

08578

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Química

POSGRADO EN CIENCIAS QUIMICAS
MAESTRÍA EN QUÍMICA AMBIENTAL

Tesis
para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Inducción de la biodegradación de Hidrocarburos
Policíclicos Aromáticos en un suelo contaminado
artificialmente

I.Q. Juan Manuel Arce Ortega

Diciembre 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Dr. Teófilo Herrera Suárez	Instituto de Biología, UNAM
Vocal	Dr. J. Enrique Gama Castro	Instituto de Geología, UNAM
Secretario	Dr. Alfonso Durán Moreno	Facultad de Química, UNAM
Primer Suplente	Dra. Refugio Rodríguez Vázquez	Depto. Biotecnología, CINVESTAV - IPN
Segundo suplente	Dr. Thangarasu Pandiyan	Facultad de Química, UNAM

Lugar donde se desarrolló la tesis:

PIOA y QA, Facultad de Química, UNAM, México

Institute for Agrobiotechnology (IFA-Tulln), Viena, Austria. Dentro del proyecto de intercambio académico: UNAM (México) / Universität für Bodenkultur (Wien)

Con el asesoramiento en Viena de: Dr. OLIVER SZOLAR y Dr. ANDREAS LOIBNER,

Y como Director de tesis: Dr. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

Ciudad Universitaria 15 de agosto de 2000

BIOL. FRANCISCO INCERA UGALDE
JEFE DE LA UNIDAD ADMINISTRATIVA DEL POSGRADO
DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR
U.N.A.M.

PRESENTE

Después de haber revisado la tesis "INDUCCIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EN UN SUELO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE", considero que el documento reúne los atributos académicos requeridos para un trabajo de investigación original dentro de la Maestría en Ciencias Químicas (Química Ambiental), de la Facultad de Química de la U.N.A.M., por lo que no tengo inconveniente en otorgar mi voto aprobatorio, para que el alumno Juan Manuel Arce Ortega proceda con los tramites administrativos para obtener el grado correspondiente.

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente


Dr. Teófilo Herrera Suárez
Instituto de Biología, UNAM

Ciudad Universitaria 15 de agosto de 2000

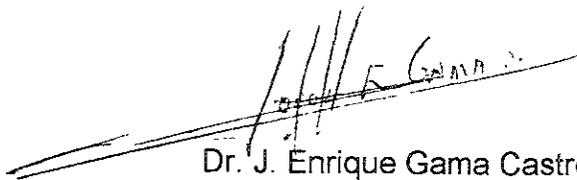
BIOL. FRANCISCO INCERA UGALDE
JEFE DE LA UNIDAD ADMINISTRATIVA DEL POSGRADO
DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR
U N A.M.

PRESENTE

Después de haber revisado la tesis "INDUCCIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EN UN SUELO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE", considero que el documento reúne los atributos académicos requeridos para un trabajo de investigación original dentro de la Maestría en Ciencias Químicas (Química Ambiental), de la Facultad de Química de la U.N.A.M., por lo que no tengo inconveniente en otorgar mi voto aprobatorio, para que el alumno Juan Manuel Arce Ortega proceda con los tramites administrativos para obtener el grado correspondiente.

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. ENRIQUE GAMA CASTRO", is written over a horizontal line. The signature is somewhat stylized and includes a date "15/08/00" written below the main name.

Dr. J. Enrique Gama Castro
Instituto de Geología, UNAM

Ciudad Universitaria 15 de agosto de 2000.

BIOL. FRANCISCO INCERA UGALDE
JEFE DE LA UNIDAD ADMINISTRATIVA DEL POSGRADO
DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR
U.N.A.M.

PRESENTE

Después de haber revisado la tesis "INDUCCIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EN UN SUELO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE", considero que el documento reúne los atributos académicos requeridos para un trabajo de investigación original dentro de la Maestría en Ciencias Químicas (Química Ambiental), de la Facultad de Química de la U.N.A.M., por lo que no tengo inconveniente en otorgar mi voto aprobatorio, para que el alumno Juan Manuel Arce Ortega proceda con los tramites administrativos para obtener el grado correspondiente.

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alfonso Durán Moreno', written over a horizontal line.

Dr. Alfonso Durán Moreno
Facultad de Química, UNAM

Ciudad Universitaria 15 de agosto de 2000

BIOL. FRANCISCO INCERA UGALDE
JEFE DE LA UNIDAD ADMINISTRATIVA DEL POSGRADO
DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR
U.N.A.M.

PRESENTE

Después de haber revisado la tesis "INDUCCIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EN UN SUELO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE", considero que el documento reúne los atributos académicos requeridos para un trabajo de investigación original dentro de la Maestría en Ciencias Químicas (Química Ambiental), de la Facultad de Química de la U.N.A.M., por lo que no tengo inconveniente en otorgar mi voto aprobatorio, para que el alumno Juan Manuel Arce Ortega proceda con los tramites administrativos para obtener el grado correspondiente.

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Refugio Rodríguez Vázquez
Dpto. Biotecnología y Bioingeniería
CINVESTAV IPN

Ciudad Universitaria 15 de agosto de 2000

BIOL. FRANCISCO INCERA UGALDE
JEFE DE LA UNIDAD ADMINISTRATIVA DEL POSGRADO
DIRECCIÓN GENERAL DE ADMINISTRACION ESCOLAR
U.N.A.M.

PRESENTE

Después de haber revisado la tesis "INDUCCIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EN UN SUELO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE", considero que el documento reúne los atributos académicos requeridos para un trabajo de investigación original dentro de la Maestría en Ciencias Químicas (Química Ambiental), de la Facultad de Química de la U.N.A.M., por lo que no tengo inconveniente en otorgar mi voto aprobatorio, para que el alumno Juan Manuel Arce Ortega proceda con los tramites administrativos para obtener el grado correspondiente.

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente



Dr. Thangarasu Pandiyan
Facultad de Química, UNAM

Reconocimientos:

El presente trabajo fue posible, gracias al apoyo de:

El Programa de Ingeniería Química y Química Ambiental, de la UNAM y al Instituto de Agrobiotecnología (Institute for Agrobiotechnology) IFA-Tulln, Viena, Austria. Dentro del proyecto de intercambio académico: UNAM (México) / Universität für Bodenkultur (Wien). Con el asesoramiento en Viena de: Dr. Oliver Szolar y Dr. Andreas Loibner, y como director de tesis AL DR Víctor Manuel Luna Pabello

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"

ÍNDICE

Reconocimientos	3	
Indice	4	
Resumen	7	
CAPÍTULO 1. Antecedentes	8	
1.0	Introducción	8
1.1	Marco histórico	10
1.2	Definición del problema	13
1.3	Justificación	14
1.4	Hipótesis	15
1.5	Objetivos	15
CAPÍTULO 2. Fundamentos	16	
2.1	¿Qué son los HPA?	16
2.2	Toxicidad de HPA	17
2.3	Biodegradación de HPA	18
2.4	Rutas metabólicas de biodegradación de HPA	22
2.5	Factores involucrados en la biodegradación de HPA	24
2.5.1	Temperatura	24
2.5.2	Oxigenación	25
2.5.3	Salinidad	25
2.5.4	Humedad	25
2.5.5	Acidez y alcalinidad	25
2.5.6	Nutrientes	25
CAPÍTULO 3. Protocolo experimental	27	
3.1	Plan de trabajo	27
3.1.1	Reactivos y disolventes	27
3.2	Método analítico	30
3.2.1	Extracción de HPA y cambio de disolvente	32
3.2.2	Acondicionamiento del extracto y fraccionamiento	32
3.2.3	Sililización	33
3.2.4	Análisis cromatográfico en el CG/MS	34
3.3	Ensayo de factibilidad de biodegradación de HPA	34
3.3.1	Características del suelo experimental y selección de HPA	35
3.3.2	Procedimiento experimental	35
3.3.3	Preparación de las muestras de suelo experimental	37
3.3.4	Control de humedad	37
3.3.5	Inóculo	38
3.4	Biodegradación bajo condiciones controladas	38
3.5	Toma de muestra	40
3.6	Estudio cinético de la degradación de antraceno y criseno	41

3.7	Manejo y disposición de residuos	41
	CAPÍTULO 4. Resultados y discusión	43
4.0	Resultados	43
4.1	Evaluación de la remoción de HPA en el suelo, por fenómenos abióticos (tratamiento 2)	45
4.2	Estudio de factibilidad de biodegradación de antraceno y criseno (tratamiento 3)	48
4.3	Efecto de la adición de nutrientes en la biodegradación de HPA	52
4.4	Efecto de la adición de fósforo relación C:P 100:1	53
4.5	Adición de nitrógeno y fósforo relación C:N:P 100:10:1	54
4.6	Efecto de cambio de pH en suelo manteniendo la relación C:N:P 100:10:1	55
4.7	Estudio cinético de la biodegradación de antraceno y criseno	57
4.7.1	Estudio cinético del tratamiento 3	57
4.7.2	Cinética de degradación de HPA en suelo con adición de nutrientes los tratamientos 5 y 6	58
4.8	Discusión de resultados	59
	CAPÍTULO 5 Conclusiones y recomendaciones	62
	BIBLIOGRAFÍA	63
	ANEXO 1. Descripción detallada del método analítico desarrollado	68
A 1.1	Desarrollo del método	68
A 1.2	Análisis en el CG/MS	71
A 1.3	Sililización	71
A 1.4	Acondicionamiento del extracto y fraccionamiento	73
A 1.5	Experimento 1: Selección del adsorbente (óxido de aluminio o sílica gel)	74
A 1.6	Experimento 2: Efecto de la polaridad de la columna y el volumen de sílica gel usada para fragmentar antraceno y ácido 1 hidróxi naftóico	76
A 1.7	Experimento 3. Efecto de los procesos de evaporación	79
A 1.8	Experimento 4. Fraccionamiento del estándar num.4, 1ª fracción eluida con diclorometano y 2ª fracción con Metanol/ácido acético	82
A 1.9	Experimento 5. Efecto de la polaridad de la sílica gel en el fraccionamiento del estándar num.4	86
A 1.10	Experimento 6. Seguimiento del fraccionamiento del estándar num.4	88
A 1.11	Experimento 7 Elección de la 1º fracción de estándar num. 4 utilizando hexano y diclorometano	89
A 1.12	Experimento 8. Detección del volumen mínimo de diclorometano en la evaporación, para cambio de disolvente a hexano	91
A 1.13	Experimento 9. Fraccionamiento del estándar num. 4, utilizando hexano para la 1ª fracción, 2ª fracción diclorometano y la 3ª fracción con metanol/ácido oxálico	92
A 1.14	Experimento 10. Detección de las condiciones óptimas para fraccionar el	

	estándar num. 5, polaridad de sílica gel y eluyente para la segunda fracción	95
A 1.15	Experimento 11. Obtención de las condiciones óptimas para fraccionar una muestra real	101
	ANEXO 2. Resultados experimentales del análisis cromatográfico	107
A 2.1	Curvas patrón	107
A 2.2	Análisis cromatográfico del suelo con inóculo (tratamiento 1)	110
A 2.3	Análisis cromatográfico del suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2)	110
A 2.4	Análisis cromatográfico del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3)	112
A 2.5	Análisis cromatográfico de los suelos con adición de nutrimentos	115
	ANEXO 3. Procesamiento estadístico de los resultados experimentales	119
A 3.1	Resultados del suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2)	119
A 3.2	Análisis de resultados del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3)	123
A 3.3	Análisis de resultados en el suelo con relación C:P 100:1 (tratamiento 5)	139
A 3.4	Análisis de resultados en el suelo con relación C:N:P 100:10:1 (tratamiento 6)	141
A 3.5	Análisis de resultados en el suelo con relación C:N:P 100:10:1 pH 4.2 (tratamiento 7)	143
A 3.6	Análisis de resultados en el suelo con relación C:N:P 100:10:1 pH 9.2 (tratamiento)	145
	Anexo 4 Método microbiológico para cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC)	146

Resumen

En los procesos de biodegradación de hidrocarburos de petróleo presentes en suelo, comúnmente queda de manera remanente los denominados hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA). El presente trabajo consistió en evaluar la posibilidad de inducir la biodegradación de dos HPA (antraceno y criseno). Mediante el manejo de variables ambientales, como la relación carbono, nitrógeno, fósforo (C:N:P 100:10:1) y pH. De acuerdo con los resultados obtenidos, sin modificación de los parámetros, es posible biodegradar en 130 días el 98% de antraceno y el 50% de criseno. En tanto que con una relación de C:N:P, 100:10:1, y un pH de 6.5 fue posible degradar en 16 días el 50 % de antraceno y el 40 % de criseno. Lo anterior permite evidenciar la posibilidad de aumentar la velocidad de degradación de ambos compuestos mediante el manejo de variables ambientales.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.0 Introducción

Durante muchos siglos la humanidad ha podido convivir en armonía con la naturaleza, ya que de manera consciente o inconsciente se ha permitido a los procesos de regeneración naturales restablecer el equilibrio ecológico. Sin embargo, a finales del siglo veinte la explotación inmoderada de recursos naturales y la generación de una gran cantidad de productos de difícil reincorporación al ciclo biogeoquímico correspondiente, han cambiado en muchas partes del planeta las condiciones de vida que prevalecían. Como zonas boscosas que han sido taladas de forma inmoderada convirtiendo el lugar en una zona semiárida o incluso a nivel atmosférico el adelgazamiento de la capa de ozono por el uso inmoderado de fluorocarbonos en aerosoles. Asimismo, la generación de residuos sólidos y líquidos que se disponen a cielo abierto en el suelo ha propiciado que la vocación natural de éste se vea alterada. Tal es el caso de los hidrocarburos derramados en suelo, producto de las actividades de explotación del petróleo a principios y mediados de siglo, cuando la tecnología utilizada no permitía el aprovechamiento integral de este valioso recurso o bien, por descuidos o accidentes durante la extracción a últimas fechas.

Conscientes de lo anterior, los avances tecnológicos han buscado, últimamente reincorporar los residuos generados al ciclo biogeoquímico correspondiente de manera artificial. Mundialmente existen muchas investigaciones a este respecto de forma que, para algunos materiales peligrosos ya existen procedimientos y tecnologías para reincorporarlos al ambiente sin causar graves alteraciones al ecosistema. Lamentablemente la generación de residuos avanza mucho más rápido que estas investigaciones o existen compuestos que aún no tienen un procedimiento para reincorporar sus elementos al ciclo biogeoquímico correspondiente, tal es el caso de los compuestos recalcitrantes (Fan y Scow, 1993), aquellos que por mecanismos de degradación biológica no son posibles de transformar en forma significativa y que se encuentran generalmente en forma sólida o líquida, frecuentemente en el suelo o cuerpo de agua. Una gran mayoría de compuestos contaminantes son considerados como residuos peligrosos por su efecto dañino a la salud, al grado que algunos de ellos son carcinogénicos como es el caso del benceno y de los bifenilos policlorados, o mutagénicos como el caso de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) (Wadrowski y Histes, 1997). Algunos de estos podrían ser los representativos de ciertas actividades económicas, pero el petróleo crudo y sus derivados, son los contaminantes más comunes, se localizan en las zonas de explotación, en refinerías, gasolineras y en fábricas de pinturas, hules y pegamentos; los disolventes para desengrasar se utilizan en las industrias electrónica y mecánica, así como en tintorerías (Lesage, 1993). En México, la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (actualmente SEMARNAP) publicó en 1990 una lista de los compuestos que son considerados residuos peligrosos y las concentraciones máximas permitidas en agua (NTE-CRP-002/88), actualmente Norma Oficial Mexicana NOM-053-ECOL-1993, que establece el procedimiento para llevar a cabo la prueba de extracción para

determinar los constituyentes que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.

En México al igual que en la mayor parte del mundo, el avance tecnológico no está en igualdad con el avance en la conceptualización de los procesos ecológicos que rigen este planeta, como se puede observar con la creciente generación de residuos peligrosos por parte de todos los sectores productivos y no productivos que existen en el país. En este contexto el presente trabajo tiene dos propósitos fundamentales: investigar la forma de reincorporar al ciclo biogeoquímico correspondiente a hidrocarburos policíclicos aromáticos residuales, generados por la industria petrolera, recalcitrantes a la biodegradación. Así como evaluar la factibilidad de degradación biológica de dos hidrocarburos policíclicos aromáticos (antraceno y criseno con baja o nula biodegradación), bajo condiciones ambientales controladas.

La parte experimental se desarrolló en el Instituto de Agrobiotecnología (Institute for Agrobiotechnology, IFA-Tulln), en Viena, Austria, el cual permanece a la vanguardia en el campo de la biodegradación de productos xenobióticos en Europa. Lo anterior con el propósito de integrar los conocimientos y tecnologías aplicadas en futuras investigaciones en el ámbito nacional. La parte experimental se integró por tres etapas, la primera consistió en el montaje y adecuación de un método analítico para la cuantificación de los hidrocarburos policíclicos aromáticos y los posibles metabolitos de degradación. La segunda etapa en la evaluación de la factibilidad de biodegradación de antraceno y criseno en un suelo previamente caracterizado, libre de hidrocarburos con requerimientos mínimos de nutrimentos, al que se adicionó antraceno y criseno y como inóculo microorganismos provenientes de una planta de tratamiento de aguas. En la tercera etapa se determinó la influencia de la adición de nutrimentos al suelo. Los resultados directos del análisis se reportan en forma de anexos, con el fin de dar fluidez y una mejor comprensión del presente trabajo.

1.1 Marco histórico

El desarrollo de las tecnologías de "remediación" a escala mundial se inició en los países desarrollados hace poco más de 15 años. El interés se dio después de haber encontrado en los acuíferos que abastecen de agua a las poblaciones, residuos de compuestos considerados peligrosos en concentraciones que sobrepasan los límites permitidos. Con la finalidad de proteger la salud humana, los gobiernos de diferentes países establecieron como una actividad prioritaria el desarrollo de técnicas de todo tipo para reducir los niveles de contaminación en suelos y acuíferos. Las actividades de investigación realizadas dieron origen a diversas tecnologías de tratamiento, diferenciándolas por los factores que predominan en el tratamiento como físicoquímicas o biológicas. Las primeras que se desarrollaron fueron las del tipo físicoquímico como la incineración, la solidificación y estabilización. No obstante existen además, las siguientes:

El ataque con **luz ultravioleta** tiene como fundamento suministrar a una molécula la energía suficiente para romper uno más enlaces entre los átomos que la forman, esta energía proveniente de las radiaciones electromagnéticas que se ubican en el rango de longitud de onda de 200 nm a 100 angstroms. Este fenómeno ocurre con los rayos solares (Calabrese y Koustecki, 1993).

El uso de dióxido de titanio acelera la producción de radicales libres OH en agua al ser expuesto a radiaciones electromagnéticas del espectro ultravioleta, lo cual se ha denominado **fotocatálisis** la formación de radicales libres produce un ataque de oxidación sobre los compuestos químicos presentes (Turchi y Ollis, 1990).

La mayoría de los métodos están basados en la oxidación de los compuestos, destrucción del doble enlace que da estabilidad a molécula o compuestos de menor peso molecular como productos de la oxidación, y este es el propósito de utilizar **ozono**, el cual es altamente reactivo. Al contacto con compuestos orgánicos forma ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas, y en casos extremos dióxido de carbono (Leeson et al, 1993).

El **peróxido de hidrógeno** al igual que el ozono es un oxidante, pero a diferencia del ozono el peróxido de hidrógeno forma un producto, el agua, el cual puede interferir en la reacción química.

El **proceso térmico** consiste en elevar la temperatura, para provocar la ruptura de los enlaces químicos. Formando como productos compuestos de menor peso molecular pero si esto se lleva a cabo en un medio oxidante (aire), que forma adicionalmente dióxido de carbono. Este método requiere de un control estricto de temperatura ya que puede formar productos no deseados como dioxinas (Calabrese y Koustecki, 1993).

Posteriormente, surgieron otras tecnologías innovativas como la desorción térmica, la extracción con vapor, el lavado de suelo y la extracción de disolventes. Otras tecnologías más recientes fueron la vitrificación, la encapsulación y el "venteo"

seguido, de condensación, pero la finalidad de este tipo de técnicas sólo permite eliminar el contaminante de la zona afectada y rara vez reintegrarlo al ciclo biogeoquímico correspondiente (Connell, 1984).

Las técnicas biológicas surgen como segunda opción, en ellas se utilizan a seres vivos de manera principal. Inicialmente se aplicaron el composteo y el biocultivo "land-farming", así como el uso de reactores con cepas puras de microorganismos degradadores combinado con el bombeo e inyección del agua subterránea a través de pozos. Posteriormente, se aplicaron otras técnicas como la bioestimulación y el bioventeo. Una de las principales características de la biorremediación es que los contaminantes realmente se pueden transformar en compuestos que se integran al ambiente y no solamente a la mera transferencia de lugar, como sucede con algunos tratamientos fisicoquímicos (Calabrasc y Koustecki, 1994). En las tecnologías llamadas de biorremediación se explota la capacidad de adaptación que los microorganismos pueden desarrollar bajo las condiciones que imperan en un lugar contaminado utilizando como fuente de carbono al contaminante. Dichas condiciones comúnmente llegan a ser adversas para su sobre vivencia, sobre todo a altas concentraciones. Sin embargo, existen poblaciones resistentes que se adaptan e interaccionan de manera sinérgica, con lo cual se logra la degradación del compuesto contaminante. Las tecnologías de biorremediación pueden ser del tipo *in situ* es decir que se aplican en el sitio contaminado, y *ex situ*, en las cuales el suelo contaminado se lleva a otro lugar para su tratamiento. Generalmente, la tecnología *in situ* se emplea cuando la contaminación ha alcanzado el nivel frático y se debe evitar que el bulbo de ésta se extienda en el acuífero. La tecnología *ex situ* se utiliza cuando la contaminación se presenta solamente en la parte superficial del suelo o bien, la actividad de la población microbiana autóctona no puede asegurar la biodegradación de los contaminantes bajo las condiciones que imperan en el lugar.

Aunque la base de funcionamiento de las tecnologías de biorremediación es utilizar la capacidad biodegradadora de los microorganismos, existen diversas maneras de aprovecharla dependiendo de varios factores como son la profundidad de la contaminación, la unidad de suelo, el tipo y concentración de los contaminantes, la presencia de actividad degradadora, la presencia de aceptores finales de electrones para la respiración microbiana y las condiciones climatológicas que imperan en el lugar (Saval, 1995). El siguiente listado presenta los diversos tipos de tecnologías que pueden ser aplicadas para la biorremediación de suelos y acuíferos contaminados y la base de su funcionamiento

·BIOAUMENTACIÓN.-Tiene como base la adición de microorganismos al sitio contaminado cuando la población autóctona carece de capacidad degradadora.

·BIOESTIMULACIÓN.-Su funcionamiento es a través de la adición de estimulantes de la actividad microbiana autóctona como co-sustratos o aceptores de electrones para la biodegradación.

·BIOVENTEO.-Es la introducción de oxígeno a través del suelo para estimular la población microbiana netamente aerobia.

·COMPOSTEO.-En esta técnica el material contaminado se coloca sobre la superficie del terreno y que puede ser en forma de pilas que se cubre para crear condiciones termófilas, se mezcla periódicamente para favorecer la aireación.

·BIOCULTIVO.- Es el tratamiento en fase sólida que generalmente se realiza en sitios confinados para retener los lixiviados que se forman.

·BIOSORCIÓN.- Es el uso de microorganismos con afinidad para adsorber metales bajo ciertas condiciones, generalmente se aplica en fase líquida.

Asimismo en el presente trabajo se manejará el término INDUCCIÓN, como una combinación de la bioaumentación y bioestimulación.

Las tecnologías de biorremediación ofrecen diversas ventajas, entre las principales se pueden citar las siguientes:

1. Son tecnologías seguras, económicas y más rápidas que algunos tratamientos fisicoquímicos.
2. Son sistemas biológicos cuyo costo es mínimo, más aún si se utiliza la población autóctona.
3. El ecosistema del sitio contaminado prácticamente no se altera recupera.
4. No se generan desechos como producto del tratamiento, ya que los contaminantes son realmente degradados con excepción de los elementos persistentes o recalcitrantes.
5. Pueden ser acoplados a otro tipo de tecnología cuando la remoción de los contaminantes no es la máxima deseada.
6. Los contaminantes adsorbidos o atrapados en los poros del suelo, también son degradados.
7. Se puede alternar esta tecnología con otra de tipo fisicoquímico.

Cuando se trata de una biorremediación *in situ* se tiene ventajas adicionales que son:

8. Se eliminan costos de transportación ya que se realiza en el sitio contaminado.
9. Al utilizar la población autóctona se elimina la necesidad de introducir microorganismos potencialmente peligrosos.

A partir de lo anterior se puede inferir que la biorremediación presenta una tecnología que permite llevar a cabo la reintegración de contaminantes como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) a los ciclos biogeoquímicos respectivos.

1.2 Definición del problema

Los compuestos HPA son frecuentemente encontrados en lugares con actividad volcánica o resultado de transformación de restos fósiles, producto de una combustión incompleta, en combustibles sólidos, efluentes industriales, preservadores de madera, plaguicidas, herbicidas, colorantes y productos farmacéuticos (Lesage y Jackson, 1993). Son compuestos que están formados por dos o más anillos aromáticos (químicamente muy estables). Estos compuestos son nocivos al ambiente aun en pequeñas cantidades como lo marcan los experimentos que se han hecho con microorganismos y animales, generalmente se clasifican como mutagénicos y carcinogénicos (Micromedex inc, 1997). En ratas se presentan problemas mutagénicos con 2 ppm o efectos tumorogénicos con 3.5 ppm, los cuales son sólo un ejemplo de los muchos que se han reportado.

Los efectos carcinogénicos se clasifican en:

Grupo 2A: probables efectos carcinogénicos en humanos

Grupo 3: no clasificable como carcinogénico en humanos

1. Antraceno: 3
2. Benz[a]antraceno: 2a
3. Benzo[k]fluoranteno: 2b
4. Benzo[ghi]perileno: 3
5. Benzo[a]pireno: 2a
6. Benzo[e]pireno: 3
7. Criseno: 3
8. Coroneno: 3
9. Dibenz[a,h]acridina: 2b
10. Dibenz[a,h]antraceno: 2a
11. 7h-dibenzo[c,g]carbazona: 2b
12. Fenantreno: 3
13. Pireno: 3

En la revisión bibliográfica de trabajos que proponen como técnica de depuración en sitios contaminados por hidrocarburos a la biorremediación, se encontró que son relativamente exitosos tanto a nivel internacional como nacional. La mayoría de las técnicas planteadas hasta el momento permiten degradar al hidrocarburo parcialmente en tiempos cortos o en tiempos muy largos, como lo demuestran los trabajos de Brouchez et al (1997), relacionados con HPA. Algunos de los compuestos de este grupo se pueden someter a una degradación biológica con resultados aceptables, mientras que otros sólo son parcialmente degradados como es el criseno, o persisten a la biodegradación como es el benzo(a)antraceno que persiste a la biodegradación (Kelley y Cerniglia, 1995). En un estudio realizado por Kelley y Cerniglia (1995) en la degradación de una mezcla de HPA por *Mycobacterium sp.* cepa PYR-1, se observó que la bacteria logró degradar de una mezcla sintética los siguientes compuestos: fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, excepto benzo(a)pireno y criseno. La mezcla sintética contenía un total de 11.11 ppm de HPA de la cual 0.86 ppm correspondían al criseno y 1.29 ppm para el benzo(a)pireno.

En dicha investigación también se realizó la biodegradación con el mismo microorganismo en una mezcla de hidrocarburos obtenida de un sitio contaminado obteniéndose los mismos resultados es decir, la degradación nula de benzo(a)pireno y criseno. El comportamiento del trabajo realizado sobre la biorremediación de HPA se ilustra en la Tabla 1.1

Tabla 1.1 Porcentaje de remoción en compuestos HPA en un proceso de biorremediación

COMPUESTO	EXPERIMENTO						# ANILLOS
	A	B	C	D	E	F	
<i>Naftaleno</i>	81	94	51	63	50	80	2
<i>Fenilnaftaleno</i>	37	20	13	44	0	42	2
<i>Acenaftileno</i>	33	42	0	35	0	0	3
<i>Acenafteno</i>	0	80	0	43	0	54	3
<i>Fluoreno</i>	64	83	15	59	0	68	3
<i>Fenantreno</i>	62	76	13	60	0	52	3
<i>Antraceno</i>	0	39	37	41	0	23	3
<i>Fluoranteno</i>	28	30	16	23	0	38	4
<i>Pireno</i>	0	25	19	0	0	28	4
<i>Benzo(b)fluoreno</i>	35	0	18	0	0	0	4
<i>4-metilpireno</i>	46	0	19	0	0	21	4
<i>Benzo(a)antraceno</i>	35	0	0	25	0	0	4
<i>Criseno</i>	0	0	0	0	0	0	4

Los experimentos A, B, C y D son realizados en un periodo de 35.5 a 37 días, y el E duró 118 días (Calabrrese, y Koustecki, 1994.)

