

00551

7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

24.

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DEGRADACION DE DIESEL Y DE HIDROCARBUROS
POLINUCLEO AROMATICOS ADSORBIDOS EN
SUELO POR *Pleurotus ostreatus*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A :

Z. VANESSA HERNANDEZ RODRIGUEZ

274271

CUERNAVACA, MORELOS.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE BIOINGENIERIA

TESIS DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

Degradación de Diesel y de Hidrocarburos Polinúcleo Aromáticos

Adsorbidos en Suelo por *Pleurotus ostreatus*

Presenta

IBQ. Z. Vanessa Hernández Rodríguez

Asesor de tesis

Dr. Facundo J. Márquez Rocha

Agradecimientos

El presente proyecto se llevó a cabo gracias al apoyo económico del Instituto Mexicano del Petróleo a través del proyecto FIES-95-108-VI y a DGAPA (IN 220597/UNAM). De la misma manera agradezco el apoyo económico de CONACYT para la realización de los estudios de Maestría.

Agradezco especialmente al Dr. Facundo Márquez Rocha por la confianza, apoyo y asesoría que me brindó durante la realización de mis estudios de Maestría y en la elaboración de la tesis.

Agradezco al Dr. Rafael Vázquez Duhalt por su asesoramiento académico y por haberme permitido realizar la tesis en su laboratorio, en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Te agradezco a tí, porque de una manera u otra contribuiste en la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias Bioquímicas.

A mis padres, Remigio y Teresa, son lo máximo.

A mis hermanas, Marissa y Tita, son lo mejor.

A Edgarcito, porque llenas ahora mi lugar (por eso te pareces a mi).

Max, Boris, Lorenzo y Jacobo, los quiero mucho.

A Rikrdo, por ser mi mundo, te amo.

Indice General

	Página
Nomenclatura	i
Indice de Figuras	ii
Indice de Tablas	iv
Resumen	1
1 Introducción	2
2 Antecedentes	
2.1 Impacto ambiental del petróleo	4
2.1.1 Composición y fuente de generación de hidrocarburos	7
2.1.2 Problemas a la salud causados por hidrocarburos	10
2.2 Métodos de tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos	14
2.2.1 Biorremediación de suelos	15
2.3 Metabolismo de hidrocarburos polinúcleo aromáticos	20
2.3.1 Hongos lignolíticos en la degradación de HPA	23
2.4 Mecanismo de acción de monooxigenasas	33
2.5 Limitaciones en la biorremediación de suelos	37
2.5.1 Tiempo de añejamiento del suelo	37
2.5.2 Tipo de suelo	38
2.5.3 Concentración del contaminante	39
2.5.4 Adición de surfactantes	39
2.5.5 Otros aspectos que limitan la biorremediación de suelos	43
3 Objetivos	45
4 Material y Métodos	
4.1 Reactivos	46
4.2 Microorganismos y medios de cultivo	46
4.2.1 Consorcio microbiano	46
4.2.2 Hongo	47

4.3	Análisis del suelo	48
4.4	Cinética de degradación de diesel	48
4.4.1	Cinética de consumo de diesel en medio líquido	48
4.4.1.1	Determinación de proteína	49
4.4.2	Cinética de degradación de diesel adsorbido en suelo	49
4.4.3	Análisis cualitativo del diesel	50
4.5	Cinéticas de degradación de hidrocarburos polinúcleo aromáticos	50
4.5.1	Establecimiento de los sistemas de degradación	50
4.5.2	Extracción de HPA's	54
4.5.3	Análisis de HPA's	54
4.6	Degradación de benzo[a]pireno	54
4.6.1	Determinación de la producción de CO ₂ y mineralización de benzo[a]pireno	54
4.6.2	Análisis de la adsorción al suelo del benzo[a]pireno metabolizado	55
4.7	Determinación de la humedad de los sistemas	58
5	Resultados y discusión	
5.1	Análisis del suelo	59
5.2	Cinéticas de degradación de diesel	61
5.2.1	Cinética de consumo de diesel en medio líquido	61
5.2.2	Cinéticas de degradación de diesel adsorbido en suelo	64
5.3	Cinéticas de degradación de pireno por <i>Pleurotus ostreatus</i>	71
5.4	Cinéticas de degradación de antraceno y fenantreno por <i>Pleurotus ostreatus</i>	76
5.5	Degradación de benzo[a]pireno por <i>Pleurotus ostreatus</i>	79
5.5.1	Cinética de producción total de CO ₂ por <i>Pleurotus ostreatus</i> y mineralización de benzo[a]pireno	79
5.5.2	Análisis de la adsorción al suelo del benzo[a]pireno metabolizado	80
6	Conclusiones	82
7	Referencias	83
8	Anexos	92

Nomenclatura

Ant	Antraceno
B[a]p	Benzo[a]pireno
CMM	Concentración mínima mutagénica
CMC	Concentración micelar crítica
CP450	Citocromo P540
DCM	Diclorometano
DNA	Acido desoxirribonucléico
EPA	Environmental Protection Agency
Fen	Fenantreno
FMO	Flavin monooxigenasa
HC	Hidrocarburo
HLB	Balance hidrofílico-lipofílico
HPA	Hidrocarburo polinúcleo aromático
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Km	Constante Michaelis-Menden
MMM	Medio mineral mínimo
NAPL	Fase líquida no acuosa
Pir	Pireno
SEDESOL	Secretaría de Desarrollo Social
TX-100	Tritón X-100
T80	Tween 80
T40	Tween 40

Indice de figuras

Número		Página
1	Estructuras de hidrocarburos polinúcleo aromáticos	9
2	Ruta metabólica para la producción del último carcinógeno de benzo[a]pireno	12
3	Pasos propuestos para la biodegradación bacteriana de fenantreno	22
4	Ruta propuesta para el metabolismo de fenantreno por <i>P. ostreatus</i>	25
5	Camino propuesto para el metabolismo de fenantreno en cultivos de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	27
6	Ruta propuesta para el metabolismo de pireno por el hongo <i>P. ostreatus</i>	28
7	Metabolitos identificados durante la degradación del antraceno por <i>Pleurotus ostreatus</i>	29
8	Pasos en la activación de oxígeno y la oxidación del sustrato por varios CP450	35
9	Modelo conceptual de la disolución del hidrocarburo mediado por el surfactante	41
10	Sistema experimental en frasco para la degradación de diesel y HPA's	51
11	Sistema experimental en columnas para la degradación de HPA's por <i>Pleurotus ostreatus</i>	52
12	Sistema para el análisis de la producción de CO ₂	57
13	Degradación de diesel en medio líquido	61
14	Cromatografía de una muestra de diesel a tiempo 0	62
15	Cromatografía de una muestra de diesel a 320 h de incubación con el consorcio microbiano	63
16	Degradación de diesel adsorbido en suelo	64
17	Cromatograma control de una muestra de diesel	67
18	Cromatograma de una muestra de diesel después de 5 semanas de tratamiento con el hongo <i>P. ostreatus</i> y el consorcio microbiano	68

19	Cromatograma de una muestra de diesel después de 5 semanas de tratamiento con el hongo <i>P. ostreatus</i>	69
20	Cromatograma de una muestra de diesel después de 5 semanas de tratamiento con el consorcio microbiano	70
21	Degradación de pireno por <i>P. ostreatus</i> con 0.15% de surfactante	72
22	Degradación de pireno por <i>P. ostreatus</i> en frasco con diferentes aditivos	73
23	Degradación de pireno por <i>P. ostreatus</i> en columnas	75
24	Degradación de pireno por <i>P. ostreatus</i> en frascos	75
25	Degradación de antraceno por <i>P. ostreatus</i>	76
26	Degradación de fenantreno por <i>P. ostreatus</i>	77
27	Producción de CO ₂ total y degradación de benzo[a]pireno (mg/ml) adsorbido en suelo por <i>P. ostreatus</i> en columnas	79
28	Porcentaje de ¹⁴ C extraído del suelo después de 3 semanas de tratamiento, en la fase acuosa y en la fase orgánica	81

Indice de tablas

Número		Página
I	Concentración mínima mutagénica de algunos HPA's	12
II	Concentración máxima permisible de HPA's	13
III	Elementos básicos de la biorremediación	16
IV	Técnicas empleadas en la biorremediación	17
V	Susceptibilidad de los hidrocarburos a la biorremediación	19
VI	Solubilidad de algunos hidrocarburos polinúcleo aromáticos en agua	40
VII	Propiedades de surfactantes no iónicos	42
VIII	Experimentos realizados en el presente trabajo	53
IX	Características fisico-químicas del suelo	59

Resumen

Desde la década pasada se conoce que los hongos de putrefacción blanca tienen la capacidad de degradar y mineralizar hidrocarburos polinúcleo aromáticos debido a su semejanza estructural con la lignina, el sustrato natural. En el presente trabajo se utilizó un consorcio microbiano en la biodegradación de diesel en medio líquido y el hongo *Pleurotus ostreatus* en la biodegradación de diesel, pireno, antraceno, fenantreno y de benzo(a)pireno previamente adsorbidos en suelo. Después de un tiempo de incubación de cinco semanas en suelo con diesel adsorbido se detectó que la presencia del consorcio no aumenta significativamente la degradación del diesel. Se puede atribuir la remoción del diesel exclusivamente a la acción del hongo *P. ostreatus*. En los experimentos de hidrocarburos polinúcleo aromáticos adsorbidos en suelo se observó una disminución de HPA del 70%. Se observó que adicionando aditivos como Tween 40, H₂O₂ o mantener un flujo de aire húmedo a través del suelo se mejoró la degradación de pireno obteniendo un máximo de 80%. Observándose también una influencia negativa en la degradación por el tiempo de adsorción de HPA al suelo. En el caso del antraceno y fenantreno los resultados parecen indicar que la velocidad de desorción es mayor que la velocidad de degradación, por lo que no se encontró una mayor remoción de ellos en presencia de surfactantes. En los experimentos de llevados a cabo con benzo[a]pireno-C¹⁴ no se observó mineralización pero sí degradación e incluso se encontró ¹⁴C en los extractos acuosos, lo que supone que parte del benzo[a]pireno se transformó a compuestos menos hidrofóbicos.

1 Introducción

La biorremediación es un proceso para la remoción y desintoxicación de sistemas ecológicos contaminados con sustancias xenobióticas por tratamientos biológicos o bioquímicos.

Los hidrocarburos polinúcleo aromáticos (HPA), son compuestos que tienen dos o más anillos aromáticos, se encuentran ampliamente distribuidos en el medio (agua, suelo y aire), en diferentes concentraciones y proporciones. Estos pueden estar sustituidos por grupos nitro- e hidroxilo- y formando mezclas complejas. El origen de muchos de estos compuestos no es de carácter biosintético pero pueden ser derivados de la pirrólisis natural de compuestos orgánicos. Se encuentran principalmente en el petróleo crudo y se producen durante la combustión incompleta de éste, sus derivados o de otros materiales orgánicos; también se han encontrado durante el cocimiento de alimentos y en subproductos industriales (36, 41, 65, 79, 82).

En sitios contaminados, la remoción de los HPA es muy difícil debido a su carácter hidrofóbico. Esta última propiedad hace que los HPA se unan fuertemente a la materia orgánica del suelo disminuyendo su biodisponibilidad por lo que su biodegradación se ve disminuída. Una biodisponibilidad reducida de contaminantes en suelo es causado por la baja transferencia de masa a los microorganismos degradadores, por lo que los contaminantes y las bacterias tienen una distribución microscópica diferente en el suelo y los compuestos deben primero difundirse hacia las bacterias para ser tomados y degradados. Los hidrocarburos rápidamente se asocian con la materia orgánica del suelo y con los sedimentos donde llegan a ser adsorbidos y persisten hasta que son degradados, resuspendidos, bioacumulados o removidos por el hombre (14).

El uso de surfactantes puede disminuir los problemas de transferencia de masa inherentes a los HPA, debido a que ayudan en la liberación de los contaminantes hidrofóbicos adsorbidos a la materia orgánica, reducen la tensión interfacial liberando los

contaminantes atrapados en los poros por las fuerzas de capilaridad que incrementan la transferencia de masa, para así hacerlos disponibles hacia los microorganismos (87).

Para la remoción de HPA del suelo, se ha sugerido el uso de microorganismos que tengan la capacidad de transformarlos a compuestos menos tóxicos, considerando que muchos de estos compuestos son agentes potencialmente mutagénicos y/o carcinogénicos. Estos compuestos pueden ser totalmente degradados (mineralizados) o pueden ser parcialmente transformados, por un microorganismo o una comunidad de ellos. El uso de un diverso grupo de hongos lignolíticos y no lignolíticos para la remoción de HPA ha despertado gran interés ya que algunos de estos hongos, como *Pleurotus ostreatus*, pueden utilizar cometabólicamente HPA, tales como el benzo[a]pireno, pireno, antraceno, entre otros (9).

En situaciones donde la población microbiana es pequeña, la inoculación con una población activa de cepas degradadoras, las cuales tendrán un amplio espectro de propiedades metabólicas, es una opción para mejorar la velocidad de degradación y reducir el período de aclimatación. Esta técnica es conocida como bioaumentación (62).

En el presente trabajo se analizó la degradación de hidrocarburos adsorbidos en suelo. El diesel, como un ejemplo de hidrocarburo que contiene una mezcla de hidrocarburos alifáticos y el pireno, antraceno, fenantreno y benzo[a]pireno como compuestos modelo de hidrocarburos polinúcleo aromáticos. También se analizó la influencia de agentes externos como la aereación y adición de tensoactivos, peróxido de hidrógeno en la degradación de los hidrocarburos polinúcleo aromáticos en el suelo durante el proceso de biorremediación.

2 Antecedentes

2.1 Impacto Ambiental del petróleo.

El petróleo, el oro negro, como se le conoce porque es la base del progreso, irónicamente es ahora una amenaza en el ambiente. Las combustiones incompletas, los derrames en suelo y agua, el manejo inadecuado de los combustibles durante la extracción, refinación y transporte han ocasionado daños no sólo al hombre sino también a la flora y fauna del ambiente.

A nivel mundial se han creado leyes y regulaciones ambientales dando lugar a la formación de un mercado de tratamiento de suelos contaminados. En México existen programas de tratamiento ambiental y leyes desde hace más de 30 años, pero enfocados al mejoramiento de la calidad del aire y agua. A falta de una normatividad propia, las autoridades ambientales mexicanas han establecido procedimientos y límites de limpieza a partir de información extranjera, principalmente de Estados Unidos. No existe aún una legislación con criterio propio que regule la contaminación en suelos del territorio nacional. Países europeos como Alemania, Holanda, Inglaterra e Italia, se enfocan en la biorremediación de su suelos con el fin de obtener, posteriormente, un provecho (15). En nuestro país, invertir en la biorremediación es considerado como una mala inversión.

Por el contrario la política de los Estados Unidos ha sido basada en la existencia de leyes las cuales cubren la seguridad en el trabajo, el ambiente, la agricultura, el procesamiento de alimentos, la producción de fármacos y la salud pública. En lo relativo a la biorremediación existen 4 reglamentos que deben ser consideradas con el fin de asegurar el cumplimiento con las regulaciones existentes. Estas son el Acta del Control de Sustancias Tóxicas (TSCA por sus siglas en inglés); el Acta de Comprensiva Respuesta Ambiental, Compensación y Responsabilidad (CERCLA); el Acta de Conservación y Recuperación de los Recursos (RCRA) y el Acta de Pesticidas en Plantas Federales

(FPPA). Todos estos estatutos se encuentran bajo la jurisdicción de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) (65).

Otro grave problema en nuestro país es la falta de programas multidisciplinarios que integren campos tales como microbiología, ingeniería, geología, ciencia de los suelos, entre otras, que permitan desarrollar e implementar sistemas de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. En septiembre de 1971 fue expedida la Ley Federal para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental; para Aguas en marzo de 1973; para Emisión de Ruidos en diciembre de 1982 y para la Descarga de Desechos al Mar en enero de 1979 y se establecieron niveles máximos permisibles de contaminación para descargas de aguas residuales. Posteriormente se expidió la Ley Federal para la Protección Ambiental en febrero de 1982 donde el ordenamiento principal de esta ley fue expedir las normas técnicas que incluyeron los Límites Máximos Permisibles de Contaminantes para Aguas Residuales, su uso y explotación. Esta ley fue derogada por la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA) decretada en 1988, para cumplir, los reglamentos y la normatización particular para prevenir la contaminación ambiental y fueron emitidas sobre Impacto Ambiental, Contaminación Atmosférica, Control de Emisiones de vehículos automotores que circulan en la Ciudad de México y Area Metropolitana, Desechos Peligrosos y para la Transportación de Material y Desechos Peligrosos. Como puede verse no existen leyes que regulen la calidad de los suelos en México. Sin embargo, los hidrocarburos pueden entrar en el área de Desechos peligrosos, aún cuando ésta no cuenta con los parámetros para controlar la contaminación. Una sustancia peligrosa es un material que puede provocar un daño a los organismos vivos, materiales, estructuras o el ambiente por explosión o peligro de fuego, corrosión, toxicidad a organismos u otros efectos perjudiciales (65).

A pesar del gran interés en la eliminación de desechos peligrosos, aún no se cuenta con información completa disponible en materia de la importancia cuantitativa y composición de la contaminación por hidrocarburos. Las fuentes de contaminación por petróleo son diversas, a nivel mundial se estima que anualmente entre 5 y 10 millones de

toneladas de hidrocarburos entran a los océanos, de ellos, casi un 45 % ocurre por el manejo del petróleo en barcos y un 37 % proviene de desagües industriales y desperdicios urbanos y sólo el 2 % por actividad de explotación y producción (69). También hay derrames crónicos en refinerías, en el transporte y en aguas de proceso. En la producción primaria, los problemas de contaminación se generan por las actividades en baterías de separación, plantas de deshidratación, presas de pozos y fugas accidentales por roturas de líneas. Los desechos llegan por lo general a cuerpos de agua, ríos, así como a terrenos agrícolas y ganaderos, siendo un riesgo para la salud humana (71).

Según PEMEX, dos de los lugares más contaminados por hidrocarburos en México son la refinería Lázaro Cárdenas y el Pantano de Santa Alejandrina, ambos ubicados en el sureste del país. La refinería a afectado un área de 70 hectáreas así como 3 km del arroyo San Francisco, el cual se cubrió con una capa uniforme de aceite de hasta 50 cm de espesor. Sólo durante 1994, la Procuraduría Federal de Protección al Medio Ambiente recibió reportes de 88 fugas de hidrocarburo en el estado de Tabasco, por un volumen de 3,000 barriles, los cuales afectaron 52,178 m² de pastizales; 30,626 m² de zonas pantanosas y 200 m² de superficies acuáticas. De las fugas reportadas, sólo se atendieron 35. Se calcula que en 1991 se generaron 5,424,292 mil toneladas al año de residuos peligrosos y se ha estimado que el 2.4 % son derivados del petróleo, es decir, 130,183 ton/año (71).

SEDESOL mencionó que los residuos anuales de los procesos de refinación y petroquímicos de PEMEX alcanzan la cifra de 1.7 millones de toneladas de residuos; de éstos el 90.15 % corresponde a desperdicios semisólidos; 9.6 % a líquidos y 0.25 % a sólidos; 18 % del total se consideran peligrosos, tal es el caso de los HPA. Los residuos reciclados representan 0.1 % y se estima que sólo el 13 % del total es susceptible de ser reutilizado (77). En el Golfo de México, el 50 % de los sistemas costeros rebasan el límite de 10 partes por billón (ppb) de hidrocarburos para aguas superficiales no contaminados establecidos por la UNESCO (62). La EPA enlistó en 1994, 40,000 sitios de desechos peligrosos no controlados, sólo en los Estados Unidos (66).

La política ambiental en el país recibió un tratamiento prioritario en el Plan Nacional de Desarrollo 1989-1994. Así también el Programa Nacional para la Protección del Medio Ambiente (PNPMA) fue aprobado con el objetivo de armonizar el crecimiento económico con el reestablecimiento de la calidad del ambiente, promoviendo la conservación y el aprovechamiento racional de los recursos naturales. Este programa contemplaba varios objetivos incluyendo algunos relacionados con la prevención y control de la contaminación del suelo, el manejo correcto de sustancias peligrosas y la preservación de la calidad y uso óptimo del agua. No es sino hasta ahora que se considera la contaminación de suelos como un problema nacional. Tomando en cuenta que México es un país de actividad petrolera, la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos es un área de gran potencial debido a el impacto ambiental negativo de esta industria. En la actual administración, la Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca desea impulsar aún más los aspectos relacionados con el ambiente. Los suelos contaminados con petróleo constituyen un caso muy particular por depender de PEMEX, única empresa en el país que controla la explotación, exploración y refinación del petróleo.

Pero la restauración del suelo no sólo consiste en cubrir el contaminante con pastos verdes y árboles, sino disminuir los riesgos a la salud provocados por el petróleo. Para conocer el problema al que nos enfrentamos necesitamos primero conocer los componentes del petróleo y segundo, la toxicidad generada de los diversos hidrocarburos. Se mencionan en forma breve en los siguientes dos puntos.

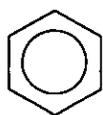
2.1.1 Composición y fuente de generación de hidrocarburos.

La composición del petróleo de acuerdo a su solubilidad diferencial en solventes orgánicos es (82):

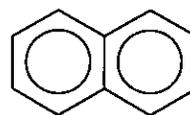
- Saturados (n- y cadenas ramificadas de alcanos y cicloparafinas).

- Aromáticos (mono-, di- y polinúcleo aromáticos, con cadenas alquílicas y/o fusionados con anillos de cicloparafinas). Estos compuestos, al igual que el monóxido de carbono, pueden ser el resultado de una combustión incompleta.
- Resinas (agregados de una variedad de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas).
- Asfaltenos (agregados de polinúcleo aromáticos, ácido nafteno, sulfuros, fenoles polihídricas, ácidos grasos y metaloporfirinas).

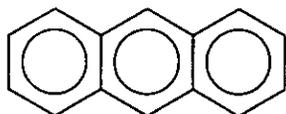
Los hidrocarburos con pesos moleculares muy bajos, como el metano, pueden actuar como precursores para los compuestos polinúcleo aromáticos a través de la pirosíntesis. Esto sucede a temperaturas que exceden los 500 °C en el cual se rompen los enlaces carbono-hidrógeno y carbono-carbono para formar radicales libres. Estos radicales se deshidrogenan y se combinan químicamente para formar estructuras de anillos aromáticos, los cuales resisten la degradación térmica. Los HPA pueden también ser formados de alcanos superiores presentes en los combustibles, por el proceso de pirólisis, el "cracking" de compuestos orgánicos para formar moléculas más pequeñas y más estables y radicales (65). Ejemplos de hidrocarburos polinúcleo aromáticos se muestran en la figura 1.



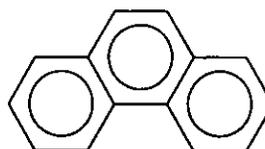
Benzeno



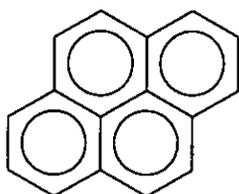
Naftaleno



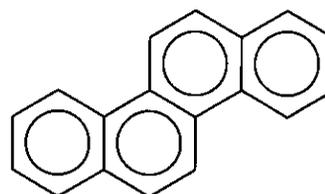
Antraceno



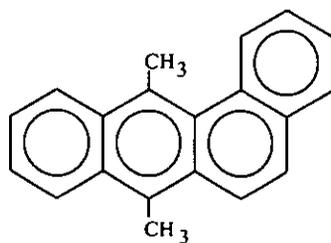
Fenantreno



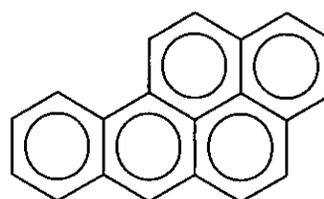
Pireno



Criseno



7,12-Dimetil-
benzo[a]antraceno



Benzo[a]pireno

Figura 1. Estructuras de hidrocarburos polinúcleo aromáticos.

2.1.2 Problemas a la salud causados por hidrocarburos.

Ultimamente ha aumentado el interés de muchos contaminantes y sustancias peligrosas debido al conocimiento de sus efectos tóxicos. Entre los componentes del petróleo, los alcanos y alquenos, aún los más simples, están considerados como compuestos tóxicos. El metano, etano, n-butano e isobutano son conocidos como asfixiantes los cuales despojan al aire de suficiente oxígeno para la respiración. Los problemas más comunes asociados al uso de hidrocarburos líquidos es la dermatitis causada por la disolución de una porción de grasas de la piel y se caracteriza por inflamarse, secarse y escamar la piel. La inhalación de hidrocarburos líquidos n-alcanos y de cadena ramificada volátiles pueden causar depresión del sistema nervioso central manifestado por mareo y pérdida de la coordinación. La exposición a n-hexano y ciclohexano resulta en la pérdida de mielina y la degeneración de axones, esto da como resultado desórdenes múltiples del sistema nervioso (polineopatía), incluyendo debilidad muscular y falta de control en las extremidades. El etileno actúa también como asfixiante y anestésico para animales y es fitotóxico. Las propiedades toxicológicas del propileno son muy similares a las del etileno. El 1,3-butadieno gaseoso es irritante a los ojos y a las membranas mucosas del sistema respiratorio; a altos niveles, causa inconsciencia y posteriormente, la muerte. El acetileno es un gas incoloro con olor a ajo, que actúa como asfixiante y narcótico, causando dolor de cabeza, mareos y alteraciones gástricas. El benceno inhalado es absorbido por la sangre desde la cual es tomado fuertemente por el tejido graso. El intermediario metabolizado benceno epóxido es probablemente el responsable de la toxicidad causando daño a la médula ósea. El benceno es irritante a la piel y puede causar eritema, sensación de quemadura, edema y ampollas. La inhalación de aire conteniendo más de 60 g/m³ de benceno puede ser fatal dentro de pocos minutos. Exposiciones de largo tiempo puede causar leucemia. El tolueno es menos tóxico que el benceno y sólo hasta 500 ppm puede causar dolor de cabeza, náuseas y falta de coordinación. A exposición masiva tiene efectos narcóticos que puede llevar al coma. La exposición al naftaleno puede causar anemia, irritación en la piel y daño a los riñones (65). Moléculas de HPA de alto peso molecular como el benzo[a]pireno, 1,2:5,6-dibenzantraceno, dibenzo[a,1]pireno, entre otros, son

agentes mutagénicos y carcinogénicos (26). En la mutagénesis se altera el DNA para producir cambios que son hereditarios. El mecanismo de mutagenicidad es similar al de carcinogénesis pero en este caso los mutágenos causan defectos de nacimiento. Un químico carcinogénico es una sustancia extraña al cuerpo causando una descontrolada replicación celular conocida como cáncer. Los dos pasos más importantes por lo cual los xenobióticos causan cáncer son el **estado de iniciación** seguido de un **estado promocional** (65).

Los carcinógenos usualmente tienen la habilidad de formar enlaces covalentes con macromoléculas, especialmente DNA. Esto altera la replicación del DNA en una manera tal que las células se replican descontroladamente y forman tejido canceroso (65). Las sustancias químicas que causan cáncer directamente son llamados carcinógenos primarios o directos. Muchos xenobióticos involucrados en causar cáncer son precarcinógenos o procarcinógenos. Estas especies requieren activación metabólica por reacciones de la Fase I o Fase II para producir últimos carcinógenos, los cuales son los responsables de la carcinogénesis (65). El procarcinógeno benzo[a]pireno es metabolizado por el Citocromo P450 y la epóxido hidrolasa a varios metabolitos incluyendo el carcinógeno benzo[a]pireno-7,8-diol-9,10-epóxido, como se muestra en la figura 2 (48, 78). Ejemplos de HPA de alto peso molecular y su concentración mínima mutagénica se presentan en la tabla I. Los análisis para determinar la CMM fueron llevados a cabo en células humanas B-lymphoblastoides, las cuales han sido manipuladas para expresar CP450. La mutagenicidad fue medida en el locus de la timidina kinasa. Las células fueron crecidas en medio con HPA y después se platearon en platos de microtitulación en presencia (mutagenicidad) y ausencia (eficiencia de plateo) de un agente selectivo (trifluorotimidina), después se contabilizaron las células vivas para determinar la fracción mutada. La CMM para cada molécula fue tomada como la intercepción de la línea ascendente de la gráfica dosis-respuesta con el 99% de límite de confianza superior de los controles negativos (26). Se analizó también que los HPA oxidados tienen una CMM mucho menor (en algunos casos no resultaron mutágenos) que los originales HPA. Como ejemplos podemos mencionar al ciclopenta[cd]pireno con una CMM de 1.8 ± 1.1 ng/ml y su compuesto oxidado tiene una

CMM de 2600+/-71; el 1,4-crisenoquinona, el 1,6-benzo[a]pirenoquinona, el 3,6-benzo[a]pirenoquinona y el 4,5-benzo[a]pirenoquinona no resultaron ser mutagénicos (26).

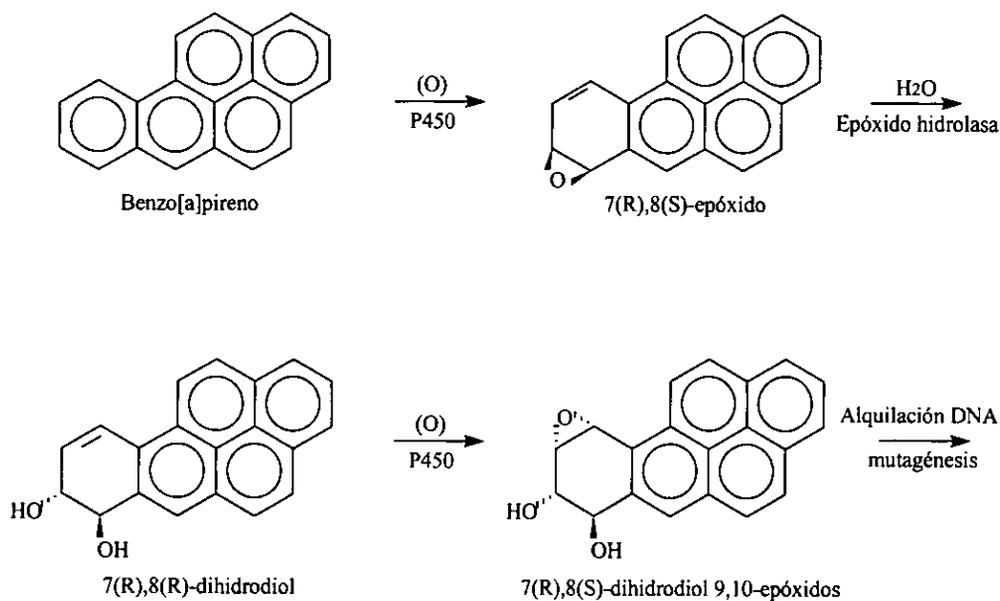


Figura 2. Ruta metabólica para la producción del último carcinógeno de Benzo[a]pireno.

Tabla I. Concentración mínima mutagénica de algunos hidrocarburos polinúcleo aromáticos (26).

HPA	CMM (ng/ml)
Benzo[b]fluorantreno	55 ₋ 20
Benzo[j]fluorantreno	53 ₋ 30
Indeno[1,2,3-cd]pireno	50 ₋ 9.2
5-Metilcriseno	21 ₋ 13
Dibenzo[a,k]fluorantreno	16 ₋ 12
Benzo[a]pireno	14 ₋ 9
1-Metilbenzo[a]pireno	9.4 ₋ 7.9
Nafto[2,1-a]pireno	5.0 ₋ 4.9
Ciclopenta[cd]pireno	1.8 ₋ 1.1
Dibenzo[a,i]pireno	0.7 ₋ 0.6

Sin embargo, según estudios ecotoxicológicos de Kalf (51) en varias especies, las concentraciones mínimas mutagénicas presentadas en la tabla II deberían ser consideradas como los mejores estimados de una concentración arriba de la cual el riesgo de efectos adversos se considera inaceptable.

Tabla II. Concentración Máxima Permisible de Hidrocarburos polinúcleo aromáticos (51).

	Concentración Máxima Permisible		
	Agua ($\mu\text{g/l}$)	Suelo (mg/kg)	Sedimento (mg/kg)
Naftaleno	1.20	0.14	0.14
Antraceno	0.07	0.12	0.12
Fenantreno	0.30	0.51	0.51
Fluoranteno	0.30	2.60	2.60
Benzo[a]antraceno	0.01	0.25	0.36
Criseno	0.34	10.7	10.7
Benzo[k]fluoranteno	0.04	2.40	2.40
Benzo[a]pireno	0.05	0.26	2.70
Benzo[ghi]perileno	0.03	7.50	7.50
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0.04	5.90	5.90

Es indudable la importancia de tratar los suelos contaminados con hidrocarburos, dándole ímpetu a la formación de leyes y reglamentos, a la disminución de los riesgos a la salud y al mejoramiento del ambiente.

2.2 Métodos de tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos.

Debido a la problemática ambiental mundial antes mencionada, se han venido desarrollando tecnologías para la limpieza, remoción y desintoxicación de los suelos contaminados con hidrocarburos. Algunos métodos biológicos y no biológicos se encuentran disponibles para la remediación de suelos. La elección de la técnica dependerá de factores como la hidrogeología del sitio, la composición del suelo, la población microbiana, consideraciones climáticas y la composición y concentración del contaminante (19).

Por otro lado, se ha encontrado que la mayor parte de los trabajos realizados por PEMEX en materia de restauración de suelos corresponden a procesos de estabilización de los desechos, los cuales consisten en vertir sobre los terrenos afectados, grandes cantidades de cal (Ca(OH)_2); posteriormente se cubren esas áreas con una capa de algún desecho orgánico como bagazo de caña o café y por último se aplica una capa de césped. Se considera que PEMEX debe invertir alrededor de 40,000 millones de dólares para limpiar suelos, lagunas y litorales (77). Mientras que en los Estados Unidos, los costos de descontaminación ambiental están en el rango entre 0.5 y 1.0 billón de dólares (6).

Entre los métodos no biológicos o fisicoquímicos se incluye almacenaje, incineración, bombeo de aire y relleno. Las técnicas de almacenaje y relleno tienen sus mayores costos en el movimiento y el transporte del suelo contaminado pudiendo haber problemas de filtración de los hidrocarburos menos viscosos hacia el manto freático. El mejoramiento en el diseño de los contenedores ha aumentado los costos de estas técnicas. La incineración y el bombeo de aire consumen mucha energía y liberan tóxicos a la atmósfera (62).

La combinación de tratamientos biológicos y fisicoquímicos es en muchos casos preferible para reducir costos y disminuir el tiempo de tratamiento. Los métodos biológicos son utilizados en un 15-20 % de los casos (19).

