



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"APLICACION DE BIOENSAYOS DE TOXICIDAD
AGUDA PARA EVALUACION DE SUELOS
CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DEL
PETROLEO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ROSAURA PAEZ BISTRAIN



DIRECTOR DE TESIS: DR. VICTOR M. LUNA PABELLO



MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

MAYO 2000

2001140



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedico este trabajo con todo mi amor:

A mis hijas Pamela, Melissa y Samantha, por ser la luz que ilumina mi existencia.

A mi esposo José Martín, con quien he vivido los eventos más importantes de mi vida.

*A mis padres Angela Bistrain y Daniel Paez, a mis hermanos Ricardo, Eric, Martín y Sandra,
a quienes además agradezco todo su cariño, apoyo y comprensión.*

Al M en C. Margarito Paez, por ser el mejor ejemplo a seguir,

por todo el cariño e incondicional apoyo.

A mis entrañables amigos Ivette, Angélica, Carlos Mario y José Luis.

Deseo expresar mi reconocimiento a:

Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental, de la Facultad de Química, bajo la Coordinación de la Dra.-Ing. Carmen Durán Domínguez, por permitirme el uso de sus instalaciones y equipos, necesarios para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Proyecto Conacyt **3302P-B** "Tratamiento de aguas residuales usando un sistema de raíces en humedales", por la beca otorgada para la realización de este trabajo de Tesis.

Proyecto **FIES-IMP 96F-48-VI** "Desarrollo de un proceso para facilitar la biodisponibilidad de compuestos recalcitrantes derivados del petróleo para su aplicación en sitios contaminados", por el financiamiento que permitió llevar a cabo esta investigación.

Proyecto **DGAPA IN108798**, por el apoyo en la obtención de reactivos para la determinación de algunos parámetros físicos y químicos del suelo.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, y por las sugerencias hechas para enriquecerlo.

Al Dr. Victor Manuel Luna Pabello, por haber dirigido este trabajo y por el apoyo prestado durante el desarrollo del mismo.

A la Dipl. Q. A. Michaela Holzer y al Biol. Francisco Damián por haber compartido los conocimientos e inquietudes que permitieron el planteamiento de este trabajo de investigación.

A la Biol. Ivette Ruiz B. por los comentarios y sugerencias hechos durante la revisión de este documento, por su confianza y apoyo en todo momento, e indiscutiblemente por su valiosa, sincera e incondicional amistad.

Al M. en C. Efrain Tovar Sánchez por el apoyo en el análisis estadístico de los resultados, por las atinadas sugerencias para mejorar la presentación de este trabajo, pero sobre todo por su confianza, apoyo y valiosa amistad.

Al Dr. Jorge Gama Castro por su asesoría y acertadas recomendaciones en lo que se refiere al análisis edafológico del suelo.

A la Biol. Miriam Piña Cobos, al I. Q. Juan Manuel Arce, al M. en Q. Ambiental Rolando García, a los Pas. de Q. A. Katia Pérez y Alfoso Madrigal Plaza por su apoyo en los análisis ambientales y más que eso, por la amistad surgida durante el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Gilberto Díaz González por su apoyo en el análisis cromatográficos de las muestras de suelo y por compartir sus conocimientos y gran experiencia en este campo, pero sobre todo por su invaluable amistad.

A la M. en C. Guadalupe Ponce por haber dedicado parte de su tiempo a la revisión de este documento y por sus valiosas y atinadas sugerencias para mejorarlo y de forma preponderante su muy valiosa amistad.

ÍNDICE

| | |
|--|----------|
| RESUMEN | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 2 |
| 2. MARCO TEÓRICO | |
| 2.1 EL SUELO | 4 |
| 2.1.1 Características edáficas | 4 |
| 2.1.2 Flujo de contaminantes en el suelo | 6 |
| 2.1.3 Procesos de transformación de los contaminantes en el suelo | 8 |
| 2.2 HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO | 9 |
| 2.2.1 Características y composición | 10 |
| 2.2.2 Los hidrocarburos del petróleo como contaminantes y su degradación | 13 |
| 2.2.3 Análisis de hidrocarburos en el suelo | 18 |
| 2.3 PRUEBAS ECOTOXICOLÓGICA PARA SUELOS CONTAMINADOS | 19 |
| 2.3.1 Uso de microorganismos en pruebas de toxicidad | 21 |
| 2.3.1.1 Efectos de los contaminantes sobre los microorganismos | 23 |
| 2.3.2 Uso de plantas terrestres en pruebas de toxicidad | 23 |
| 2.3.2.1 Efectos de los contaminantes sobre el desarrollo de las plantas | 25 |
| 2.3.3 Uso de lombrices de tierra en pruebas de toxicidad | 27 |
| 2.3.3.1 Efectos de los contaminantes sobre la lombriz de tierra | 28 |
| 3. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO | |
| 3.1 OBJETIVOS GENERALES | 30 |
| 3.2 OBJETIVOS PARTICULARES | 30 |
| 3.3 ESTRATEGIA DE TRABAJO | 31 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | |
| 4.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE SUELO | 32 |
| 4.2 CARACTERIZACIÓN EDÁFICA DEL SUELO | 32 |
| 4.3 ANÁLISIS DE CONTAMINANTES | |
| 4.3.1 Determinación de Hidrocarburos Totales del Petróleo | 38 |
| 4.3.2 Determinación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos | 39 |
| 4.3.3 Determinación de metales pesados | 40 |

| | |
|--|----|
| 4.4 PRUEBAS ECOTOXICOLÓGICAS EMPLEADAS | |
| 4.4.1 Prueba de toxicidad aguda con <i>Bacillus cereus</i> | 41 |
| 4.4.2 Pruebas de toxicidad aguda con <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Triticum aestivum</i> y <i>Zea mays</i> | 43 |
| 4.4.3 Prueba de toxicidad aguda con <i>Eisenia foetida</i> | 44 |
| | |
| 5. RESULTADOS | |
| 5.1 CARACTERIZACION EDÁFICA | 46 |
| 5.2 ANÁLISIS DE CONTAMINANTES EN EL SUELO | 47 |
| 5.3 VALORES DE TOXICIDAD AGUDA CON <i>Bacillus cereus</i> | 51 |
| 5.4 VALORES DE TOXICIDAD AGUDA CON PLANTAS TERRESTRES | 53 |
| 5.4.1 <i>Phaseolus vulgaris</i> | 53 |
| 5.4.2 <i>Zea mays</i> | 56 |
| 5.4.3 <i>Triticum aestivum</i> | 58 |
| 5.5 VALORES DE TOXICIDAD AGUDA CON <i>Eisenia foetida</i> | 60 |
| | |
| 5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN | 63 |
| | |
| 6. CONCLUSIONES | 72 |
| | |
| 7. RECOMENDACIONES | 73 |
| | |
| 8. BIBLIOGRAFÍA | 74 |

RESUMEN

Entre las sustancias tóxicas que se llegan a producir en millones de toneladas por año, se encuentra el petróleo crudo y los productos derivados del mismo; estos productos son una fuente importante de toxicidad en el ambiente debido a su persistencia y uso común en la sociedad industrializada. La aplicación de pruebas biológicas y microbiológicas para evaluar la biodisponibilidad de éstas sustancias tóxicas en el ambiente y, en particular en muestras de sólidos (sedimentos, suelos, lodos), se ha incrementado significativamente durante la última década. En el presente trabajo se llevó a cabo la evaluación de la toxicidad de un suelo contaminado con productos de la refinación del petróleo y cuya contaminación no obstante ser añeja, continúa recibiendo aportaciones periódicas. Para cumplir con éste cometido se inició con la caracterización física y química del suelo, obteniendo parámetros como pH, textura, capacidad de intercambio catiónico, densidad, capacidad de campo, % de humedad, fósforo, nitrógeno, % de materia orgánica y carbono orgánico total. Se realizó también caracterización del tipo de contaminantes presentes en el suelo, determinándose hidrocarburos alifáticos (C14-C34) y aromáticos (compuestos de 4 y 5 anillos principalmente), mediante el uso de cromatografía de gases con detector de ionización de flama. Se detectaron metales pesados (V, Ni, Cr, Fe, Cu, Mn y Zn) en bajas concentraciones, mediante el uso de la espectrofotometría de absorción atómica. La evaluación toxicológica, se hizo mediante una batería de pruebas de toxicidad aguda que comprenden el uso de *Bacillus cereus* (bacterias), *Eisenia foetida* (lombriz de tierra) y *Zea mays*, *Triticum aestivum* y *Phaseolus vulgaris* (plantas). El ensayo de toxicidad aguda con *B. cereus* se basa en el porcentaje de inhibición de la deshidrogenasa. En el caso de *E. foetida*, la toxicidad se evaluó por el porcentaje de sobrevivencia. Para *Z. mays*, *T. aestivum* y *P. vulgaris* se estimó la toxicidad en la germinación y primeros estadios de crecimiento.

Como resultado de éstas pruebas, se obtuvo que a una concentración de 92 % de suelo contaminado hay un 50% de inhibición en la actividad deshidrogenasa en *B. cereus* (IC_{50}). Para *E. foetida* el porcentaje de mortalidad fue del 100 % en las concentraciones probadas del 12, 25 y 50 %, a los 14 días que duró la prueba. En cuanto a la evaluación con plantas, se observó que el efecto inhibitorio en la germinación y en los primeros estadios de crecimiento fue mayor en *P. vulgaris*; mientras que *Z. mays* y *T. aestivum* resultaron ser menos sensibles a la contaminación del suelo.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluyó que el suelo evaluado resulta ser más tóxico para *E. foetida* que para *B. cereus*, *P. vulgaris*, *T. aestivum*, y *Z. mays*. Lo cual tiene mucho que ver con la ruta de exposición al tóxico, la edad de la contaminación, y la disponibilidad de los contaminantes. En general se puede decir según Dombroski et al. (1991), que el suelo es ligeramente tóxico para *B. cereus*, moderadamente tóxico para *P. vulgaris*, *T. aestivum*, y *Z. mays*; y tóxico para *E. foetida*.

1. INTRODUCCIÓN

Aunque por mucho tiempo, el hombre ha arrojado a la biosfera los desechos provenientes de sus diversas actividades, la contaminación ambiental sólo se produce, en sentido estricto, cuando la introducción de sustancias alteran el medio receptor -aire, agua y suelo-, originando un desequilibrio en los ecosistemas afectando negativamente la salud y la calidad de vida del hombre, y modificando en ocasiones las condiciones climáticas locales o globales (Restrepo, 1995). Fue a partir de la Revolución industrial cuando se produjo un cambio cualitativo al recibir el ambiente los desechos de los procesos productivos a una velocidad mucho mayor de lo que éste podría absorberlos para autopurificarse, o bien, por el carácter no biodegradable de muchos de esos desechos (Restrepo, 1995).

En México, debido al acelerado crecimiento de la población y al aumento de las actividades agrícolas e industriales, se ha causado un notable deterioro en la calidad ambiental, así como una acelerada generación de residuos de todo tipo. Se estima que en México se generan 450,000 toneladas de residuos al día, de los cuales 14 000 toneladas aproximadamente, corresponden a residuos peligrosos (INE 1996). Esto ha hecho que México cuente con gran cantidad de sitios contaminados por diversas actividades y que en la mayoría de los casos se desconozcan los niveles de afectación debido a la falta de monitoreo (Iturbe *et al.*, 1999).

Por otra parte, cada vez se conoce con mayor precisión la naturaleza y la gravedad de los efectos ocasionados por diversas tareas productivas realizadas en áreas naturales y se sabe que la presencia de petróleo y sus derivados en los ecosistemas, no sólo se debe a las actividades normales de extracción, sino también al transporte, los desechos industriales urbanos, las actividades económicas y recreativas; las filtraciones naturales y los fenómenos climáticos (Restrepo, 1995).

En respuesta a lo anterior, han surgido diferentes tecnologías de remediación para limpiar sitios contaminados, cuyo objetivo es el de reducir la concentración así como eliminar sustancialmente los efectos tóxicos en el ambiente. Los criterios para la remediación de suelos se han basado prácticamente en el análisis químico de los niveles de contaminación. Sin embargo, los cambios recientes en las políticas ambientales tienden a una consideración más funcional de la

remediación, basada en el uso de suelo, lo que incrementa la demanda de información del sitio específico en cuanto a los efectos locales de los contaminantes presentes. Los niveles de contaminantes son indicativos de un riesgo potencial, pero los ensayos biológicos dan una evidencia más directa de los efectos tóxicos de los contaminantes en el suelo. Por ello la *determinación de la toxicidad es uno de los aspectos importantes en la evaluación de las posibles alternativas de remediación*. Esta, junto con otras características del sitio, consideradas en un análisis de riesgo, pueden determinar el tipo y nivel de tratamiento que se debe aplicar en un sitio contaminado (Iturbe *et al.*, 1999).

Finalmente, puede decirse que a pesar de los numerosos estudios realizados sobre la contaminación por hidrocarburos (Botello, 1978; Botello y Paez, 1987; Botello y Villanueva, 1987; Cervantes, 1999; Díaz-González *et al.* 195; Elias-Murguía y Martínez, 1991; Gallegos, 1996; González, 1990; Ramírez *et al.*, 1991; Santer, 1997; Trujillo *et al.*, 1990; Zavala, 1993) *no existe todavía un conocimiento suficiente en relación con los siguientes puntos (Restrepo, 1995):*

1. Tasa de degradación del petróleo en los diferentes componentes del ecosistema, en particular en áreas consideradas vitales
2. Toxicidad específica de emisiones y descargas
3. Vías de difusión del petróleo y sus productos en los ecosistemas
4. Mecanismos de incorporación del petróleo en las cadenas alimenticias
5. Eficiencia real y efectos de los métodos de control

En este sentido, el presente trabajo se plantea en el marco del segundo punto, buscando contribuir al conocimiento de la toxicidad temporal de un suelo que ha sido impactado a causa del petróleo como resultado de las actividades de explotación, traslado, refinación y almacenamiento del mismo.

Por lo anterior, se considera que la aplicación de bioensayos de toxicidad permite valorar de manera integral el nivel de contaminación presente tanto en sitios remediados, como en aquellos contaminados recientemente; coadyuvando así a un mejor diagnóstico de la problemática existente en un determinado sitio en particular.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 EL SUELO

El suelo tiene múltiples definiciones, según Alexander (1990), es el material exterior, poco compacto de la superficie terrestre, un estrato característicamente diferente del lecho rocoso subyacente. Es la región en la que se sustenta la vida vegetal y de la cual las plantas obtienen soporte mecánico y muchos de sus nutrimentos. Químicamente, el suelo contiene una gran cantidad de sustancias orgánicas que no se encuentran en los substratos más profundos. El ambiente edáfico es uno de los sitios más dinámicos en interacciones biológicas en la naturaleza, en el cual se realizan la mayor parte de las reacciones bioquímicas involucradas en la descomposición de materia orgánica, la intemperización de las rocas y la nutrición de cultivos agrícolas.

2.1.1 Características edáficas

El suelo está formado por cinco componentes principales: materia mineral, agua, aire, materia orgánica y organismos vivos. La cantidad de estos constituyentes no es la misma en todos los suelos sino que varía con la localidad. La cantidad de materia orgánica y mineral, que forman parte de la porción inanimada, es relativamente estable en un determinado lugar; sin embargo la proporción de aire y agua varía. El aire y el agua juntos representan aproximadamente la mitad del volumen en la mayoría de los suelos, al cual se le llama espacio poroso; mientras que la fracción mineral, que en muchos casos contribuye con poco menos de la mitad del volumen, se origina de la desintegración y descomposición de las rocas, transformándose con el transcurso del tiempo (Foth, 1990).

Por lo general, la materia orgánica constituye de >1 al 15 % del total, y se relaciona con la vegetación nativa, pero si la vegetación es constante, la acumulación es regulada por las condiciones climáticas; entendiéndose por materia orgánica, todo el material de origen orgánico que se encuentra en diferentes estados de descomposición en el suelo. Consecuentemente, quedan incluidos bajo este término, residuos de animales y vegetales que aún presentan suficiente

diferenciación para permitir la identificación de su origen, así como aquellos productos orgánicos muy degradados, que han llegado a un virtual equilibrio con el medio (Aguilera y Martínez, 1996). Estos últimos forman un material amorfo, relativamente estable, cuyo color puede variar desde pardo hasta negro y es el principal responsable de varias propiedades importantes del suelo; al que se le conoce como humus (Aguilera y Martínez, 1996; Aguilar *et al.* 1987). La porción viviente, en la mayoría de los suelos, constituye menos del 1% del volumen total; aún así, esta fracción es indudablemente esencial para la producción de cultivos y la fertilidad del suelo.

La parte inorgánica del suelo tiene un notable efecto sobre los habitantes edáficos (Edafón), debido a su influencia sobre la disponibilidad de nutrimentos, aireación y retención de agua. En la fracción mineral se encuentran partículas de una gran variedad de tamaños, las cuales se clasifican con base en sus dimensiones. En el extremo superior se encuentran piedras y grava, materiales cuyos diámetros sobrepasan los 2 mm. Las partículas de arena son un poco más pequeñas teniendo un diámetro de 0.05 a 2 mm. Las estructuras cuyo diámetro se encuentra entre 0.002 y 0.05 mm son denominadas limos, mientras que las de diámetro menor de 0.002 mm (2 μm) se conocen como arcilla (Alexander, 1990). Es importante mencionar que las partículas de menor tamaño, exponen una mayor área superficial por unidad de masa que las partículas más grandes. Debido a que las partículas de arcilla presentan un área superficial grande y usualmente una carga negativa, son un potente adsorbente para los cationes tanto orgánicos como inorgánicos y posibilitan el desplazamiento del intercambio catiónico en el suelo (Larson y Weber, 1994). Los minerales arcillosos contienen sílice, oxígeno y aluminio, aunque también pueden encontrarse hierro, magnesio, potasio, calcio, sodio y algunos otros elementos en cantidades variables (Alexander, 1990).

En comparación con la arcilla, el limo ejerce una influencia menor en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Por su parte, la partícula de arena, unidad comparativamente grande, expone una pequeña área superficial, teniendo todavía menor trascendencia. Sin embargo, ésta afecta el movimiento de agua y del aire (Foth, 1990).

En términos generales, los suelos se dividen en suelos de textura fina y gruesa. En los primeros, predomina la arcilla; lo que les permite tener una mayor capacidad de absorción de nutrimentos

y usualmente son más fértiles. Los últimos son suelos arenosos, los cuales tienen poros grandes y permiten una más rápida infiltración del agua. Sin embargo, los suelos arcillosos tienen una mayor capacidad de retención de agua debido a su mayor área superficial y presentan un volumen de vacío total mayor que los suelos arenosos (Aguilera y Martínez, 1996).

2.1.3 Flujo de contaminantes en el suelo

La industrialización de la sociedad ha venido a incrementar la producción y emisión de sustancias químicas naturales y xenobióticas, muchas de las cuales tienen su punto final en el suelo; debido a que sus componentes tienen una gran capacidad para retener compuestos químicos, sobre todo aquellas moléculas polares o iones divalentes o trivalentes cargados positivamente. En consecuencia, el suelo es un receptor nato para toda clase de sustancias químicas, encontrándose con frecuencia en concentraciones considerablemente mayores que en otros compartimentos ambientales. Esta situación podría inducir un mayor o menor impacto en las funciones del suelo como ecosistema, entre las que se encuentran la descomposición de la materia orgánica, la mineralización de nutrientes y la síntesis de sustancias húmicas (Verhoef y van Gestel, 1995).

El suelo juega un papel importante en el transporte y remoción de los contaminantes ya que: (a) provee una superficie de absorción; (b) actúa como un amortiguador en el sistema y (c) sirve como filtro para los contaminantes. Los procesos de transporte dominantes, relacionados con el suelo, son la adsorción y la lixiviación (eluviación-iluviación) (Conell y Miller, 1984).

El proceso de adsorción está influenciado por varios factores, entre los que destacan: (1) la estructura característica del químico (peso molecular, grupos funcionales, solubilidad y coeficiente de partición) (Means, *et al.*; 1980; Dzombak y Luthy, 1984; Maxin y Kögel-Knabner, 1995), (2) el contenido de materia orgánica en el suelo (Means, *et al.*; 1980; Dzombak y Luthy, 1984; Ragle, *et al.*, 1997); (3) el pH del medio (Verhoef y van Gestel, 1995); (4) el tamaño de las partículas (textura) (Alexander, 1995), (5) la capacidad de intercambio iónico (Alexander, 1995) y (6) la temperatura (Verhoef y van Gestel, 1995).

La adsorción de los compuestos químicos orgánicos por materiales arcillosos o materia orgánica ocurre por una o más de las siguientes interacciones: fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, intercambio iónico, enlaces covalentes, protonación, intercambio de ligandos, y/o partición hidrofóbica (Pierzynski *et al*, 1994; Pignatello, y Xing, 1996; Dec y Bollag, 1997).

Los estudios de la cinética de la adsorción y desorción proveen otra perspectiva en el comportamiento de los tóxicos que es relevante en la evaluación de riesgos (Alexander, 1995). Para los compuestos hidrofóbicos, así como para algunas otras sustancias, el alcanzar el aparente equilibrio en la adsorción podría requerir semanas, meses y algunas veces, posiblemente varios años. La fase inicial de adsorción es rápida, y frecuentemente cerca de la mitad del compuesto químico en solución acuosa es removido del suelo en unos pocos minutos u horas. Esta primera fase es seguida por una considerable baja en la adsorción, la cual puede ser de una prolongada duración (Alexander, 1995).

El movimiento de los contaminantes a través del suelo incluye al agua como acarreador y el desplazamiento resulta de una fuerza externamente aplicada, tal como la gravedad (Fig. 1). El movimiento significativo origina lixiviados los cuales pueden reducir la concentración de los contaminantes en el suelo pero causan problemas de contaminación en los mantos acuíferos (Conell y Miller, 1984). En general las especies polares son más móviles en el suelo, que las especies no polares, incrementando su movilidad de la siguiente forma: hidrocarburos >éteres >aminas terciarias >nitro compuestos >esteres >cetonas >aldehidos >amidas >ácidos (Conell y Miller, 1984).

En resumen, el movimiento de un contaminante orgánico en el suelo depende de características químicas tales como su solubilidad relativa en agua; su presión de vapor; su tamaño molecular; su carga y presencia de otros compuestos orgánicos. La capacidad del suelo para adsorber y secuestrar compuestos orgánicos, está directamente asociada con el contenido de materia orgánica, el tipo y porcentaje de arcillas (tanto cristalinas como amorfas) presentes; estructura del suelo; pH, así como con la frecuencia, intensidad y duración de la contaminación y con el

flujo de agua a través del perfil del suelo (Conell y Miller, 1984; Hatzinger y Alexander, 1995, Carmichael et al., 1997).