1.3 Justificación

Existen sitios contaminados por hidrocarburos que presentan nula o baja degradación al ser sometidos a la tecnología de biorremediación, como es el caso de algunos HPA. Teniendo en cuenta que en la biorremediación se explota la capacidad de adecuación que los microorganismos han logrado desarrollar bajo las condiciones que imperan en el lugar contaminado y que incluso cuando las condiciones pueden llegar a ser adversas, las diferentes poblaciones se adaptan entre sí, organizando su interacción para actuar de manera sinérgica (Frederick y Egan, 1994). Una posible explicación parcial del porqué algunos de los HPA biodegradan sería la siguiente: los sitios contaminados por hidrocarburos generalmente contienen una mezcla de grupos alifáticos y aromáticos, en este sentido se puede suponer que los microorganismos degradan en primera instancia los compuestos más simples con rutas metabólicas diferentes a las que se establecen para degradar a los compuestos recalcitrantes, prevaleciendo así una competencia por los substratos simples, favoreciendo su degradación preferencial (Atlas y Cerniglia, 1995).

1.4 Hipótesis

Considerando lo que anteriormente se planteó para el presente trabajo la siguiente hipótesis:

Si un compuesto del grupo HPA catalogado como persistente a la biodegradación en suelo al estar mezclado con otros hidrocarburos es sometido a condiciones ambientales particulares, como cambio de pH, adición de nutrimentos y microorganismos (provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales), es posible lograr su biodegradación.

1.5 Objetivos

El objetivo general de esta investigación es:

Evaluar la factibilidad de biodegradar antraceno y criseno adicionados a un suelo inicialmente libre de hidrocarburos, mediante la inoculación de microorganismos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales y el manejo adecuado de variables ambientales.

Los objetivos particulares son:

- Montaje y adecuación de un método analítico para la cuantificación de HPA en suelo que permita obtener resultados confiables y reproducibles y que brinde además la oportunidad de identificar algunos de los posibles metabolitos de biodegradación.
- Determinar la influencia de la adición controlada de fósforo y nitrógeno, así como la respuesta a diferentes valores del pH, en el proceso de biodegradación manteniendo constante la humedad del suelo.

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 ¿Qué son los HPA?

Como se mencionó, en los suelos contaminados con hidrocarburos se propone la biodegradación como la técnica de restauración. Sin embargo, con ésta se favorece la eliminación de hidrocarburos alifáticos quedando un remanente de hidrocarburos que no son fácilmente posibles de llevar hasta la mineralización, entre ellos se encuentran los HPA. Asimismo, se debe recordar que los HPA se forman durante la combustión incompleta de procesos antropogénicos y fenómenos naturales. Éstos son compuestos altamente peligrosos. En Estados Unidos la EPA (Agencia de Protección al Ambiente) regula actualmente 16 HPA figura 2.1 como contaminantes de prioridad en agua y suelo, y generalmente los reporta como "HPA totales" (tHPA) en tierras contaminadas. Tal como se describió en el capítulo anterior los 16 HPA regulados comprenden dos mutagénicos, especies de alto peso molecular y siete de ellos se designan como carcinógenos en humanos. Todos los HPA carcinogénicos (cHPA) son compuestos de alto peso molecular.

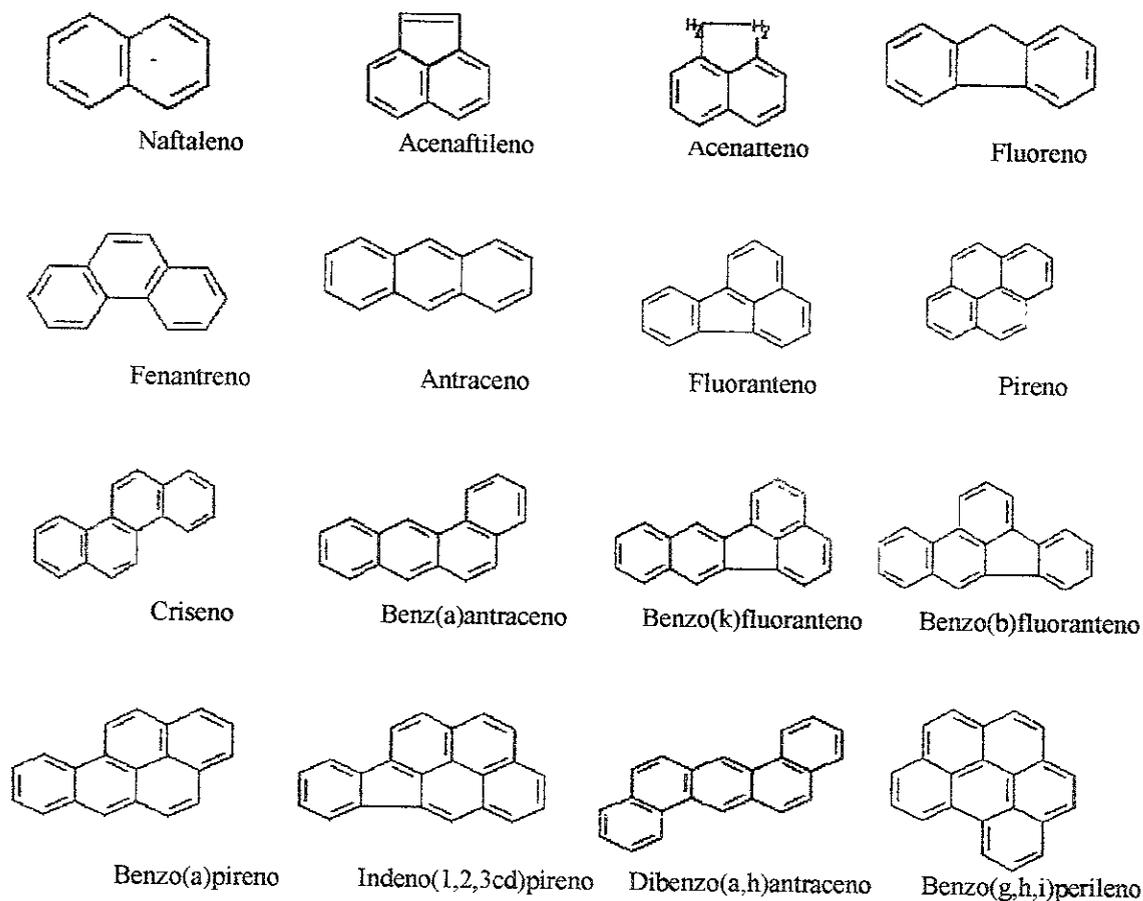


Fig. 2.1 HPA regulados por la EPA (www.chem-analitcs.com)

2.2 Toxicidad de los HPA

Cabe señalar que en regiones altamente contaminadas de Europa Oriental, se ha encontrado que la contaminación de HPA puede impedir el crecimiento de fetos. Niños polacos que estuvieron expuestos a niveles altos de partículas de estos contaminantes nacieron con cabeza y cuerpo pequeños (Denissenko, 1996). De igual manera, se sabe que los niños pueden tener dificultades de aprendizaje. Se identificó que el ADN de cada niño había sido dañado por los HPA generados por la quema incompleta de combustibles. De esta forma, cuando los HPA se ligan al ADN, forman aductos que pueden causar mutaciones y aumentar la probabilidad de cáncer figura 2.2. Los recién nacidos con altos niveles de HPA pesaron en promedio 160 gramos menos a lo normal y midieron 1.04 cm menos, asimismo la circunferencia de sus cabezas fue 0.95 cm más pequeñas. Los embriones fueron particularmente vulnerables a los efectos de contaminación ambiental dado que su capacidad para reparar el ADN dañado era menor, incluso la exposición mínima a HPA podía aumentar el riesgo de cáncer.

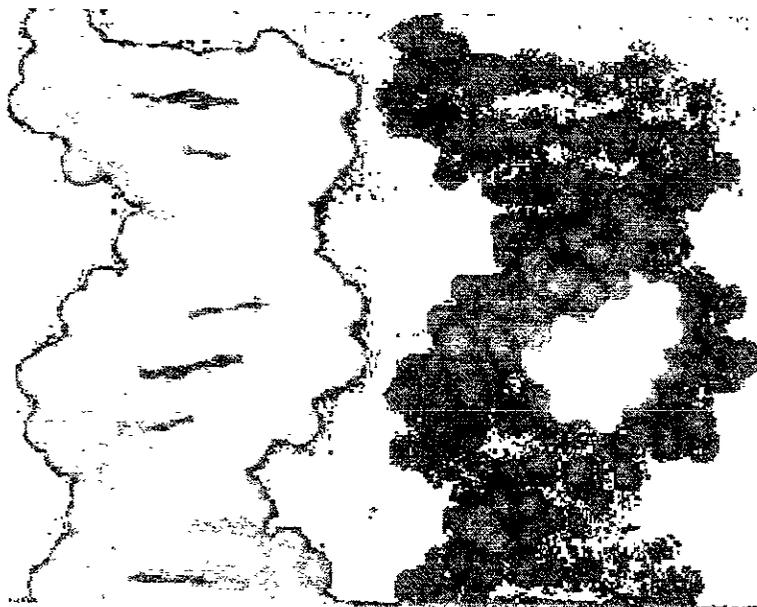


Figura 2.2 Se muestran dos estructuras de ADN, la izquierda es normal, la derecha tiene un HPA ligado entre los enlaces del ADN. Un cambio en la estructura de ADN se refleja como una alteración genética. (Cortesía del Laboratorio de Investigación en Efectos sobre la Salud, USEPA, RTP, NC) www.chem-analitics.com.dna.shtml.

Uno de los rasgos característicos de los sitios contaminados con HPA es que se encuentran como una mezcla compleja entre ellos y con otros agentes químicos tóxicos.

Tomando en cuenta lo anterior, se podría esperar que para compuestos altamente tóxicos como los HPA no sea factible la biodegradación, sin embargo, existen trabajos que demuestran lo contrario, tal es el caso reportado por Wang et al, (1990). En dicho trabajo suelo contaminado con diesel se sometió a un ensayo de biodegradación a escala piloto. Al inicio se mineralizaron en su totalidad los

hidrocarburos alifáticos dejando como remanente los HPA, de manera que al realizar un estudio de toxicidad (Microtox) del suelo, se observaron los efectos mutagénicos. Después de casi 12 semanas se observó que la concentración de HPA disminuyó al igual que la toxicidad del sitio quedando el suelo totalmente destoxificado en 20 semanas (Wanng et al, 1990). Asimismo, existen otras investigaciones en donde queda evidenciado que los HPA solo pueden ser degradados parcialmente por los microorganismos autóctonos (Mueller et al, 1991).

2.3 Biodegradación de HPA

Para poder comprender mejor la biodegradación de los HPA en suelo, es necesario estudiar detalladamente todos los factores involucrados como la concentración en que se encuentra el contaminante y determinar el número de anillos del HPA. Ya se mencionó que los HPA de dos o tres anillos son más fáciles de biodegradar. Ejemplo de ello es el trabajo reportado por Wiesel, (1993) quien observó que en una mezcla de naftaleno, fluoranteno y pireno (compuestos de dos, tres y cuatro anillos respectivamente), se presentó una secuencia progresiva de biodegradación comenzando por el naftaleno, y continuando posteriormente con los otros dos compuestos. Con el fin de profundizar en la relación que existe entre la biodegradación y el número de anillos de HPA, se han realizado investigaciones en las que se trabaja con una mezcla de HPA de dos hasta seis anillos aromáticos en un medio líquido al cual se adicionan microorganismos. De acuerdo con esos experimentos, se han logrado degradar compuestos de hasta cuatro anillos con resultados satisfactorios, observándose que la degradación es nula o mínima para compuestos de cinco o más anillos (Dreyer et al, 1995).

Independientemente de que en algunas ocasiones se aplican microorganismos adaptados para la degradación de un contaminante específico, y reforzando así el proceso, se debe tener en cuenta que para llevar a cabo la biodegradación deseada es necesario controlar diversos factores. Por ejemplo la combinación de oxígeno, nutrimentos, humedad, temperatura y pH. Se sabe también que los HPA son una clase de compuestos químicos sumamente hidrófobos. El naftaleno es el más soluble en agua, su solubilidad es aproximadamente de 30 mg/L, de manera que al aumentar el peso molecular o el número de anillos, por ejemplo criseno (cuatro) y benzo[a]pireno (cinco), la solubilidad disminuye.

Si bien, en los estudios mencionados con anterioridad se ha mostrado que los HPA pueden mineralizarse bajo condiciones de laboratorio, las conversiones de moléculas de HPA al dióxido del carbono siempre son mucho menores al 100% y a menudo entran en el intervalo de 20 a 50%. (Bumpus, 1989)

Los mecanismos fundamentales que controlan la biodegradación de HPA son:

- 1) La absorción o bioabsorción
- 2) La producción de metabolitos

La absorción de HPA ocurre en la membrana de la célula y se plantea como el primer paso en el proceso de degradación, un concepto importante de este modelo es que en el interior de membrana celular existe un micro-ambiente hidrófobo, que facilita la absorción. De esta manera, pasa al citoplasma en donde se lleva a cabo la degradación de los HPA por acción enzimática (Peña, 1995).
Figura 2.3

Algunas propiedades importantes de membrana celular son:

- Una bicapa lipídica.
- Los fosfolípidos de la membrana se comportan como un mosaico fluido.
- La membrana es selectivamente permeable.
- El interior de la membrana es muy hidrófobo (grupos de ácido grasos).

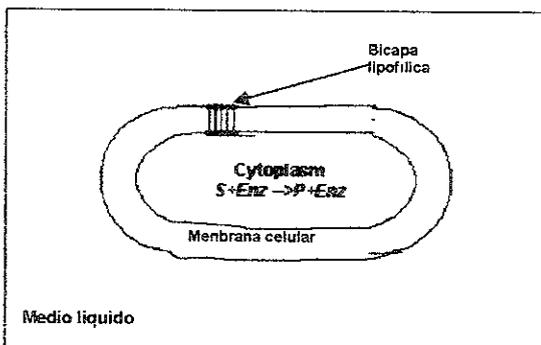


Figura 2.3 Esquema representativo de la membrana celular

Dadas las características hidrofóbicas de la membrana celular, los HPA pueden ingresar por absorción al interior de la célula. Una vez en el citoplasma, se lleva a cabo la degradación de éstos vía acción enzimática. De tal manera que la proporción de degradación de HPA puede ser controlada a través de absorción de la membrana. Se ha desarrollado un modelo de comportamiento estructurado para describir el proceso de bioabsorción y biodegradación. La absorción de HPA por membrana es análoga al coeficiente de partición del octanol-agua.

Cuando aumenta la hidrofobicidad del HPA hay una mayor bioabsorción en la membrana, sin embargo, la proporción de biodegradación disminuye porque menos HPA están biodisponibles en el líquido extracelular. Cuando la mayoría de los HPA están alejados de la célula, para llevar a cabo la bioadsorción, se obtiene en una baja biodegradación del HPA. Los hallazgos importantes del estudio de Chang y Bae, (1999) incluyen:

- La hidrofobicidad tiene un impacto significativo en la degradación de un compuesto hidrófobo

- Una célula puede ser al mismo tiempo un bioabsorbente y un biocatalizador para el HPA

Un estudio más específico señala al grupo enzimático Citocromo P-450 como el biocatalizador involucrado en las oxidaciones de compuestos químicos xenobióticos por microorganismos. Debido a su papel funcional ofrece un potencial para la tecnología de biodegradación. En varios microorganismos ya se han caracterizado las enzimas del Citocromo P-450 y se han establecido ventajas en términos de sus propiedades catalizadoras (Guengerich, 1995).

La acción de las enzimas del Citocromo P-450 puede explicarse en la figura 2.4 con una serie de pasos químicos simples:

- 1.- Comienza atrapando el sustrato al Citocromo férrico (Fe^{3+}).
- 2.- Un electrón es transferido al átomo de Fe, pasando éste a su estado ferroso (Fe^{2+}), esta transferencia es a veces realizada por proteína *Citocromo b₅* (figura 1).
- 3.- Esta forma ferrosa se une a una molécula de O_2 .
- 4.- Se realiza una segunda reducción agregándose un electrón y además un protón.
- 5.- Este intermediario pierde una molécula de agua dejando un complejo $(\text{FeO})^{3+}$ que directamente oxida el sustrato (Shugart, 1994).

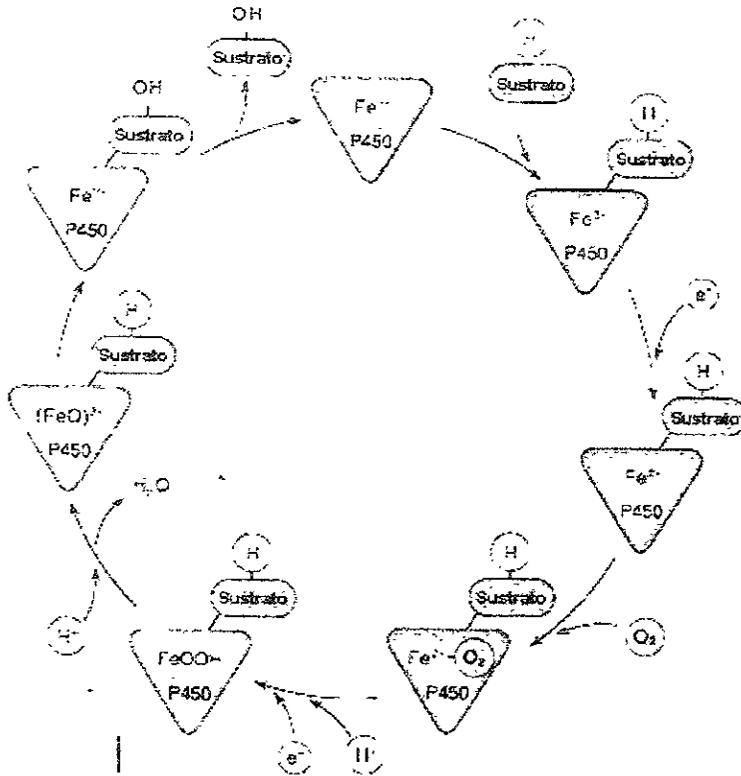


Figura 2.4 Mecanismo de acción del complejo enzimático Citocromo P-450.

La figura 2.5 muestra algunos de los posibles orígenes de electrones involucrados en el proceso recién explicado. Se observa al Citocromo P-450 en la membrana celular. Los electrones involucrados en la oxidación de los sustratos en manos del Citocromo P-450 pueden provenir del NADPH (Fosfato dinucleótido nicotinamida-adenina) desde el citoplasma o del Citocromo b5 que se encuentra en la membrana (Guengerich, 1993).

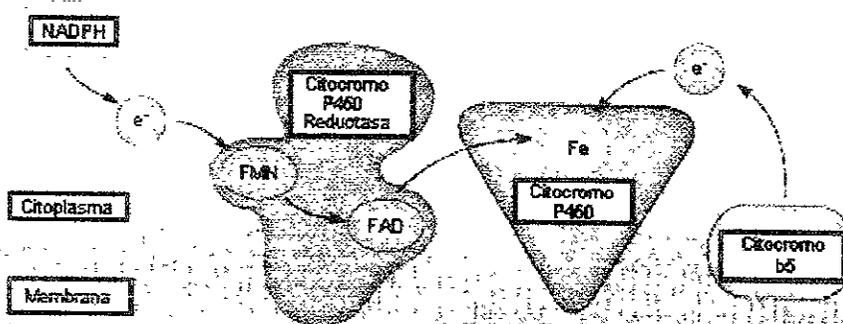


Figura 2.5 Componentes del sistema Citocromo P-450 en la membrana celular.

2.4 Rutas metabólicas de biodegradación de HPA

Recientemente se ha comprobado que la biodegradación de HPA en condiciones aerobias produce una mayor remoción y en ella interviene el Citocromo P-450 como catalizador de la reacción de oxidación (Savas, 1997).

Los microorganismos que llevan a cabo este proceso pueden ser hongos o bacterias, incluso se han llegado a secuenciar las rutas metabólicas de degradación (Stanley, 1986; Shutherland, 1992), como se muestra en las figuras 2.6 y 2.7.

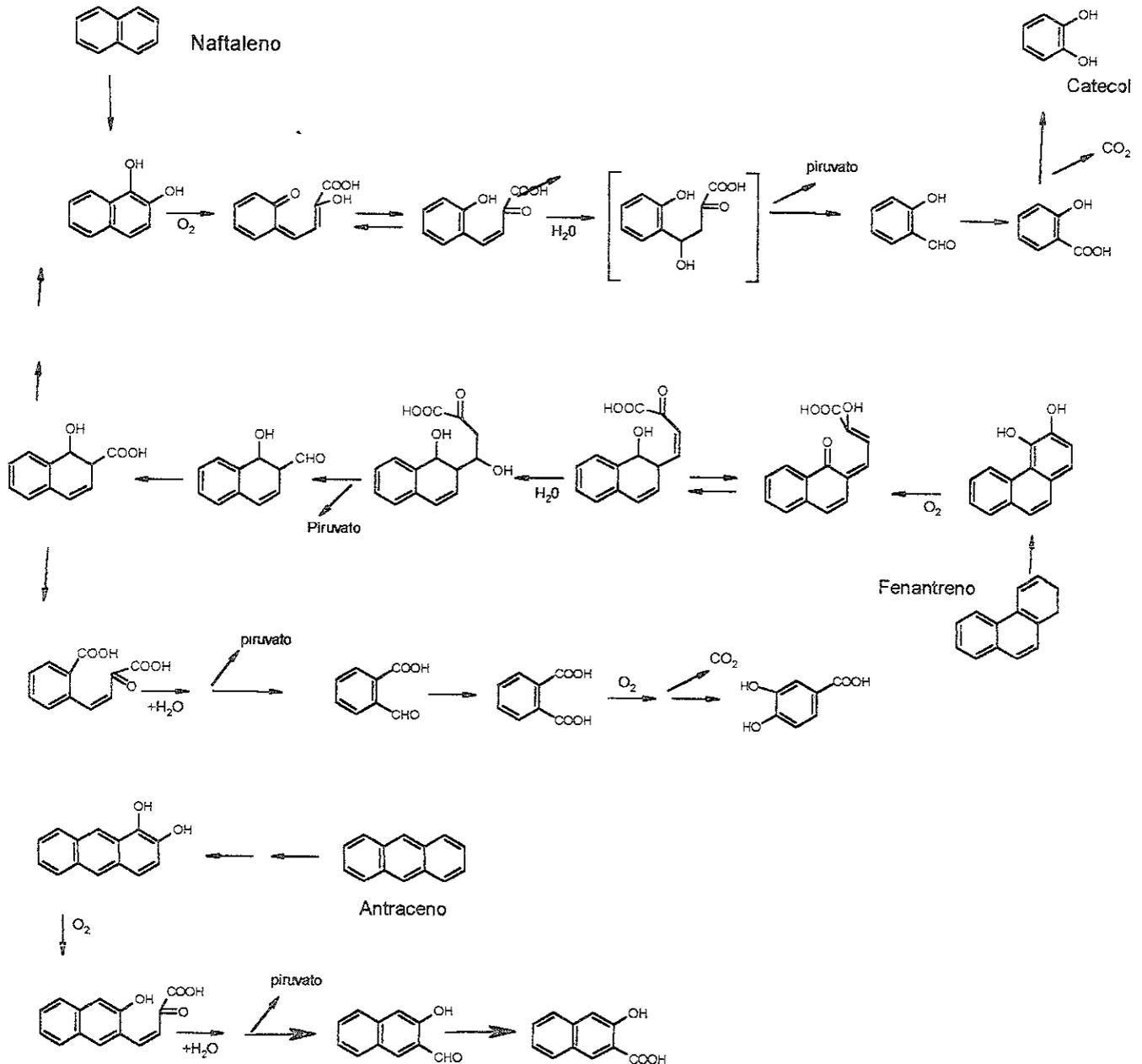


Fig 2.6 Ruta metabólica de biodegradación de antraceno, fenantreno y naftaleno, por *Pseudomona sp*

En la ruta metabólica propuesta para la degradación de HPA por bacterias, se observa que si el HPA tiene tres anillos aromáticos se llevan a cabo los procesos de oxidación e hidrólisis, de forma que se llega a la secuencia marcada para la degradación de antraceno, por lo tanto es posible suponer que en compuestos con más de tres anillos, el mecanismo de degradación es muy similar al sugerido (Stanley, 1986).

En el caso de que la biodegradación se lleve a cabo por hongos existen tres alternativas, figura 2.7, siendo los metabolitos más frecuentes las cetonas y los hidróxidos (Lange et al, 1994)

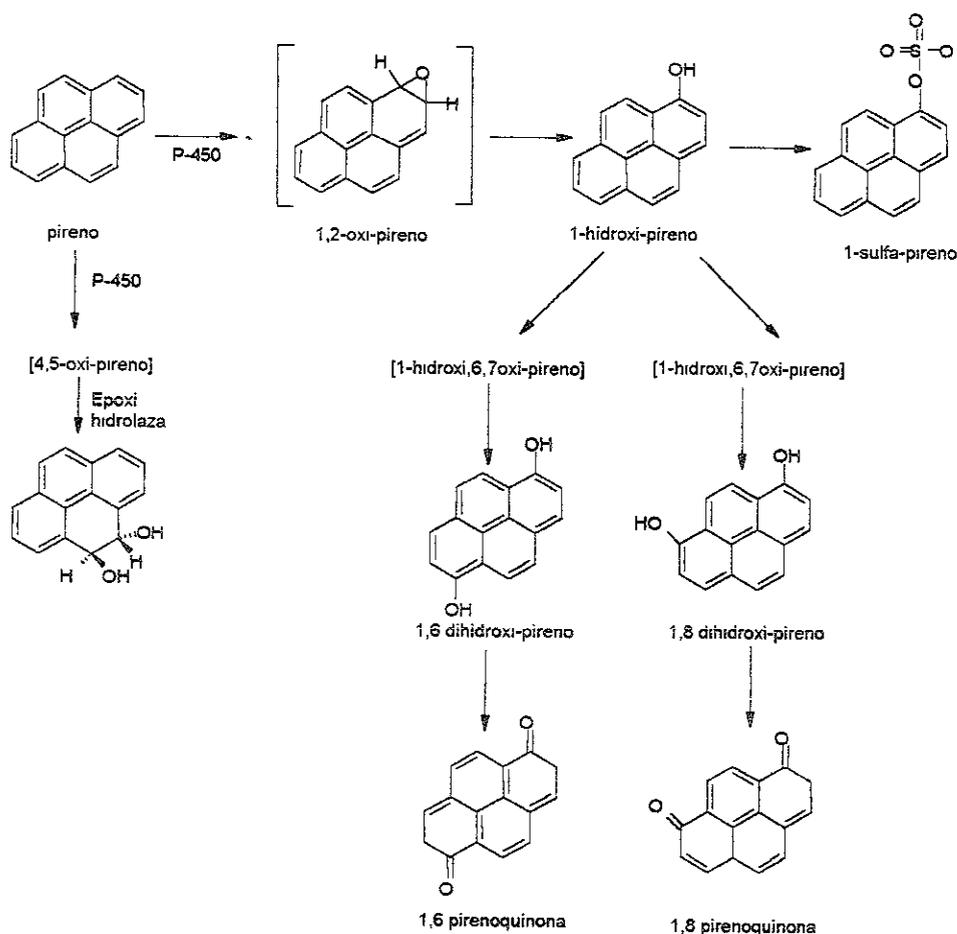


Fig 2.7 Ruta metabólica de biodegradación de pireno por hongos .

Es importante tener en cuenta que algunos de los metabolitos que se forman durante la degradación llegan a ser más tóxicos que los HPA iniciales, por esto para algunos de los compuestos con más de 4 anillos no se completa el proceso de mineralización (Schneider et al, 1996). También se sabe que el proceso biodegradación es completo cuando se lleva a cabo por cepas puras, y para en el caso de consorcios microbianos se producen fenómenos de cometabolismo o inhibición de la degradación en función de la ruta metabólica que sigan los microorganismos (Bouchez, 1995).

2.5 Factores involucrados en la biodegradación de HPA

Específicamente, se han descrito en forma general los factores principales que están involucrados en la biodegradación de HPA en un medio líquido donde el HPA está relativamente biodisponible. A continuación se describen, con base en estudios de casos, otros factores que intervienen en la biodegradación de HPA en el suelo, principalmente aquellos que propician la biodisponibilidad del hidrocarburo.

