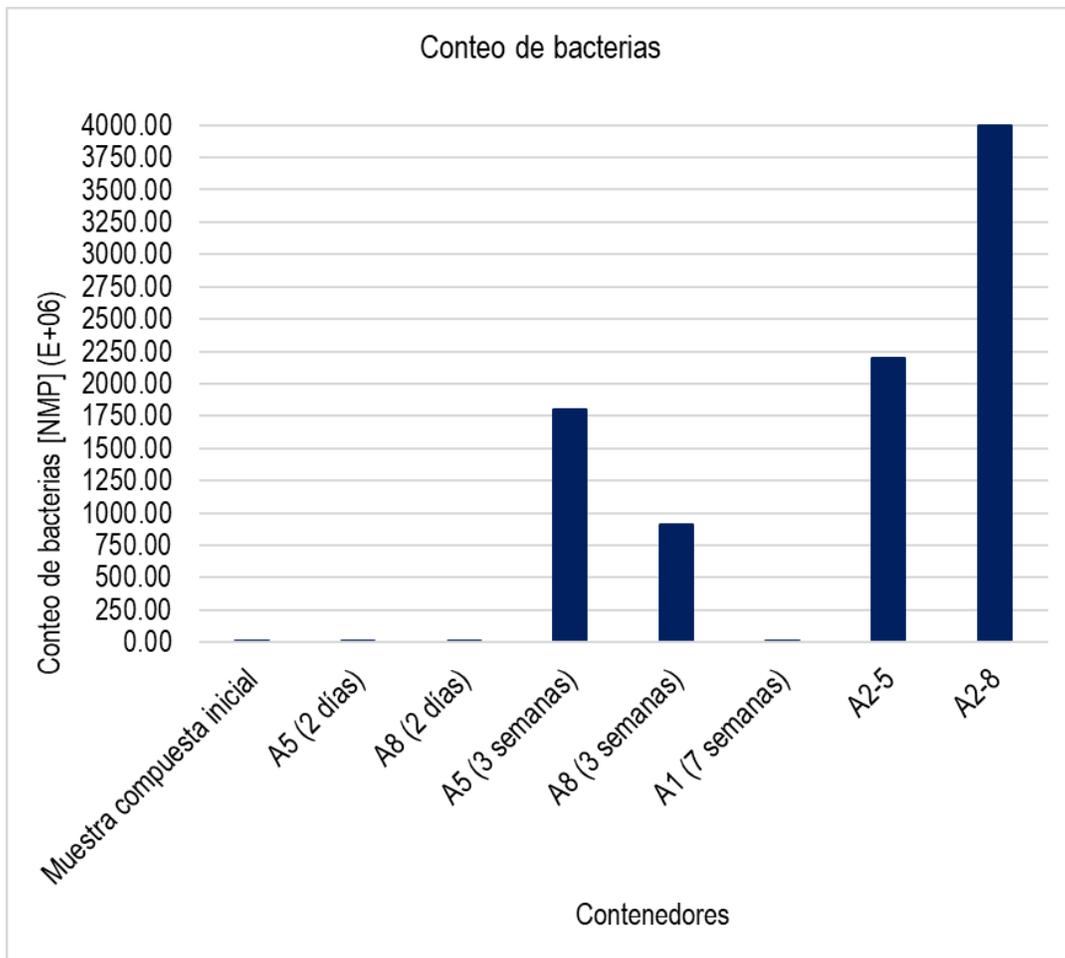


FIGURA V.4 Conteo de bacterias

## V.4 EXPERIMENTO 2: VOLATILIZACIÓN

En cuanto a las concentraciones de HFM de las muestras de suelo utilizadas para el experimento de volatilización, se compararon los resultados obtenidos de los frascos abiertos y cerrados expuestos al ambiente, por lo que se obtuvo:

TABLA V.14 Promedio de resultados de experimentación de volatilización para frascos abiertos y frascos cerrados<sup>4</sup>

	VOLATILIZACIÓN	
	F. ABIERTOS	F. CERRADOS
	mg/kg	mg/kg
<b>HFM</b>	11649.2	12137.7
<b>HAP</b>		
<b>Benzo(a)antraceno</b>	147.21	152.66
<b>Benzo(a)pireno</b>	187.64	197.55
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	246.98	255.30
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	78.14	86.02
<b>Dibenzo(a,h)antraceno</b>	49.63	46.52
<b>Indeno(1,2,3,c-d)pireno</b>	115.17	109.85

Al analizar la tabla V.14 que muestra que no se presenta un cambio significativo en los valores de las concentraciones de HFM y HAP; se concluye que la volatilización no contribuye significativamente a la eliminación del contaminante; sin embargo, la mezcla continua correspondiente al método de biorremediación que genera una aireación, además de la adición de agua, si constituye un factor de gran importancia para que la remoción del contaminante sea más eficiente, ya que se trata de distribuir de manera uniforme la oxigenación en la totalidad del suelo, es por esto que se presenta un grado de disminución en la concentración de HFM y HAP en los primeros dos muestreos.

<sup>4</sup> Las concentraciones de HFM y HAP de los frascos utilizados, pueden observarse en los anexos 4 y 5.

### V.5 EXPERIMENTO 3: FOTÓLISIS

En la tabla V.15, se presentan las concentraciones obtenidas para el experimento de fotólisis, se compararon los resultados logrados a partir de los frascos expuestos a la luz solar y los que se mantuvieron cerrados y cubiertos con papel aluminio, por lo que se tiene:

TABLA V.15 Promedio de los resultados de experimentación de fotólisis para frascos expuestos y frascos cerrados y cubiertos<sup>5</sup>

	FOTÓLISIS	
	F. CERRADOS	F. EXPUESTOS
	mg/kg	mg/kg
HFM	11673.3	11995.8
HAP		
Benzo(a)antraceno	135.88	143.74
Benzo(a)pireno	175.24	183.86
Benzo(b)fluoranteno	196.14	238.59
Benzo(k)fluoranteno	79.70	79.85
Dibenzo(a,h)antraceno	28.42	43.10
Indeno(1,2,3,c-d)pireno	89.03	101.94

Al calcular el porcentaje de remoción para ambos hidrocarburos, se presentan valores muy pequeños, por lo que se concluye que no hay efecto por fotólisis, y las diferencias mostradas en los resultados pueden deberse a la heterogeneidad del suelo. Además, el suelo al tratarse de un material sólido, la transmisión de la luz es casi nula entre sus partículas, por lo que la degradación de los contaminantes en este tipo de elemento es casi nula.