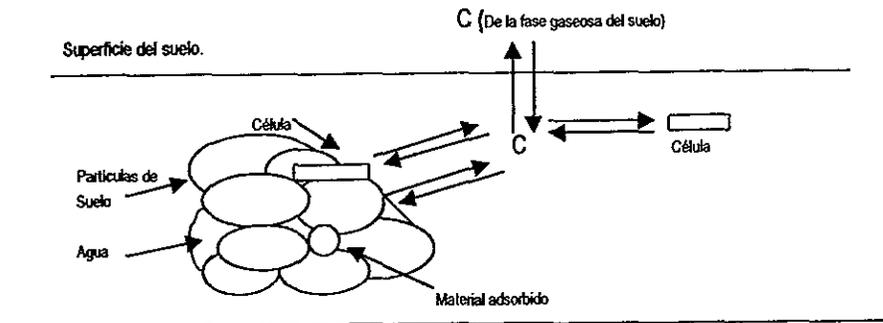


Figura 1. La fase mineral (sólida) del suelo se encuentra usualmente en agregados y el agua fluye a través de canales entre los agregados. Un contaminante disuelto en el agua (C) puede ser removido de la solución por biodegradación, (células), volatilización a la fase gaseosa y por adsorción en la materia orgánica y la superficie mineral de los agregados. La adsorción puede ocurrir en la superficie de los agregados o dentro de las grietas de los agregados. Los contaminantes adsorbidos y atrapados dentro de los agregados no son fácilmente transportados por el flujo de agua. La adsorción y volatilización reduce la concentración de contaminantes en la fase acuosa, lo cual baja la tasa de biodegradación al disminuir la biodisponibilidad del sustrato (Bouwer y Zehnder, 1993).

2.1.3 Procesos de transformación de los contaminantes en el suelo

Las reacciones abióticas y bióticas, por separado o en combinación, son las responsables de las transformaciones de los contaminantes en el suelo. Se asume frecuentemente que la degradación de los compuestos químicos orgánicos es mediante procesos bióticos; sin embargo, pueden ocurrir simultáneamente reacciones abióticas (Pierzynski, et al, 1994).

En el suelo, las transformaciones abióticas tienen lugar en la fase líquida (solución del suelo) y en la interfase sólido-líquido. En la solución, las reacciones de hidrólisis y redox, son las transformaciones abióticas más comunes. Las arcillas, la materia orgánica, y los óxidos metálicos son capaces de catalizar las reacciones abióticas que ocurren en el suelo. Los cationes intercambiables, también pueden influenciar las transformaciones de los compuestos químicos en el suelo (Bouwer y Zehnder, 1993).

Las transformaciones microbianas de los compuestos químicos orgánicos son clasificadas de la siguiente manera: (1) biodegradación (el contaminante es usado como sustrato para el crecimiento); (2) comensalismo (el contaminante es transformado por reacciones metabólicas sin ser usado como fuente de energía); (3) acumulación (el contaminante es incorporado dentro del microorganismo); (4) polimerización o conjugación (el contaminante es ligado con otro compuesto orgánico); y (5) efectos secundarios de la actividad microbiana (el contaminante es transformado debido a un efecto microbiano indirecto, i.e., modificaciones de pH) (Bollag y Liu, 1990). Aunque estas transformaciones se consideran mediadas por microorganismos, también se incluyen transformaciones abióticas, especialmente en las transformaciones relacionadas con las categorías 4 y 5 (Pierzynski *et al*, 1994).

La biodegradación es considerado el principal proceso en el que los compuestos orgánicos son transformados a productos inorgánicos como CO₂, H₂O, y sales minerales. En ecosistemas naturales, la biodegradación de los compuestos orgánicos, es debida principalmente a bacterias heterótrofas y actinomicetes, algunas bacterias autótrofas, hongos incluyendo basidiomicetes y levaduras, y protozoarios específicos (Pierzynski, *et al*, 1994).

2.2 HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO

Los hidrocarburos se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente oceánico, atmosférico y terrestre, pero pueden o no haberse originado del petróleo; por lo que es difícil determinar el origen de los hidrocarburos en una muestra ambiental basada en su composición. Tal dificultad refleja las muy variadas fuentes y flujos de hidrocarburos, lo cual determina la magnitud y el rango de entrada de estas sustancias a un sector particular del ambiente (Botello, 1996). Las descargas y pérdidas de petróleo crudo o refinado forman parte de este flujo de material a través de la interacción de los procesos naturales e inducidos. Consecuentemente una evaluación ecotoxicológica del impacto de los hidrocarburos del petróleo en un sistema ambiental global, depende del conocimiento del balance de material y flujo de las operaciones petroleras y de las tasas de producción; ya que las operaciones petroleras incluyen una secuencia de pérdidas de material y conversiones químicas, con consecuentes descargas a diferentes compartimentos de la ecosfera (Connell y Miller, 1984).

2.2.1 Características y composición

Tanto el petróleo crudo como el refinado varían ampliamente en sus propiedades físicas y composición química, dependiendo de su origen y en el caso de los productos refinados, de la naturaleza del proceso de refinación. Estos factores también producen diferencias importantes en las propiedades ambientales tales como la solubilización, volatilización, oxidación fotoquímica y microbiológica y toxicidad biológica (Connell y Miller, 1984).

El número de los componentes individuales en los diferentes tipos de petróleos es muy grande (más de 100 compuestos diferentes)(Cole, 1994) y el dilema de interpretación se agrava, debido a la alteración del petróleo, ya sea por mecanismos fisicoquímicos (i.e., foto-oxidación, evaporación, dilución) o bien por efecto de los microorganismos que están presentes en el suelo. Así la composición química de los petróleos de las diferentes regiones productoras, y aún los provenientes de una misma región varían ampliamente, ya que contienen miles de diferentes compuestos químicos originados y ensamblados de manera distinta durante su diagénesis o formación geoquímica (Botello, 1996).

Los principales elementos que componen el petróleo son el Carbono (80-87 %) y el Hidrógeno (10-15%), aunque otros como el Azufre (0-10 %), Nitrógeno (0-1%) y el Oxígeno (0-5%) están presentes en cantidades menores ya sea en su forma elemental o bien como constituyentes heterocíclicos y grupos funcionales. También se reportan algunos metales traza como Vanadio, Níquel, Hierro, Aluminio y Cobre cuya concentración varía dependiendo del tipo de petróleo crudo y de la región donde se formó (Botello, 1996). En la tabla 1 se presenta la composición "promedio" de un petróleo crudo según Koons (1973).

Los petróleos crudos son clasificados de acuerdo a sus propiedades físicas o su composición química. La gravedad específica determina si son clasificados como ligeros, medianos o pesados. Los petróleos crudos también pueden ser separados en fracciones químicas de acuerdo con su punto de ebullición. La cantidad relativa de compuestos de las diferentes categorías son algunas veces usados para clasificar el petróleo (p. ej. , parafínico, nafténico, alto o bajo en azufre) (Botello, 1996).

Tabla 1. Composición típica de un petróleo crudo (Koons, 1973)

| Componente | Porcentaje |
|---|------------|
| Por tamaño molecular | |
| Gasolinas (C ₇ -C ₁₀) | 30% |
| Kerosenas (C ₁₀ -C ₁₂) | 10% |
| Destilados ligeros (C ₁₂ -C ₂₀) | 15% |
| Destilados pesados (C ₂₀ -C ₄₀) | 25% |
| Residuos pesados | 20% |
| Por composición | |
| Hidrocarburos saturados (Alcanos lineales y ramificados) | 30% |
| Hidrocarburos nafténicos (Cicloalcanos) | 50% |
| Hidrocarburos aromáticos | 15% |
| Compuestos polares (Nitrógeno, azufre, oxígeno) | 5% |

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son moléculas orgánicas no polares constituidas por dos o más anillos bencénicos íntimamente ligados o conectados en su estructura molecular, éstos pueden presentarse como no sustituidos o bien presentar una sustitución en un átomo de hidrógeno por grupos metilo. En la tabla 2 se dan algunas características de 31 HAP's de interés ambiental. Los compuestos van del naftaleno (C₁₀H₈, dos anillos) hasta el coroneno (C₂₄H₁₂, siete anillos); compuestos con nitrógeno, azufre y oxígeno son frecuentemente incluidos en la clasificación de los HAPs. Algunos miembros de estos compuestos han sido identificados por exhibir propiedades tóxicas/peligrosas (tabla 2); razón por la cual, la Environmental Protection Agency (EPA) ha incluido 16 HAP's en su lista de contaminantes prioritarios para ser monitoreados en efluentes industriales (Dzomback y Luthy, 1984). El petróleo crudo contiene de 0.2 a 7% de HAPs; el cual se incrementa con la gravedad específica del petróleo. En general los HAPs tienen baja solubilidad en agua, altos puntos de fusión y ebullición y baja presión de vapor. La solubilidad decrece, los puntos de ebullición y

fusión se incrementan y la presión de vapor decrece con el incremento en el peso molecular (Kalf, et al., 1997)

Tabla 2. Características estructurales, fisicoquímicas y biológicas de 31 HAPs* de interés ambiental.

| Compuesto | Peso Molecular | Formula Molecular | Número de anillos | Potencial Carcinogénico ^a | Solubilidad en agua µg/L | Enlistado como contaminante ^b |
|---------------------------|----------------|---------------------------------|-------------------|--------------------------------------|--------------------------|--|
| Naftaleno | 128 | C ₁₀ H ₈ | 2 | | 31700 | E |
| Acenaftileno | 152 | C ₁₂ H ₈ | 3 | | | E |
| Acenafteno | 154 | C ₁₂ H ₁₀ | 3 | | 3930 | E |
| Fluoreno | 166 | C ₁₃ H ₁₀ | 3 | -- | 1980 | E |
| Antraceno | 178 | C ₁₄ H ₁₀ | 3 | -- | 73 | E |
| Fenantreno | 178 | C ₁₃ H ₁₀ | 3 | -- | 1290 | E |
| Fluorantenos | 202 | C ₁₆ H ₁₀ | 4 | -- | 260 | E, W |
| Pireno | 202 | C ₁₆ H ₁₀ | 4 | -- | 135 | E |
| Benzo (a) fluoreno | 216 | C ₁₇ H ₁₂ | 4 | - | 45 | |
| Benzo (b) fluoreno | 216 | C ₁₇ H ₁₂ | 4 | - | 2 | |
| Benzo (c) fluoreno | 216 | C ₁₇ H ₁₂ | 4 | - | | |
| Benzo (a) antraceno | 228 | C ₁₈ H ₁₂ | 4 | + | 14 | E |
| Benzo (c) fenantreno | 228 | C ₁₈ H ₁₂ | 4 | ++ | | |
| Criseno | 228 | C ₁₈ H ₁₂ | 4 | ± | 2 | E |
| Trifenileno | 228 | C ₁₈ H ₁₂ | 4 | | 43 | |
| Benzo (g,h,i) fluoranteno | 226 | C ₁₈ H ₁₀ | 5 | - | | |
| Benzo (b) fluoranteno | 252 | C ₂₀ H ₁₂ | 5 | ++ | | E |
| Benzo (j) fluoranteno | 252 | C ₂₀ H ₁₂ | 5 | ++ | | W |
| Benzo (k) fluoranteno | 252 | C ₂₀ H ₁₂ | 5 | - | | E, W |
| Benzo (a) pireno | 252 | C ₂₀ H ₁₂ | 5 | +++ | 3.8 | E, W |

*Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

| Compuesto | Peso Molecular | Formula Molecular | Número de anillos | Potencial Carcinogénico* | Solubilidad en agua µg/L | Enlistado como contaminante ^b |
|--------------------------|----------------|---------------------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| Benzo (a) pireno | 252 | C ₂₀ H ₁₂ | 5 | - | 5.5 | |
| Perileno | 252 | C ₂₀ H ₁₂ | 5 | - | 0.4 | |
| Dibenz (a,c) antraceno | 278 | C ₂₂ H ₁₄ | 5 | + | | |
| Dibenz (a,h) antraceno | 278 | C ₂₂ H ₁₄ | 5 | +++ | 2.49 | E |
| Antantreno | 276 | C ₂₂ H ₁₂ | 6 | - | | |
| Benzo (g,h,i) pireno | 276 | C ₂₂ H ₁₂ | 6 | | 0.26 | E, W |
| Indeno (1,2,3-cd) pyreno | 276 | C ₂₂ H ₁₂ | 6 | + | | E,W |
| Dibenzo (a,h) pireno | 302 | C ₂₄ H ₁₄ | 6 | +++ | | |
| Dobenzo (a,i) pireno | 302 | C ₂₄ H ₁₄ | 6 | +++ | | |
| Dibenzo (a,l) pireno | 302 | C ₂₄ H ₁₄ | | ± | | |
| Coroneno | 300 | C ₂₄ H ₁₂ | 7 | - | 0.14 | |

*National Academy of Science (1992). - no carcinogénico; ± incierto; + carcinogénico; ++ y +++ fuertemente carcinogénico

^bLista de contaminantes en Environmental Protection Agency (E) y World Health Organization (W).

2.2.2 Los hidrocarburos del petróleo como contaminantes y su degradación

Como contaminantes, los hidrocarburos ocupan una posición intermedia entre altamente biodegradables, biogénicos y altamente recalcitrantes; ya que tienen un origen biológico, pero por procesos geoquímicos y después por refinamiento se alteran de una forma importante (Bartha, 1986). La fracción biodegradable puede ser transformada por microorganismos a una forma más estable. Mientras que la fracción recalcitrante tiene una alta resistencia a la biodegradación; sin embargo, la fracción persistente puede bajo condiciones específicas, de acuerdo al compuesto que se trate, sufrir una biodegradación (Wise y Trantolo, 1994).

Tanto en la tierra como en el mar, el nivel de descargas (afluentes, derrames, operaciones de limpieza, etc.) representa probablemente más del 90% de la contaminación total de hidrocarburos antropogénicos (Bartha, 1986). Los suelos en particular pueden recibir hidrocarburos como el petróleo crudo en lugares adyacentes a pozos de extracción o bien por fugas en los oleoductos; en tales lugares, los vegetales son afectados drásticamente y la agricultura puede llegar a ser imposible (Joergensen *et al.*, 1995).

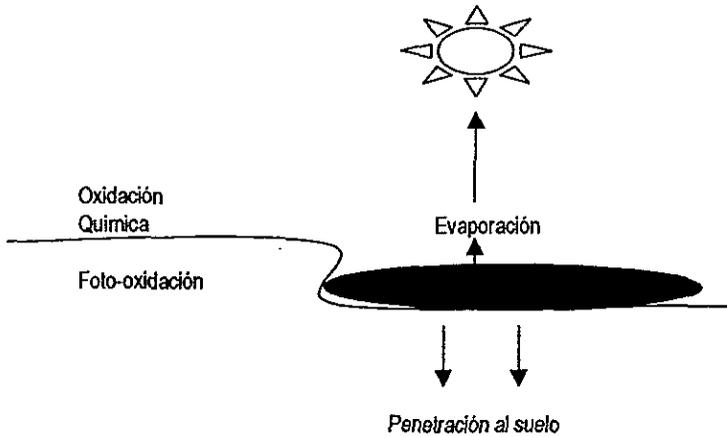
En el suelo los hidrocarburos están sujetos a una rápida infiltración vertical y a menos que esto se prevenga por un clima frío o por saturación de agua, la evaporación y la fotodegradación de hidrocarburos en el suelo es muy bajo, sólo cantidades del 1-2% del derrame (Bartha, 1986).

Antes de que ocurra un derrame de petróleo, aire y agua están distribuidos en los espacios intersticiales de las diferentes zonas del suelo en una relación directamente proporcional a la profundidad (la saturación se incrementa conforme aumenta la profundidad); sin embargo, después de que ocurre un derrame, los hidrocarburos del petróleo compiten con el agua y el aire por los espacios porosos. El vapor de los hidrocarburos puede rápidamente desplazar al aire, mientras que el volumen de los hidrocarburos líquidos compite con el agua por los espacios intersticiales disponibles (Cole, 1994).

Los hidrocarburos derramados, se mueven hacia abajo debido a la fuerza de gravedad; aunque puede ocurrir una migración horizontal debido a la fuerza de capilaridad entre el líquido derramado y las partículas del suelo (Fig. 2) (Cole, 1994).

La fotodegradación de los hidrocarburos es muy baja y los combustibles derivados del petróleo crudo son muy tóxicos para muchos organismos; sin embargo, para otros son aprovechables como sustrato, en particular en el caso de bacterias y hongos (i. e., *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*) (Wise y Trantolo, 1994). Las poblaciones bacterianas responden favorablemente a la adición, en el suelo, de parafinas, y otros hidrocarburos alifáticos derivados del petróleo, provocando que éstos sustratos vertidos en el suelo lleguen a desaparecer (Alexander, 1990).

Los contaminantes orgánicos, al ser alterados químicamente pierden con frecuencia su capacidad tóxica o la modifican. El petróleo crudo y sus productos de refinación empiezan a sufrir cambios en su composición al ser expuestos al aire, agua o a la luz solar (Fig. 3). Los componentes de bajo peso molecular se evaporan rápidamente, el porcentaje de evaporación varía de cerca del 10% en los derrames de petróleo de crudos pesados y productos refinados (Diesel No. 6) hasta más de 75% para crudos ligeros y productos refinados (Diesel No. 2, gasolina). Menos del 5% del petróleo crudo y productos refinados (principalmente aromáticos de bajo peso molecular) se disuelven en agua. Los hidrocarburos expuestos a la luz solar, al aire o al agua pueden ser transformados a compuestos polares oxidados (foto-oxidación) (Albers, 1995).



Destino Biológico

1. Degradación por los microorganismos del suelo
2. Metabolismo de las plantas
3. Metabolismo de los invertebrados del suelo

Figura 3. Diferentes destinos que pueden seguir los contaminantes orgánicos, como los hidrocarburos, derramados en la superficie del suelo (Albers, 1995).

Dado que el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos aromáticos, alifáticos y varios compuestos heterocíclicos, incluyendo compuestos que tienen el oxígeno, nitrógeno, y azufre en su estructura química, la mezcla puede ser fraccionada en una fracción saturada de alifáticos, una fracción de aromáticos y una fracción asfáltica o polar (Cole, 1994).

Dentro de los hidrocarburos de la fracción saturada se incluyen los n-alcenos, ramificaciones de alcanos y cicloalcanos (naftenos). En el proceso de degradación, el ataque inicial es sobre los alcanos de cadena corta, el cual se lleva a cabo por medio de tres mecanismos: (1) La cadena es atacada por una monooxigenasa, la cual introduce un átomo de oxígeno en el grupo metil terminal que da como resultado un alcohol primario, el cual es después oxidado a un aldehído y a un ácido graso (éste es uno de los mecanismos más frecuentes); (2) hay una deshidrogenación, lo que da como resultado un alqueno, que es metabolizado a alcohol primario, después a un aldehído y finalmente a un ácido graso no involucrado en el paso de la oxidación; (3) por último la formación de un hidroperóxido alquilo, el cual es convertido directamente a ácido graso, desviándose el paso de alcohol primario y aldehído. Cuando se ha formado el ácido graso, éste es metabolizado para dar lugar a la beta oxidación y llegar a la AcetilCoA. Los alcanos de cadena larga al ser degradados forman un alcohol secundario que surge de la oxidación y es metabolizado a cetona, por último ésta origina un éster (éster acetil). El éster produce un alcohol primario más un ácido graso (ácido acético). El alcohol primario es oxidado en forma directa a un aldehído y éste a su vez a un ácido graso análogo y del alcohol primario como el aldehído se produce la beta oxidación (Bouwer y Zehnder, 1993).

La degradación de cicloalcanos sustituidos ocurre más rápidamente que la degradación de las formas insustituibles, particularmente si hay un n-alcano sosteniendo adecuadamente una cadena larga. En tales casos el ataque microbiano normalmente ocurre primero en la porción sustituible, iniciando un producto intermediario de un ácido carboxílico ciclohexano o un compuesto relacionado. Estos hidrocarburos no presentan grupos metil terminales y son biodegradados por un mecanismo a la oxidación terminal. El grupo hidróxil es oxidado a un aldehído y un grupo carboxílico. El resultado es un ácido dicarboxílico que después es metabolizado por la beta-oxidación (Bouwer y Zehnder, 1993).

La degradación de compuestos aromáticos por bacterias normalmente implica la formación de un diol seguido por una división y formación de un diácido tal como el *cis-cis* ácido mucónico; el cual es metabolizado hasta llegar a Acetil-CoA y la otra vía por la que el anillo del catecol puede ser abierto es el "meta desdoblamiento" del cual resulta un grupo hidróxilo en el compuesto 2-cis-cishidroxi-semialdehído mucónico, el cual es metabolizado a ácido pirúvico más acetaldehído (Bouwer y Zehnder, 1993).

2.2.3 Análisis de Hidrocarburos en el suelo

La estructura heterogénea de la matriz del suelo complica la determinación analítica de los contaminantes en el mismo. La extracción de los contaminantes depende de varios factores, tales como las propiedades físicas y químicas de las sustancias, las características del suelo y la interacción entre ambos. Raramente el contaminante se encuentra uniformemente distribuido en el suelo. Dado que los hidrocarburos normalmente consisten de una mezcla de diferentes compuestos y el suelo también está constituido por diversos compuestos minerales y orgánicos, se pueden observar una variedad de efectos de absorción, solubilidad y polaridad. Dependiendo de la muestra a analizar, se han probado varias técnicas de extracción (Yeung *et al.*, 1994) siendo las más empleadas la extracción con equipo Soxhlet, el cual es un método eficaz para la extracción de hidrocarburos de muestras de suelo o matrices similares y la sonicación. Entre los métodos tradicionales para la cuantificación de los hidrocarburos totales del petróleo, se encuentra el método EPA 418.1 (EPA, 1983). Para la obtención y separación de los hidrocarburos del crudo, se han reportado el uso de extracciones líquido-líquido, y cromatografía de fluidos supercríticos, con excelentes recuperaciones, sin embargo, por razones de costo y de eficiencia, se prefiere el uso de cromatografía en columna empleando adsorbentes como la sílica gel, alúmina o mezclas de ambas. Las fracciones obtenidas son cuantificadas en cromatografía de gases con detector de ionización de flama, Cromatografía de gases/masas u otras técnicas alternas como Cromatografía de gases/extracción térmica (Grimmer, 1984; Pollard *et al.*, 1992; Dwijen y Murray, 1997).

2.3 PRUEBAS ECOTOXICOLÓGICAS

Desde su inicio, la Toxicología se interesó casi exclusivamente por el efecto de las sustancias químicas sobre el hombre y muy secundariamente, sobre algunos animales; es decir, ha sido una toxicología humana (Albert, 1990).

Muy recientemente, y sólo a causa de ese interés antropocéntrico, nos empezamos a preocupar por los efectos sobre el medio; naciendo así la toxicología ambiental, y posteriormente, en 1969 Truhaut introdujo el término "ecotoxicología" en el que el objetivo a preservar no es el género humano ni ninguna otra especie en forma aislada, sino el conjunto de elementos biológicos y no biológicos que integran un ecosistema (Duffus, 1983).

Según el belga Guido Persoone, experto en toxicología acuática, probablemente la mayor diferencia entre la toxicología humana y la ecotoxicología, al menos desde el punto de vista de aceptabilidad del riesgo, es que, para la ecotoxicología, la desaparición de unos pocos individuos en una población de plantas o animales no se considera generalmente de crucial importancia, en tanto que se mantengan las funciones propias de la población y la comunidad biológica en el ecosistema (Albert, 1990).