En la biodegradación de HPA en suelo, la biodisponibilidad del hidrocarburo puede llegar a ser el paso que determine la factibilidad de remoción. Se ha demostrado que al tratar de biodegradar una mezcla de HPA con microorganismos autóctonos, sólo se logran degradar compuestos de dos o tres anillos, al hacer un extracto de los HPA del suelo y suspenderlos en un medio líquido que se inocula con microorganismos aislados de mismo suelo se logra degradar una mayor proporción e incluso compuestos que anteriormente se creían recalcitrantes (Weissenfels et al, 1992). Para entender esta poca biodisponibilidad de los HPA en el suelo es necesario recordar que el suelo es una matriz compleja, formada principalmente por arena, Limo, arcilla y materia orgánica (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos) siendo la proporción de arcilla el factor más importante en la adsorción de materia orgánica incluyendo los HPA, de tal forma que un suelo con una gran cantidad de arcilla deja en menor biodisponibilidad a los HPA (Siebe, 1997). Ante esta problemática se han propuesto dos soluciones: mezclar el suelo con composta o algún otro material que sirva como soporte para los microorganismos y que a su vez compita con el suelo para la adsorción de HPA (Käster y Mahro, 1995), o agregar un compuesto surfactante (tensoactivo) capaz de desorber los HPA de la arcilla y hacerlos disponibles en el agua presente en el suelo, el inconveniente de utilizar esto es que los microorganismos no sólo degradan al HPA sino también al agente surfactante (Madsen y Kristense, 1996; Soeder et al, 1996). Sin embargo, se ha observado que algunos microorganismos son capaces de generar compuestos extracelulares (enzimas) para desorber el HPA del suelo tal como sucede con algunos hongos (Andersson, 1996). Otros factores físicos que afectan la biodegradación de HPA son: temperatura, oxigenación, salinidad, humedad, acidez, alcalinidad y nutrimentos (Leahy y Colwell, 1990).

2.5.1 Temperatura

La temperatura influye por su efecto en la naturaleza física y composición química de los HPA; en la actividad de los microorganismos y en la composición de la flora microbiana. La degradación generalmente disminuye cuando la temperatura desciende, lo que se relaciona con una baja de la actividad enzimática (Gibbs et al, 1975).

2.5.2 Oxigenación

La oxigenación es el paso inicial del catabolismo de HPA usando el complejo enzimático Citocromo P-450, que requiere de oxígeno. La disponibilidad de oxígeno en suelos depende del consumo microbiano, la unidad de suelo, si se encuentra inundado y de la presencia de sustratos utilizables. (Bossert y Bartha, 1984).

2.5.3 Salinidad

Ward y Brock demostraron que el grado de metabolización de un hidrocarburo disminuye cuando se incrementa la salinidad en un intervalo de 3.3 a 28.4%.

2.5.4 Humedad

Se considera que la humedad adecuada para la actividad microbiana es de 40 a 68% para sistemas aerobios. En suelos con humedad mayor al 70% se reduce la transferencia de oxígeno y disminuye de manera significativa la actividad microbiana (Cookson, 1990; Griffin, 1980)

2.5.5 Acidez y alcalinidad

Un suelo con pH de 6 a 7 se considera neutro, con pH menor de 4.5 es muy ácido, y muy básico de 8 en adelante. El pH del suelo se relaciona con la capacidad de intercambio iónico del mismo (Primo, 1981). El pH afecta el comportamiento de las funciones celulares, transporte de la membrana celular y el equilibrio de reacciones catalizadas de los microorganismos. El crecimiento bacteriano se lleva a cabo en condiciones óptimas de pH neutro a ligeramente alcalino. La degradación de hidrocarburos se reporta como muy rápida a pH cercano a 7, para el caso de algunos hongos como *Phanerochoete chrysosporium*, su actividad aumenta a pH de 4.5 (Rodríguez et al, 1999; Dhawale et al, 1992)

2.5.6 Nutrientes

La composición básica de las bacterias es de 80 % agua y 20 % de materia seca, de la que el 90 % es materia orgánica y el 10 % de inorgánica. Una fórmula que permite describir de manera aproximada su fracción orgánica es $C_5H_7O_2N$ (EPA, 1986). Cuando también se considera la presencia de fósforo, se puede emplear la formulación $C_{60}H_{87}O_{23}N_{12}P$. Los compuestos que forman parte de la fracción inorgánica incluyen P_2O_5 (50%), SO_3 (15%), Na_2O (11%), CaO (9%), MgO (8%), K_2O (6%) y Fe_2O_3 (1%) (Metcalf y Eddy, 1998). Puesto que todos estos elementos y compuestos deben proceder del entorno en que se desarrolla la célula, la falta de cualquiera de ellos limitara el crecimiento celular. Con base en ésta información se realiza un cálculo teórico de la cantidad de nitrógeno y fósforo para la síntesis de la masa molecular (Mills y Frankenberger, 1994).

Sin embargo, mejor que calcular las necesidades teóricas nutricionales o utilizar una regla empírica, se debería determinar como parte de los ensayos de tratabilidad en laboratorio. Las necesidades específicas son mucho más dependientes del tipo de residuo, la disponibilidad de nutrimentos en el mismo producción de biomasa y del diseño del sistema del tratamiento. De esta forma se tienen diferentes relaciones C:N:P. Encontrando las que se basan en la cantidad de carbono orgánico total COT, con la proporción de COT:N:P de 100:23:4.3 pero por lo general se ha adoptado una regla empírica 100:25:5 (La Greca y Buckingham, 1998). También las que son producto de la experimentación ajustando la relación C:N:P hasta obtener la óptima relación C:N:P 100:10:1, o donde se observan mejores rendimientos (Rojas et al, 2000). De igual forma se han reportado relaciones experimentales que señalan que es necesario 150mg de nitrógeno y 30mg de fósforo para convertir 1 g de hidrocarburo en material celular (Crawford y Crawford, 1993). Asimismo, se debe considerar que durante degradación del hidrocarburo aproximadamente se convierte la mitad en material celular y el resto se oxida para obtener energía.

La energía liberada en las reacciones de oxidación-reducción no se desperdicia, sino que se emplea en la formación de ciertos compuestos bioquímicos que contienen enlaces fosfato de alta energía el más común es el ATP, que actúa como receptor primario de energía en la célula (Neidhardt et al, 1990). De los nutrimentos requeridos para el crecimiento de los microorganismos son nitrógeno y fósforo los que probablemente llegan a estar presentes de manera deficiente en el suelo contaminado, por lo que normalmente se deben agregar al sistema de biorremediación en una forma disponible (ejemplo: amonio como fuente de nitrógeno y fosfatos como fuente de fósforo). Específicamente la adición de fosfatos contribuye en la formación de ATP para llevar a cabo la función metabólica, y en la conformación de aminoácidos y fosfolípidos así como otros compuestos necesarios para el desarrollo de microorganismos. Al igual que el fósforo otro nutrimento de suma importancia es el nitrógeno el cual es la clave para la construcción de aminoácidos y ácidos nucleicos (Brock y Madigan, 1993).

26

CAPÍTULO 3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.1 Plan de trabajo

Con base en los fundamentos teóricos señalados en el capítulo anterior, en la biodegradación de HPA intervienen factores fisicoquímicos y biológicos, por lo que si el objetivo de este trabajo es evaluar la biodegradación de un HPA en suelo es necesario controlar cada uno de los factores que intervienen. Asimismo, se debe contar con una metodología analítica que permita realizar el seguimiento de los HPA, de forma reproducible. Por esta razón la parte experimental estará dividida en tres etapas fundamentales que son:

1. Montaje y adecuación del método analítico
2. Ensayo de verificación de la eliminación de compuestos HPA presentes en un suelo de prueba de características conocidas, y constatación de los mecanismos por los cuales desaparecen (forma abiótica o por biodegradación)
3. Ensayo de la biodegradación empleando un suelo de prueba contaminado con HPA al cual se le adicionan nutrimentos (fosfatos y nitratos)

Al respecto, las dos primeras etapas son las más importantes para comprobar la factibilidad de biodegradación de los HPA y la última, tiene como propósito el encontrar las condiciones óptimas para que se lleve a cabo la biodegradación inducida de los HPA seleccionados.

3.1.1 Reactivos y disolventes.

Para llevar a cabo la fase experimental se contó con los siguientes materiales:

Disolventes: Diclorometano, Hexano, Ácido Acético y Ácido Clorhídrico todos ellos Merck grado HPLC.

Reactivos: Fenol (Loba 77848), Naftol (Merck 1-06223.0050), Ácido 1 hidróxi naftóico (Fluka 55910), Ácido benzóico (Merck 134.0005), 2,6-Dimetil fenol (Merck 3768), 3-4 Ácido dihidróxi benzóico (Sigma 99-50-3), Ácido 4-hidroxi benzóico (Sigma 99-96-7), Dibenzo(a,h)antraceno (Sigma 53-70-3), Criseno (Sigma 218-01-9), Antraceno (Sigma 120-12-7), Sulfato de sodio Anhidro (Sigma S 5640).

Para llevar a cabo la etapa experimental se utilizó un suelo que previamente había sido caracterizado por personal del instituto donde se desarrolló este trabajo de investigación, el cual se denominó suelo IFA, su caracterización se muestra en la tabla 3.1. En cuanto a los HPA seleccionados en la tabla 3.1a se muestran sus principales propiedades fisicoquímicas.

Tabla 3.1 Estudio de caracterización del suelo utilizado en la primera y segunda etapa.

Materia seca %	88.18±5.5
densidad de suelo (<5mm) Kg/L	1.097±0.2
densidad de suelo (< 2mm) Kg/L	1.045±0.13
Suelo < 2mm:	
materia seca %	88.18±1.4
Distribución de tamaño de partícula	
Arena 2mm-63 µm %	41.17± 4.3
20-63 µm %	8.75± 0.45
10-20 µm %	8.25±1.1
6-10 µm %	4.24±0.7
2-6 µm %	9.25± 0.57
Limus %	30.5± 0.32
Arcilla <2 µm %	28± 4.5
Materia Orgánica seca %	1.2± 0.09
pH suelo	6.5± 0.1
Máxima Capacidad Retención de Agua gH ₂ O/g suelo seco	0.373±0.05
Respiración básica mg CO ₂ /g suelo seco 24 hrs	13.56±0.5
Respiración inducida Glucosa mg CO ₂ /g suelo seco 4 hrs	44.05±0.5
Hidrocarburos Totales mg/Kg	40.38±1.3
Nitrógeno total %	0.16±0.05
Fosfatos disponibles mg/kg	< 100
Carbono total mg/ kg	20329±35
Carbono Inorgánico mg/ kg	5679±39
Nitrógeno como Nitratos mg/ kg	71.4±.05
Nitrógeno amoniacal mg/ kg	<1
HPA	
Fenantreno µg/ kg	34.26±0.46
Antraceno µg/ kg	3.86±0.5
Fluoranteno µg/ kg	37.96±1.4
Pireno µg/ kg	41.86±3.86
Benz(a)antraceno µg/ kg	18.41±3.21
Criseno µg/ kg	24.79±4.5
Benzo(b)fluoranteno µg/ kg	19.17±3.2
Benzo(k)fluoranteno µg/ kg	8.35±3.1
Benzo(a)pireno µg/ kg	17.86±2.8
Benzo(g,h,i)perileno µg/ kg	17.27±4.3
Indeno(1,2,3-c-d)pireno µg/ kg	19.43±6.3
Metales Pesados	
Ca mg/ kg	11053±5.8
Cd mg/ kg	7.7±2.3
Cr mg/kg	28.5±1.2
Cu mg/kg	21.7±0.51
Fe mg/kg	28481±28
K mg/kg	5053±43
Mg mg/kg	8732±61
Mn mg/kg	476±13

Tabla 3.1 a Características Fisicoquímicas de los HPA adicionados

Químico	Antraceno	Criseno	Dibenzo[a,h]antraceno
# CAS	120127	218019	53703
Peso molecular	178.23	228.20	278.20
Número de anillos	3	4	5
Solubilidad en agua (mg/L)	7.3E-02	2.0E-03	2.5E-03
Presión de vapor a 20°C (Pa)	2.61E-02	8.4E-05	1.33E-08
Constante partición Henry	2.67E-03	3.88E-03	6.00E-07
Log Coef Partición Octanol-agua.	4.45	5.61	6.69
Constante de Permeabilidad (cm/h)	0.22	0.81	2.7
Coefficiente partición Carbono org. (L/kg)	2.95E+04	3.98E+05	3.80E+06
Difusión en Aire (cm ² /s)	3.24E-02	2.48E-02	2.02E-02
Difusión en Agua (cm ² /s)	7.74E-06	6.21E-06	5.18E-06
Captación de suelo a planta seca	11.0E-2	1.9E-2	0.43E-2
Captación de suelo a planta húmeda	2.2E-2	0.38E-2	0.0088E-2
Factor de Absorción de GI	7.60E-01	3.10E-01	3.10E-01
Factor de absorción dérmico	1.00E-02	1.00E-02	1.00E-02
Factor de Bioactividad en peces (L/Kg)	0.13E+04	1.3E+04	8.7E+04
Coefficiente Transferencia en carne (día/kg)	6.3E-04	1.3E-02	1.6E-01
Coefficiente Transferencia en leche (día/kg)	2.0E-04	4.0E-03	5.0E-02

3.2 Método analítico

Como se ha planteado, el principal objetivo de esta investigación es comprobar la factibilidad de degradación de los que los HPA en el suelo con la adición de microorganismos de una planta de tratamiento de aguas residuales, para lo cual, es necesario contar con un método analítico que permita hacer un seguimiento del sustrato que sirve como fuente de carbono (HPA) para los microorganismos. Una muestra de suelo se somete a una serie de etapas o procedimientos de acondicionamiento que permiten aislar los compuestos de interés para su análisis y cuantificación, cada una de estas etapas de acondicionamiento están descritas como normas o métodos analíticos.

No obstante, al revisar investigaciones de biodegradación previamente se observa que la validez de los resultados obtenidos, tienen como sustento una metodología analítica validada y probada. Tomando como referencia las normas establecidas por la EPA SW846 Métodos 3600C, 3610B, 3611B, 3630C (Wischamann y Steinhart, 1997; Zink y Leoben, 1995; Langbehn y Steinhart, 1995), o alguna otra organización internacional. Sin embargo no siempre es posible aplicar estas en su totalidad como han sido descritas, por diferentes causas. como el no contar con la infraestructura necesaria, o el hecho de que estos métodos usan grandes volúmenes de reactivos, lo cual genera una gran cantidad de residuos, que muchas veces no pueden ser tratados en forma adecuada, esto no implica que los métodos propuestos no sean tomados en cuenta, por el contrario, estos sirven como referencias generales. A partir de estos se harán las adecuaciones necesarias para cumplir con lo estipulado. Adicionalmente al trabajo de investigación de biodegradación se desarrolló una metodología que permitió el seguimiento en el cambio de la concentración de los compuestos de interés de una forma reproducible y confiable, haciendo posible analizar una mayor cantidad de muestras al menor costo, pero generando la mínima cantidad de residuos. Además hay que considerar que si bien, este método fue utilizado en primera instancia para la investigación de biorremediación planteada, y podría ser utilizado en investigaciones posteriores en donde las condiciones de biodegradación impliquen trabajar con un mayor número de compuestos que analizar, como es el caso de experimentos de biorremediación en condiciones reales y no tan sólo para experimentos con condiciones controladas, incluyendo el seguimiento de metabolitos (anexo I).

Secuenciar un proceso de biorremediación implica conocer cual es la variación de los contaminantes (HPA), para esto tienen que ser separados del suelo mediante el método de extracción líquida, pasando así de una fase sólida a una fase líquida, pero en la extracción se aíslan junto con los HPA los metabolitos y otros compuestos orgánicos presentes en el suelo. Aún cuando es posible cuantificar los compuestos de interés con equipos análisis sofisticados, como un cromatógrafo de gases con detector de espectroscopía de masas (CG/MS), el cual es capaz de separar e identificar cada uno de los compuestos presentes, no siempre es posible contar con este equipo o en ocasiones, el extracto contiene una gran cantidad de compuestos difíciles de separar, lo cual implica largos

tiempos de análisis o bien que algunos de estos compuestos no sean excluidos de la columna cromatográfica con lo que el tiempo de vida de ésta disminuye, por esta razón se propone un proceso de limpieza del extracto denominado "Clean up", este proceso no es otra cosa que una cromatografía previa, la cual permite un fraccionamiento o separación de compuestos presentes en la muestra de acuerdo con su polaridad y de esta forma realizar con mayor facilidad el análisis. Con lo que se ha planteado hasta el momento se puede observar la dificultad para elaborar un método analítico, sobre todo considerando que al modificar los métodos que ya han sido validados, se deben encontrar nuevas condiciones que permitan realizar el análisis en forma confiable y reproducible. Sin embargo, al tomar como referencia los métodos revisados se establecen las etapas mínimas que permiten llevar a cabo el análisis, las cuales se enuncian a continuación: extracción soxhlet, concentración del extracto (evaporación), fraccionamiento "clean up", concentración de las fracciones (evaporación), reacción de derivatización (sililización), análisis en el CG/MS. Para cada una de estas etapas se evaluaron las condiciones y los parámetros de trabajo hasta encontrar las óptimas, con excepción del proceso de extracción. Mediante la cuantificación de un estándar, el procedimiento se describe con detalle en el Anexo 1. En la figura 3.2 se representa en forma general un diagrama de flujo con los pasos de metodología desarrollada.

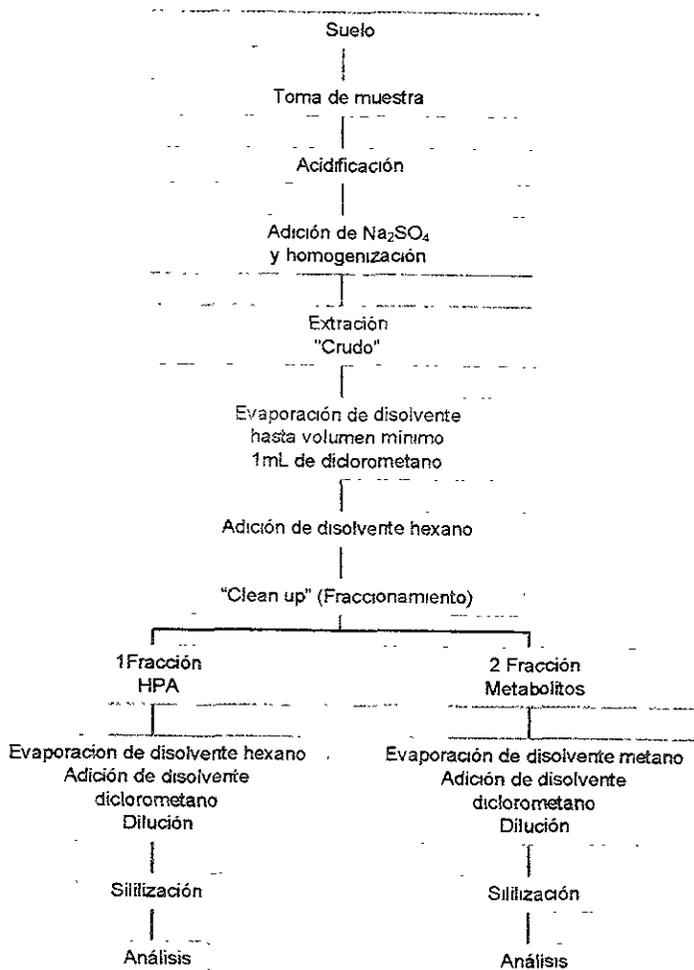


Fig. 3.2 Secuencia del procedimiento seguido para el análisis de muestras.

Asimismo, se hace una breve descripción de las etapas principales.

3.2.1 Extracción de HPA y cambio de disolvente

La optimización al proceso de extracción se realiza al cuantificar los extractos de del suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2). La extracción de cada uno de los experimentos planteados se realizó siguiendo la norma EAP SW846, método 3541, que establece el procedimiento para extracción soxhlet automatizada. De manera resumida el procedimiento consistió en lo siguiente: se tomó una muestra de 5 a 10 g de suelo utilizando una balanza analítica (SCALTEC Mod. SB41), y una cantidad igual de sulfato de sodio anhidro (previamente colocado en un horno a 450 °C por 12 horas, para posteriormente alcanzar la temperatura ambiente dentro de un desecador con cierre a vacío). El suelo se acidificó previamente con ácido clorhídrico 4.4 M añadiendo 2mL a cada muestra de suelo y se dejó en reposo 3 horas. Después el suelo se mezcló con el sulfato de sodio en un mortero, hasta que se logra homogeneizar la muestra. Posteriormente en un cartucho para extracción (EDEROL Qual 115) se pesaron 10 g de la mezcla homogeneizada. La extracción se realizó por duplicado en el equipo de extracción Soxhlet Automático (GERHARDT Soxthem2000 automatic). Utilizando como disolvente 100 mL diclorometano bajo las siguientes condiciones de proceso. en la etapa de cocimiento una hora, con una temperatura de 140 °C, posteriormente cuatro etapas de evaporación de disolvente de 15 mL y un período de extracción de hora y media.

El extracto de aproximadamente 20 mL se evaporó usando el rotoevaporador con las siguientes condiciones de operación, temperatura 30 °C y presión 300 mmHg, el proceso se detuvo cuando el volumen residual fue aproximadamente menor a 2 mL, para aforar posteriormente a 2 mL con diclorometano. El análisis del extracto no fraccionado (denominado "crudo") obtenido anteriormente pudo realizarse mediante un cromatógrafo de gases acoplado con un detector de masas. La concentración de la muestra no debió exceder el intervalo en el cual la respuesta es lineal entre el espectrómetro de masas y la concentración del HPA, por lo que se tuvo que diluir la muestra antes de inyectarla al cromatógrafo. Con ello los posibles metabolitos formados quedaron en una concentración mínima en la cual no fue posible detectarlos ni cuantificarlos con exactitud. Para poder conocer los posibles metabolitos formados durante la biodegradación fue necesario llevar a cabo el fraccionamiento del extracto, también conocido como "clean up", esto se realizó en una columna cromatográfica aprovechando que los compuestos en el extracto tienen diferente polaridad.

3.2.2 Acondicionamiento y fraccionamiento del extracto

Antes realizar el fraccionamiento a los extractos fue necesario determinar los parámetros óptimos de trabajo, lo cual se describe en el anexo I donde se utilizaron estándares conocidos para fragmentar. Asimismo se consideró el manejo de compuestos tóxicos, por lo que se requiere contar con un equipo que

de preferencia sea desechable o fácil de limpiar, para tal efecto se propuso la elaboración de columnas cromatográficas que usan como soporte externo pipetas Pasteur con capacidad aproximadamente 14.5 mL y como retén interno fibra de vidrio, en lugar de las tradicionales columnas, que utilizan una mayor cantidad de reactivo y disolventes.

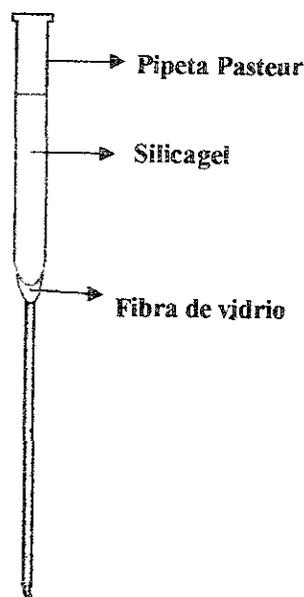


Figura 3.3 Esquema simplificado de una columna de fragmentación.

La columna cromatográfica se limpió perfectamente (pipeta Pasteur) con hexano, se le colocó en la parte interior inferior 0.08 g de lana fibra de vidrio (previamente lavada con acetona y hexano y dejando a evaporación en la campana de extracción), como se muestra en la figura 3.3 procurando no ocupar una longitud mayor a 2 mm. Posteriormente, en un vial con capacidad para 10 mL y tapón de teflón se depositaron 0.5 g sílica gel (malla 15-40 μ y 60 Å diámetro de poro) desactivada al 8% y se agregaron 3 mL hexano, formándose una suspensión que se colocó dentro

de la pipeta previamente preparada, evitando la formación de burbujas en su interior. Asimismo se cuidó que la columna de sílica gel siempre permaneciera cubierta por el disolvente de lo contrario ésta ya no sería útil.

El extracto "crudo" fue evaporado en el rotovaporador a una temperatura 30 °C y presión 300 mmHg, el proceso se detuvo cuando el volumen residual fue aproximadamente 0.5 mL, aforando posteriormente a 2mL con hexano, la solución así preparada fue depositada dentro de la columna cromatográfica para el fraccionamiento o "Clean up". La primera fracción se eluyó con 7mL de hexano y la segunda fracción con 0.5 mL de diclorometano seguido por 6 mL de metanol/ácido oxálico. Ambas fracciones fueron recolectadas en viales con tapón de teflón y evaporadas en el rotoevaporador hasta un volumen aproximadamente menor a 2 mL aforando con el solvente respectivo. Las condiciones de evaporación fueron 30 °C y presión 300 mmHg y 40 °C y presión 200 mmHg para la primera y segunda fracción respectivamente. Para realizar el análisis cromatográfico en ambas fracciones se debió sustituir el respectivo disolvente por diclorometano, con el fin de realizar la reacción de sililización.

3.2.3 Sililización

Es posible obtener una respuesta del equipo a diferentes concentraciones de los HPA inyectando la muestra directamente al cromatógrafo. Sin embargo esto no

fue posible para los metabolitos que se formaron durante la biodegradación de los HPA ya que son compuestos en los que con un aumento de temperatura su estructura cambia o destruye, como son grupos carboxilo, aldehído o hidróxido (COOH, CHO, OH) unidos a un grupo aromático. De modo que para poder ser detectados en el cromatógrafo de gases, fue necesario protegerlos de una posible descomposición al momento de ser inyectados en el cromatógrafo. Una forma de protegerlos es mediante la reacción de sililización, según se establece en los trabajos de Wischmann, 1996. La sililización es una reacción química en la cual se agrega un grupo trimetil silicato (TMS) al metabolito en la posición del hidrógeno que está unido al grupo carboxilo o hidroxilo, esto implica que el disolvente no debe contener ninguno de estos grupos y de preferencia debe ser no polar como por ejemplo el hexano o diclorometano. También debe tomarse en cuenta que el reactivo sililizante además de costoso es tóxico, por lo que se aconseja trabajar con microlitros, en microviales los cuales tienen una capacidad máxima de 200 μL . Preferentemente se debe trabajar dentro de una campana de extracción. Para llevar a cabo la reacción de sililización de la primera fracción se tomaron 70 μL de ésta y se depositaron en un microvial, en el cual se evaporó el disolvente hexano (usando el rotoevaporador a 30 °C y presión 300 mmHg) hasta sequedad para adicionar 70 μL de diclorometano y 70 μL de TMS y poniendo a temperatura de 50°C durante 30 minutos. Para la segunda fracción el proceso es similar, solo varían las condiciones en el rotoevaporador a 40 °C y presión 200 mmHg.

3.2.4 Análisis cromatográfico en el GC/MS

Como se mencionó anteriormente, la cuantificación de los HPA y los metabolitos se realiza por medio del análisis cromatográfico, para lo cual se cuenta con un cromatógrafo de gases que tiene como detector un espectrómetro de masas, serie HP 6890 utilizando una columna capilar HP 5MS, el cual además de separar los compuestos analíticos permite identificar y constatar si efectivamente corresponde al compuesto esperado.

3.3. Ensayo de factibilidad de biodegradación de HPA

Debido a la dificultad que implica el manejo de suelos contaminados por hidrocarburos como consecuencia de la actividad propia de la industria del petróleo, no es recomendable utilizar éstos para realizar experimentos tendientes a la evaluación de cada uno de los factores que intervienen en la degradación de este tipo de contaminantes. Principalmente por que al trabajar con suelos poco homogéneos no es posible lograr la reproducibilidad de los experimentos, ya que no existe un punto de referencia para realizar la comparación entre degradación abiótica y microbiología, además de que este suelo tiene como fuente de carbono una cantidad inespecífica de compuestos.

3.3.1 Caracterización del suelo experimental y selección de HPA

Es por lo anteriormente mencionado que se propuso el uso de un suelo denominado IFA que inicialmente estuviera libre de HPA, así como de otras posibles fuentes de carbono. La caracterización del suelo IFA fue realizada previamente por personal del instituto (IFA) donde se realizó este trabajo de investigación, estando ésta perfectamente caracterizada en la tabla 3.1, que se muestra al inicio de este capítulo. Se puede observar que el contenido de arcilla es de 28%, diferente a los suelos mexicanos que fluctúan entre un 8 a 14 %, esto implica que el experimento fue sometido a una mayor adsorción de los HPA en el suelo, lo cual repercute en una menor biodisponibilidad. Por lo que de resultar factible la biodegradación bajo estas condiciones, se podría esperar que en un suelo con menor adsorción se obtendrán mejores resultados. Otros beneficios que se obtienen al utilizar un suelo IFA son: la posibilidad de controlar la adición de los contaminantes HPA, y aumentar la posibilidad de biodegradar los compuestos presentes mediante la adición de microorganismos.