### V.6 EXPERIMENTO 4

#### V.6.1 Carbono orgánico total

Los resultados presentados por el Laboratorio de Edafología Ambiental se presentan a continuación:

TABLA V.16 Promedios de porcentaje de carbono orgánico total<sup>6</sup>

Muestra	% C org
1	6.46
2	8.06
3	11.77
4	13.33
5	14.89

<sup>5</sup> Los resultados de las concentraciones de HFM y HAP para los frascos analizados se pueden observar en los anexos 6 y 7.

<sup>6</sup> En el anexo 8 se pueden observar los resultados de los duplicados analizados.

En la figura V.5, se presenta la relación entre el contenido de carbono y el conteo de bacterias:

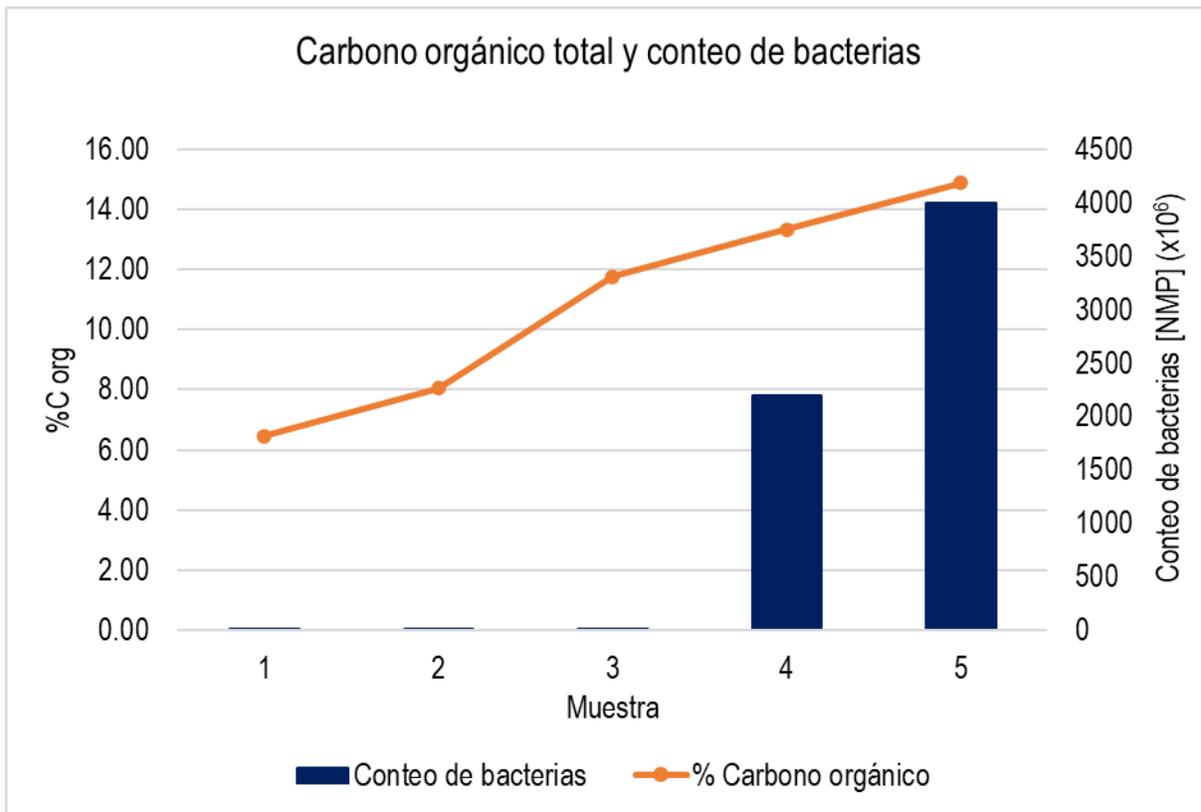


FIGURA V.5 Carbono orgánico total y conteo de bacterias

El carbono orgánico del suelo se compone de diversos elementos, donde se conoce que el propio hidrocarburo que contamina el suelo constituye una parte de este; así como la materia orgánica presente en el suelo y los mismos microorganismos, ya sean vivos o muertos; por lo que, se puede suponer que a mayor número de bacterias existe una mayor concentración de carbono orgánico total. Esto se observa en la figura V.5, donde se muestra que el porcentaje de carbono orgánico aumenta a medida que aumenta el número de microorganismos en las muestras estudiadas.