La ecotoxicología de los contaminantes es considerada como una secuencia de interacciones y efectos controlados por sus propiedades físicas y químicas. Un contaminante descargado al ambiente está sujeto a dispersión física en la atmósfera, agua o suelo, al mismo tiempo que puede ser químicamente modificado o degradado por procesos abióticos o con mayor frecuencia por organismos presentes en el ambiente; frecuentemente, los productos de la degradación pueden, por sí mismos, tener un impacto perjudicial mayor que el contaminante original. En algunos casos el ambiente puede ser modificado por los procesos de degradación más que por el contaminante en sí (Connell y Miller 1984).

Los organismos de diferentes niveles tróficos exhiben una variedad de reacciones ante las sustancias tóxicas introducidas en el ambiente. Tales reacciones, van desde las poco

significativas hasta efectos subletales, tales como la reducción en el crecimiento, en la tasa de reproducción, efectos en el comportamiento o finalmente efectos letales (Salanitro *et al*, 1997).

El concepto de toxicidad se refiere a la propiedad de una sustancia de producir un efecto dañino sobre un organismo. Si la toxicidad es aguda, en el término está implícita la muerte del organismo a causa del deterioro producido por la sustancia tóxica. Si la toxicidad es crónica, podrá sobrevivir hasta que se rebase el límite de su capacidad homeostática (Duffus, 1983). Para que el tóxico produzca tales efectos debe ser incorporado al organismo; ya que los grados de toxicidad están en función de los niveles que alcance en los tejidos del organismo; estos niveles se relacionan con la concentración del compuesto en el medio, lo cual depende tanto del tipo de contaminante como del organismo y del tiempo de exposición (Duffus, 1983).

El estudio de las características ecotóxicas de un producto, se viene haciendo mediante la exposición al tóxico, durante diferentes periodos de tiempo, de determinadas especies que se consideran indicadores por su escasa o gran sensibilidad; de las cuales, las más utilizadas en el medio terrestre son lombrices de tierra (*Eisenia spp* y *Lumbricus spp*), plantas (*Oryza sativa*, *Avena sativa*, *Triticum aestivum*, *Phaseolus spp* y *Lactuca sativa*, etc.) y colémbolos (*Folsomia candida* y *Heteromurus nitidus*). Se han propuestos numerosos ensayos *in vivo* o *in vitro*, incluso con el empleo simultáneo de varias especies (ensayos multiespecies), que solo consideran dos variables: concentración del tóxico y tiempo de exposición (Beyer y Greg, 1995).

La evaluación más común de la toxicidad es la medida de la letalidad a corto plazo. Para una sustancia dada, esta medida implica la determinación de la concentración media que es letal para una proporción fija, de ordinario el 50% de una población de organismos de prueba después de la exposición continua durante un tiempo fijo (CL_{50}). Además de la CL_{50} , pueden usarse otros parámetros en los estudios de la letalidad a corto plazo. Por ejemplo, la dosis letal mínima (DLM), que es la dosis que mata como mínimo un organismo de la población de prueba a lo largo del periodo de prueba. Esta puede denominarse DL1. También puede determinarse, como Pham-Huu-Chanh ha sugerido, la dosis máxima nunca fatal en 24h (DMNF) y la dosis mínima siempre fatal en 24h (DMSF), que es la dosis mínima que causa el 100% de mortalidad en este tiempo (Duffus, 1983).

La medida de la letalidad a corto plazo es un aspecto de la evaluación de la toxicidad aguda, la cual es definida como "los efectos adversos totales producidos por una sustancia tóxica cuando se administra en forma de dosis única" (Duffus, 1983).

2.3.1 Uso de microorganismos en pruebas de toxicidad

Los microorganismos juegan un papel importante en el flujo de nutrientes en los ecosistemas y son ubicuos en la naturaleza; además de ser utilizados en procesos de tratamiento de desechos municipales e industriales y en biorremediación. Por lo anterior, es esencial evaluar el impacto de los químicos en estos organismos para un mejor entendimiento y diseño de los diferentes procesos de tratamiento (Regno *et al.*, 1998).

Las pruebas de toxicidad microbiana tienen la ventaja de ser rápidas y fáciles en comparación de otras pruebas con organismos superiores debido principalmente al ciclo de vida tan corto de los microorganismos y a la posibilidad de observar efectos tóxicos sobre varias generaciones en un marco de tiempo limitado y las altas concentraciones de tóxicos que pueden ser empleadas (Bitton y Koopman, 1986). Las pruebas microbiológicas han experimentado suficientes evaluaciones y refinamientos, siendo ahora ampliamente usadas en pruebas de toxicidad. También, son reproducibles y consideradas como confiables (Liu, 1985).

Considerables investigaciones se han llevado a cabo para evaluar los efectos tóxicos de los químicos en organismos del suelo (Hatzinger y Alexander, 1985; Joergensen *et al.*, 1995; Kwan y Dutka, 1992; Liu y Strachan, 1981; Mahendru y Dubey, 1987; Nichols *et al.*, 1997; Nirmalakhandan *et al.*, 1994; Regno *et al.*, 1998; Rönnpapel *et al.*, 1995; Zemanek *et al.*, 1997).

Los diferentes métodos incluyen la evaluación de los efectos de los compuestos químicos en el número de organismos por conteo directo; la diversidad o composición de organismos; producción de biomasa y actividad microbiana (Bartha, 1982).

La medición de la actividad microbiana, es un método directo, ya que un incremento o decremento en la actividad microbiana del suelo puede ser correlacionado con factores

ecológicos externos; lo que la hace una metodología valiosa en la evaluación de la toxicidad del suelo (Regno et al., 1998).

La actividad enzimática es un indicador directo de la actividad microbiana, ya que muestra el potencial de los microorganismos del suelo para degradar compuestos orgánicos así como xenobióticos, y puede indicar el efecto dañino de los tóxicos en las poblaciones microbianas del suelo (Zemanek et al., 1997). El estudio de la actividad enzimática en los suelos, se uso en un principio como un "índice de fertilidad" de los suelos. Sin embargo, estudios subsecuentes mostraron que no habla relación entre la actividad enzimática del suelo y el rendimiento de las cosechas (Bitton y Koopman, 1986). Las contradicciones en algunas de las investigaciones llevadas a cabo, podrían ser debidas a la localización de las enzimas en el suelo. Algunas de las enzimas son asociadas con las células vivas; mientras que otras se encuentran asociadas con arcillas y coloides húmicos, las cuales pueden persistir por largos periodos en el suelo después de la muerte celular. Las enzimas intracelulares, como las deshidrogenasas, son los mejores indicadores de la actividad biológica en suelos y agua; consecuentemente, pueden ser excelentes indicadores del efecto inhibitorio de las sustancias tóxicas. (Bitton y Koopman, 1986).

Mahendru y Dubey (1987), para determinar la actividad bacteriana en el suelo, usaron la respiración, el conteo bacterial viable y la actividad deshidrogenasa. Encontrando una correlación positiva entre la respiración del suelo y el número de colonias de bacterias y entre la respiración del suelo y la actividad deshidrogenasa. Si bien la determinación de la actividad enzimática en suelos es una efectiva, rápida y barata forma de medir la toxicidad, los autores recomiendan que la actividad deshidrogenasa se use en conjunto con mediciones respirométricas del suelo y enumeración de células microbiales (Regno et al., 1998).

Por su parte, Liu y Strachan (1981) desarrollaron una prueba de toxicidad rápida, basada en la reducción de la rezasurina por la deshidrogenasa bacteriana usando una mezcla de bacterias como organismos de prueba. Liu (1989), propuso el uso de *Bacillus cereus* para pruebas de toxicidad en suelo, por ser un organismo típico del suelo y tener una alta afinidad para adherirse a las partículas del mismo. Rönnpagel et al., (1995) retomaron la técnica propuesta por Liu y

Strachan (1981) y modificada por Liu (1989) y compararon la sensibilidad de la prueba tanto si las bacterias entraban en contacto directo con la muestra o con un extracto acuoso de la misma; así como los bioensayos utilizando *B. cereus*, con bioensayos de Microtox en fase sólida y con extractos acuosos de la muestra; resultando la prueba de contacto con *B. cereus* la más sensible a los compuestos químicos utilizados.

2.3.1.1 Efecto de los contaminantes en los microorganismos

Se han propuesto numerosos mecanismos por los cuales los tóxicos inhiben y eventualmente matan a las bacterias. Entre los más importantes se tienen los que pueden causar daño al material genético o provocar la desnaturalización de las proteínas, como por ejemplo, los compuestos halogenados. Otros compuestos pueden causar el rompimiento de las membranas celulares bacterianas (i. e. el fenol y los compuestos cuaternarios de amonio), resultando en la pérdida de proteínas, ADN, ARN, y otros materiales orgánicos (Bitton y Koopman, 1986).

Una acción subletal de los contaminantes es su habilidad para bloquear quimiorreceptores bacterianos, lo cual puede llevar a la inhibición de procesos de descomposición orgánica y de autopurificación. Uno de los efectos más importantes de los tóxicos sobre las bacterias, es la inhibición de la actividad enzimática (Bitton y Koopman, 1986).

2.3.2 Uso de plantas en pruebas de toxicidad

Las pruebas de fitotoxicidad son usadas como parte de una batería de prueba para la evaluación de sitios contaminados. Cuando se realizan trabajos de remediación o recuperación de suelos contaminados, las pruebas pueden ser usadas para asegurar la limpieza del sitio (Wang, 1991). Las pruebas ecotoxicológicas han sido desarrolladas para obtener una evaluación extensiva sobre la compatibilidad de sitios evaluados o remediados, con la flora y fauna. Los efectos fitotóxicos observados en suelos remediados podrían mostrar metabolitos tóxicos que no serían evidenciados por un análisis fisicoquímico (Vorhef y Van Gestel, 1995).

La Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OCDE) ha desarrollado guías de prueba para determinar los posibles efectos de sustancias químicas sólidas o líquidas incorporadas al suelo en la germinación de semillas y estadios tempranos de desarrollo en una variedad de plantas terrestres después de una única aplicación. En este punto existe un amplio rango de especies de plantas recomendadas por diferentes organizaciones. Especies tales como arroz, frijol de soya, fenugreco, cebolla, rábano, lechuga son mencionados en la guía de pruebas de la OECD para pruebas de crecimiento de plantas terrestres. Las especies de plantas más usuales recomendadas por la Environmental Protection Agency (EPA, 1982), la Food and Drug Administration (FDA, 1987) y la Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 1984) para las pruebas de germinación de semillas y elongación de raíz son: calabaza, lechuga, rábano. Otras especies de plantas que han sido sugeridas por la EPA y la FDA son la avena, maíz, zanahoria, frijol de soya, frijol y trigo (Tabla 2).

Tabla 2. Especies vegetales recomendadas por diferentes agencias para pruebas de fitotoxicidad.

| EPA | FDA ^a | | OECD ^b | |
|-----------|------------------|---|-------------------|---|
| - | frijol | D | Frijol (mungo) | 3 |
| Col | Col | D | Col (china) | 2 |
| Zanahoria | Zanahoria | D | - | |
| Cebolla | - | | - | |
| Maíz | Maíz | M | - | |
| - | - | | Berro | 3 |
| Calabaza | Calabaza | D | - | |
| - | - | | Fenugreco | 3 |
| Lechuga | Lechuga | D | Lechuga | 3 |
| - | - | | Mostaza | 2 |
| Avena | Avena | M | Avena | 1 |
| - | - | | Nabo gallego | 2 |
| - | - | | Rábano | 2 |
| - | - | | Clavo rojo | 3 |
| - | - | | Arroz | 1 |
| Centeno | Centeno | M | Centeno | 1 |
| - | - | | Sorgo | 1 |
| Soya | Soya | D | - | |
| Tomate | Tomate | D | - | |
| - | - | | Nabo | 2 |
| - | - | | Arveja | 3 |
| - | Trigo | M | Trigo | 1 |

^a La FDA divide las especies en mono y dicotiledoneas, que se muestran como M y D en la tabla.

^b La OECD enlista las especies en categorías 1, 2 y 3 y recomienda usar una de cada categoría.

Los protocolos de prueba mejor desarrollados para plantas terrestres son las pruebas de laboratorio para la germinación de semillas, emergencia, elongación de raíz y crecimiento vegetativo (Vorhef y Van Gestel, 1995). Las pruebas de fitotoxicidad deben ser incluidas como parte de la batería de prueba en orden de un desarrollo comprensivo del perfil de toxicidad de un químico específico, pesticidas, efluentes o sitios contaminados (Wang, 1991).

2.3.2.1 Efecto de los hidrocarburos sobre el desarrollo de las plantas

Los hidrocarburos que se encuentran contaminando el suelo, generalmente tienen un efecto negativo en las comunidades vegetales. El modo en que los hidrocarburos actúan sobre las plantas es complejo e incluye el contacto tóxico directo y efectos deletéreos indirectos mediados por las interacciones de los hidrocarburos con los componentes abióticos y microbianos del suelo (Bossert y Bartha, 1984). El contacto tóxico ocurre primeramente por el efecto solvente de los hidrocarburos de bajo punto de ebullición, sobre la estructura de las membranas lipídicas de las células. La toxicidad de los hidrocarburos disminuye en el siguiente orden: monoaromáticos > olefinas > naftalenos > parafinas. Dentro de cada clase, la toxicidad es posiblemente correlacionada con el incremento del peso molecular e inversamente correlacionada con el incremento de la polaridad. El efecto indirecto de los hidrocarburos en el suelo, incluye una disminución en la cantidad de oxígeno disponible para las raíces de las plantas, debido al exhaustivo uso del oxígeno del suelo por los microorganismos para la degradación de los hidrocarburos. Tales condiciones anóxicas favorecen la producción microbiana de compuestos fitotóxicos como el H_2S . Los microorganismos degradadores de hidrocarburos, también compiten con las plantas por los nutrientes minerales. Además de que el petróleo también afecta la estructura física del suelo, disminuyendo su capacidad para almacenar agua y aire (DeJong, 1986).

Por otra parte, los intermediarios metabólicos de la degradación microbiana de los hidrocarburos podría temporalmente incrementar la toxicidad de los mismos; ya que muchos de los productos de la degradación incompleta poseen características fitotóxicas, entre los que se incluyen ácidos grasos, fenólicos y terpenoides (Stevenson, 1966 en Wang y Bartha, 1994).

Las plantas que crecen en suelos contaminados por hidrocarburos pueden presentar síntomas similares al efecto de la sequía, debido a que alrededor de la raíz se forma una película grasosa que impide la entrada de agua; ésto no sucede con todas las especies de plantas, se sabe que las gramíneas pueden adaptarse mejor a las condiciones mencionadas anteriormente y crecer sin muchos problemas (Anderson *et al.*, 1993). El agua representa un papel esencial en los procesos metabólicos y fisiológicos de las plantas, así como el transporte de sustancias y en el mantenimiento de la turgencia; una deficiencia de este elemento limita el crecimiento y desarrollo de la planta llegando al grado de aniquilarla en condiciones muy drásticas (Arnon, 1972).

El estrés hídrico afecta diversos procesos anatómicos, morfológicos, fisiológicos y bioquímicos, en algunas etapas de crecimiento de las plantas. Los efectos pueden ser una disminución en el crecimiento de las hojas, en el rendimiento del grano, en el rendimiento de la materia seca, en la fotosíntesis, en la transpiración, cierre estomático, decremento de la concentración interna de CO₂, reducción del área foliar, reducción de síntesis de ATP (Hsiao, 1973; Kramer, 1983). El estrés hídrico también es usualmente acompañado por una disminución de citocininas en los exudados de la raíz lo que aparentemente se manifiesta en una interferencia en la síntesis de proteínas y ARN. La translocación de los carbohidratos a través del floema disminuye también como respuesta a la sequía (Kramer, 1983).

Hsiao *et al.* (1976) propusieron que el crecimiento celular es probablemente el proceso más sensible debido al déficit hídrico causado por la disminución de turgencia, la cual es indispensable para el alargamiento celular. El efecto anterior se refleja en la reducción del área foliar. La disminución en la humedad del suelo produce un cambio estomático y de transpiración, un efecto en la conductancia estomática de la hoja y en el aparato fotosintético.

La actividad fotosintética disminuye cuando el potencial de agua es limitante debido en parte al cierre estomático y en algunos casos al efecto directo en los cloroplastos. El contenido de clorofila en las plantas también disminuye a causa del estrés hídrico presentado en las plantas. Hsiao *et al.* (1976) afirmaron que la reducción en el potencial de agua redujo la acumulación de clorofila en hojas etioladas debido a la inhibición en la formación de protoclorofila.

La raíz de las plantas absorbe los contaminantes orgánicos, los cuales pueden ser confinados en los tejidos de la planta en formas biológicamente menos disponibles. Otro proceso que se ha observado en la extracción de un contaminante orgánico del suelo por plantas, es la acumulación en la raíz, la translocación al xilema y la subsecuente volatilización de la superficie de las hojas. Un contaminante orgánico presente en el suelo, puede ser degradado o mineralizado por las plantas o por los microorganismos asociados a ellas; pues aunque las plantas tienen una significativa actividad metabólica tanto en la raíz como en el tallo, la inherente habilidad de las plantas puede ser aumentada por la actividad de las comunidades microbianas que se encuentran alrededor de la raíz, en los tejidos de la raíz, en el torrente del xilema, en el tejido de hojas y tallo y en la superficie de las hojas (Anderson *et al.*, 1993).

2.3.3 Uso de lombrices de tierra en pruebas de toxicidad

Las lombrices de tierra (Annelida: Oligochaeta), poseen cualidades necesarias para biomonitorizar ecosistemas terrestres contaminados. Entre las más importantes se encuentran: tamaño corporal grande, tamaño poblacional alto, fáciles de coleccionar e identificar, su relativa inmovilidad en el suelo, su estrecho contacto y alto consumo del sustrato proveen las propiedades óptimas para un bioindicador (Heimbach, 1992).

Eisenia foetida es la especie más usada en los ensayos para la evaluación ecotoxicológica de suelos. Tiene un amplio rango de tolerancia de pH, temperatura y humedad. Fue descubierta en California en 1954, presenta una distribución cosmopolita, es de un color rosa intenso, tiene una longevidad aproximada de 16 años, y una fecundidad de 1 500 lombrices/año.

Las normas de la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD, 1984) y la European Economic Community (EEC, 1985), recomiendan a *Eisenia foetida* y *E. andrei* como organismos de prueba, debido a que ambas especies son comúnmente encontradas en compostas y puede ser fácilmente cultivadas en el laboratorio en un sustrato de estiércol de caballo o vaca (OECD, 1984). Son tres las pruebas de toxicidad aguda que se emplean con mayor frecuencia. Una es la prueba de contacto con papel filtro (OECD, 1984), en la que las lombrices de tierra adultas de las especies *Eisenia* spp. son expuestas a un papel filtro

empapado con una solución de la sustancia de prueba. La mortalidad es evaluada, y se obtiene la CL_{50} a las 48 horas cuyo valor es expresado como μg por cm^2 . Este método ha demostrado ser rápido, fácil y reproducible (Edwards, 1983). Sin embargo, autores como Heimbach (1984) demostró que esta prueba no permite obtener valores predictivos de los efectos de los tóxicos sobre las lombrices en el suelo.

La segunda prueba emplea un suelo constituido artificialmente (OECD, 1984 a), en la cual los adultos de *Eisenia* spp. son expuestos al químico de prueba mezclado con un sustrato de suelo artificial durante 14 días. La mortalidad es el único parámetro, y el valor de la CL_{50} es expresado como mg por Kg de suelo seco. Van Gestel y Ma (1990) demostraron que los resultados obtenidos en el suelo artificial, pueden ser fácilmente trasladados al suelo natural; por esta razón el uso de suelo artificial es aceptable, además de que se obtienen valores predictivos con respecto a los efectos que ocurren en el campo (Heimbach, 1992; Van Gestel, 1992).

La tercera prueba es la propuesta por Ferrière *et al.* (1981), cuya única diferencia con la anterior es que las lombrices adultas de la especie *Eisenia* spp son expuestas al químico de prueba mezclado con un sustrato amorfo de sílica gel llamado Artisol. La prueba dura catorce días y la sobrevivencia es el único parámetro de prueba, expresado en términos de la CL_{50} .

2.3.3.1 Efectos de los contaminantes orgánicos sobre la lombriz de tierra

Las pruebas de toxicidad aguda con lombrices de tierra, solo proveen información concerniente a la mortalidad, la cual usualmente ocurre después de dos semanas; en contraste, las pruebas de toxicidad crónica han sido capaces de detectar desordenes fisiológicos a diferentes concentraciones de contaminantes durante un tiempo prolongado. Entre los efectos observados, se encuentra la disminución en la producción de huevos y en la eclosión de los mismos, pérdida de la tonicidad del cuerpo y desordenes en el comportamiento (Abdul Rida y Bouché, 1997).

Autores como Neuhauser y Callahan. (1990), observaron una reducción en el peso final y en la producción de huevos, así como efectos neurotóxicos en *E. Foetida*, debido a la exposición de los organismos a diferentes concentraciones de contaminantes orgánicos. Bauer y Römbke (1997), observaron además una pérdida en la coordinación de movimientos y parálisis.

Entre las características que afectan el impacto de los contaminantes sobre las lombrices se incluyen: la ruta de exposición, la solubilidad en agua, la volatilidad, el coeficiente de partición octanol/agua y la capacidad de adsorción del suelo. Un suelo con bajo contenido de humedad puede disminuir la toxicidad de algunos químicos, debido a la adsorción competitiva de los coloides de la arcilla o de la materia orgánica (Santer, 1997).

3. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

3.1 OBJETIVOS GENERALES

- Determinar la concentración de hidrocarburos totales, alifáticos y aromáticos contenidos en una muestra de suelo obtenida en una zona con influencia petrolera y relacionarlo con las características edafológicas de la misma.
- Evaluar la toxicidad de una muestra de suelo contaminada con hidrocarburos, mediante bioensayos de toxicidad aguda, utilizando diferentes especies de organismos.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Montaje y aplicación de técnicas para caracterización y análisis fisicoquímico de suelos contaminados con hidrocarburos.
- Montaje y aplicación de técnicas cromatográficas para la determinación de hidrocarburos presentes en suelo.
- Montaje y aplicación de bioensayos con bacterias (*Bacillus cereus*), para la evaluación del nivel de toxicidad prevaleciente en suelos contaminados con hidrocarburos
- Montaje y aplicación de bioensayos con plantas terrestres (*Phaseolus vulgaris*, *Zea mays* y *Triticum aestivum*), de acuerdo con la guía de la OECD (1984), para la evaluación del nivel de toxicidad prevaleciente en suelos contaminados con hidrocarburos
- Montaje y aplicación de ensayos de toxicidad con lombrices de tierra (*Eisenia foetida*), de acuerdo con la guía de la OECD (1984), para la evaluación del nivel de toxicidad prevaleciente en suelos contaminados con hidrocarburos.