2.2.1 Biorremediación de suelos.

Dentro de las tecnologías biológicas la biorremediación es una buena alternativa, debido a que se transforman, e incluso se mineralizan, los contaminantes y se disminuye la toxicidad de los suelos. La biorremediación se basa en el uso de microorganismos que metabolizan los contaminantes debido a que utilizan enzimas que les permiten degradarlos.

En la biorremediación se tienen varias técnicas (Tabla IV), entre las que se encuentra la bioestimulación de los microorganismos empleando nutrientes y otros químicos para degradar los contaminantes. Los microorganismos bajo condiciones naturales están generalmente limitados por fósforo, nitrógeno y azufre. Factores como el pH, textura del suelo, requerimientos de oxígeno, mezclado y humedad deben ser considerados en el proceso.

Estos sistemas biológicos tienen numerosas aplicaciones en suelos, lagunas, lodos, entre otros. Existen toda una serie de tecnologías para la biorremediación de agua, efluentes y desechos tóxicos y todos se basan en la capacidad degradativa de los microorganismos. Un resumen de los elementos básicos de la biorremediación se enlistan en la tabla III.

Existen tres técnicas comunes en la biorremediación *in situ* de suelo y suelo lodoso contaminados (65). En la primera técnica se inocula el suelo con microorganismos no autóctonos degradadores y con adición de nutrientes. En la segunda técnica se adiciona sólo nutrientes y aceptores de electrones periódicamente al suelo suponiendo que en el sitio se encuentran los microorganismos degradadores adaptados pero deficientes en nutrientes y oxígeno. La tercera técnica se basa en un biorreactor en la superficie del suelo donde se adiciona nutrientes, oxígeno y microorganismos.

Tabla III. Elementos básicos de la biorremediación (21).

Fuente de carbono	Generalmente mezcla de compuestos tales como el petróleo, gasolina, compuestos específicos.
Consortio microbiano	Bacterias, hongos, aunque también se tienen los actinomicetos, levaduras, algas.
Otros nutrientes	Es necesario una fuente de nitrógeno (amonio, nitrato, urea) y de fósforo (fosfatos).
Agua	Es requisito fundamental la presencia de agua o al menos una humedad relativa alta.
Condiciones ambientales	La biodegradación sólo opera en rangos restringidos de pH y temperatura. Los cambios drásticos afectan negativamente.
Metales	En condiciones elevadas son inhibidores del proceso.
Producto (con oxígeno)	En el proceso aeróbico se obtiene biomasa y CO ₂ principalmente.
Producto (sin oxígeno)	En proceso anaerobio se genera biomasa, CO ₂ y CH ₄ y/o una mezcla de compuestos orgánicos (etanol, acetona, butanol, ácidos orgánicos). Se requiere de un aceptor terminal de electrones (nitrato, sulfato, etc.)

En el caso de que la contaminación sólo se encuentre en suelo, existen técnicas como el biorreactor (SBR), la técnica de labranza y el biotratamiento suelo-lechada (ver tabla IV). La técnica de labranza consiste en colocar el suelo sobre una cama de grava donde se le rocía nutrientes y agua mezclándose periódicamente para proveer oxígeno a los microorganismos del suelo. El lixiviado colectado es de nuevo rociado al suelo. La tercera técnica utiliza un reactor donde se le introduce el suelo lechoso del 10-30 % del volumen, se adicionan nutrientes y se le provee agitación vigorosa para proporcionarle oxígeno.

Tabla IV. Técnicas empleadas en la biorremediación (62).

Tipo	Principio	Comentario	Seguridad
“Land farming” (labranza)	Suelo mezclado con nutrientes y tratamiento <i>in situ</i> .	Requiere revestimiento para contener los microorganismos y el material.	Problemas con el revestimiento y la capa; el monitoreo y el tratamiento puede ser difícil.
Suelo lechoso	Suelo y agua agitados en un reactor.	Temperatura no controlada.	Poco control sobre el proceso de degradación; el efluente puede ser tratado.
De subsuperficie	Agua, nutrientes y oxígeno, bombeados a través del suelo.	Mejora el crecimiento de la población autóctona. Aplicaciones primarias: derrames de aceites y gasolinas.	Contaminación orgánica del agua subterránea; no hay control sobre la dispersión de microorganismos o productos de la degradación.
Reactor por lote o “batch” en secuencia (SBR)	Digestión microbiana en suspensión líquida.	Permite el control de las condiciones de operación.	Liberación de microorganismos al ambiente; se puede monitorear los microorganismos y los contaminantes.
Sistema de tratamiento de suelo	Lavado para solubilizar los contaminantes adsorbidos.	Necesario pretratamiento para maximizar la eficiencia.	Los efluentes van al SBR; el suelo lavado puede ser monitoreado.
Sistema de tratamiento acuoso	Microorganismos inmobilizados o enzimas en un sistema de flujo.	Requiere material orgánico soluble.	No hay liberación de microorganismos; el efluente puede ser monitoreado y tratado.
Biorreactor de capa fija	Microorganismos/enzimas en medio plástico en columnas para maximizar el área superficial e intercambiar nutrientes.	Puede tratar bajas concentraciones de material orgánico.	No liberación microbial; el reciclaje de los contaminantes permite mejorar la degradación y el monitoreo.

La biorremediación puede ser agrupada en dos clases: intrínseca y diseñada (19). La biorremediación intrínseca maneja la capacidad innata de las comunidades microbianas autóctonas para degradar los contaminantes ambientales sin utilizar técnicas para mejorar el proceso. La efectividad de la biorremediación intrínseca debe ser probada con un régimen de monitoreo continuo para analizar las concentraciones de los contaminantes. La

biorremediación diseñada es la aceleración de la actividad microbiana utilizando técnicas para modificar el sitio, tales como la instalación de celdas para modificar la circulación de los fluidos y adicionar nutrientes para estimular el crecimiento microbiano. Actualmente se da mayor énfasis en las técnicas de la biorremediación diseñada.

Para proveer la mayor información con respecto a la viabilidad y eficiencia de la biorremediación, se han establecido protocolos de tratabilidad. Estos protocolos consisten de dos fases. La Fase I provee información con respecto a parámetros químicos y microbiológicos requeridos para determinar si la biorremediación es una tecnología factible dadas las condiciones del sitio. Una vez que la biorremediación ha sido seleccionada como la tecnología apropiada, se da lugar a la Fase II. Esta Fase II provee información acerca de la cinética de la reacción y del punto final más conveniente para llegar a los límites propuestos. El análisis de los datos predice la velocidad de remoción de los constituyentes de acuerdo a modelos seleccionados y el tiempo estimado requerido para la biorremediación (73).

El desarrollo de la biorremediación se centra en el mejoramiento del diseño de reactores, de los sistemas para proveer nutrientes y oxígeno, mejorar cepas degradativas, de tratamientos aeróbios y estrategias para mejorar la biodisponibilidad. El porcentaje de suelo recuperado o biorremediado varía de suelo a suelo, dependiendo de la viscosidad del crudo, las concentraciones y proporciones constitutivas, factores económicos y la tecnología empleada. Los hidrocarburos del petróleo y sus derivados tienen diferente susceptibilidad a ser biorremediados. Sitios contaminados con gasolina, diesel, alcoholes, cetonas y ésteres han sido restaurados con buenos resultados. Sin embargo, las técnicas de biorremediación para creosotas y HPA están aun en desarrollo. Los tipos representativos de hidrocarburos del petróleo y derivados enlistados en la siguiente tabla, tienen un amplio rango de aplicaciones industriales.

Tabla V. Susceptibilidad de los hidrocarburos a la biorremediación (19).

Químico	Frecuencia de ocurrencia	Estatus de biorremediación	Evidencia de futuras aplicaciones	Limitaciones
Gasolina, diesel	Muy frecuente	Establecido		Forma fase líquida no acuosa
HPA	Común	Emergente	Biodegradación aerobia bajo un estrecho rango de condiciones	Adsorbidos fuertemente a superficies de los sólidos
Creosota	Infrecuente	Emergente	Realmente biodegradable bajo condiciones aerobias	Adsorbidos fuertemente a superficies de los sólidos; forma fase líquida no acuosa
Alcoholes, cetonas, ésteres	Común	Establecido		
Eteres	Común	Emergente	Biodegradable bajo un estrecho rango de condiciones utilizando microorganismos aerobios y nitrato reductores.	

Loehr y Webster (63) compilaron resultados de estudios en laboratorio, nivel piloto y de campo indicando que, en la mayoría de los casos los procesos de biorremediación resultaron en un considerable decremento en la toxicidad y movilidad del material tratado.

2.3 Metabolismo de los Hidrocarburos Polinúcleo Aromáticos.

Un número limitado de microorganismos incluyendo bacterias, micobacterias, algas y hongos lignolíticos y no lignolíticos son capaces de degradar compuestos recalcitrantes como los HPA con 3 o más anillos aromáticos fusionados (6, 8, 9, 10, 23, 41, 80, 91). Los compuestos recalcitrantes son aquéllos que resisten la biodegradación y tienden a persistir y acumularse en el ambiente. En los últimos años se han utilizado consorcios microbianos para la degradación de creosota, gasolina, diesel o cualquier otro hidrocarburo derivado del petróleo. Estos microorganismos han sido aislados de sitios contaminados con petróleo, como los alrededores de las refinerías y de lugares donde ha habido derrames. La ventaja de utilizar consorcios sobre un sólo microorganismo es que sus miembros actúan juntos para degradar compuestos xenobióticos y/o transformar contaminantes (23). Estos microorganismos pueden degradar muchos compuestos xenobióticos con diferentes grados de dificultad y a diferentes velocidades. En algunos casos los microorganismos degradadores han sido identificados y caracterizados (30, 41, 53, 66, 80, 81). Cepas como *Sphingomonas paucimobilis* EPA50J, aislada desde un sitio contaminado con creosota, puede degradar fluorantreno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluorantreno y dibenzo[a,h]antraceno (91). Otras bacterias como *Pseudomonas vesicularis* es capaz de degradar fluoreno y fenantreno, *Alcaligenes desnitrificans* degrada también fluoreno (80), *Flavobacterium sp.* y *Beijerinckia sp.* degradan fenantreno (81) y *Mycobacterium sp.* BB1 degrada fenantreno, pireno y fluoranteno (13).

De acuerdo a varios estudios (25) se piensa que las bacterias de diferentes géneros creciendo en un mismo medio sufren una transferencia genética y un cruce metabólico. Por lo que ha habido un gran interés en la elucidación de la cooperatividad metabólica microbiana que es funcional en el catabolismo de compuestos orgánicos. Los consorcios microbianos actúan en conjunto desarrollando sistemas metabólicos que pueden llevar a la completa transformación de compuestos contaminantes. El desarrollo de consorcios naturales o contruídos puede resultar una gran ayuda en las técnicas de biorremediación.

La biodegradación de HPA por bacterias ha sido observada bajo condiciones aerobias y anaeróbicas. El camino biodegradativo aerobio de HPA inicia por la introducción de átomos de oxígeno molecular en el núcleo aromático, la reacción siendo catalizada por una dioxigenasa multicomponente, la cual consiste de una reductasa, una ferredoxina y una proteína fierro-azufre (42). Las bacterias que utilizan fenantreno como la única fuente de carbono y energía lo oxidan primeramente en la región "Bahía" (posiciones C-3 y C-4 o C-5 y C-6,) para formar fenantreno cis-dihidrodiol. Posteriormente produce ácido 1-hidroxi-2-naftoico y ácido protocatecónico o catecol, el cual puede ser mineralizado (16) (figura 3).

Por otro lado, la asimilación de los n-alcanos de los hidrocarburos es un proceso oxidativo donde el oxígeno molecular es incorporado en la cadena n-alquil en el paso inicial para la formación de un alcohol primario (42).

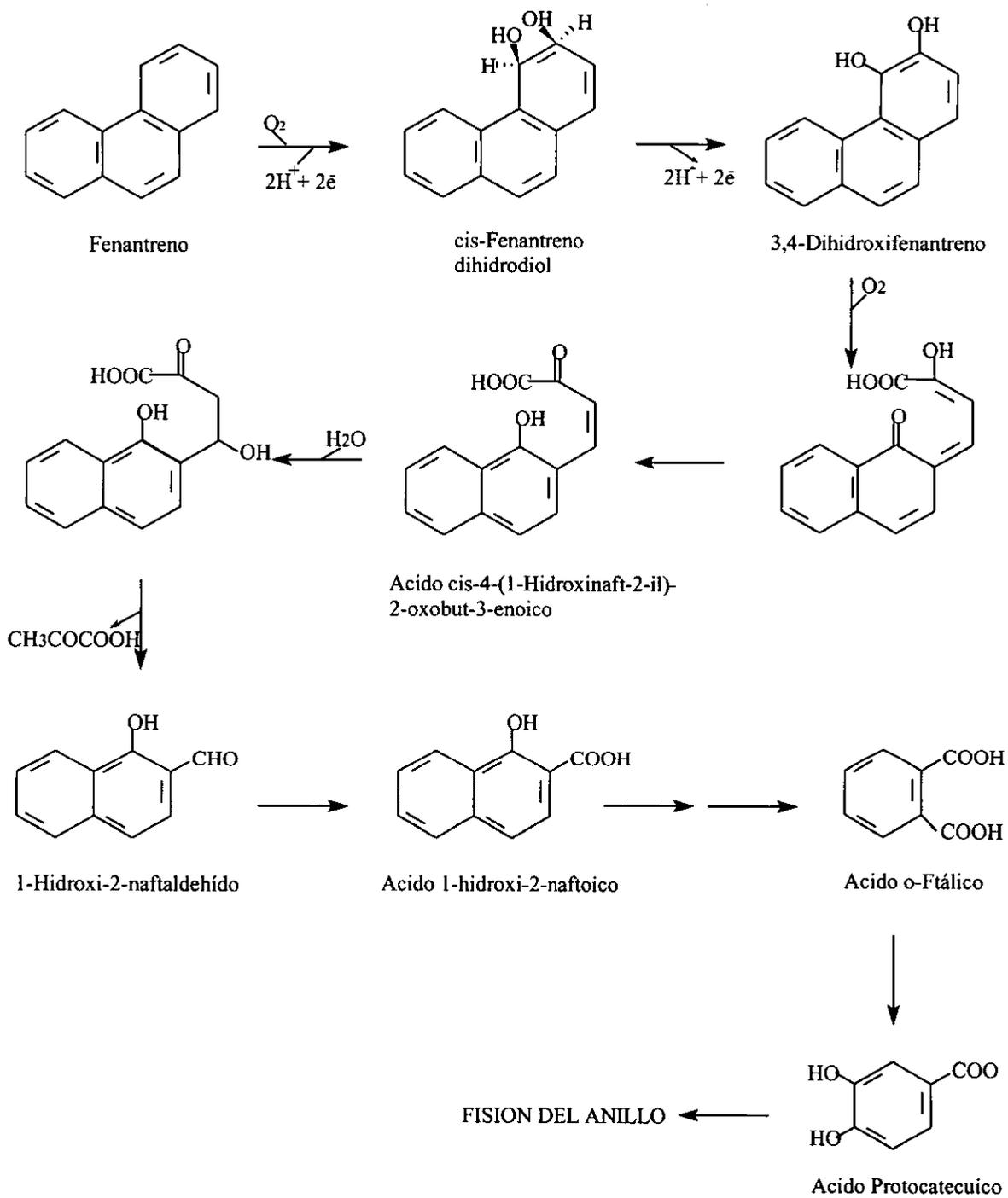


Figura 3. Pasos propuestos para la biodegradación bacteriana de fenantreno (16).

2.3.1 Hongos lignolíticos en la degradación de HPA.

En los basidiomicetos de putrefacción blanca existe toda una serie de enzimas extracelulares responsables de la degradación de lignina (el sustrato natural). Además de lignina peroxidadas (EC1.11.1.14; diarilpropano:oxígeno, peróxido de hidrógeno oxidorreductasas), se encuentra la manganoso peroxidadas (EC1.11.1.13; Mn (II):peróxido de hidrógeno oxidorreductasas) y las laccasas (EC1.10.3.2; benzenodiol:oxígeno oxidorreductasas), que se cree están involucradas en la degradación de HPA's (10, 43).

La lignina es un biopolímero estructural aromático complejo de las plantas vasculares, formada por unidades de fenil propano que es degradado por unos cuantos organismos. Por su estructura proporciona a las plantas rigidez y unión entre sus células. De acuerdo a la definición de Sarkanen y Ludwig (72), la lignina es un polímero natural formado por la polimerización de tres precursores primarios: alcohol-*trans*-para-cumárico, alcohol-*trans*-coniferílico y alcohol- *trans*-sináptico, por ello la molécula de lignina presenta una estructura ramificada irregular.

Algunos autores mencionan que los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y *Bjerkandera sp.* pueden ser más prominentes en su habilidad para mineralizar HPA a CO₂ que *Phanerochaete chrysosporium*, aunque este último sea más estudiado (10, 29). En años recientes se ha reportado que *Pleurotus ostreatus* degrada, en medio líquido fenantreno, antraceno, fluoreno, pireno y benzo[a]pireno a CO₂ y productos solubles en agua (9). Sin embargo, al parecer las actividades de estas enzimas lignolíticas de *P. ostreatus* no se correlacionan con la degradación de los HPA (10).

En un estudio realizado por Andersson y Henrysson (3) donde compararon la degradación de HPA por varios hongos, encontraron lo siguiente. *P. ostreatus* tuvo la capacidad de degradar antraceno y de acumular antraquinona y *P. chrysosporium* no. Con *T. versicolor* no encontraron acumulación de antraquinona. Demostraron también un efecto positivo en el número de microorganismos en el suelo al adicionar paja húmeda, pero que

esta población de microorganismos puede ser inhibida por el hongo inoculado, sea cual fuere éste. Encontraron también que hubo una mayor metabolización del fenantreno cuando se utiliza *P. chrysosporium* y los microorganismos autóctonos del suelo (3). Bezalel y su grupo (10) utilizaron *P. ostreatus* para analizar la mineralización de un amplio rango de compuestos marcados con ^{14}C en medio líquido, incluyendo catecol, fenantreno, pireno, antraceno, benzo[a]pireno, fluoreno y fenantreno. En este estudio resultó el fluorantreno como único compuesto no mineralizado. Otro microorganismo reportado por su habilidad para metabolizar pireno es *Crinipellis stipitaria* (64). Bogan y Lamar (12) reportaron una degradación de fenantreno por *Phanerochaete laevis* con una acumulación no significativa del intermediario quinona en un período de 4 semanas. *T. versicolor*, capaz de mineralizar fenantreno y pireno en cultivo líquido, produjo metabolitos sustituidos en la región K (posiciones C-9,10 de fenantreno y posiciones C-4,5 de pireno), mientras que *Kuehneromyces mutabilis*, *Flammulina velutipes*, *Laetiporus sulphureus* y *Agrocybe aegerita* produjeron metabolitos sustituidos en la posición C-1,2, C-3,4 y C-9,10 del fenantreno y en la posición C-1 del pireno (76). *Cunninghamella elegans*, hongo no lignolítico, oxida fenantreno a el *trans*-1,2-dihidrodiol y pequeñas cantidades de *trans*-3,4 y *trans*-9,10-dihidrodiol y un glucósido conjugado de 1-fenantrol (17).

Los hongos no utilizan el fenantreno como única fuente de carbono y energía, sino que cometabolizan el HPA a productos hidroxilados (8). Como puede verse, muchos hongos no lignolíticos metabolizan fenantreno de una manera altamente regio- y estereoselectiva, vía Citocromo P450 monooxigenasa y epóxido hidrolasa para formar fenantreno *trans*-1,2-, *trans*-3,4- y *trans*-9,10-dihidrodiol; 1-, 2-, 3-, 4- y 9-fenantroles; y conjugados de sulfato, glucósidos y glucurónicos de los metabolitos primarios (8).

Pleurotus ostreatus oxida fenantreno, siendo el *trans*-9,10-dihidroxi-9,10-dihydrofenantreno el mayor intermediario formado. La configuración absoluta del enantiómero predominante producido es 9R, 10R. Bezalel y Cerniglia (10), utilizando $^{18}\text{O}_2$, demostraron que éste era incorporado en el *trans*-9,10-dihidroxi-9,10-dihydrofenantreno, indicando que una monooxigenasa fue involucrada en la formación de este intermediario.

Estos estudios también sugieren que una monooxigenasa P450 está involucrada en la oxidación inicial de fenantreno. Así, el Citocromo P450 monooxigenasa parece jugar un rol importante en la biodegradación de HPA por hongos.

El metabolismo del fenantreno por *P. ostreatus* involucra una hidratación de la región K, como *T. versicolor*, catalizada por la epóxido hidrolasa y la formación del ácido 2,2'-difénico podría ser producido por una reacción catalizada por la laccasa. Rutas biodegradativas propuestas para el metabolismo de fenantreno se pueden observar en la siguiente figura (8, 80).

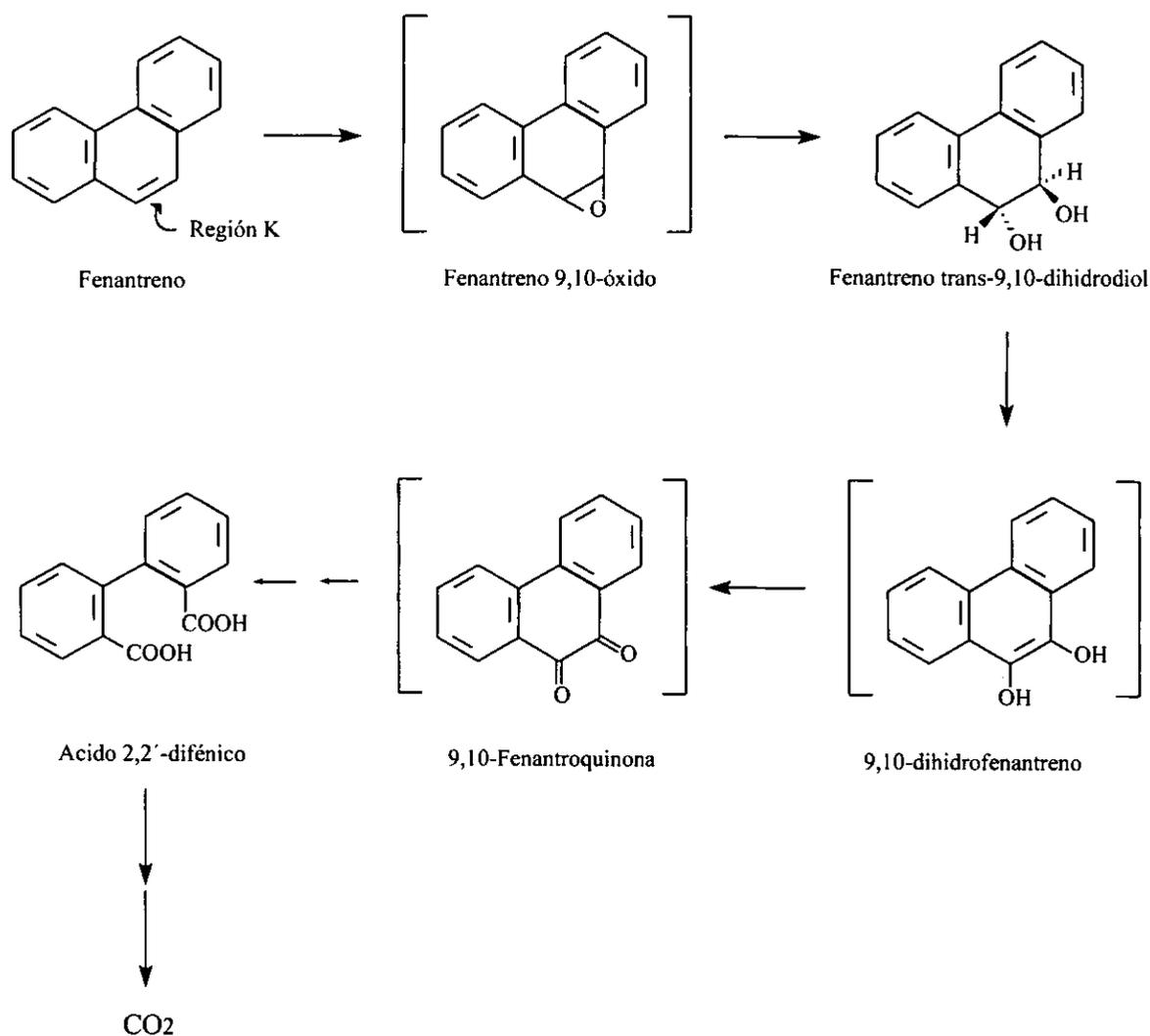


Figura 4. Ruta propuesta para el metabolismo del fenantreno por *Pleurotus ostreatus*.

Sutherland (84) analizó el metabolismo del fenantreno por *Phanerochaete chrysosporium*. En el medio líquido se detectaron el fenantreno *trans*-9,10- y *trans*-3,4-dihidrodiol, los cuales podrían ser formados por actividades sucesivas de monooxigenasas y epóxido hidrolasas, mencionadas anteriormente. Sin embargo, los intermediarios fenantreno 9,10- y 3,4-óxidos no fueron encontrados. Estos últimos son generalmente inestables y se isomerizan a fenoles o se hidratan por la epóxido hidrolasa a los correspondientes *trans*-dihidrodiol. *P. chrysosporium* produjo mayormente el *trans*-9,10-dihidrodiol mientras que *C. elegans* produjo mayormente el *trans*-1,2-dihidrodiol. Los tres fenantroles que se encontraron fueron producidos por deshidratación de los *trans*-dihidrodiol o por un rearrreglo de los postulados óxidos arenos. El fenantreno 9,10-quinona, el cual podría ser un producto de la actividad peroxidasa no fue detectado en este estudio. Suponen que el fenantreno induce la actividad del Citocromo P450 monooxigenasa. Reafirman que esta monooxigenasa está involucrada en la formación de óxidos areno desde el fenantreno y que la epóxido hidrolasa produce *trans*-dihidrodiol (84).

Bajo condiciones ligninolíticas *P. chrysosporium* mineraliza fenantreno oxidándolo primeramente a fenantreno-9,10-quinona y posteriormente rompe el anillo a ácido 2,2-difénico. Bajo condiciones no ligninolíticas, *P. chrysosporium* metaboliza fenantreno a fenantreno *trans*-3,4- y *trans*-9,10-dihidrodiol; 3-, 4- y 9-fenantroles y el glucósido conjugado de 9-fenantrol (84) (figura 5). Así, *P. chrysosporium* tiene múltiples caminos enzimáticos para el metabolismo del fenantreno. Por lo que el primer paso metabólico es diferente entre *P. ostreatus* y *P. chrysosporium*. Además, la lignina peroxidasa H8 purificada de *P. chrysosporium* oxida benzo[a]pireno a el 1,6-, 3,6- y 6,12-quinonas y el pireno en el 1,6- y 1,8-quinonas (89, 39). La lignina peroxidasa de *P. chrysosporium* cataliza directamente oxidaciones de un electrón de sustratos aromáticos. Los radicales aril cationes resultantes tienen un rearrreglo espontáneo (11). Oxidaciones de un electrón de varios polinúcleo aromáticos por Mn^{3+} ha sido también documentada (11) sugiriendo que la manganeso peroxidasa de *P. chrysosporium* puede jugar un papel clave en la degradación

de HPA *in vivo*. Pero no es muy claro todavía las oxidaciones mediadas por el Mn^{3+} en la degradación de HPA.

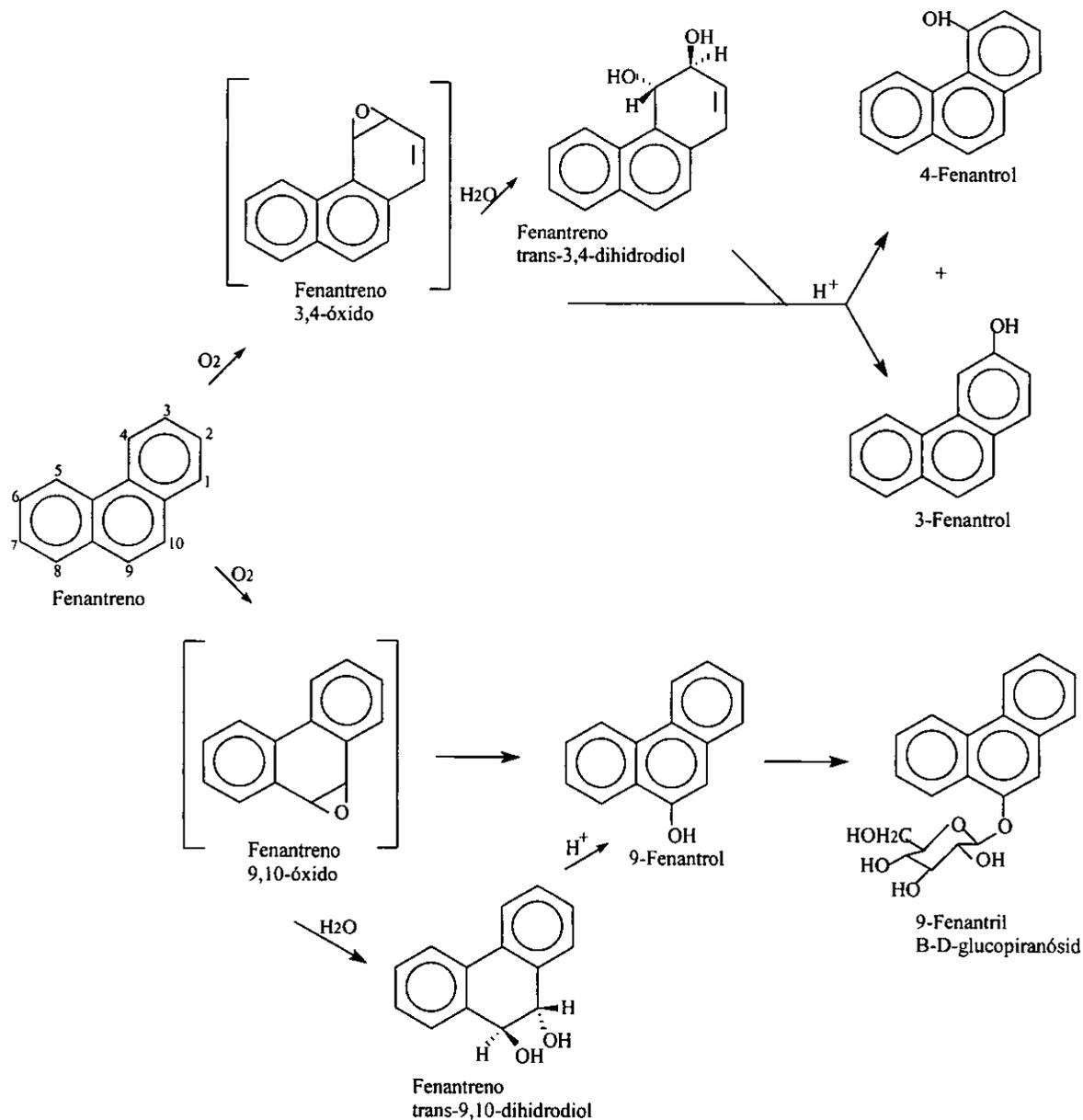


Figura 5. Camino propuesto para el metabolismo de fenantreno en cultivos de *P. chrysosporium*.

Estudios de Hammel (39) mostraron que los oxígenos de las quinonas provienen del H₂O en las reacciones catalizadas por la lignina peroxidasa. Sus experimentos con pireno y lignina peroxidasa formaron pireno-1,6-diona y pireno-1,8-diona, los cuales resultaron del ataque nucleofílico del agua en aquellos átomos de carbono con las más alta densidad de carga positiva. Mostraron que las quinonas no fueron sustrato de la lignina peroxidasa. La adición de la segunda molécula de H₂O, presumiblemente involucra ataque en uno de los dos posibles intermediarios electrofílicos; el radical catión 1-hidroxipireno o el catión 1-oxopireno (39). Las quinonas formadas son reducidas a hidroquinonas por la celobiosa quinona reductasa (6).

La estructura química de los metabolitos identificados por Bezalel (9), también como el camino propuesto para el metabolismo del pireno por *Pleurotus ostreatus* se muestran en la figura 6. El pireno fue metabolizado en la región K para formar un epóxido, el cual fue hidratado a *trans*-4,5-dihidrodiol, con el enantiómero predominante en la configuración R,R (9). Por lo que el mecanismo de degradación del fenantreno y del pireno es similar. Nuevamente, el Citocromo P450 monooxigenasa y la epóxido hidrolasa podrían ser también las enzimas responsables para la formación del pireno dihidrodiol.

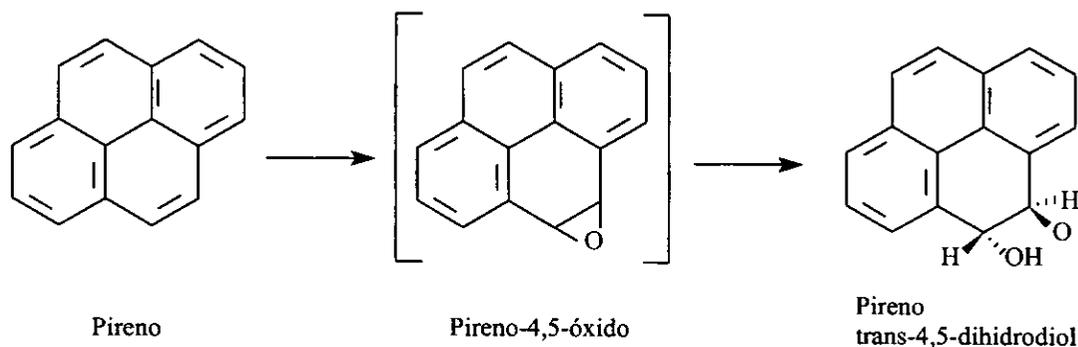


Figura 6. Ruta propuesta para el metabolismo del pireno por el hongo *Pleurotus ostreatus*.

Los metabolitos identificados durante la degradación de antraceno por *P. ostreatus* fueron 9,10-antraquinona y antraceno *trans*-1,2-dihidrodiol, donde el enantiómero predominante es de configuración S,S. La formación de 9,10-antraquinona y antraceno *trans*-1,2-dihidrodiol puede representar un ataque por dos diferentes sistemas enzimáticos (laccasa y CP450, respectivamente) o por un sistema enzimático que ejerce regioselectividad por oxidación del antraceno en diferentes sitios (9).