Los HPA seleccionados para la fase experimental son: antraceno, criseno, y dibenzo(a,h)antraceno, con dos, cuatro y cinco anillos respectivamente. Se sabe que el antraceno es biodegradable, y que el dibenzo(a,h)antraceno es recalcitrante, aún en condiciones de biodisponibilidad (Ye et al, 1996) éste se agrega con el propósito de utilizarlo como estándar interno durante el análisis, el criseno es el HPA que estará en evaluación, el que en trabajos previos se ha reportado con biodegradación de 50 a 70% en medio líquido y con resultados mínimos en suelo (kelley, Cerniglia, 1995). Las características fisicoquímicas de estos HPA están descritas previamente en la tabla 3.1a, al inicio de este capítulo.

3.3.2 Procedimiento experimental

Para realizar el estudio que permitiera determinar la factibilidad de la eliminación de los HPA del suelo por microorganismos fue necesario considerar, en lo posible todos los fenómenos que se pudieran presentar durante la fase experimental, como: fotocatalisis, evaporación, descomposición térmica, o por el contrario, dada la naturaleza de los HPA, se presentara una adsorción tal que fuera imposible retirarlos del suelo. Por lo anterior y a efecto de corroborar que la degradación que se presentó fue atribuible únicamente a la acción de los microorganismos y no a fenómenos abióticos, se plantearon tres experimentos simultáneos con las características indicadas en la tabla 3.2. De acuerdo con esto el tratamiento 1: servirá como testigo, y para determinar las posibles interferencias de los compuestos orgánicos presentes inicialmente en el suelo. En el tratamiento 2: la adición de azida de sodio servirá para inhibir la actividad microbiana y detectar la degradación abiótica que se pueda presentar y el tratamiento 3: en el que se observará como se lleva a cabo la degradación microbiana de los HPA.

Tabla 3.2 Características de los experimentos realizados con suelo

		TRATAMIENTO 1 suelo + inóculo	TRATAMIENTO 2 suelo + HPA	TRATAMIENTO 3 suelo + inóculo + HPA
	Suelo IFA adicionado	284.6241	284.6241	284.6241
	Suelo seco (g)	250	250	250
Concentra ción final ppm		mg adicionados		
500	ANTRACENO	0	125	125
500	CRISENO	0	125	125
50	DB(a,h)Antr	0	12.5	12.5
		mL		
Solvente	CH ₂ Cl ₂	0	250	250
	H ₂ O (mL)		21.3258	
Inóculo	Lodos (g)	21.616		21.616
	Na- Azid (g)	0	0,25	0

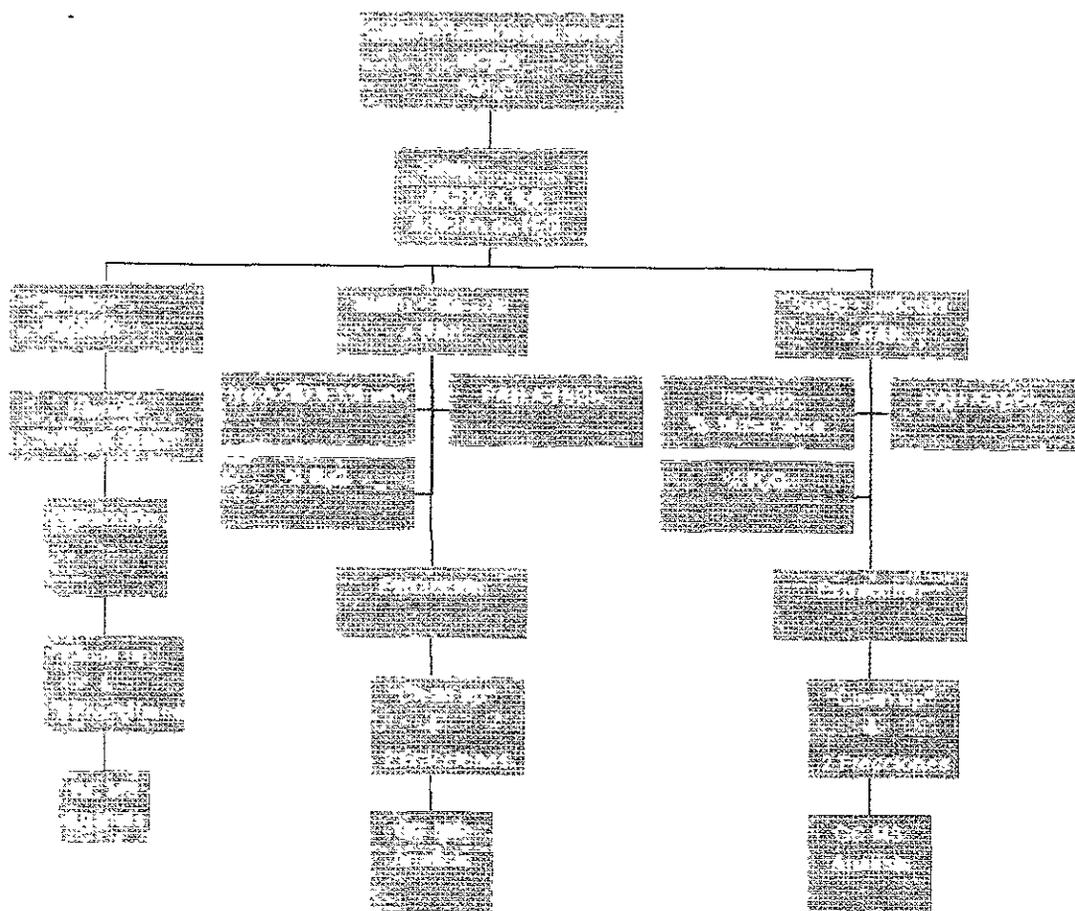


Figura 3.4 Diagrama de flujo de la primera etapa de trabajo

En la figura 3.4 se presentan las diferentes actividades realizadas que constan principalmente de: a) contaminación del suelo con HPA, b) inoculación del suelo, c) aplicación de metodología analítica (extracción, acondicionamiento del extracto "clean up", fraccionamiento del extracto, sililización, análisis en el cromatógrafo de gases con un detector espectrómetro de masas).

3.3.3 Preparación de las muestras de suelo experimental

El suelo fue previamente tamizado, permitiendo solamente el paso de partículas menores a 2 mm, con el propósito de eliminar raíces y hojas, así como para disgregar los agregados existentes, contar con un suelo homogéneo y con características de textura adecuadas para la realización del estudio. En los tratamientos 2 y 3 el suelo fue contaminado con las siguientes concentraciones de HPA: 500 mg de criseno, 500 mg de antraceno y 50 mg dibenzo(a,h)antraceno por kilogramo de suelo seco. Para lograr esto, antes de agregar el "agua" y los microorganismos, se preparó una solución de los tres HPA en concentración igual a la que tendrían en el suelo. Como disolvente se utilizaron 250 mL de diclorometano (CH_2Cl_2). Esta solución se mezcló en un vaso de precipitados de 2L con la cantidad de suelo necesaria que correspondió a 250 g de suelo seco manteniendo en agitación y evaporando durante 72 horas en la campana de seguridad. Posteriormente se agregó el inóculo o la azida de sodio según correspondió. Una vez realizado lo anterior, se cubrió la parte exterior del vaso con papel estaño con el propósito de evitar la fotodegradación. La temperatura se mantuvo constante a 20 °C. La tabla 3.2 resume las características de cada experimento.

3.3.4 Control de humedad

Un parámetro de suma importancia en los estudios de biodegradación que se debe conocer y controlar a lo largo del experimento, es el porcentaje de humedad que contiene el suelo. Por tal motivo, antes de inocular y/o contaminar el suelo debe tomarse una muestra aproximadamente de 5 g de suelo con el que se va a trabajar. Esa muestra se coloca en el horno a una temperatura de 105 °C durante un tiempo suficiente para que se evapore el agua que contiene. Una vez realizado lo anterior, se pesa y por diferencia de pesos entre el inicial y el final, se determina la cantidad de agua presente. Este tipo de análisis debe hacerse en muestras representativas y por triplicado a efecto de contar con resultados confiables. Debe recordarse que del suelo bajo estudio ya se había determinado con anterioridad la Máxima Capacidad de Retención de Agua, MCRA, la cual fue de 0.373 g de agua por gramo de suelo seco. Además se sabe que para que ocurra la biodegradación en el suelo, éste debe contar con aproximadamente un 60% como máximo respecto a la MCRA. En este caso el valor fue de 0,2238 gramos agua por gramo de suelo seco, el cual corresponde a un valor aceptable. En consecuencia, se procedió a agregar agua hasta llegar al valor estipulado el cual permanece constante a lo largo de todo el experimento (por fenómenos naturales de evaporación, la cantidad de agua en el suelo disminuye). Por lo que periódicamente se debe añadir la cantidad necesaria para que la cantidad de agua siempre sea constante. La forma de mantener la humedad del suelo a lo largo del

experimento, se pudo lograr a partir del control constante del peso del recipiente, lo cual a su vez se logra a través de la adición de agua cuando así se requiera. No obstante, no es posible garantizar completamente que dicha agua adicionada logre distribuirse homogéneamente en todo el suelo. Lo que puede llegar a ocasionar repercusiones indeseables en el experimento. Una forma de minimizar este efecto indeseable es mediante la adición cuidadosa con un atomizador del volumen de agua requerido para el control de la humedad.

3.3.5 Inóculo

Con respecto al inóculo incorporado al suelo bajo estudio, como se mencionó con anterioridad, procedió del lodo de una planta de tratamiento aerobio de aguas residuales, se le determinó también la cantidad de agua inicial. Para ello, se tomó una muestra de lodo de aproximadamente 100 mL y se depositó en un recipiente a peso constante. Al igual que se hizo en la muestra de suelo, se procedió a la evaporación del agua mediante la elevación de la temperatura en un horno a 105°C durante 12 horas, determinando por diferencia de peso la cantidad de agua que contiene. Así, al momento de agregar el lodo (inóculo microbiano) también se incorporó humedad al suelo lo cual debe tomarse en cuenta para el cálculo de la humedad relativa deseada para los tratamientos 1 y 3. De manera similar, al agregar la solución de azida de sodio al suelo del tratamiento 2, se agregó agua, la cual fue considerada para el cálculo del valor deseado. En este sentido la concentración final deseada fue de 0.1% gramos de azida de sodio por gramo de suelo seco.

3.4 Biodegradación bajo condiciones controladas

Como siguiente etapa experimental se llevó a cabo la biodegradación de HPA en forma inducida, utilizando el mismo tipo de suelo que en la etapa anterior pero manipulando parámetros como pH y adición de nutrientes específicamente la relación carbono nitrógeno, fósforo, con el propósito de favorecer las condiciones de degradación de los microorganismos. En esta etapa, la fase experimental estuvo constituida por cuatro vasos de precipitados de 500 mL de suelo inicialmente sin contaminar, adicionando la cantidad necesaria de antraceno, criseno y dibenzo(a,h)antraceno para lograr las concentraciones siguientes 500, 500 y 50 ppm respectivamente, de igual forma el porcentaje de humedad y el inóculo utilizado conforme al procedimiento descrito en la etapa anterior. En cuanto a la adición de los nutrientes, se ha encontrado en la literatura que uno de los parámetros que influye en el desarrollo de los microorganismos es la relación molar entre carbono, nitrógeno y fósforo marcando como un óptimo la proporción de 100:10:1 respectivamente. Por lo que antes de agregarlos se debe tomar en cuenta la cantidad de nutrientes existentes en el suelo a emplear. Con base en ésta se determina la cantidad de fósforo o nitrógeno necesarios para llegar a la relación óptima. Las condiciones particulares para cada experimento se enmarcan en la tabla 3.3. El pH fue otro parámetro que se manipuló con el fin de observar las variaciones que se pueden presentar para la biodegradación, aún cuando existen en el medio los nutrientes adecuados. De manera general el

planteamiento es el siguiente: en el tratamiento 5 a diferencia de los otros no se adiciona nitrógeno con el propósito de observar cual es el aporte del fósforo en comparación con el nitrógeno al compararlo con el tratamiento 6, los tratamientos 7 y 8 son para observar las variaciones que se producen por un cambio de pH. Las condiciones particulares de cada experimento se muestran en la tabla 3.3

Tabla 3.3 Condiciones experimentales en suelo para inducir la biodegradación.

	Tratamiento 5	Tratamiento 6	Tratamiento 7	Tratamiento 8
Suelo seco (g)	75	75	75	75
CH ₂ Cl ₂ ml	75	75	75	75
			mg	
Antraceno	37.5	37.5	37.5	37.5
Criseno	37.5	37.5	37.5	37.5
Dibenzo(a,h) antraceno	37.5	3.75	37.5	3.75
Suelo (g)	82.38	82.38	82.38	82.38
Adición H ₂ O	12.004	11.802	12.025	11.706
g H ₂ O/g suelo seco	21.999	21.999	21.999	21.999
Relación				
C:N:P	100:01:01	100:10:01	100:10:01	100:10:01
NO ₃ mg		778.281	778.281	778.28125
PO ₄ mg	109.875	109.875	109.875	109.875
pH	6.5	6.5	4.5	9.2
HCl 4.4 N (ml)			6	
NaOH (g)				0.6
Inóculo (g)	12.00	12.00	12.00	12.00

Las actividades necesarias para secuenciar los HPA remanentes y de los metabolitos que se forman durante la biodegradación inducida en cada uno de estos experimentos, se realizarán conforme a lo señalado en el diagrama de flujo de la figura 3.5. La metodología de trabajo empleada fue similar a la planteada en la etapa anterior, por lo que de igual forma se tuvo primero que encontrar las condiciones óptimas del método antes de proceder al análisis de las muestras.

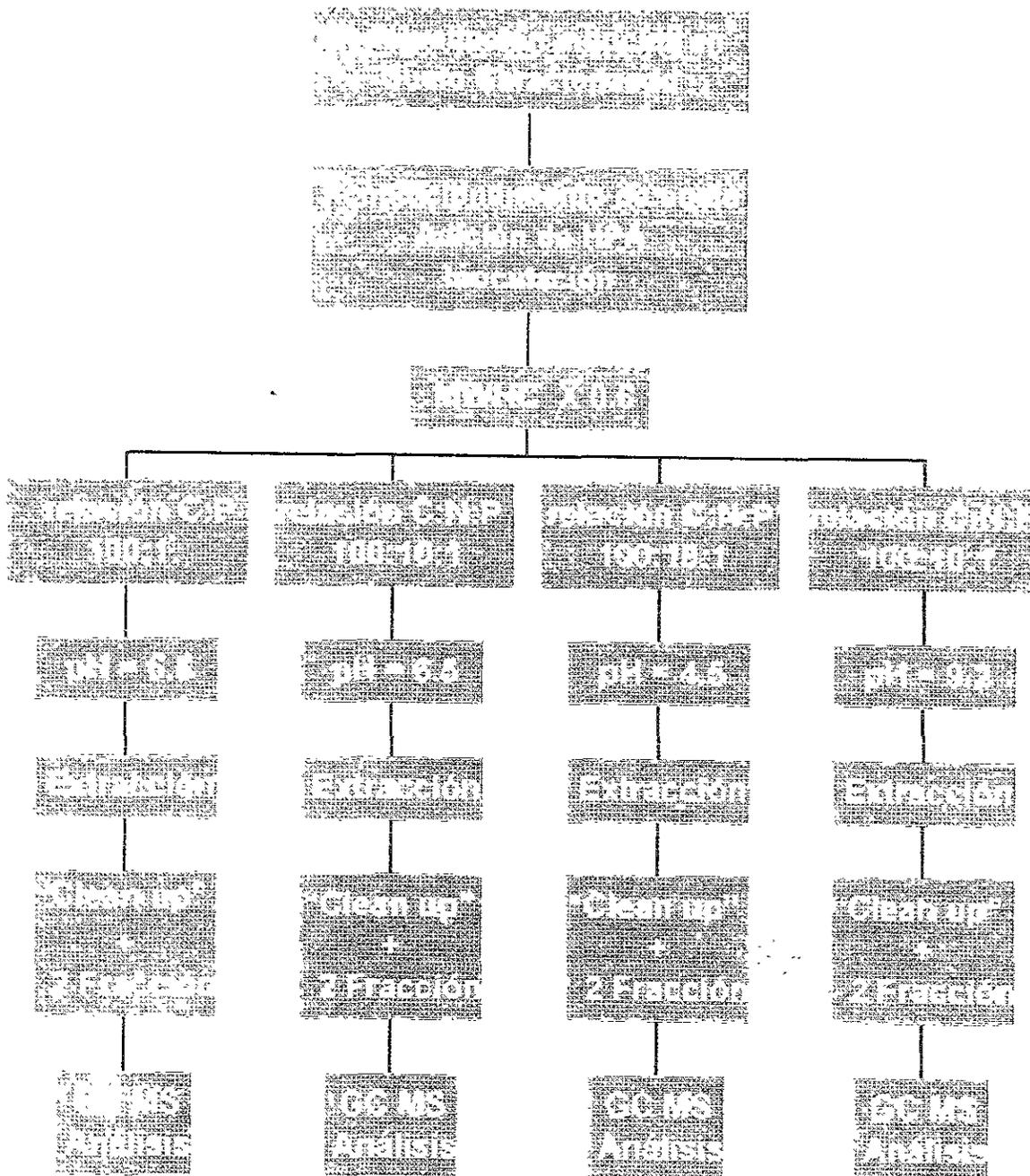


Figura 3.5 Diagrama de flujo de las actividades en la secuenciación de la biodegradación bajo condiciones controladas

3.5 Toma de muestra

Los tres experimentos descritos para en la primera etapa, que se llevaron a cabo en vasos precipitados de 2 L cubiertos con papel estaño. Se obtuvieron muestras periódicas de cada experimento. Después de cada toma, se les determinó el peso total final del vaso, el cual debe ser constante entre las tomas de muestra. Para determinar en los tratamientos 1, 2 y 3 la concentración remanente de los HPA, se

tomaron aproximadamente muestras de 10 g de suelo de cada uno de los recipientes que contenían el suelo experimental, los días 0, 4, 8, 16, 32, 64, 90 y 132. En cada ocasión se registró la cantidad de muestra que se retiró así como el nuevo peso del vaso contenedor, esto con el fin de mantener siempre constante la humedad del suelo agregando sólo la cantidad de agua requerida para compensar la pérdida por evaporación, los valores obtenidos se muestran en la tabla 3.4

Tabla 3.4 Valores obtenidos de los diferentes pesos de los contenedores de suelo en el ensayo de factibilidad de biodegradación

Día	Peso suelo 1	Muestra 1	Peso suelo 2	Muestra 2	Peso suelo 3	Muestra 3
0	741,800	10,979	765,700	10,863	770,100	10,029
4	730,919	10,881	755,029	10,671	759,240	10,860
8	720,262	10,657	744,642	10,387	748,640	10,600
16	710,091	10,171	734,359	10,283	738,459	10,181
32	699,631	10,460	723,761	10,598	728,212	10,247
64	688,914	10,717	712,841	10,920	717,130	11,082
90	677,777	11,137	700,958	11,883	705,987	11,143
132	667,545	10,232	690,825	10,133	695,078	10,909

El mismo procedimiento se realizó para la toma de muestra en el ensayo de biodegradación inducida, pero en este caso las muestras fueron de aproximadamente 5 g. y los días de muestreo fueron 0, 5, 8, 16 y 33 tal como se muestra en la tabla 3.5

Tabla 3.5 Valores obtenidos de los diferentes pesos de los contenedores de suelo en el ensayo de inducción de biodegradación

Día	Peso Suelo 5	Muestra 5	Peso Suelo 6	Muestra 6	Peso Suelo 7	Muestra 7	Peso Suelo 8	Muestra 8
0	188.8917	5.489	190.5994	5.374	186.5004	5.356	187.8789	5.777
5	183.7817	5.110	185.1594	5.440	181.4014	5.099	182.8339	5.045
8	178.7517	5.030	180.0034	5.156	176.2414	5.160	177.4259	5.408
16	173.6317	5.120	174.7174	5.286	170.9794	5.262	172.2789	5.147
33	168.2287	5.403	169.4554	5.262	165.1854	5.794	167.2789	5.000

3.6 Estudio cinético de la degradación de antraceno y criseno

Con los datos que se obtienen de ambas etapas experimentales es posible realizar el estudio cinético de la biodegradación, mediante la utilización de un método gráfico denominado método del espejo, el cual consiste en obtener la pendiente en diferentes puntos de la curva de biodegradación.

3.7 Manejo y disposición de residuos

En este trabajo se procuró generar la menor cantidad de residuos, ya que al trabajar con compuestos con alta toxicidad como los HPA no es fácil su disposición y manejo dentro del laboratorio.

Como se mencionó anteriormente este trabajo se desarrolló en su fase experimental en el IFA, ubicado en Austria, donde se contó con la infraestructura necesaria para disponer en forma adecuada de los residuos generados. Es importante señalar que la manipulación de los reactivos, disolventes y suelo contaminado se hizo dentro de una campana de seguridad, sólo la extracción se llevó a cabo fuera de la campana. Sin embargo el equipo de extracción contaba con una campana para extraer los vapores que se generaban durante el proceso. Durante toda la fase experimental se trabajó con equipo de protección personal adecuado (bata, lentes de seguridad, guantes desechables). Resaltando que se usaba un nuevo par de guantes cada ocasión que se tenía acceso a la campana; de seguridad, con el propósito de evitar la contaminación fuera de la campana, una vez que terminaba de trabajar en la campana de seguridad, los guantes que habían sido utilizados se disponían dentro de la campana en el contenedor correspondiente. El equipo y material fueron en su mayoría desechables, debido a que es más costoso económica y ambientalmente el uso de disolventes para lavar el material contaminado. Por esta razón dentro de la campana de seguridad se dispuso de tres contenedores para residuos sólidos: uno para cristalería (pipetas pasteur, viales y microviales), otro para guantes y papel, otro para el suelo, sílica gel, óxido de aluminio, etc. Todos los recipientes contaban con tapa. En cuanto a los disolventes utilizados, dentro de la campana de extracción se colocó un frasco con capacidad de 4 litros aproximadamente, en él se disponían los disolventes orgánicos con HPA, los que posteriormente se disponían en un contenedor de mayor capacidad para finalmente mandarlos a incineración. De igual forma, periódicamente los residuos sólidos de los contenedores de la campana de seguridad, se depositaron en un contenedor especial que se encontraba fuera de las instalaciones, para posteriormente enviarlo a incineración.

Como se mencionó este procedimiento fue utilizado porque se contaba con la infraestructura necesaria. Sin embargo, en países como el nuestro, si bien no es posible de implementar los mismos procedimientos, se debe procurar generar la menor cantidad de residuos que tienen como única alternativa de disposición la incineración, o en el caso del suelo, la biodegradación a largo tiempo.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.0 Resultados

Al secuenciar un proceso de biodegradación de HPA en suelo, la validez y confiabilidad de los resultados dependen principalmente de contar con un método analítico reproducible. Aun más cuando en éste se hacen innovaciones en alguna de las etapas que lo conforman. El suelo es una matriz tan compleja, que aún cuando se controlan en el ámbito macroscópico las variables asociadas a dicho sistema como humedad temperatura, pH, etc., siempre existe la posibilidad que a nivel microscópico el sistema presente características diferentes. Lo cual influye en procesos como adsorción o desorción de compuestos específicamente en el proceso de extracción. Por lo anterior se requirió de un severo control de cada una de las variables del proceso para cuantificar los compuestos de interés, ya que la mínima variación en éste podría adicionarse a los antes mencionados.

Por esto se deben analizar cada uno de los pasos en la secuencia de análisis señalados, desde la toma de muestra hasta el análisis cromatográfico. La optimización de algunos parámetros de estos pasos ya ha sido estudiados y se encuentran descritos en el ANEXO 1. Por lo que sólo faltaba evaluar la eficiencia en el proceso de extracción, el cual a diferencia de los pasos subsecuentes se evaluó con el tratamiento 2, ya que en éste se suprimió la acción microbiana y resulta ideal para evaluar los efectos de remoción por factores abióticos entre los que se incluye la extracción.

Para el ensayo de factibilidad de degradación de HPA, sin adición de nutrientes ni cambio de pH, expuesto en el capítulo tres con los tres experimentos paralelos. Tratamiento 1 (Suelo + Inóculo microbiano) sirve como blanco o referencia; el tratamiento 2 (Suelo + HPA + Azida de sodio) es para observar los posibles remociones de HPA por procesos abióticos y el tratamiento 3 (suelo +HPA + Inóculo microbiano) para observar el fenómeno de biodegradación de los HPA. Para llevar a cabo el análisis de los compuestos de interés, el primer paso fue la extracción de los HPA como se señala en el capítulo anterior. Tomando muestras en los intervalos establecidos de aproximadamente 10 g y obteniendo extractos por duplicado para cada uno de los ensayos. Una vez obtenidas las curvas patrón que permiten cuantificar los HPA mediante análisis cromatográfico (anexo 2), se procedió a analizar los extractos de las muestras de suelo.

El análisis cromatográfico del suelo con inóculo (tratamiento 1) sirvió como blanco de referencia, ya que en el extracto del suelo además de los HPA hay compuestos orgánicos, ácidos húmicos y fulbicos que podrían causar interferencia en la interpretación de los resultados. Sin embargo, como se observa en la figura 4.1, los 3 HPA adicionados al suelo se logran diferenciar de los picos que producen los otros compuestos presentes en el suelo.

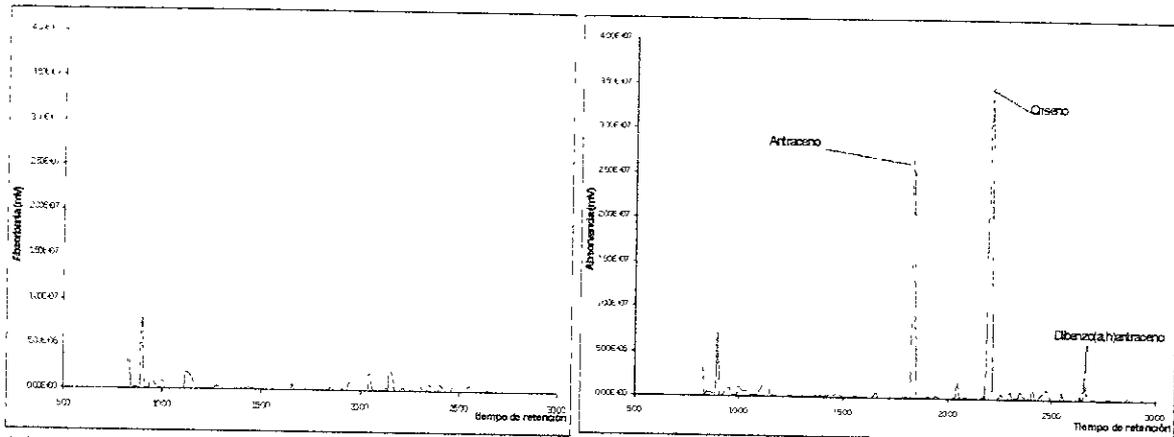


Figura 4.1 a la izquierda se muestra el cromatograma del suelo con inóculo (tratamiento 1) y a la derecha el cromatograma del suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2).

Como se describe en el anexo 2 para la cuantificación de los HPA adicionados al suelo, se elaboraron las curvas de calibración con una solución estándar de HPA. Lo anterior permitió el cálculo de las respectivas concentraciones en los extractos de los diferentes tratamientos del suelo.

A la obtención del extracto, denominado “crudo”, prosiguió el proceso de “Clean up” para obtener las dos fracciones y la cuantificación correspondiente. Para evaluar el proceso de fraccionamiento, antes de fraccionar los extractos del tratamiento 3 se tomó una alícuota de 70 µL, para su análisis cromatográfico. Asimismo se analizaron los correspondientes extractos después de ser fraccionados, con el propósito de evaluar el proceso de fragmentación, el cual se llevó a cabo con un 85 por ciento de eficiencia promedio como se muestra en la tabla 4.1. Si bien no es la mejor eficiencia que se podría obtener, es aceptable.

Tabla 4.1 Porcentaje de recuperación del fraccionamiento de los extractos (a) y (b) del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

Muestra/ Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno	Muestra/ día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
(a) /0	81.45	78.92	78.09	(b) /0	79.35	76.81	80.95
(a) /4	72.14	69.43	62.81	(b) /4	71.84	72.01	72.12
(a) /8	88.90	85.08	80.36	(b) /8	82.46	78.86	71.43
(a) /16	89.47	88.36	83.33	(b) /16	98.04	95.92	101.45
(a) /32	76.84	76.01	63.62	(b) /32	72.24	74.05	77.26
(a) /64	81.07	66.58	55.25	(b) /64	86.99	83.98	70.33
(a) /80	86.76	87.63	86.19	(b) /80	98.56	84.51	89.70
(a)/132	95.48	98.57	99.59	(b)/132	95.83	89.48	90.91
promedio	84.01	81.32	76.15	promedio	85.66	81.95	81.77

Por otro lado, todo este proceso arrojó una gran cantidad de datos registrados en el anexo 2 que necesariamente fueron procesados y analizados antes de dar un reporte final, lo cual se encuentra desarrollado en el anexo 3. Presentando a continuación el resultado de este proceso de análisis en cada uno de los tratamientos.