## V.6.2 Obtención de proteínas totales a partir del método de nitrógeno Kjeldahl

A continuación, se presentan los promedios de los resultados para proteínas, que se obtuvieron a partir de los cálculos descritos en la metodología, por lo que se tiene:

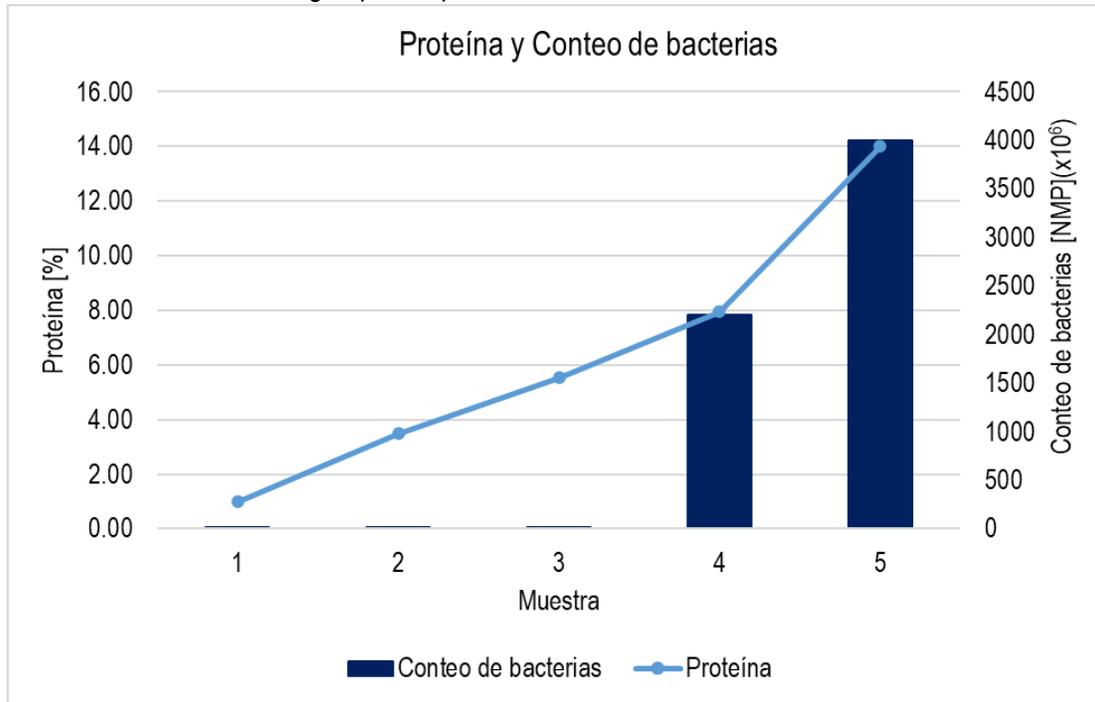


FIGURA V.6 Proteínas presentes en las muestras analizadas<sup>7</sup>

Según Singleton, et al (2003, como se cita en Verdenelli, et al, 2019), demostraron que las proteínas representan el 50% de la biomasa microbiana, por lo que se entiende que al aumentar la cantidad de microorganismos presentes en el suelo, las proteínas tendrán un aumento proporcional, como se observa a partir de la figura 5.6, el porcentaje de proteína que se presenta en las muestras de suelo va en aumento, manteniendo un comportamiento similar al incremento presentado para el conteo de bacterias realizado. Además, se observa que la muestra 5, que corresponde a las muestras de suelo con 200 gramos de HS, presenta un incremento de casi el doble de proteínas comparadas con los resultados obtenidos para las muestras de 100 gramos de harina de sangre.

Al analizar los resultados obtenidos para las proteínas (anexo 9), se entiende que existe una estrecha relación entre el nitrógeno del suelo y los microorganismos que habitan en él, ya que se conoce que los microorganismos al realizar el proceso de mineralización de la materia orgánica producen diferentes nutrientes como nitrógeno, fósforo o potasio (Pascual & Venegas, s.f.); por lo que es correcto afirmar que al presentarse un mayor número de microorganismos, el porcentaje de nitrógeno en el suelo incrementará por lo que las proteínas irán en aumento igualmente. Aunque es importante considerar algunos factores de influencia para el cálculo de este parámetro, como el agregado de harina de sangre en las muestras de suelo, ya que se sabe que la HS es un fertilizante rico en hierro y nitrógeno.

<sup>7</sup> Los resultados obtenidos para proteínas de las muestras y sus duplicados analizadas pueden observarse en el anexo 9.

### V.6.3 Obtención de sólidos totales volátiles (STV)

Con respecto al cálculo de STV en las muestras examinadas, se obtuvo lo siguiente:

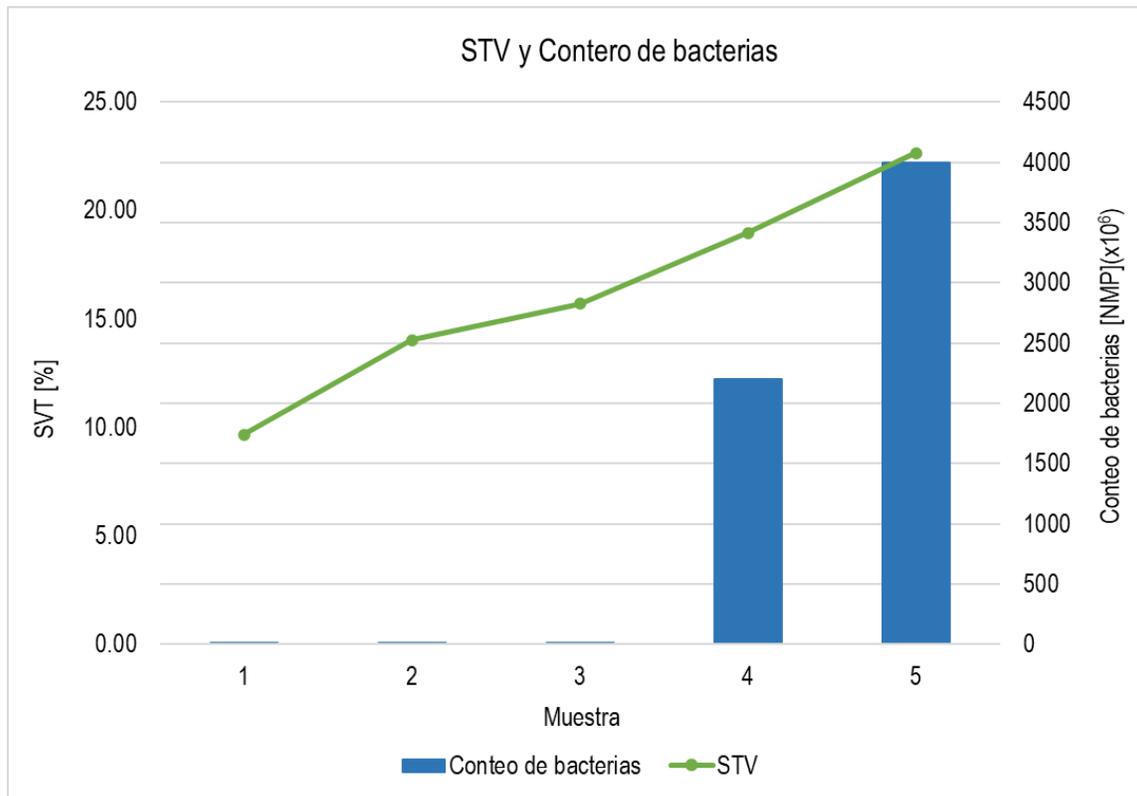


FIGURA V.7 Sólidos totales volátiles<sup>8</sup>

Se conoce que los sólidos totales volátiles son una parte de la materia orgánica e inorgánica de una muestra que se calcina al estar a altas temperaturas; en consecuencia al presentarse un aumento en el porcentaje de STV, la cantidad de materia orgánica en el suelo tendrá un aumento; por lo que, aunque por sí sólo este parámetro no nos proporciona la información necesaria para afirmar que la materia orgánica aumentó debido al aumento de los microorganismos, sí se puede suponer que una parte de este incremento se debe a la actividad de las bacterias y su necromasa.

A pesar de que la obtención de los STV se presenta como una manera más directa para determinar la materia orgánica e inorgánica de una muestra, es difícil determinar con exactitud el cálculo de este parámetro, ya que se trabaja con un suelo que presenta diferentes componentes que pueden intervenir en la interpretación de los resultados.

<sup>8</sup> Los resultados de sólidos totales volátiles de las muestras se pueden observar en el anexo 10.

## VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### VI.1 CONCLUSIONES

#### Análisis microbiológico

Después de analizar los resultados, es evidente que existe una baja concentración en la población de bacterias heterótrofas al inicio del experimento (1,200,000 [NMP]) en comparación con los resultados obtenidos al término del experimento 1; observándose un aumento de más del doble de la población bacteriana (2,700,000 [NMP]) después de la adición de 50 gramos de HS; y para los contenedores con suelo con 100 gramos de HS, que mostró un incremento de 1,600,000 [NMP].

A tres semanas de iniciado el experimento 1, el incremento de la población microbiana en los contenedores de suelo con 50 gramos de HS es de 667 veces más a partir del segundo muestreo, con un total de 1,800,000,000 [NMP]; en el caso del suelo con 100 gramos de HS, se observa que el crecimiento es menor con 910,000,000 [NMP], siendo casi la mitad del conteo de bacterias presentado en comparación con los contenedores con 50 gramos de HS, donde parecía existir preferencia de las bacterias por una cantidad menor de HS.

Sin embargo, a las siete semanas de continuar con el experimento, es notable que la mayor población de bacterias se obtuvo en los contenedores de suelo con 200 gramos de HS; donde el crecimiento se registró como 4.4 veces mayor al presentado en el muestreo anterior y 1.82 veces mayor que el registrado para los contenedores con 100 gramos de harina de sangre (Figura V.4).

De acuerdo con los resultados obtenidos para proteínas, STV, carbono orgánico y comparándolo con el conteo de bacterias realizado, es notable una relación entre los valores conseguidos, ya que a medida que aumenta la cantidad de HS e incrementan los días del experimento, estos parámetros van en aumento.

Los resultados de esta tesis muestran claramente la relación entre la comunidad bacteriana, las proteínas, los sólidos totales volátiles y el carbono orgánico total.

#### Análisis de remoción de hidrocarburos

Con respecto al análisis de los resultados obtenidos para el experimento 1 de las concentraciones de hidrocarburos de fracción media (HFM) mostrados en los resultados de las tablas 5.3, 5.4 y 5.6, se determina que la mayor remoción obtenida se presenta en el suelo con 200 gramos de harina de sangre, siendo esta de 44.1% con base en la concentración inicial del experimento (11283.9 [mg/kg]). En el caso del suelo con 100 gramos de harina de sangre se presenta una remoción de HFM del 24.1% y las muestras testigo presentan un porcentaje de remoción bajo de 7.3%.

Se concluye que existe una remoción de HFM significativa (44%) a las siete semanas de la experimentación con la adición de 200 gramos de HS al suelo contaminado; interpretándose que existe una adaptación de los microorganismos, tanto a las condiciones del suelo como de la harina de sangre que se agregó; donde se

presenta que a mayor cantidad de harina de sangre se observa un mayor número de microorganismos, por lo que se obtiene una mayor remoción de HFM.

Para el caso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), al analizar los resultados mostrados en las tablas V.8 a V.13, se presenta que existe una mayor remoción de los hidrocarburos a mayor cantidad de harina de sangre que corresponde a una mayor población de microorganismos, observándose un promedio de remoción de casi el 50% en los HAP analizados.

Se concluye que los microorganismos heterótrofos contenidos en el suelo estudiado poseen una alta adaptabilidad a las condiciones del medio, logrando no solo su adaptación, crecimiento y mantenimiento en el suelo inicial, sino también al agregado de la harina de sangre, que facilitó el desarrollo de estos, así como su capacidad de degradación y, en consecuencia, la remoción de los hidrocarburos, tanto HFM como HAP, estos últimos difíciles de degradar como lo muestra la literatura.

Con respecto a los resultados de volatilización, se obtuvo que el promedio del porcentaje de remoción de HFM fue de 4.02%, y como se mencionó anteriormente, este porcentaje no presenta un cambio representativo en los resultados obtenidos.