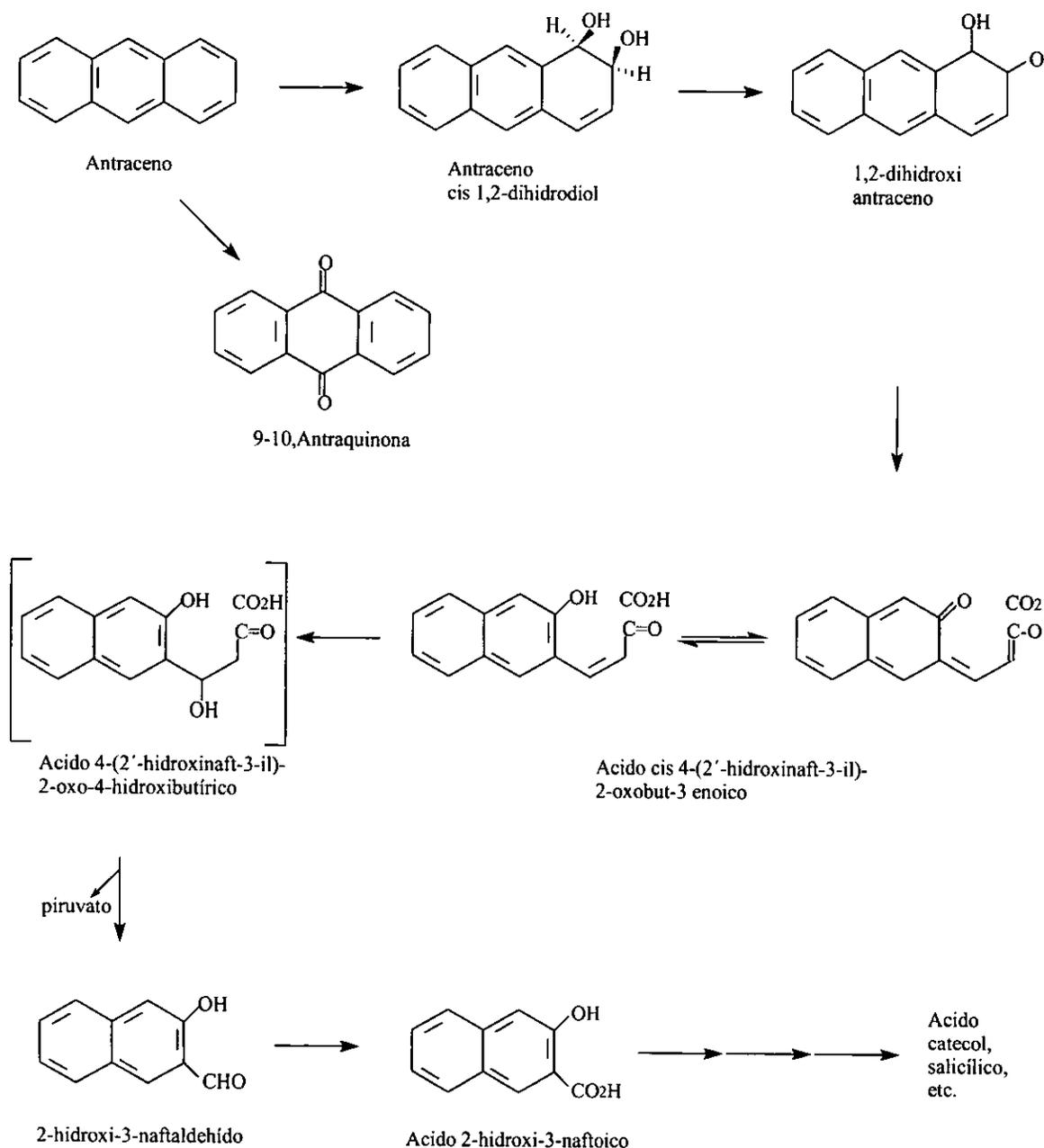


Figura 7. Metabolitos identificados durante la degradación de antraceno por *P. ostreatus*.

La baja estereoselectividad de *P. ostreatus* durante el metabolismo de pireno y antraceno indica la baja preferencia estereoselectiva de las isoenzimas del Citocromo P450 y/o la epóxido hidrolasa (9).

Se ha encontrado que en cultivos con pireno y fenantreno, teniendo la misma actividad laccasa, los niveles de mineralización de pireno son mucho más bajos que los de fenantreno (10). En estos mismos estudios encontraron que la actividad peroxidasa Mn independiente fue inhibida por uno de los metabolitos de los HPA.

Las laccasas son oxidasas multicobre y catalizan la oxidación de un electrón de sustratos orgánicos que está acoplada a la reducción de 4 electrones de oxígeno molecular y agua (41). Entre la variedad de sustratos oxidados incluye polifenoles, fenoles metoxi sustituidos, diaminas y un considerable rango de otros compuestos (86).

Heinzkill (43) encontró que los basidiomicetos *Panaeolus sphinctrinus*, *Panaeolus papilionaceus* y *Coprinus friesii* produjeron altos niveles de actividad laccasa y de manganeso peroxidasa en medio líquido adicionado con nitrógeno. Resultados similares fueron obtenidos por Youn (92) durante el cultivo de *P. ostreatus* en un medio rico en proteína. La ventaja de la actividad laccasa sobre la lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa es su baja especificidad al sustrato por lo que se amplía el espectro de moléculas de HPA que pueden ser oxidados. Además, la lignina peroxidasa sólo puede oxidar compuestos que tengan un potencial de ionización de hasta 8.15 eV (89). En otras investigaciones (67) *Chrysosporium lignorum*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* no mineralizaron benzo[a]pireno sin la inducción de las enzimas por un compuesto ligninolítico. Estudios recientes de Lang (60) se encontró que en cultivos líquidos conteniendo pireno, *P. ostreatus* produce más laccasa que en medio sólido (paja); mientras que la concentración de manganeso peroxidasa es la misma en medio líquido que en medio sólido conteniendo pireno.

Analizando la mineralización de lignina y de HPA por *Pleurotus ostreatus* se observó que la degradación hasta CO₂ comenzó en el día 12 para la lignina a diferencia de sólo 3 días para los HPA (10). Por lo que se asume que *Pleurotus ostreatus* utiliza diferentes sistemas de degradación para la lignina y para los HPA.

En conclusión, *Pleurotus ostreatus* actúa sobre los HPA como hongo no lignolítico, sin embargo, es capaz a mineralizarlos. Si *Pleurotus ostreatus* no contiene lignina peroxidasa y el metabolismo de HPA no se correlaciona claramente con la actividad laccasa, es posible que el Citocromo P450 monooxigenasa y la manganeso peroxidasa sean las responsables del paso inicial en el metabolismo de estos compuestos, como se verá en detalle en el siguiente punto. El mecanismo ligninolítico de *Pleurotus ostreatus* puede estar involucrado en pasos posteriores del metabolismo, tales como el rompimiento del anillo aromático y la evolución a CO₂ (8, 9, 10). El CP450 monooxigenasa encontrado en microorganismos, plantas y animales cataliza muchos tipos de transformaciones químicas, las cuales incluyen hidroxilaciones alifáticas, epoxidaciones, desalquilaciones, deshalogenaciones y varios mecanismos basados en inactivaciones (55). Muchas de estas reacciones son objeto de estudio para la biorremediación.

En el presente trabajo se seleccionó el hongo de *Pleurotus ostreatus* por su facilidad de crecer, en un tiempo relativamente corto, en sustratos sencillos y baratos como el trigo y por el conocimiento de los antecedentes de degradación de HPA en medios líquidos. *Pleurotus ostreatus* es un hongo saprobio de la madera que en la naturaleza se encuentra fructificando en los troncos de árboles muertos. Es un hongo comestible sumamente apreciado, que ha sido cultivado en Europa Central y Asia desde tiempos antiguos. En la actualidad se le cultiva principalmente en Japón e Italia utilizando desperdicios vegetales lignocelulósicos como sustrato (72).

Para cultivar hongos de putrefacción blanca, para posterior utilización en biorremediación, se pueden utilizar sustratos lignocelulósicos tan sencillos y económicos como el aserrín, trozos de madera y desechos agrícolas.

La ventaja de utilizar hongos sobre consorcios bacterianos en la degradación de hidrocarburos es que los hongos no necesitan adaptación previa sobre los contaminantes para poder metabolizarlos (5). Lo anterior se confirma con los experimentos realizados en este trabajo. Así como también, las bacterias necesitan nutrientes adicionales para el proceso degradativo y no en el caso de los hongos, donde la limitación de nutrientes favorece la degradación y los sistemas lignolíticos no dependen de los compuestos contaminantes. Estos últimos pueden ser degradados a niveles no detectables (6). Sin embargo, los consorcios microbianos tienen mayor capacidad de mineralizar los hidrocarburos donde los hongos principalmente sólo transforman, mediante oxidaciones, los compuestos. Los hongos pueden también antagonizar con el crecimiento bacteriano porque producen radicales capaces de oxidar biomoléculas tales como proteínas y DNA, que como resultado daría la muerte de las bacterias. Además que durante el metabolismo, los hongos ajustan el pH de su ambiente, así que si es diferente al pH óptimo de las bacterias, éstas no crecerán después de que el hongo se introduzca en el suelo (6). Barron (7) demostró que varios hongos lignolíticos, entre ellos *P. ostreatus*, tienen la habilidad de atacar y digerir microcolonias de bacterias. Las bacterias son lisadas y el contenido es aparentemente absorbido como una fuente de nutrientes por los hongos.

Se deben de estudiar todas las posibilidades, hongos, bacterias y consorcios microbianos para mejorar los efectos de la biorremediación.

2.4 Mecanismo de acción de monooxigenasas.

Las enzimas CP450 (EC 1.14.14.1), también conocidas como monooxigenasas de función mixta, son las enzimas más importantes que metabolizan drogas en el hígado y funcionan en la biotransformación oxidativa de una amplia variedad de xenobióticos lipofílicos y compuestos endógenos a derivados más solubles (35). Consecuentemente, el CP450 microsomal hepático, promueve la eliminación de algunos contaminantes orgánicos hidrofóbicos debido a que facilita la introducción de grupos funcionales polares para la subsecuente excreción. La inducción de CP450 puede significativamente afectar el metabolismo, la bioacumulación y la toxicocinética de xenobióticos y además alterar la susceptibilidad toxicológica de animales expuestos (61).

Aparte de la destoxicación de xenobióticos, CP450 monooxigenasas también participa activamente en la biosíntesis de alcaloides, giberelinas, fenoles, etc. y existe en varias formas en la naturaleza (27). En muchos tejidos tales como el hígado, riñones, cerebro y los tejidos esteroideogénicos, las formas constitutivas mitocondriales están involucradas mayormente en la oxidación de sustratos fisiológicamente importante tales como colesterol, hormonas esteroideas y vitamina D3. Se ha encontrado que el ácido araquidónico es convertido a alcohol y epóxidos por CP450 y éstos pueden ser incorporados a los fosfolípidos (35).

La formación mediada por CP450 monooxigenasas de intermediarios electrofílicos ha sido visto a ser un paso clave en la citotoxicidad y la iniciación de tumores. Células específicas tales como las epiteliales bronquiales no ciladas, un sitio importante de CP450 monooxigenasas en el pulmón, son altamente vulnerables a furanos, hidrocarburos clorados, indoles y HPA's (32). El CP450-1A1 ha sido de considerable interés debido a su inducibilidad por varios contaminantes y su posible relación con el cáncer de pulmón en humanos. El CP450-1A1 humano es primeramente expresado en tejido extrahepático tales como placenta, pulmón y células sanguíneas periferales. Muchos HPA's y HC clorados parecen ser sustratos o inductores de CP450-1A1 en humanos (18, 61). Estudios de

Anandatheerthavarada (2) mostraron la existencia de CP450 inducidos por xenobióticos en mitocondria, el cual puede activar carcinógenos como benzo[a]pireno, aflatoxina B1 y dimetilnitrosamina en radicales reactivos que se unen al DNA mitocondrial y afectan la transcripción y la traducción del DNA en la mitocondria.

Según Khatisashvili (56), el CP450 juega el papel del transformador universal de compuestos no polares de origen tanto endógeno como exógeno. Sus resultados indicaron un decremento de la actividad biosintética de CP450 en presencia de xenobióticos y su preferible transformación en procesos de detoxificación. Por lo que propone también que el mecanismo de oxidación microsomal de CP450 monooxigenasa es cambiada a una actividad peroxidasa. Indicando que la misma forma de CP450 debe participar en la hidroxilación microsomal de xenobióticos y en procesos biosintéticos de la célula.

Por otro lado, en el proceso de detoxificación de xenobióticos, el estado más limitante es la hidroxilación de moléculas hidrofóbicas, las cuales son catalizadas por un CP450 unido a la membrana conteniendo un sistema monooxigenasa. Los productos hidrolizados con un significativo incremento en la polaridad son enzimáticamente oxidados en la fase líquida. La velocidad de oxidación del sustrato por CP450 depende en su mayoría del grado de su hidrofobicidad (56). Indicando que la polaridad de la molécula es uno de los factores que definen la conversión de los compuestos por el sistema monooxigenasa.

Muchas reacciones de CP450 se llevan a cabo con la estequiometría característica de monooxigenasas:



Sin embargo, CP450 a menudo tiene la capacidad de utilizar hidroperóxidos en varias formas. El mecanismo catalítico de monooxigenación puede ser considerado en dos partes, activación del oxígeno y oxidación del sustrato (figura 8).

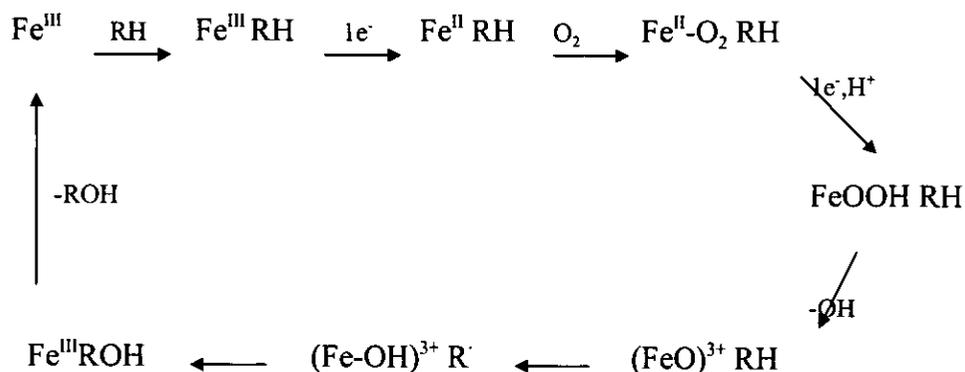
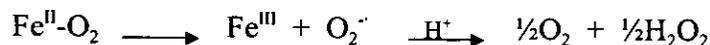


Figura 8. Pasos en la activación de oxígeno y la oxidación del sustrato por varios CP450 (35).

Todas las reacciones de oxigenación incluyen procesos tales como hidroxilación de carbono y los heteroátomos N, S y I, desalquilaciones de aminas y éteres y epoxidaciones. Estas reacciones pueden ser racionalizadas en términos de 2 pasos, abstracción de un átomo de hidrógeno (o electrón) y un reenlace de oxígeno.



Además, las diferentes enzimas CP450 no deberían ser consideradas individualmente como estrictamente epoxidasas, N-desmetilasas, etc. ya que la reacción afectada es una función del acoplamiento del sustrato y la proteína (35). Las CP450 pueden catalizar reacciones de reducción también como de oxidación. Las enzimas CP450 pueden formar H_2O_2 cuando la oxidación de sustratos no se ajusta al flujo de electrones.



El CP450 puede también utilizar H_2O_2 , hidroperóxidos y peróxidos y pueden tener alguna relación con las peroxidasas, las cuales también utilizan radical catiónico Fe(IV)porfirina. La enzima fúngica cloroperoxidasa es por definición espectral una CP450 y cataliza la siguiente reacción:



Los CP450 pueden también catalizar la “reductiva” β -escisión de hidroperóxidos para rendir alcanos y carbonilos (35).

Diferentes formas moleculares de CP450 son encontradas en compartimentos de la membrana mitocondrial y microsomal. Los CP450 microsomales y mitocondriales difieren con respecto a sus requerimientos para la transferencia de electrones. Los CP450 microsomales aceptan electrones a través de una flavoproteína llamada NADPH citocromo P450 reductasa. Mientras que CP450 mitocondriales reciben electrones a través de una proteína hierro-azufre llamada Adx y una flavoproteína llamada Adr (2, 35).

Otra clase mayor de enzimas de oxigenación, conocidas por su función en la destoxificación de xenobióticos, es la monooxigenasa contiendo flavina o grupo FMO. La reacción de FMO requiere O_2 , NAD(P)H , H^+ y un sustrato oxigenable. La secuencia de la reacción es la siguiente: el FMO conteniendo FAD se une a NADPH el cual reduce el flavina a FADH_2 para formar un estable 4α -hidroperoxiflavina, FAD-OOH ; un sustrato orgánico con un nucleófilo oxigenable, típicamente un nitrógeno o azufre, interactúa con la enzima unida a 4α -hidroperoxiflavina rindiendo el producto monoogineno y un complejo FAD-OH (hidroxiflavina); y agua y NAD(P)^+ son entonces liberados, dejando el FAD completamente oxidado (83). Usualmente hay múltiples isoenzimas de FMO en un organismo o tejido dado, pero cada isoenzima tiene un amplio rango de sustratos que pueden oxigenar. Las FMO están generalmente localizados en la membrana microsomal.

Así, esta revisión sugiere que las formas de Citocromo P450 tiene un papel muy importante en la activación y disposición de xenobióticos como los HPA.

2.5 Limitaciones en la biorremediación de suelos.

La biorremediación se ve limitada fundamentalmente por dos factores muy importantes, la biodegradabilidad y la biodisponibilidad. Se ha observado que una fracción residual no se llega a degradar en el suelo a pesar de que se encuentran las condiciones óptimas para la biodegradación. La degradación de hidrocarburos tiene un comportamiento asintótico, donde después de un tiempo la concentración residual no cambia (33).

La limitada biodisponibilidad de los HPA hacia el ataque microbiano es el factor que mayormente afecta su velocidad de biodegradación (45). La biotransformación está controlada por la actividad bioquímica microbiana y la transferencia de masa de un compuesto químico al microorganismo (14, 81). Así que la biodisponibilidad de un compuesto está determinada por un número de procesos fisicoquímicos tales como adsorción, desorción, difusión y disolución. Así mismo, se tienen varios factores que afectan la biodisponibilidad y que se describen a continuación:

- a) Tiempo de añejamiento (permanencia de contaminante) del suelo.
- b) Tipo de suelo.
- c) Concentración del contaminante.
- d) Adición de surfactantes.

2.5.1 Tiempo de añejamiento del suelo.

La disminución de la disponibilidad de los hidrocarburos aumenta al transcurrir el tiempo de permanencia del contaminante en el suelo (38). Este decremento puede ser el resultado de (i) productos de reacciones de oxidación química incorporándose en la materia orgánica, (ii) baja difusión en poros muy pequeños y adsorción en la materia orgánica, o (iii) la formación de capas semirrígidas alrededor de la fase líquida no acuosa (NAPL) con una alta resistencia hacia la transferencia de masa NAPL-agua (14).

Según Alexander (1) los compuestos contaminantes llegan a ser tan adsorbidos a la materia orgánica del suelo que no representarían un riesgo para la salud debido a su falta de movilidad. Sin embargo, afirma el autor, no está confirmado en todos los casos que el secuestro de los contaminantes tóxicos en el suelo disminuya su toxicidad. La movilidad de los contaminantes presentes en el material tratado y la toxicidad de los suelos siendo tratados son reducidos como resultado de reacciones físicas, químicas y biológicas en el proceso de biorremediación (63).

Cornelissen y sus colaboradores (22), hicieron una comparación entre la velocidad de desorción y la velocidad de degradación con 15 HPA (de 2 a 6 anillos). Proponen que al inicio, la fase rápida de la biorremediación, los factores microbianos limitan la velocidad de biodegradación y no la desorción. En la segunda parte de la biorremediación, la fase lenta, en los factores de desorción está el punto crítico. Utilizando diferentes compuestos, microorganismos y sedimentos, ellos calcularon una constante de velocidad de la desorción “rápida” de $0.05-3 \text{ h}^{-1}$ y una constante de velocidad de desorción “lenta” de $10^{-4}-10^{-3} \text{ h}^{-1}$.

2.5.2 Tipo de suelo.

El comportamiento hidrofóbico, que va aumentando con la complejidad de la estructura molecular del compuesto y la fuerte adsorción a la materia orgánica del suelo lleva a una limitada transferencia de masa. El comportamiento físico del suelo es determinada, en la mayoría de los casos, por la medida de las partículas que constituyen ese suelo. De acuerdo a la medida de las partículas el suelo se puede clasificar en arcilloso ($<0.002 \text{ mm}$), limoso ($0.002-0.05 \text{ mm}$), arenoso ($0.05-1 \text{ mm}$) y de grava ($>1 \text{ mm}$) (65). Estas características del suelo influyen en la adsorción de los contaminantes.

Por otro lado, las bacterias se encuentran en poros de $0.8-3 \text{ }\mu\text{m}$ y los contaminantes están en poros mucho más estrechos. Al inicio, los compuestos contaminan macroporos y superficies de algunas partículas donde hay relativamente bajo nivel de microorganismos,

después se difunden a poros más pequeños donde se puede llevar a cabo la biotransformación, si las condiciones ambientales y el número de microorganismos son favorables. Con el transcurso del tiempo, los contaminantes lentamente se difunden en poros extremadamente pequeños ($\ll 1\mu\text{m}$) donde no hay microorganismos. Por lo tanto, los contaminantes y las bacterias tienen una distribución microscópica diferente en el suelo y los compuestos deben difundirse primero hacia la bacteria para poder ser degradados (65).

2.5.3 Concentración del contaminante.

Las limitaciones de biodisponibilidad aumentan conforme la concentración de contaminante disminuye porque la cantidad absoluta de hidrocarburos disminuye (24). Al inicio, la velocidad de degradación es mayor porque los microorganismos metabolizan los compuestos más sencillos o de su preferencia dejando persistir una fracción remanente. A altas concentraciones de contaminante, la biodisponibilidad está regulada por la solubilización desde la fase líquida no acuosa y a bajas concentraciones, la biodisponibilidad está regulada por los procesos de desorción y difusión.

2.5.4 Adición de surfactantes.

La solubilidad de los HPA's puede variar si éstos se encuentran puros o en mezcla. Guha y sus colaboradores (36) mostraron que la solubilidad de naftaleno se ve reducida en presencia de fenantreno y/o pireno. La solubilidad del fenantreno aumentó en presencia de naftaleno y pireno. La solubilidad del pireno se redujo en presencia de naftaleno y no se afectó en presencia de fenantreno e incrementó en presencia de ambos. Concluyó que el incremento en los valores del coeficiente de partición es explicado por la partición del soluto en la interface micela-agua, la cual cambia la energía libre interfacial e incrementa efectivamente el volumen de la micela dejando a un mayor potencial de solubilización.

La solubilidad varía entre diferentes HPA, dependiendo de su complejidad estructural, como se ilustra en la tabla VI.

Tabla VI . Solubilidad de algunos HPA en agua (20).

Compuesto	µg/l
Dos anillos:	
Naftaleno	31,700
Acenafteno	4,472
Fluoreno	1,995
Tres anillos:	
Fenantreno	1,283
Fluorantreno	263
Antraceno	73
Cuatro anillos:	
Pireno	135
Trifenileno	41
Benzo[a]antraceno	14
Cinco anillos:	
Benzo[a]pireno	3.8
Dibenzo[a,h]antraceno	2.4
Perileno	0.4
Seis anillos:	
Benzo[g,h,i]perileno	0.2
Coroneno	0.14

La utilización de surfactantes puede ayudar a la movilización de hidrocarburos contaminantes. Los surfactantes son moléculas compuestas de una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica, por lo que actúan decreciendo los niveles de tensión superficial y tensión interfacial. La concentración crítica micelar es aquella arriba de la cual las micelas están presentes en solución (46). Las moléculas de surfactante forman agregados micelares en la fase acuosa cuando la concentración crítica micelar es excedida. Así que los compuestos

hidrofóbicos se solubilizan por encontrarse secuestrados dentro de las micelas. En el equilibrio, la cantidad de HPA solubilizado depende, linealmente, de la concentración de surfactante arriba de la CMC (87). Como se observa en la figura 9 esta solubilización y el decremento de la tensión superficial e interfacial son las mayores razones para facilitar el transporte de contaminantes adsorbidos en fase sólida hacia la fase acuosa. Varios factores influyen en la efectividad del surfactante: la identidad del químico adsorbido, las características del suelo, la concentración y estructura del surfactante y la toxicidad del surfactante hacia los microorganismos (4, 50). La concentración micelar crítica varía dependiendo de aspectos estructurales moleculares del surfactante como las ramificaciones del tallo, posición de la cabeza hidrofílica y la diversidad estructural de ésta (46). En la tabla VII se muestran propiedades de algunos surfactantes no iónicos.

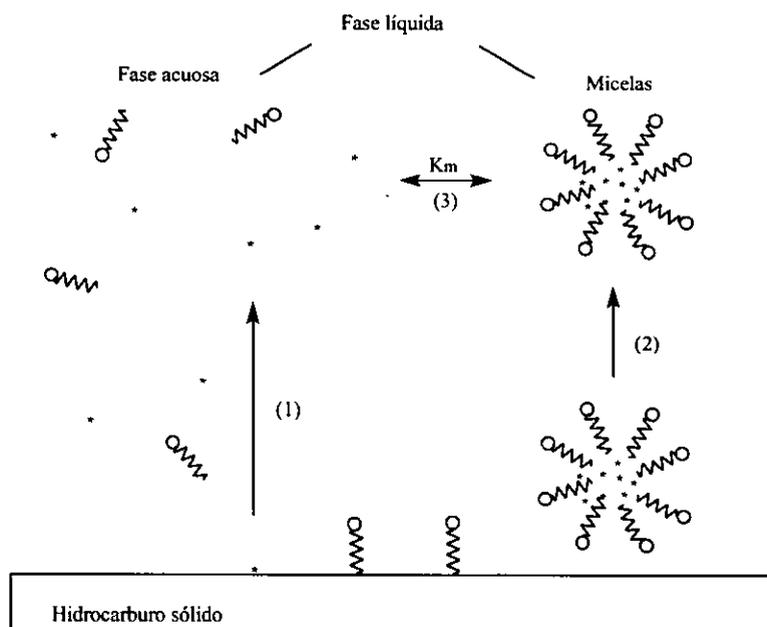


Figura 9. Modelo conceptual de la disolución del hidrocarburo mediado por el surfactante.

Tabla VII. Propiedades de surfactantes no iónicos.

Surfactante	Estructura	HLB	CMC (mg/L)	Referencia
Tritón X-100	$(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x\text{H}, x=10$	13.5	150	31
Tween 80	Polyoxyethylenesorbitan monooleato	15.5	13	31
Tween 40	Polyoxyethylenesorbitan monopalmitato	15.6	29	44

HLB = balance hidrofílico-lipofílico CMC = concentración micelar crítica

Estudios de Laha y Luthy (59, 70) demostraron que la mineralización del fenantreno decreció cuando varios surfactantes sintéticos no-iónicos fueron adicionados al suelo. Esta inhibición ocurrió cuando los surfactantes estuvieron presentes en concentraciones arriba de su concentración crítica micelar. Los autores sugirieron que la causa para la inhibición fue una limitada cantidad de fenantreno disponible debido a la fuerte partición en las micelas del surfactante. Así que la biodegradación también se ve limitada por la partición de HPA en las micelas más que por los efectos tóxicos de los surfactantes. Por otro lado, Grimberg (34) propone que los microorganismos sólo tienen acceso al fenantreno presente en fase acuosa y que no tienen acceso directo al compuesto sólido o al compuesto solubilizado en las micelas del surfactante.

Se ha investigado también, el uso de biosurfactantes, es decir, surfactantes producidos microbiológicamente para mejorar la biodegradación de compuestos hidrofóbicos (79). Los biosurfactantes son producidos también por levaduras, hongos y hasta por plantas superiores (75). Oberbremer (68) ha observado el incremento de la biodegradación de hidrocarburos del 45-140% con la adición de varios surfactantes glicolípidos y Jain (47) observó el incremento en la biodegradación de tetradecano, hexadecano y pristano en muestras de suelo con biosurfactante producido por *Pseudomona aeruginosa*. Sin embargo, cuando ellos utilizaron microorganismos degradadores de hidrocarburos y productores de biosurfactantes, observaron un decremento de la biodegradación debido posiblemente a la fuente de carbono utilizada. Cuando se produjo el

biosurfactante en aceites vegetales y glucosa se mejoraron sus características tensoactivas mientras que utilizar gasolina como fuente de carbono, no se observaron resultados positivos (70).

Entre los microorganismos productores de biosurfactantes se encuentran: *Torulopsis bombicola*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Rhodococcus erythropolis*, entre otros (79, 58). La producción de surfactante puede tener dos objetivos: cuando los surfactantes son extracelulares causan la emulsificación de los hidrocarburos y cuando son asociados a la pared celular, ellos facilitan la penetración de hidrocarburos al espacio periplásmico. Duvnjak y su grupo (30) demostraron que *Corynebacterium* produjo surfactante asociado a la pared celular el cual fue liberado después de la adición de hexadecano. Aunque hay casos donde no se conocen aún las causas de la producción del surfactante (58). Hammel (40) sugirió que las bacterias que producen biosurfactantes deben tener acceso directo a los hidrocarburos dentro de las micelas o microemulsiones vía un mecanismo de transporte complejo.

Entre los surfactantes bacteriales se encuentran los rhamnolípidos, lípidos de trehalosa, diferentes lípidos mono-, di- y trisacáridos, lípidos conteniendo aminoácidos, peptidolípidos y proteínas hidrofóbicas. De levaduras, los soforolípidos, lípido mannosileritritol y lípidos conteniendo proteína. Los surfactantes de origen fúngico son el ácido ustilágico y lípidos mannosileritritol. Todos estos biosurfactantes son de carácter no-iónico o aniónico y su concentración crítica micelar varía desde 1 a 200 mg/l (58).

2.5.5 Otros aspectos que limitan la biorremediación de suelos.

La biorremediación también se ve limitada cuando las condiciones ambientales cambian drásticamente, por lo general el proceso se detiene o disminuye sensiblemente la eficiencia de remoción. Si la concentración de hidrocarburo es muy elevada, entonces habrá que diluir, lo que significa mayores costos y manejo de materiales (62). Tomando en

cuenta que los derrames son accidentales, no siempre resulta factible proporcionar nutrientes, agua y aeración en el sitio problema. Otros factores limitantes incluyen el suministro de oxígeno y de nutrientes, especialmente cuando se trata de trabajar *in situ*, donde la distribución de los contaminantes y las condiciones geológicas pueden ser muy heterogéneas, por lo cual puede haber necesidad de ajustar la humedad, temperatura y pH. Se ha estudiado que la concentración de aceptores de electrones requeridos para asegurar la biorremediación varía con las características químicas y la cantidad del contaminante. Si el aceptor de electrones llega ser limitado, la biorremediación disminuirá o cesará (62). Otros estudios (70) mencionan que el oxígeno puede ser más limitante que la biodisponibilidad en altas concentraciones de hidrocarburo. Los nutrientes y los metabolitos poliméricos, así como los agregados celulares, pueden ser adsorbidos a la superficie orgánica obstruyendo los poros e impidiendo la interacción entre los microorganismos y las moléculas de hidrocarburo (70).

Para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, la adición de microorganismos degradadores se considera una valuable opción para incrementar la velocidad de degradación cuando el factor limitante es la actividad microbiana. Si el potencial de degradación es inherente a los microorganismos autóctonos del suelo, la adición de microorganismos degradadores específicos puede sólo reducir el tiempo necesario para la biorremediación (54).

Por lo antes mencionado, es necesario realizar estudios de biodegradación de hidrocarburos adsorbidos en suelo tomando en consideración los riesgos a la salud que nos vayan guiando hacia el punto final más conveniente de la biorremediación. Así, se plantean los siguientes objetivos.

3 Objetivos

3.1 Objetivo general.

Establecer un sistema para la biodegradación de diesel e hidrocarburos polinúcleo aromáticos adsorbido en suelo en presencia del hongo *Pleurotus ostreatus*.

3.2 Objetivos específicos.

- ◆ Determinar la degradación de diesel por un consorcio microbiano en medio líquido.
- ◆ Determinar la degradación de diesel adsorbido en suelo por un consorcio microbiano y por el hongo *Pleurotus ostreatus*, así como la combinación de ambos.
- ◆ Determinar las cinéticas de biodegradación de HPA adsorbidos en suelo con *Pleurotus ostreatus*.
- ◆ Analizar el efecto de surfactantes sobre la degradación de hidrocarburos polinúcleo aromáticos.
- ◆ Determinar el efecto de la aereación en la degradación de HPA.
- ◆ Determinar la mineralización de benzo[a]pireno por recuperación de $^{14}\text{CO}_2$.
- ◆ Analizar la adsorción al suelo de los metabolitos de la degradación del benzo[a]pireno por el hongo *Pleurotus ostreatus*.

4 Material y Métodos

4.1 Reactivos.

El pireno, antraceno, fenantreno y benzo[a]pireno fueron adquiridos en Aldrich Chemical Co. El hidrocarburo seleccionado como modelo de mezcla de hidrocarburos fue el diesel comercial (PEMEX), por ser un destilado del petróleo y su uso extendido como combustible en México. Se utilizaron 3 surfactantes no iónicos, Tween 80, Tween 40 y Tritón X-100 y uno iónico, el dodecilsulfonato de sodio (SDS) comprados a Sigma Chemical Co., así como los hidrocarburos alifáticos, n-decano, n-undecano, n-dodecano, n-tridecano, n-tetradecano, n-pentadecano, n-hexadecano, n-heptadecano, octadecano, nonadecano, eicosano, n-henicosano y n-docosano y el HPA benzo[a]pireno-7-¹⁴C (26.6 mCi/mmol). Los solventes diclorometano, tolueno y acetonitrilo fueron comprados a Fisher. El HCl 0.01 N (estandarizado), el ácido acético, el Na₂SO₄ anhidro, el Na₂SO₄, las sales de Ba₂Cl, acetato de sodio, el fosfato de sodio monobásico y dibásico y los componentes del medio mineral se adquirieron de J.T. Baker. La glucosa, el extracto de levadura y el agar bacteriológico para los medios de cultivo fueron adquiridos de Difco.

4.2 Microorganismos y medios de cultivo.

4.2.1 Consorcio microbiano.

Se utilizó un consorcio microbiano aislado de zonas contaminadas con hidrocarburos (petróleo crudo) (>50 g/Kg peso seco de suelo) de refinerías y pozos petroleros del Golfo de México. Esta comunidad fue mantenida por adición secuencial de petróleo crudo tipo Maya, en el laboratorio de Biotecnología Ambiental del Instituto Mexicano del Petróleo. Posteriormente, se adaptó a crecer en diesel como única fuente de carbono en medio líquido por medio de resiembras mensuales, liofilizado y resembrado en medio mineral líquido con la siguiente composición:

Medio mineral	g/l
K ₂ HPO ₄	1.71
KH ₂ PO ₄	1.32
NH ₄ Cl	1.26
MgCl·6H ₂ O	0.0108
CaCl ₂	0.02
Metales traza	1 ml

Utilizando agua destilada y ajustando el pH a 7.0, se esterilizó el medio en autoclave (15 lb-15 min). Se adicionó de 5 a 10% de diesel y se inoculó con el consorcio microbiano, previamente adaptado, al 10%. Se incubó durante un mes, tiempo al cual la concentración de biomasa alcanzó un nivel adecuado, a 30°C y 200 rpm para posteriormente ser utilizado en los experimentos de degradación de diesel en medio líquido y en suelo.