4.1 Evaluación de la remoción de HPA en el suelo por fenómenos abióticos (tratamiento 2).

La primera situación que se observa es el comportamiento ondulatorio en las muestras del suelo con azida de sodio (tratamiento 2), donde los datos que corresponden al día cero tienen valores inferiores a 500 ppm para criseno y antraceno e inferiores a 50 ppm para dibenzo(a,h)antraceno, aumentando para el día cuatro y disminuyendo posteriormente, tal como se observa en la figura 4.2. Este comportamiento se observa también en los tratamientos 3, 5, 6, 7 y 8. También se debe recordar que el suelo utilizado contenía una gran cantidad de arcilla que hizo menos biodisponibles a los HPA.

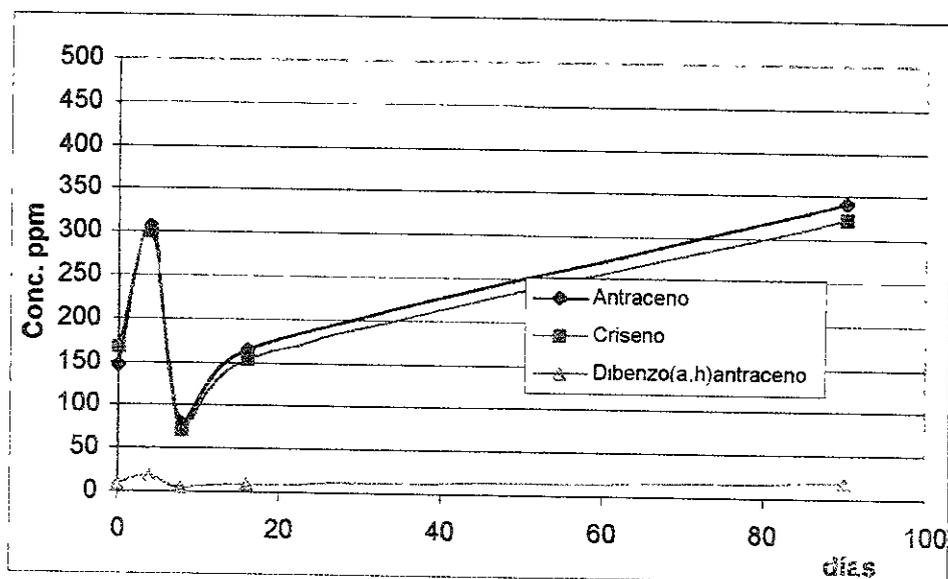


Figura 4.2 Promedio de los análisis cromatográfico de los extractos del suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2).

Como se explicó anteriormente en este suelo no se registra actividad microbiológica por la adición azida de sodio, por lo que las variaciones que se presentan se deben a procesos abióticos. Se sabe también que los HPA no se evaporan fácilmente (tabla 3.1 a) y que por el contrario se adsorben fuertemente, es por lo anterior que se puede garantizar que la concentración en el suelo de cada uno de los HPA permanece sin cambios. De forma que los cambios que se presentan en los resultados del análisis de los extractos se deben a factores fisicoquímicos que se conjugan. Para poder entender lo que sucede se parte de los resultados del extracto de la muestra del día cero del tratamiento 2 de la cual se conoce indudablemente la concentración de los HPA en el suelo. El hecho de

que el análisis cromatográfico presente resultados diferentes se debe a que durante el proceso de extracción siempre queda un remanente en el suelo lo cual se conoce como eficiencia de extracción, figuras 4.3 y 4.4.

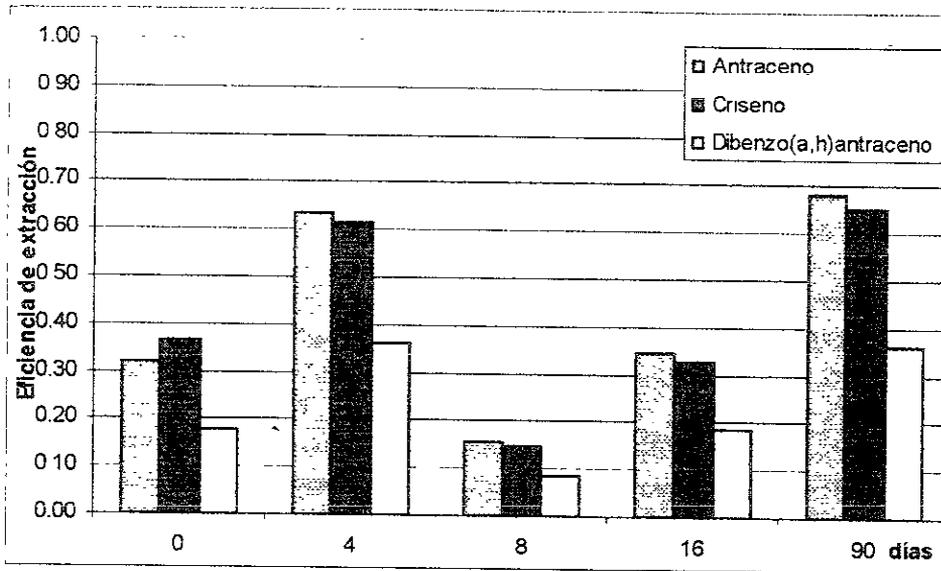


Figura 4.3 Eficiencia de extracción en el suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2) a

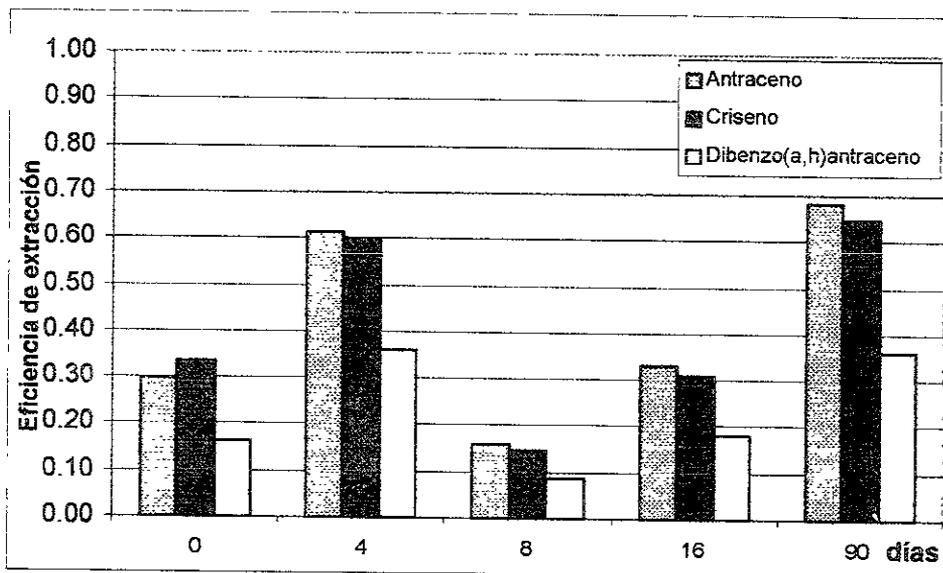


Figura A 4.4 Eficiencia de extracción en el suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2) b

Debido a la adsorción que se establece entre los HPA y el suelo, generalmente ésta permanece constante. Sin embargo, en este caso se observa que para las muestras posteriores al día cero, la eficiencia de extracción fue variable. Esto se debió principalmente a que aun cuando a nivel macroscópico se mantuvieron la condiciones de humedad en el suelo, a nivel microscópico fue necesario un cierto tiempo para llegar al equilibrio, es por esta razón que la eficiencia varió en forma impredecible.

Se observa también que durante la extracción soxhlet existe una selectividad del disolvente utilizado (diclorometano) hacia cada uno de los HPA. Detectando una relación de proporción entre el dibenzo(a,h)antraceno y los otros dos HPA, la cual permaneció a lo largo del experimento, como se muestra en la figura 4.5.

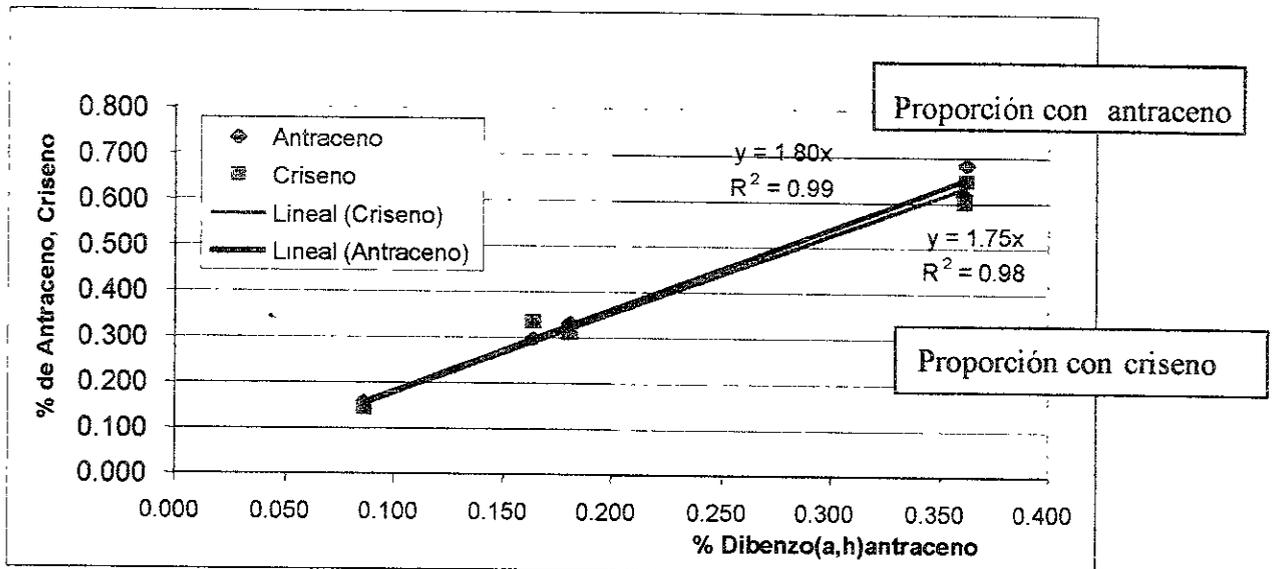


Figura 4.5 Proporción de estándar interno con antraceno y criseno en el suero con HPA y azida de sodio (tratamiento 2).

Por otro lado al ser el dibenzo(a,h)antraceno un compuesto extremadamente recalcitrante, sirvió como estándar interno para cuantificar los otros dos HPA. De forma que a partir de las concentraciones de antraceno y criseno reportadas se puede calcular la concentración en el suelo, al ser corregidas por un factor debido a la eficiencia en la extracción determinado por el porcentaje de dibenzo(a,h)antraceno reportado y por la proporción de este con los el antraceno y criseno debida a la selectividad del disolvente en la extracción tal como se explica en el anexo 3.

Teniendo en cuenta esta forma de hacer el cálculo para obtener la concentración de los HPA en el suelo, se presentan a continuación los resultados para evaluar la eliminación de HPA por procesos abióticos, tratamiento 2 en la figura 4.6. Se observa que la eliminación de los HPA después de 90 días es prácticamente nula, para el antraceno, no así para el criseno el cual muestra una retención del 19% la que permanece constante hasta los 90 días, esto implica que los factores que podrían provocar una remoción abiótica están controlados. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la una disminución que existe en los primeros días, es producto de los cambios fisicoquímicos de interacción entre el suelo y los HPA antes de llegar a un equilibrio. Por lo que durante los primeros días, la adsorción del suelo por los HPA fue muy fuerte que aún con la extracción no se permitió desorber en su totalidad a los HPA. Esto debido a que en la forma como se realizaron los experimentos se requiere de un cierto tiempo para la completa difusión del agua en los poros del suelo afectando de esta forma al equilibrio de interacción adsorción-

para los ensayos posteriores, y aún cuando la máxima remoción registrada para el caso de criseno no supera al 19% sí explica las fluctuaciones que se presentan en los primeros días por efectos abióticos.

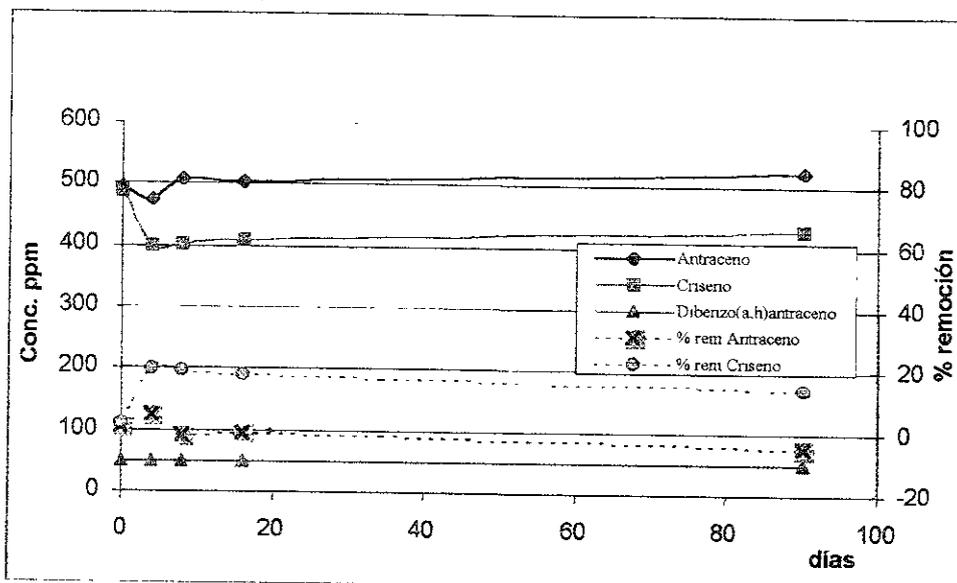


Figura 4.6 Remoción abiótica de HPA en el suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2)

Una vez evaluada la retención por factores abióticos se procede a corregir los resultados los suelos 3, 5, 6, 7 y 8, que se obtuvieron con ayuda del estándar interno en el anexo 3.

4.2 Estudio de factibilidad de biodegradación de antraceno y criseno (tratamiento 3)

En las figuras 4.7 a, b y c se presentan los resultados tal y como surgen del análisis cromatográfico de los extractos del suelo con HPA e inóculo. En donde se observó un comportamiento similar al que se presentó en el suelo con azida de sodio (tratamiento 2), en cuanto a la oscilación de la concentración de los HPA. Igual que en el tratamiento 2 al analizar la eficiencia de extracción se observa que hay una correlación entre los tres HPA. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurrido en el suelo con azida de sodio, en suelo con HPA e inóculo se observa que la correlación en la eficiencia de extracción para el antraceno y criseno con respecto al dibenzo(a,h)antraceno (estándar interno) se presenta sólo en los primeros 32 días figura 4.8. Se asume que la variación del comportamiento en la eficiencia de extracción después del día 32 se debió a la biodegradación, al comparar los resultados obtenidos con los del tratamiento 2. Sin embargo, en forma adicional, y para garantizar que la degradación de HPA es producto de la acción de los microorganismos se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC) por cuenta en placa (siguiendo el procedimiento detallado en el anexo 4).

Los resultados promedio se presentan en la tabla 4.2. El análisis microbiológico solo se consideró en forma cuantitativa y no cualitativa ya que éste fue objeto de un trabajo paralelo a esta investigación.

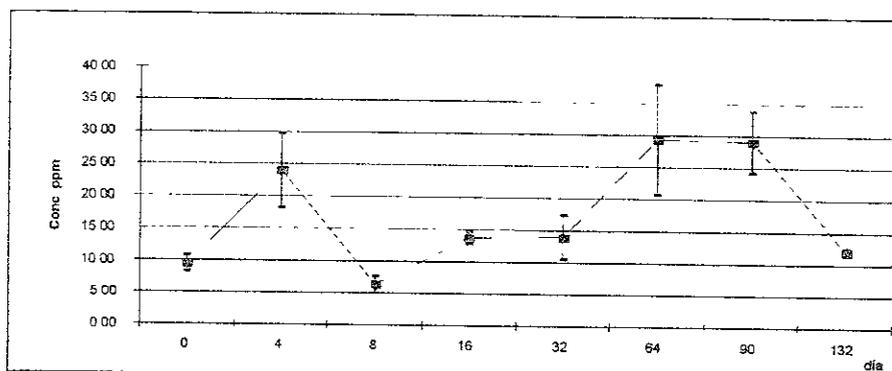


Figura 4.7a Análisis cromatográfico promedio de dibenzo(a,h)antraceno en el tratamiento 3

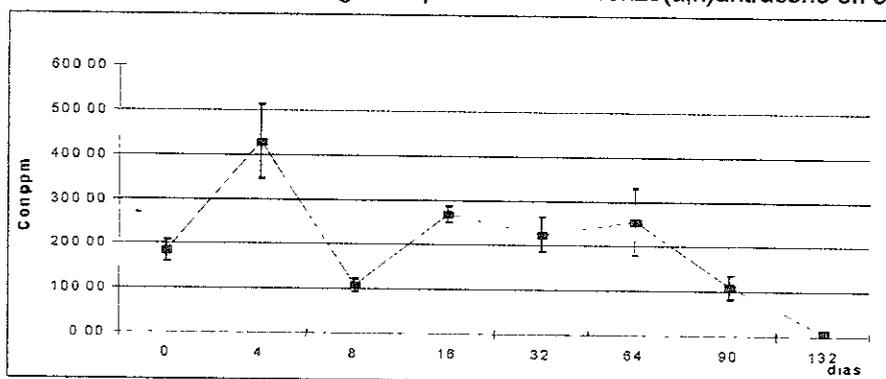


Figura 4.7 b Análisis cromatográfico promedio de antraceno en el tratamiento 3

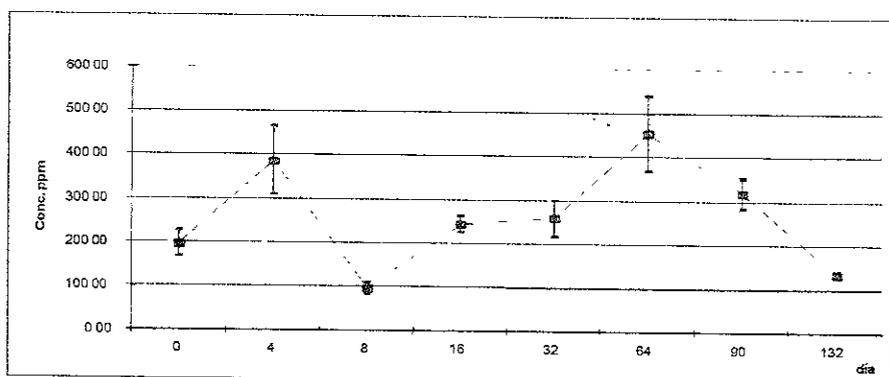


Figura 4.7c Análisis cromatográfico promedio de criseno en el tratamiento 3

Tabla 4.2 Promedio de la cuenta en placa de UFC

Día	(UFC) en el suelo con azida de sodio e HPA (tratamiento 2)	(UFC) en el suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3)
4	0	25±10
32	1	90±7
64	0	223±14
132	0	115±12

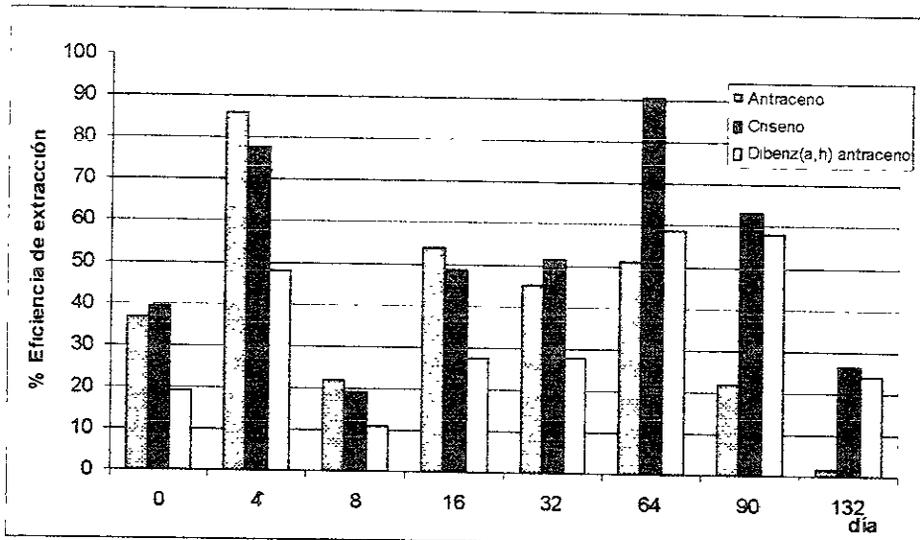


Figura 4.8 Eficiencia de extracción promedio en las muestras del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

Así, la determinación de la concentración de antraceno y criseno en el suelo para los 132 días, se realizó corrigiendo los valores obtenidos del análisis cromatográfico por un factor que fue determinado por la eficiencia de extracción del estándar interno y la proporción que mantiene con el antraceno o criseno en los primeros 32 días (anexo 3). De esta forma se procedió a calcular la concentración de antraceno y criseno en suelo, se obtienen los resultados de la tabla 4.3, donde se analiza la factibilidad de biodegradación de los compuestos HPA. La figura 4.9 muestra la remoción total de los HPA, por lo que para observar cuales son por biodegradación exclusivamente fue necesario restar de los efectos por remoción abiótica.

Tabla 4.3 Concentración promedio de antraceno y criseno en el tratamiento 3

Día	Antraceno	Criseno
0	499.77 ± 2.59	504.03 ± 3.80
4	463.53 ± 21.26	396.76 ± 17.23
8	516.90 ± 82.52	431.46 ± 62.00
16	502.39 ± 10.76	429.96 ± 8.18
32	421.70 ± 26.58	458.02 ± 35.63
64	227.32 ± 39.53	389.81 ± 62.76
80	95.74 ± 5.78	269.76 ± 36.87
132	15.69 ± 1.50	271.44 ± 32.37

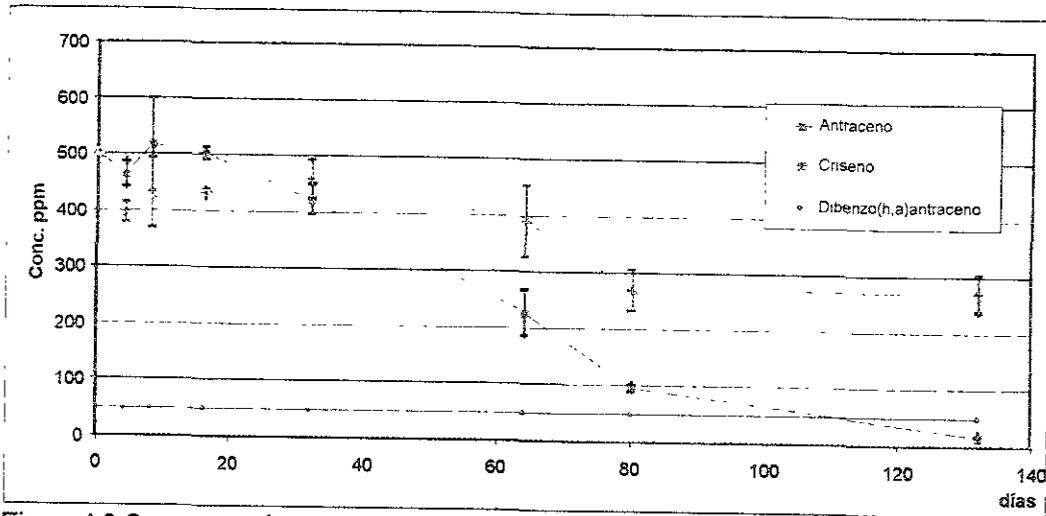


Figura 4.9 Concentración promedio de HPA en el tratamiento 3

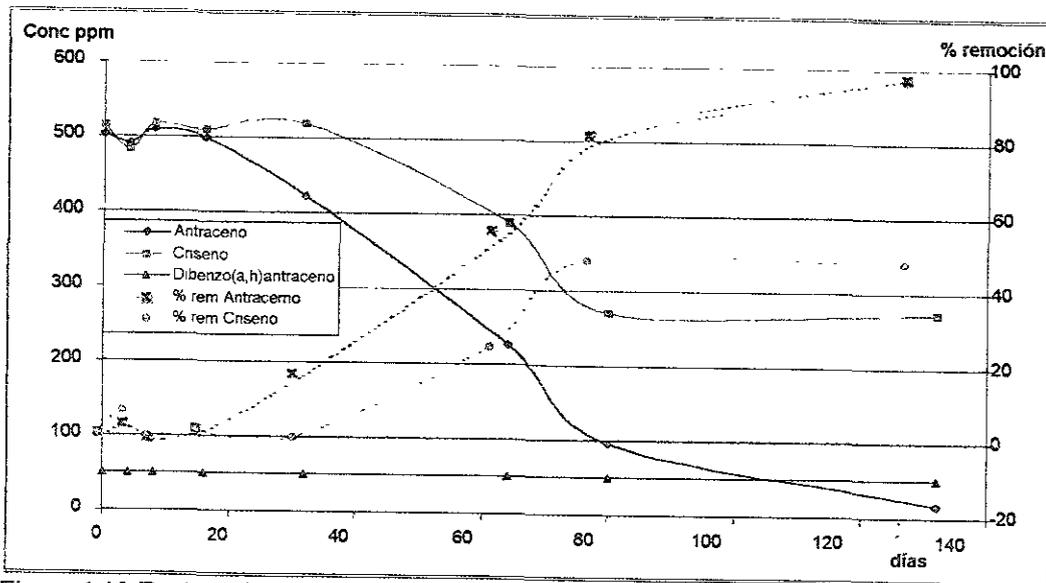


Figura 4.10 Evaluación de biodegradación de los HPA, en el suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

La remoción de HPA por microorganismos figura 4.10 se logra al restar a los datos obtenidos en la tabla 4.3 los efectos de la retención abiótica observados en la figura 4.6. Los resultados se presentan en la tabla 4.4, el cálculo de porcentaje de remoción se hace con respecto a la concentración inicial teórica de 500 ppm. Por esta razón algunos porcentajes de remoción son negativos. Encontrar concentraciones superiores a las teóricas, se debe a que aún cuando a nivel macroscópico el suelo se mantiene homogéneo, pueden existir zonas donde la concentración es un poco más alta.

Tabla 4.4. Cambios de concentración en partes por millón, de antraceno, criseno y dibenzo(a,h)antraceno, en el suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

Días	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h)antraceno	% remoción antraceno	% remoción criseno
0	503.86	514.08	50.00	0.00	0.00
4	490.56	483.04	50.00	2.64	6.04
8	509.71	516.55	50.00	-1.16	-0.48
16	497.84	508.80	50.00	1.20	1.03
32	421.70	519.02	50.00	16.31	-0.96
64	227.32	389.81	50.00	54.88	24.17
80	95.74	269.76	50.00	81.00	47.53
132	15.69	271.44	50.00	96.89	47.20

Con esto se demostró que la biodegradación de compuestos clasificados como recalcitrantes, pero también se observa que el tiempo para degradar estos compuestos es relativamente largo, como el criseno disminuyó después de 130 días de una concentración inicial de 514 ppm a 271 ppm, lo cual implica un 47% de remoción. Los microorganismos inicialmente atacan al antraceno llegando prácticamente a la remoción total, y de manera un poco más lenta la del criseno. En este experimento sólo se obtuvieron datos hasta el día 132 pero es posible que si se prosiguiera por más tiempo la eliminación de criseno sería mayor.

4.3 Efecto de la adición de nutrientes en la biodegradación de HPA

Tal como se señaló en el capítulo 3, una vez probada la factibilidad de biodegradación de un compuesto recalcitrante como criseno, se procedió a realizar un nuevo ensayo con el propósito de analizar algunos de los factores que pueden influir en la velocidad de degradación. En este sentido, se prepararon cuatro experimentos (tratamiento 5 a 8) similares al experimento realizado con el tratamiento 3, usando el mismo tipo de suelo y contaminado por igual con 500 ppm de antraceno, 500 ppm de criseno y 50 ppm de dibenzo(a,h)antraceno al cual se adicionaron nutrientes (nitrógeno o fósforo) y cambio de pH. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las condiciones indicadas en la tabla 4.5.

Tabla 4.5 Condiciones experimentales establecidas para la evaluación en suelo de la biodegradación de HPA

Tipo de suelo*/Condiciones experimentales	pH (unidades)	Relación de nutrientes
Tratamiento 5	6.5	Carbono:fósforo, 100:1
Tratamiento 6	6.5	Carbono:nitrógeno:fósforo, 100:10:1
Tratamiento 7	4.2	Carbono:nitrógeno:fósforo, 100:10:1
Tratamiento 8	9.2	Carbono:nitrógeno:fósforo, 100:10:1

4.4 Efecto de la adición de fosfatos relación C:P 100:1

En el tratamiento 5 se puede observar como afecta a la biodegradación de antraceno y criseno la adición de fosfatos en la relación C:P 100: 1 manteniendo el pH en 6.5, en la tabla 4.6 se muestran los resultados:

Tabla 4.6. Valores obtenidos, en partes por millón, de las muestras procedentes del suelo con relación carbono: fósforo 100 : 1 y pH= 6.5 (tratamiento 5).