Con respecto a los resultados obtenidos para el experimento de fotólisis, se observa un cambio poco significativo para la remoción del hidrocarburo ya que, al analizar los datos, se tiene un porcentaje de remoción de HFM de menos del 3%; por lo que se considera que la exposición a la luz del ambiente no presenta una influencia en la remoción de HFM.

Al analizar los procesos de volatilización y fotólisis, se concluye que las pérdidas no son considerables en ninguno de los hidrocarburos analizados; y la remoción presentada puede ser atribuible al manejo de la muestra, a las pérdidas en la extracción y cuantificación, así como al porcentaje de recuperación.

Así mismo, se concluye que el conjunto de la biorremediación mediante la bioestimulación con harina de sangre y con la constante adición de oxígeno a los microorganismos mediante la aireación continua y la humedad son factores de influencia en la remoción de HFM y HAP en el suelo estudiado; indicando que existe una correlación entre la harina de sangre, la cantidad de microorganismos y la remoción de hidrocarburos.

## **VI.2 RECOMENDACIONES**

De acuerdo con los resultados, es recomendable llevar a cabo un experimento de continuidad, donde el suelo contaminado sea similar al analizado, con una cantidad de harina de sangre de 200 gramos por cada kilogramo de suelo y con un tiempo de experimentación mayor de, al menos, 15 semanas.

De igual manera, es recomendable llevar a cabo un experimento donde se realice un estudio de bacterias degradadoras mediante un análisis de reacción en cadena de la polimerasa o PCR, con el fin de identificar este tipo de bacterias existentes en el suelo y su posible incremento.

## REFERENCIAS

Aguilar, A. (2023). *Efecto de la contaminación del suelo con diferentes concentraciones de petróleo sobre la nodulación por rizobios en plantas de Medicago sativa y sobre su biomasa aérea y subterránea*. Consultado el 24 de enero de 2023, de: <http://132.248.9.195/ptd2023/mayo/0840355/Index.html>

Al-Hawach, A., et all. (2018). *The Egyptian Journal of Aquatic Research. Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment*, pp. 71-76. Consultado el 29 de enero de 2024, doi: 10.1016/j.ejar.2018.06.001

Andrades, M., Moliner, A & Masaguer, A. (2015). *Prácticas de edafología. Métodos didácticos para análisis de suelos*. España: Universidad de la rioja.

Bush, L. M. (2022). *Introducción a las bacterias*. Consultado el 29 de julio de 2024, de: <https://www.msmanuals.com/es-mx/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-introducci%C3%B3n/introducci%C3%B3n-a-las-bacterias>

Carey, F. A. (2023). *Hydrocarbon*. Consultado el 15 de noviembre de 2023, de: <https://www.britannica.com/science/hydrocarbon>

Carrillo, C. N. & Papacristofilou, S. I. J. (s. f.). *Derivados del petróleo. El diésel*. Consultado el 30 de julio de 2024, de: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/241728/DieselFT.pdf>

Centro de estudios sociales y de opinión pública. (2006). *Antecedentes*. Consultado el 15 noviembre de 2023, de: [http://archivos.diputados.gob.mx/Centros\\_Estudio/Cesop/Eje\\_tematico/2\\_mambiente.htm#\[Citar%20como\]](http://archivos.diputados.gob.mx/Centros_Estudio/Cesop/Eje_tematico/2_mambiente.htm#[Citar%20como])

De Jesús, E. E. & Ruiz, U. (2012). *La remediación de sitios contaminados*. Consultado el 30 de julio de 2024, de: <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/Libros2011/CD001404.pdf>

De la Trinidad, K. L. (2024). *Evaluación de la factibilidad técnica y económica de procesos de remoción de nitrógeno amoniacal y materia orgánica en fuentes de agua subterránea para suministro de agua potable en la Ciudad de México*. Consultado el 30 de julio de 2024, de: [http://132.248.9.195/ptd2024/ene\\_mar/0852562/Index.html](http://132.248.9.195/ptd2024/ene_mar/0852562/Index.html)

De los Cobos, D. (septiembre, 2024). *¿Cómo tratar la contaminación de suelos y acuíferos usando microorganismos? Un enfoque básico para definir su pertinencia y algunas estrategias experimentales*. Ponencia presentada en el 8vo. Curso de Soluciones a la Contaminación de Suelos y Acuíferos, Ciudad de México, México.

Diario Oficial de la Federación. (1995). *NORMA Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*. Consultado el 06 de febrero de 2024, de: <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69532.pdf>

Diario Oficial de la Federación. (1995). *NORMA Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico*. Consultado el 06 de febrero de 2024, de: [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4883170&fecha=16/10/1995#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4883170&fecha=16/10/1995#gsc.tab=0)

Diario Oficial de la Federación. (2003). *Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos*. Consultado el 22 de enero de 2024, de: <https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LGPGIR.pdf>

Diario Oficial de la Federación. (2013). *Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación*. Consultado el 18 de septiembre de 2023, de: <https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/6646/1/nom-138-semarnat.ssa1-2012.pdf>

Diario Oficial de la Federación. (2020). *NORMA MEXICANA. NMX-AA-187-SCFI-2021. Análisis de Agua-Medición de Carbono Orgánico Total en Aguas naturales, Salinas, Residuales y Residuales Tratadas*. Consultado el 06 de febrero de 2024, de: <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/NMX-AA-187-SCFI-2021.pdf>

Encyclopædia Britannica. (s.f.). *pH*. Britannica Academic. Consultado el 25 de septiembre de 2023, de: <https://academic-eb-com.pbidi.unam.mx:2443/levels/collegiate/article/pH/59549>

Estado de México. (2021). *Contaminación del Medio Ambiente*. Consultado el 25 de octubre de 2023, de: [https://edomex.gob.mx/medio\\_ambiente\\_2021](https://edomex.gob.mx/medio_ambiente_2021)