4.2.2 Hongo.

El hongo de putrefacción blanca que se utilizó en este trabajo fue *Pleurotus ostreatus* ECS-110(IE8), depositada en el cepario micológico de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Tapachula, Chiapas. Se inoculó, tomando el hongo de caja Petri, en medio líquido compuesto de glucosa (5 g/l) y extracto de levadura (5 g/l) a pH de 5.5. Se incubó durante 6 días a 29°C y 200 rpm y los pellets de hongo formados se reinocularon en trigo húmedo estéril (no se determinó la humedad del trigo). Se dejó incubar el hongo en el trigo por 10 días antes de ser utilizado en los experimentos.

4.3 Análisis del suelo.

Para caracterizar el tipo de suelo utilizado se determinaron los siguientes parámetros:

- pH
- Conductividad eléctrica
- Materia orgánica
- Humedad
- Textura
- Nitrógeno
- Fósforo
- Cationes disponibles

Los análisis del suelo fueron realizados por el Laboratorio de Investigaciones Ambientales CEIB-UAEM. (Ver anexos para metodología empleada).

4.4 Cinética de degradación de diesel.

4.4.1 Cinética de consumo de diesel en medio líquido.

Para determinar la acción del consorcio microbiano sobre la degradación del diesel se llevó a cabo la cinética de consumo en medio líquido. En matraces Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de medio mineral mínimo (4.2.1) y 7 % de diesel como única fuente de carbono, se inocularon con el consorcio microbiano, previamente crecido en diesel, y se incubaron a 29°C y 200rpm. Los controles contenían sólo medio mineral mínimo y diesel. El consumo de diesel se monitoreó durante 320 h tomando muestras cada 50 h. 5 ml de cada muestra fueron extraídos dos veces con diclorometano acidificado y la fase orgánica fue concentrada hasta 700-500 µl y pasada a través de sulfato de sodio para eliminar completamente la humedad. Se realizó una curva de calibración donde el área total bajo la curva se graficó contra su peso. Los extractos fueron aplicados a un cromatógrafo de gases

marca Varian, modelo 3700 equipado con un detector de ionización de flama, columna capilar (30 m largo x 0.25 mm, SPB-20, Supelco), helio como gas acarreador y con el siguiente programa: temperatura del inyector 220 °C; temperatura del detector ión 300 °C; temperatura inicial 90 °C tiempo 2 min; velocidad del programa 6 °C/min; temperatura final 280 °C tiempo 5 min.

4.4.1.1 Determinación de proteína.

Cada muestra obtenida se centrifugó y el precipitado se lavó dos veces con agua destilada y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de buffer fosfatos para después ser sonificado. Los restos celulares se precipitaron por centrifugación y el sobrenadante se utilizó para cuantificar proteína.

4.4.2 Cinética de degradación de diesel adsorbido en suelo.

Para los experimentos de degradación de diesel se utilizaron frascos de 100 ml a los cuales se les adicionó 5 g de suelo seco estéril, 1 ml de diesel en diclorometano y 1 g de trigo (figura 10). El solvente se dejó evaporar por 20 min antes de la inoculación. Una serie de unidades experimentales se inocularon con 1 g de *Pleurotus ostreatus* en trigo, la segunda serie de unidades con el consorcio microbiano al 10 % y una tercera serie de frascos con ambos. Se incubaron por 5 semanas y se tomaron muestras por triplicado cada semana con sus respectivos controles sin inocular.

La extracción se llevó a cabo de la siguiente manera. Se adicionó 25 ml de diclorometano al suelo y se agitó vigorosamente en vórtex por unos minutos y se dejándose 20 min. antes de centrifugar a una velocidad de 10,000 rpm durante 15 min. Después la fase orgánica se deshidrató y limpió con Na₂SO₄ anhidro en un filtro de fibra de vidrio. Repitiéndose el proceso por dos veces más y se evaporó el solvente DCM en un rotavapor hasta tener 2 ml de extracto para su análisis en cromatografía de gases.

Para el análisis de la degradación se utilizó una curva estándar que relacionaba el área bajo la curva con la concentración en mg/ml de diesel. El equipo utilizado fue un Cromatógrafo de gases de ionización de flama marca Varian modelo 3700 con una columna capilar (30 m x 0.25 mm) SPB-20 marca Supelco, con las siguientes condiciones, temperatura inicial 80°C por 2 min, temperatura final 280°C por 5 min a una velocidad de 6°C/min y una temperatura del inyector de 260°C y helio como gas acarreador.

4.4.3 Análisis cualitativo del diesel.

Para el análisis cualitativo del diesel se determinaron los tiempos de retención de estándares de hidrocarburos alifáticos puros y en mezcla desde el decano (n-C10) hasta el docosano (n-C22) disueltos en DCM y analizados por cromatografía de gases bajo las condiciones señaladas en el punto 4.4.2.

4.5 Cinéticas de degradación de hidrocarburos polinúcleo aromáticos.

4.5.1 Establecimiento de los sistemas de degradación.

Para los ensayos en frasco (100 ml) y columna de vidrio (15 cm x 1.6 cm d.i.) se utilizó 5 g de suelo seco y estéril y 4 ml de agua destilada para obtener una humedad del 48%. Se adicionó al suelo 0.5 mg de HPA (pireno, antraceno y fenantreno) en solución con diclorometano, se dejó evaporar el solvente por 15 min y se agitó. Posteriormente se adicionó 1 g de trigo húmedo estéril y finalmente se inoculó con 1 g (aproximadamente) del hongo *Pleurotus ostreatus* previamente crecido en trigo. Los frascos se cubrieron con su tapa durante un período de incubación de 3 semanas de la misma manera que los ensayos de degradación de diesel (figura 10).

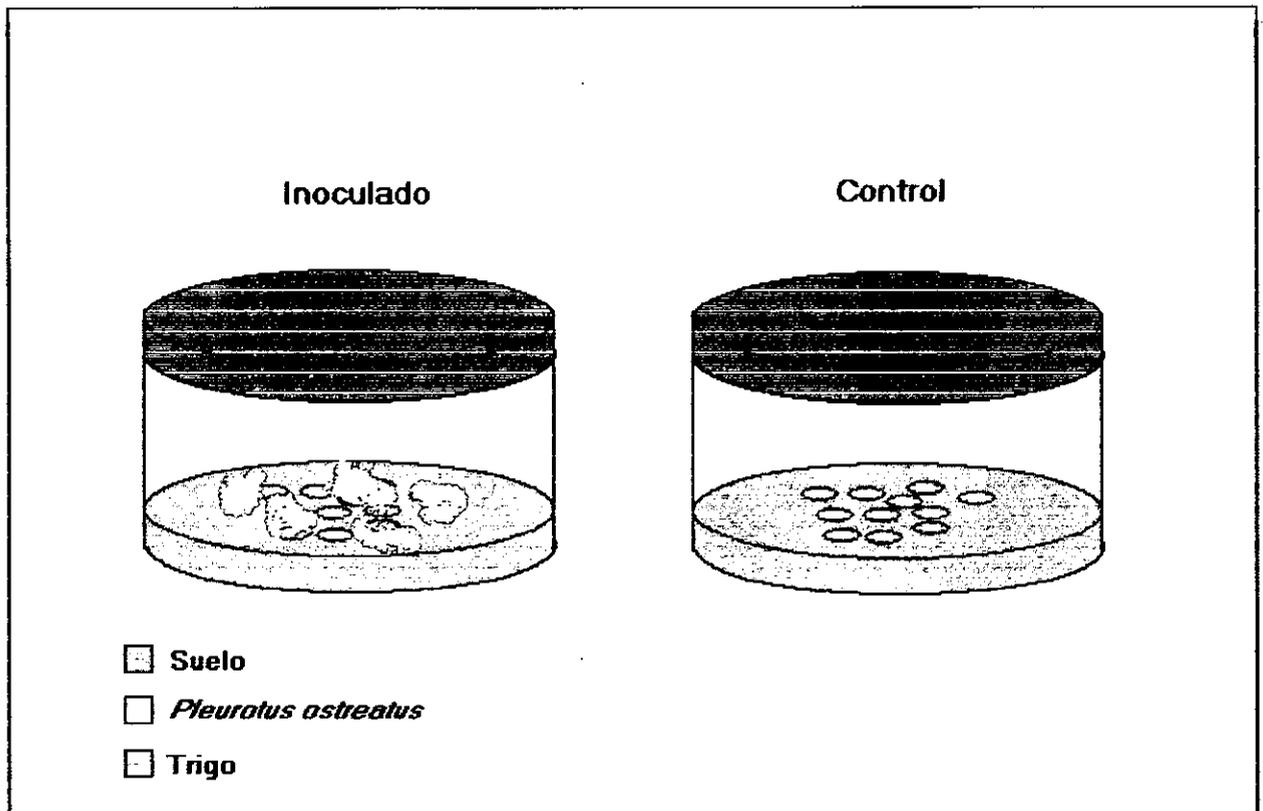


Figura 10. Sistema en frasco para la degradación de diesel y HPA's.

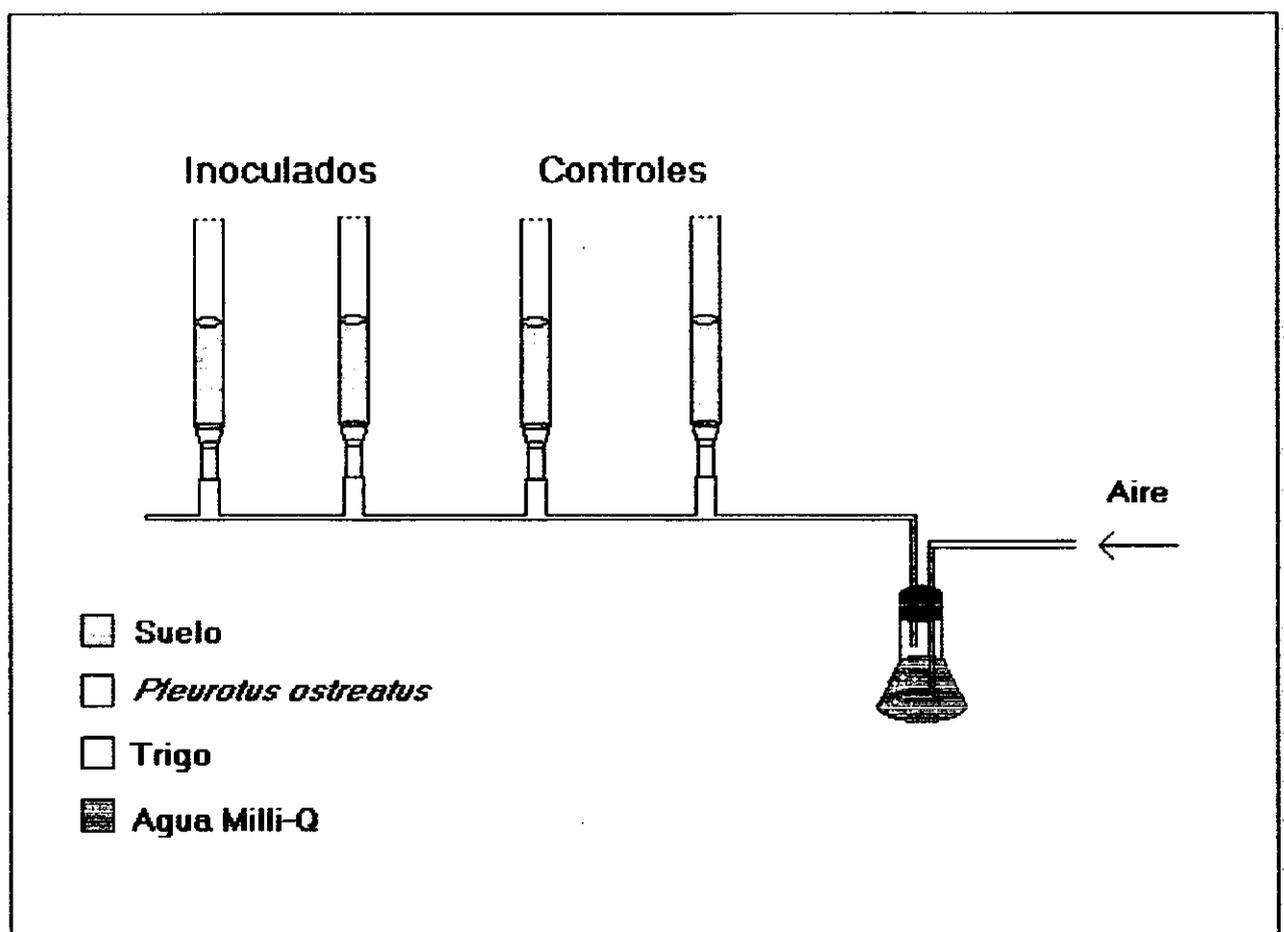


Figura 11. Sistema experimental en columnas para la degradación de Hidrocarburos Polinúcleo Aromáticos por *Pleurotus ostreatus*

En las columnas se adicionó primero el trigo, después el hongo y finalmente el suelo con HPA quedando éste en la parte superior, adicionando aire húmedo por la parte inferior (figura 11). Se siguió el mismo tratamiento que en los frascos. Cada semana se extrajo una muestra de suelo por triplicado y con su respectivos controles sin inocular.

Se realizaron una serie de experimentos donde las variables fueron: HPA, pireno, fenantreno o antraceno; agente oxidante con o sin adición de 1 mM de H₂O₂; surfactante Tritón X-100, Tween 80, Tween 40 o sin surfactante; reactor, frasco o columna y tiempo de contaminación del suelo previo a la biorremediación, 0 o 2 meses (tabla VIII). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Tabla VIII. Experimentos realizados en el presente trabajo.

Exp. no.	HPA	H ₂ O ₂ 1mM	TX100 0.15%	T80 0.15%	T40 0.15%	Frasco	Columna	*Tiempo (meses)
1	Pir					X		0
2	Pir		X			X		0
3	Pir			X		X		0
4	Pir				X	X		0
5	Pir	X				X		0
6	Pir	X			X	X		0
7	Pir						X	0
8	Pir				X		X	0
9	Pir						X	2
10	Pir				X		X	2
11	Pir					X		2
12	Pir				X	X		2
13	Ant					X		0
14	Ant				X	X		0
15	Ant						X	0
16	Ant				X		X	0
17	Fen					X		0
18	Fen				X	X		0
19	Fen						X	0
20	Fen				X		X	0

*Tiempo de añejamiento o permanencia del HPA.

4.5.2 Extracción de hidrocarburos polinúcleo aromáticos.

La extracción se llevó a cabo de la siguiente manera. Se adicionó 25 ml de diclorometano al suelo y se agitó vigorosamente en vórtex por unos minutos y se dejó 20 min. antes de centrifugar a una velocidad de 10,000 rpm durante 15 min. Después la fase orgánica se deshidrató y limpió con Na₂SO₄ anhidro en un filtro de fibra de vidrio. Repitiéndose el proceso por dos veces más y se dejó evaporar el solvente hasta la sequedad en un rotavapor y finalmente se aforó el volumen a 1 ml con acetonitrilo.

4.5.3 Análisis de hidrocarburos polinúcleo aromáticos.

Para medir la desaparición del HPA se hizo un análisis espectrofotométrico observándose la disminución de absorbancia a una longitud de onda determinada (333 nm para el pireno y 250 nm para el fenantreno y antraceno). El equipo utilizado fue un espectrofotómetro Beckman DU-650. Para el cálculo del % de degradación se utilizaron curvas estándar para cada sustrato obteniéndose los mg/ml remanentes de HPA, tomando las concentraciones de los controles como el 100% remanente. Este método fue calibrado comparado con la determinación en HPLC.

4.6 Degradación de benzo[a]pireno.

4.6.1 Determinación de la producción de CO₂ y mineralización de benzo[a]pireno.

Para determinar la formación de CO₂ y la posible mineralización se utilizó el sistema de columnas aereadas y como sustrato al benzo[a]pireno frío (500 µg/ml) y benzo[a]pireno-7-¹⁴C (0.2 µCi/ml). Para evitar el CO₂ del aire húmedo, se colocó al inicio de la corriente de aire una trampa que contenía una solución de KOH 1M (figura 12). Se disolvió el vial del benzo[a]pireno-¹⁴C con 950 µl de tolueno para obtener una concentración final de 52 µCi/ml. Se tomaron 46 µl de esta solución y se disolvieron en una solución de 6 mg de

benzo[a]pireno frío en 12 ml de DCM. Se adicionó 1 ml de esta solución final en 5 g de suelo (por cada columna). Se inoculó con 1 g del hongo *Pleurotus ostreatus* y 4 ml de agua (48% de humedad). Se atrapó el CO₂ producido en una solución de KOH 8.5 mM y se analizó cada semana por duplicado. El análisis consistió de tomar 20 ml de la solución de KOH y se le adicionó Ba₂Cl 1mM para precipitar el KOH que reaccionó con el CO₂ producido. El remanente se tituló con HCl 0.01 M, utilizando indicador de fenolftaleína. Para el análisis de ¹⁴CO₂ producido se tomaron 0.5 ml de la solución del frasco de KOH y se adicionaron a 4.5 ml de líquido de centelleo. La radioactividad se analizó en cuentas por minuto (CPM) en un contador Beckman Instruments, Inc. LS Analyzer. Todos estos experimentos se hicieron por duplicado. Por otro lado, se fue analizando la degradación de 0.5 mg benzo[a]pireno adsorbido en 5 gr de suelo por el hongo *Pleurotus ostreatus* en columnas. La extracción se llevó a cabo con solvente diclorometano y el análisis de la concentración del benzo[a]pireno remanente se hizo por espectrofotometría. El establecimiento del sistema de degradación para el benzo[a]pireno y el análisis cuantitativo se realizó con el procedimiento indicado en el punto 4.4. Los experimentos de degradación se hicieron por triplicado con sus respectivos controles sin inocular.

4.6.2 Analisis de la adsorción al suelo del benzo[a]pireno metabolizado.

Para determinar el destino del benzo[a]pireno metabolizado, se analizó la radiactividad del suelo después de 3 semanas de incubación del hongo *Pleurotus ostreatus*. La extracción del benzo[a]pireno y benzo[a]pireno-¹⁴C se llevó a cabo de la siguiente manera: para cada columna (suelo inoculado y controles) se adicionaron 20 ml de agua grado Milli-Q al suelo y se acidificó con una gota de H₂SO₄, se agitó el frasco con vórtex y después de 1 h se centrifugó a una velocidad de 10 rpm durante 15 min. Se tomaron 0.5 ml del sobrenadante y se adicionaron a 4.5 ml de líquido de centelleo para el análisis de la radiactividad. Después se separó el suelo de la fase acuosa y se le adicionaron 25 ml de DCM al suelo, se agitó vigorosamente en vórtex por unos minutos y se dejaron transcurrir 20 min. antes de centrifugar a una velocidad de 10,000 rpm durante 15 min. Después la fase orgánica se deshidrató y limpió con Na₂SO₄ anhidro en un filtro de fibra de vidrio.

Repitiéndose el proceso por dos veces más y se dejó evaporar el solvente por rotavapor hasta obtener finalmente un volumen de 0.5 ml. A este volumen de 0.5 ml se le adicionaron 4.5 ml de líquido de centelleo para analizar la radiactividad. Para conocer el porcentaje de extracción se hizo un blanco el cual consistió de 4.5 ml de líquido de centello y 500 µl de una solución que contenía 250 µg de benzo[a]pireno y 0.1 µCi de benzo[a]pireno-¹⁴C. La radioactividad se analizó en cuentas por minuto (CPM) en un contador Beckman Instruments, Inc. LS Analyzer.

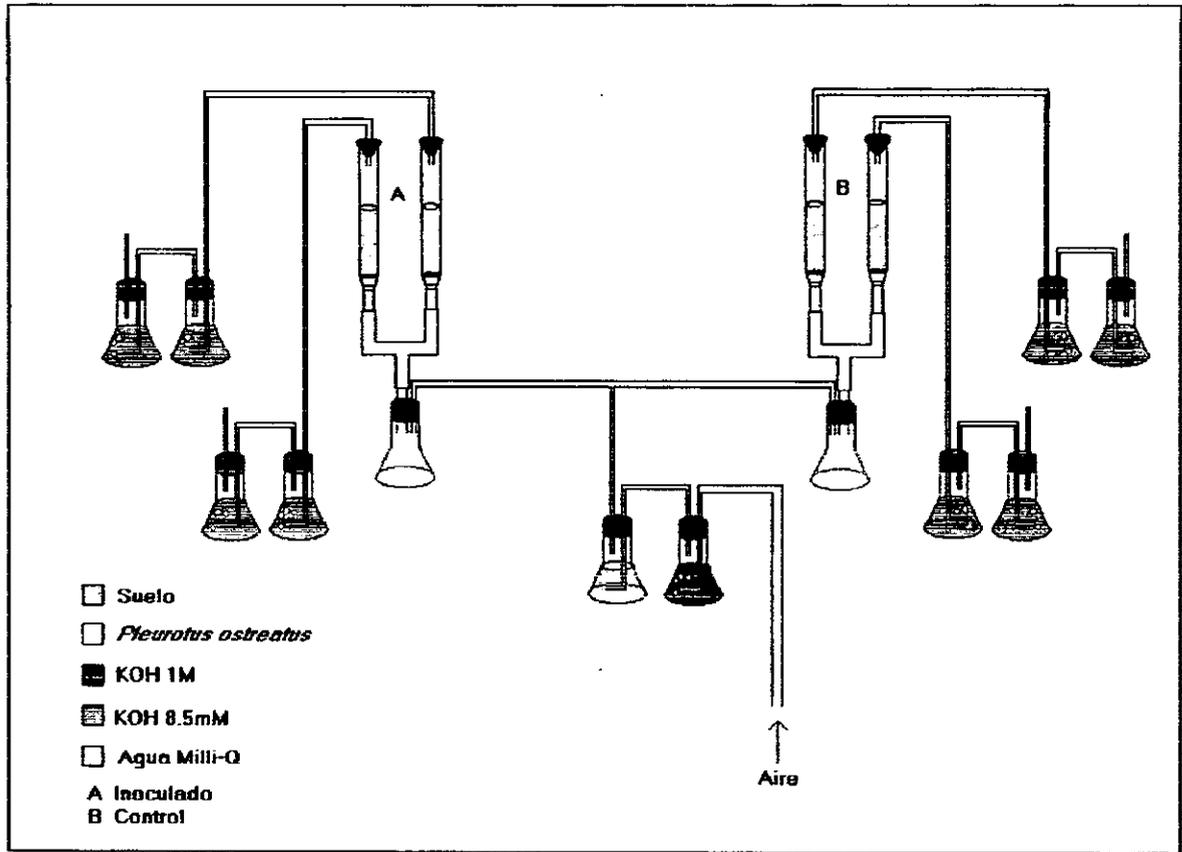


Figura 12. Sistema para el análisis de la producción de CO₂.

4.7 Determinación de la humedad de los sistemas.

Para la determinación de la humedad en las unidades experimentales se corrieron 2 experimentos, uno en frascos y el otro en columnas. Se tomaba muestra del suelo y se determinaba la humedad cada semana durante 3 semanas. Se utilizó una Balanza de determinación de Humedad marca Ohaus modelo 6010 & 6100 y los experimentos se hicieron por triplicado.

5 Resultados y discusión

5.1 Análisis del suelo.

De acuerdo al análisis del suelo realizado por el Laboratorio de Investigaciones Ambientales CEIB-UAEM, los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Tabla IX. Características físico-químicas del suelo.

Parámetro	Suelo
pH	5.6
Conductividad eléctrica ($\mu\text{ohms/cm}$)	94.7
Materia orgánica (%)	6.2
Humedad (%)	1.7
Textura	Franco-arcillo limoso
% de arcillas	36.0
% de arenas	54.0
% limos	10.0
Nitrógeno (%)	0.21
Fósforo disponible (mg/kg)	26.5
Cationes disponibles (incluye los intercambiables y solubles) (meq/100 g)	
Calcio	35.7
Magnesio	6.1
Sodio	6.6
Potasio	1.6

Los análisis del suelo seleccionado mostraron que se trataba de un suelo ácido con textura franco-arcilloso limoso, con un contenido muy bajo de nitrógeno y de humedad. Su contenido de materia orgánica es muy alto lo cual podría causar problemas de adsorción de los HPA. Varios estudios han sugerido que el contenido de carbón orgánico del suelo es el factor más importante para determinar la adsorción de moléculas hidrofóbicas tales como los HPA (90). De los metales analizados el calcio fue el metal con mayor concentración en el suelo. Según estudios recientes (49), el enlace o atracción entre los HPA y los ácidos húmicos es mayor en presencia de iones calcio, por lo que podría representar un problema para la extracción de los HPA.

5.2 Cinéticas de degradación de diesel.

5.2.1 Cinética de consumo de diesel en medio líquido.

Para analizar la degradación de diesel en medio líquido se llevó a cabo una cinética de crecimiento y de consumo de hidrocarburos. La cinética de producción de biomasa del consorcio microbiano en MMM con diesel como única fuente de carbono y su consumo es ilustrada en la figura 13. Una concentración de biomasa de 43 mg/l fue observado después de 200 h de incubación, correspondiendo a un 38.7 % de degradación de diesel durante la fase exponencial de crecimiento. La disminución de la concentración del diesel continuó durante el período estacionario y disminuyó hasta un 71 % después de 320 h de tratamiento. El crecimiento se asemeja a una curva de Monod, donde el diesel fue consumido y biomasa fue producida. La curva estándar de concentración de diesel en cromatografía de gases se presenta en los anexos.

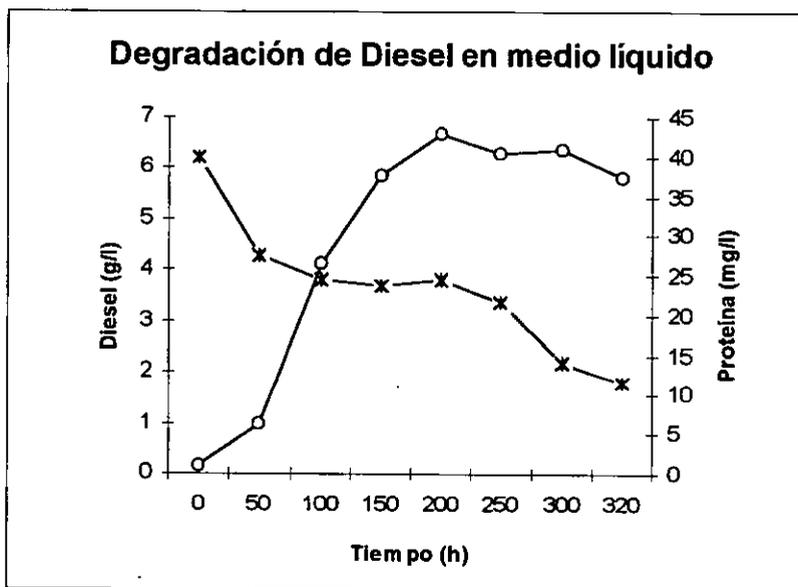


Figura 13. Degradación de diesel en medio líquido por el consorcio microbiano. La línea continua representa la cinética de crecimiento y la línea discontinua representa el consumo de diesel.

En las figuras 14 y 15 se presentan los cromatogramas típicos de las muestras analizadas correspondientes al tiempo 0 y a 320 h de tratamiento, respectivamente.

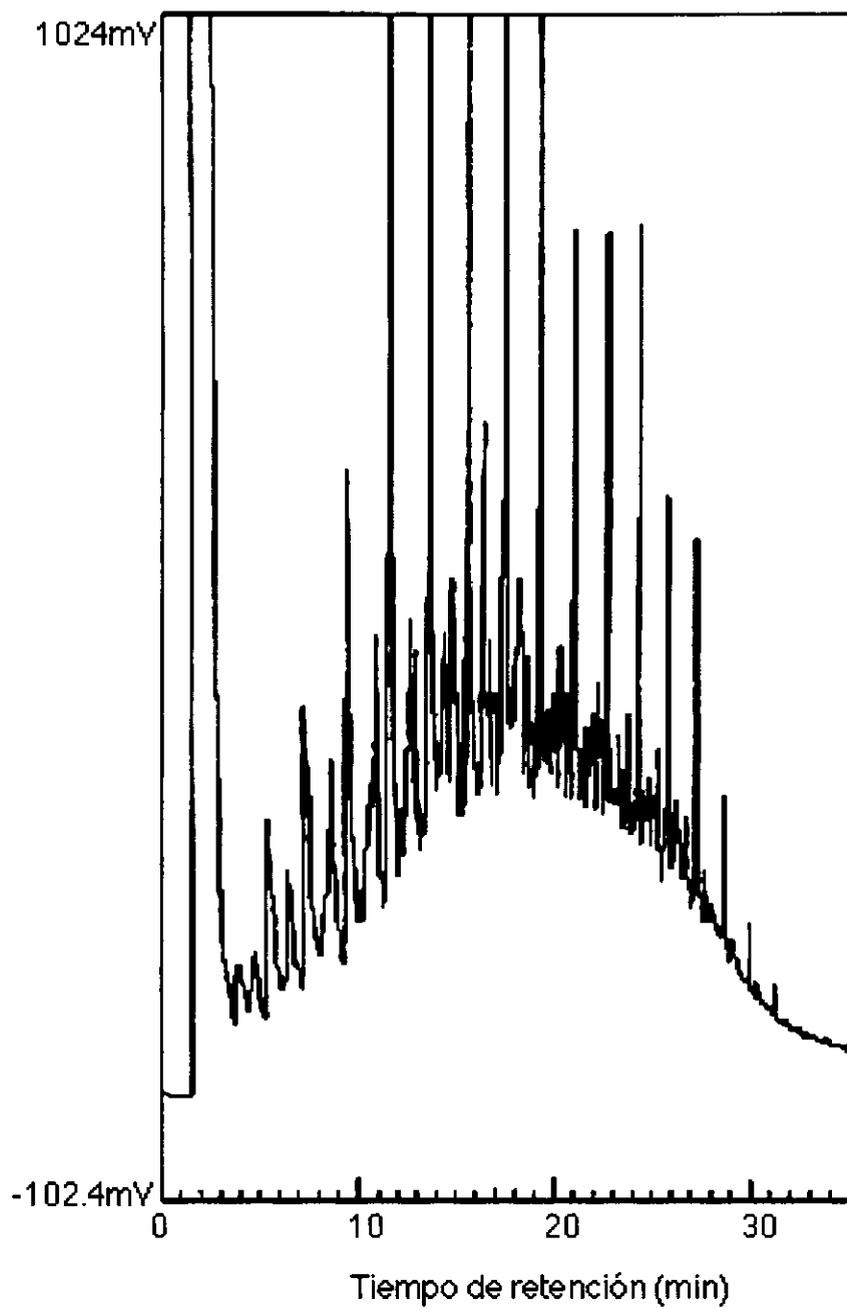


Figura 14. Cromatografía de una muestra de diesel a tiempo cero.

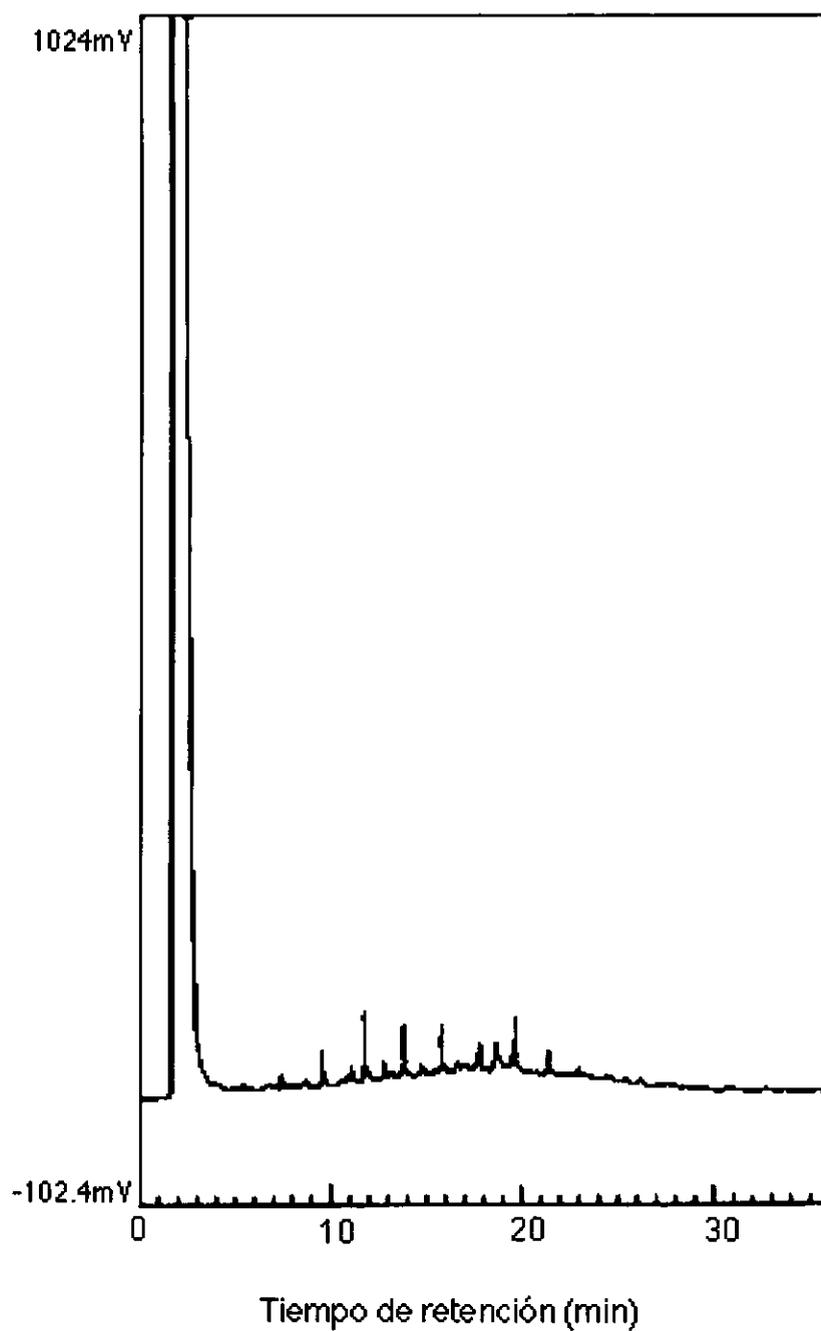


Figura 15. Cromatografía de una muestra de diesel a 320 h de incubación con el consorcio microbiano.