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno	% remoción Antraceno	% remoción Criseno
0	499.32	505.95	50.00	0.14	-1.19
5	459.05	484.90	50.00	8.19	3.02
8	311.96	431.16	50.00	37.61	13.77
16	321.48	413.26	50.00	35.70	17.35
32	276.89	402.14	50.00	44.62	19.57

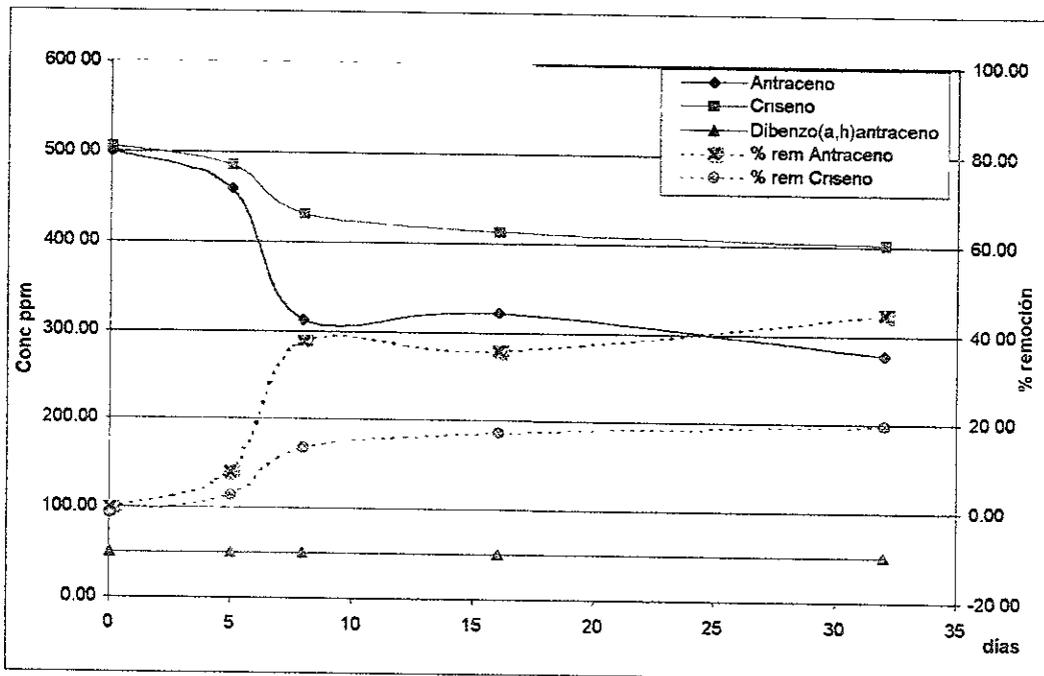


Fig 4.11 Biodegradación de HPA en el suelo con relación C:P 100:1 (tratamiento 5), corregido por factores abióticos

4.5 Adición de nitrógeno y fósforo relación C:N:P 100:10:1

En el tratamiento 6 se adicionó una solución de nitratos-amonio y fosfatos para mantener en el suelo la relación C:N:P 100:10:1, los resultados de la biodegradación se muestran en la tabla 4.7.

Tabla 4.7. Valores obtenidos, en partes por millón, de las muestras procedentes del suelo con relación carbono: nitrógeno : fósforo 100 : 10 : 1 (tratamiento 6)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno	% remoción Antraceno	% remoción Criseno
0	500.32	495.80	50.00	-0.06	0.84
5	497.78	508.54	50.00	0.44	-1.71
8	447.28	493.92	50.00	10.54	1.22
16	253.09	312.94	50.00	49.38	37.41
32	235.90	309.64	50.00	52.82	38.07

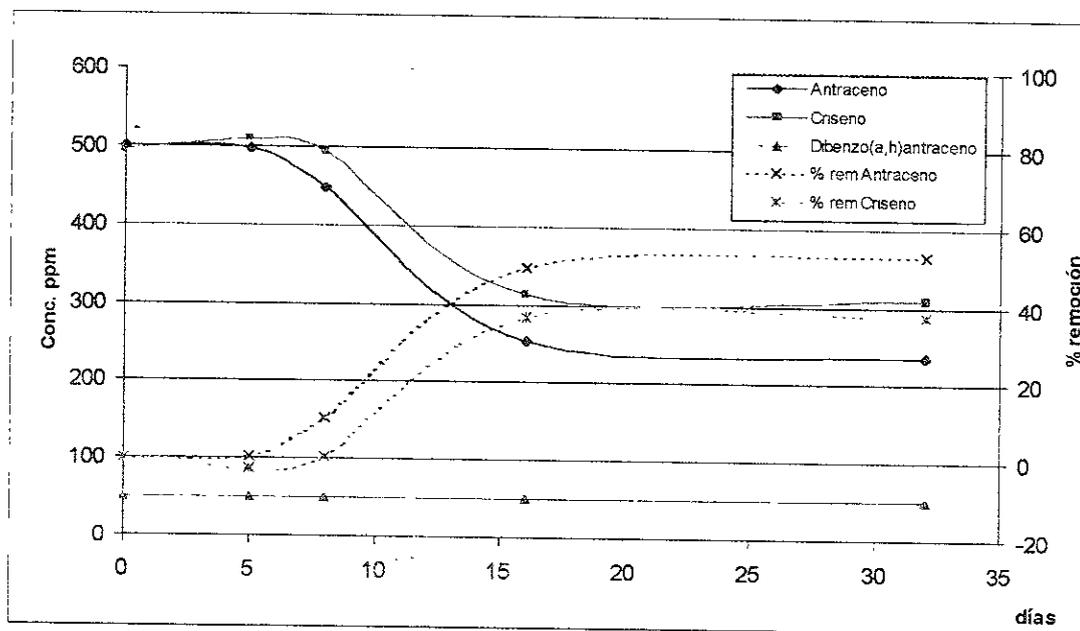


Fig 4.12 Biodegradación de HPA en el suelo con relación C:N:P 100:10:1 (tratamiento 6)

Los resultados obtenidos en los suelos donde se adicionaron nitrógeno y/o fósforo (tratamientos 5 y 6), indican que con la adición de estos nutrientes al suelo, dentro de los intervalos empleados, es posible reducir el tiempo de biodegradación del criseno. Sin embargo la mayor remoción de criseno se logró con la relación C:N:P 100:10:1. Es importante hacer notar que la diferencia de adición de nitrógeno y fósforo con adicionar solo fósforo, se refleja en una mayor la eliminación de criseno cuando se agregan ambos nutrientes. Sin embargo, la concentración de criseno remanente al agregar solo fósforo resulta menor que la que se logra, para el mismo tiempo, en el suelo donde no se agregaron nutrientes.

4.6 Efectos de cambio de pH en suelo manteniendo la relación C:N:P 100:10:1

En el tratamiento 7 el pH se ajustó a 4.2 unidades mediante la adición de ácido clorhídrico, mientras que para el tratamiento 8, se empleó hidróxido de sodio para obtener un pH inicial de 9.2 unidades. Cabe resaltar que para los experimentos señalados se ajusta la relación C:N:P 100:10:1, asimismo el suelo se acondicionó y manipuló de forma similar a lo realizado en el tratamiento 3 en cuanto a humedad, manejo de muestras y la extracción.

Tabla 4.8. Valores obtenidos, en partes por millón, de las muestras procedentes del suelo con relación C:N:P 100:10:1, pH=4.2 (tratamiento 7).

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno	% remoción Antraceno	% remoción Criseno
0	495.18	499.56	50.00	0.96	0.09
5	511.17	500.79	50.00	-2.23	-0.16
8	486.14	440.31	50.00	2.77	11.94
16	464.07	462.42	50.00	7.19	7.52

Tabla 4.9. Valores obtenidos, en partes por millón, de las muestras procedentes del suelo con relación C:N:P 100:10:1, pH=9.2 (tratamiento 8).

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno	% remoción Antraceno	% remoción Criseno
0	497.74	502.59	50.00	0.45	-0.52
5	490.10	499.11	50.00	1.98	0.18
8	508.36	497.52	50.00	-1.67	0.50

En los resultados de las tablas 4.8 y 4.9 se observa que para en el tratamiento 8, aún cuando sólo se cuenta con tres puntos analizados, es claro que se originó la inhibición de la degradación en comparación con los resultados obtenidos para los tratamientos 5 y 6 donde a los 8 días ya existía remoción. En el suelo que está en un medio ácido, se observa una menor inhibición (figura 4.9), la cual en su fase inicial de adaptación, si bien resulta más lenta que cuando se agrega nitrógeno y fósforo a pH=4.2 (tratamiento 6). Los valores de degradación a los 15 días indican una remoción del 8%. Por este motivo, es posible suponer que la degradación, en medio ácido, sea por medio de hongos tal como se reporta en los trabajos realizados por Hammel et. al, (1992) o un consorcio microbiano diferente a la que se presenta en el suelo con pH=6.5, lo cual se constató mediante los respectivos análisis microbiológicos, con la metodología señalada en el anexo 4.

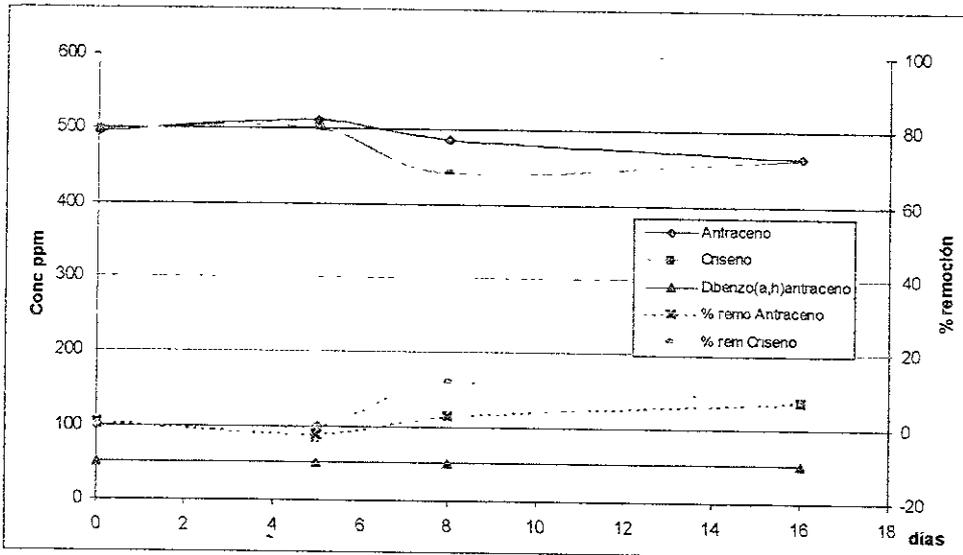


Fig 4.13 Biodegradación de HPA en el suelo con relación C:N:P 100:10:1 pH=4.2 (tratamiento 7)

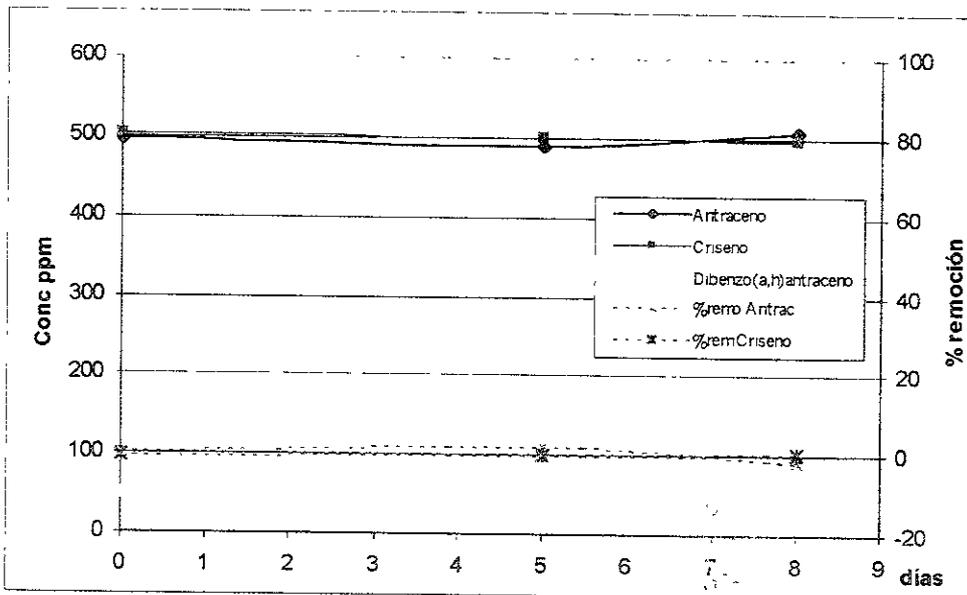


Fig 4,14 Biodegradación de HPA en el con relación C:N:P 100:10:1 pH=9.2 (tratamiento 8)

Adicionalmente, a la cuantificación de criseno y antraceno se realizó la cuenta en placa de unidades formadoras de colonias (UFC), siguiendo la metodología que se describe en el anexo 4. La prueba se realizó para los tratamientos 5, 6, 7, 8 tomando en cada caso una única muestra el día 32. Obteniendo los siguientes resultados: 40, 68, *0 y 0 UFC para los tratamientos 5, 6, 7 y 8 respectivamente.

*Crecimiento de hongos

4.7 Estudio cinético de la biodegradación de antraceno y criseno

Para analizar como influyen los nutrientes adicionados en la biodegradación del antraceno y criseno se hace el estudio cinético, utilizando los datos obtenidos para la remoción de los substratos (HPA) en los tratamientos 3, 5 y 6. Se calcula la rapidez de remoción de los substratos (HPA) $r = [\text{mg HPA/kg de suelo/día}]$ con base en el método tradicional de cálculo cinético, conocido como método del espejo. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 4.10 a 4.12 con los que se elaboran las figuras 4.15, 4.16 y 4.17

Tabla 4.10 Estudio cinético en el suelo sin adición de nutrientes (tratamiento 3). $r = [\text{mg HPA/kg de suelo/día}]$.

días	r Antraceno	r Criseno
0	3.33	7.76
2	3.33	7.76
6	-4.79	-8.38
12	1.48	0.97
24	4.76	-0.64
48	6.07	4.04
72	8.22	7.50
106	1.54	-0.03

Tabla 4.11 Estudio cinético en el suelo con relación C:P 100:1 (tratamiento 5). $r = [\text{mg HPA/kg de suelo/día}]$.

días	r Antraceno	r Criseno
0	8.05	4.21
2.5	8.05	4.21
6.5	49.03	17.91
12	1.49	2.24
24	2.79	0.70

Tabla 4.12 Estudio cinético en el suelo con relación C:P:N 100:10:1 (tratamiento 6). $r = [\text{mg HPA/kg de suelo/día}]$.

días	r Antraceno	r Criseno
0	0.51	0.01
2.5	0.51	0.01
6.5	16.83	4.87
12	24.27	22.62
24	1.07	0.21

4.7.1 Estudio cinético del tratamiento 3

Cuando no se agrega nitrógeno o fósforo al suelo y las concentraciones de nutrientes son mínimas (tratamiento 3), la biodegradación de antraceno es casi total, como se observa en la figura 4.11. Sin embargo, para el criseno sólo se logra llegar al 47 % de remoción. El estudio cinético revela que la degradación de antraceno empieza a los 16 días con una velocidad de cambio de $r=1.48$ [mg HPA/kg de suelo/día] que sigue ascendente hasta obtener un máximo $r=8.22$ en el día 72. Esto implica que antes que degradar al criseno, los microorganismos utilizan el antraceno como fuente de carbono y posteriormente al criseno.

Para el criseno se observa que la degradación comienza después del día 32 con una velocidad de cambio menor valor que la del antraceno llegando a un máximo de $r=7.5$ [mg HPA/kg de suelo/día] el día 72 al igual que el antraceno pero con un valor menor. Después de este máximo en la velocidad de cambio, la concentración de criseno se mantiene constante. Probablemente por la formación de algún metabolito de la degradación que puede ser más tóxico que el mismo criseno

(Rodríguez ,1998), o también porque la cantidad de nutrimentos ya no es suficiente para lograr la transformación.

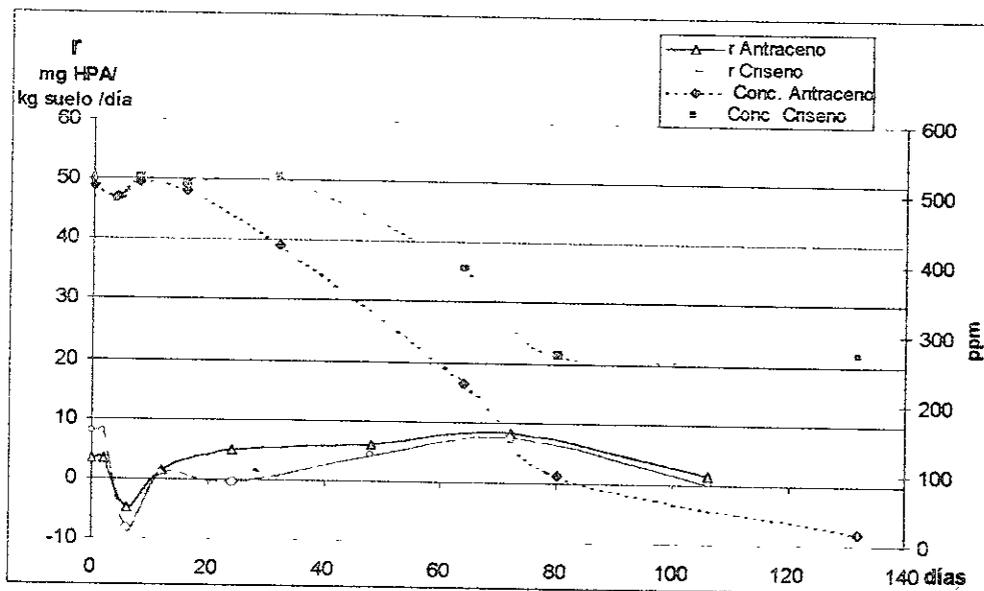


Fig 4.15 Cinética de biodegradación de antraceno y criseno en el tratamiento 3

4.7.2 Cinética de degradación de HPA en suelos con adición de nutrimentos (tratamientos 5 y 6)

Con la adición de nutrimentos el primer cambio que se observa es la disminución en el tiempo de degradación. Sin embargo, al analizar detalladamente como influyó cada uno de los nutrimentos agregados se pueden observar cambios importantes así para la figura 4.12 donde se muestra los efectos por adición de fosfato en relación C:P 100:1 (tratamiento 5).

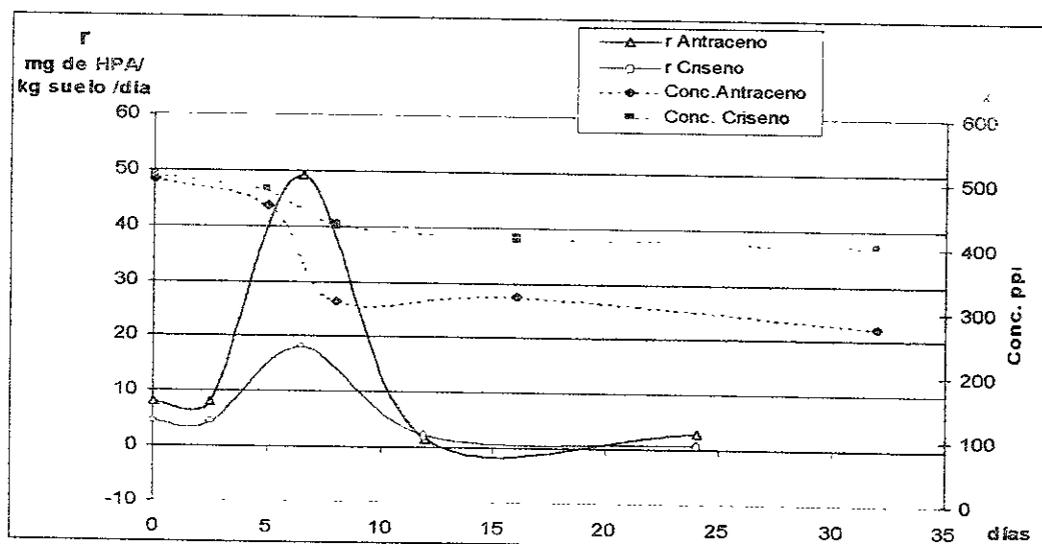


Fig 4.16 Estudio cinético de biodegradación de antraceno y criseno, con una relación de C:P 100:1 (tratamiento 5).

Se puede observar que la degradación de antraceno comienza el día 3 mostrando una velocidad de degradación máxima ($r = 49.3$) a los 7 días aproximadamente para disminuir prácticamente a cero el día 12. Para el criseno se da un comportamiento similar al antraceno pero en menor proporción en cuanto al valor máximo de velocidad de degradación ($r = 17.9$), pero se logran velocidades de cambio mayores a las obtenidas en el suelo donde no se agregaron nutrientes, para el mismo periodo.

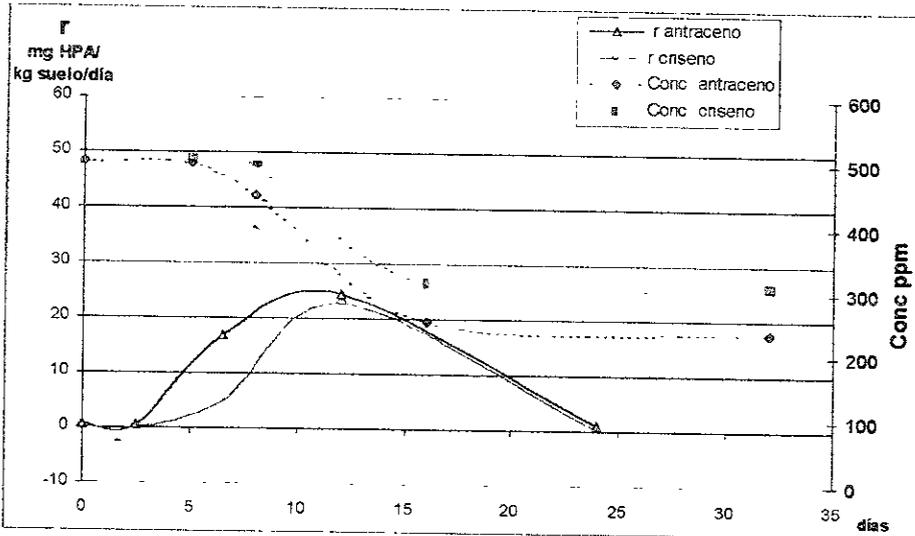


Figura 4.17 estudio cinético de la biodegradación de antraceno y criseno con la relación C:N:P 100: 10:1 (tratamiento 6).

En el estudio cinético del suelo con relación de C:N:P 100:10:1 (tratamiento 6), se puede observar que agregar nitrógeno y fósforo al medio no sólo produce un aumento súbito en la velocidad de cambio de remoción de los HPA como en el caso anterior, como se observa en la figura 4.17. En este caso se observa que el valor de la velocidad de degradación para antraceno y criseno es prácticamente la misma ($r = 24.27$ y 22.62) respectivamente, aunque cabe resaltar que la degradación de criseno comienza 3 días después que la del antraceno.

4.8 Discusión de resultados

De los resultados de la fase experimental se puede resaltar lo siguiente: se comprobó la factibilidad de degradación de antraceno y criseno. Se observa que la adición de nutrientes favorece la degradación de antraceno y criseno. El pH influye determinantemente en la biodegradación, a $\text{pH} = 9.0$ no hay degradación y a $\text{pH} = 4.2$ existe un cambio en la velocidad de degradación. Si bien, fue posible detectar la factibilidad de la degradación de antraceno y criseno en el suelo donde no se agregó nutrientes, se debe resaltar que el antraceno fue transformado casi en su totalidad, no así el criseno del cual solo se logró degradar un máximo de 47 %. Por lo que se puede observar en la figura 4.10, la degradación del criseno en un suelo sin adicionar nutrientes, comienza cuando ha sido removido un 50 %

del antraceno. Lo anterior se podría explicar al considerar que cuando la fuente de carbono más asequible disminuye en su concentración los microorganismos comienzan un proceso de cambio para asimilar otra fuente de carbono disponible. Aun cuando esto implique más difícil degradación, como es el caso del criseno. También se debe considerar que una vez que se termina la degradación del antraceno, la degradación de criseno aparentemente se detiene, lo que podría deberse a que la biodegradación del criseno ocurre por una especie de cometabolismo en el cual con los metabolitos que se generan durante la degradación de antraceno se facilita la degradación de criseno (Atlas, 1997). Para esclarecer esta situación es necesario la realización de futuras investigaciones en las cuales se haga un seguimiento detallado de los metabolitos generados durante la degradación. Tomando en cuenta el método analítico que se ha desarrollado.

Por otro lado, el estudio microbiológico por cuenta en placa de unidades formadoras de colonias (UFC), junto con la evaluación de la remoción por factores abióticos, permitió obtener los elementos necesarios para atribuir la eliminación de antraceno y criseno a factores biológicos. De aquí que futuras investigaciones se deben enfocar al seguimiento que permita identificar los microorganismos que se forman en cada etapa de la biodegradación. De acuerdo con la cinética de degradación observada en el suelo sin adición de nutrimentos (tratamiento 3); la máxima velocidad de degradación para el criseno fue cuando la velocidad de degradación de antraceno alcanzó su valor máximo. En cuanto a los efectos favorables que se observan cuando se adiciona al suelo nitrógeno y fósforo, se deben principalmente a que al estar en una mayor concentración y disponibilidad que en el tratamiento 3, los microorganismos encuentran mejores condiciones pueden llevar a cabo sus funciones metabólicas (Levin y Gealt, 1997).

En los experimentos de degradación de antraceno y criseno en suelo, con el tratamiento 5 agregando solamente fósforo y con el tratamiento 6 agregando fósforo y nitrógeno, se debe recordar qué función principal cumple cada uno de éstos nutrimentos en la célula. También se sabe que los organismos obtienen cantidades muy diferentes de ATP del catabolismo de la misma fuente de energía. Estas diferencias importantes de energía se reflejan en la producción de células, ya que el rendimiento de las células es directamente proporcional a la cantidad producida de ATP (Baker y Herson, 1994) (para lo cual es necesario que el fósforo este presente y disponible en el suelo). Esto implica que al aumentar la cantidad de fósforo en el suelo y dado que el proceso de biodegradación es aerobio, se favorece la formación de ATP por lo que se dispara el crecimiento de microorganismos a diferencia de lo ocurrido en el tratamiento 3 donde los microorganismos crecen muy lentamente. El crecimiento súbito de microorganismos que se observa en el tratamiento 5. Si bien, permite degradar en un tiempo más corto a los hidrocarburos, también conlleva a que la remoción se detenga de forma súbita después del día 8 (figura 4.16), quedando un remanente de antraceno a diferencia del suelo sin adición de nutrimentos (tratamiento 3), donde había sido degradado casi en su totalidad. En cuanto al criseno sucede una cosa similar aunque en este caso al compararlo con lo ocurrido con el tratamiento 3 se observa que el porcentaje de remoción se alcanza en menos de la mitad del

tiempo. La correlación del nitrógeno en el desarrollo celular, si bien no contribuye de igual manera que el fósforo en la generación de energía, es de suma importancia para la producción de aminoácidos y ácidos nucleicos (Brock y Madigan, 1993).

En cuanto a los diferentes efectos que se observan en el suelo con la relación C:N:P 100:10:1 (figura 4.12) con la relación C:P 100:1, la remoción de criseno es mayor en la primera. Sin embargo en ambos casos la degradación de antraceno se detiene. El estudio de cinética de degradación muestra que en este caso la degradación del criseno se logra con una velocidad casi igual a la que se alcanza para el antraceno. Lo cual implica que no sólo ocurre la degradación de la fuente de carbono sino que también hay crecimiento de microorganismos. Sin embargo, es probable que la inhibición de crecimiento, se deba a la presencia de algún metabolito que se forma durante la degradación. Lo anterior implica que cuando no se agregan nutrimentos al suelo los microorganismos requieren de más tiempo para adaptarse y empezar a metabolizar, por lo que inicialmente se degrada el compuesto con mayor biodisponibilidad (antraceno), y a medida que éste se consume se comienza a utilizar, toma como fuente de carbono el de menor biodisponibilidad (criseno), el cual es menos asequible debido a sus características fisicoquímicas y a la adsorción del suelo. No obstante, aún cuando se supone que los microorganismos siguen rutas metabólicas similares al degradar un compuesto con más anillos, se llegan a formar metabolitos que inhiben la degradación (Rodríguez, 1998).