3.3. ESTRATEGIA DE TRABAJO

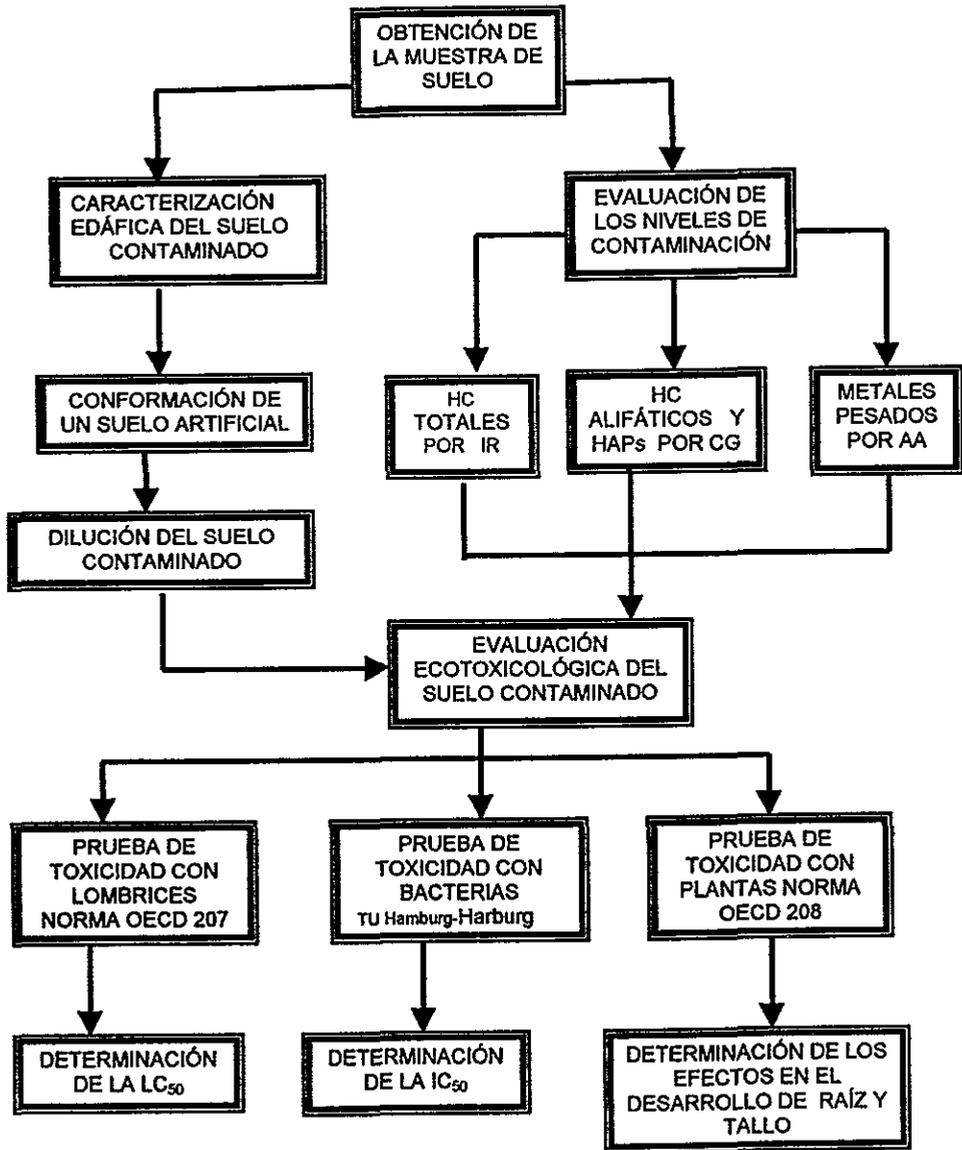


Figura 4. Diagrama que muestra la estrategia de trabajo empleada, para cumplir con los objetivos planteados

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE SUELO

El suelo fue colectado en terrenos de la refinería "Lazaro Cardenas" en Minatitlán, Veracruz, en la zona conocida como pantano de Santa Alejandrina. El muestreo fue realizado según la USDA-SCS (1986), eligiendo varios puntos al azar y conformando una muestra compuesta; dicho muestreo fue realizado por el Instituto Mexicano del Petróleo y la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Una vez que la muestra estuvo en el laboratorio, se procedió a su homogeneización y se mantuvo en refrigeración a 4 °C (cero biológico). Para la determinación de parámetros físico y químicos se secaron 2 Kg de suelo a temperatura ambiente; mientras que para la evaluación toxicológica el suelo se utilizó húmedo, haciendo las correcciones pertinentes con el valor de peso seco obtenido.

4.2 CARACTERIZACIÓN EDÁFICA DEL SUELO CONTAMINADO

Es muy importante conocer las propiedades y características físicas y químicas del suelo (tabla 4), tales como pH, tamaño de partículas, textura, porcentaje de humedad, capacidad máxima de retención de agua, densidad, contenido de materia orgánica, nutrientes: N (NH_4 , NO_3) P, K y determinación de metales pesados, ya que de todo ello depende el flujo de los contaminantes en el suelo, así como la disponibilidad que éstos tengan para los organismos que habitan normalmente el mismo.

Determinación de pH en el suelo (Reyes Jaramillo, 1996)

Para la determinación del pH, se colocaron 10g de suelo dentro de un vaso de precipitado, al que se adicionó 25 ml de una solución de CaCl_2 0.01M y se homogenizó por dos horas. Posteriormente se obtuvo la medida utilizando un electrodo sensitivo a los iones H^+ (potenciometro WTW).

Tabla 4. Parámetros y métodos empleados para su determinación en la caracterización edafológica del suelo.

| Tipo de análisis | Método empleado |
|------------------|--|
| pH | Potenciométrico (Reyes Jaramillo, 1996) |
| Color | Tablas de Munsell (1990) |
| Densidad real | Pícnométrico (Reyes Jaramillo, 1996) |
| Espacio poroso | A partir de densidad real y aparente |
| Nitrógeno | Kjeldahl (Jackson, 1976) |
| Fósforo | Bray-I (1945) (Reyes Jaramillo, 1996) |
| Textura | Hidrómetro de Bouyoucos (1962) |
| Materia orgánica | Walkley y Black (1934) (Reyes Jaramillo, 1996) |

Determinación del color del suelo (Tablas de Munsell, 1990)

El color del suelo se obtiene por comparación de las tablas de color Munsell, las cuales permiten unificar la denominación del color. Las tablas de color Munsell consisten en diferentes cuadros coloreados (243), distribuidos en tarjetas desmontables; el arreglo que presentan esta hecho con base en las tres variables que se combinan para dar cualquier color: matiz, brillo e intensidad.

Determinación del tamaño de las partículas y textura (Método de Bouyoucos, 1963)

El método del hidrómetro fue calibrado en 1926 por Bouyoucos, quien determinó que, en condiciones normales, después de 40 segundos todas las partículas mayores de 0.5 mm de diámetro se sedimentarán, de tal manera que no tendrán ninguna influencia sobre el hidrómetro. Las lecturas que se hacen una hora después de iniciada la sedimentación corresponden a partículas mayores que 5 micras, y luego de dos horas se sedimentan las partículas mayores que dos micras y sólo quedan en suspensión las arcillas y partículas con un diámetro inferior a dos micras.

El procedimiento se lleva a cabo pesando 55 g de suelo previamente secado al aire y tamizado, el cual se puso en un vaso de Berzelius al que se agregó inicialmente 20 ml de una solución de peróxido de hidrógeno al 30 % y se colocó a baño María sin exceder los 60 °C y se siguió agregando peróxido de hidrógeno durante los siguientes 20 días, hasta la completa destrucción de la materia orgánica, indicada por la desaparición de las burbujas. Se dejó secar el suelo y se

pesaron 50 g que se colocaron en un batidor eléctrico al que se agregaron 10 ml de hexametáfosfato de sodio y 10 ml de oxalato de sodio, se adicionó agua destilada y se agitó durante 15 minutos para posteriormente pasarlo a una probeta de 1000 ml y se aforó con agua destilada. Se agitó un minuto con el agitador manual para homogenizarla. Se dejó reposar durante 40 segundos y se tomó la primera lectura con el hidrómetro. Se dejó reposar dos horas y se hizo la segunda lectura. Cada vez que se hizo una lectura, se tomó nota de la temperatura.

El porcentaje de partículas se calcula siguiendo las siguientes formulas:

$$\% \text{ de limos} + \% \text{ de arcillas} = \frac{1^{\text{a}} \text{ lectura (40')} \times 100}{\text{g de suelo}}$$

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

$$\% \text{ de arcillas} = \frac{2^{\text{a}} \text{ lectura (120')} \times 100}{\text{g de suelo}}$$

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

Cálculo del % de humedad (Reyes Jaramillo, 1996)

Se colocaron 10 g de suelo en crisoles a peso constante. Esto se hizo colocando los crisoles en la estufa a 105 °C por 24 h y se dejaron enfriar en un desecador. Posteriormente se les adiciono el suelo y se colocaron en la estufa a 105 °C por 24 h, se dejaron enfriar en el desecador para pesarse nuevamente en una balanza analítica.

La pérdida de peso por la humedad del suelo se determina matemáticamente de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Humedad} = [(W_i - W_f) / W_i] \times 100$$

W_i = Peso inicial de la muestra del suelo

W_f = Peso final del suelo

Determinación de la densidad real (Reyes Jaramillo, 1996)

Para llevar a cabo esta determinación, se lavaron y secaron los picnómetros a 105 °C/1h. Se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron, anotando fracciones de diezmilésima de gramo. Posteriormente se pesaron 5 g de suelo seco y tamizado por malla de 2 mm de abertura. Se lleno con agua destilada hervida y fría un tercio del volumen del picnómetro, desalojando el aire que se

podiera formar de la suspensión agua-suelo. Se dejó reposar 30 minutos y se procedió a llenar con agua a su totalidad incluyendo el capilar del tapón teniéndose especial cuidado de no derramar nada. A continuación, se pesó nuevamente el picnómetro, con lo cual se obtuvo el peso del agua más el peso del suelo; contando con éstos datos, se deshecho el contenido del picnómetro y se enjuagó para llenarlo con agua hasta que subió por el capilar y se pesó nuevamente.

La densidad de las partículas se calculó con la siguiente fórmula:

$$DR = \frac{S}{S+A - (S+a)}$$

En donde: S = peso del suelo
A = peso del agua
S+a = peso del suelo + peso del agua

Determinación del espacio poroso del suelo (Reyes Jaramillo, 1996)

Para obtener el porcentaje de porosidad se determinaron primero los valores de la densidad aparente (DA) y de la densidad real o de las partículas (DP) del suelo, sustituyendo los valores de la siguiente relación:

$$\text{Espacio poroso (\%EP)} = 100 - \left[\frac{DA}{DP} \right] \times 100$$

Determinación del contenido de materia orgánica (Walkley y Black 1934)

La determinación de materia orgánica se hizo de manera indirecta a partir de la determinación de carbono orgánico total siguiendo la metodología propuesta por Walkley y Black, la cual comprendió la combustión de la materia orgánica de una muestra de 0.1 g de suelo (seco y tamizado a 0.5 mm) con una solución de dicromato de potasio y ácido sulfúrico concentrado, los cuales al entrar en contacto producen una temperatura de 125 °C. Se dejó reposar por espacio de 30 minutos, al cabo de los cuales se agregaron 250 ml de agua y 10 ml de ácido fosfórico. El dicromato que queda después de la oxidación se tituló con sulfato ferroso y en lugar de usar un indicador (Difenilamina) como lo proponen Walkley y Black, se hicieron mediciones potenciométricas. El punto de equilibrio se calculó por el método del paralelogramo.

El contenido de carbono orgánico del suelo se obtuvo de la siguiente manera:

$$\%C = M \times \frac{V1 - V2}{S} \times 0.39$$

En donde

M = Molaridad del sulfato ferroso

V1 = ml de sulfato ferroso requeridos para el blanco

V2 = ml de sulfato ferroso requeridos para la muestra

S = peso de la muestra en gramos

La conversión de % de carbono a % de materia orgánica se hizo empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de materia orgánica} = 1.9 \times \% \text{ de carbono}$$

Determinación de Fósforo disponible (Bray-1,1945)

Para esta determinación, se siguió el método de Bray P-1, el cual ha sido ampliamente usado como un índice de fósforo disponible en los suelos. La mezcla de HCl y NH_4F tiene como finalidad remover las formas de fósforo fácilmente solubles en medio ácido, en gran parte de los fosfatos de calcio y una proporción de los fosfatos de aluminio y de hierro. El NH_4F disuelve los fosfatos de aluminio y de hierro al formar un ión complejo con estos iones metálicos en solución ácida. En general, este método ha sido más exitoso en los suelos ácidos.

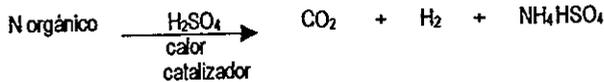
Se pesó 1.0 g de suelo secado al aire y cernido con un tamiz de 2mm y se colocaron en una botella de extracción, en donde se añadieron 20 ml de una solución extractora (mezcla de HCl 0.025 N y NH_4F 0.03N) y se agitó vigorosamente por 5 minutos. Después de agitar, se filtró utilizando papel filtro Whatman No. 2. Se transfirieron 2 ml del extracto a un tubo al que se añadieron 8 ml de una solución de sulfuro-molibdato y ácido ascórbico-L, mezclando perfectamente. Después de 10 minutos, se midió la intensidad del color (%T) a 882 nm.

Se preparó una curva estándar incluyendo 2 ml de la solución extractora en un rango de 0.1 a 1 μg de P por ml. Los cálculos se hicieron de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Ppm de P en suelo} = \text{ppm de P en solución} \times 35.$$

Determinación de Nitrógeno total (Jackson, 1976)

El procedimiento Kjeldahl es el más usado en la determinación de nitrógeno en suelos. Existen de él versiones macro, semi-micro y micro adaptados a varias circunstancias y condiciones, pero todas ellas constan de dos pasos bien definidos: la digestión de la muestra y la evaluación del amonio. La relación generalizada del procedimiento Kjeldahl se representa en la siguiente ecuación:



Para llevar a cabo esta determinación, se pesó 1 gramo de suelo previamente tamizado a través de malla 60 y se colocó en un frasco micro-Kjeldahl seco, al que se adicionaron 1.1 g de mezcla de catalizadores K_2SO_4 , 3 ml de H_2SO_4 , para después colocarse en la unidad digestora a temperatura media alta hasta que el digestado se tomó claro; a partir de este momento se dejó ebullición la muestra por una hora. Una vez que se completó esta etapa, se agregaron 20 ml de agua al frasco, para poner en suspensión el digestado. Se dejaron decantar las partículas de sílice. El contenido líquido se transfirió a la cámara de destilación del aparato de destilación por arrastre de vapor. Se colocaron 10 ml de NaOH 10 N en el fondo de la cámara de destilación. Se destiló hasta coleccionar 75 ml de destilado.

Se determinó el nitrógeno amoniacal presente en el destilado titulando con H_2SO_4 0.01 N y realizando los siguientes cálculos:

$$\%N = \frac{(V_m - V_b) \times N \times 14}{P \times 100}$$

Donde:

- V_m = Volumen de H_2SO_4 empleado en titular la muestra
- V_b = Volumen de H_2SO_4 empleado en titular el blanco
- N = Normalidad exacta de ácido sulfúrico
- 14 = Peso equivalente del nitrógeno
- P = Peso de la muestra expresado en gramos
- 100 = Factor para convertir a porcentaje

Conformación de un suelo artificial

Para evaluar la toxicidad de la muestra de suelo contaminado, fue necesario conformar un suelo artificial, con el propósito de diluir la muestra de suelo contaminado. Se requirieron los datos del tamaño de partículas del suelo contaminado para a partir de éstos, conformar el suelo artificial. Una

vez que se obtuvieron los porcentajes de arena, limo y arcilla de la muestra, se mezclaron arena con arcilla del tipo caolinita y limo de cuarzo; los dos primeros fueron obtenidos comercialmente y el tercero fue proporcionado por el departamento de Física de suelos del Instituto de Geología de la UNAM.

De la manera arriba descrita, se obtuvo la fracción mineral del suelo, la cual fue enriquecida con el mismo porcentaje de materia orgánica que el determinado para el suelo contaminado. La materia orgánica (14 %), se adicionó en forma de humus activo obtenido comercialmente.

4.3 ANÁLISIS DE CONTAMINANTES EN EL SUELO

4.3.1 Determinación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (Método 418.1 de la EPA)

Se pesaron 10 g de muestra en un matraz erlenmeyer de 125 ml, al que se adicionaron aproximadamente 1 g de sulfato de sodio anhidro granular y se homogeneizó.

Se adicionaron aproximadamente 3 g de sílica gel y se homogeneizó; posteriormente se adicionaron 50 ml de tetracloruro de carbono y se dejó reposar por 30 minutos. Transcurridos éstos, se agitó con agitador magnético durante 5 minutos. Después, se procedió a filtrar en un matraz volumétrico de 50 ml y se aforó con tetracloruro de carbono.

Se calibró el instrumento utilizando los estándares de trabajo preparados con anterioridad. Se determinó la absorbancia directamente de cada solución a 2950 cm^{-1} . El siguiente paso, fue la preparación de una curva de calibración de absorbancia vs. mg de hidrocarburos del petróleo por 1000 ml de solución.

Después de que la sílica gel se ha asentado en la muestra extraída, se procedió a llenar la celda con la solución para determinar la absorbancia de la extracción. La concentración de los hidrocarburos del petróleo en el extracto, se determinó comparando la respuesta contra la gráfica de calibración.

Los hidrocarburos de petróleo en la muestra se calculan usando la siguiente fórmula:

$$\text{HTPs (mg/ml)} = (\text{Abs}-b)/m \cdot f1 \cdot f2$$

donde:

Abs.= absorbanza de la muestra

f1= factor de dilución del extracto

f2= factor de corrección = 50 g de la muestra

m= pendiente

b= ordenada al origen

Determinación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos (Cromatografía de gases)

Para la caracterización de los hidrocarburos tanto alifáticos como aromáticos se siguió la técnica recomendada por la United Nations Environment Programme/IOC/IAEA (1992).

El suelo húmedo, se secó a temperatura de 40-50°C, se maceró en un mortero de porcelana y se tamizó a través de una malla de 250 µm. Se tomó una submuestra del suelo tamizado de 5 g con base peso seco para realizar la extracción.

Extracción Soxhlet

Se realizó de acuerdo a lo establecido por el método 3540 de la U.S. EPA (métodos para la evaluación de residuos sólidos). Es un procedimiento para extraer compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles de sólidos tales como suelos. La extracción soxhlet, maximiza el contacto entre la matriz de la muestra y el solvente extractante.

Este método es aplicable para aislar y concentrar compuestos orgánicos insolubles y poco solubles en agua para analizarlos en los distintos procedimientos cromatográficos. Los 5 g del suelo contaminado se colocaron en un tubo de celulosa para extracción. El tubo se introdujo en un extractor soxhlet, que es conectado a un matraz de bola con 250 ml de una mezcla hexano:diclorometano (50:50) y a un refrigerante. Una vez montado el extractor, se colocó en un calentador. La extracción se terminó después de 8 horas. Se colectó el extracto proveniente de la etapa anterior y se llevó a un rotoevaporador hasta obtener un volumen de 5-10 ml.

Separación en columnas

Se utilizaron columnas de vidrio de 2 cm de diámetro interno por 30 cm de longitud. Se empacaron en el orden siguiente: \pm 30 ml de hexano + fibra de vidrio + 4 g de sílica + 4 g de alúmina + sulfato de sodio anhidro. Se añadió la muestra, se agregaron 20 ml de hexano para obtener la fracción 1 (HC alifáticos). La fracción 2 (HC aromáticos policíclicos) se obtuvo eluyendo con 30 ml de una mezcla hexano:diclorometano (9:1) + 20ml de una mezcla hexano:diclorometano (50:50). Las dos fracciones por separado se evaporaron hasta un volumen de 2-5 ml. Fueron trasvasadas a viales y se llevaron a sequedad, para su posterior reconstitución y análisis por cromatografía de gases de alta resolución.

Para el análisis cromatográfico, se utilizó un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama con las siguientes especificaciones:

Columna capilar de sílica fundida 5% fenil metil silicona de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μ m de espesor de capa. Para la determinación de hidrocarburos alifáticos, el inyector y el detector se calentaron a una temperatura de 300 °C. El horno se programó con una rampa de temperatura que inició en 70 °C en la que se mantuvo por medio minuto con un rango de 11 °C por minuto hasta 180 °C con un rango de 10 °C por minuto hasta 245 °C con un rango de 9 °C por minuto hasta 320 °C durante 14 minutos

Para la determinación de hidrocarburos aromáticos, el inyector y el detector se calentaron a una temperatura de 320 °C. El horno se programó con una rampa de temperatura que inició en 90 °C, temperatura en la que se mantuvo por medio minuto con un rango de 8 °C por minuto hasta 180 °C continuando con un rango de 5 °C por minuto hasta 245 °C subiendo con un rango de 2°C por minuto hasta 300 °C en donde se mantuvo por 6 minutos.

4.3.3 Determinación de metales pesados (Absorción atómica)

Se realizó la cuantificación de metales pesados para eliminar o considerar la posible interferencia de concentraciones significativas de metales pesados en la evaluación de la toxicidad del suelo por contaminación de hidrocarburos del petróleo.

Para llevar a cabo la determinación de metales pesados, se hizo una digestión ácida de la muestra; pesando 2.0007 g de suelo húmedo colocados en un matraz de balón al que se agregaron 30 ml de ácido clorhídrico y 10 ml de ácido nítrico para ser colocado en un nido de calefacción a 140 °C durante dos horas.

Terminada la digestión, se procedió a filtrar el extracto al vacío y se aforó a 100 ml con agua desionizada; para posteriormente, realizar la lectura en un equipo de Absorción Atómica Shimadzu AA-630-12.

4.4 PRUEBAS ECOTOXICOLÓGICAS EMPLEADAS

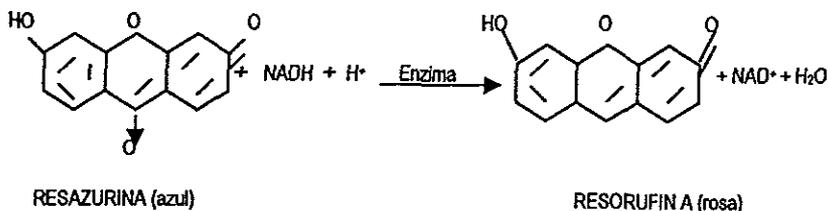
Las pruebas de toxicidad proveen una medida directa de la biodisponibilidad de tóxicos, permitiendo la observación de efectos en diferentes niveles y cuando se combina con el análisis químico, puede ayudar a establecer relaciones entre los sitios contaminados y los efectos ecológicos adversos.

Una vez caracterizado el suelo y el tipo de contaminante existente en el mismo, se procedió con la evaluación toxicológica del suelo; para lo cual se emplearon la prueba de toxicidad con *Bacillus cereus* según TU-Hamburg-Harburg, modificado y las pruebas de toxicidad aguda en lombrices y plantas terrestres (frijol, trigo y maíz), siguiendo los lineamientos establecidos por la OECD 207 y 208 respectivamente.