5.2.2 Cinéticas de degradación de diesel adsorbido en suelo.

Una vez comprobado que el consorcio microbiano tenía la capacidad de consumir diesel en medio líquido, se comparó su capacidad degradativa con la del hongo *Pleurotus ostreatus*. Se utilizaron como sistemas experimentales frascos con diesel adsorbido en suelo. El diesel fue el hidrocarburo seleccionado como fracción típica del petróleo. Se realizaron experimentos con *Pleurotus ostreatus* y con un consorcio microbiano previamente adaptado en diesel como única fuente de carbono.

La gráfica (figura 16) expresada en porcentaje de degradación, muestra que el consorcio microbiano logró una degradación del diesel del 60 %. La unión del hongo con el consorcio microbiano dió un aumento en la degradación tal que logró el 89 % y la degradación del diesel sólo por el hongo *Pleurotus ostreatus* llegó a ser del 81 %.

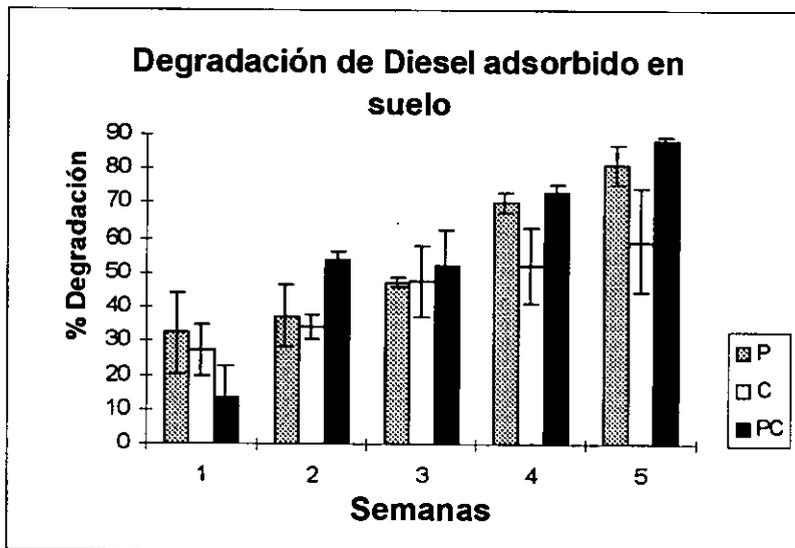


Figura 16. Cinética de degradación de diesel adsorbido en suelo por P *Pleurotus ostreatus*, C consorcio microbiano y PC por ambos.

Se confirmó que los organismos nativos aclimatados en diesel pueden ser producidos *ex situ* y reinoculados a un suelo contaminado como un tratamiento efectivo para la remoción del diesel del suelo. Como se observa, a partir de la tercera semana no se tiene una diferencia significativa entre la acción del hongo actuando sólo y con la acción combinando hongo/consorcio microbiano. La degradación debida al consorcio microbiano entre la 3a., 4a. y 5a. semana no mostró una diferencia significativa. Por lo que se puede atribuir la remoción del diesel exclusivamente a la acción del hongo *P. ostreatus*. Resultado que nos sorprendió puesto que no se conocía la acción de este hongo en la degradación de hidrocarburos alifáticos. Estos resultados coinciden con estudios previos de Lang (60) donde analizó diferentes cepas de *Pleurotus ostreatus*, *D. squalens* y *G. applanatum* y observó que ni el crecimiento ni la producción de laccasa y manganeso peroxidasa de cepas de *P. ostreatus* fueron afectadas por la microbiota del suelo. Concluyendo que este hongo fue altamente competitivo con la microbiota del suelo y que actuó mejor porque *P. ostreatus* penetra en el suelo y *D. squalens* y *G. applanatum* no. También se observó que el hongo penetró en el suelo. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa de computación SAS System 6.08 bajo supervisión de la Dra. Refugio Rodríguez, investigadora del CINVESTAV.

Para la optimización de la biorremediación, es necesario entender los factores que controlan la actividad microbiana en un sitio específico. Uno de los factores más importantes es la concentración del sustrato. La remoción del diesel puede ser analizada por el modelo cinético del crecimiento exponencial y concentración alta de sustrato ($-ds/dt = ke^{rt}$; donde $[s] \gg Km$). Obteniéndose una velocidad de degradación de 0.091 h^{-1} para la degradación de diesel en medio líquido y $<0.04 \text{ d}^{-1}$ en medio sólido con el consorcio microbiano. En presencia de *P. ostreatus* la velocidad de degradación fue de 0.062 d^{-1} . (Ver anexos).

Las pérdidas por volatilización se podrían considerar nulas ya que los controles permanecen constantes a lo largo del experimento. La humedad de los sistemas fue del 60 %.

En la degradación del diesel por el consorcio microbiano se observó un aumento en el pico de tiempo de retención de 21.0 min, con respecto a los controles a partir de la tercera semana. En la degradación de diesel por *Pleurotus ostreatus* se observó un aumento en el pico de tiempo de retención de 13.0 min a partir de la segunda semana y una disminución de un pico de tiempo de retención de 14.8, n-tetradecano, a partir de la tercera semana. En la degradación de diesel por *Pleurotus ostreatus* y el consorcio microbiano se observó un aumento en los picos de tiempo de retención de 18.3 min, n-hexadecano, y 21.0 min, a partir de la segunda semana y 20.0 min, n-heptadecano, a partir de la cuarta semana. Así que el perfil de degradación de diesel no pareció ser el mismo para el hongo *Pleurotus ostreatus*, para el consorcio microbiano y para cuando se encontraban ambos en el mismo suelo, ya que se observó la formación de algunos productos o la desaparición de otros de manera diferente.

Según el análisis cualitativo, el diesel utilizado contenía, entre otros, hidrocarburos alifáticos desde el n-decano (C10) hasta el n-docosano (C22), ver anexos. Las figuras 17, 18, 19 y 20 muestran las cromatografías de una muestra control (sin inóculo), una muestra tratada con hongo de *Pleurotus ostreatus* y el consorcio microbiano, una muestra tratada sólo con el hongo y una muestra tratada con el consorcio microbiano, respectivamente, a las 5 semanas de tratamiento.

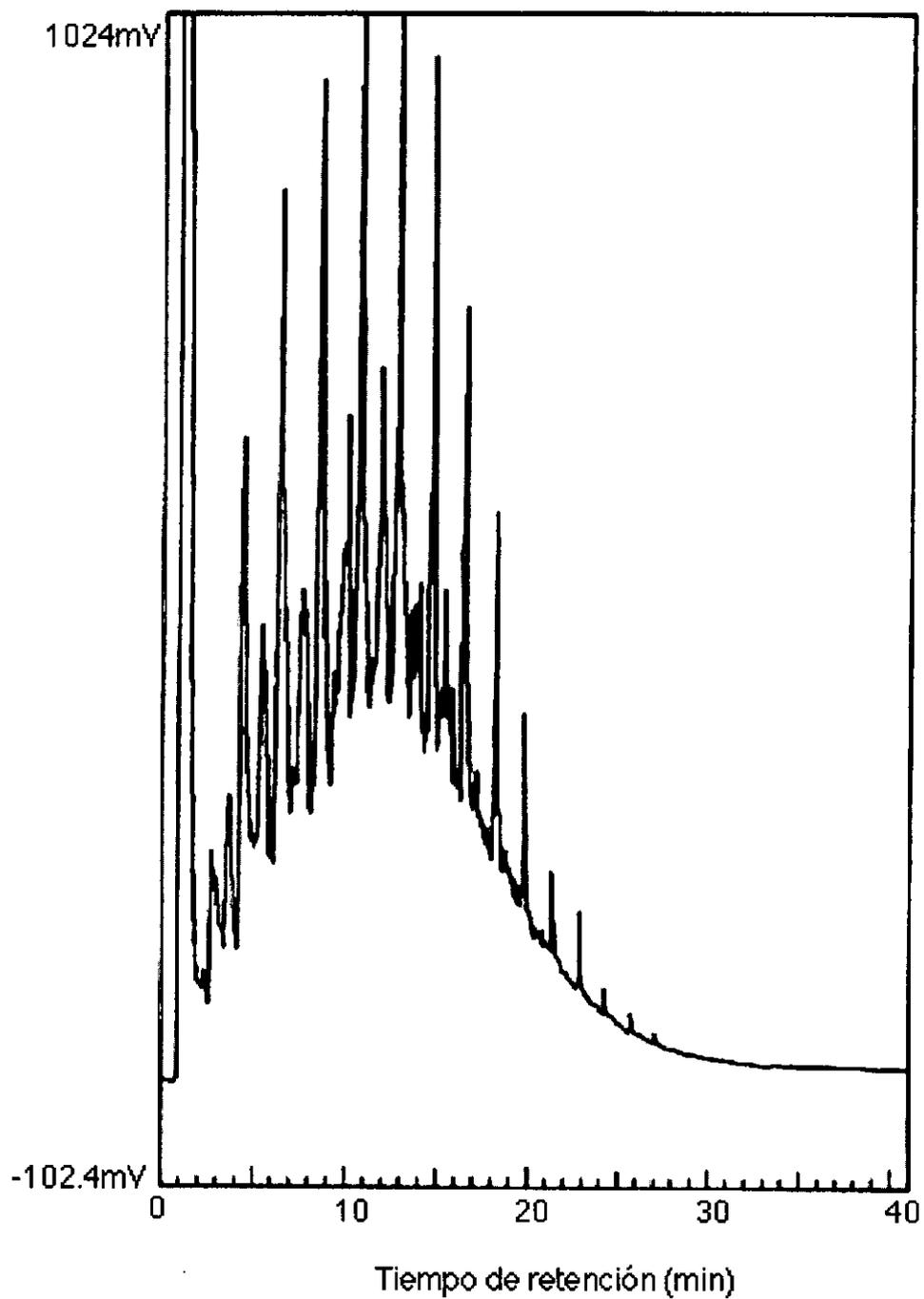


Figura 17. Cromatograma control de una muestra de diesel.

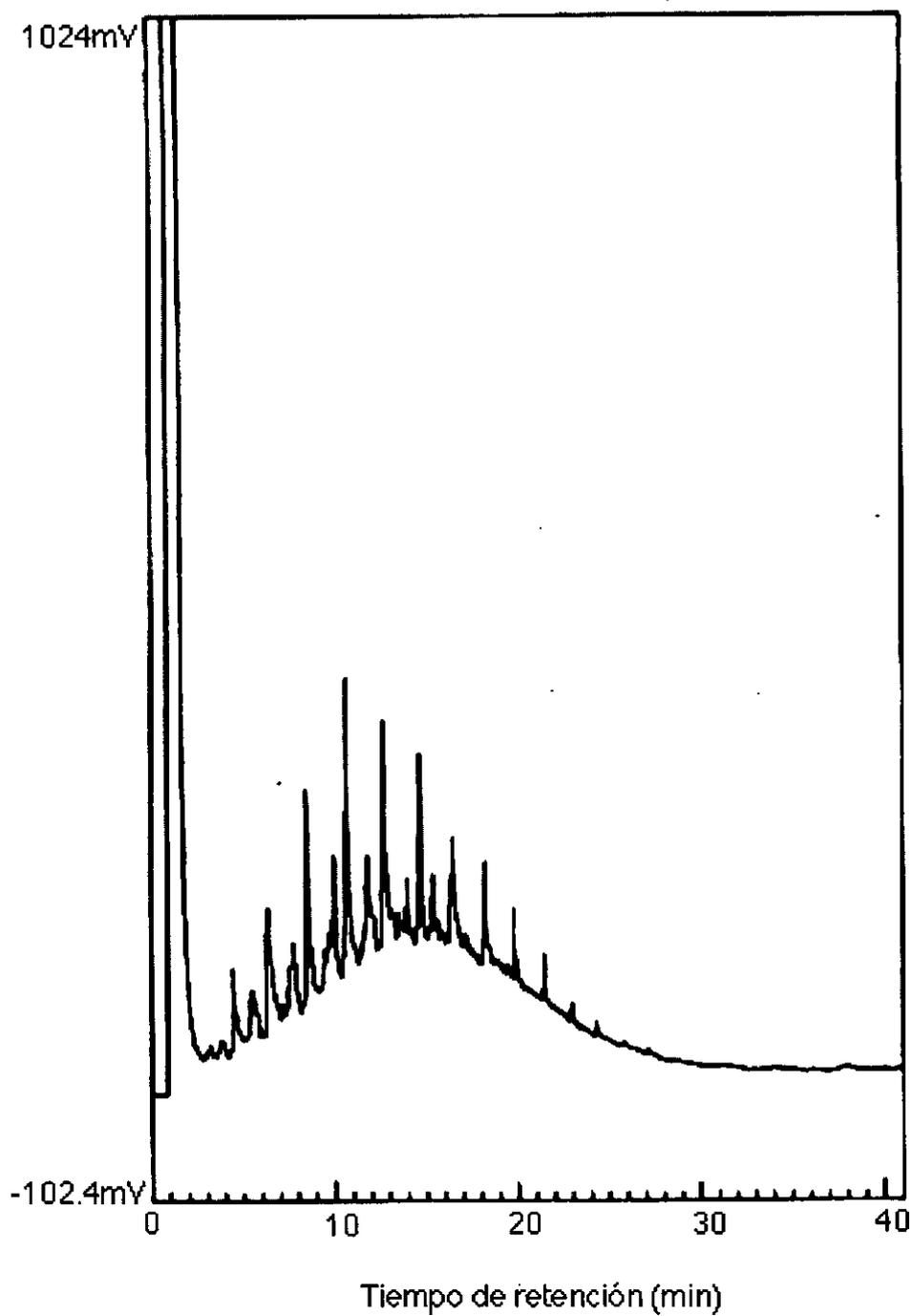


Figura 18. Cromatograma de una muestra de diesel después de cinco semanas de tratamiento con el hongo *Pleurotus ostreatus* y el consorcio microbiano.

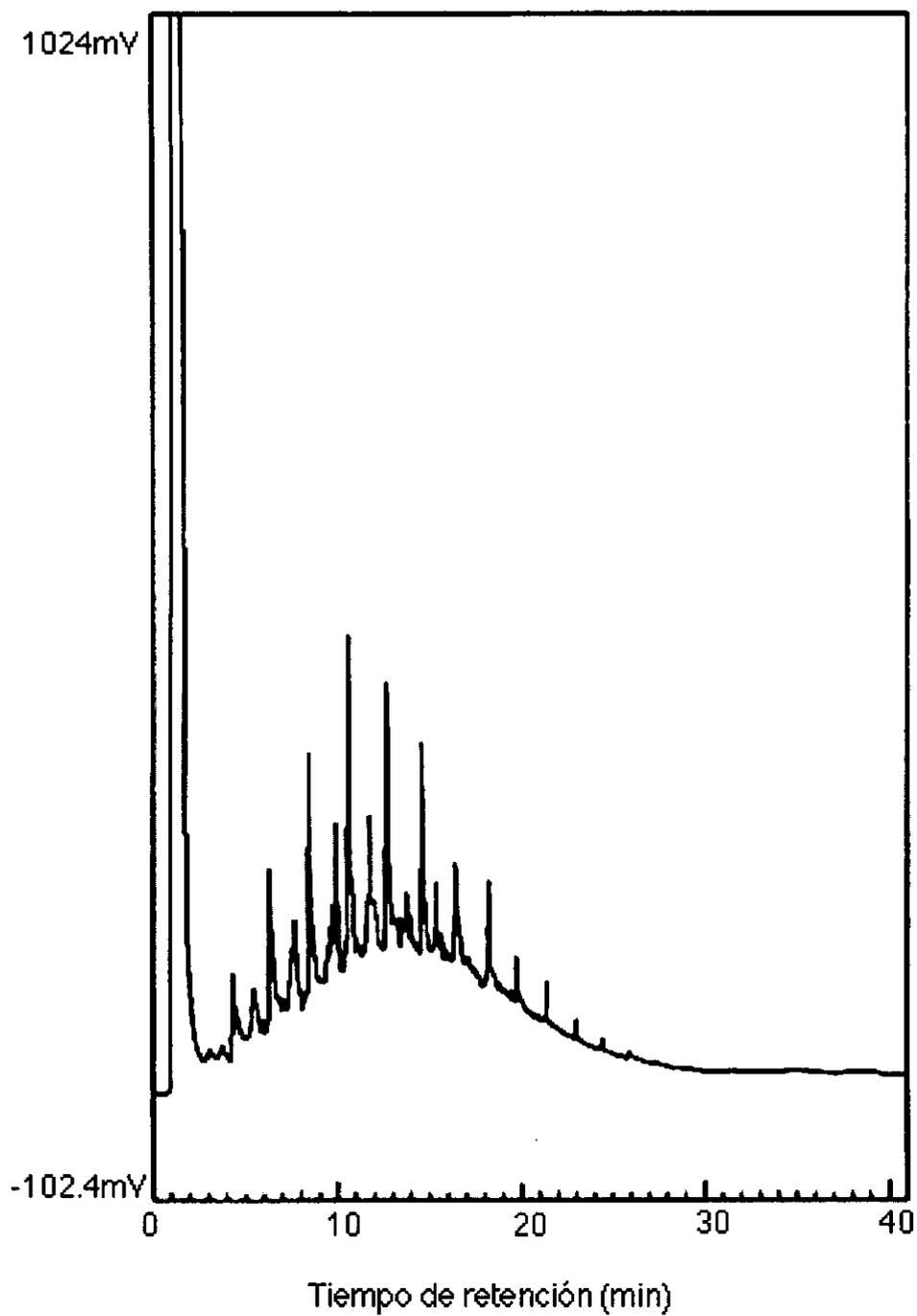


Figura 19. Cromatograma de una muestra de diesel después de cinco semanas de tratamiento con el hongo *Pleurotus ostreatus*.

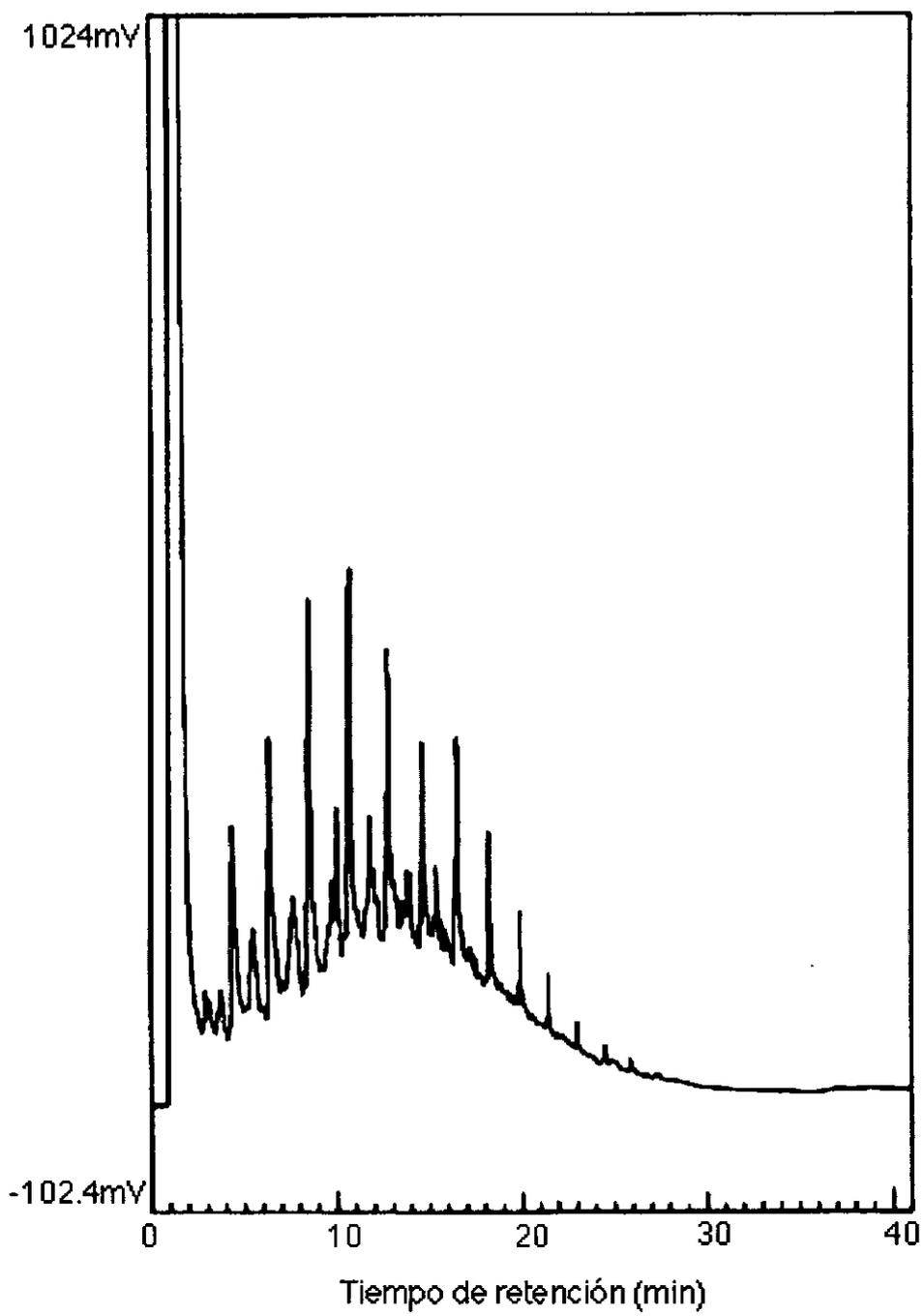


Figura 20. Cromatograma de una muestra de diesel después de cinco semanas de tratamiento con el consorcio microbiano.

5.3 Cinéticas de degradación de pireno por *Pleurotus ostreatus*.

Una vez analizado la acción del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre el diesel como hidrocarburo modelo, se prosiguió a analizar la degradación de compuestos hidrofóbicos como los hidrocarburos polinúcleo aromáticos que usualmente se encuentran en concentraciones variadas en diesel y otros hidrocarburos. Se seleccionó el pireno, el antraceno y el fenantreno como HPA modelos.

Primero se determinó el efecto de los tres diferentes surfactantes no iónicos utilizados al 0.15 %, Tritón X-100, Tween 80 y Tween 40 sobre la degradación de pireno adsorbido en suelo en cultivos de *Pleurotus ostreatus*. En la figura 21 se observa que adicionando al suelo el surfactante Tritón X-100 se alcanzó un 63 % de degradación de pireno, con Tween 80 se obtuvo un 75 % y con Tween 40 el 70 % de degradación a tres semanas de tratamiento. Sin embargo, con el surfactante Tween 40 se alcanzó una degradación de pireno de 71.5 % a partir de la segunda semana de incubación.

A pesar de que se utilizó una concentración de surfactantes muy por arriba de la CMC, al parecer no se inhibió el crecimiento del hongo *P. ostreatus*. Se ha visto que la utilización de altas concentraciones de surfactantes puede ser tóxico para los microorganismos (59). En base a la mayor velocidad de remoción de pireno por *Pleurotus ostreatus*, disminuir la fase de adaptabilidad, mostrar mayor reproducibilidad y tener menor costo (100ml \$35.2 US Tritón X-100, \$18.8 US Tween 80 y \$13.3 US Tween 40; SIGMA 1999) se eligió al surfactante Tween 40 para utilizarlo en los experimentos posteriores.

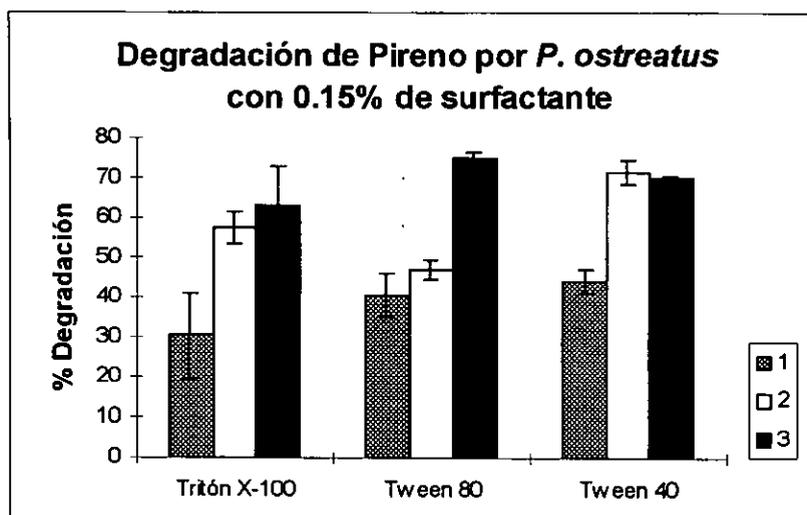


Figura 21. Degradación de pireno adsorbido en suelo por *Pleurotus ostreatus* en frascos con 0.15% de surfactante, donde 1, 2 y 3 son el número de semanas de incubación.

La figura 22 muestra los resultados de los experimentos de degradación de pireno realizados en frasco. Se observó que sin adicionar al medio aditivos como H_2O_2 1 mM y 0.15 % de surfactante Tween 40, se logró una degradación del pireno del 40 %. Mejoró por llegar a 60 % al adicionar H_2O_2 y se alcanzó una degradación a la tercera semana del 70 % utilizando surfactante. Fue posible mejorar a 84 % de degradación si se adiciona H_2O_2 semanalmente y Tween 40 al suelo conjuntamente. Indicando una posible limitación de aceptores de electrones como el H_2O_2 y una baja biodisponibilidad del pireno hacia el hongo. Una posibilidad es que la adición de H_2O_2 favorece la degradación, ya que facilita la incorporación de radicales hidroxilo al anillo aromático para su posterior oxidación y apertura del anillo aromático, como lo ha mencionado la literatura (5, 35). Al adicionar surfactante al suelo, los problemas de biodisponibilidad se redujeron, haciendo más accesible el HPA.

Es posible también que el surfactante Tween 40 esté funcionando como fuente de carbono alterna para *Pleurotus ostreatus*. Se ha observado que el Tween 80 es utilizado por hongos lignolíticos como fuente de carbono adicional (74). Esto último se confirmó con

análisis por HPLC donde se observó que la concentración del surfactante iba disminuyendo a lo largo de la cinética. Después de 3 semanas de incubación no se observó mayor degradación de pireno aún con los aditivos, indicando que después de un tiempo la concentración residual no cambia. Este efecto de comportamiento asintótico de la degradación de HPA ya ha sido reportado en la literatura (33). La humedad inicial del sistema fue de 48 % y disminuyó hasta 34 % en la tercera semana de incubación.

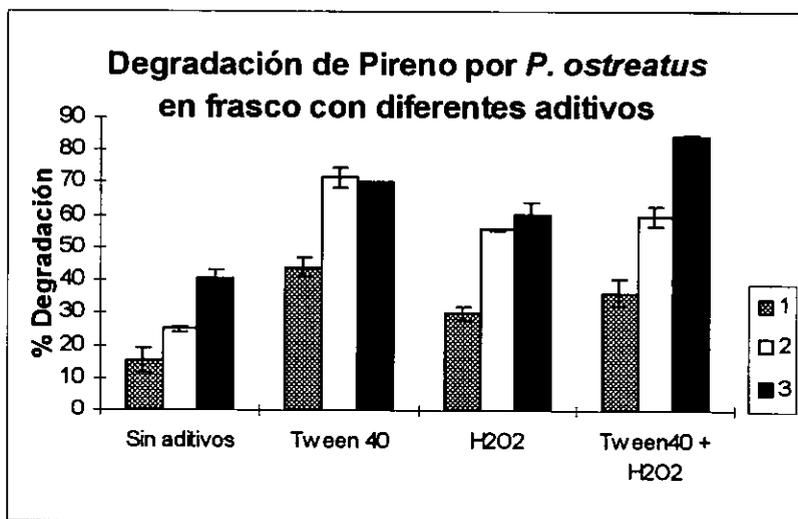


Figura 22. Efecto de la adición de aditivos en la degradación de pireno adsorbido en suelo por *Pleurotus ostreatus*.

Las gráficas de los experimentos realizados con pireno en columnas aireadas mostraron un aumento en la degradación del 10 % por arriba de los resultados que se obtuvieron en frascos. Debido probablemente a que el oxígeno de la corriente de aire en los sistemas en columna favoreció la degradación de pireno porque el oxígeno molecular es necesario para el primer paso enzimático en la transformación de HPA. Comparativamente, los análisis de varianza realizados con el programa SPSS/PC+ The Statistical Package for IBM PC indicaron que sí hay diferencia significativa en el porcentaje de degradación entre utilizar sistema cerrado (frasco) y sistema areado (columna) y que mejora al utilizar surfactante. Esto coincide con trabajos previos en donde se ha demostrado que este tipo de

microorganismos son aerobios y que la presencia de oxígeno influye positivamente en la degradación (6, 10, 57, 76). La humedad inicial fue de 48 % y sólo disminuyó hasta 43 % en la tercera semana de incubación. Por lo que existe la posibilidad de que en el sistema en frasco donde se lleva a cabo sin aereación, la disminución de la degradación pueda ser por la disminución en la humedad. Aunque en sistemas utilizando otros hongos lignolíticos no se ha observado un cambio sustancial en la degradación de benzo[a]pireno al trabajar a baja humedad (35 %) (28).

Este mismo efecto se presentó cuando el pireno se dejó adsorbido por 2 meses antes de ser tratado, utilizando surfactante Tween 40 al 0.15 %, como indican las figuras 23 y 24. Como se esperaba, el tiempo de adsorción al suelo del pireno 2 meses afectó negativamente la degradación. Al parecer, el pireno se va adsorbiendo al suelo penetrando a lugares inaccesibles para el hongo a lo largo del tiempo. Obsérvese que en columnas al utilizar Tween 40 al 0.15 % en el suelo con 2 meses de adsorción del pireno, el comportamiento es el mismo que sin utilizar surfactante en un suelo "fresco". Mientras que en frasco el comportamiento sin utilizar surfactante a tiempo 0 y a tiempo de 2 meses resultó no tener diferencia significativa. Sin embargo, en este caso, sí hay diferencia significativa cuando se utiliza Tween 40, tanto en suelo "fresco" como en suelo de 2 meses. Los análisis de varianza confirmaron las observaciones anteriores indicando que hay mayor degradación de pireno cuando se inocula en columna y en presencia de surfactante, en cualquiera de los dos tiempos.

La literatura menciona que los contaminantes hidrofóbicos primeramente son adsorbidos a las áreas hidrofóbicas del suelo seguido de una adsorción basada en la migración de los contaminantes hidrofóbicos a sitios menos accesibles dentro de la matriz del suelo al transcurrir el tiempo (49, 87, 90).

Los resultados y el análisis de varianza han mostrado el impacto del tiempo de exposición de pireno al suelo con un alto contenido de materia orgánica, la adición de

surfactante y el tipo de sistema en el porcentaje de biodegradación de HPA. El pH del suelo fue de 6-7 en todos los casos.

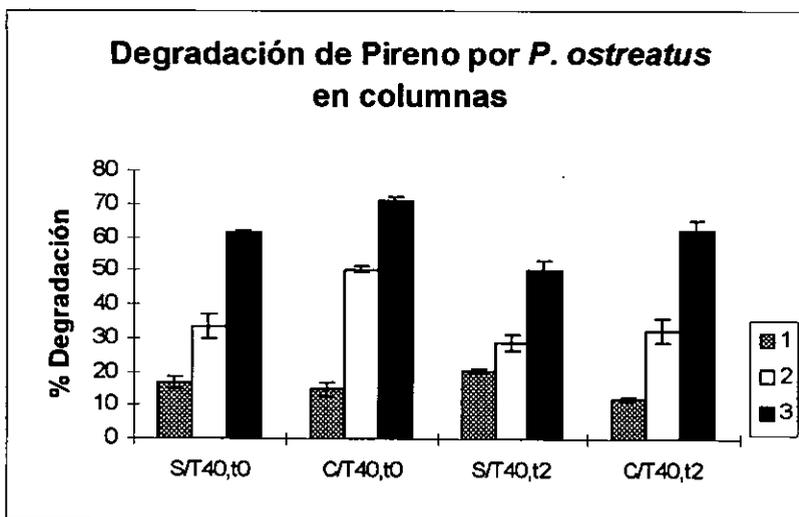


Figura 23. Efecto del tiempo previo de adición del pireno antes de la inoculación en columnas; t0= inoculado inmediatamente después de la adsorción, t2= inoculado a los dos meses de haber sido adsorbido el pireno al suelo; S/T40= sin adición de Tween 40, C/T40= con adición de Tween 40.

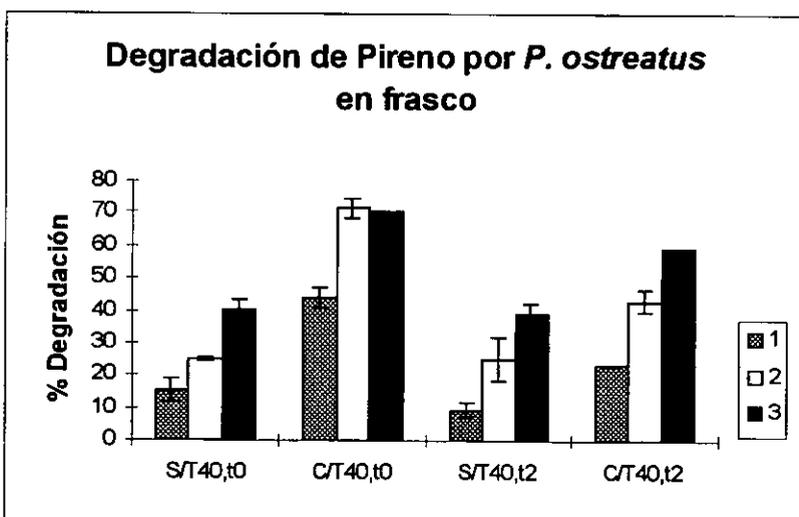


Figura 24. Efecto del tiempo previo de adición del pireno antes de la inoculación en frascos; t0= inoculado inmediatamente después de la adsorción, t2= inoculado a los dos meses de haber sido adsorbido el pireno al suelo; S/T40= sin adición de Tween 40, C/T40= con adición de Tween 40.

5.4 Cinéticas de degradación de antraceno y fenantreno por *Pleurotus ostreatus*.

Otros dos HPA fueron ensayados en su degradación por *Pleurotus ostreatus* en sistemas cerrados en frasco y en sistemas aireados en columna adsorbidos en suelo. La figura 25 muestra los resultados de la degradación de antraceno en frascos y columnas. Como se observa, la mayor degradación se obtuvo en frascos utilizando surfactante Tween 40, donde se logró un 80 %. Sin embargo, no se mejoró la degradación al utilizar columnas aireadas y con la adición de surfactantes. Los análisis de varianza nos confirmaron que las diferencias en el porcentaje de degradación no son significativas.