Fernández, L. C., et al. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. Consultado el 15 de noviembre de 2023, de: <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/Libros2011/CG008215.pdf>

Fraga, I. (2016). *Reducción de microcontaminantes orgánicos persistentes en medios acuosos: fotodegradación directa y degradación fotocatalizada de propranolol en agua de mar*. Consultado el 31 de enero de 2024, de: [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/16373/FragaDominguez\\_Isabel\\_TFM\\_2012.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/16373/FragaDominguez_Isabel_TFM_2012.pdf?sequence=2&isAllowed=y)

García, L. (s. f.). *Hidrocarburos alifáticos y aromáticos, características y nomenclatura*. Consultado el 15 de noviembre de 2024, de: <https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/prepa4/n4/m11.html#refe1>

Gisbert, J., et al. (2011). *VERTISOLES*. Consultado el 17 de enero de 2024, de: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12869/Vertisoles.pdf>

Hernández, J. J. (2024). *La volatilidad en la vida*. Consultado el 30 de julio de 2024, de: <https://www.uv.mx/cienciauv/blog/la-volatilidad-en-la-vida/>

Iturbe, R. (2014). *Suelos y Acuíferos Contaminados. Evaluación y limpieza. Capítulo 6. Técnicas biológicas de remediación de suelos y acuíferos*. TRILLAS. ISBN: 978-607-17-1982-9

Jiang, J., et al (2014). Food safety: Food análisis Technologies/Tecnicas. Consultado el 08 de enero de 2024, de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444525123000528?via%3Dihub>

Laboratorio de Ingeniería Ambiental. Coordinación de Ingeniería Hidráulica y Ambiental. (2023). *Nitrógeno Kjeldahl*. México: Instituto de Ingeniería, UNAM.

Liang, C., et al (2019). *Quantitative assessment of microbial necromass contribution to soil organic matter*. Consultado el 04 de abril de 2024, de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gcb.14781>

Martínez, E., Fuentes, J. P. y Acevedo, E. (2008). *Carbono orgánico y propiedades del suelo*. Consultado el 14 de febrero de 2024, de: [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-27912008000100006](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-27912008000100006)

Miguel, J. D. (2013). *Cobertura vegetal, materia orgánica y pH en suelo y su relación con el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI) en el Parque Nacional Iztaccíhuatl-Popocatepetl*. (pp. 20). Consultado el 18 de septiembre de 2023, de: <http://132.248.9.195/ptd2013/septiembre/0701015/Index.html>

Morales, M. E. (s. f.). *La biología de los microorganismos*. Consultado el 30 de julio de 2024, de: <https://www.oaxaca.gob.mx/ageo/la-biologia-de-los-microorganismos/>

Moreno, H. (2017). *Residuos peligrosos y pasivos ambientales en México. Una comparación de normativas ambientales*. Consultado el 08 de noviembre de 2023, de: <http://eprints.uanl.mx/19235/1/Homero%20Moreno%20Montemayor.pdf>

Moyao, C. (1991). *Electrodos modificados*. Consultado el 30 de julio de 2024, de: <http://132.248.9.195/pmig2016/0171049/Index.html>

Noguera, B. (2020). *¿Qué son los hidrocarburos alifáticos?* Consultado el 24 de enero de 2024, de: <https://www.ingenieriaquimicareviews.com/2020/09/hidrocarburos-alifaticos.html>

Páez, G. A. (2019). *Evaluación económica de la conversión de residuos de petróleo mediante combinación de procesos de hidrotratamiento y coquización*. Consultado el 30 de julio de 2024, de: <http://132.248.9.195/ptd2019/agosto/0794900/Index.html>

Pascual, R. & Venegas, S. (s.f.). *La materia orgánica del suelo. Papel de los microorganismos*. Consultado el 04 de abril de 2024, de: <https://www.ugr.es/~cjl/MO%20en%20suelos.pdf>

Pizaña, E. (2013). *Hidrocarburos Alifáticos*. Consultado el 15 de noviembre de 2023, de: <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/15211/7/NOMENCLATURA.pdf>

Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (Profepa). (s. f.). *Glosario Impacto Ambiental*. Consultado el 30 de julio de 2024, de: [https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/1431/1/mx/glosario\\_impacto\\_ambiental.html?num\\_letra=3&num\\_letra\\_siguiente=4](https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/1431/1/mx/glosario_impacto_ambiental.html?num_letra=3&num_letra_siguiente=4)

Ruiz, S. (2001). *Desarrollo de métodos de electroforesis capilar en fase micelar. Aplicación al análisis de herbicidas y de sus productos de degradación. Capítulo V: Estudio de degradación*. Consultado el 31 de enero de 2024, de: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6423/08cap5.pdf;sequence=8>

Scandroglio, R. D. y Barrionuevo, M. E. (2020). *Prácticas sustentables: Uso de harina de sangre como fertilizante*. Consultado el 25 de octubre de 2023, de: [https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/9876/INTA\\_CRPatagoniaNorte\\_%c3%81realInvestigaci%c3%b3nyDesarrolloTecnolog%c3%adaAgriculturaFamiliarRegi%c3%b3nPatagonia\\_Pr%c3%a1cticas\\_sustentables\\_uso\\_harina\\_como\\_fertilizante.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/9876/INTA_CRPatagoniaNorte_%c3%81realInvestigaci%c3%b3nyDesarrolloTecnolog%c3%adaAgriculturaFamiliarRegi%c3%b3nPatagonia_Pr%c3%a1cticas_sustentables_uso_harina_como_fertilizante.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). *¿Qué es y para que sirve el fertilizante?* Consultado el 29 de julio de 2024, de: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/que-es-y-para-que-sirve-el-fertilizante>

Secretaría de Energía. (2015). *¿Qué son los hidrocarburos?* Consultado el 15 de noviembre de 2023, de: <https://www.gob.mx/sener/articulos/que-son-los-hidrocarburos>