4.4.1 Prueba de ecotoxicidad con *Bacillus cereus*

Esta prueba permite la evaluación ecotoxicológica directa de un sólido contaminado determinando la actividad enzimática del organismo de prueba que se incuba junto con el sólido contaminado. El criterio de la prueba es la inhibición de la actividad de la deshidrogenasa determinada por la conversión de resazurina en comparación a un control (no contaminado). La resazurina es un indicador de óxido reducción. La reducción de la resazurina (azul) tiene lugar en dos estados. En el primero se lleva a cabo una conversión irreversible a resorufina (rosa).

Subsecuentemente, se da un cambio reversible de resorufina a dihidroresorufina, compuesto incoloro. Ya que la reducción de la resazurina a resorufina es irreversible, en los sistemas fisiológicos, la resazurina parece ser la elección ideal para la medición cuantitativa de la actividad deshidrogenasa, de acuerdo con la siguiente reacción:



Procedimiento

Para la realización de esta prueba se requirió de un cultivo madre de bacterias (*B. cereus*); el cual se obtuvo inoculando 1 ml de bacterias congeladas en 50 ml de medio Liu fresco e incubando a 25 °C y 120 rpm de agitación, en ausencia de luz durante 16 a 18 horas. Del cultivo madre, se utilizaron 2 ml para inocular 50 ml de medio Liu fresco. Se incubó en la obscuridad durante tres horas a 25 °C y 120 rpm de agitación. Se ajustó la densidad óptica del cultivo a 0.4 ± 0.005, a una longitud de onda de 600 nm con el medio como blanco. Este cultivo fue el que se utilizó en la prueba. Para esta determinación se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible. La cepa de *B. cereus* congelada, fue obtenida del cepario de la Facultad de Química de la UNAM.

La muestra de suelo contaminado se diluyó utilizando un suelo conformado artificialmente. Las diluciones porcentuales utilizadas, fueron las siguientes: 1.5, 3, 6, 12, 25, 50 y 100 %. Cada dilución así como el control y el blanco se hicieron por triplicado.

Para cada dilución y sus réplicas, se pesaron 2 g de suelo húmedo en tubos pyrex con tapón de rosca y se suspendieron en 4 ml de agua. Para el control, se utilizaron 2 g de suelo artificial, suspendidos en 4 ml de agua. A cada muestra se adicionaron 2 ml del cultivo de bacterias, del que antes se ajustó la densidad óptica, y a los blancos se agregaron 2 ml del medio. Estos tubos se incubaron a 25 °C por 2 h en el agitador orbital a 120 rpm. Después de agitar, se adicionaron 4 ml de una solución de resazurina y se incubaron durante 15 minutos más en las mismas condiciones. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 2000 rpm. La reacción se paró enfriando los tubos con hielo. Posteriormente, se filtró el

sobrenadante con una membrana de 0.2 mm de abertura, para separar las bacterias y evitar interferencias en las lecturas. Se midió la absorbancia del filtrado a 600 nm en el espectrofotómetro UV-visible.

Cálculos

De las absorbancias determinadas se calculó la conversión de la resazurina por los microorganismos, para evaluar la actividad de la deshidrogenasa. Para este fin se emplean la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Conversión} = \text{Actividad bacteriana}$$

$$\text{Actividad bacteriana} = \frac{A_{600\text{nm}} \text{del blanco} - A_{600\text{nm}} \text{de la muestra}}{A_{600\text{nm}} \text{del blanco}} * 100$$

$$\text{Inhibición} = 100 - \text{actividad bacteriana}$$

El resultado final es la inhibición de la muestra con respecto al control. A partir de estos datos, se procedió al cálculo de la concentración inhibitoria al 50 % (CL₅₀), mediante dos métodos. Uno es el método gráfico, en el cual se construye una gráfica de los logaritmos de las diluciones contra los porcentaje de inhibición. Se intercepta la gráfica en el 50% de inhibición y se lee el logaritmo de la dilución a que esta ocurre, el antilog es el resultado.

El segundo método es el análisis PROBIT, el cual es un procedimiento de estadística paramétrica para la estimación de la CL₅₀, asociado con un intervalo de confianza del 95 %. El análisis consiste de la transformación de los porcentajes de mortalidad (inhibición) observados a Unidades Probit (tablas) y de la concentración de contaminación a logaritmos en base 10. De esta manera, la relación entre las variables transformadas es aproximadamente lineal, procediendo a obtener los parámetros de la regresión para el cálculo de la CL₅₀.

4.4.3 Prueba de toxicidad con plantas terrestres OECD 208

Esta prueba es empleada para determinar los posibles efectos tóxicos de sustancias químicas sólidas o líquidas incorporadas al suelo, en la germinación de semillas y en estadios tempranos del desarrollo de algunas plantas terrestres como son: trigo (*Triticum aestivum*) variedad romouga; maíz (*Zea mays*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) variedad bayomex; todas ellas cosecha 1997. Las semillas de trigo y de maíz fueron obtenidas del Centro Internacional para el

Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT). Las semillas de frijol fueron obtenidas del departamento de producción de semillas de la Universidad Autónoma de Chapingo.

Antes de llevar a cabo la prueba de toxicidad en sí, se realizó una prueba de viabilidad para asegurar que las semillas tuvieran un mínimo de 80% de capacidad germinativa.

Para esta prueba, se hicieron las mismas diluciones de suelo contaminado que en la prueba de lombrices, empleando en este caso 1, 000 g de suelo en peso seco para cada maceta. En total se utilizaron 27 Kg de suelo contaminado y 44 Kg de suelo conformado artificialmente. Cada dilución se hizo por triplicado; en cada maceta se sembraron 10 semillas haciendo un total de 240 semillas sembradas por especie. Las macetas se mantuvieron en un cuarto a temperatura ambiente (25°C – 35°C), con periodos de luz/obscuridad de 11/12 hrs, la humedad del suelo se ajustó a la capacidad de campo del suelo artificial (0.2 ml/g). La prueba se dio por terminada después de 21 días.

Para determinar el efecto del tratamiento y de la carga genética del individuo sobre la longitud de tallo y raíz, así como en el número de hojas de las tres especies de plantas utilizadas, se realizaron análisis de varianza (Andeva) sobre los datos corregidos como $X' = \text{Log}(X + 1)$, por existir muchos valores de cero (Zar, 1984).

Por último, para conocer las diferencias entre celdas se aplicaron pruebas de Tukey (Zar, 1984).

4.4.2 Prueba de toxicidad aguda con lombrices de tierra OECD-207

Para esta prueba se utilizó la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) en estado adulto con la formación de clitelo de aproximadamente 5 meses de edad; las cuales fueron obtenidas del Departamento de Fertilidad del Suelo de la UACH.

Las lombrices fueron sometidas a una aclimatación de 24 horas en el suelo artificial (suelo utilizado como control). Después de este tiempo se prepararon recipientes con suelo contaminado "diluido" con suelo artificial, en los mismos porcentajes utilizados para bacterias; completando un total de 750 g en peso seco para cada frasco. De cada concentración se realizaron tres réplicas. La humedad del suelo se ajustó al 60% de la capacidad de retención del suelo artificial. En cada recipiente con suelo, se colocaron 10 lombrices de un peso aproximado

de 0.5 g cada una. La prueba duró catorce días a lo largo de los cuales, se hizo un conteo diario del número de organismos vivos en cada frasco. La prueba se realizó bajo luz continua y a una temperatura de $20^{\circ} \pm 5^{\circ} \text{ C}$.

Con los resultados obtenidos, se procedió a elaborar una curva de sobrevivencia y a calcular la concentración letal al cincuenta por ciento (CL_{50}) mediante el análisis PROBIT.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZACIÓN EDÁFICA

El suelo analizado presentó un color oscuro (café-negro), debido a la adición de compuestos orgánicos. Este mismo hecho repercutió en el valor del pH, el cual fue ácido (4.2). A este pH, la mayoría de las plantas presenta serias deficiencias de nutrimentos (pH dísticos). En cuanto al análisis del tamaño de partículas, resultó predominante la fracción arenosa (81.84%), seguida por la arcilla (15.16%) y limo (3%), valores que de acuerdo a la Sociedad Internacional de la Ciencia del Suelo, corresponden a un tipo textural Areno-francoso. Los resultados de la caracterización edafológica del suelo contaminado, se muestran en la tabla 5.

En cuanto al contenido de carbono orgánico total, este resultó ser alto (Foth, 1990), mientras que el nitrógeno y el fósforo se encuentran dentro del rango clasificado como bajos (Aguilar, et al. 1987).

Tabla 5. Relación de parámetros físicos y químicos de una muestra de suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo, proveniente de la refinería Lazaro Cardenas.

| PARÁMETRO | SUELO CONTAMINADO |
|--------------------------|------------------------|
| Color seco | 3/2 7.5 YR café oscuro |
| Color húmedo | negro |
| Valor de pH | 4.2 |
| Densidad aparente (g/mL) | 0.76 |
| Densidad real (g/mL) | 1.06 |
| Espacio poroso (%) | 62.92 |
| Sólidos (%) | 37.08 |
| Arena (%) | 81.84 |
| Arcilla (%) | 15.16 |
| Limo (%) | 3.00 |
| Materia orgánica (%) | 14.39 |
| Nitrógeno (%) | 0.060 |
| Carbono (%) | 9.06 |
| Fósforo (mg/L) | 0.48 |
| Humedad relativa (%) | 36.77 |

5.2 ANÁLISIS DE CONTAMINANTES EN EL SUELO

Determinación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPHs, por sus siglas en inglés)

La determinación de TPHs en suelos es un parámetro normalmente empleando con la finalidad de *cuantificar el grado general de contaminación* que se presenta antes y después de remediar una zona contaminada.

El resultado obtenido para la muestra de suelo contaminado fue de 30 809.15 ppm, por lo que fue evidente el contenido de hidrocarburos de origen petrogénico en el área de estudio.

Determinación de hidrocarburos alifáticos y policíclicos aromáticos

El análisis cromatográfico del suelo permitió detectar hidrocarburos alifáticos a partir del C14 hasta el C34, por comparación del cromatograma de la muestra con un estándar. Las concentraciones de hidrocarburos alifáticos detectadas en la muestra analizada, varían de 4.53 a 474.82 $\mu\text{g/g}$ de peso seco. De los hidrocarburos registrados, el C23, C24 y C25 son los que sobresalen por su alta concentración, con 281.01, 373.09 y 474.82 $\mu\text{g/g}$ respectivamente; mientras que la menor concentración se registró para el C14 y C15 con 4.65 y 4.53 $\mu\text{g/g}$ respectivamente (Tabla 6). Todos los valores anteriores corresponden a la muestra de suelo sin diluir, es decir, al 100 % (Figura 3).

En cuanto al comportamiento de las concentraciones de hidrocarburos alifáticos en las diferentes diluciones, se observaron valores totales que van de 11.66 $\mu\text{g/g}$, en la dilución del 3% de suelo contaminado hasta 674.53 $\mu\text{g/g}$, en la muestra de suelo diluida al 50 %; valores que representan el 0.64 y 36.9 % respectivamente, de la concentración total registrada en la muestra sin diluir (1827.95 $\mu\text{g/g}$). En las muestras con la menor concentración de suelo conataminado, se detectó el 56 % (9) de los compuestos que se detectaron en la muestra sin diluir (16).

En lo que respecta a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) detectados en la muestra de suelo al 100%, se observó que predominan los compuestos de alto peso molecular (4 y 5 anillos), mientras que los compuestos más ligeros (2 anillos) no se detectaron, ya que deben encontrarse en niveles por debajo del límite de detección del equipo (0.01 $\mu\text{g/g}$) (Tabla 7, figura 4). El Indeno (1,2,3 cd) pireno fue el compuesto que registró la mayor concentración con 104.88 $\mu\text{g/g}$, valor que representa el 32% de la concentración total de HAPs, y 40 % de los compuestos

con 5 anillos. La menor concentración registrada corresponde al antraceno (4.4 µg/g), uno de los dos compuestos de 3 anillos detectados en la muestra analizada.

Los HAPs, se registrarán en un rango que fue de 2.05 µg/g en la concentración más baja de suelo contaminado, hasta 159.54 µg/g en la dilución al 50 % de la muestra de suelo contaminando. Dichos valores representan el 0.62 y 48.8 %, respectivamente, de la concentración total obtenida para la muestra sin diluir (327.14 µg/g). En las diluciones con menor concentración de suelo contaminado, se detectó el 36.4 5 de los compuestos detectados en la muestra sin diluir (11).

Tabla 6. Niveles de hidrocarburos alifáticos determinados en las diferentes diluciones de una muestra de suelo, mediante cromatografía de gases. Los valores se encuentran en µg/g de suelo en peso seco (ppm)

| COMPUESTOS | DILUCIONES (%) | | | | | | S. D |
|-------------------|----------------|--------------|--------------|--------------|----------------|---------------|----------------|
| | 0 | 3 | 6 | 12 | 25 | 50 | |
| C10 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| C11 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| C12 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| C13 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| C14 | N.D. | N.D. | N.D. | 0.17 | 1.34 | 2.26 | 4.65 |
| C15 | N.D. | N.D. | N.D. | 0.49 | 2.85 | 3.47 | 4.53 |
| C16 | N.D. | N.D. | 0.73 | 2.14 | 4.16 | 20.79 | 19.69 |
| C17 | N.D. | N.D. | 0.57 | N.D. | 3.24 | 12.82 | 32.16 |
| C18 | 0.019 | 0.06 | 2.35 | 6.72 | 10.24 | 20.59 | 79.29 |
| C19 | 0.02 | 1.12 | 4.33 | N.D. | 12.96 | 52.05 | 133.43 |
| C20 | N.D. | 0.56 | 4.76 | 10.25 | 18.25 | 44.35 | 126.8 |
| C21 | N.D. | 0.89 | 3.29 | 12.8 | 14.55 | 67.48 | 103.57 |
| C22 | N.D. | 1.24 | 2.96 | 14.55 | 8.16 | 78.71 | 135.27 |
| C23 | 0.54 | 0.38 | 2.12 | 14.82 | 78.42 | 123.34 | 281.01 |
| C24 | N.D. | 0.03 | 1.02 | N.D. | N.D. | 140.2 | 373.09 |
| C25 | 0.001 | 5.92 | N.D. | 8.16 | 92.5 | 138.61 | 474.82 |
| C26 | 0.26 | 1.46 | N.D. | 2.33 | 3.098 | 0.87 | 9.32 |
| C27 | 0.22 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 1.13 | N.D. |
| C28 | 0.16 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| C29 | 0.06 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| C30 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.38 | 12.25 |
| C31 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| C32 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.98 | 10.55 |
| C33 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| C34 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 5.84 | 27.52 |
| Suma total | 1.28 | 11.66 | 20.83 | 69.63 | 238.178 | 674.53 | 1827.95 |

N.D < 0.01 µg/g. *S. D. Suelo sin diluir

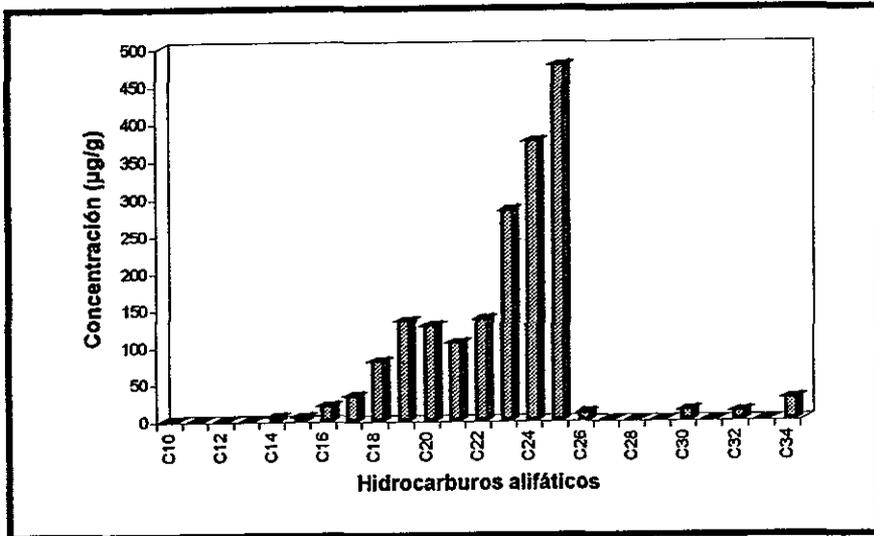


Fig. 3. Abundancia de los hidrocarburos alifáticos detectados en la muestra de suelo estudiada.

Tabla 7. Concentraciones de hidrocarburos policíclicos aromáticos detectadas en diferentes diluciones de una muestra de suelo contaminado usando cromatografía de gases. Valores en µg/g en peso seco.

| Num. anillos | COMPUESTOS | DILUCIONES (%) | | | | | | | Suma total por No. De anillos |
|--------------|------------------------|----------------|------|------|-------|-------|--------|--------|-------------------------------|
| | | 0 | 3 | 6 | 12 | 25 | 50 | S. D* | |
| 2 | Naftaleno | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | |
| 2 | Acenafileno | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | |
| 2 | Acenafeno | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | |
| 2 | Fluoreno | 0.16 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 3 | Fenantreno | N.D. | 0.97 | N.D. | 1.42 | 0.46 | 1.56 | 4.4 | |
| 3 | Antraceno | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | |
| 3 | Fluoranteno | N.D. | N.D. | N.D. | 0.34 | 1.47 | 3.95 | 9.1 | 13.5 |
| 4 | Pireno | N.D. | N.D. | 0.09 | 0.89 | 1.57 | 3.06 | 9.71 | |
| 4 | Benzo(a)antraceno | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 5.85 | |
| 4 | Criseno | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.78 | 2.93 | 3.53 | |
| 4 | Benzo(b)fluoranteno | N.D. | 0.06 | N.D. | 0.95 | 2.73 | 7.84 | 18.68 | |
| 4 | Benzo(k)fluoranteno | N.D. | N.D. | N.D. | 0.52 | 1.84 | 5.48 | 14.44 | 19.31 |
| 5 | Benzo(a)pireno | N.D. | N.D. | N.D. | 0.65 | 2.79 | 9.07 | 25.98 | |
| 5 | Indeno(1,2,3-cd)pireno | N.D. | 0.54 | 1.05 | 4.89 | 12.45 | 48.79 | 104.88 | |
| 5 | Dibenzo(a,h)antraceno | N.D. | N.D. | 0.28 | 2.36 | 9.87 | 29.34 | 46.8 | |
| 5 | Benzo(g,h,i)pitifeno | N.D. | 0.48 | 1.78 | 5.12 | 18.41 | 47.52 | 83.77 | 261.43 |
| | Suma total | | 2.05 | 3.2 | 17.14 | 52.37 | 159.54 | 327.14 | |

N.D < 0.01 µg/g

*S.D Suelo sin diluir

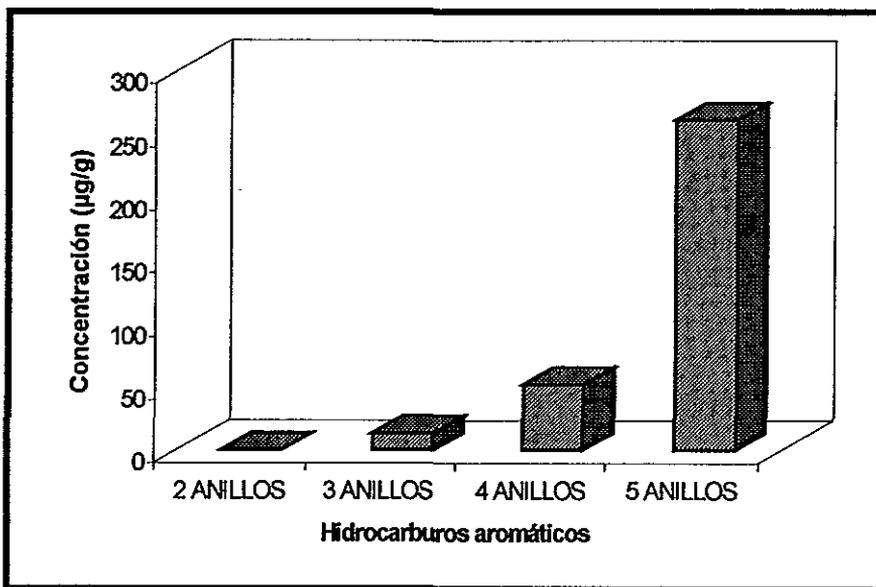


Figura 4. Abundancia de los hidrocarburos policíclicos aromáticos por número de anillos en la muestra de suelo analizada

Determinación de metales pesados

Para una mejor caracterización de la muestra de suelo utilizada en los bioensayos de toxicidad, se llevó a cabo la determinación de metales pesados. Los metales analizados, están dentro de los que se han reportado como de amplio uso dentro de la industria petroquímica y de refinado de petróleo tales como el vanadio, fierro, cromo, plomo, cobre, cadmio, manganeso y níquel (Páez-Osuna, 1996).

Los niveles de metales detectados, se registran en la tabla 8, en la cual se observa que en general, los metales analizados se registraron en concentraciones menores a 1.82 ppm; a excepción de el cromo (11.8 ppm).

Tabla 8. Concentraciones de metales pesados detectados en una muestra de suelo contaminada por hidrocarburos provenientes de una refinería de petróleo, mediante el uso de Espectrofotometría de Absorción Atómica.

| Metal | Concentración (ppm) |
|-----------|---------------------|
| Vanadio | 0.95 |
| Fierro | 1.82 |
| Cromo | 11.8 |
| Plomo | 0.40 |
| Cobre | 0.26 |
| Cadmio | N.D. |
| Manganeso | 0.41 |
| Niquel | 0.62 |

5.3 Prueba de toxicidad aguda con *Bacillus cereus*

Para la evaluación de la toxicidad del suelo utilizando bacterias, se empleó el término CI_{50} para referirnos a la concentración efectiva del tóxico que causa un 50% de la inhibición de la deshidrogenasa bacteriana.

Los resultados de la incubación de las diferentes diluciones de la muestra de suelo contaminado, se presentan en la tabla 9, en la cual se observa que a medida que se incrementa la concentración del suelo contaminado, se incrementa el porcentaje de inhibición de la actividad microbiana, debida a la inhibición de la deshidrogenasa.

Tabla 9. Valores promedio del porcentaje de inhibición de la deshidrogenasa en *B. cereus* por contacto con las diferentes diluciones de suelo contaminado.

| Concentración (%) | Inhibición (%) \pm e.s |
|-------------------|-----------------------------|
| 1,5 | 10.84 \pm 0.36 |
| 3 | 18.28 \pm 1.07 |
| 6 | 22.95 \pm 1.80 |
| 12 | 23.97 \pm 6.15 |
| 25 | 30.86 \pm 0.54 |
| 50 | 47.63 \pm 5.41 |
| 100 | 54.12 \pm 0.56 |

El análisis PROBIT, también conocido como Método de Unidades Probabilísticas es utilizado para evaluar la relación dosis-respuesta de un contaminante sobre un organismo, medida en términos de la concentración letal media; en este caso se hizo en términos de la concentración inhibitoria al 50% (IC_{50}).

De acuerdo al método PROBIT, la IC_{50} se encuentra en una concentración del 82.35% de suelo contaminado (Fig. 5); lo que permite ubicar al suelo estudiado, según Dombrozki *et al.* (1991), como un suelo ligeramente tóxico. El valor determinado para la IC_{50} , corresponde a 1.21 Unidades de Toxicidad Aguda.