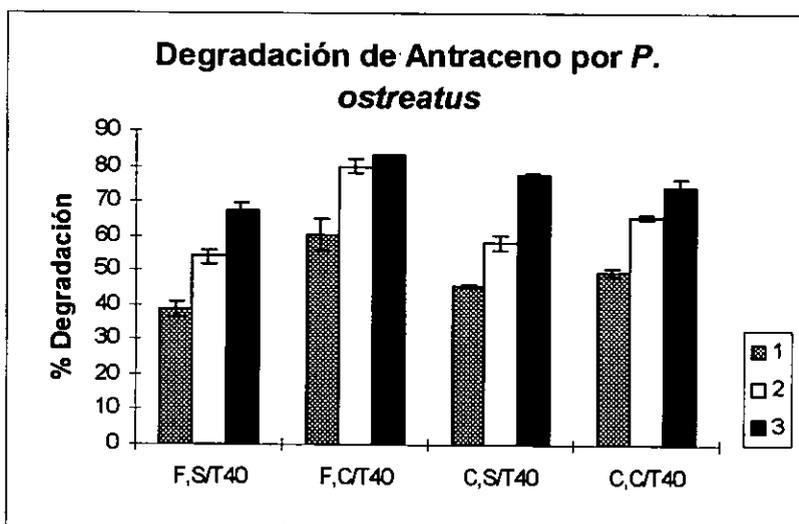


Figura 25. Efecto del surfactante sobre la degradación de antraceno adsorbido en suelo por *Pleurotus ostreatus*.

El mismo efecto se presentó para el fenantreno, mostrado en la figura 26. Se observó muy poca variación entre el comportamiento de estos dos compuestos puesto que tienen el mismo peso molecular a pesar de que tienen diferente solubilidad, 1,283 $\mu\text{g/l}$ para el fenantreno y 73 $\mu\text{g/l}$ para el antraceno (20). Como puede verse en estos dos casos, no hubo un efecto positivo significativo al utilizar columnas aireadas y surfactante Tween 40. De acuerdo a los análisis de varianza, se confirma que no hubo una diferencia significativa en

el porcentaje de degradación de fenantreno en los dos tipos de sistemas en presencia y en ausencia de surfactante Tween 40. Estos resultados nos sugieren que la accesibilidad del HPA del suelo al hongo está siendo más rápida que la capacidad de metabolización, por lo que la adición del surfactante no favoreció la degradación del antraceno y del fenantreno.

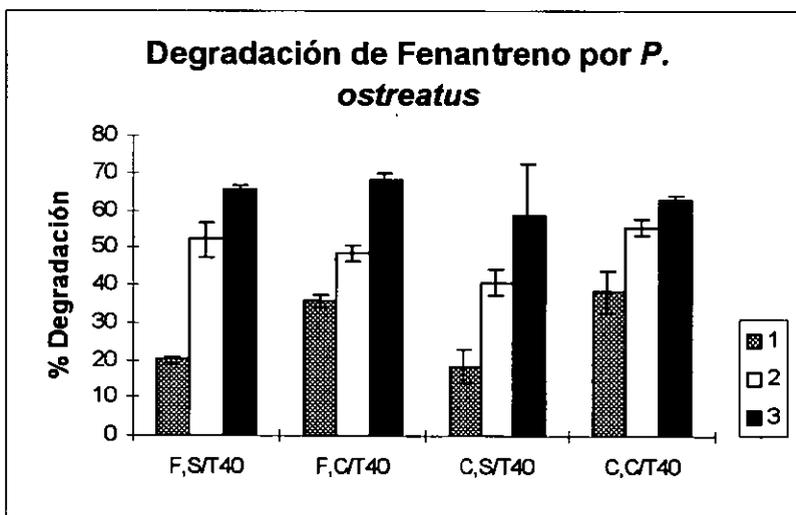


Figura 26. Efecto del surfactante sobre la degradación de fenantreno adsorbido en suelo por *Pleurotus ostreatus*.

Después de 3 semanas de tratamiento con el hongo *Pleurotus ostreatus*, se observó una concentración residual de antraceno y/o fenantreno en el suelo, como en el caso del pireno. Además del comportamiento asintótico de estos HPA, el tener una concentración residual puede ser debido a la falta de biodisponibilidad de estos compuestos que se encuentran fuertemente adheridos a la fracción arcillosa del suelo utilizado o a la materia orgánica de éste. Recordando que la adsorción y la partición dentro de la materia orgánica o microporos son considerados mecanismos primarios para la asociación de HPA con la materia orgánica. Estas asociaciones involucran interacciones no covalentes entre los HPA y las regiones hidrofóbicas del material húmico (37).

Los resultados mostraron que la biodegradación de HPA pudo ser mejorada de varias formas, adicionando H_2O_2 , surfactantes o utilizando columnas aireadas. Sin embargo, los efectos varían con el compuesto y con la presencia del surfactante, ya que se encontró una diferencia significativa en el porcentaje de degradación de cada uno de los HPA utilizados. Al parecer, el alto contenido de materia orgánica en el suelo no parece ser un factor que esté afectando la degradación de moléculas como el antraceno y del fenantreno puesto que se alcanzó un considerable porcentaje de remoción aún sin utilizar surfactante, siendo el antraceno el de mayor porcentaje de degradación (75 %). Por lo que el surfactante no resulta ser igual de eficiente para los 3 HPA, ya que no hay diferencia significativa en el porcentaje de degradación al utilizar o no Tween 40 en cualquier sistema para antraceno y fenantreno pero sí hay una diferencia muy importante en para el pireno. Indicando, en conjunto, que los factores tipo de hidrocarburo, sistemas y surfactante están influyendo para que el porcentaje de degradación sea mayor para cualquiera de los HPA. Ver anexos para los análisis de varianza.

Varios reportes (8, 10, 12, 23, 33, 39, 80) han establecido que bacterias y hongos degradan hidrocarburos alifáticos y HPA sólo en medios líquidos o en suelos lodosos pero en estos experimentos se demostró que se puede degradar diesel y HPA en medio sólido, es decir, en suelo.

5.5 Degradación de benzo[a]pireno por *Pleurotus ostreatus*.

5.5.1 Cinética de producción de CO₂ por *Pleurotus ostreatus* y degradación de benzo[a]pireno.

Para determinar el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en el suelo bajo las mismas condiciones de los experimentos de degradación de HPA realizados en columnas, se analizó la producción de CO₂ durante 3 semanas cada semana utilizando el benzo[a]pireno como sustrato. Por otro lado, se fue analizando la degradación de benzo[a]pireno adsorbido en suelo en columnas aireadas, semanalmente. En la figura 27 se observan los resultados obtenidos en la cinética de producción total de CO₂ por *Pleurotus ostreatus* y la disminución de la concentración del sustrato.

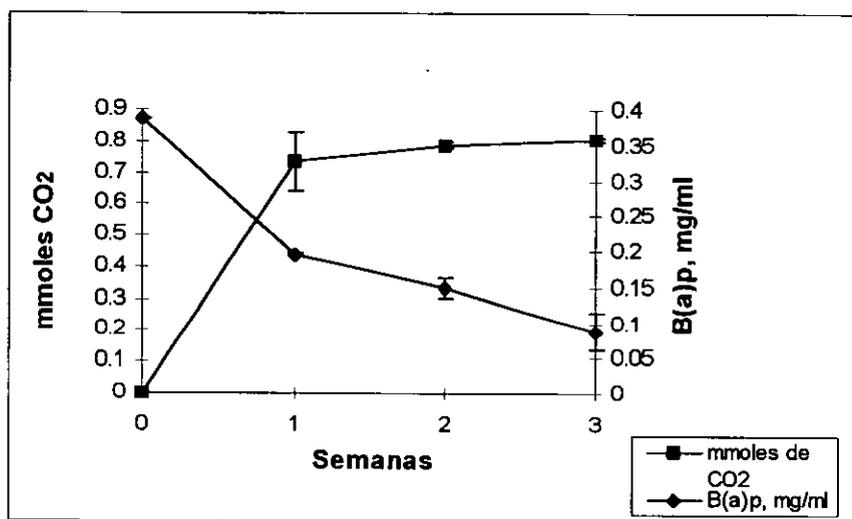


Figura 27. Producción de CO₂ total y degradación de benzo[a]pireno (mg/ml) adsorbido en suelo por *Pleurotus ostreatus* en columnas.

Como puede verse, la mayor producción de CO₂ tuvo lugar durante la primera semana de incubación. El hongo *P. ostreatus* tiene su mayor velocidad de crecimiento en

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

benzo[a]pireno durante la primera semana de incubación. Además, en la primera semana de crecimiento se dió también el mayor porcentaje de degradación del benzo[a]pireno.

Para analizar la posible incorporación del C-7 del benzo[a]pireno al CO₂ producido por acción del hongo *Pleurotus ostreatus*, se utilizó benzo[a]pireno-7-C¹⁴ adsorbido en suelo en las columnas. Se tomó este criterio, ya que estudios anteriores reportan que los carbonos de las posiciones 4, 5 y 7, 8 son los sitios más factibles de ser oxidados por hongos (52). Se tomó muestra cada semana del CO₂ total y se analizó el C¹⁴O₂ producido mediante el análisis de conteo de centelleo para determinar las cuentas por minuto. Los resultados del análisis de radiactividad en cuentas por minuto nos indicaron que el 7-C¹⁴ del benzo[a]pireno no se transformó hasta CO₂. Se cree que el hongo *Pleurotus ostreatus* oxida o transforma al benzo[a]pireno pero no llega a mineralizarlo y que lo más probable es que este sustrato transformado se vaya a formar parte de los ácidos húmicos del suelo, como se ha reportado anteriormente (37) o probablemente se requería de más tiempo de incubación para observar una transformación hasta CO₂.

5.5.2 Análisis de la adsorción al suelo del benzo[a]pireno metabolizado.

Una vez analizado la producción de CO₂ y no observar mineralización del benzo[a]pireno, se verificó la presencia de radiactividad en el suelo después de 3 semanas de tratamiento. De acuerdo a los análisis de radiactividad en cuentas por minuto de 2 muestras de suelo tratadas con el hongo *Pleurotus ostreatus* y 4 muestras controles (sin inóculo) se observó que el ¹⁴C permanecía en el suelo después de 3 semanas.

Como se observa en la figura 28, en la fase acuosa de las muestras tratadas se obtuvo un 11.04 % de ¹⁴C y un 88.96 % en la fase orgánica. Mientras que en muestras control se obtuvo un 1.79 % de ¹⁴C y un 98.22 % en la fase orgánica. Podemos suponer que el benzo[a]pireno es transformado a moléculas menos hidrofóbicas y de bajo peso molecular que se pueden extraer en la fase acuosa, formar parte de las sustancias húmicas, polimerizarse o incluso ser absorbido por el micelio de *Pleurotus ostreatus*. Algunos

reportes mencionan que benzo[a]pireno-quinona llega a polimerizarse para formar estructuras semejantes a la lignina por reacciones de oxigenación (88). Estudios de Dzulpuc (28) comprueban que los HPA son absorbidos por el micelio de los hongos durante el crecimiento de éste.

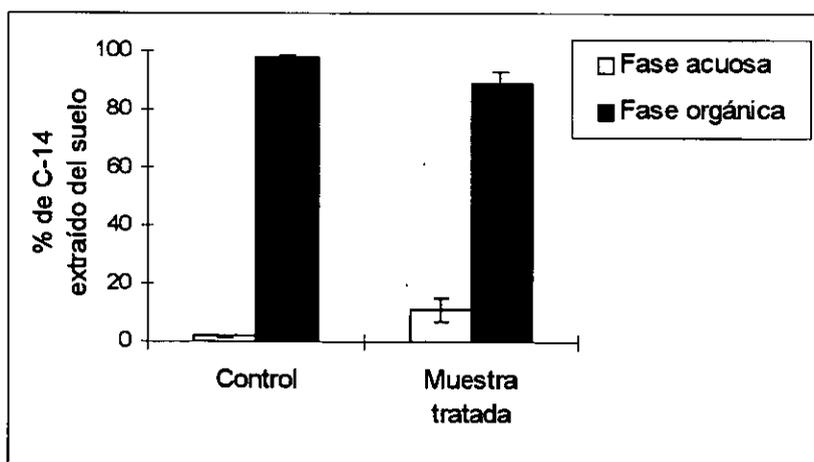


Figura 28. Porcentaje de ^{14}C extraído del suelo después de tres semanas de tratamiento en la fase acuosa y en la fase orgánica. Las muestras tratadas se inocularon con *P. ostreatus* los controles no se inocularon.

6 Conclusiones

- * El hongo ligninolítico de *Pleurotus ostreatus* mostró tener una capacidad de degradar hidrocarburos polinúcleo aromáticos y diesel que se encuentran adsorbidos en el suelo.
- * Los resultados muestran la desaparición de pireno en más del 40% y ésta puede llegar al 80% si se adiciona peróxido de hidrógeno y surfactante Tween 40 o se utilizan columnas aireadas. Por lo que se deduce que existe una limitación en cuanto a especies aceptoras de electrones y limitaciones en la biodisponibilidad de hidrocarburos, cuando éste es pireno.
- * Las cinéticas de degradación de antraceno y fenantreno sugieren que la velocidad de desorción del HPA es mayor que la velocidad de degradación, por lo que la transferencia de masa no es el factor limitante del proceso.
- * El hongo *Pleurotus ostreatus* mostró tener mayor capacidad que el consorcio microbiano de degradar el diesel adsorbido en suelo.
- * Los resultados de los análisis de la producción de CO₂ durante la degradación del benzo[a]pireno-7-¹⁴C mostraron que *Pleurotus ostreatus* transforma el sustrato pero no llega a mineralizarlo.

7 Referencias

1. Alexander, M. 1995. How toxic are toxic chemicals in soil? *Environ. Sci. Technol.* 11:2713-2717.
2. Anandatheerthavarada, H., Dwivedi, R., Biswas, J., Avadhani, N. 1997. Localization of multiple forms of inducible Cytochromes P450 in rat liver mitochondria: Immunological characteristics and patterns of xenobiotic substrate metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 339:136-150.
3. Andersson, B., Henrysson, T. 1996. Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:647-652.
4. Aronstein, B., Calvillo, Y., Alexander, M. 1991. Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. *Environ. Sci. Technol.* 25:1728-1731.
5. Barr, D., Aust, S. 1994. Mechanism white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 28:79-87.
6. Barr, D., Steven, D. 1994. Pollutant degradation by white rot fungi. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 138:49-72.
7. Barron, G. 1988. Microcolonies of bacteria as a nutrient source for lignicolous and other fungi. *Can. J. Bot.* 66:2505-2510.
8. Bezalel, L., Hadar, Y., Cerniglia, C. 1996. Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 7:2547-2553.
9. Bezalel, L., Hadar, Y. 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2554-2559.
10. Bezalel, L., Hadar, Y., Cerniglia, C. 1996. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:292-295.

11. Bogan, B., Lamar, R. 1995. One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 7:2631-2635.
12. Bogan, B., Lamar, R. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes. Appl. Environ. Microbiol. 62:1597-1603.
13. Boldrin, B., Tiehm, A., Fritzsche, C. 1993. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by a *Mycobacterium sp.* Appl. Environ. Microbiol. 6:1927-1930.
14. Bosna, T., Tmieddorp, P., Schraa, G. 1997. Mass Transfer limitations of biotransformation: Quantifying bioavailability. Environ. Sci. Technol. 31:248-252.
15. Caplan, J. A. 1993. The worldwide bioremediation industry: prospects for profit. Bioremediation. 11:320-323.
16. Cerniglia, C. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Curr. Opin. Biotechnol. 4:331-338.
17. Cerniglia, C., Cambell, W., Freeman, J., Evans, F. 1989. Identification of a novel metabolite in phenanthrene metabolism by the fungus *Cunninghamella elegans*. Appl. Environ. Microbiol. 55:2275-2279.
18. Chun, Y., Jeong, T., Roh, J., Guengerich, F. 1997. Characterization of a fusion protein between human Cytochrome P450 1A1 and rat NADPH-450 oxidoreductase in *Escherichia coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 230:211-214.
19. Committee on In Situ Bioremediation, Water Science and Technology Board, Commission on Engineering and Technical Systems and National Research Council. 1993. *In situ* Bioremediation. National Academy Press, Washington, D. C. 31-43.
20. Cookson, J. Jr. 1995. Bioremediation Engineering Desing and Application. Mc Graw-Hill, Inc.
21. Cookson, J. T. 1995. Bioremediation Engineering. McGraw Hill, Inc. New York.

22. Cornelissen, G., Rigterink, H., Ferdinandy, M, Van Noort, P. 1998. Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 32, 966-970.
23. Crawford, D. 1997. The potencial use of anaerobic consortia for bioremediation. Octavo curso avanzado sobre procesos biotecnológicos, *Biología Ambiental*.
24. De Jonge, H., Freijer, J., Verstraten, J., Westerveld. 1997. Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 31:771-775.
25. De Souza, M., Newcombe, D., Alvey, S. 1998. Molecular basis of a bacterial consortium: interspecies catabolism of atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* 1:178-184.
26. Durant, J., Busby, W., Lafleur, A., Penman, B., Crespi, C. 1996. Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. *Mutation Research.* 371:123-157.
27. Durst, F. 1991. Biochemistry and physiology of plant Cytochrome P-450. In *Frontiers in Biotransformation.* 4:191-232.
28. Dzul-Puc. 1999. Tesis de doctorado, *Biología y Bioingeniería.* CINVESTAV-IPN.
29. Field, J., De Jong, E., Costa, G., De Bont, J. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2219-2226.
30. Francy, D. S., Thomas, J., Raymond, R., Ward, C. 1991. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *Ind. Microbiol. J.* 8:237-246.
31. Fu, M., Alexander, M. 1995. Use of surfactants and slurring to enhance the biodegradation in soil compounds initially dissolved in nonaqueous-phase liquids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:551-558.
32. Gebremichael, A., Chang, A., Buckpitt, A., Plopper, C., Pinkerton, K. 1995. Postnatal development of Cytochrome P4501A1 and 2B1 in rat lung and liver: effect of aged and diluted sidestream cigarette smoke. *Toxicol. Appl. Pharmacology.* 135:246-253.
33. Gray, M., Banerjee, D., Fedorak, P., Hashimoto, A., Masliyah, J., Pickard, M. 1994. Biological remediation of anthracene-contaminated soil in rotating bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:933-940.

34. Grimberg, S., Stringfellow, W., Aitken, M. 1996. Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of nonionic surfactant. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 7:2387-2392.
35. Guengerich, F. 1991. Reactions and significance of Cytochrome P-450 enzymes. *J. Biol. Chem.* 266:10019-10022.
36. Guha, S., Jaffé, P., Peters, C. 1998. Solubilization of PAH mixtures by a nonionic surfactant. *Environ. Sci. Technol.* 32:930-935.
37. Guthrie, E., Bortiatynski, J., Van Heemst, J., Richman, J. 1999. Determination of [¹³C]Pyrene sequestration in sediment microcosms using flash pyrolysis-GC-MS and ¹³C NMR. *Environ. Sci. Technol.* 33:119-125.
38. Guthrie, E., Pfaender, F. 1998. Reduced pyrene bioavailability in microbially active soils. *Environ. Sci. Technol.* 32,50-508.
39. Hammel, K., Kalyanaraman, B., Kirk, T. 1986. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]dioxinas by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J. Biol. Chem.* 261:16948-16952.
40. Hammel, R., Ratledge, C. 1993. Biosynthetic mechanisms of low molecular weight surfactants and their precursor molecules. In n. Kosavic (de), *Biosurfactants*. Marcel Dekker, Inc, New York. 3-63.
41. Harayama, S. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation desing. *Current Op. Biotechnol.* 8:268-273.
42. Harayama, S., Neidle, E. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Ann. Rev. Microbiol.* 46:565-601.
43. Heinz, M., Bech, L., Halkier, T., Schneider, P., Anke, T. 1998. Characterization of laccasas and peroxidase from wood-rotting fungi: (Family *Coprinaceae*). *Appl. Environ. Microbiol.* 5:1601-1606.
44. Helenius, A., Simons, K. 1975. Solubilization of membranes by detergents. *Biochem. Biophys. Act.* 410:29-79.
45. Huesemann, M. 1997. Incomplete hydrocarbon biodegradation in contaminated soils: limitations in bioavailability or inherent recalcitrance?. *Bioremediation J.* 1:27-39.

46. Huibers, P., Lobanov, V., Katritzky, A., Shah, D., Karelson, M. 1997. Prediction of Critical Micelle Concentration using a quantitative structure-property relationship approach. *J. Colloid and Interface Science*. 187:113-120.
47. Jain, D., Lee, H., Trevors, J. 1992. Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. *J. Ind. Microbiol.* 10:87-93.
48. Jones, J., Shou, M., Korzakwa, K. 1995. Stereospecific activation of the procarcinogen benzo[a]pyrene: a probe for the active sites of the cytochrome P450 superfamily. *Biochemistry*, 34:6956-6961.
49. Jones, K., Tiller, C. 1999. Effect of solution chemistry on the extent of binding of phenanthrene by a soil humic acid: a comparison of dissolved and clay bound humic. *Environ. Sci. Technol.* 33:580-587.
50. Kabin, J., Tolsted, S., Sáez, E., Grant, C., Carbonell, R. 1998. Removal of organic films from rotating disks using aqueous solutions of nonionic surfactants; effect of surfactant molecular structure. *J. Colloid and Interface Science*. 206:102-111.
51. Kalf, D., Crommentuijn, T., Van de Plassche, E. 1997. Environmental quality objectives for 10 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 36:89-97.
52. Kanaly, R., Bartha, R., Fogel, S. 1997. Biodegradation of [¹⁴C]Benzo[a]pyrene added in crude oil to uncontaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4511-4515.
53. Kästner, M., Breuer-Jammali, M., Mahro, B. 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41:267-273.
54. Kästner, M., Breuer-Jammali, M., Mahro, B. 1998. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:359-362.
55. Kellner, D., Maves, S., Sligar, S. 1997. Engineering cytochrome P450s for bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:274-278.

56. Khatishashvili, G., Gordezioni, M., Kvesitadze, G., Korte, F. 1996. Plant monooxygenases: participation in xenobiotic oxidation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 36:118-122.
57. Kirk, T., Schultz, E., Connors, W. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 117:277-285.
58. Kosaric, N., Cairns, W., Gray. 1988. *Biosurfactants and Biotechnology*. Marcel Dekker, vol. 25.
59. Laha, S., Luthy, R. 1991. Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems. *Environ. Sci. Technol.* 25:1920-1930.
60. Lang, E. 1997. Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganisms. *Microb. Ecol.* 34:1-10.
61. Letcher, R., Norstrom, R., Lin, S., Ramsay, M., Bandiera, S. 1996. Immunoquantitation and microsomal monooxygenase activities of hepatic Cytochrome P4501A and P4502B and chlorinated hydrocarbon contaminant levels in polar bear (*ursus maritimus*). *Toxicol. Appl. Pharmacology*. 137:127-140.
62. Levin, M. A., Gealt, M. *Biotreatment of Industrial and Hazardous Waste*. McGraw-Hill, Inc. New York. Capítulo 1.
63. Loehr, R., Webster, M. 1997. Changes in toxicity and mobility resulting from bioremediation processes. *Bioremediation J.* 2:149-163.
64. Longe, B., Kremer, S., Sterner, O., Anke, H. 1994. Pyrene metabolism in *Crinipellis stipitaria*: identification of *trans*-4,5-dihydro-4,5-dihydroxypyrene and 1-pyrenylsulfate in strain JK364. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3602-3607.
65. Maharan, S. E. 1993. *Fundamentals of Environmental Chemistry*. Lewis Publishers, Boca Raton.
66. May, R., Schroder, P., Sandermann, H. 1997. *Ex-Situ* process for treating PAH-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Environ. Sci. Technol.* 31:2626-2633.
67. Morgan, P., Lee, S., Sheppard, L., Watkinson, R. 1993. Growth and biodegradation by white-rot fungi inoculated in soil. *Soil Biol. Biochem.* 25:279-287.

68. Oberbremer, A., Muller-Hurtig, R., Wagner, F. 1990. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:485-489.
69. Prince, R.C. 1994. Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Critical Rev. Microbiol.* 19(4):217-242.
70. Providenti, M. 1993. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *Ind. Microbiol. J.* 12:379-395.
71. Quintero, R., Castañón, R., Solleiro, J. 1996. Biorremediación de suelos ¿oportunidades de desarrollo en México? *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería.* 301-308 pp.
72. Ramirez Carrillo, R. 1989. Producción y caracterización de cepas de *Pleurotus ostreatus* capaces de producir una degradación selectiva de la lignocelulosa. Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM. UACPYP del CCH.
73. Rogers, J., Tedaldi, D., Kavanaugh, M. 1993. A screening protocol for bioremediation of contaminated soil. *Environ. Prog.* 12:146-156.
74. Rojas, Avelizapa. 1999. Tesis de doctorado, Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN.
75. Roy, D., Kammalapati, R. 1997. Soil washing potential of a natural surfactant. *Environ. Sci. Technol.* 31:670-675.
76. Sack, U., Heinze, T., Deck, J., Cerniglia, C., Martens, R., Zadrazil, F., Fritsche, W. 1997. Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 10:3919-3925.
77. Secretaría de Desarrollo Social. 1992. Informe Nacional del Ambiente (1989-1991) para la Conferencia de las Naciones Unidas sobre Medio Ambiente y Desarrollo. México, D. F.
78. Shou, M., Krausz, K., Gonzalez, F., Gelboin, H. 1995. Metabolic activation of the potent carcinogen dibenzo[a,i]pyrene by human recombinant cytochromes P450, lung and liver microsomes. *Carcinogenesis.* 17:2429-2436.
79. Singleton, I. 1994. Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and applied Research. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 59:9-23.

80. Smith, M. 1990. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation*. 1:191-206.
81. Stucki, G. Alexander, M. 1987. Role of dissolution and solubility in biodegradation of aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 2:292-297.
82. Sugiura et. al. 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Sci. Technol.* 31:45-51.
83. Suh, J., Poulsen, L., Ziegler, M., Robertus, J. 1996. Molecular cloning and kinetic characterization of a Flavin-containing monooxygenase from *Sacharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 15:268-274.
84. Sutherland, J., Selby, A., Freeman, J., Evans, F., Cerniglia, C. 1991. Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 11:3310-3316.
85. Teorema. 1998. Junio-Agosto, año 5, 16-17.
86. Thurston, C. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology.* 140:19-26.
87. Tiehm, A., Stiebe, M., Werner, P. 1997. Surfactant-enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil. *Environ. Sci. Technol.* 31:2570-2576.
88. Trenck, T., Sandermann, H. 1981. Incorporation of benzo[a]pirene quinones into lignin. *FEBS Letters.* 125:72-76.
89. Vázquez D., Westlake, D., Fedorak, P. 1994. Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:459-466.
90. Weissenfels, W., Klewer, H., Langhoff, J. 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:689-696.
91. Ye, D., Siddigi, M., Maccubbin A., Kumar, S., Sikka, H. 1996. Degradation of polycuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environ. Sci. Technol.* 30:136-142.

92. Youn, H., Kim, J., Maeng, S., Han, H., Jeong, B., Jeong, G., Kang, S., Hah, Y. 1995. Single electron transfer by an extracellular laccase from the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Microbiology*. 141:393-398.

8 Anexos

1.3.6. Determinación de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} y Mg^{+2} intercambiables.

a) Reactivos

- Solución madre estándar de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} y Mg^{+2} . Poner a secar a 105°C las siguientes cantidades de los reactivos que se especifican:

4 g de carbonato de calcio (CaCO_3)

1 g de óxido de magnesio (MgO)

1 g de cloruro de sodio (NaCl)

1 g de cloruro de potasio (KCl)

Una vez secas, pesar en la balanza analítica 0.2487 g de MgO y colocarlo en un vaso de precipitado de 500 ml, agregar 50 ml de agua destilada y HCl concentrado, suficiente para disolver el reactivo. Agregar 2.5 g de CaCO_3 y si es necesario, agregar más ácido para que se disuelva. Agregar 0.5847 g de NaCl y 0.3727 g de KCl . Una vez disuelto todo, transferir a un matraz volumétrico de 1000 ml y aforar al volumen. Guardar en botella de plástico y etiquetar con fecha y concentraciones de cada elemento, que son las siguientes:

ión	ppm	meq/l
Ca^{+2}	1000	50.00
Mg^{+2}	150	12.50
Na^+	230	10.00
K^+	195	5.00

Para determinar calcio y magnesio, preparar la curva estándar a partir de la solución madre, de la siguiente manera:

- Preparar 5 matraces volumétricos de 100 ml y agregar a cada uno 0, 2, 4, 6 y 10 ml de la solución madre, aforar al volumen con agua destilada, transferir a botellas de plástico y etiquetarlas debidamente. Cada solución tiene las siguientes concentraciones:

No. matraz	ppm de Ca^{+2}	Meq/l de Ca^{+2}	ppm de Mg^{+2}	Meq/l de Mg^{+2}
I	0	0	0	0.00
II	20	1	3	0.25
III	40	2	6	0.50
IV	60	3	9	0.75
V	100	5	15	1.25

- Tomar 5 tubos de ensaye aforados a 20 ml, agregar 1 ml de cada una de las soluciones anteriores, 2 ml de solución de lantano al 2%, 5 ml de acetato de amonio 1 N y aforar al volumen. Las concentraciones finales se dan a continuación, a partir de las cuales se calculan las concentraciones de las muestras.

No. tubo	ppm de Ca^{+2}	Meq/l de Ca^{+2}	ppm de Mg^{+2}	Meq/l de Mg^{+2}
I	0	0.00	0.00	0.0000
II	1	0.05	0.15	0.0125
III	2	0.10	0.30	0.0250
IV	3	0.15	0.45	0.0375
V	5	0.25	0.75	0.0625

Para determinar sodio y potasio, preparar la curva estándar a partir de la solución madre, de la forma siguiente:

- Preparar 6 matraces volumétricos de 100 ml, debidamente etiquetados y perfectamente limpios, añadir 50 ml de la solución de acetato de amonio 1 N, pipetear 1, 2, 3, 4, 5, y 6 ml de la solución madre y agregarlos a los matraces. Aforar con agua destilada, agitar y transferir a botellas de plástico debidamente etiquetadas. Las concentraciones finales son:

ml de la solución madre	Meq/l de Na ⁺	ppm de Na ⁺	Meq/l de K ⁺	ppm de K ⁺
1	0.1	2.3	0.05	1.95
2	0.2	4.6	0.11	3.90
3	0.3	6.9	0.15	5.85
4	0.4	9.2	0.20	7.80
5	0.5	11.5	0.25	9.75
6	0.6	13.8	0.30	11.70

- Solución de lantano al 1 % m/v. Pesar 1.173 g de La₂O₃, y colocarlo en un vaso de precipitados de 50 ml, agregar agua destilada y 5 ml de HCl concentrado y agitar hasta que se disuelva el reactivo. Transferir a un matraz volumétrico de 100 ml, enjuagar el vaso de precipitados y agregar el lavado al matraz. Diluir al volumen.

b) Procedimiento

Las concentraciones de calcio y magnesio se determinan en un espectrofotómetro de absorción atómica. Después de tener el extracto de cada una de la muestras, darles el siguiente tratamiento:

- Tomar un tubo de ensaye aforado a 20 ml.
- Agregar 1 ml de la solución problema.
- Agregar 2 ml de la solución de lantano al 1%.
- Aforar a 20 ml con agua destilada.
- Agitar perfectamente el tubo de ensaye.
- Calibrar el espectrofotómetro de absorción atómica siguiendo las instrucciones del capítulo cinco y del manual correspondiente al modelo del aparato que se está usando.
- Obtener las concentraciones de cada muestra construyendo una gráfica a partir de los datos de la curva de calibración, tal y como se describe en el capítulo cinco.

Las concentraciones de sodio y potasio se determinan en un espectrofotómetro de flama. El extracto de suelo se lee directo, pero si las lecturas son mayores que las de la curva estándar, la muestra debe diluirse a un volumen conocido.

En el capítulo cinco se encuentran las instrucciones para el manejo del aparato y para determinar las concentraciones de cada elemento.

2.2.Fundamentos para la determinación de la materia orgánica.

2.2.1. Análisis de la materia orgánica por pérdida de peso.

Para poder llevar a cabo una determinación directa de la materia orgánica del suelo, es necesario separarla del material inorgánico, el cual, constituye el 90 % o más del peso del suelo, para este propósito, se deben destruir los componentes orgánicos y medir la pérdida de peso, lo cual indica el contenido de materia orgánica. Los requerimientos para dicha destrucción, es que el tratamiento usado no debe afectar o alterar otros constituyentes del suelo.

Los dos métodos más utilizados son:

- Destrucción de la materia orgánica con peróxido de hidrógeno.
- Incineración del suelo a altas temperaturas.

El primer método tiene serias limitaciones porque la destrucción es incompleta, variando de un suelo a otro. Sin embargo, si se quiere tener un informe más detallado del método, consultar a Jackson, 1982.

El método de pérdida por ignición, da una destrucción total de la materia orgánica, pero algunos compuestos inorgánicos, también son descompuestos por las altas temperaturas, resultando una pérdida de peso considerablemente mayor en relación con el contenido de materia orgánica real. Sin embargo, dichos compuestos pueden removerse con una mezcla de HCl y HP, de esta manera la pérdida de peso es un valor aceptable para la materia orgánica.

También es posible perder peso por la descomposición de CO_3^- , agua y grupos OH^- de las arcillas; el producto es el desprendimiento de CO_2 . Por tal motivo, este método no es adecuado para suelos calcáreos.

3.1.2. Determinación del porcentaje de humedad y densidad aparente.

a) Material

Frascos de vidrio de 100 ml, con boca ancha.

Estufa.

Balanza analítica.

Probeta de 10 ml.

b) Procedimiento

- Mezclar perfectamente la mezcla del suelo.
- Tomar una probeta de 10 ml y agregar suelo hasta dicho volumen.
- Pesar un frasco limpio y seco y anotar su peso (DATO A).
- Agregarle los 10 ml de suelo que se tienen en la probeta, teniendo cuidado que no se quede adherido a las paredes externas del frasco. Pesar y anotar este dato (DATO B).
- Colocar el frasco con todo y suelo a la estufa a 105 °C y dejarlo toda la noche.
- Retirarlo y colocarlo en un desecador hasta enfriar.
- Pesar los frascos con el suelo seco en la estufa y anotar el dato (DATO C).

c) Cálculos

Peso del suelo seco al aire = B - A

Peso del suelo seco en estufa = C - A

Pérdida de peso = B - C

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(B - C) (100)}{C - A}$$

3.3.2. Determinación del nitrógeno total (incluyendo nitratos).

a) Reactivos

- Mezcla ácido sulfúrico-ácido salicílico. Disolver 25 g de ácido salicílico en ácido sulfúrico y llevar a un volumen de un litro.
- Tiosulfato de sodio.
- Reactivos que se usan en la "determinación de nitrógeno orgánico".

b) Procedimiento

- Colocar 5 g de suelo en un matraz Kjeldahl de 800 ml.
- Añadir 40 ml. de la mezcla ácido sulfúrico-salicílico y agitar el matraz hasta que ésta se mezcla completamente con el suelo.
- Dejar reposar toda la noche.
- Añadir 5 g de tiosulfato de sodio por medio de un embudo de cola larga.
- Calentar cuidadosamente hasta que la espuma cese.
- Enfriar y añadir 20 ml de agua, 10 g de mezcla digestora y 0.1 g de selenio.
- Incrementar el calor hasta que la digestión está terminada.
- Seguir el procedimiento como lo indica la sección de "Determinación de nitrógeno orgánico".