Secretaría de Economía. (2015). *NORMA MEXICANA NMX-AA-034-SCFI-2015. Análisis de agua. Medición de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba*. Consultado el 06 de febrero de 2024, de: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166146/nmx-aa-034-scfi-2015.pdf>

Secretaría de Economía. (2016). *La Normalización en México: cuáles son sus funciones y beneficios para el consumidor*. Consultado el 29 de julio de 2024, de: <https://www.gob.mx/se/articulos/la-normalizacion-en-mexico-cuales-son-sus-funciones-y-beneficios-para-el-consumidor>

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2008). *Compendio de Estadísticas Ambientales*. Consultado el 30 de julio de 2024, de: [https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe\\_2008\\_ing/compendio\\_2008/compendio2008/10.100.8.236\\_8080/ibi\\_apps/WFServletcead.html](https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe_2008_ing/compendio_2008/compendio2008/10.100.8.236_8080/ibi_apps/WFServletcead.html)

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). (2014). *7.4.1 Sitios contaminados*. Consultado el 08 de noviembre de 2023, de: [https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe\\_resumen14/07\\_residuos/7\\_4\\_1.html](https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe_resumen14/07_residuos/7_4_1.html)

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2021). *Programa Nacional de Remediación de Sitios Contaminados 2021-2024*. Consultado el 22 de enero de 2024, de: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/681183/PNRSC-2021-2024.pdf>

Secretaria de Medio Ambiente y recursos Naturales. (2021). *Trámite SEMARNAT 07 035 B*. Consultado el 22 de enero de 2024, de: <https://www.gob.mx/semarnat/documentos/tramite-semarnat-07-035-b>

Secretaria de Salud. (2015). *Normas Oficiales Mexicanas*. Consultado el 29 de julio de 2024, de: <https://www.gob.mx/salud/en/documentos/normas-oficiales-mexicanas-9705>

Sotelo, E., et al. (2008). *Historia y desarrollo de la clasificación de vertisoles en el sistema FAO y la taxonomía*. Consultado el 17 de enero de 2024, de: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792008000400005](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792008000400005)

Speight, J. G. (2017). *Environmental Organic Chemistry for Enginners*. Chapter 2: Organic Chemistry. Betterworth-Heinemann, pp. 50-59. Consultado el 24 de enero de 2024, doi: 10.1016/B978-0-12-804492-6.00002-2

United States Environmental Protection Agency (EPA). (2010). Reference Guide to Non-combustion Technologies for Remediation of Persistent Organic Pollutants in Soil. Chapter 3: Anaerobic Bioremediation Using Blood Meal, pp. 25-27. Consultado el 06 de marzo de 2024, de: <https://semspub.epa.gov/work/HQ/151748.pdf>

United States Environmental Protection Agency (EPA). (2017). *How to evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites. A Guide For Corrective Action Plan Reviewers. Chapter V: Landfarming*. Consultado el 29 de enero de 2024, de: [https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-03/documents/tum\\_ch5.pdf](https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-03/documents/tum_ch5.pdf)

Verdenelli, R. A., et al. (2019). *Proteínas y perfiles SDS-PAGE de los suelos agrícolas bajo fertilizante mineral*. Consultado el 04 de abril de 2024, de: <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/FCEFYN/article/view/20860/23401>

Wang, H., et al. (2017). In-Situ Bioremediation of DDTs and PAH Contaminated Aging Farmland Soil Using Blood Meal. Consultado el 06 de marzo de 2024, de: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15320383.2017.1385593>

## ANEXOS

### Anexo 1 Concentraciones de hidrocarburos en muestras de suelo contaminado al inicio del experimento

	Muestras testigo			Muestras con 50 g de HS			Muestras con 100 g de HS		
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
HFM	11541.5	10856.1	17097.4	11351.7	18022.0	11520.1	10395.5	12186.8	11269.4
HAP									
Benzo(a)antraceno	305.45		266.53		266.95		179.21		286.35
Benzo(a)pireno	313.98		351.53		346.81		200.71		293.06
Benzo(b)fluoranteno	448.31		545.14		525.38		292.55		399.28
Benzo(k)fluoranteno	127.88		139.42		137.51		83.31		123.48
Dibenzo(a,h)antraceno	72.5		96.96		96.45		52.37		68.16
Indeno(1,2,3,c-d)pireno	228.97		310.48		304.24		174.69		225.98
Conteo de bacterias [NMP]					2,700,000			1,600,000	

### Anexo 2 Concentraciones de hidrocarburos en muestras de suelo contaminado 3 semanas después del inicio del experimento

	Muestras testigo			Muestras con 50 g de HS			Muestras con 100 g de HS		
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
HFM	8237.9	9443.4	14290.3	10376.3	12279.7	8821.5	5871.8	10193.1	10203.8
HAP									
Benzo(a)antraceno	199.64	244.49	195.13	250.68	184.48	222.21	99.49	279.18	249.48
Benzo(a)pireno	214.28	261.71	251.20	259.18	240.61	234.55	117.86	298.11	258.41
Benzo(b)fluoranteno	289.43	330.36	345.44	330.88	320.31	298.23	150.49	388.57	334.16
Benzo(k)fluoranteno	87.50	100.96	96.10	99.12	88.81	89.04	38.83	112.85	97.75
Dibenzo(a,h)antraceno	50.08	44.36	72.50	59.47	71.62	53.12	35.69	69.32	58.81
Indeno(1,2,3,c-d)pireno	153.74	143.43	236.44	188.60	224.40	172.45	113.10	223.05	190.72
Conteo de bacterias [NMP]					1,800,000,000			910,000,000	

### Anexo 3 Concentraciones de hidrocarburos en muestras de suelo contaminado 7 semanas después del inicio del experimento