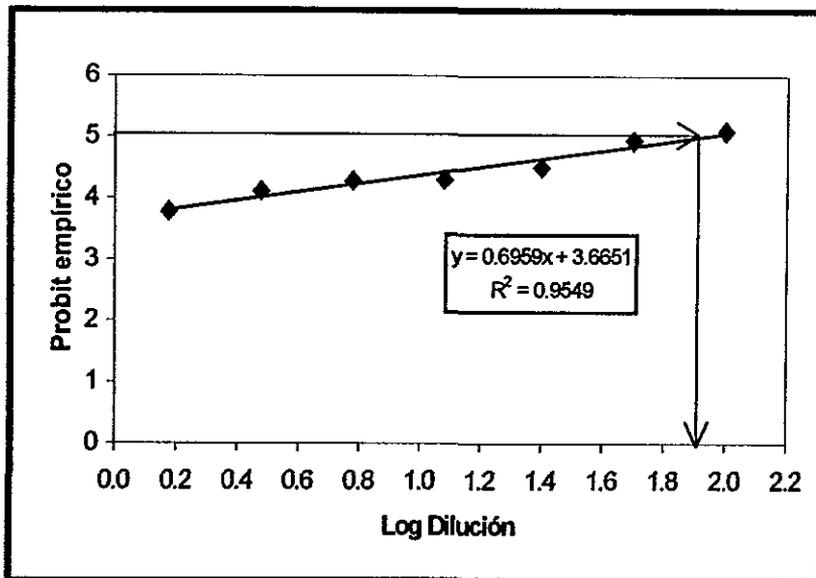


Figura 5. Gráfica a partir de la cual se obtiene el valor de la IC_{50} , como el antilog X (en $y = 5$), para la inhibición de la deshidrogenasa en *B. cereus*.

5.4 Toxicidad en plantas terrestres

Germinación

La germinación de las plantas utilizadas en este bioensayo, resultó afectada en diferentes grados en las tres especies probadas (tabla 10); siendo la más sensible el frijol (*P. vulgaris*), para la cual el porcentaje más alto de germinación fue de 93 % en la concentración del 50 % de suelo contaminado y el porcentaje más bajo fue de 30% en la concentración de 1.5 % de suelo contaminado. Para *Z. mays* se obtuvo un porcentaje de germinación del 100 % en las concentraciones más altas de suelo contaminado (25 y 50 %), mientras que el porcentaje de germinación más bajo se registró para la concentración del 12 % (86.67 %). En el caso de *T. aestivum*, se observó un 100 % de germinación en tres de las concentraciones probadas (3, 25 y 50 %); obteniéndose un 76.67 % como porcentaje más bajo de germinación en la concentración del 12 % de suelo contaminado.

Tabla 10. Porcentajes de germinación registrados para las tres especies de plantas utilizadas en el bioensayo de toxicidad aguda con plantas.

| Concentración (%) | Germinación (%) | | |
|-------------------|--------------------|----------------|--------------------|
| | <i>P. vulgaris</i> | <i>Z. mays</i> | <i>T. aestivum</i> |
| Control | 86.67 | 93.33 | 100.00 |
| 1.5 | 30.00 | 93.33 | 86.67 |
| 3 | 43.33 | 90.00 | 100.00 |
| 6 | 40.00 | 93.33 | 83.33 |
| 12 | 43.33 | 86.67 | 76.67 |
| 25 | 66.67 | 100.00 | 100.00 |
| 50 | 93.33 | 100.00 | 100.00 |

Desarrollo vegetativo

Phaseolus vulgaris

i) Tallo

Del análisis de varianza realizado, para determinar si hubo diferencias significativas en la longitud del tallo alcanzada por las plantas de frijol, crecidas en las diferentes diluciones de suelo contaminado, se deduce que hubo un efecto altamente significativo del tratamiento (diluciones de la muestra) sobre la longitud del tallo (tabla 11). El análisis de varianza que se hizo para determinar el efecto de la carga genética de cada individuo sobre la longitud del tallo dió como resultado una diferencia altamente significativa (tabla 12).

Como resultado de la prueba de Tukey, se observa que el control no difiere del tratamiento al 50% con respecto a la longitud del tallo. Pero éstos si difieren significativamente del tratamiento a concentraciones de 1.5, 3, 6 y 12 % de suelo contaminado, los cuales no difieren entre sí formando un solo grupo (Tabla 13).

Tabla 11. Análisis de varianza para determinar el efecto del tratamiento sobre la longitud del tallo de plantas de *Phaseolus vulgaris* crecidas a diferentes concentraciones de suelo contaminado.

| Fuente de variación | SC | gl | CM | F | p |
|---------------------|--------|-----|-------|--------|--------|
| Tratamiento | 17.795 | 6 | 2.966 | 10.240 | 0.0000 |
| Error | 58.792 | 203 | 0.290 | | |

Tabla 12. Análisis de varianza para determinar el efecto individual sobre la longitud del tallo de plantas de *Phaseolus vulgaris* crecidas a diferentes concentraciones de suelo contaminado.

| Fuente de variación | SC | gl | CM | F | p |
|---------------------|--------|-----|-------|-------|--------|
| Individuo | 35.870 | 29 | 1.237 | 5.468 | 0.0000 |
| Error | 40.716 | 180 | 0.226 | | |

Tabla 13. Longitud de tallo de *Phaseolus vulgaris* sometido a diferentes concentraciones de suelo contaminado. Letras diferentes denotan diferencias significativas con $p < 0.05$.

| Tratamiento | longitud | |
|-------------|----------|-------|
| Control | 1.103 | a |
| 1.5 % | 0.370 | c |
| 3 % | 0.539 | c |
| 6 % | 0.469 | c |
| 12 % | 0.478 | c |
| 25 % | 0.782 | a b c |
| 50 % | 1.132 | a |

ii) Raíz

En las tablas 14 y 15 se presentan los resultados del análisis de varianza efectuado para determinar las diferencias significativas del tratamiento sobre la longitud de la raíz y del efecto de la carga genética individual sobre la longitud de la raíz, respectivamente; en las cuales se puede observar que existe una diferencia altamente significativa en el efecto del tratamiento sobre la longitud de la raíz, así como el comportamiento individual de las plantulas.

En lo que respecta a la prueba de Tukey, se destaca que el control, no difiere del tratamiento al 50% con respecto a la longitud de la raíz. Pero éstos si difieren significativamente del tratamiento a 1.5, 3, 6 y 12 % de suelo contaminado, los cuales no difieren entre si formando un solo grupo (Tabla 16).

Tabla 14. Análisis de varianza para determinar el efecto del tratamiento sobre la longitud de la raíz de plantas de *Phaseolus vulgaris* crecidas a diferentes concentraciones de suelo contaminado.

| Fuente de variación | SC | gl | CM | F | p |
|---------------------|--------|-----|-------|--------|--------|
| Tratamiento | 14.682 | 6 | 2.447 | 10.317 | 0.0000 |
| Error | 48.148 | 203 | 0.237 | | |

Tabla 15. Análisis de varianza para determinar el efecto individual sobre la longitud de la raíz de plantas de *Phaseolus vulgaris* crecidas a diferentes concentraciones de suelo contaminado.

| Fuente de variación | SC | gl | CM | F | p |
|---------------------|--------|-----|-------|-------|--------|
| Individuo | 27.571 | 29 | 0.951 | 4.853 | 0.0000 |
| Error | 35.259 | 180 | 0.196 | | |

Tabla 16. Longitud de la raíz de *Phaseolus vulgaris* sometido a diferentes concentraciones de suelo contaminado. Letras diferentes denotan diferencias significativas con $p < 0.05$.

| Tratamiento | longitud | |
|-------------|----------|-------|
| Control | 1.002 | a |
| 1.5 % | 0.286 | c |
| 3 % | 0.576 | c |
| 6 % | 0.460 | c |
| 12 % | 0.397 | c |
| 25 % | 0.698 | a b c |
| 50 % | 1.007 | a |

Zea mays**i) Tallo**

En lo que se refiere a *Zea mays*, el análisis de varianza realizado para establecer si hay diferencias significativas en el efecto del tratamiento, sobre la longitud del tallo, así como del individuo sobre el mismo parámetro, indica que en ambos casos existe una diferencia altamente significativa en la respuesta de las plantas a la exposición de suelo contaminado en las diferentes concentraciones, así como en la respuesta individual. Los resultados de los Anovas se pueden observar en las tablas 17 y 18.

La tabla 19 presenta los resultados de la prueba de Tukey; en la cual se pueden observar dos grupos, uno es el que forman el control, los tratamientos al 1.5, 25 y 50 %; los cuales no difieren entre sí. Pero sí difieren del grupo que forman los tratamientos al 3, 6 y 12 % de suelo contaminado, que no presentan diferencias significativas entre sí.

Tabla 17. Análisis de varianza para determinar el efecto del tratamiento sobre la longitud del tallo de plantas de *Zea mays* crecidas a diferentes concentraciones de suelo contaminado.

| Fuente de variación | SC | gl | CM | F | p |
|---------------------|--------|-----|-------|-------|--------|
| Tratamiento | 2.628 | 6 | 0.438 | 4.920 | 0.0001 |
| Error | 18.076 | 203 | 0.089 | | |

Tabla 18. Análisis de varianza para determinar el efecto individual sobre la longitud del tallo de plantas de *Zea mays* crecidas a diferentes concentraciones de suelo contaminado.

| Fuente de variación | SC | gl | CM | F | p |
|---------------------|--------|-----|-------|-------|--------|
| Individuo | 10.220 | 29 | 0.352 | 6.050 | 0.0000 |
| Error | 10.484 | 180 | 0.058 | | |

Tabla 19. Longitud del tallo de *Zea mays* sometido a diferentes concentraciones de suelo contaminado. Letras diferentes denotan diferencias significativas con $p < 0.05$.

| Tratamiento | longitud | |
|-------------|----------|-----|
| Control | 1.188 | a |
| 1.5 % | 1.121 | a |
| 3 % | 1.017 | a b |
| 6 % | 1.054 | a b |
| 12 % | 0.982 | a b |
| 25 % | 1.204 | a |
| 50 % | 1.326 | a |

ii) Raíz

Con respecto al efecto del tratamiento y de la carga genética individual, sobre la longitud de la raíz en *Zea mays*, se observó una diferencia altamente significativa en la respuesta provocada por las diferentes concentraciones de suelo contaminado así como en la respuesta individual (tabla 20 y 21).

Los resultados de la prueba de Tukey se presentan en la tabla 22; en la cual se observa que no hay diferencias claras entre el control y los diferentes tratamientos; sin embargo se aprecia que son más semejantes entre si los tratamientos del 3, 6 y 12 % de suelo contaminado que con el resto de los tratamientos.

Tabla 20. Análisis de varianza para determinar el efecto del tratamiento sobre la longitud de la raíz de plantas de *Zea mays* crecidas a diferentes concentraciones de suelo contaminado.

| Fuente de variación | SC | gl | CM | F | p |
|---------------------|--------|-----|-------|-------|---------|
| Tratamiento | 4.167 | 6 | 0.694 | 5.629 | 0.00002 |
| Error | 25.048 | 203 | 0.123 | | |

Tabla 21. Análisis de varianza para determinar el efecto individual sobre la longitud de la raíz de plantas de *Zea mays* crecidas a diferentes concentraciones de suelo contaminado.

| Fuente de variación | SC | gl | CM | F | p |
|---------------------|--------|-----|-------|-------|--------|
| Individuo | 12.214 | 29 | 0.421 | 4.459 | 0.0000 |
| Error | 17.000 | 180 | 0.094 | | |

Tabla 22. Longitud de la raíz *Zea mays* de sometido a diferentes concentraciones de suelo contaminado. Letras diferentes denotan diferencias significativas con $p < 0.05$.

| Tratamiento | longitud | |
|-------------|----------|----|
| Control | 1.309 | a |
| 1.5 % | 1.247 | a |
| 3 % | 1.149 | ab |
| 6 % | 1.126 | ab |
| 12 % | 1.054 | ab |
| 25 % | 1.409 | ad |
| 50 % | 1.465 | ac |

Triticum aestivum

i) Tallo

El tercer organismo de prueba en cuanto a plantas terrestres, fue el trigo (*T. aestivum*) para el cual el análisis de varianza determinó una diferencia significativa en el efecto de los diferentes tratamientos sobre la longitud del tallo (tabla 23). Por otra parte, observamos que no existen diferencias significativas en la respuesta individual de *T. aestivum* con respecto a la longitud del tallo (tabla 24).

La tabla 25 presenta los resultados de la prueba de Tukey efectuada como complemento del Anova, en la cual es evidente que el control es más semejante a las concentraciones del 3, 25 y 50 % difiriendo de las concentraciones al 1.5, 6, y 12%, siendo éstas también diferentes entre si.

Tabla 23. Análisis de varianza para determinar el efecto del tratamiento sobre la longitud del tallo de plantas de *Triticum aestivum* crecidas a diferentes concentraciones de suelo contaminado.

| Fuente de variación | SC | gl | CM | F | p |
|---------------------|--------|-----|-------|-------|---------|
| Tratamiento | 3.885 | 6 | 0.647 | 5.644 | 0.00002 |
| Error | 23.284 | 203 | 0.115 | | |

Tabla 24. Análisis de varianza para determinar el efecto individual sobre la longitud del tallo de plantas de *Triticum aestivum* crecidas a diferentes concentraciones de suelo contaminado.

| Fuente de variación | SC | gl | CM | F | p |
|---------------------|--------|-----|-------|-------|-------|
| Individuo | 3.515 | 29 | 0.121 | 0.922 | 0.584 |
| Error | 23.654 | 180 | 0.131 | | |

Tabla 25. Longitud del tallo de *Triticum aestivum* sometido a diferentes concentraciones de suelo contaminado. Letras diferentes denotan diferencias significativas con $p < 0.05$.

| Tratamiento | longitud | |
|-------------|----------|-----|
| Control | 1.257 | a |
| 1.5 % | 1.094 | a b |
| 3 % | 1.192 | a |
| 6 % | 1.023 | a c |
| 12 % | 0.923 | b c |
| 25 % | 1.297 | a |
| 50 % | 1.291 | a |

ii) Raíz

En lo que se refiere al efecto de las diferentes concentraciones del suelo contaminado, sobre el crecimiento de la raíz, el análisis de varianza dejó ver que existen diferencias significativas en el crecimiento de la raíz en los diferentes tratamientos (tabla 26); mientras que la respuesta individual no presenta diferencias significativas en la longitud de la raíz (tabla 27). Los resultados de la prueba de Tukey se muestran en la tabla 28.

Tabla 26. Análisis de varianza para determinar el efecto del tratamiento sobre la longitud de la raíz en plantas de *Triticum aestivum* crecidas a diferentes concentraciones de suelo contaminado.

| Fuente de variación | SC | gl | CM | F | p |
|---------------------|--------|-----|-------|-------|---------|
| Tratamiento | 4.155 | 6 | 0.692 | 4.737 | 0.00015 |
| Error | 29.678 | 203 | 0.146 | | |

Tabla 27. Análisis de varianza para determinar el efecto individual sobre la longitud de la raíz de plantas de *Triticum aestivum* crecidas a diferentes concentraciones de suelo contaminado.

| Fuente de variación | SC | gl | CM | F | p |
|---------------------|--------|-----|-------|-------|-------|
| Tratamiento | 5.875 | 29 | 0.202 | 1.304 | 0.151 |
| Error | 27.459 | 180 | 0.155 | | |

Tabla 28. Longitud de la raíz de *Triticum aestivum* sometido a diferentes concentraciones de suelo contaminado. Letras diferentes denotan diferencias significativas con $p < 0.05$.

| Tratamiento | longitud | |
|-------------|----------|-----|
| Control | 1.257 | a |
| 1.5 % | 1.094 | a b |
| 3 % | 1.192 | a |
| 6 % | 1.023 | a c |
| 12 % | 0.923 | b c |
| 25 % | 1.297 | a |
| 50 % | 1.291 | a |

5.5 Valores de toxicidad con lombrices de tierra

La evaluación ecotoxicológica con *Eisenia foetida*, mostró una gran sensibilidad de este organismo a la contaminación del suelo, ya que la CL_{50} , después de 7 días de exposición, se encontró en la concentración de 6 % de suelo contaminado; observándose una mortalidad del 100% en la concentración del 50 % del suelo estudiado (tabla 29). Después de 14 días, la concentración más baja de suelo contaminado, sobrepasó el 50 % de mortalidad, llegando al 100 % en la concentración del 12 %. En la figura 6 se ilustra la sobrevivencia de *E. foetida* a lo largo de los catorce días que dura la prueba.

Tabla 29. Registro de los porcentajes de mortalidad observados en *Eisenia foetida*, después de 7 y 14 días de exposición a diferentes concentraciones de suelo contaminado.

| Concentración (%) | Mortalidad (%) | |
|-------------------|----------------|---------|
| | 7 días | 14 días |
| Control | 6.67 | 6.67 |
| 1.5 | 28.57 | 60.71 |
| 3 | 35.71 | 85.71 |
| 6 | 57.14 | 92.86 |
| 12 | 75.00 | 100.00 |
| 25 | 85.71 | 100.00 |
| 50 | 100.00 | 100.00 |

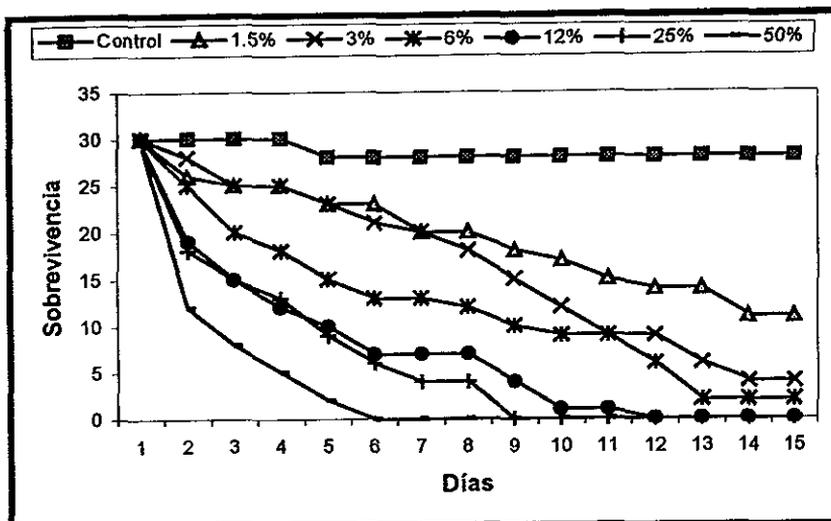


Figura 6. Gráfica que muestra la sobrevivencia de *Eisenia foetida* expuesta a diferentes concentraciones de suelo contaminado a lo largo de 14 días.

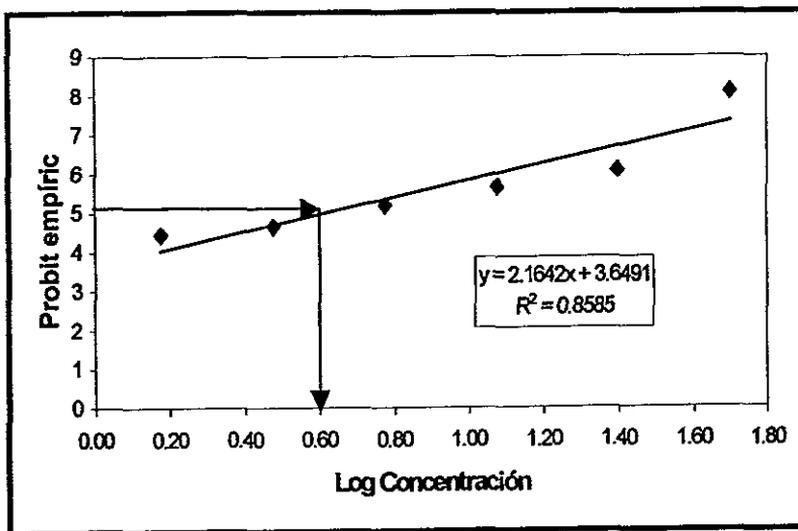


Figura 7. Gráfica a partir de la cual se obtiene la LC₅₀ para *E. foetida*, después de 7 días de exposición a diferentes concentraciones de suelo contaminado.

El valor de la LC₅₀ para *E. foetida*, mediante el método PROBIT, solo fue posible obtener a los 7 días de exposición; determinándose en una concentración de 4.1% de suelo contaminado (fig. 7). Este método no se empleo para la determinación de la LC₅₀ después de 14 días de exposición, dado que este valor se encontraba por debajo de la menor concentración probada.

El valor de la LC₅₀ calculado por el método PROBIT, corresponde a un valor de 24.4 Unidades de Toxicidad Aguda a los siete días de exposición al suelo contaminado.

6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Caracterización física y química del suelo

De acuerdo con el análisis granulométrico, el suelo estudiado se puede considerar como de textura gruesa, ya que presenta una alta proporción de arena (81.84 %), que de acuerdo con la FAO-UNESCO pueden ser clasificados como Arenosoles. Si bien los altos contenidos de material orgánico (14.4 %), no son típicos para estos suelos, su origen puede ser explicado como resultado de adiciones a través de escurrimientos y desbordamientos o inundaciones estacionales; además, la geoforma favorece que dichas adiciones tiendan a acumularse y debido a las condiciones del clima a mineralizarse rápidamente. Según Zavala (1993), propiedades como la estructura y la textura, no son afectadas por derrames de hidrocarburos, ya que ésta es consecuencia del material de depósito aluvial que aportan los ríos.

Por otra parte, la contaminación del suelo por hidrocarburos puede incrementar el carbono orgánico por procesos de oxidación y modificar la estructura del suelo por la ruptura de agregados (Eliás-Murguía y Martínez, 1991); sin embargo, Varela *et al.* (1990) y Zavala (1990) reportan la degradación de materia orgánica en suelos con derrames de petróleo. Eliás-Murguía y Martínez (1991), detectaron alteraciones en la capacidad de intercambio catiónico inducido por la pérdida de bases y la acidificación del suelo, debida a la acumulación de carbono orgánico y bloqueo del intercambio de gases con la atmósfera, causando la muerte o disminución de bacterias, hongos y nemátodos (Segal y Minernelli, 1987).

En lo que respecta a los valores de densidad real y aparente de un suelo, estos dependen de su composición. Así, en la mayoría de los suelos minerales, el valor de la densidad real no sobrepasa los 2.65 g/ml. Mientras que en los suelos con grandes cantidades de minerales pesados como magnetita, epidota, zircón, turmalina y hoblenda puede sobrepasar a dicho valor. La materia orgánica así como algunos vidrios volcánicos, repercuten en los valores de densidad, originando valores que varían de 1.2 – 1.5 g/ml (Foth, 1990). El valor determinado para el suelo estudiado (1.06 g/ml) se encuentra ligeramente por debajo de este rango, debido a la adición de hidrocarburos, ya que estos provocan una disminución en la densidad de las partículas del suelo (Zavala, 1993). Por otra parte, los suelos orgánicos, tiene una densidad aparente muy baja en relación a la de los suelos

minerales. Existe una variación considerable en esta densidad, dependiendo de la naturaleza de la materia orgánica. Son comunes valores en el rango de 0.1 a 0.6 g/ml en este tipo de suelos.