3.5. Análisis del tamaño de partícula.

3.5.1. Generalidades.

El suelo está formado por unidades discretas que se encuentran unidas integrando agregados. Estas partículas tienen diversa composición y estructura y también difieren en tamaño y forma, ya que son de naturaleza orgánica e inorgánica y pueden encontrarse en formas cristalinas o amorfas.

La distribución por tamaño de partículas de un suelo, expresa las proporciones de las medidas diversas de las unidades que lo conforman. Anteriormente a esta determinación se le denominaba análisis mecánico, aunque actualmente se le conoce como "análisis del tamaño de partícula". Este tamaño es un parámetro basado en varios criterios arbitrarios (Day, P. en Black, 1965, p. 545), tales como:

- Es el ancho del cuadrado más pequeño o el diámetro del círculo más pequeño a través del cual pasa la partícula. El diámetro de un círculo que tiene un área igual al área máxima proyectada por la partícula.
- El diámetro de una esfera cuyo volumen es igual al de la partícula.
- El diámetro de una esfera cuya densidad y velocidad de sedimentación (en un volumen dado), es igual al de la partícula.

Estos criterios corresponden a partículas esféricas, pero no son aplicables a partículas anisométricas, como son realmente las del suelo, por lo que los resultados de la determinación de las medidas del tamaño de partícula, deben estar acompañados de los datos del método usado.

Los métodos más comunes son el tamizado y la sedimentación, y a pesar de sus limitaciones es un análisis muy valioso para la clasificación texturas del suelo, para problemas relacionados al intemperismo, estructura del suelo, segregación de partículas y transporte de sedimentos por agua y/o viento.

3.5.2. Pretratamiento y dispersión.

Los métodos usuales para fraccionar el suelo, requieren que las partículas se dispersen en solución acuosa, para lo cual se agita en una solución alcalina de cualquiera de los siguientes reactivos o mezcla de éstos: metafosfato de sodio, hidróxido de sodio, carbonato de sodio, oxalato

de sodio y pirofosfato de sodio. Este tratamiento es suficiente, excepto para los agregados finos coloidales.

La efectividad de los agentes dispersantes depende de la absorción del sodio que se intercambia con otros cationes y así se forman fuerzas de repulsión eléctrica entre partículas del suelo. Los materiales que contienen considerables cantidades de sales solubles, yeso o materia orgánica, no pueden ser dispersados sin antes quitarles estos componentes. Además, en todos los casos hay que agitar, pero este proceso no debe ser excesivamente vigoroso, pues se puede producir la ruptura de partículas individuales.

3.5.3. Tamizado.

El tamizado es un proceso muy adecuado para separar partículas gruesas, mayores de 0.05 mm. La probabilidad de que una partícula pase a través de un tamiz en un tiempo dado de agitación depende de la naturaleza de ésta, además de las propiedades del tamiz. Por ejemplo, una partícula cuya forma sólo le permite pasar en una cierta orientación, tendrá, muy pocas posibilidades de atravesar el tamiz, excepto en el caso de que se agite durante un largo período de tiempo. Además los tamices tienen generalmente aperturas de diferentes medidas, por lo que para tener una buena reproducibilidad en el método, hay que estandarizarlo cuidadosamente.

3.5.4. Sedimentación.

Partículas pequeñas y esféricas de densidad p_s y diámetro x , sedimentan en un líquido de densidad p_l y viscosidad n , a la velocidad de $V = X^2 g (p_s - p_l) / 18n$, donde g es la aceleración de la gravedad. Esta relación se conoce como la ecuación de Stokes.

La separación de las partículas con determinada medida, puede entonces realizarse aplicando esta ley. Esto es, si se quiere separar la fracción arcillosa ($0 < X < 0.002$ mm), se homogeniza una suspensión de suelo y se decanta todo el líquido que permanece arriba del plano $z = -h$, en el tiempo $t = 18 nh/g (p_s - p_l) X^2$. Para realizar una separación cuantitativa se requiere que el estudio sea continuamente suspendido y decantado, de forma de permitir que todas las partículas tengan la misma oportunidad de estar en la parte superior de la suspensión en el momento de iniciar el periodo de sedimentación.

3.5.5. Teoría del método de muestreo con pipeta.

El método con pipeta, que es el que se recomienda en este manual, basa en el hecho de que por sedimentación se elimina la profundidad h en un tiempo t , todas las partículas que tienen velocidades mayores de h/t , mientras que se retienen en esa altura la concentración original de partículas con velocidades mayores. Tomando un pequeño volumen a una profundidad h y a un tiempo t , se puede determinar con base en la ecuación de Stokes, el tamaño de partícula muestreado y por peso la cantidad total de éstas respecto a la muestra inicial.

3.5.6. Teoría del método del hidrómetro.

Este método es menos preciso que el anterior, sin embargo, para ciertos propósitos en que no es necesaria mucha precisión es posible aplicarlo. Su fundamento es similar al de la pipeta, pero varía en la manera de determinar la concentración del sólido en suspensión. Si d representa la densidad de la suspensión, p_l la densidad del líquido y p_s la densidad de la partícula, todas ellas medidas en g/l, se tiene la siguiente ecuación:

$$d = p_l + (c/1000) (1 - p_l/p_s)$$

donde c es la concentración del sólido suspendido. Ya que la fuerza que impulsa al hidrómetro hacia arriba, está directamente relacionada a la densidad de ésta y la escala del hidrómetro para valores particulares de p_l y p_s puede ser calibrada para que corresponda directamente con la concentración de la suspensión (para mayores datos referirse a American Society for Testing and Materials, 1961, y 1961 b, y Day 1956). En ambos métodos hay que considerar el efecto de la temperatura sobre el tiempo de sedimentación.

3.5.7. Determinación del tamaño de la partícula por el método de la pipeta.

a) Material

- 12 tubos para centrifuga de 200 ml y con aforo a 180 y 200 ml.
- 24 jeringas desechables de 20 ml.
- 2 gradillas de metal para 6 tubos y para los del punto 1.
- 24 recipientes de aluminio con capacidad de 25 ml.
- Balanza electrónica .
- Cucharas de muestreo de 10 y 5 ml.

- Baño de agua con control de temperatura.
- Agitador mecánico.
- Tamices de 20 cm de diámetro con apertura de 0.05 mm.
- Embudo con apertura de 20 cm.
- Agitador electrónico para tamices con adaptador para 10 cm de diámetro.
- Dos conjuntos completos de tamices de 1, 0.5, 0.25 y 0.1 mm.

(estas medidas se basan en la clasificación de tamaño de partícula del Departamento de Agricultura Americano, pueden seleccionarse también otros tamices de acuerdo a otros criterios).

- 12 vasos de precipitados de 50 ml.
- Pipetas de 10 y 25 ml.
- Camisas de centrífuga.
- Reloj con timbre.
- Termómetro.
- 12 cajas Petri.

b) Reactivos

- Solución de H_2O_2 al 12 % m/v.
- Agente dispersante. Disolver 100 g de hexametáfosfato de sodio y 14 g de Na_2CO_3 con agua y aforar a 2 litros.
- Solución al 10 % de $CaCl_2$ m/v. Disolver 10 g de $CaCl_2$ en 100 ml de agua.

c) Procedimiento

En un grupo de 12 tubos, se realiza el análisis de 10 muestras de suelos, 1 repetición y un blanco (usando todos los reactivos sin añadir suelo). Se necesita llevar a cabo este análisis después de haber determinado el pH, conductividad eléctrica, total de bases intercambiables y capacidad de intercambio catiónico.

1. Destrucción de la materia orgánica y preparación de la suspensión.

- Revisar que los tubos estén limpios, secos y claramente numerados.
- Colocarlos en una gradilla en orden numérico y ponerlos a secar $105^\circ C$ por 15 minutos, dejarlos enfriar y pesar (DATO A).

- Colocar 10 g de suelo seco al aire con aquellas muestras con capacidad de intercambio catiónico (CIC) de hasta 50 meq/100 g y 5 g para muestras con CIC mayor de 50 meq/100 g.
- Si el pH es menor que 4.2 o la conductividad eléctrica mayor de 2 mmho/cm, las muestras deben ser centrifugadas antes de continuar con el siguiente paso.
- Añadir 25 ml de la solución de peróxido de hidrógeno en los tubos, excepto para muestras ricas en materia orgánica, ya que en ese caso es necesario añadir primero de 5 a 10 ml y después el resto, evitando el exceso de espuma.
- Dejar reposar a temperatura ambiente por 5 minutos para evitar reacciones violentas y después colocar en un baño de agua a temperatura de ebullición.
- Pasada una hora, retirar las muestras del baño. A las que tengan más de 1 de materia orgánica hay que añadir 25ml más de peróxido de hidrógeno y repetir el proceso. Si la muestra contiene más materia orgánica se realizan nuevas adiciones a cada 1 % de ésta, le corresponden 25 ml adicionales.
- Se pasan al horno a 105°C y se dejan hasta el día siguiente (mínimo 16 horas).
- Se sacan las muestras, se dejan enfriar y se pesan en una balanza (DATO B).
- Añadir 180ml de agua deionizada a cada tubo.
- Con una pipeta, adicionar 10 ml del reactivo dispersante.
- Tapar los tubos con tapones de hule (las muestras ya preparadas no se pueden dejar por más de 24 horas).

2. Dispersión y sedimentación.

- Poner el baño a una temperatura de 20°C.
- Colocar las cápsulas de aluminio en el horno a 105°C por 5 minutos. Enfriar y pesar (DATO C).
- Colocar los tubos en el agitador por 16 horas con una velocidad de 30 a 50 ciclos por minuto.
- En el momento de apagar el motor del agitador, se colocan los tubos en la gradilla y si los tapones tienen suelo adherido, se lava con 10 ml de agua destilada y se afora a 200 ml.
- Se agitan con un "agitador manual de vidrio" y se empieza a medir el tiempo. A los dos minutos y 48 segundos se toman, con una jeringa de 20 ml colocada a 20 cm de profundidad, más o menos 20 ml de la muestra (hay que realizar la operación en los segundos para que el tiempo correcto de sedimentación, 2'53", quede en la parte media del período (este tiempo está considerado para 20°C).
- Hay que cuidar de no agitar la suspensión durante la operación.
- Colocar el líquido de la jeringa en el recipiente de aluminio correspondiente.

- Agitar la siguiente muestra y repetir el procedimiento.
- Cuando se tienen las cápsulas de aluminio con la suspensión, se pesan y se anotan los datos (DATO D).
- Se pesan 12 nuevas cápsulas de aluminio y se colocan en el horno a 105° C por 5 minutos y se dejan enfriar (DATO E).
- Se agitan los doce tubos con el "agitador manual de vidrio", con intervalo de 2 minutos y se toma el tiempo. A las 4 horas y 48 minutos, se inicia la operación con el tubo que se agitó primero.
- Se obtiene 20 ml de la muestra, con una jeringa desechable sumergida a 6 cm y se pasa a una cápsula de aluminio ya pesada.
- Se repite la operación consecutivamente, cada dos minutos, con los 11 tubos restantes.
- Se pesan las doce cápsulas de aluminio con arcilla-agua (DATO F).
- Se colocan las 24 cápsulas de aluminio en charolas metálicas y se introducen al horno a 105 ° C toda la noche.
- Se enfrían los recipientes de aluminio.
- Se pesan los correspondientes a limo y arcilla (los primeros doce) (DATO G) y posteriormente los últimos que únicamente contienen arcilla (DATO H). Si es necesario una clasificación de las arenas se detiene el análisis en este paso y se realiza lo siguiente:

A= Peso de los tubos vacíos.

B= Peso de los tubos más suelo mineral.

C= Peso de las cápsulas de aluminio para arcilla y limo, vacías

D= Peso de las cápsulas de aluminio con arcilla y limo + agua.

E= Peso de las cápsulas de aluminio para arcillas.

F= Peso de las cápsulas de aluminio con arcilla y agua.

G= Peso de la cápsula con arcilla y limos.

H= Peso de la cápsula con arcilla.

c) Cálculos

$$\begin{array}{l} \% \text{ de arcillas} \\ \text{menores de} \\ 0.002 \text{ mm} \end{array} = \left[\frac{200 (H - E)}{F - H} - \text{blanco arcillas} \right] \left[\frac{100}{B - A} \right]$$

$$\text{Bco de arcillas} = \frac{200 (\text{H blanco} - \text{E blanco})}{\text{F blanco} - \text{H blanco}}$$

$$\begin{array}{l} \text{\% de limo} \\ \text{(de 0.002 a} \\ \text{0.02 mm)} \end{array} = \left[\frac{200 (\text{G} - \text{C})}{\text{D} - \text{G}} - \text{blanco limos} \right] \left[\frac{100}{\text{B} - \text{A}} - \text{\% arcillas} \right]$$

$$\text{Blanco de limos} = \frac{200 (\text{G blanco} - \text{C blanco})}{\text{D blanco} - \text{G blanco}}$$

$$\text{\% de arenas} = 100 - (\text{\% de arcillas} + \text{\% de limos})$$

3. Tamizado y separación de arenas.

- Humedecer la superficie de un tamiz de 20 cm de diámetro de 0.053 mm o lo más cercano a este valor, colocarlo sobre un embudo y éste, sobre un garrafón de vidrio o un desagüe.
- Verter el contenido de los tubos, de los que se obtuvieron las muestras de arcilla y limo, en el tamiz y enjuagar los tubos varias veces con agua destilada, la que también se vacía sobre el tamiz.
- Lavar abundantemente con agua y pasar toda la arena retenida de un lado.
- Colocar vasos de 40 ml sobre cajas de Petri, cerca de donde se trabaja.
- Pasar la arena al vaso con ayuda de una piceta, dejar que la arena se sedimente y decantar toda el agua que sea posible.
- Secar los doce vasos de las muestras de arena en un horno a 105° C el tiempo que resulte necesario y dejar enfriar.
- Arreglar los dos juegos de cuatro tamices (preferentemente de 10 cm de diámetro, si no se tiene, es posible usar los de 20 cm) de las diferentes medidas seleccionadas, de mayor a menor apertura, terminando con una tapa.
- Se recomiendan tamices de 1, 0.5, 0.25 y 0.1 mm. Si son de 10 cm, se pesan y se anota el dato (DATO I).

- Se pesa la cantidad de arena que se añade en el tamiz más grueso (I), pesando el vaso con la arena y luego al vaso vacío. Repetir la operación con cada grupo de tamices que se tengan.
- Colocar los dos grupos en el agitador mecánico de tamices a una amplitud de 1.5 en la escala y 10 minutos de tiempo.
- Se pesa cada tamiz con la cantidad de arena que haya y se anotan sus pesos.

DATO K = Tamiz de 1 mm

DATO L = Tamiz de 0.5 mm

DATO M = Tamiz de 0.25 mm

DATO N = Tamiz de 0.1 mm

DATO 0 = Tapa

- Si no se cuenta con tamices pequeños o de plástico, resulta necesario traspasar la arena con ayuda de una brocha, con extrema precaución, a una charola de pesar (recipiente de plástico ligero).
- La suma de los pesos debe corresponder al peso inicial de arena que se colocó en el tamiz más grueso (DATO I). Si hubo pérdidas, el error debe repartirse entre las diferentes fracciones.

d) Cálculos

$$\begin{array}{l} \text{\% de arenas muy gruesas} \\ (2.0 \text{ a } 1.0 \text{ mm}) \end{array} \quad \begin{array}{l} (K) (100) \\ = \frac{\quad}{B - A} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{\% de arenas gruesas} \\ (1.0 \text{ a } 0.5 \text{ mm}) \end{array} \quad \begin{array}{l} (L) (100) \\ = \frac{\quad}{B - A} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{\% de arenas medias} \\ (0.5 \text{ a } 0.25 \text{ mm}) \end{array} \quad \begin{array}{l} (M) (100) \\ = \frac{\quad}{B - A} \end{array}$$

$$\begin{array}{l} \text{\% de arenas fina} \\ (0.25 \text{ a } 0.10 \text{ mm}) \end{array} \quad \begin{array}{l} (N) (100) \\ = \frac{\quad}{B - A} \end{array}$$

- Agregar 5 ml de metasilicato de sodio y la misma cantidad de oxalato de sodio, más la cantidad necesaria de agua destilada hasta que llegue a la segunda marca del vaso. Agitar durante 5,15 ó 30 minutos.
- En lugar de los dos reactivos, puede agregarse 10 ml de calgon.
- Verter el contenido del vaso a una probeta de 1000 ml y aforar al volumen con agua destilada ó agua de la llave.
- Simultáneamente hacer un blanco tomando una probeta de 1000 ml, añadir la misma cantidad de reactivo dispersante, aforar al volumen y seguir todas las indicaciones al igual que las muestras.
- Agitar durante un minuto con el émbolo de acero.
- Tomar la lectura con el hidrómetro a los 40 segundos (La), cuidadosamente para no disturbar la suspensión, y asl mismo, registrar la temperatura.
- Registrar las mismas mediciones para el blanco (Lb).
- Tomar una lectura adicional a las dos horas (Lc), así como su temperatura; al mismo tiempo los datos del blanco (Ld).

d) Cálculos

$$\% \text{ de limos y arcillas} = \frac{La - Lb}{\text{Peso del suelo seco}} \times 100$$

$$\% \text{ de arcillas} = \frac{Lc - Ld}{\text{Peso del suelo seco}} \times 100$$

$$\% \text{ de arenas} = 100 - \% \text{ de limos y arcilla}$$

$$\% \text{ de limos} = \% \text{ de limos y arcillas} - \% \text{ de arcilla}$$

Donde:

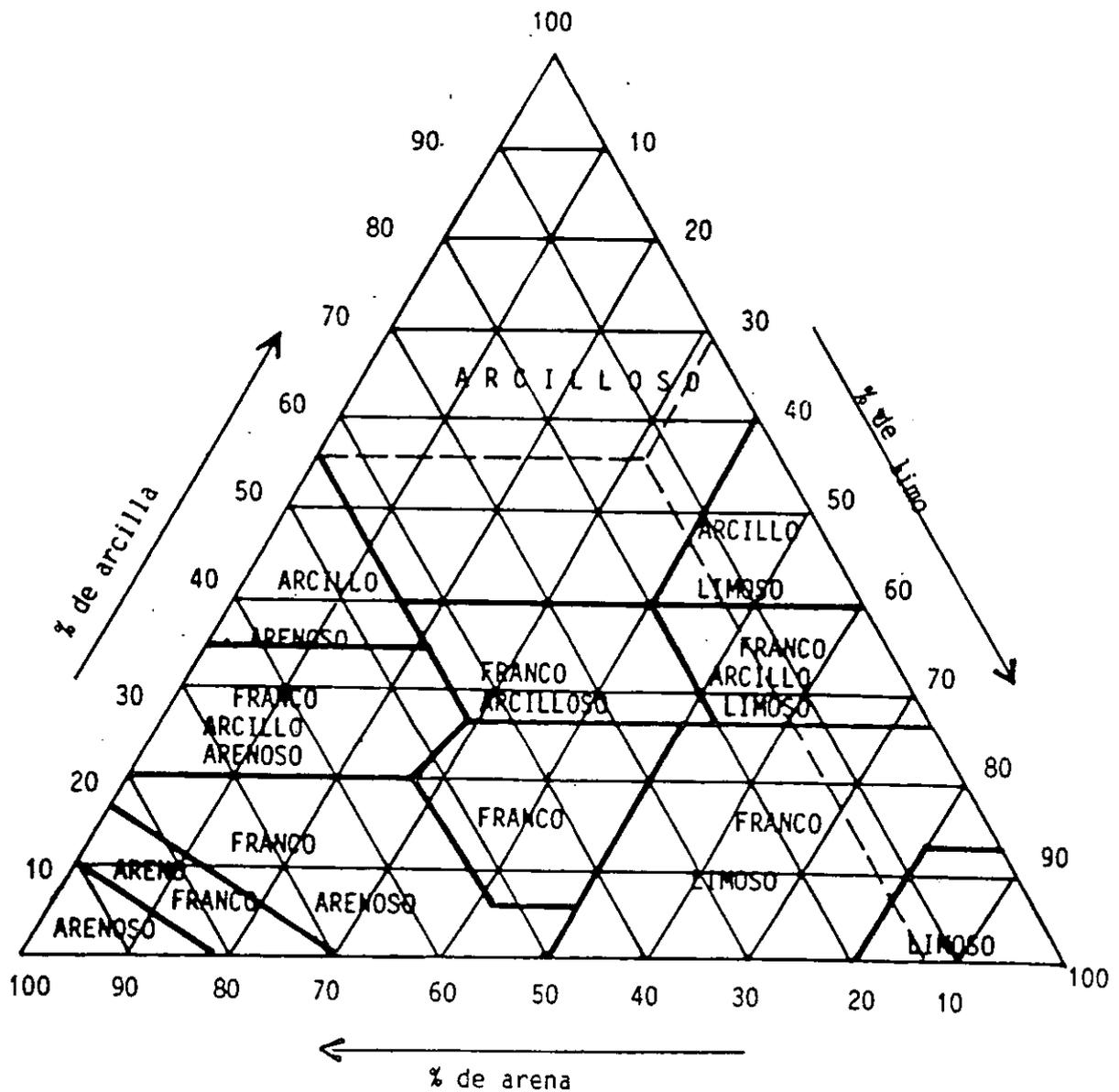
La = Lectura del hidrómetro tomada a los 40 segundos.

Lb = Lectura del hidrómetro para el blanco, tomada a los 40 segundos.

Lc = Lectura del hidrómetro tomada a las 2 horas.

Ld = Lectura del hidrómetro para el blanco, tomada a las 2 horas.

Realizar la clasificación textural del suelo con ayuda del triángulo mostrado en la siguiente figura.
Por cada grado arriba de 20°C se agrega a la lectura 0.2 y por cada grado abajo de dicha temperatura, se le disminuye la misma cantidad a la lectura.



Triangulo textural mostrando los porcentajes de arena, limo y arcilla y las clases texturales, las cuales se determinan por la intersección de las tres líneas

4.2.2. Extracción del fósforo disponible para las plantas.

El método químico para fósforo disponible que se describe en este texto, incluye todas las formas de fosfatos inorgánicos, pero mayormente los fosfatos de calcio, hierro y aluminio; las cantidades de fósforo disueltas, dependen de las concentraciones de dichas formas inorgánicas y su solubilidad en el extractante usado. (Chang y Juo, 1963).

Se han hecho numerosas pruebas para obtener una solución extractante que permita conocer la cantidad de fósforo disponible en el suelo, pero ninguno de ellos ha demostrado ser universalmente aplicable.

La extracción con agua no es satisfactorio por dar resultados muy bajos, por lo que suele utilizarse una solución que contiene un ácido diluido, para suelos ácidos y ligeramente alcalina para suelos básicos. La más empleada es la solución extractora Bray I que contiene HCl 0.025 N y NH_4F 0.03 N; el primero lleva parte del fósforo a la solución y, el segundo induce la formación de iones complejos de hierro y aluminio solubles, impidiendo así que el fósforo vuelva a precipitado. El fósforo extraído con la solución Bray I, presenta una buena correlación con la respuesta de las plantas en la mayoría de los suelos jóvenes, sean ácidos o básicos, pero principalmente para aquellos con un pH entre 5 y 7. Una solución extractora más enérgica como la Bray II (HCl 0.1 N con NH_4F), da buenos resultados en suelos muy ácidos.

Para suelos básicos donde se presentan los fosfatos de calcio insolubles es recomendable una solución alcalina de NaHCO_3 para extraer únicamente los fosfatos disponibles, ya que muchos trabajos han demostrado que la solubilidad de los compuestos mencionados, está en función del pH y de la actividad del calcio: con pH mayor de 7.5, la solubilidad está en función de la actividad del calcio y con un pH menor de 7, depende de la actividad del ion H^+ y del Ca^{++} . Así que un aumento en la actividad del ion H^+ sube la solubilidad del fósforo, y un aumento en la actividad del calcio, la baja por precipitarse como fosfato de calcio. Con soluciones extractoras ácidas pueden presentarse reacciones de precipitación secundarias, ya que suben la actividad del calcio, por lo que el fósforo se precipita.

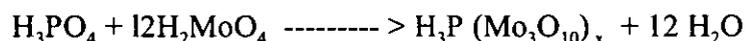
La solución de NaHCO_3 a pH 8.5 reduce este tipo de reacciones porque induce la formación de CaCO_3 (Olsen et al, 1954, p. 3).

4.2.3. Determinación colorimétrica del fósforo.

Una vez en solución, el fósforo puede ser cuantificado por métodos colorimétricos, cada uno de ellos tiene ventajas sobre el otro bajo ciertas condiciones; uno depende de la combinación

del fósforo con ión molibdato y el otro, da reacción con vanadomolibdato (Hesse op. cit.). El primero es el más sensitivo y por lo tanto el más usado, tanto para extractos de suelos muy concentrados como para aquellos que contienen concentraciones más pequeñas.

El fósforo de la solución reacciona con el molibdato para formar un complejo heteropolimolibdico como el ácido coordinador central,



El complejo es de color amarillo pero después de la reducción del Mo^{+6} a Mo^{+3} y/o Mo^{+5} , presenta una coloración azul. Sin embargo existen otros iones que reaccionan de manera semejante al fósforo y son: As^{+5} , Si^{+4} , Ge^{+4} y B^{+3} , por ello deben tomarse precauciones en caso de que se encuentren en cantidades apreciables.

Muchos agentes reductores han sido utilizados para formar el azul de molibdeno y la selección del reactivo apropiado depende de la sensibilidad requerida y de la libertad de interferencia. Jackson (1964), reporta 4 métodos y el uso de uno y otro depende de los factores mencionados.

El método que se describe en este texto, es el de la reducción del ácido molibdofosfórico, producto de la adición de cloruro estañoso, en un medio acidificado con HCl. Este es adecuado para determinar concentraciones de 0.05 a 1 ppm de fósforo, pueden ser toleradas hasta 15 ppm de Fe^{+3} , las sales de cloro no interfieren aunque se presenten en grandes cantidades; los sulfatos, percloratos y nitratos afectan el desarrollo del color, sólo si se presentan en grandes cantidades (Dickman y Bray, 1940). La intensidad del color azul de la solución depende de la cantidad de fósforo presente, tiempo de formación, temperatura y pH (Hesse, 1971). El efecto del pH ha sido muy estudiado y se ha encontrado que existe un rango de acidez sobre el cual es estable el color azul, que es entre un pH de 2.7 a 3.0; éste se mantiene con HCl, usando el 2,4-dinitrofenol como indicador. El color azul incrementa con el tiempo, llegando a su máxima intensidad después de cierto período y se debilita lentamente. Para obtener resultados reproducibles, las lecturas colorimétricas deben tomarse después de la adición del reactivo reductor, con un período de tiempo constante; éste es un inconveniente del método pero no es insuperable.

La temperatura debe mantenerse a 25 ± 5 °C durante toda la determinación.

El procedimiento tradicional es adicionar a la solución reductora una serie de soluciones problema, cada dos minutos y comenzar las lecturas fotoeléctricas después de 15 minutos de haber adicionado la solución al primer lote de muestra. Por lo tanto, las lecturas de cada grupo son tomadas cada dos minutos. La ley de Beer se cumple hasta una concentración de 4 ppm de fósforo

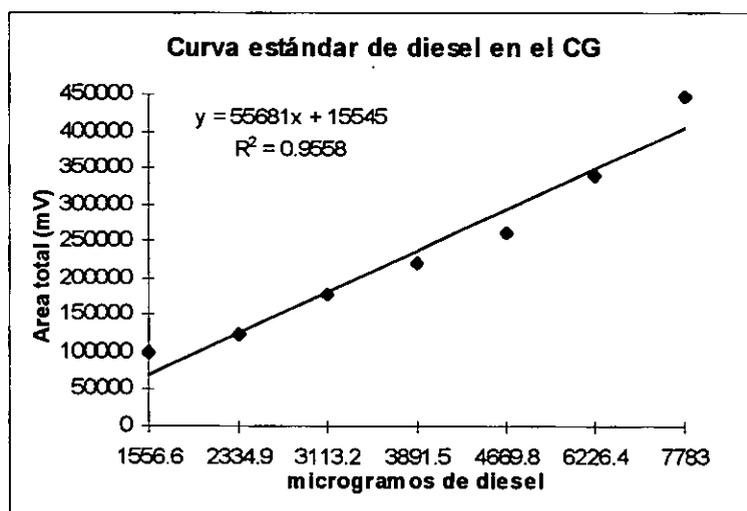
en solución. Es importante hacer notar que si una muestra está muy concentrada, presentará un color azul muy intenso que dará lecturas mayores a la de la solución de 4 ppm (máxima concentración de la curva de calibración). En este estado, la solución no puede ser diluida por lo que el experimento debe ser repetido usando soluciones menos concentradas de la muestra.

4.5. Medición del pH en el suelo.

El pH del suelo se determina con mayor precisión con el método electrométrico. En éste, es usado un electrodo de vidrio que es sensible a la actividad de los H^+ y adquiere un potencial con respecto a la solución que se está midiendo. Este electrodo forma parte de un circuito que abarca también un electrodo de referencia (un electrodo que tiene un potencial constante, como el de calomel) y, se establece una diferencia de potencial entre ellos. Usando un electrodo de vidrio, que es reversible para con los H^+ , y un electrodo de calomel, se puede comparar la diferencia de potencial observada en la solución problema con una solución estandar. Estas últimas deben ser preparadas con un valor de pH definido y reproducible, de acuerdo a las recomendaciones de U.S. National Bureau of standards; estas soluciones de referencia tienen un potencial de contacto insignificante (Bolt, 1978, p. 35).

Curva estándar de diesel

Cromatógrafo de gases marca Varian, modelo 3700 equipado con un detector de ionización de flama, columna capilar (30 m largo x 0.25 mm, SPB-20, Supelco), helio como gas acarreador y con el siguiente programa: temperatura del inyector 220 °C; temperatura del detector ión 300 °C; temperatura inicial 90 °C tiempo 2 min; velocidad del programa 6 °C/min; temperatura final 280 °C tiempo 5 min.



Diesel.

OBS	TIEMP	TRAT	DEG
1	1	A	17.2
2	1	A	33.7
3	1	A	46.0
4	2	A	39.0
5	2	A	47.6
6	2	A	25.6
7	3	A	48.0
8	3	A	45.4
9	3	A	48.2
10	4	A	74.6
11	4	A	67.5
12	4	A	68.6
13	5	A	73.8
14	5	A	82.3
15	5	A	87.8
16	1	A	24.3
17	1	B	37.7
18	1	B	20.2
19	2	B	30.08
20	2	B	38.51
21	2	B	33.80
22	3	B	50.50
23	3	B	33.30
24	3	B	59.06
25	4	B	63.94
26	4	B	55.80
27	4	B	37.55
28	5	B	38.57
29	5	B	72.16
30	5	B	67.80
31	1	C	2.60
32	1	C	12.40
33	1	C	25.50
34	2	C	56.40
35	2	C	51.30
36	2	C	54.42

BS	TIEMP	TRAT	DEG
37	3	C	66.0
38	3	C	50.2
39	3	C	40.4
40	4	C	72.7
41	4	C	70.6
42	4	C	76.0
43	5	C	87.8
44	5	C	88.1
45	5	C	89.6

DATA.OUT

----- TIEMP=1 -----

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	3	A B C
TIEMP	1	1

Number of observations in by group = 9

The SAS System 100
17:12 Saturday, April 1, 1995

----- TIEMP=1 -----

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: DEG

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	537.075000	268.537500	1.83	0.2403
Error	6	882.805000	147.134167		
Corrected Total	8	1419.880000			

← No hay
* significativa
entre A, B,
C al
tiempo 1
* $\alpha = 0.05$

R-Square	C.V.	Root MSE	DEG Mean
0.378254	49.71265	12.1299	24.4000

The SAS System 101
17:12 Saturday, April 1, 1995

----- TIEMP=1 -----

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: DEG

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	537.075000	268.537500	1.83	0.2403

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	537.075000	268.537500	1.83	0.2403

----- TIEMP=1 -----

General Linear Models Procedure

T tests (LSD) for variable: DEG

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate not the experimentwise error rate.

Alpha= 0.05 Confidence= 0.95 df= 6 MSE= 147.1342
Critical Value of T= 2.44691

Comparisons significant at the 0.05 level are indicated by '***'.

The SAS System 103
17:12 Saturday, April 1, 1995

----- TIEMP=1 -----

General Linear Models Procedure

TRAT Comparison	Lower Confidence Limit	Difference Between Means	Upper Confidence Limit
--------------------	------------------------------	--------------------------------	------------------------------

A - B	-24.354	1.350	27.054
A - C	-5.869	16.800	39.469
B - A	-27.054	-1.350	24.354
B - C	-11.645	15.450	42.545
C - A	-39.469	-16.800	5.869
C - B	-42.545	-15.450	11.645

----- TIEMP=2 -----

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	3	A B C
TIEMP	1	2

----- TIEMP=2 -----

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: DEG

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	683.990600	341.995300	6.96	0.0273
Error	6	294.757400	49.126233		
Corrected Total	8	978.748000			
R-Square		C.V.	Root MSE		DEG Mean
0.698842		16.74527	7.00901		41.8567

Si se
trouve
≠
significative
à $\alpha = 0.05$

The SAS System 106
17:12 Saturday, April 1, 1995

----- TIEMP=2 -----

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: DEG

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	683.990600	341.995300	6.96	0.0273

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	683.990600	341.995300	6.96	0.0273

----- TIEMP=2 -----

General Linear Models Procedure

T tests (LSD) for variable: DEG

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate not the experimentwise error rate.

Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 49.12623
Critical Value of T= 2.45
Least Significant Difference= 14.003

Means with the same letter are not significantly different.

T Grouping	Mean	N	TRAT
A	54.040	3	C
B	37.400	3	A
B	34.130	3	B

----- TIEMP=3 -----

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	3	A B C
TIEMP	1	3

A y B no muestran diferencias significativas pero ambos con C si las hay a un $\alpha = 0.05$

----- TIEMP=3 -----

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: DEG

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	46.1528000	23.0764000	0.20	0.8218
Error	6	682.7904000	113.7984000		
Corrected Total	8	728.9432000			

R-Square	C.V.	Root MSE	DEG Mean
0.063315	21.76772	10.6676	49.0067

The SAS System 111
17:12 Saturday, April 1, 1995

----- TIEMP=3 -----

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: DEG

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	46.1528000	23.0764000	0.20	0.8218

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	46.1528000	23.0764000	0.20	0.8218

no hay diferencia significativa

----- TIEMP=3 -----

General Linear Models Procedure

T tests (LSD) for variable: DEG

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate not the experimentwise error rate.

Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 113.7984
Critical Value of T= 2.45

Least Significant Difference= 21.313

Means with the same letter are not significantly different.

T Grouping	Mean	N	TRAT
A	52.200	3	C
A			
A	47.620	3	B
A			
A	47.200	3	A

----- TIEMP=4 -----

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	3	A B C
TIEMP	1	4

Number of observations in by group = 9

----- TIEMP=4 -----

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: DEG

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	752.425356	376.212678	5.52	0.0437
Error	6	409.278067	68.213011		
Corrected Total	8	1161.703422			

Si hay $\alpha = 0.05$
 Δ — \neq significativa

R-Square	C.V.	Root MSE	DEG Mean
0.647691	12.65679	8.25912	65.2544

----- TIEMP=4 -----

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: DEG

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	752.425356	376.212678	5.52	0.0437

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	752.425356	376.212678	5.52	0.0437

----- TIEMP=4 -----

General Linear Models Procedure

T tests (LSD) for variable: DEG

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate not the experimentwise error rate.

Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 68.21301 .

Critical Value of T= 2.45

Least Significant Difference= 16.501

Means with the same letter are not significantly different.

T Grouping	Mean	N	TRAT
A	73.100	3	C
A			
A	70.233	3	A
B	52.430	3	B

*C y A no presentan # significativa pero ambos con B si lo presentan
α = 0.05*

----- TIEMP=5 -----

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	3	A B C
TIEMP	1	5

Number of observations in by group = 9

----- TIEMP=5 -----

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: DEG

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	1367.06420	683.53210	5.34	0.0466
Error	6	768.59020	128.09837		
Corrected Total	8	2135.65440			

R-Square	C.V.	Root MSE	DEG Mean
0.640115	14.80710	11.3181	76.4367

----- TIEMP=5 -----

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: DEG

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	1367.06420	683.53210	5.34	0.0466

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	2	1367.06420	683.53210	5.34	0.0466

→ has

significant

----- TIEMP=5 -----

General Linear Models Procedure

T tests (LSD) for variable: DEG

NOTE: This test controls the type I comparisonwise error rate not the experimentwise error rate.

Alpha= 0.05 df= 6 MSE= 128.0984
 Critical Value of T= 2.45
 Least Significant Difference= 22.612

Means with the same letter are not significantly different.

T Grouping Mean N TRAT

	A	88.500	3 C
	A		
B	A	81.300	3 A
B			
B		59.510	3 B

Solo se
tiene \neq entre
C y B
 $\alpha = 0.05$

DIESEL REMOVAL FROM A CONTAMINATED-SOIL BY NATURAL HYDROCARBON DEGRADING MICROORGANISMS

Facundo J. Márquez-Rocha (CICESE, Ensenada, B.C., México)
Vanessa Hernández-Rodríguez and Rafael Vázquez-Duhalt (IBT-UNAM,
Cuernavaca, Mor., México)

ABSTRACT: A bacterial community was used for a biotreatability test of a diesel-contaminated soil. The consortia was obtained from a complex microbial community isolated from a hydrocarbon-contaminated sites. Transferring this community to a diesel-containing liquid medium as sole carbon source, more than 90 % of the diesel added (7%: v/v) was consumed to produce bacterial biomass as analyzed by gas chromatography and protein determinations. The biomass produced was lyophilized and used as bacterial inoculum for bioremediation treatment of a diesel-contaminated soil, in both laboratory and semi-pilot scale level. Bacterial cells were reactivated on liquid medium containing-diesel and inoculated on a diesel-containing soil (20 % v/p of diesel). Diesel absorbed to soil was removed more than 60 % during five weeks of treatment in both levels. Diesel removal was improved (> 90 %) by an additional inoculation of white rot fungus *Pleurotus ostreatus* at laboratory scale. Biodegradation does not appear to be limited by microbial metabolic activity, since high molecular weight hydrocarbons (> C 16) were biodegraded at same rate. The no degradation of the remaining hydrocarbons seems to be due to a mass transfer limitations in which hydrocarbon are not available to microorganisms.

INTRODUCTION

Bioremediation is being used or proposed as a treatment option at many hydrocarbon-contaminated sites (Braddock et al. 1997). The effectiveness of bioremediation is often a function of the extent to which a microbial population or consortium can be enriched and maintained in an environment. Microorganisms with the ability to degrade crude oil are ubiquitously distributed in soil and marine environments (Venkateswaran and Harayama, 1995). However, when few or no indigenous degradative microorganisms exist in a contaminated area or when there are not time for the natural enrichment of a suitable population, inoculation may be a realistic option. Inoculation may sometimes shorten the acclimation period prior to the onset of biodegradation. The same ecological principles that influence biodegradation in general will also govern the effectiveness of inocula, regardless of whether they are natural isolates or genetically engineered microorganisms (Liu and Suflita, 1993).

Various authors have reported that inoculation had no positive, or only marginal effects on oil biodegradation rates. Microorganisms able to degrade organic pollutants in culture may fail to function when inoculated into natural environments because they may be susceptible to toxins or predators in the

environment, they may use other organic compounds in preference to the pollutant, or they may be unable to move through the soil to site containing the contaminant. The successful use of microbial inocula in soils requires the microorganisms to contact the contaminant. Physical adsorption to soil particles or filtration by small pores may inhibit the transport of organisms (Margesin and Schinner, 1997). Although bacteria are probably responsible for most hydrocarbon biodegradation in the environment, fungi and yeast, and even some cyanobacteria and algae have some ability to degrade hydrocarbons, albeit at very slow rates. A major question in the hydrocarbon biodegradation of is how the microbes actually contact substrates. Three main mechanisms are often involved, and different bacterial species may use one or more of them. Interactions with the low levels of dissolved material, direct contact with drops or surfaces of the insoluble phase, and interactions with hydrocarbon "solubilized" by interaction with surfactants (Prince 1993). In this work, we utilized a bioaugmentation procedure for bioremediation experiments of a diesel-contaminated soil at laboratory and semi-pilot scale levels.

Objective. Evaluate the possibility to use a natural bacterial community to scale up a bioremediation process to remove diesel from contaminated soil.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial community and fungal strain. A bacterial consortium was obtained from the Mexican Institute of Petroleum (IMP, Mexico City). It was acclimated to grow on crude oil prior to diesel acclimation. The mineral medium consisted as followed (g/L): K_2HPO_4 1.71, KH_2PO_4 1.32, NH_4Cl 1.26, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.011, $CaCl_2$ 0.02, and trace metals 1 mL, 7 mL of diesel were added per 100 mL of medium. The bacterial consortium was acclimated to growth in the mineral medium and diesel as sole carbon source. A dense culture was lyophilized to keep the bacterial community. An inoculum of the consortium was activated and used to prepare the inoculum for soil treatment. A strain of the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* ECS-110 (IE-8, Instituto de Ecología, Xalapa, Ver., Mex.) was used for laboratory experiments.

Soil preparation and physicochemical analyses. An sample of soil 5 g was dried at 80°C over night (this may serve to eliminate indigenous bacteria from the soil). Once dried, 1 mL of diesel was uniformly placed on the soil and allowed to adsorbed during 30 min. Humidity was adjusted to approximately 43 %. Physicochemical analyses of soil were done by the Environmental Biotechnology Laboratory of University of Morelos, Morelos. The parameters values are summarized in Table 1.

Biodegradation conditions. 1) Laboratory scale. Soil containing-diesel was treated with 1 mL of bacterial consorcio previously grown in liquid medium. Control test was carried out without addition of any microorganism. Experiments

were carried out by triplicate and sampling was programmed once a week. 2) Semi-pilot level. Two unit cells of 5 m² and 20 cm deep were used for these experiments. One of these units was used as control or non-contaminated soil. Inocula for this level were prepared on small cement mixer during one week.

TABLE 1. Soil physicochemical characteristics

Parameter	Value
pH	5.64
Electrical conductivity (μohms/cm)	94.70
Organic matter (%)	6.22
Humidity (%)	1.76
Texture	
Clay (%)	36.0
Sand (%)	54.0
Slime (%)	10.0
Nitrogen (%)	0.214
Available phpsphate (mg/kg)	26.50
Available cations (solubles and exchangables (meq/100 g)	
Calcium	35.70
Magnesium	6.10
Sodium	6.62
Potassium	1.58

Bacterial analyses. Lyophilized isolates were classified to their generic level on the base of gram stain, catalase reaction, oxidase activity, and ability to utilize glucose and lactose under aerobic and anaerobic conditions.

Analysis. In liquid, diesel was extracted with dichloromethane (1:1) by using 5 mL of sample and mixed vigorously. In soil, one flask or 5 g of soil (semi-pilot) were used every sampling time, the diesel was extracted utilizing 50 mL of solvent. The organic phase was pass through a NaSO₄ and concentrated to 0.2 mL and analyzed by gas chromatography. A varian model 3700 equipped with a flame detector and capillary column (30 m long, I.D. 0.25 mm, SPB-20, Supelco).

RESULTS AND DISCUSSION

Bacterial community growth on diesel. The Figure 1 shows the time-course of a liquid culture of the bacterial consortium using diesel as sole carbon source. The growth was a typical Monod-type curve, were hydrocarbon were consumed and biomass produced. Diesel was consumed more than 90 %. At initial time the chromatographic signal was typical for high molecular saturated hydrocarbons and at final time diesel was almost consumed.

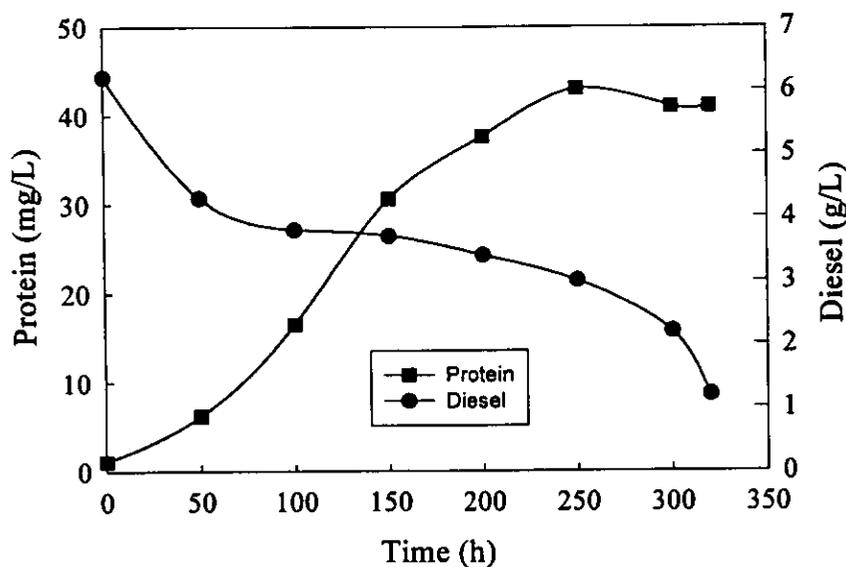


FIGURE 1. Time course of the growth of the bacterial consortium grown on diesel as sole carbon source.

Diesel removal from soil. The bacterial consortium was used to remove diesel adsorbed in soil. Bioaugmentation is one of the strategies used for bioremediation. Here we confirmed that native organisms acclimated to grow on diesel can be produced *ex situ* and re-inoculated to a contaminated soil as an effective treatment to remove diesel from the soil. Figure 2 shows the biodegradation of diesel adsorbed in soil by the bacterial consortium (C) and *P. ostreatus* (P) or both (PC). Diesel oil consists mostly of linear and branched alkanes with different chain lengths and contains a variety of aromatic compounds. Many of these compounds, especially linear alkanes, are known to be easily biodegradable. Due to low water solubility however, the biodegradation of these compounds is often limited by slow rates of dissolution, desorption, or transport. In general, the bioavailability of hydrophobic compounds is determined by their sorption characteristics and dissolution or partitioning rates and by transport processes to the microbial cell (Sticher et al., 1997). Biodegradation does not appear to be limited by the aqueous solubility of hydrocarbon molecules since a significant fraction of high molecular weight (> C16) saturates were biodegraded (>60%). However, the degradation activity of the bacterial community may be limited by its movement, since *P. ostreatus* achieved more efficient removal of diesel. Four bacterial genera were identified in the bacterial community, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Acinetobacter* and *Flavobacterium*.

Semi-pilot scale experiments inoculated with the same bacterial inocula were able to remove more than 70% of the diesel absorbed (Fig. 3). Non-inoculated soil eliminated only a little more than 20% of the diesel, which may be due to the presence of some hydrocarbonoclastic bacterial activity.

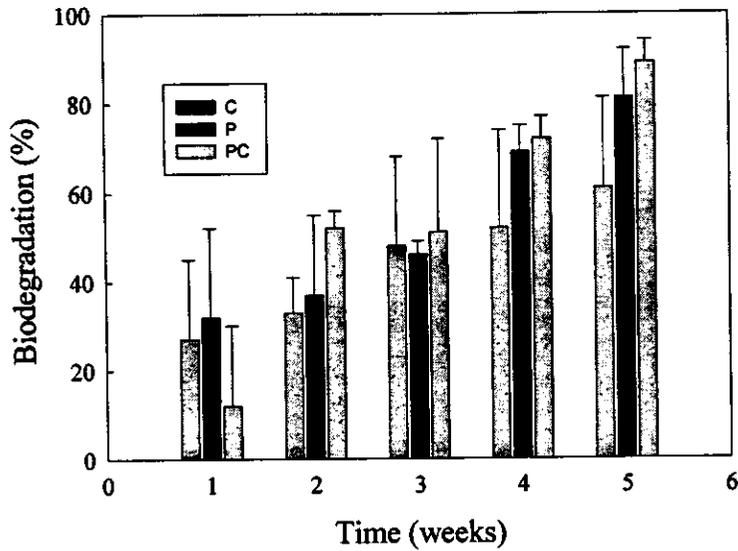


FIGURE 2. Time course of diesel removal from soil (laboratory level). C: microbial community; P: *P. ostreatus*; PC: *P. ostreatus* + C

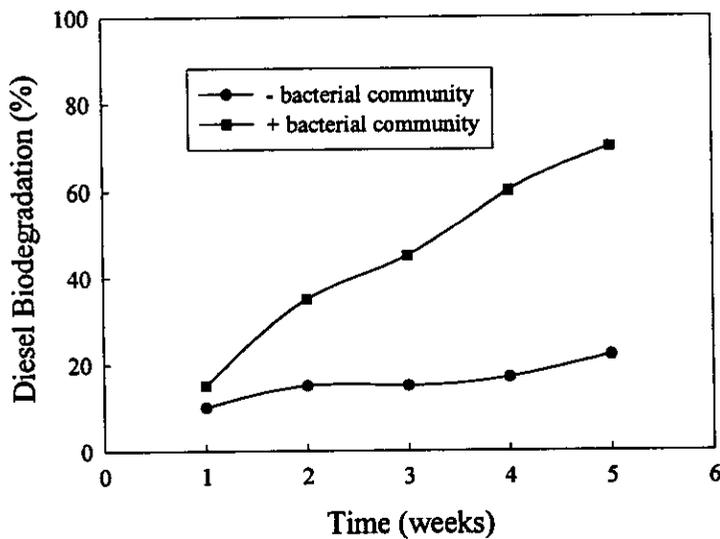


FIGURE 3. Diesel biodegradation at semi-pilot scale level.

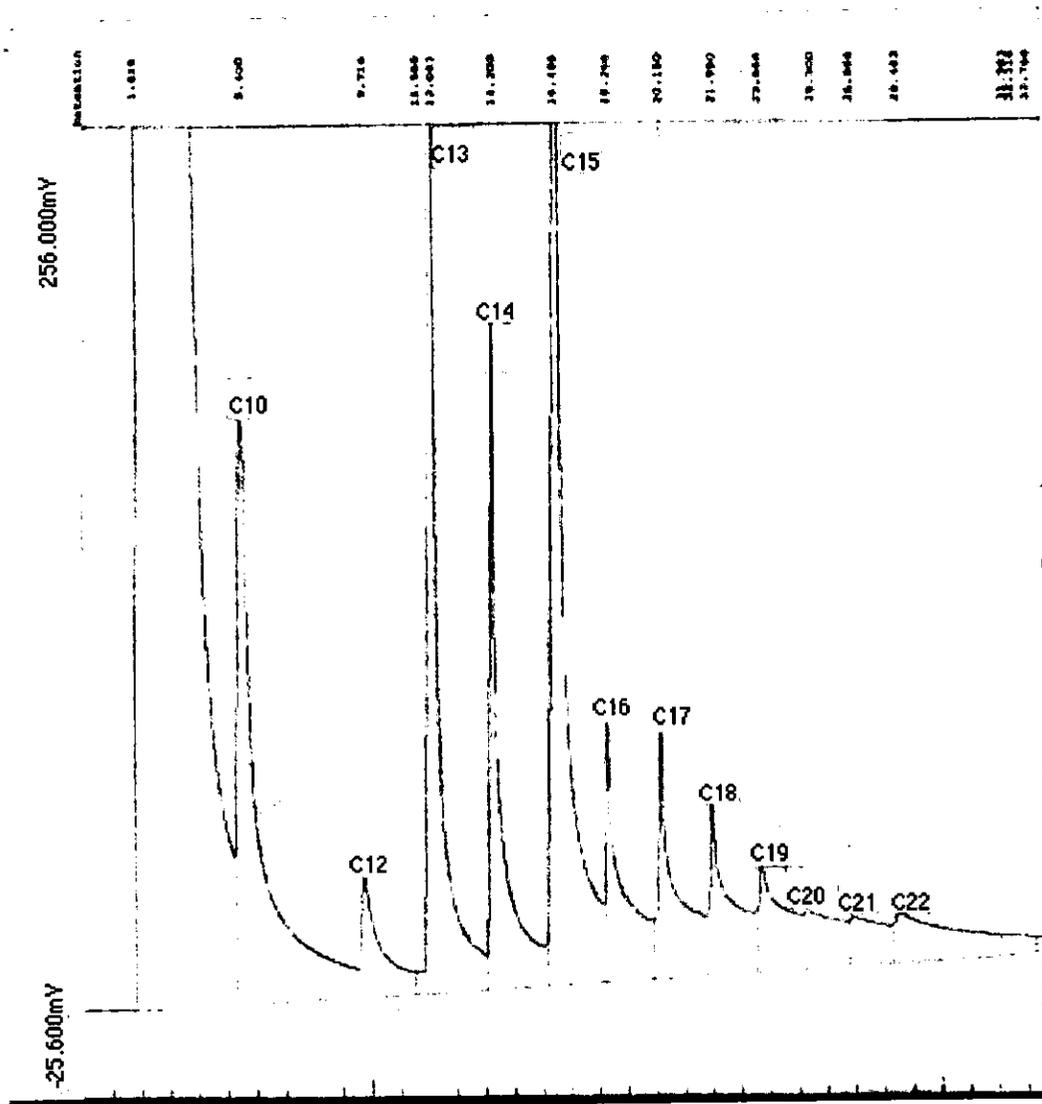
For optimization of bioremediation, it is necessary to understand the factors that control microbial activity at specific site. One of the important factors is the

substrate concentration. Diesel removal may be analyzed by exponential growth and high substrate concentration kinetic model ($-ds/dt = ke^n$; where $[s] \gg K_m$), we obtained a degradation rate of 0.091 h^{-1} for liquid degradation and $<0.04 \text{ d}^{-1}$ in soil at laboratory scale with the microbial community. At semi-pilot scale biodegradation rate increased to 0.051 d^{-1} may be due to indigenous microbial activity. In laboratory experiments, with the presence of *P. ostreatus* degradation rate was 0.062 d^{-1} .

Enhancement of the microbial activity in hydrocarbon-contaminated site may be used in combination with microbial addition. The semi-pilot based results support the concept of bioaugmentation by increasing the biodegradative activity that may be improved by inoculum stimulation.

REFERENCES

- Braddock J. F., M. L. Ruth, P. H. Catterall, J. L. Walworth, and K. A. McCarthy. 1997. "Enhancement and inhibition of microbial activity in hydrocarbon contaminated arctic soils: implications for nutrient-amended bioremediation". *Environ. Sci. Technol.* 31(7): 2078-2084.
- Huesemann M. H. 1995. "Predictive model for estimating the extent of petroleum hydrocarbon biodegradation in contaminated soils". *Environ. Sci. Technol.* 29(1): 7-18.
- Liu S. And Suflita J. M. 1993. "Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation". *TIBTECH* 11(8): 344-352.
- Margensin R. and F. Schinner. 1997. "Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for bioremediation of diesel oil in Alpine soils". *Appl. Environ. Biotechnol.* 63(7): 2660-2664.
- Prince R. C. 1993. "Petroleum spill bioremediation in marine environments". *Crit. Rev. Microbiol.* 19(4): 217-242.
- Sticher P., Jaspers M. C. M., Stemmler K., Harms H., Zehnder A. J. B., and van der Meer J. R. 1997. "Development and characterization of a whole-cell bioluminescent sensor for bioavailable middle-chain alkanes in contaminated groundwater samples". *Appl. Environ. Microbiol.* 63(10): 4053-4060.
- Venkateswaran K. and Harayama S. 1995. "Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil". *Cand. J. Microbiol.* 41: 767-775.



Cromatografía de estándares de hidrocarburos

6/1/99

DATA LIST FILE 'A:\VANESSA.DAT' FREE / HIDRO SYST SURFC DEGRAD.

MEANS /TABLES DEGRAD BY HIDRO BY SYST BY SURFC.

The raw data or transformation pass is proceeding

36 cases are written to the uncompressed active file.

***** Given WORKSPACE allows for 6241 Cells with 3 Dimensions for MEANS.

Summaries of DEGRAD
By levels of HIDRO
SYST
SURFC

Variable	Value	Label	Mean	Std Dev	Cases
For Entire Population			66.7333	11.0626	36
HIDRO	1.00		60.7250	12.9244	12
SYST	1.00		66.2500	5.2748	6
SURFC	1.00		71.0000	1.2166	3
SURFC	2.00		61.5000	.6245	3
SYST	2.00		55.2000	16.3219	6
SURFC	1.00		70.0000	.3606	3
SURFC	2.00		40.4000	2.9597	3
HIDRO	2.00		75.6667	6.1094	12
SYST	1.00		76.2333	2.0753	6
SURFC	1.00		75.2667	2.6558	3
SURFC	2.00		77.2000	.9539	3
SYST	2.00		75.1000	8.7770	6
SURFC	1.00		83.0000	.2000	3
SURFC	2.00		67.2000	2.3065	3
HIDRO	3.00		63.8083	7.0183	12
SYST	1.00		60.9000	9.1337	6
SURFC	1.00		63.2000	1.0817	3
SURFC	2.00		58.6000	13.8391	3
SYST	2.00		66.7167	2.1545	6
SURFC	1.00		68.0333	2.0306	3
SURFC	2.00		65.4000	1.5100	3
Total Cases =	36				

Page 5 SPSS/PC+ 6/1/99

This procedure was completed at 5:47:46

Page 6 SPSS/PC+ 6/1/99

FINISH.

End of Include file.

MAYO 31 DE 1999.

DATA LIST FILE 'a:\vanessa.dat' FREE / HIDRO SYST SURFC DEGRAD.
ANOVA /VARIABLES DEGRAD BY HIDRO (1,3) SYST SURFC (1,2).

86 cases are written to the uncompressed active file.

EL ANALISIS DE VARIANZA ES UN FACTORIAL DE 3X2X2 CON TRES REPS. POR CELDA.

* * * A N A L Y S I S O F V A R I A N C E * * *

DEGRAD
BY HIDRO
SYST
SURFC

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Signif of F
Main Effects	2440.066	4	610.017	32.800	.000
HIDRO	1493.522	2	746.761	40.153	.000
SYST	40.534	1	40.534	2.179	.153
SURFC	906.010	1	906.010	48.715	.000
2-way Interactions	1176.783	5	235.357	12.655	.000
HIDRO SYST	431.127	2	215.564	11.591	.000
HIDRO SURFC	424.052	2	212.026	11.400	.000
SYST SURFC	321.604	1	321.604	17.292	.000
3-way Interactions	220.157	2	110.079	5.919	.008
HIDRO SYST SURFC	220.157	2	110.079	5.919	.008
Explained	3837.007	11	348.819	18.756	.000
Residual	446.353	24	18.598		
Total	4283.360	35	122.382		

86 Cases were processed.

0 Cases (.0 PCT) were missing.

DATA LIST FILE 'A:\PIRENO.DAT' FREE / TIEMPO SYST SURFC DEGRAD.

Page 2 SPSS/PC+ 6/1/99

MEANS /TABLES DEGRAD BY TIEMPO BY SYST BY SURFC.

The raw data or transformation pass is proceeding

24 cases are written to the uncompressed active file.

***** Given WORKSPACE allows for 6241 Cells with 3 Dimensions for MEANS.

Page 3 SPSS/PC+ 6/1/99

Summaries of DEGRAD
 by levels of TIEMPO
 SYST
 SURFC

Variable	Value	Label	Mean	Std Dev	Cases
For Entire Population			56.6208	11.8852	24
TIEMPO	1.00		60.7250	12.9244	12
SYST	1.00		66.2500	5.2748	6
SURFC	1.00		71.0000	1.2166	3
SURFC	2.00		61.5000	.6245	3
SYST	2.00		55.2000	16.3219	6
SURFC	1.00		70.0000	.3606	3
SURFC	2.00		40.4000	2.9597	3
TIEMPO	2.00		52.5167	9.5691	12
SYST	1.00		55.9333	7.1896	6
SURFC	1.00		62.0000	3.0265	3
SURFC	2.00		49.8667	3.1070	3
SYST	2.00		49.1000	11.0336	6
SURFC	1.00		59.0000	.4583	3
SURFC	2.00		39.2000	3.1796	3
Total Cases =	24				

Page 5 SPSS/PC+ 6/1/99

This procedure was completed at 6:19:55

Page 6 SPSS/PC+ 6/1/99

FINISH.

End of Include file.

5/31/99

DATA LIST FILE 'A:\PIRENO.DAT' FREE / TIME SYST SURFC DEGRAD.

ANOVA /VARIABLES DEGRAD BY TIME SYST SURFC (1,2).

The raw data or transformation pass is proceeding

24 cases are written to the uncompressed active file.

* * * A N A L Y S I S O F V A R I A N C E * * *

DEGRAD
BY TIME
SYST
SURFC

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Signif of F
Main Effects	2776.131	3	925.377	185.570	.000
TIME	404.260	1	404.260	81.068	.000
SYST	479.720	1	479.720	96.201	.000
SURFC	1892.150	1	1892.150	379.442	.000
2-way Interactions	335.051	3	111.684	22.396	.000
TIME SYST	26.670	1	26.670	5.348	.034
TIME SURFC	19.260	1	19.260	3.862	.067
SYST SURFC	289.120	1	289.120	57.979	.000
3-way Interactions	57.970	1	57.970	11.625	.004
TIME SYST SURFC	57.970	1	57.970	11.625	.004
Explained	3169.153	7	452.736	90.789	.000
Residual	79.787	16	4.987		
Total	3248.940	23	141.258		

24 Cases were processed.

0 Cases (.0 PCT) were missing.

Page 5 SPSS/PC+

5/31/99

This procedure was completed at 16:35:50

Page 6 SPSS/PC+

5/31/99

FINISH.

End of Include file.

DATA LIST FILE 'A:\SISTEMA1.DAT' FREE / HIDRO SYST SURFC DEGRAD.

SPSS/PC+

ANOVA /VARIABLES DEGRAD BY SYST SURFC (1,2).

The raw data or transformation pass is proceeding

12 cases are written to the uncompressed active file.

ANOVA' PROBLEM REQUIRES 374 BYTES

SPSS/PC+

* * * A N A L Y S I S O F V A R I A N C E * * *

BY DEGRAD
SYST
SURFC

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Signif of F
Main Effects	1512.915	2	756.457	281.211	.000
SYST	366.307	1	366.307	136.174	.000
SURFC	1146.607	1	1146.607	426.248	.000
2-way Interactions	303.008	1	303.008	112.642	.000
SYST SURFC	303.008	1	303.008	112.642	.000
Explained	1815.922	3	605.307	225.021	.000
Residual	21.520	8	2.690		
Total	1837.442	11	167.040		

12 Cases were processed.

0 Cases (.0 PCT) were missing..

This procedure was completed at 8:40:55

FINISH.

End of Include file.

DATA LIST FILE 'A:\SISTEMA2.DAT' FREE / HIDRO SYST SURFC DEGRAD.

ANOVA /VARIABLES DEGRAD BY SYST SURFC (1,2).

The raw data or transformation pass is proceeding

12 cases are written to the uncompressed active file.

ANOVA' PROBLEM REQUIRES 374 BYTES OF MEMORY.

* * * A N A L Y S I S O F V A R I A N C E * * *

DEGRAD
BY SYST
SURFC

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Signif of F
Main Effects	148.067	2	74.033	22.227	.001
SYST	3.853	1	3.853	1.157	.313
SURFC	144.213	1	144.213	43.296	.000
2-way Interactions	235.853	1	235.853	70.809	.000
SYST SURFC	235.853	1	235.853	70.809	.000
Explained	383.920	3	127.973	38.421	.000
Residual	26.647	8	3.331		
Total	410.567	11	37.324		

12 Cases were processed.

0 Cases (.0 PCT) were missing.

This procedure was completed at 8:44:06

FINISH.

End of Include file.

DATA LIST FILE 'A:\SISTEMA3.DAT' FREE / HIDRO SYST SURFC DEGRAD.

ANOVA /VARIABLES DEGRAD BY SYST SURFC (1,2).

The raw data or transformation pass is proceeding

12 cases are written to the uncompressed active file.

ANOVA' PROBLEM REQUIRES 374 BYTES OF MEMORY.

* * * A N A L Y S I S O F V A R I A N C E * * *

BY DEGRAD
SYST
SURFC

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Signif of F
Main Effects	140.742	2	70.371	1.414	.298
SYST	101.501	1	101.501	2.039	.191
SURFC	39.241	1	39.241	.788	.400
2-way Interactions	2.901	1	2.901	.058	.815
SYST SURFC	2.901	1	2.901	.058	.815
Explained	143.643	3	47.881	.962	.456
Residual	398.187	8	49.773		
Total	541.829	11	49.253		

12 Cases were processed.

0 Cases (.0 PCT) were missing.

This procedure was completed at 8:46:41

FINISH.

End of Include file.

DISMINUCION DE LA GENOTOXICIDAD DEL SUELO CONTAMINADO CON HPA'S POR LA ACTIVIDAD DEGRADATIVA DE *PLEUROTUS OSTREATUS*

Facundo Márquez R., Vanessa Hernández R. y Rafael Vázquez-Duhalt.
Instituto de Biotecnología, UNAM. AP 510-3, Cuernavaca,
Morelos 62250, México. Fax: 52-73-172388.

Los hidrocarburos polinúcleo aromáticos (HPA) se encuentran ampliamente distribuidos en el medio (agua, suelo y aire), en diferentes concentraciones y proporciones, pueden estar sustituidos con grupos nitro e hidroxilo. Su origen se encuentra principalmente en el petróleo crudo y en la combustión incompleta del petróleo, sus derivados y de material orgánico. En sitios contaminados, sobre todo con petróleo pesado, su remoción es muy difícil debido a su carácter hidrofóbico. Esta última propiedad hace que los HPA se unan fuertemente a la materia orgánica del suelo disminuyendo su biodisponibilidad. El uso de surfactantes puede disminuir los problemas de transferencia de masa inherentes a los HPA. Por otro lado, desde el punto de vista de salud los HPA son muy importantes ya que muchos de ellos son compuestos genotóxicos. Para la remoción de los HPA del suelo, se ha sugerido el uso de microorganismos que tengan la capacidad de transformarlos, al menos, en compuestos menos tóxicos. El uso de un diverso grupo de hongos lignolíticos y no lignolíticos para la remoción de los HPA despertó gran interés ya que algunos de estos hongos pueden utilizar HPA tales como fenantreno y antraceno. En este trabajo utilizaremos el hongo de putrefacción blanca *Pleurotus ostreatus* para la degradación del pireno y de una mezcla compleja de HPA (creosota) y observar los efectos que tiene sobre la desintoxicación del suelo.

Metodología.

La cepa de hongo utilizada fue *Pleurotus ostreatus* ECS-110(IE8). Se utilizaron los surfactantes Tritón X-100, Tween 40 y 80 al 0.05% y en otra serie de experimentos se utilizó H₂O₂ 1mM. Se utilizó el pireno como modelo de HPA y creosota con una concentración de 0.1mg/g de suelo seco. Se muestreó cada 7 días por triplicado durante 5 semanas, obteniéndose sus correspondientes desviaciones estándar. La extracción se llevó a cabo con diclorometano. El análisis por HPLC se realizó en una columna Supelco C18 fase reversa, con fase móvil ACN/H₂O 70:30. El estándar de pirenodiona se preparó por la reacción de oxidación del pireno catalizada por la enzima lignina peroxidasa en presencia de peróxido de hidrógeno. Para la prueba de genotoxicidad se usó un ensayo enzimático con la cloroperoxidasa y ADN de timo de ternera, para determinar la formación de aductos por fluorometría.

Resultados y Discusión

Los análisis por HPLC muestran la formación de al menos un producto y la disminución de pireno hasta un 40 %. De acuerdo al tiempo de retención (3.76min) en nuestro ensayo estándar es muy probable que uno de los productos sea la pirenodiona. Se observa que la adición de H₂O₂ al suelo aumenta la oxidación del pireno. Por otra parte, en los análisis de creosota se observa el aumento del área de unos picos y la disminución de otros, entre ellos un pico con el mismo tiempo de retención del pireno el cual también se reduce a lo largo del período de crecimiento del hongo. La genotoxicidad medida como la formación de aductos disminuye en forma equivalente a la oxidación del pireno. El hongo *Pleurotus ostreatus* redujo el pico del pireno hasta un 40% y en creosota de un 20 a un 30 %. La oxidación no fue más allá debido posiblemente a 3 factores 1) limitaciones en cuanto a la biodisponibilidad del pireno 2) limitaciones en cuanto a especiesceptoras de electrones y 3) posiblemente a limitaciones de sustrato (pireno y HPA). En cuanto al punto 2) con la adición de H₂O₂ se observó un aumento en la oxidación del pireno y de la creosota hasta en un 10 %, lo cual quiere decir que al menos por este punto sí existe una limitación en las especiesceptoras de electrones. La genotoxicidad disminuye posiblemente por la oxidación de HPAs con más de 3 anillos aromáticos, los cuales son menos reactivos para unirse covalentemente con el ADN y formar aductos, lo cual podría disminuir su genotoxicidad.