	Muestras testigo			Muestras con 100 g de HS			Muestras con 200 g de HS		
	A1	A2	A3	A2-4	A2-5	A2-6	A2-7	A2-8	A2-9
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
HFM	10475.4	11024.9	15095.3	8314.5	14599.4	8113.2	4285.6	6760.6	7892.7
HAP									
Benzo(a)antraceno	199.84	213.36		160.96	206.19		63.08	126.46	151.05
Benzo(a)pireno	217.61	239.64		170.95	248.16		69.58	137.17	162.14
Benzo(b)fluoranteno	273.62	305.50		190.44	319.74		91.95	165.91	210.77
Benzo(k)fluoranteno	97.28	98.99		67.50	99.48		29.07	62.94	64.61
Dibenzo(a,h)antraceno	45.63	55.24		35.37	75.2		25.41	36.68	37.92
Indeno(1,2,3,c-d)pireno	150.20	156.15		104.15	155.01		53.79	77.35	86.43
Conteo de bacterias [NMP]	2,200,000				2,200,000,000			4,000,000,000	

Anexo 4 Concentraciones de hidrocarburos para experimento de volatilización con frascos abiertos

	<b>VOL-1</b>	<b>VOL-2</b>	<b>VOL-3</b>	<b>PROMEDIO</b>
	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>
<b>HFM</b>	13043.0	11037.8	10866.7	11649.2
<b>HAP</b>				
<b>Benzo(a)antraceno</b>	145.82		148.6	147.21
<b>Benzo(a)pireno</b>	185.26		190.02	187.64
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	241.47		252.48	246.98
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	81.82		74.45	78.14
<b>Dibenzo(a,h)antraceno</b>	49.32		49.93	49.63
<b>Indeno(1,2,3,c-d)pireno</b>	114.72		115.62	115.17

Anexo 5 Concentraciones de hidrocarburos para experimento de volatilización con frascos cerrados

	<b>VOLC-1</b>	<b>VOLC-2</b>	<b>VOLC-3</b>	<b>PROMEDIO</b>
	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>
<b>HFM</b>	13074.9	10972.2	12366.0	12137.7
<b>HAP</b>				
<b>Benzo(a)antraceno</b>	152.27		153.04	152.66
<b>Benzo(a)pireno</b>	200.47		194.63	197.55
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	258.06		252.54	255.30
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	86.06		85.97	86.02
<b>Dibenzo(a,h)antraceno</b>	48.43		44.61	46.52
<b>Indeno(1,2,3,c-d)pireno</b>	111.37		108.33	109.85

Anexo 6 Concentraciones de hidrocarburos para experimento de fotólisis con frascos expuestos

	<b>FOT-1</b>	<b>FOT-2</b>	<b>FOT-3</b>	<b>PROMEDIO</b>
	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>	<b>mg/kg</b>
<b>HFM</b>	11969.8	11740.4	12277.3	11995.8
<b>HAP</b>				
<b>Benzo(a)antraceno</b>	143.74			143.74
<b>Benzo(a)pireno</b>	183.86			183.86
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	238.59			238.59
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	79.85			79.85
<b>Dibenzo(a,h)antraceno</b>	43.1			43.10
<b>Indeno(1,2,3,c-d)pireno</b>	101.94			101.94

Anexo 7 Concentraciones de hidrocarburos para experimento de fotólisis con frascos cerrados y cubiertos

	FOTC-1	FOTC-2	FOTC-3	PROMEDIO
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
<b>HFM</b>	11958.5	11750.2	11311.2	11673.3
<b>HAP</b>				
<b>Benzo(a)antraceno</b>	135.88			135.88
<b>Benzo(a)pireno</b>	175.24			175.24
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	196.14			196.14
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	79.70			79.70
<b>Dibenzo(a,h)antraceno</b>	28.42			28.42
<b>Indeno(1,2,3,c-d)pireno</b>	89.03			89.03

Anexo 8 Resultados de porcentaje de carbono orgánico

Muestra	% C org
1	6.32
	6.59
2	7.98
	8.13
3	11.68
	11.86
4	13.56
	13.09
5	14.70
	15.07

Anexo 9 Resultados de proteína presente en muestras

Muestras	S [g]	Ácido sulfúrico gastado [ml]	NK [%]	Proteína [%]
Blanco <sub>1</sub>	0	0.7		
Blanco <sub>2</sub>	0	0.4		
1	0.5018	3.3	0.15	0.91
2	0.5006	3.5	0.17	1.08
3	0.5018	9	0.46	2.89
4	0.5002	12	0.65	4.06
5	0.5013	16.4	0.88	5.48
6	0.5012	16.4	0.89	5.59
7	0.5001	23.2	1.26	7.87
8	0.5011	23.4	1.29	8.03
9	0.5009	44	2.42	15.13
10	0.5013	37.3	2.06	12.88

Anexo 11 Resultados del cálculo de sólidos totales volátiles para muestras

Cápsulas	m <sub>1</sub> [g]	m <sub>1</sub> + V [g]	V [g]	m <sub>3</sub> [g]	m <sub>4</sub> [g]	STV [%]
1	41.9346	42.9345	0.9999	42.9101	42.8143	9.5810
2	50.5728	51.5730	1.0002	51.5522	51.4547	9.7481
3	41.4505	42.4500	0.9995	42.3762	42.2405	13.5768
4	49.2682	50.2686	1.0004	50.2044	50.0598	14.4542
5	38.7250	39.7258	1.0008	39.6597	39.496	16.3569
6	38.0871	39.0874	1.0003	39.0047	38.8541	15.0555
7	42.1709	43.1765	1.0056	43.0537	42.8635	18.9141
8	42.7005	43.7040	1.0035	43.5912	43.4003	19.0234
9	42.5742	43.5753	1.0011	43.4584	43.2322	22.5951
10	41.4245	42.4554	1.0309	42.3683	42.1341	22.7180