Un efecto indirecto de la presencia de hidrocarburos en el suelo es la disminución de la disponibilidad de ciertos nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, debido a la acidificación del suelo; ya que por una parte, la máxima disponibilidad del nitrógeno se encuentra entre un pH de 6 a 8, debido a que este es el rango más favorable para el desarrollo de los microorganismos que mineralizan el nitrógeno de la materia orgánica y para aquellos que fijan el nitrógeno simbióticamente. Por otra parte, la máxima disponibilidad del fósforo está en el rango de pH de 7.5 a 6.5; un pH por debajo de 6.5, es asociado con un incremento de hierro y aluminio en solución y la formación de fosfatos de hierro y aluminio relativamente insolubles (Foth, 1990). Aunado a esto, Reid *et al.* (2000), menciona que la disponibilidad del nitrógeno para las plantas, se puede ver disminuida por la presencia de bacterias degradadoras de hidrocarburos, las cuales usan el nitrógeno en su metabolismo.

En cuanto al análisis cromatográfico de la muestra de suelo contaminado, éste reveló la ausencia de hidrocarburos de bajo peso molecular, tanto alifáticos como aromáticos, debido a que se encuentran en niveles por debajo del límite de detección del equipo (<0.01 µg/g). Esta ausencia es atribuible a que son compuestos que se pierden con facilidad por procesos de evaporación u oxidación fotoquímica, sobre todo en regiones tropicales con temperaturas elevadas y largos fotoperíodos (Botello *et al.*, 1993). Cole (1994), menciona que los hidrocarburos alifáticos presentes en la gasolina, se adsorben a las partículas del suelo en una proporción menor al 1%, mientras que se volatilizan entre un 90 y 95% y se disuelven en una proporción del 4% en el agua subterránea.

Por otro lado, sobresalen por su concentración los compuestos aromáticos de 4 y 5 anillos, siendo el indeno(1,2,3-cd)pireno, el benzo(g,h,i)perileno y el dibenzo(a,h)antraceno los que en orden decreciente, registraron las concentraciones más altas. La presencia de HAPs de alto peso molecular indica que el origen de estos contaminantes es debido a la combustión incompleta de los hidrocarburos fósiles (pirólisis), derivadas de las actividades petroleras e industriales; aunado a esto, se observó que las concentraciones de HAPs tienden a incrementarse hacia los compuestos de mayor peso molecular, como pireno, benzo(k)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo

(g,h,i)pirileno, indeno(1,2,3-cd)pireno, lo cual es típico de una contaminación crónica de derivados del petróleo (Colombo, 1989; Díaz-González *et al.*, 1995).

En general los hidrocarburos pesados penetran más lentamente en el suelo, que los livianos, en relación con el tamaño de grano; el crudo penetra vertical y se ensancha rápidamente en arenas, mientras que las texturas finas e impermeables frenan y detienen la infiltración (Toledo, 1982). En primera instancia, la textura gruesa del suelo que se estudio, permitirá una migración relativamente rápida de los hidrocarburos, sin embargo, el alto contenido de materia orgánica juega un papel importante en la retardación de la migración de estos contaminantes (Dzombak y Luthy, 1984).

Los hidrocarburos del petróleo que se encuentran contaminando el suelo, son una mezcla compleja presente en diferentes estados físicos, debido a su insolubilidad en agua. Los hidrocarburos se distribuyen en las diferentes capas del suelo, encontrándose en cualquiera de las siguientes fases:

- (a) vapor;
- (b) volumen líquido;
- (c) hidrocarburos adsorbidos;
- (d) acuosa o disuelta.

En la fase de vapor, los hidrocarburos se distribuyen en los espacios intersticiales de la zona de vadosa que no han sido ocupados por agua o por hidrocarburos en estado líquido (Cole, 1994).

Por otra parte, cabe señalar que las concentraciones detectadas de fenantreno, fluoranteno, benzo(a)antraceno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno y benzo(g,h,i)pirileno se encuentran muy por arriba de los límites máximos permisibles (LMP) determinados por Kalf *et al.* (1997), del Instituto Nacional de Salud Pública y del Ambiente de los Estados Unidos de América; mientras que el naftaleno, antraceno y criseno se encontraron en concentraciones por debajo de los límites máximos permisibles determinados por los mismos autores.

Respecto a las determinaciones de metales pesado, todos los suelos naturalmente contienen niveles trazas de metales; por lo tanto, la presencia de metales en el suelo no es indicativo de contaminación. La presencia de metales en suelos no contaminados es primeramente

relacionado a la geología del material parental del cual se formó el suelo. Dependiendo de la geología local, la concentración de metales en el suelo, podría exceder los rangos que proponen autores como Lindsay (1979) para suelos no contaminados.

El hecho de que las concentraciones detectadas en el suelo contaminado con hidrocarburos, se encuentren por debajo de los valores promedio, reportados para suelos no contaminados, puede atribuirse a que los metales asociados con la fase acuosa del suelo están sujetos al movimiento del agua, y pueden ser transportados a través de la zona de vadosa hasta el manto freático (McLean y Bledsoe, 1996); lo que hace difícil detectarlos en las capas superiores del suelo. Por otra parte, algunos metales, tales como el Cr, As, Se y Hg, pueden ser transformados a otros estados de oxidación, reduciendo su movilidad y toxicidad en el suelo (McLean y Bledsoe, 1996).

Evaluación toxicológica

Bacillus cereus

En lo que se refiere a *Bacillus cereus*, el valor de la concentración inhibitoria al 50% (82.35%), permite ubicar al suelo como ligeramente tóxico dentro de la clasificación que hacen Dombrozki *et al.*, (1991). La escasa toxicidad del suelo para los microorganismos de prueba, se puede explicar con base en la investigación realizada por Hatzinger y Alexander (1995), quienes demostraron que la mineralización de algunos HAPs decrece significativamente con el tiempo; así como su toxicidad, debido a que los compuestos se vuelven menos biodisponibles. Esto es debido a la difusión de los contaminantes en los microporos del suelo; por la partición en la materia orgánica; por la fuerte adsorción superficial en las partículas del suelo (materiales arcillosos principalmente) o a la combinación de estos procesos (Brusseau, *et al.* 1991).

Los microorganismos y los contaminantes se encuentran distribuidos entre las fases sólida, líquida y gaseosa del suelo. Muchos contaminantes orgánicos son hidrofóbicos y tienden a adherirse en las partículas del suelo, de tal manera que solo una pequeña fracción del compuesto podría encontrarse en la fase acuosa. Además, procesos tales como la adsorción o la volatilización que disminuyen la concentración de los contaminantes en la solución tiende a reducir la tasa de biotransformación y su toxicidad (Weissenfels *et al.*, 1992; Tang *et al.*, 1998).

Por otra parte, la acumulación de contaminantes en fisuras y cavidades los hace inaccesibles a los microorganismos y sus enzimas (Bouwer y Zehnder, 1993).

Dermer *et al.*, (1980) resumió la literatura sobre la deshidrogenasa como indicador de la actividad microbiana en ambientes acuáticos, concluyendo que todos los reportes muestran una correlación positiva. Sin embargo otros investigadores no encontraron correlación entre la actividad deshidrogenasa y la actividad microbiana en el suelo. Esto demuestra que el suelo es un sistema mucho más complejo que los ambientes acuáticos (Bitton y Koopman, 1986).

Finalmente, ya que la interacción entre el tóxico y la enzima frecuentemente resulta en la inhibición de la actividad enzimática (lo cual eventualmente lleva a la muerte al organismo) y que las deshidrogenasas son incluidas en reacciones anabólicas y catabólicas vitales, resultaron ideales para su uso en estudios de toxicidad.

Plantas terrestres

El efecto que producen las diferentes concentraciones de suelo contaminado sobre la germinación y en los primeros estadios de desarrollo de las plantas utilizadas, ofrece una visión amplia sobre el comportamiento tóxico de las mezclas de contaminantes que pueden encontrarse en zonas con una importante actividad industrial y permite establecer rangos de "limpieza" cuando se planea la remediación de dichos sitios. Sin embargo, se deben utilizar parámetros más sensibles como la reproducción y la estructura de la comunidad, que junto con los análisis químicos puede dar resultados más reales en un análisis de riesgo; esto debido a que las propiedades físicas químicas y biológicas del suelo remediado podrían cambiar durante el proceso, debido a la transformación y mineralización de los contaminantes que tiene lugar en el suelo (Haimi, 2000). En adición el suelo podría contener otras sustancias peligrosas que no se hayan hecho evidentes en el análisis químico.

En condiciones favorables, al hidratarse las semillas de las plantas, presentan cambios e inician su metabolismo, transporte de nutrientes y división celular. Durante este período, la semilla tiene una alta sensibilidad que compromete su capacidad germinativa cuando se ve sometida al estrés ambiental como el provocado por los hidrocarburos, ya que estos reducen la capacidad de

almacenar agua en el suelo y dan lugar a una baja disponibilidad de oxígeno, siendo estos factores tan importantes para iniciar el proceso de germinación (Wise y Trantolo, 1994). Por otra parte, las semillas son capaces de adsorber contaminantes de origen orgánico, pudiendo ocurrir ésto antes o después de iniciada la germinación. La adsorción de los contaminantes en la superficie de las semillas, aumenta la posibilidad de absorción, la cual tiene lugar por procesos no metabólicos cuando la semilla es embebida en agua o a través de procesos de difusión (Pierzynski *et al.*, 1994).

La inhibición del proceso de germinación debida a la contaminación por hidrocarburos puede variar de una especie a otra (Salanitro *et al.*, 1997), como en el caso de las especies utilizadas en este trabajo, en donde *Phaseolus vulgaris* resultó ser más sensible a la contaminación que *Triticum aestivum* y *Zea mays*, registrando esta última porcentajes altos de germinación en todas las concentraciones de suelo contaminado. Los resultados para *Z. mays* tienen concordancia con los obtenidos por Cervantes (1999) quien reporta como no afectada la germinación de *Z. mays* a diferentes concentraciones de diesel en un suelo contaminado artificialmente. Por otra parte Amakarí y Onofeghara, (1984), observaron una inhibición de la germinación de las semillas de maíz, la cual atribuyeron a la hidrofobicidad del petróleo que origina una restricción en la disponibilidad de agua y oxígeno necesarios para su germinación; sin embargo los autores no discuten la posibilidad de que el petróleo pueda penetrar la cubierta de las semillas y tener un efecto tóxico en los embriones

Por otra parte, el efecto de la contaminación sobre el desarrollo de las plántulas fue mayor en las de *P. vulgaris*, donde se observó amarillamiento y marchitez de las hojas, además de hojas abortadas. Para *T. aestivum* los efectos sobre el crecimiento del tallo y raíz fueron significativamente diferentes en las distintas diluciones de suelo contaminado, observándose un efecto de estimulación en las concentraciones más altas, en donde el rango de crecimiento fue mayor tanto para la raíz como para el tallo, sin llegar a observarse síntomas de toxicidad por exceso o carencia de algún elemento o por estrés hídrico. Esto debido a que el tiempo que dura la prueba (21 días) es muy corto respecto al ciclo de vida de la planta; por lo cual se deben considerar pruebas de toxicidad crónica que permitan evaluar el rendimiento biológico de la planta, teniendo en cuenta si alcanzan o no la madurez sexual y la producción de semillas. El efecto observado en *Z. mays* fue muy similar a la respuesta de *T. aestivum*, lo que lleva a

considerar a las monocotiledóneas como plantas de mayor resistencia a las adversidades ambientales y por lo tanto como candidatas para trabajos de fitorremediación.

Según Bromilow y Chamberlain (1995), la propiedad más importante que controla el movimiento de los compuestos químicos en las plantas, es la lipofilicidad, la cual determina la facilidad de movimiento a través de las membranas de la planta y, por ejemplo, determina el potencial de transportar a largas distancias via xilema o floema. Otras propiedades de los compuestos químicos, tales como la presencia de grupos funcionales particulares o el peso molecular, parece tener poca influencia en la partición sistémica de los contaminantes.

Un contaminante derramado en el suelo esta sujeto a procesos de sorción y pérdida, lo cual limita la cantidad de contaminante disponible para ser absorbido por las plantas (Alexander, 1995). La degradación junto con la volatilización son considerados como procesos de pérdida. La sorción de los compuestos químicos como la distribución en la fase agua-sólido es generalmente proporcional a la lipofilicidad de los compuestos y a la cantidad de materia orgánica en el suelo (Bromilow y Chamberlain, 1995). Walker (1972) (citado por Bromilow y Chamberlain, 1995), mostró que la absorción de la atrazina dentro del tallo de *Triticum aestivum*, creciendo en 12 diferentes suelos fue proporcional a la concentración de atrazina estimada en el agua del suelo; encontro que la absorcion de atrazina disminuyo con el incremento de la proporción de materia orgánica presente en el suelo. Este comportamiento se observó en este trabajo en el que el control no observa una diferencia significativa con los diferentes tratamientos, en la mayoría de los casos, siendo aún más parecida la respuesta entre el control y el tratamiento con mayor contenido de contaminante, en donde también el contenido de materia orgánica fue mayor que en los tratamientos con menor concentración de contaminantes.

Es importante determinar que tipo de especies vegetales en particular, dominan una comunidad cuyo hábitat ha sido alterado por contaminación, ya que éstas pueden estar menos limitadas por su capacidad de resistencia a este tipo de contaminantes y desarrollarse colonizando un hábitat con condiciones ambientales adversas (Cunningham y William, 1993; Wardle y Griller, 1996), adaptación que puede ser aprovechada en la recuperación de sitios contaminados (Fitorremediación).

Eisenia foetida

Por otra parte, el suelo resultó ser muy tóxico para *E. foetida*, ya que a los siete días el 50 % de mortalidad de los organismos se registró en la concentración de 4.1 % de suelo contaminado; desplazándose, este valor por debajo de la concentración más baja de suelo (1.5 %) hacia los 14 días. Tales resultados muestran la sensibilidad de este tipo de organismos, en los cuales, los contaminantes tienen dos vías de entrada; una en la que las sustancias tóxicas son absorbidas por la boca dando como resultado una respuesta tóxica rápida y prolongada. Sin embargo, la interacción química de una sustancia tóxica con otros componentes del contenido gastrointestinal pueden alterar su disponibilidad (Duffus, 1983). La segunda vía de acceso de los contaminantes a la lombriz de tierra, es la piel, en donde la principal barrera frente a la absorción es la epidermis. Esta está compuesta principalmente de lipoproteínas y sólo compuestos lipídicos solubles pueden atravesarla con facilidad, siendo éste el caso de los hidrocarburos; los cuales además evitan la difusión de agua a través de la piel, originando un estrés hídrico importante.

Salanitro *et al.* 1997, utilizaron a *E. foetida* como parte de una batería de prueba, para evaluar la toxicidad de dos suelos con diferentes contenidos de materia orgánica y contaminados artificialmente con petróleo crudo. La respuesta de *E. foetida* fue de una menor sobrevivencia en el suelo con menor contenido de materia orgánica; mientras que los valores fueron mayores en el suelo rico en materia orgánica. El valor de sobrevivencia alcanzó el 100% a la tercer semana de tratamiento, en el suelo con mayor contenido de materia orgánica; mientras que en el primero, la sobrevivencia fue del 100% sólo después de 8 semanas de tratamiento. Los autores explican este hecho debido a que el alto contenido de materia orgánica permitió una rápida degradación de los contaminantes o bien una fuerte adsorción de los mismos en las partículas del suelo, reduciendo su biodisponibilidad.

Los procesos que limitan la biodisponibilidad de los contaminantes del suelo son tan importantes como los procesos que afectan la absorción en el cuerpo, ya que aquellos podrían considerablemente limitar la cantidad de químico disponible para ser absorbido (Edmisten y Hull, 1991).

Los factores que afectan la biodisponibilidad dermal comprende diferentes procesos, incluyendo:

- sorción de los contaminantes en el suelo
- desorción de los contaminantes de las partículas del suelo, y
- transferencia de masas del contaminante de la fase acuosa del suelo y/o partículas húmedas del suelo sobre la piel o directamente a la epidermis.

Sistema de estudio

La batería de prueba utilizada para la evaluación de la toxicidad en un suelo que ha sido contaminado por la industria de la refinación del petróleo resultó ser muy adecuada, ya que permitió observar el comportamiento que pueden tener los contaminantes orgánicos en diferentes niveles de la cadena trófica. Sin embargo ésta viene a ser la primera fase en la evaluación de un sitio contaminado, ya que solo se detectan efectos a corto plazo que pueden llevar a conclusiones erróneas si se comparara con pruebas de toxicidad crónica.

En el caso de lombrices se debe evaluar el efecto de la contaminación sobre la fecundidad y la sobrevivencia; mientras que para las plantas, los efectos de los contaminantes se harían más evidentes si se permite que alcancen la madurez sexual y lleguen a la producción de semillas. Para evaluar el efecto del contaminante se deben tomar en cuenta la biomasa (peso seco) y la cobertura foliar, además de la longitud del tallo y la raíz, de cada una de las plantas y en diferentes estadios de desarrollo para establecer etapas críticas o de susceptibilidad de las plantas ante los contaminantes existentes en el suelo.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos planteados y de acuerdo con los resultados obtenidos, se presentan las siguientes conclusiones:

El suelo estudiado presentó un tipo textural franco arenoso, con un alto contenido de materia orgánica y humedad. Un pH ácido y un bajo contenido de nitrógeno y fósforo, esto último como consecuencia de la adición de hidrocarburos en el suelo.

Los hidrocarburos que se encontraron en mayor proporción fueron los alifáticos del C18 al C25, dominando el C25; mientras que de los aromáticos prevalecieron los de 4 y 5 anillos, lo cual indica que son suelos intemperizados dada la presencia de dichos compuestos recalcitrantes de alto peso molecular.

Los valores detectados de metales pesados son bajos, lo que descarta una contribución importante a la toxicidad del suelo.

En términos de la CL₅₀, *E. foetida* resultó ser el organismo más sensible a la concentración de hidrocarburos presentes en el suelo, considerándose como muy tóxico para este tipo de organismos.

En términos de la IC₅₀, el suelo fue ligeramente tóxico para *B. cereus*.

De las plantas utilizadas, *T. aestivum* presentó una menor variación en su respuesta individual hacia la contaminación del suelo, mientras que *Z. mays* y *P. vulgaris* presentan una mayor variación individual en su respuesta a la contaminación.

La sensibilidad de los organismos a la contaminación del suelo fue de la siguiente manera:

Lombrices > bacterias > plantas

RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta primera aproximación a la evaluación de suelos contaminados se ve la necesidad de realizar pruebas de toxicidad crónica que permitan una mejor apreciación de los efectos que pueden tener los contaminantes orgánicos, como los hidrocarburos, sobre las diferentes comunidades edáficas a largo plazo.

Por otra parte es muy recomendable la realización de ensayos multiespecies, que permitan determinar los sinergismos o antagonismos que pudieran establecerse entre las diferentes comunidades edáficas.

Ya que en este trabajo no se observaron efectos significativos de los contaminantes determinados, sobre los primeros estadios de desarrollo de *T. castivum* y *Z. mays*, ambas monocotiledoneas, se recomienda realizar bioensayos a largo plazo para una evaluación de su posible aplicación en sistemas de fitorremediación, para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos u otros contaminantes orgánicos.

Se recomienda también que los programas de evaluación de riesgo en suelos incluyan la realización de pruebas toxicológicas, que permitan establecer límites máximos permisibles lo más cercanos a la realidad posible.

BIBLIOGRAFÍA

- Amakiri, J. O. y F. A. Onofeghara. 1984. Effect of Crude Oil Pollution on the germination of *Zea mays* and *Capsicum frutescens*. *Env. Pollut.* 35: 159-162.
- Abdul Rida, A. M. M y Bouché M. B. 1997. Earthworm Toxicology: From Acute to Chronic Tests. *Soil Biol. Biochem.* 29: 699-703.
- Aguilar, S. A., J. Etchevers D. y J. Castellanos Z. 1987. *Análisis Químico para Evaluar la Fertilidad del Suelo*. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Chapingo, México. Pp. 85-91.
- Aguilera, C. M. y R. E. Martinez. 1996. *Relaciones Agua-Suelo-Planta-Atmósfera*. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. Pp. 66-163.
- Albers, H. P. 1995. Petroleum and Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Pp 330-355. In: Barnett A. R., G. Allen y B. Jhon (Eds). *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publishers. Boca Raton.
- Albert, L. 1990. *Curso básico de Toxicología ambiental*. Limusa. México. 280 pp.
- Alexander, M. 1990. *Introducción a la Microbiología del Suelo*. AGT. Editor, S.A. México. Pp 219-238.
- Alexander, M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press. S. D. California. Pp 196-217, 248-268.
- Alexander, M. 1995. How Toxic are Toxic Chemicals in Soil? *Environ. Sci. Technol.* 29: 2713-2717.
- Anderson, T. A., E. A. Guthrie y B.T. Walton. 1993. Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 27: 2630-2636.

Amon, I. 1972. *Crop Production in Dry Regions. Vol I. Background and Principles*. Leonard Hill Books. Londres, Gran Bretaña. 650 p.

Atlas, R. M. y R. Bartha. 1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An environmental Perspective. *Microbiol. Rev.* 45: 180-209.

Bartha, R. 1982. *Pesticide Effects on Non-target Microorganisms in Agricultural Soils*. Technical Paper 107, pp6-10. US Fish and Wildlife Service Washington, D.C.

Bartha, R. 1986. Biotechnology of Petroleum Pollutant Biodegradation. *Microb. Ecol.* 12: 155-172.

Bauer, C. y J. Römbke. 1997. Factors influencing the Toxicity of Two Pesticides on Three Lumbricid Species in Laboratory Test. *Soil Biol. Biochem.* 29: 705-708.

Beyer N. W., y L. Greg. 1995. Making Sense of Soil Ecotoxicology. Pp 104-116. In: Barnett A. R., G. Allen y B. John (Eds.) *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publishers. Boca Raton.

Bitton G. y B. Koopman. 1986. Biochemical Test for Toxicity Screening en Toxicity. Pp 27-55. In: Bitton G. y B. J. Dutka (Eds). *Testing Using Microorganisms. Vol. 1*. CRC Press. Boca Raton.

Bollag, J. M. y S. Y. Liu. 1990. Biological Transformation Processes of Pesticides. In: H. H. Cheng (Ed.). *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modeling*. Soil Science Society of America, Madison, WI. 193 p.

Bossert, I. D. y R. Bartha. 1984. The Fate of Petroleum in Soil Ecosystems. Pp. 435-473. In: Atlas, R. (Ed.) *Petroleum Microbiology*. Macmillan. USA.

Botello, A.V. 1978. Presencia de hidrocarburos fósiles en ecosistemas estuarinos del Golfo de México. *Rev. Biol. Trop.* 26: 135-151.

Botello A. V. 1996 Características, Composición y Propiedades Físicoquímicas Del Petróleo. Pp 203-210. In: Botello V. A., J. L. Rojas, J. A. Benítez, D. Zarate (Eds). *Golfo De México, Contaminación e Impacto Ambiental. Diagnóstico y Tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche. Epomex. Sep.