CONCLUSIONES

Una vez terminada la fase experimental y que se han discutido los resultados se puede concluir que: la hipótesis planteada, en el capítulo 2 se cumplió. Ya que queda demostrado que es factible la degradación en suelo del criseno, que se consideraba recalcitrante.

Se debe resaltar que para lograr consolidar la hipótesis planteada fue necesario, en primera instancia, la cuantificación de los HPA en una matriz compleja, como el suelo. Lo que fue posible una vez determinadas las condiciones que permitan hacer reproducible el análisis, utilizando estándares internos en cada etapa del análisis, con lo que se logra además optimizar los recursos existentes.

Del experimento planteado para observar la biodegradación por factores abióticos de los HPA, agregando como inhibidor de la acción microbiana azida de sodio (suelo con tratamiento 2), se observa que un factor determinante para la biodisponibilidad de los HPA, es la adsorción del suelo por los hidrocarburos. Lo cual quedo demostrado por las diferencias de eficiencia de extracción durante la fase experimental. Considerando que si no es posible desorber mediante la extracción soxhlet los HPA del suelo, difícilmente estos estarán biodisponibles para los microorganismos.

Respecto a la factibilidad de biodegradación de antraceno y criseno: en el suelo donde la única fuente disponible de carbono fueron los HPA y sin adición de nutrimentos (tratamiento 3) se observo la degradación de antraceno en un 98% y criseno en un 42%, en 132 días.

La adición de nutrimentos (nitrógeno y fósforo) al suelo favorece la biodegradación, observando una reducción en el tiempo de degradación en comparación con el suelo donde no se adicionan nutrimentos. Sin embargo solo se logra degradar el 50 % de antraceno y el 40 % de criseno. Lo que posiblemente se debe a que durante la degradación del criseno se formen metabolitos que inhiban a los microorganismos. Asimismo, el pH influyo determinadamente en la biodegradación, a pH=9 no hay degradación y a pH=4.2 existe un cambio en la velocidad de degradación, debido probablemente a un cambio de flora microbiana del suelo, ya que a este pH se propicia el desarrollo de hongos.

Bibliografía

Andersson B. E. y Henrysson T. 1996. Accumulation and degradation of dead end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 647-652.

Atlas B. 1997. *Microbial ecology fundamentals and applications*. California.

Atlas M. R. y Cerniglia C. 1995. Biodegradation of petroleum pollutants. *BioScience*. 45 (5): 333-335

Atlas, R.M. 1981. Microbial degradation of Petroleum Hydrocarbons: an environmental Perspective. *Microbial Reviews*. 45: 180-209.

Baker K. H. y Herson D. S. 1994. *Bioremediation*. Mc Graw Hill. E.U.A.

Bossert I. y Bartha R. 1984. *The fate of petroleum in soil ecosystem*. Atlas R.M (ed) Petroleum microbiology. Macv Millan Publishing Co. New York 434 – 476.

Bouchez M. y Blanchet D. 1997. Kinetic studies of biodegradation of insoluble compounds by continuous determination of oxygen consumption. *Appl. Microbiol.* 82: 310-316.

Bouchez M. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strain and by defined strain associations. *Appl Microbiol Biotechnol.* 43: 156-1645.

Brock T. D. y Madigan M. T. 1993. *Microbiología*. Prentice Hall Hispanoamericana. México.

Bumpus. 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 154-158.

Calabrese E. J. 1993. *Hydrocarbon Contaminated Soils and Ground Water*

Collwell R. R., Walker J. D. 1997. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Crit Rev. Microbiol.* 5: 423 –445.

Connell D. W. 1984. *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*. Wiley & Sons. EUA

Cookson, J. T. 1995. *Bioremediation engineering*. Design and application . Ed. Mc Graw Hill, EUA. 524.

Crawford R. L. y Crawford D. L. 1997. *Bioremediation* . Principles and applications

Bibliografía

Chang H. T. y Bae J. E. 1999, *Modeling simultaneous biosorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Department of Chemical and Environmental Engineering, Illinois Institute of Technology

Chiou C. 1998. Partition characteristics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on soil and Sediments. *Environ. Sci. Technol.* 32: 264-269.

Denissenko M. F., Pao A., Tang M. S. y Pfeifer G. P. 1996. Preferential formation of benzo[a] pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274 (5286): 430-432.

Dhawale S. W., Dhawale S. S. y Dean-Ross D. 1992. Degradation of fenanthrene by Phanerochaete chrysosporium occurs under ligninolytic as well as nonligninolytic conditions. *Appl. Environ. Microbio.* 53: 3000- 3006.

Dreyer G., König J. y Ringpfeil M. 1995. Polycyclic aromatic hidrocarbon biodegradation by a mixed bacterial culture. <http://www.biopract.de/presse03.htm>

EPA Method sw 846 Uddate III cd rom

Fan S. y Scow K. 1993. Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1911-1918.

Frederick R. J. y Egan M. 1994. Enviromentally compatible applications of biotechnology. *BioScience.* 44 (8): 529-534.

Gibbs. C. F. Pugh K. B. y Andrews A. R. 1975. Quantitatives studies on marine degradation of oil. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 188: 83-94.

Griffin D. M. 1980. *Water potential as a selective factor in the microbial ecologic of soils*. Water potential relation in soil microbiology. Soil science society of america 141-151.

Guengerich F. P. 1995, *Cytochrome P-450 proteins and potential utilization in biodegradation*. Environmental Health Perspectives 103 (5), Department of Biochemistry and Center in Molecular Toxicology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee.

Guengerich P. F. 1993. Cytochrome P-450 enzymes. *American Scientist.* 81: 440-447.

Hammel K. E., Gai W. Z., Greem B y Moen M. A. 1992. Oxidative degradation of phenantrene by the ligninolytic fungus phanerochaete chrysosporium. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1832-1838.

Bibliografía

- Käster M. y Mahro B. 1995. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil affected by the organic matrix of compost. *Appl Microbiol Biotechnol.* 44: 668-675.
- Kelley I. y Cerniglia C. 1995. Degradation of mixture of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by mycobacterium Strain PYR-1, *J. Soil Contamination.* 4: 77-91.
- La Greca M. D. y Buckingham P. 1998. *Gestión de residuos tóxicos.* Jeffrey C. Evans. Mexico.
- Langbehn A. y Steinhart H. 1995. Biodegradation studies of hydrocarbons in soil by analyzing metabolites formed. *Chemosphere.* 30(5): 855- 868.
- Lange B., Kremer S., Sterner O. y Anke H. 1994. Pyrene metabolism in *Crinipellis stipitaria*. *Appl. Environ Microbiol.* 60: 3602-3607.
- Leahy J. G. y Colwel R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews.* 54 (3): 305-315.
- Leeson A., Hapeman C. J. y Shelton D. R. 1993. Biomineralization of atrazine ozonation products. *J. Agric. Food Chem.* 41: 983-987.
- Lesage S. y Jackson R. 1993. *Ground waste Contamination and at Analysis Hazardous.*
- Levin M. y Gealt M. 1997. *Biotratamiento de residuos Tóxicos y peligrosos.* McGraw Hill. Madrid.
- Madsen T. y Kristensen P. 1997. Effects of bacterial inoculation and nonionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 631-637.
- Metcalf y Eddy 1998. *Ingeniería de aguas residuales.* McGraw-Hill/ Interamericana México.
- Micromedex inc 1997 vol 31 3.5
- Mills S.A. y Frankenberger W.T. 1994. Evaluation of phosphorus source promoting bioremediation of diesel fuel in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53:280-284.
- Mueller J.G., Middaugh D.P., Lantz S.E. y Chapman P.J. 1991. Biodegradation of cresote and pentachlorophenol in contaminated groundwater. *Appl. Environ Microbiol.* 57: 1277-1285.

Bibliografía

- Neidhardt F. C. , Ingrahm J. L. y Schaechter 1993. *Physiology of bacterial*. Sinaver Associates, Inc. Sunderland.
- Peña A. 1995. *Como funciona la celula*. La ciencia desde México, Fondo de cultura economica. México.
- Primo Y. E. 1981. *Química agrícola I. Suelos y fertilizantes*. Ed Alhambra. España.
- Rodríguez A. R. 1998. *Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos*. La ciencia desde México, Fondo de cultura economica. México.
- Rodríguez V. R., Cruz C. T., Fernández S. J. M., Roldán C. T., Mendoza C. A., Saucedo C. G. y Tomasini C. A. 1999 Use of Sugarcane bagasse pith as solid substrate for *P.chrysosporium* growth. *Folia Microbiol.* 44(2): 213-218.
- Rojas A. N. G., Rodríguez V. R., Saval B. S. y Alvarez P. J. J. 2000. Effect of C/N/P ratio and nonionic surfactants on polychlorated biphenyls biodegradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Saval S., 1995, *Curso Biorremediación de suelos y acuíferos* Programa Universitario del Medio Ambiente. UNAM. México.
- Savas Ü., Carstens C. P. y Jefcoate C. R. 1997. Biological oxidations and p450 reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 347: 181-192.
- Schneider J., Grosser R., Jayasimhulu K., Xue W. y Warshawsky D. 1996. Degradation of pyrene, benz(a)anthracene, and benzo(a)pyrene by *Mycobacterium* sp., isolated from former coal gasification site. *Appl. Environ Microbiol.* 62: 13-19.
- Shugart L. R. 1996. *Molecular markers to toxic agents*. CRC Press INC.
- Siebe S. 1997. *Química del suelo. Memorias del curso Biorremediación de suelos y acuíferos*. Programa universitario del medio ambiente. UNAM México.
- Soeder C.J., Papaderos A., Kleespies M., Kneifel H., Haegel F. y Webb L. 1996. Influence of phyto-genetic surfactants on bio-elimination of phenanthrene and fluoranthene by three bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 654-659.
- Stanley D. 1986. *Biochemistry of aromatic hydrocarbon degradation in pseudomonads*, Department of biochemistry University of Minnesota. 10(15): 527-555
- Sutherland J. B. 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungus, J. Industrial. *Microbiology.* 9: 53-62

- Turchi G. S. y Ollis F. 1990. Photocatalytic degradation of organic water contaminants. *J. Catalysis*. 122: 178-1992.
- Wagrowski D. y Hites R. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbon accumulation in urban, suburban, and vegetation. *Environ Sci. Technol.* 31: 279-282.
- Wang X., Yu X. y Bartha R. 1990. Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbon residues in soil. *Environ. Sci. Technol.* 24: 1086-1089.
- Weissenfels W. D., Klewer H. J. y Langhoff J. 1992. Adsorción de policíclicaromáticos hidrocarburos (PAH's) by soil particules; influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 36: 689 – 696.
- Wiesel I., Wubker S. M. y Rehm H. J. 1993. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an immobilized mixed bacterial culture, *Appl. Microbiol Biotechnol.* 39: 110-116.
- Wise D. L., Trantolo D. J. 1994. *Remediation of Hazardous Waste contaminated soil.* Marcel Dekker Inc. Nueva York. (3): 39-53.
- Wischmann H. y Steinhart H. 1997. The formation of oxidation products in soil and soil / compost mixtures. *Chemosphere.* 35(8): 1681 – 1698.
- Ye G., Siddiqi A., Maccubbin A. E., Kumar S. y Sikka H. C. 1996. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environ. Sci. Technol.* 30: 136-142.
- Zink G. y Lorber E. 1995. Mass espectral identification of metabolites formed by microbial degradation of PAH. *Chemosphere.* 31(9): 4077- 4084.

ANEXO 1. DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL MÉTODO ANALÍTICO MONTADO

A 1.1 Desarrollo del método

Como se mencionó anteriormente, el objetivo principal de la investigación es comprobar la factibilidad de degradación de los HPA en suelo, de acuerdo al protocolo descrito, para lo cual, es necesario contar con un método analítico que permita hacer un seguimiento del sustrato que sirve como fuente de carbono (HPA), así como los posibles metabolitos de la biodegradación que se forman, para esto, una muestra de suelo se manipula y somete a una serie de etapas o procedimientos de acondicionamiento que permiten aislar los compuestos de interés para su análisis y cuantificación, cada una de estas etapas de acondicionamiento están descritas como normas o métodos analíticos. En investigaciones de biodegradación consultadas previamente, se observa que, la validez de los resultados se sustentó en la una metodología analítica validada y probada, tomando como referencia las normas establecidas por la EPA, o alguna otra organización internacional. Sin embargo no siempre es posible aplicar estas en su totalidad como han sido descritas, por diferentes causas, como el no contar con la infraestructura necesaria, o el hecho de que estos métodos usan grandes volúmenes de reactivos, lo cual genera una gran cantidad de residuos, que muchas veces no pueden ser tratados en forma adecuada.

Es por lo anterior, que un propósito adicional de este trabajo es desarrollar una metodología que permita llevar a cabo el seguimiento de los compuestos de interés de una forma reproducible y confiable pero generando la mínima cantidad de residuos y al mismo tiempo poder analizar una mayor cantidad de muestras al menor costo. Esto no implicó que los métodos propuestos no fueran tomados en cuenta, por el contrario estos sirvieron como referencia general, y a partir de estos se hacen las adecuaciones necesarias para cumplir con lo estipulado. Además hay que contemplar, que si bien, este método será utilizado en primera instancia para la investigación de biorremediación planteada, también debe servir para investigaciones posteriores en donde las condiciones de biodegradación impliquen trabajar con un mayor número de compuestos que analizar, como es el caso de experimentos de biorremediación en condiciones reales y no tan solo para experimentos con condiciones controladas.

Secuenciar un proceso de biorremediación implica conocer cual es la variación de los contaminantes (HPA) y los metabolitos formados presentes en el suelo, y para esto tienen que ser separados del suelo mediante el método de extracción líquida, pasando así de una fase sólida a una fase líquida, pero en la extracción se aislaron junto con los HPA y los metabolitos otros compuestos orgánicos que componen al suelo. Aún cuando es posible cuantificar los compuestos de interés con equipos análisis sofisticados, como un cromatógrafo de gases con detector de espectroscopía de masas (CG/MS), el cual es capaz de separar e identificar cada

uno de los compuestos presentes, no siempre es posible contar con este equipo o, en ocasiones el extracto contiene una gran cantidad de compuestos difíciles de separar, lo cual implica largos tiempos de análisis o bien que algunos de estos compuestos no sean excluidos de la columna cromatográfica con lo que el tiempo de vida de ésta disminuye, por esta razón se propone un proceso de limpieza del extracto denominado "Clean up", este proceso no es otra cosa que una cromatografía previa, la cual permitirá un fraccionamiento o separación de compuestos presentes en la muestra de acuerdo con su polaridad y de esta forma realizar con mayor facilidad el análisis. Así los extractos obtenidos se depositaron dentro de una columna cromatográfica en la cual los compuestos son adsorbidos en un material sólido con características químicas que permiten formar enlaces polares, y sacar o eluir los compuestos de interés. Se agregó un solvente de acuerdo al carácter polar del compuesto que se quiera eluir, saliendo primero los compuestos menos polares (HPA) y después los más polares (posibles metabolitos). Pero generalmente en las investigaciones de biodegradación revisadas sólo se eluye la fracción que contiene a los HPA, haciendo el seguimiento sólo por la desaparición de estos. Dejando dentro de la columna los compuestos polares entre los que se incluye los posibles metabolitos los cuales proporcionan información adicional. Una posible explicación de por que no se eluyen, es el hecho de que en ocasiones los metabolitos que se forman tienen características fisicoquímicas que no permiten eluir con facilidad los compuestos. Lo cual implica aumentar el número de fracciones y por ende un costo adicional y tiempo, además de que el análisis por cromatografía de gases de los compuestos polares, que generalmente tienen bajo punto de ebullición, implica el uso de una reacción química de derivatización, la cual forma un derivado que sí puede ser analizado, ello implica una etapa más en el proceso de análisis.

Con todo lo expuesto hasta el momento se pudo expresar que no es fácil la elaboración de un método analítico, sobre todo considerando que la modificación de los métodos que ya han sido validados. Por lo que se debió encontrar nuevas condiciones que permitan realizar el análisis en forma confiable y reproducible para cada una de las etapas que constituyen el método analítico. Por esta razón se designo todo un capítulo para encontrar las condiciones óptimas de cada una de las etapas que se enuncian a continuación:

- a) Concentración del extracto (evaporación)
- b) Fraccionamiento, limpieza "clean up".
- c) Concentración de las fracciones (evaporación)
- d) Reacción de derivatización (silylación)
- e) Análisis en el CG/MS

Estas son las etapas mínimas necesarias para lograr el análisis, y exceptuando el proceso de extracción, en las etapas restantes se evaluarán las condiciones y los parámetros de trabajo hasta encontrar las óptimas. Mediante la cuantificación de un estándar elaborado en cada una de estas etapas.

El hecho de que se excluya de este proceso de optimización al proceso de extracción se debe a que éste se evalúa al cuantificar los extractos de las muestras de suelo de cada uno de los experimentos. En la figura A 1.1 se explica en forma general un diagrama de flujo con los pasos a evaluar de esta metodología.

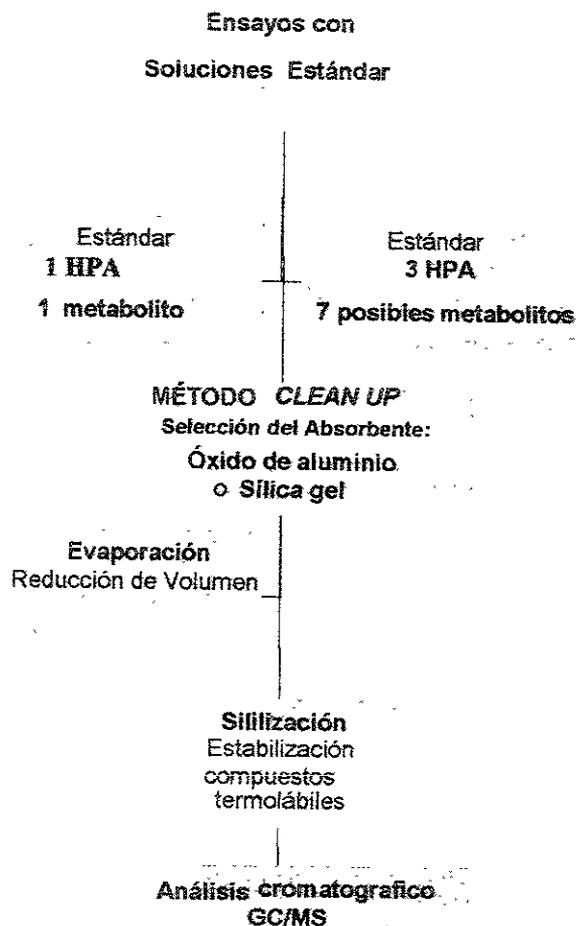


fig. A 1.1 Diagrama de flujo para el método analítico propuesto

El diagrama de flujo es una propuesta de los pasos a seguir para el método analítico, y aún cuando el análisis cromatográfico es la conclusión de este, la optimización de cada uno de ellos debe comenzar en sentido contrario al flujo. Para esto se utilizan muestras estándares preparadas en el mismo laboratorio, con las que se determina el porcentaje de recuperación en cada etapa del proceso, es necesario recalcar que no es posible trabajar con una muestra de extracto sin antes haber optimizado cada uno de los pasos del proceso analítico con una muestra estándar conocida.

A 1.2 Análisis en el GC/MS

Como se mencionó anteriormente para llevar a cabo la optimización del método se comienza por el final del proceso, en este caso el análisis cromatográfico, para lo cual se cuenta con un cromatógrafo de gases que tiene como detector un espectrómetro de masas serie HP 6890 utilizando una columna capilar HP 5MS, el cual además de separar los compuestos analíticos permite identificar y constatar si efectivamente corresponde al compuesto esperado. Es posible observar la respuesta del equipo a diferentes concentraciones de los HPA inyectando la muestra directamente al cromatógrafo, sin embargo esto no es posible para los metabolitos que se forman durante la biodegradación de los HPA ya que son compuestos que con un aumento de temperatura su estructura cambia o se destruye, es el caso de los grupos carboxilo, aldehídos o hidróxido (COOH, CHO y OH) unidos a un grupo aromático, de modo que para poder ser detectados en el cromatógrafo de gases, es necesario protegerlos de una posible descomposición en el momento en que son inyectados en el cromatógrafo, y una forma de protegerlos es mediante la reacción de sililización, según se establece en los trabajos de Wischmann,(1996).

A 1.3 Sililización

La reacción de sililización es una reacción química en la cual se agrega un grupo trimetil silicato al metabolito en la posición del hidrógeno que está unido al grupo carboxilo o hidroxilo. Esto implica que el disolvente no debe contener ninguno de estos grupos y de preferencia debe ser no polar como hexano o diclorometano, también debe tomarse en cuenta que el reactivo sililizante además de costoso es tóxico, por lo que se aconseja trabajar con microlitros, en microviales los cuales tienen una capacidad máxima de 200 μL . NOTA: preferentemente se debe trabajar dentro de una campana de extracción.

La optimización de esta etapa comienza con la preparación del estándar de un posible metabolito (ácido 1 hidróxi naftoico) en diclorometano. En microviales se depositan diferentes cantidades del estándar preparado utilizando una jeringa de 100 μL , para agregar después diferentes cantidades del agente sililizante, con el propósito de realizar los ensayos necesarios que permitan establecer para la relación mas adecuada de reactivo sililizante a una cantidad de estándar del posible metabolito, así como la temperatura óptima para llevar a cabo la reacción. Por razones prácticas y para poder trabajar con la mayor capacidad que permite el microvial se toman 70 μL de estándar y se varía la cantidad de agente sililizante, se encontró que la relación 1:1 es la que brinda mejor resultados. Además de la relación entre estándar y agente sililizante se tienen dos parámetros más por definir, el tiempo mínimo de reacción y la temperatura de reacción. De esta forma se dispone de 6 microviales con 70 μL de estándar y 70 μL de agente sililizante, tres de los cuales tendrán un tiempo de reacción de 15 minutos y los tres restantes 60 minutos en ambos casos se proponen las siguientes temperaturas 20, 50 y

100 °C de reacción, con lo que se obtienen los siguientes resultados, correspondientes al área del pico cromatográfico. Los resultados se observan en la tabla A 3.1.

Tabla A 3.1. Ensayo de sililización de una solución estándar de ácido 1 hidróxi naftóico

	15 min	60 min
20 C	6100000	
50 C	6100000	
100 C	6900000	
20 C		6300000
50 C		5900000
100 C		6700000

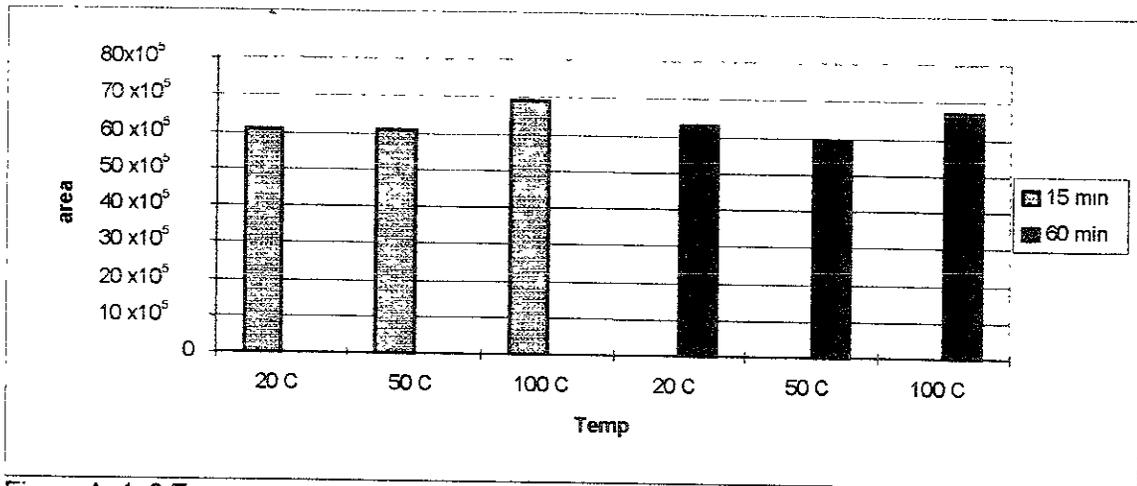


Figura A 1. 3 Ensayo comparativo de la reacción de sililización a diferentes temperaturas y tiempo de reacción

En la figura A 1.3, no existe un cambio significativo en el tiempo de reacción, en cuanto a la temperatura de reacción a 100 °C hay un aumento no muy significativo con respecto a la respuesta obtenida para 20 °C, sin embargo la temperatura seleccionada es 50 °C, para asegurar que la reacción se lleve acabo en su totalidad. El siguiente paso fue seleccionar el procedimiento de fraccionamiento o "Clean up" limpieza.

A1.4 Acondicionamiento del extracto "Clean Up" y fraccionamiento

El fraccionamiento del extracto se puede llevar a cabo como se establece en las normas EPA SW846 Métodos 3600C, 3610B, 3611B, 3630C o tomando en cuenta lo reportado por Wischamann, 1997; Leoben, 1995 y Langbehn, 1995 en el seguimiento que han realizado de metabolitos provenientes de la biodegradación de HPA, pero en ambos casos las normas y los artículos reportados, sólo hacen mención de los parámetros de trabajo a seguir, por lo que es necesario establecer cuales son las condiciones óptimas de trabajo para los extractos.

Para establecer los parámetros de trabajo óptimos, fueron fragmentadas muestras estándares conocidas, con compuestos que de acuerdo a la literatura deben estar presentes en los extractos. Por otro lado, se debe tener en cuenta que al manejar compuestos tóxicos se requiere contar con equipo que de preferencia sea desechable o fácil de limpiar, por lo que uno de los lineamientos será el de montar una técnica reproducible y económica. Para tal efecto se propone la fabricación de columnas cromatográficas que utilicen como soporte externo pipetas Pasteur con capacidad aproximada de 14.5mL y como retén interno fibra de vidrio, en lugar de las tradicionales columnas, que utilizan una mayor cantidad de reactivo y disolventes

Con el fin de encontrar las condiciones óptimas de trabajo se realizaron los siguientes experimentos o ensayos, variando los factores que influyen en el "Clean-up" desde la selección de adsorbente hasta la cantidad de eluyente y polaridad de la columna, dichos experimentos se enumeran a continuación:

- 1 Selección de adsorbente
 - a) Óxido de Aluminio
 - b) Sílica gel
- 2 Efecto de la polaridad de la columna y el volumen de sílica gel usada para fragmentar antraceno y ácido 1 hidróxi naftoico
- 3 Sistemas de evaporación
- 4 Desactivación de la sílica gel como factor de polaridad
- 5 Efecto de la desactivación de la sílica gel en selectividad
- 6 Secuenciación del fraccionamiento
- 7 Cambio de disolvente para eluir la primera fracción de diclorometano a la mezcla hexano-diclorometano 1:1
- 8 Cambio de disolvente en el estándar a hexano
- 9 Cambio de disolvente para eluir la primera fracción a hexano

Para seleccionar el tipo de adsorbente del que se constituye la columna cromatográfica, se dispone de óxido de aluminio y sílica gel, por lo que se procede a evaluar cual de los dos da mejores rendimientos utilizando una solución estándar que contiene antraceno (HPA) con 500 ppm y un posible metabolito ácido 1hydroxi naftoico con 100 ppm en diclorometano la cual será fragmentada en la columna previamente descrita.

**A 1.5 EXPERIMENTO 1:
SELECCIÓN DEL ADSORBENTE
(ÓXIDO DE ALUMINIO O SÍLICA
GEL)**

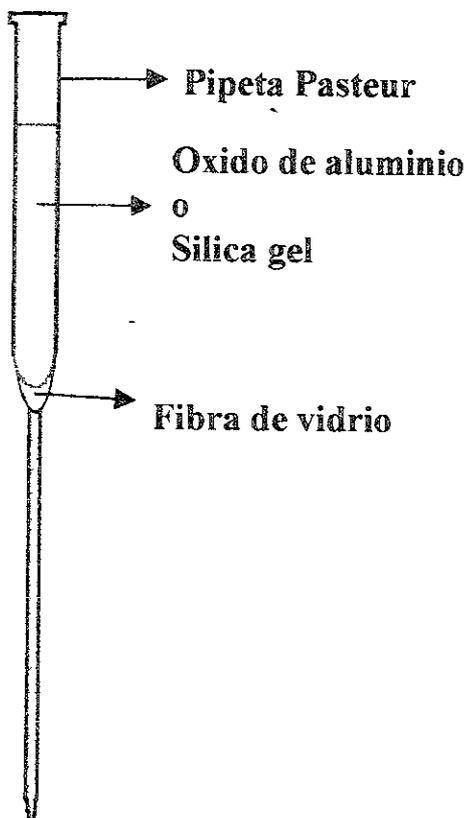


Figura A 1.3 Esquema simplificado de una columna de fragmentación

A) Óxido de aluminio

El primer intento de fragmentación se realizó con óxido de aluminio (deshidratado previamente en el horno a una temperatura de 135 C y desactivado posteriormente con agua al 5% dejando un tiempo para su equilibrio no menor a 3 horas). Para hacer la columna cromatográfica se debe limpiar perfectamente la pipeta Pasteur con diclorometano, se coloca en la parte interior inferior 0.08g de lana fibra de vidrio (previamente lavada con acetona y diclorometano y dejando a evaporación en la campana de extracción), como se muestra en la figura A 1.3 procurando no ocupar una longitud mayor a 2mm. Posteriormente, en un vial con capacidad para 10 mL y tapón de teflón se depositan 0.8 g de óxido de aluminio y se agregan 3 mL de diclorometano, formando una suspensión que se coloca dentro de la pipeta previamente preparada, evitando la formación de burbujas y procurando que la columna de óxido de aluminio siempre permanezca cubierta por el disolvente. De lo contrario está ya no sería útil.