Botello A. V., G. Díaz, S. Villanueva y S. L. Salazar. 1993. Presence of PAHs in Coastal environments of the Southeast Gulf of Mexico, México. *Polycyc. Arom. Comp.* 3: 397-404.

Botello, A. V. y F. Paez. 1987. *El Problema crucial: la contaminación*. Serie Medio Ambiente en Coatzacoalcos (1). Centro de Ecodesarrollo. México. 180 p.

Botello, A. V., y S. Villanueva. 1987. Evaluación geoquímica del río Calzadas: los impactos del petróleo. In: Toledo, A. V. Botello y M. Herzing (Eds). *El pantano: una riqueza que se destruye*. Serie Medio Ambiente en Coatzacoalcos. Centro de Ecodesarrollo. México. 185 p.

Bouwer, J. E. y A. J. B. Zehnder. 1993. Bioremediation of Organic Compounds-Putting Microbial Metabolism to Work. *Tibtech.* 11: 360-367.

Bouyoucos, G. J. 1962. Hydrometer Improved Method for Making Particles Size Analysis of Soil. *Agron. J.* 54: 464-465

Bray, R. H. y L. T. Kurtz. 1945. Determination of Total Organic, and Available forms of Phosphorus in Soils. *Soil. Sci.* 59: 39-45.

Brusseau, M. L., R. E. Jessup y P. S. Rao. 1991. Nonequilibrium Sorption of Organic Chemicals: Elucidation of Rate Limiting Processes. *Environ. Sci. Technol.* 25 :134-142

Bromilow, H. R. y K. Chamberlain. 1995. Principles Governing Uptake and Transport of Chemicals. Pp 37-68. In: Trapp. S. y C. Mc Farlane (Eds.) *Plant Contamination: Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*. Lewis Publishers. USA.

Calabrese, E. J. y P. T. Kostecki. 1992. *Hydrocarbon Contaminated Soil and Groundwater*. Lewis Publisher. USA. Pp 409-415.

Carmichael, M. L., R. F. Christman y F. K. Pfaender. 1997. Desorption and mineralization Kinetics of Phenanthrene and Chrysene in Contaminated Soils. *Environ. Sci. Technol.* 31:126-132.

Cole, G. M. 1994. *Assessment and Remediation of Petroleum Contaminated Sites*. Lewis Publishers. USA. Pp. 37-90.

Colombo, C. J., P. Emilien., B. Charles y M. Khalil. 1989. Determination of Hydrocarbon Sources Using N-Alkane and Polyaromatic Hydrocarbon Distribution Indexes. Case Study: Rio De La Plata Estuary, Argentina. *Environ. Sci. Technol.*, 23: 888-894.

Conell, W. D. y G. Miller. 1984. *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*. John Wiley and Sons. USA. 444 pp

Cunningham, D. S. y D. W. Ow. 1996. Promises and Prospects of Phytoremediation. *Plant. Physiol.* 11:715-719.

Cunningham, D. S. y R. B. William. 1993. Remediation of Contaminated Soil whit Green Plants: an Overview. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 29: 207-212.

Cervantes, D. F. 1999. Estudios de Ecotoxicidad, Biorremediación y fitobiorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos (Diesel). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 54 p.

Daniel, O. y J. M. Anderson. 1992. Microbial Biomass and Activity in Contrasting Soil Materials after Passage through the Gut of Earthworm *Lumbricus rubellus hoffmeister*. *Soil Biol. Biochem.* 24: 465-470

Dec, J. y J. M. Bollag. 1997. Determination of Covalent and no Covalent Binding Interactions between Xenobiotic Chemicals and Soils. *Soil Sci.* 162: 858-873.

DeJong, E. 1986. The Effect of crude oil spill on cereals. *Environ. Pollut.* 22: 187-196

Dermer, O. C., V. S. Curtis, y F. R. Leach. 1980. *Biochemical Indicators of Subsurface Pollution*. Ann Arbor Science, Ann Arbor Mich. 58 p.

Díaz-González G., J. Cámara-Córdoba, A. V. Botello y G. Ponce. 1995. Evaluación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en Suelos Hidromórficos de la Reserva de la Biosfera "Los Pantanos de Centla" en Tabasco, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 12: 15-21.

Dombrozki, E. C., I. D. Gaudet, y A. A. Queshi. 1991. In: *Proceedings of the 17th Annual Aquatic Toxicity Workshop*. Vol. 1; Vancouver, B. C. pp 478-494.

Duffus. H. J. 1983. *Toxicología Ambiental*. Omega. España. 173 p.

Dwijen, K. y R. Murray. 1997. Analysis of hidrocarbon contaminated soil by thermal extraction gas chromatography. *Environ. Sci. Technol.* 31:646-650.

Dzomback, D. A. y R. G. Luthy. 1984. Estimating Adsorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Soils. *Soil Sci.* 137: 292-307

Edmistein, W. G y R. W. Hull. 1991. Factors Affecting the Dermal Bioavailability of Hydrocarbons in Soil: Applicability to Human Health Risk Assessment. Pp. 541-554. In: *Hydrocarbon Contaminated Soil*. Vol. 1. Calabresse J. E. y P. F. Kostecki (Eds.). Lewis Publishers.

Edwards, C. A. 1983. *Report of the Second Stage in development of a estandardized Laboratory Method for Assessing the Toxicity of Chemical Substances for Earthworms*. Commission of the European Communities, DOC. XI/83/700, Brussels.

European Economic Community. 1985. EEC Directive 79/831. Anexo V, Parte C. *Methods for Determination of ecotoxicity*. Nivel I. C(II)4: Toxicity for Eartworm. Artificial soil test. DG XI/128/82.

Ellas-Murguía, R. L. y V. Martínez. 1991. Suelos Contaminados con Hidrocarburos. Pp. 46-93. In: F.J. F. Ruiz (Ed.) *Causas y Consecuencias de la Contaminación del suelo, mesa redonda*. Depto. de Suelos. UACH. Chapingo.

Environmental Protection Agency. 1982. *Petroleum Hydrocarbon Total Recoverable, Spectrophotometric Infrared*, Method 418.1 for Chemical Analysis. Cincinnati, Ohio.

Environmental Protection Agency. 1986. *Test Methods for Evaluating Solid Wastes; Soxhlet Extraction*, Method 3540. Washington, D.C.

Ferrière, G.,L. Fayolle y M. B. Bouché. 1981. Un Noevel Outil, Essentiel pour l'écophysologie et l'écotoxicologie: l'élevage des lombriciens en sol artificiel. *Pedobiologia*. 22: 196-201.

Fletcher, R. D. 1994. Practical Considerations During Bioremediation. Pp. 39-55. In: Wise, D. L. y D. J. Trantolo (Eds.). *Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soils*. MerceL Dekker, Inc. N. Y, USA.

Food and Drug Administration. 1987. Seed Germination and Root Elongation. Section 4.06. In: *Environmental Assessment Technical Handbook*. US Departamnt of Health and Human Service, Food and Drug Administration, Center of Food Safety and Applied Nutrition, and center for veterinary Medicine, Washington, D.C.

Foth, D. H. 1990. *Fundamentals of Soil Science*. John Wiley and Sons. USA. 360 pp.

Frankenberger, T. W., y J. B. Johanson. 1982. Influence of Crude Oil and Refined Petroleum Products on Soil Dehydrogenase Activity. *J. Environ. Qual.* 11: 602-607.

Gallegos, M. 1986. *Petróleo y Manglar*. Serie Medio Ambiente en Coatzacoalcos (3). Centro de Ecodesarrollo. México. 103 p.

González, E. C. 1990. Determinación de niveles de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en sedimentos recientes de la plataforma continental de los estados de Tabasco y Campeche, México. ENEP-Zaragoza, UNAM. México. 108 p. Tesis de Licenciatura.

Grimmer, G. 1984. *Environmental Carcinogens: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. CRC Press. Florida, USA. pp. 44-46.

Haimi, J. 2000. Decomposer Animals and Bioremediation of Soils. *Environ. Pollut.* 107: 233-238.

Hatzinger B. P. y M. Alexander. 1995. Effect of Aging of Chemicals in Soil and Their Biodegradability and Extractability. *Environ. Sci. Technol.* 29:537-545.

Heimbach, F. 1984. Correlation between three methods for determining the toxicity of chemicals for earthworm. *Pest. Sci.* 15: 605-611.

Heimbach, F. 1992. In: Becker, H., P. J. Greig-Smith y Heimbach F. (Eds.) *Ecotoxicology of Earthworm*. Intercept Press, Andover, Hants, UK.

Hernández Acosta E. 1997. Influencia de un Complejo de Hidrocarburos en Poblaciones Rizosféricas y en el Crecimiento del Frijol Variedad Michoacán 12-A3. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 150 pp.

Hsiao, T. C., E. Acevedo, E. Fereres y D. W. Henderson. 1976. Water Stress, growth and osmotic adjustment. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 273: 479-500.

Hsiao, T. C. 1973. Plant Responses to Water Stres. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 24:519-570.

Instituto Nacional de Ecología. 1996. *Programa para la Minimización y Manejo Integral de Residuos Industriales Peligrosos en México*. Dirección General de Residuos Materiales y Riesgo. INE-SEMARNAP. México.

Iturbe, A. R., C. Flores, C. Chávez, A. Castro y D. Rodríguez. 1999. Saneamiento de Sitios Contaminados. *GEO UNAM*. 5: 40-45.

Jackson, M. L. 1976. *Análisis químico de suelos*. Omega. Barcelona.

Joergensen, R. G., J. Schmaedeke, K. Windhoust y B. Meyer. 1995. Biomass and Activity of Microorganisms in a Feul Contaminated Soil. *Soil Biol. Biochem.* 27: 1137-1143.

Komoβα, D., C. Langebartels, H. Sanderman Jr., H. R. Bromilow, y K. Chamberlain. 1995.. Metabolic Processes for Organic Chemicals in Plants. Pp 69-103. In: Trapp. S. y Mc Farlane C. (Eds.). *Plant Contamination: Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes*. Lewis Publishers. USA.

Kalf, F. D., T. Crommentuijn y E. J. van de Plassche. 1997. Environmental Quality Objectives for 10 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *Ecotox. Environ. Saf.* 36: 89-97.

Koons, C. B. 1973. Chemical Composition: a Control on the Physical and Chemical Processes acting on Petroleum in the Marine Environment. In: *Background Papers for a Workshop on Inputs, Fate and Effects of Petroleum in the Marine Environment*. Vol. II. National Academy of Sciences. Washington. D.C. USA.

Kramer, P. J. 1983. *Water Relations of Plants*. Academic Press, Inc. New York. Pp 25-56.

Kwan, K. K., y B. J. Dutka. 1992. Evaluation of Toxi-Chromotest Direct Sediment Toxicity Testing Procedure and Microtox Solid-Phase Testing Procedure. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 49:656-662.

- Larson, A. R. y E. J. Weber. 1994. *Reaction Mechanisms in Environmental Organic Chemistry*. Lewis Publishers. USA. Pp. 60-67.
- Lindsay, W. L. 1979. *Chemical Equilibria in Soils*. John Wiley and Sons. USA. 325 p.
- Liu, D., y J. D. Strachan. 1981. A Rapid Biochemical Test for Measuring Chemical Toxicity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 26: 145-149.
- Liu, D. 1985. Effect of Bacterial Cultures on Microbial Toxicity Assessment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 331-339.
- Liu, D. 1989. A rapid and simple biochemical test for direct determination of chemical toxicity. *Tox. Assess.* 4:399-404.
- Mahendru. P. y P. S. Dubey. 1987. Herbicide Toxicity and Microbial Responses in Soil. *Toxicity Assess.* 2: 167-174.
- Maxin, R. C. y I. Kögel-Knabner. 1995. Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) to Water-Soluble Soil Organic Matter. *Europ. J. Soil. Sci.* 46: 193-204.
- McCarthy, J. F., y B. D. Jiménez. 1985. Interactions Between Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Dissolved Humic Material : Binding and Dissociation. *Environ. Sci. Technol.* 19: 1072-1076.
- McLean, E. J y Bledsoe E. B. 1996. Behavior of Metals in Soils. Pp. 19-55. In: Russell J. B. (Ed.) *EPA Environmental Assessment Sourcebook*. Ann Arbor Press. USA. 386 p.
- Means, J. C., S. G. Wood, J. J. Hasset y W. L. Banwart. 1980. Sorption of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons by Sediments and Soils. *Environ. Sci. Technol.* 14: 1524-1528.

- Neuhauser, E. F. y C. Callaham. 1990. Growth and Reproduction of The Earthworm *Eisenia Foetida* Exposed to Sublethal Concentrations of Organic Chemicals. *Soil Biol. Biochem.* 22: 175-179.
- Nichols, T. D., D. C. Wolf, H. B. Rogers, C. A. Beyrouly y C. M. Reynolds. 1997. Rhizosphere Microbial Populations in Contaminated Soils. *Water, Air, and Soil Pollution.* 95: 165-178.
- Nirmalakhandan, N., V. Arulganendran, M. Mohsin, B. Sun y F. Cadena. 1994. Toxicity of Mixtures of Organic Chemicals To Microorganisms. *Wat. Res.* 28: 543-551.
- Organization For Economic Cooperation And Development. 1984. *OECD Guideline For Testing Of Chemicals. Guideline 207 "Earthworm, Acute Toxicity Test"*. Paris, Francia, 9 pp
- Organization For Economic Cooperation And Development. 1984. *OECD Guideline For Testing Of Chemicals. Guideline 208 "Terrestrial Plants, Growth Test"*. Paris, Francia, 6 pp
- Páez-Osuna F. 1996. Fuentes de Metales en la Zona costera Marina. Pp. 297-308. In: A.V. Botello, J.L. Rojas-Galviz, J. A. Benítez, D. Zárate-Lomeli (Eds). *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX. Serie Científica, 5. 666 p.
- Pierzynski, M. G., T. J. Sims y F. G. Vance. 1994. *Soils and Environmental Quality*. Lewis Publishers. USA. PP 20-39 y 185-200.
- Pignatello, J. J. 1991. Sorption Dynamics of Organic Compounds in Soils and Sediments. Pp 45-80. In: *Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils*. Sawhney, B. L., Brown, K. (Eds.) Soil Science Society of America: Madison, WI.
- Pignatello, J. J. y B. Xing. 1996. Mechanisms of Slow Sorption of Organic Chemicals to natural Particles. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1-11

Pollard, J. S., Hrudey E. S., Furh J. B., Alex F. R., Holloway R. L. y tosto F. 1992. Hydrocarbon Wastes at Petroleum and Creosote Contaminated Sites : rapid Characterization of component Clases by thin layer chromatography with Flame Ionozation Detection. *Environ. Sci. Technol.* 67: 2528-2534.

Ragle, S. C., R. R. Engebretson y R. Von Wandruszka. 1997. The Secuestration of Hydrophobic Micropollutants by Dissolved Humic Acids. *Soil Sci.* 162: 106-113.

Ramanathan, A. y S. L. Burks. 1996. Hazard Evaluation of Soil Contaminant With Acuatic Animals and Plants Toxicity Test. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 956-963.

Ramírez, A. J., R. Garcia, P., y F. Rodriguez N. 1991. Difusión de hidrocarburos en suelo bajo condiciones de invernadero. Pp. 75. In: Tovar, S. J. L. y R. Quintero, L. (Eds), La investigación edafológica en México 1990-1991. Memorias del XXIV Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Chapingo.

Rattner A. B., y A. G. Heath. 1995. Environmental Factors Affecting Contaminant Toxicity in Acuatic and Terrestrial Vertebrates. Pp 519-535. In: David J. H., B. Barnett y A. B. Jhon, (Eds) *Handbook Of Ecofoxicology*. Lewis Publishers. Boca Raton.

Regno, V., J. Arulgnanendran y N. Nirmalakhandan. 1998. Microbial Tpxicity in Soil Medium. *Ecofoxicol. Environ. Safety.* 39: 48-56.

Reid, J. B., K. C. Jones y K. T. Semple. 2000. Bioavailability of Persistent Organic Pollutants in Soil and Sediment a Perspective on Mechanisms, Consequences and Assessment. *Environ. Pollut.* 108: 103-112.

Restrepo, I. 1995. *Desarrollo Sustentable en el Golfo y Caribe de México*. Centro de Ecodesarrollo. México. Pp. 162-173.

- Reyes Jaramillo I. 1996. *Fundamentos Teórico-Prácticos de Temas selectos de la Ciencia del Suelo. Parte I.* Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. 257 p.
- Rhykerd, L. R., D. Sen, K. J. MacInnes, y R. W. Weaver. 1998. Volatilization of Crude Oil from Soil Amended with Bulking Agents. *Soil Sci.* 163: 87-92.
- Rönnpapel, K., W. Lib, y W. Ahlf. 1995. Microbial Bioassays to Assess the Toxicity of Solid-Associated Contaminants. *Ecotox. Environ. Safety.* 31:99-103.
- Salanitro, P. J., B. D. Philip y H. H. Michael. 1997. Crude Oil Hydrocarbon Bioremediation and Soil Ecotoxicity Assessment. *Environ. Sci. Technol.* 31: 1769-1776.
- Sandermann, H. 1992. Plant Metabolism of Xenobiotics. *Tibs.* 17:82-84.
- Santer, P. 1997. Bioremediation and Ecotoxicological Evaluation of Diesel-Contaminated Soil. Diplomarbeit Durchgesürt Am Ifa Tull Ababteilungum Weltbiotechnologie Univerität Fur Boden Kultur Wien. 76 P.
- Segal, W., y R. L. Minemelli. 1987. Extent of regeneration of the Microbial Community in the Reclaimed Spent Oil Shale Land. *J. Environ. Qual.* 16:44-48.
- Tang J., M. J. Carroquino, B. K. Robertson y A. Martin. 1998. Combined Effect of Sequestration and Bioremediation in Reducing the Bioavailability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil. *Environ. Sci. Technol.* 32:3586-3590.
- Ting, Y-P, C. Fang y H. M. Tan. Effect of Heavy Metals on the Bioremediation of petroleum Hydrocarbons. Pp. 389-394. In: Batelle (eds) *In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon and Other Organic Compounds.* The Fifth International In situ and on site Bioremediation Symposium. San Diego, California. Abril 19-22, 1999.

Toledo, A. 1982. *Petróleo y Ecodesarrollo en el Sureste de México*. Centro de Ecodesarrollo. México 152 p.

Trujillo, N. A., J. Zavala, C. y L. Bucio, A. 1990. Evaluación de la contaminación por hidrocarburos aromáticos y metales pesados en los suelos del ejido La Ceiba, Huimanguillo, Tabasco. CEICADES-CP, CECODEZPET, Gob. Del Edo. de Tabasco. 43 p.

UNEP/IOC/IAEA 1992. Determination Of Petroleum Hydrocarbons In Sediments. Reference Method No. 20. United Nations Experts Pollution (UNEP).

USDA-SCS. 1986. *Soil Survey Laboratory methods and Procedures for Collecting Soil Sample*. Soil Conservation Service U. S. Department of Agriculture Washington, D.C., USA. 90 p

Van Gestel, C. A. M. y W. C. Ma. 1990. An Approach to Cuantitative Structure-Activity Relationships in Terrestrial Ecotoxicology: Earthworm Toxicity Estudios. *Chemos*. 21: 1023-1033.

Van Gestel, C. A. M. 1992. The Influence of Soil Characteristics on the Toxicity of Chemicals for Earthworms a Review. Pp. 44-54. In: Becker, H., P. J. Greig-Smith y Heimbach F. (Eds.) *Ecotoxicology of Earthworm*. Intercept Press, Andover, Hants, UK.

Van Straalen, M. N. y C. A. M. van Gestel. 1998. Soil invertebrates and microorganisms. Pp 251-277. In: Calow P. (Ed.). *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Science. Reino Unido.

Varela, P. M. A., A. Cruz, M. J. Ticante y J. L. Garcia. 1990. Modificación de las propiedades de un suelo por adición de aguas contaminadas por grasas y aceites, p. 36-37. In: 1^{er} Simp. Nacional de Degradación del Suelo. Memoria. Dpto. de Edaf., Inst. de Geol., UNAM.

Verhoef, A. H. y M. A. C. van Gestel 1995. Methods to Assess the Effects of Chemicals on Soils. Pp. 223-257. In: Linthurst, A. R., Bourdeau P. y R. G. Tardiff (Eds.) *Methods to Assess the Effects of Chemicals on Ecosystems*. SCOPE. John Wiley and Sons. USA.

Walkley, A. y I. A. Black. 1934. An Examination of the Detjareff Method for Determining Soil Organic Matter and Propose Modification of the Chromic Acid Titration Method. *Soil Sci.* 37: 29-38

Wang, W. 1991. Literature Review on Higher Plants for Toxicity Testing. *Water, Air and Soil Pollution.* 59: 318-400.

Wang, X., X. Yu y R. Bartha. 1990. Effect Of Bioremediation on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Residues in Soil. *Env. Sci. Technol.* 24:1086-1089.

Wang, X y R. Bartha. 1994. Effects of Biorremediation on toxicity, Mutagenesis, and Microbiota in Hydrocarbon Polluted soils. Pp. 175-197. In: Wise, L. y D. Trtantolo (Eds.). *Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soils.* USA: 929 p.

Wardle, D. A. y K. E. Griller. 1996. The Quest for a Contemporary Ecological Dimension to Soil Biology. *Soil. Biol. Biochem.* 28: 1741-1748.

Weber, B. J. y C. T. Miller. 1991. Organic Chemical Movement over and Through Soil. Pp 305-334. In: Sawhney, B. L. y K. Brown (Eds.). *Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils.* Soil Science Society of America: Madison, WI.

Weissenfels D. W., K. Hans-Jürgen y L. Josep. 1992. Adsorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) by Soil Particles: Influence on Biodegradability and Biototoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:689-696.

Wise, D. L. y D. J. Trantolo. 1994. *Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soil.* Dekker, Inc. New York, EUA. Pp 149-599.

Yeung, P.P., L. R. Johnson y N. S. Acharya. 1994. An Improved Procedure for Determining Oil Content in wet Soil Sample. In: ASTM (Eds.). *Soil Contaminated with Petroleum Constituents.* Philadelphia, USA.

Zemanek G, M., J. P. Simon, L. K. Sandra y E. H. Steve. 1997. Toxicity and Mutagenicity of Component Classes of Oils Isolated from Soils at Petroleum- and Creosote-Contaminated Sites. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 47:1250-1258

Zavala, C. J. 1990. *Regionalización Natural e Impacto Petrolero en el Distrito de Agua Dulce, Tabasco*. CEICADES-CP, IREBIT A. C. H. Cárdenas (Mimeo) 98 p.

Zavala, C. J. 1993. Evaluación de los cambios de uso de suelo como un proceso de degradación en el campo petrolero Samaria, Tabasco. Centro de Edafología, C. P. Montecillos, México. 187 p. Tesis de Maestría en Ciencias.

Zavala, C. J., C. A. Ortiz Solorio, E. Ojeda Trejo y A. V. Botello. 1996. Contaminación del Suelo por Hidrocarburos en el Campo Petrolero Samaria, Tabasco, p. 255-264. In: A. V. Botello, J. L. Rojas Galviz, J. A. Benítez, D. Zárate-Lomeli (Eds). *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica, 5. 666 p.