Una vez formada la columna, se acondiciona pasando un volumen de 5 mL de diclorometano y posteriormente se adicionan 2.5 mL de la solución estándar

preparada previamente. Se eluye con 10mL de diclorometano la primera fracción (el grupo no polar antraceno) la cual es recolectada en vial que se marca como la fracción 1, la segunda fracción (grupos polares) se eluye con 10 mL metanol y es colectada en el vial marcado como fracción 2. El análisis de las dos fracciones se realiza en un cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas siguiendo la metodología que se indicó previamente, esto incluye la reacción previa de derivatización (silylación), recordando que para la segunda fracción el disolvente es metanol, por lo que para poder realizar la silylación, primero tendrá que evaporarse el disolvente y redisolverse con diclorometano.

Obteniendo que sólo la primera fracción (antraceno) es detectada en el cromatógrafo y la segunda fracción no se encuentra pues queda adsorbida en la columna. Se propone entonces cambiar las condiciones de la columna (polaridad), por lo que se desactiva el óxido de aluminio como se explicó anteriormente, pero esta vez con tres concentraciones de agua: al 0%, 5% y otra al 10 %. Se realiza el fraccionamiento con el procedimiento señalado para 2.5 mL de solución estándar pero sólo se logra separar la primera fracción y la segunda nuevamente se queda en la columna. Lo anterior se señala en la tabla A 1.2. Para cuantificar el porcentaje de recuperación, se inyecta en el cromatógrafo una muestra de la solución estándar previa silylación, en la misma corrida en la que se analizan las fracciones I y II. Se observa que la segunda fracción no contiene al ácido 1hidroxi naftoico, que es el compuesto polar que se espera recuperar en esta fracción.

Tabla A 1.2 Porcentaje de recuperación del “clean-up” con óxido de aluminio

columna	Disolvente de Elución	fracción	NOMBRE	CONC ppm	tiempo retención	Area	% recuperado
Estándar	CH ₂ Cl ₂	Std	Antraceno	514	13.793	244734195	100,00
Estándar	CH ₂ Cl ₂	std	Ácido 1hidroxi naftoico	90	14.789	53298886	
Al ₂ O ₃ 0%	CH ₂ Cl ₂	1F	Antraceno	Nd	13.799	297352283	121,50
Al ₂ O ₃ 0%	Met-OH	2F	Ácido 1hidroxi naftoico	Nd	No detecta		
Al ₂ O ₃ 5%	CH ₂ Cl ₂	1F	Antraceno	Nd	13.798	259078120	105,86
Al ₂ O ₃ 5%	Met-OH	2F	Ácido 1hidroxi naftoico	Nd	No detectado		

B) Sílica Gel

Se realizó la fabricación de columnas cromatográficas, utilizando el procedimiento de manufactura señalado, pero con sílica gel en lugar de óxido de aluminio, y al mismo tiempo se probaron diferentes eluyentes para la segunda fracción, por lo que se prepararon los siguiente solventes: metanol, etilacetato, iso-propanol, acetona, y una mezcla metanol ácido acético al 1%. En todas estas columnas se añadieron 2.5 mL de la solución estándar pero el resultado de la fragmentación fue el mismo que en las columnas de óxido de aluminio, excepto cuando se eluyó la segunda fracción con la mezcla metanol ácido acético al 1%, en donde fue posible obtener el espectro de masas que comprobó la existencia del ácido 1hidróxi naftoico. Es necesario recordar que para poder llevar a cabo el análisis

cromatográfico de la segunda fracción, es necesario realizar la reacción de silylización en un disolvente apolar, por lo que al eluir la segunda fracción con la mezcla metanol ácido acético al 1% se debe llevar a cabo la evaporación de éste para sustituirlo por diclorometano. Desafortunadamente al hacer esto se forma un precipitado que impide tomar una muestra representativa para depositarla en el microvial, por esta razón se deposita primero 70 μL de la segunda fracción y después se lleva a cabo la evaporación del disolvente polar directamente en el microvial, redisolviendo con 70 μL de diclorometano. De esta forma aun cuando se forma el precipitado, al añadir posteriormente 70 μL de agente silylante se redisuelve formando una solución homogénea, este procedimiento se repite para todas los ensayos siguientes.

A 1.6 Experimento 2: Efecto de la polaridad de la columna y el volumen de sílica gel usada para fragmentar antraceno y ácido 1 hidróxi naftóico

Una vez seleccionada a la sílica gel como adsorbente adecuado y encontrado el disolvente que logra eluir al compuesto polar (2ª fracción) de la columna cromatográfica, y considerando el procedimiento señalado en la reacción de silylización, se procede a encontrar las condiciones óptimas para la elución de la segunda fracción. Esta presenta problemas de recuperación que dependen fundamentalmente de dos variables el volumen de la columna (gramos utilizados) y polaridad del eluyente (mezcla metanol, ácido acético) para esto se proponen los siguientes experimentos

- Experimento 2 A. Variar la polaridad de la mezcla metanol / ácido acético 1%, 3%, 5% y el volumen de elución manteniendo constante la cantidad de sílica gel que forma la columna
- Experimento 2 B. Variación del volumen de elución, la cantidad de sílica que conforma la columna y elución con metanol/ ácido acético al 1%

A continuación se describen las condiciones para los dos experimentos. Los resultados del porcentaje recuperado para la segunda fracción se muestran en la tabla A 1.3 y en forma gráfica en la figura A 1.4.

Experimento 2 A. Efecto de la polaridad del eluyente

Columna con 0,8 g de sílica gel desactivada con 6% de agua
Eluyentes:

Met-OH / ácido acético 1%

Met-OH / ácido acético 3%

Met-OH / ácido acético 5%

tabla A1.3 Evaluación del efecto del eluyente en el experimento 2^a

Vol. elución	Tiempo de retención	Área	% recuperación	Elución Met-OH / Ácido acético
5 mL	14,789	14464181	31,63	1%
10 mL	14,784	26062004	26,18	1%
15 mL	14,787	22258078	22,36	1%
10 mL	14,785	31650752	31,80	3%
15 mL	14,788	33727184	33,88	3%
10 mL	14,788	27096926	27,22	5%
15 mL	14788	34686845	34,85	5%

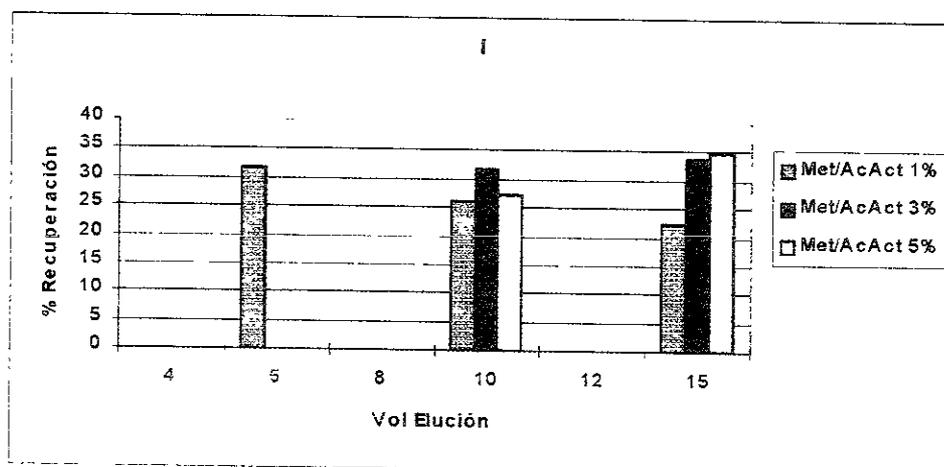


Fig. A 1.4 Experimento 2A recuperación de la segunda fracción

En la figura A1.4 se observa que para la misma cantidad de sílica gel 0.8 g desactivada al 6%, la recuperación de la segunda fracción presenta un comportamiento ascendente a medida que se aumenta el volumen de elución, para la mezcla de ácido acético al 3 y 5%, pero no así para la que esta 1 %, la cual no representa un comportamiento lógico, esto se debe a pérdidas del compuesto durante la evaporación del disolvente, que se explican posteriormente.

Experimento 2 B. Efecto del volumen de eluyente

Para el experimento 2 B varió la cantidad de gramos que conforman la columna se obtuvieron los siguientes resultados tabla A 1.4.

Columnas de sílica gel desactivada con 6% de agua
Elución de la segunda fracción con metanol / ácido acético al 1%

tabla A 1.4 Evaluación del volumen de eluyente en el experimento 2B

Vol	t retención	área	% recuperación	g sílica gel
4ml	14,786	7722419	11,03	0,3
8ml	14,788	14619198	20,87	0,3
4ml	14,786	44583244	63,65	0,3
8ml	14,791	71545314	102,15	0,3
8 ml	14,788	28296790	40,40	0,5
8 ml	14,785	22615210	32,29	0,5
10 ml	14,790	43525703	62,14	0,5
10 ml	14,785	25026108	35,73	0,5
12 ml	14,788	35467641	50,64	0,5
12 ml	14,787	51695547	73,81	0,5

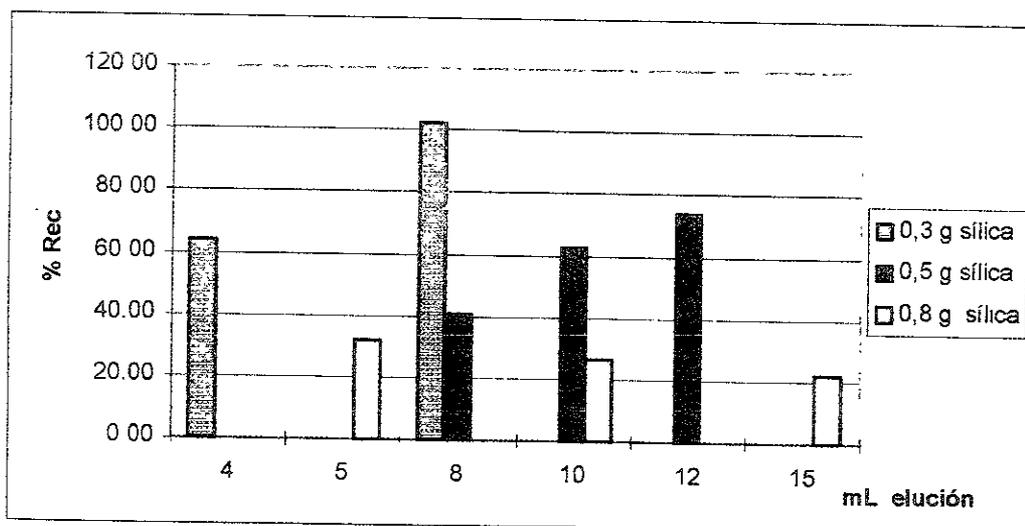


Fig. A 1.5 Efecto del volumen de eluyente

En la figura A 1.5 se observa que para las columnas con 0.3 y 0.5 g de sílica la recuperación es mayor cuando aumenta el volumen de elución, pero este comportamiento no se presenta en la columna con 0.8 g, esto se debe a la pérdida del compuesto durante la evaporación del disolvente a temperatura ambiente al ajustar el volumen de la segunda fracción y en el proceso de sililización que se

lleva acabo en microviales con microlitros, lo cual conlleva mucho errores por fenómenos de manipulación, por lo que algunos de los resultados encontrados varían de lo esperado, las condiciones óptimas de la fragmentación se encontraron después de evaluar el proceso de evaporación.

Para observar como influye el proceso de evaporación y manipulación de las muestras se procedió a realizar el **experimento 3** en el que una solución del estándar Num. 3 que contiene 3 HPA y 7 posibles metabolitos disueltos en diclorometano, se sometieron diferentes métodos de evaporación sugeridos en la literatura como son: nitrógeno, dejando al ambiente y el rotavapor.

A 1.7 Experimento 3. Efecto de los procesos de evaporación

En los experimentos anteriores se hace referencia a la manipulación de las muestras o procesos de evaporación. Sin embargo no se había hecho referencia anteriormente porque se consideraba que no eran importantes, pero dados los resultados obtenidos en los ensayos anteriores fue necesario hacer un estudio de los posibles efectos que estos procesos tienen en el resultado final. Los procesos de evaporación son necesarios cuando la concentración del analito en la muestra es muy diluída y es necesario concentrarla o cuando el volumen no se conoce con exactitud, por ejemplo cuando se recolectan las fracciones del "Clean-up", también cuando se tiene que cambiar el disolvente en que está el analito a determinar, por no ser el adecuado para el análisis posterior o para poder llevar acabo alguna reacción de derivatización, por ejemplo, en el caso de la segunda fracción que tiene como disolvente una mezcla de dos compuestos polares (que disuelve perfectamente a los metabolitos polares) se debe evaporar hasta eliminarlo totalmente, ya que no es posible realizar en él la sililización, y sustituirlo por diclorometano, pero en el caso específico de la segunda fracción, al eliminar el metanol/ácido acético en el vial hasta sequedad y tratarlo de disolver con diclorometano, se forma una suspensión, por lo que primero se redisuelve en el vial con un volumen conocido de metanol/ ácido acético y de aquí se toman se toma los microlitros necesarios que se disponen en el microvial y es en éste donde se evapora el disolvente y se redisuelve en diclorometano, yaún cuando se forma la suspensión, al agregar el agente sililizante disuelve el analito y se forma una solución homogénea.

Es por todo este proceso de evaporaciones y trasvase de muestra que es necesario llevar a cabo éste ensayo reproduciendo los procesos de evaporación con un estándar utilizando diferentes métodos de evaporación como son evaporación natural, evaporación con nitrógeno y evaporación con el equipo de rotavapor o rotaevaporador. Los procesos de evaporación se realizan de la siguiente forma: se poner 70 μL del estándar Num.3 que tiene como disolvente diclorometano en un microvial, evaporar hasta sequedad, se redisuelve en metanol/ ácido acético evaporando de nuevo hasta sequedad adicionando 70 μL de diclorometano y se lleva a cabo la reacción de sililización. Las condiciones de evaporación son las siguientes: para la evaporación al ambiente se deja abierto el microvial en la campana, en el caso de evaporación con nitrógeno se contó con un

equipo donde se pudieron evaporar al mismo tiempo hasta 8 muestras con un flujo homogéneo el cual es regulado con una válvula, procurando que no sea tan fuerte como para expulsar al líquido fuera del microvial y para el rotovapor la temperatura del baño maría no debía rebasar los 40 °C y la presión es de 300 mmbar. Las pruebas de evaporación se realizan por triplicado, con el propósito de obtener resultados que fueran representativos de una muestra real, los procesos de evaporación utilizaron una solución estándar que contenía 7 posibles metabolitos y tres HP, denominado en este caso estándar Num.3. Asimismo para poder comparar y cuantificar el experimento 3 se analizaron en el cromatógrafo de Gases-Masas tres soluciones del estándar Num.3 sin evaporar, las cuales sirvieron como patrón de referencia, los resultados se registran en la tabla A 1.5. Los resultados obtenidos muestran que durante el proceso de evaporación se pierden algunos de los compuestos más volátiles y por otro lado, demuestra que una forma confiable y segura de evaporar es mediante el uso del rotavapor. El método de nitrógeno si bien en ocasiones es confiable, depende mucho de las condiciones de operación que en ocasiones no pueden ser reproducibles como lo muestran los resultados de la figura A 1.6

Tabla A 1.5 Solución patrón estándar sin evaporar

	Fenol	Dimetil fenol	Ácido benzóico	Naftol	Ácido hidróxi benzóico	Ácido dihidróxi bezóico	Ácido 1 hidróxi naftoico	Antraceno	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
Estándar No 3 (1)	25.10	20.60	27.50	22.80	12.60	10.90	19.30	27.80	1036.10	264.80
Estándar No 3 (2)	23.10	19.00	25.10	21.20	11.40	10.30	17.40	25.40	888.20	238.80
Estándar No 3 (3)	23.60	19.80	26.20	21.90	12.10	10.30	17.70	24.70	1066.50	246.40
Estándar promedio	23.93	19.80	26.27	21.97	12.03	10.50	18.13	25.97	996.93	250.00

Estándar sometido a diferentes métodos de evaporación, concentración en ppm

	Fenol	Dimetil fenol	Ácido benzóico	Naftol	Ácido hidróxi benzóico	Ácido dihidróxi bezóico	Ácido 1 hidróxi naftoico	Antraceno	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
Evaporado en Roto Vap	22.80	18.80	26.80	23.20	12.20	7.50	18.90	936.70	262.10	28.40
Evaporado en Roto Vap	21.50	17.80	25.10	21.10	11.50	7.40	17.60	1030.30	236.30	26.10
Evaporado en Roto Vap	20.90	17.10	24.30	20.50	10.50	5.70	12.70	896.70	228.40	21.00
Evaporado por N2	12.40	12.70	24.60	20.80	11.60	10.20	17.40	918.10	245.10	26.00
Evaporado por N2	13.40	13.50	24.50	20.90	11.60	10.00	18.40	1056.30	239.60	25.40
Evaporado por N2	4.80	6.30	25.00	21.40	11.80	10.20	17.90	1037.00	249.90	26.40
Evaporado en 4hrs al ambiente	2.80	3.10	23.20	16.70	11.50	10.00	17.20	1061.70	247.80	25.40
Evaporado en 4hrs al ambiente	3.10	3.60	24.50	17.40	12.00	10.50	17.90	913.70	254.40	26.80
Evaporado en 4hrs al ambiente	2.40	2.60	24.20	17.40	12.00	10.30	16.70	1051.20	261.30	26.10
Evaporado en 22hrs al ambiente	1.00	0.80	15.20	12.10	11.90	9.50	17.30	915.60	243.60	26.70
Evaporado en 22hrs al ambiente	1.00	0.90	15.30	11.90	12.20	10.40	17.60	922.80	252.40	27.20

Estándar sometido a diferentes métodos de evaporación, porcentaje de recuperado

	Fenol	Dimetil fenol	Ácido benzóico	Naftol	Ácido hidróxi benzóico	Ácido dihidróxi bezóico	Ácido 1 hidróxi naftoico	Antraceno	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
Evaporado en Roto Vap	95.26	94.95	102.03	105.61	101.39	71.43	104.23	93.96	104.84	109.37
Evaporado en Roto Vap	89.83	89.90	95.56	96.05	95.57	70.48	97.06	103.35	94.52	100.51
Evaporado en Roto Vap	87.33	86.36	92.51	93.32	87.26	54.29	70.04	89.95	91.36	80.87
Evaporado por N2	51.81	64.14	93.65	94.69	96.40	97.14	95.96	92.09	98.04	100.13
Evaporado por N2	55.99	68.18	93.27	95.14	96.40	95.24	101.47	105.95	95.84	97.82
Evaporado por N2	20.06	31.82	95.18	97.42	98.06	97.14	98.71	104.02	99.96	101.67
Evaporado en 4hrs al ambiente	11.70	15.66	88.32	76.02	95.57	95.24	94.85	106.50	99.12	97.82
Evaporado en 4hrs al ambiente	12.95	18.18	93.27	79.21	99.72	100.00	98.71	91.65	101.76	103.21
Evaporado en 4hrs al ambiente	10.03	13.13	92.13	79.21	99.72	98.10	92.10	105.44	104.52	100.51
Evaporado en 22hrs al ambiente	4.18	4.04	57.87	55.08	98.89	90.48	95.40	91.84	97.44	102.82
Evaporado en 22hrs al ambiente	4.18	4.55	58.25	54.17	101.39	99.05	97.06	92.56	100.96	104.75

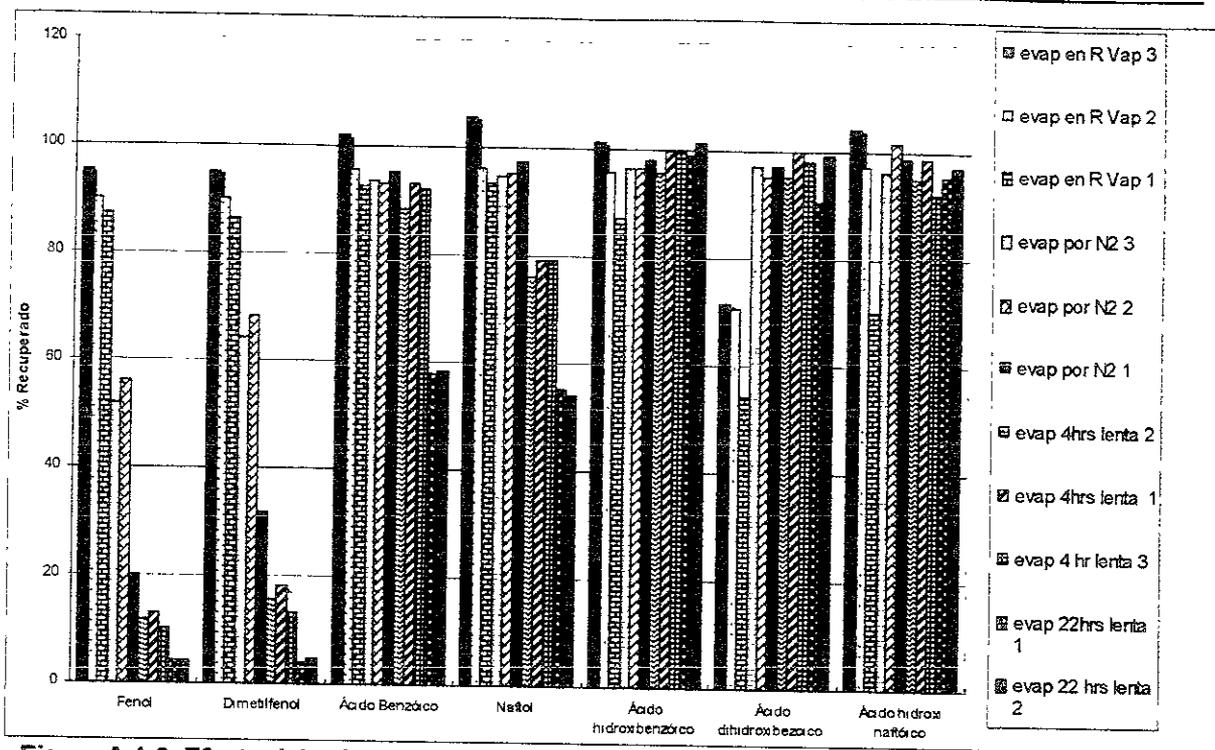


Figura A 1.6 Efecto del método de evaporación sobre una solución estándar.

A 1.8 Experimento 4. Fraccionamiento del estándar Num. 4, 1ª fracción eluida con diclorometano y 2ª fracción con metanol/ácido acético

Una vez que se estudió el efecto de los diferentes sistemas de evaporación sobre el estándar Num. 3 se observa que el método más adecuado es el uso del rotaevaporador. Con el fin de obtener los parámetros óptimos para el "Clean-up", se procedió a elaborar un nuevo estándar num. 4 similar al utilizado en el experimento anterior, el cual constó de tres HPA y siete posibles metabolitos, con las concentraciones que se indican en la tabla A 1.6

Con el propósito de encontrar las condiciones más favorables para obtener un máximo de recuperación y una buena separación de los diferentes componentes del estándar, de acuerdo con su polaridad.

Tabla A 1.6 Solución estándar Num.4
3 HPA + 7 posibles metabolitos

Nombre	Conc final ppm
Fenol	225.538
Naftol	20.456
Ácido 1 hidróxi naftóico	16.863
Ácido benzoico	24.471
2,6-Dimetil fenol	18.432
3-4 Ácido dihidróxi benzoico	14.932
Ácido 4-hidroxi benzoico	15.546
Dibenzo(a,h)antraceno	52.000
Criseno	253.038
Antraceno	314.750

El proceso de "clean up" se realizó con las siguientes condiciones: seis columnas de vidrio con 0.5 g de sílica-gel, desactivada con agua al 6 %, utilizando como muestra a fraccionar 2 mL de solución estándar Num. 4. La primera fracción se obtuvo utilizando como eluyente 7.5 mL de diclorometano. Para la segunda fracción, se eluyeron tres columnas con 10 mL una solución de ácido acético al 1% (0.17M) en metanol, y las tres columnas restantes con 10 mL ácido oxálico 0.17M en metanol. Cada una de las fracciones fue recolectadas en viales de aproximadamente 12 mL de capacidad y evaporadas en el rotaevaporador hasta un volumen menor a 2 mL a una temperatura de 20°C y 300 mbar para la primera fracción y 40°C y 200mbar para la segunda fracción, ajustando el volumen con un matraz aforado de 2 mL con el disolvente que correspondía. Previa reacción de sililización se realizó el análisis en el cromatógrafo de gases-masas, en el cual además de las fracciones obtenidas se intercalaron en el análisis tres muestras del estándar Num.4. el cual sirvió para calibrar el equipo y como patrón de referencia para calcular el porcentaje de recuperación, como se muestra en la tabla A 1.7

Tabla A 1.7 Estándar num.4, patrón de referencia

Estándar	Fenol	2,6-Dimetil fenol	Ácido benzóico	Naftol	4-Hidroxi Ácido benzóico	3-4 Ácido dihidróxi benzóico	Antraceno	Acido 1 Hidróxi Naftol	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
Num.4 (1)	213.00	17.00	23.60	18.60	14.00	13.10	300.90	12.80	239.10	43.80
Num.4 (2)	235.60	19.30	25.20	21.30	16.30	15.80	322.00	18.00	260.20	55.10
Num.4 (3)	228.10	19.00	24.70	21.50	16.40	15.90	321.40	19.80	259.80	57.10
promedio	225.57	18.43	24.50	20.47	15.57	14.93	314.77	16.87	253.03	52.00
Valor real	225.53	18.43	24.47	20.45	15.546	14.932	314.75	16.863	253.03	52

La primera fracción se obtuvo como se mencionó anteriormente al eluir la muestra con 7 mL de diclorometano, obteniendo los resultados que se muestran en la tabla A 1.8, y presentados como porcentaje de recuperación, en las tablas A 1.9 e ilustrado en la figura A 1.7

Tabla A 1.8 1ª Fracción estándar num. 4, sílica gel 0.5 g eluido con 7.5 mL CH₂Cl₂ concentraciones en ppm

Sílica desactivada con 6% H ₂ O		Fenol	Dimetil fenol	Ácido benzóico	Naftol	Ácido hidróxi benzóico	Ácido dihidróxi bezoico	Antraceno	Acido 1 hidróxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
Gramos de sílica gel en la columna	Muestra Fracción										
0.5	1F (1)	193.6	15.30	0.60	16.10			278.00		228.60	44.70
0.5	1F (2)	197.2	16.00	0.70	17.70			289.50		234.60	49.20
0.5	1F (3)	210.9	17.60	0.70	19.70			314.90		260.80	53.90
0.5	1F (4)	208.8	17.20	0.70	19.10			309.10		248.80	54.70
0.5	1F (5)	208.7	17.20	0.80	19.00			304.70		246.00	53.50
0.5	1F (6)	200.0	16.20	0.30	17.60			291.90		231.10	47.70

Tabla A 1.9 1ª Fracción estándar num. 4, sílica gel 0.5 g 7.5 ml CH₂CL₂, porcentaje recuperado

Sílica desactivada con 6% H ₂ O		Fenol	Dimetil fenol	Ácido benzóico	Naftol	Ácido hidróxi benzóico	Ácido dihidróxi benzóico	antraceno	Ácido 1 hidróxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antracen
Gramos de sílica gel en la columna	Muestra Fracción										
0.5	1F (1)	85.83	83.00	2.45	78.66	0.00	0.00	88.32	0.00	90.34	85.96
0.5	1F (2)	87.42	86.80	2.86	86.48	0.00	0.00	91.97	0.00	92.72	94.62
0.5	1F (3)	93.50	95.48	2.86	96.25	0.00	0.00	100.04	0.00	103.07	103.65
0.5	1F (4)	92.57	93.31	2.86	93.32	0.00	0.00	98.20	0.00	98.33	105.19
0.5	1F (5)	92.52	93.31	3.27	92.83	0.00	0.00	96.80	0.00	97.22	102.88
0.5	1F (6)	88.67	87.88	1.22	85.99	0.00	0.00	92.74	0.00	91.33	91.73

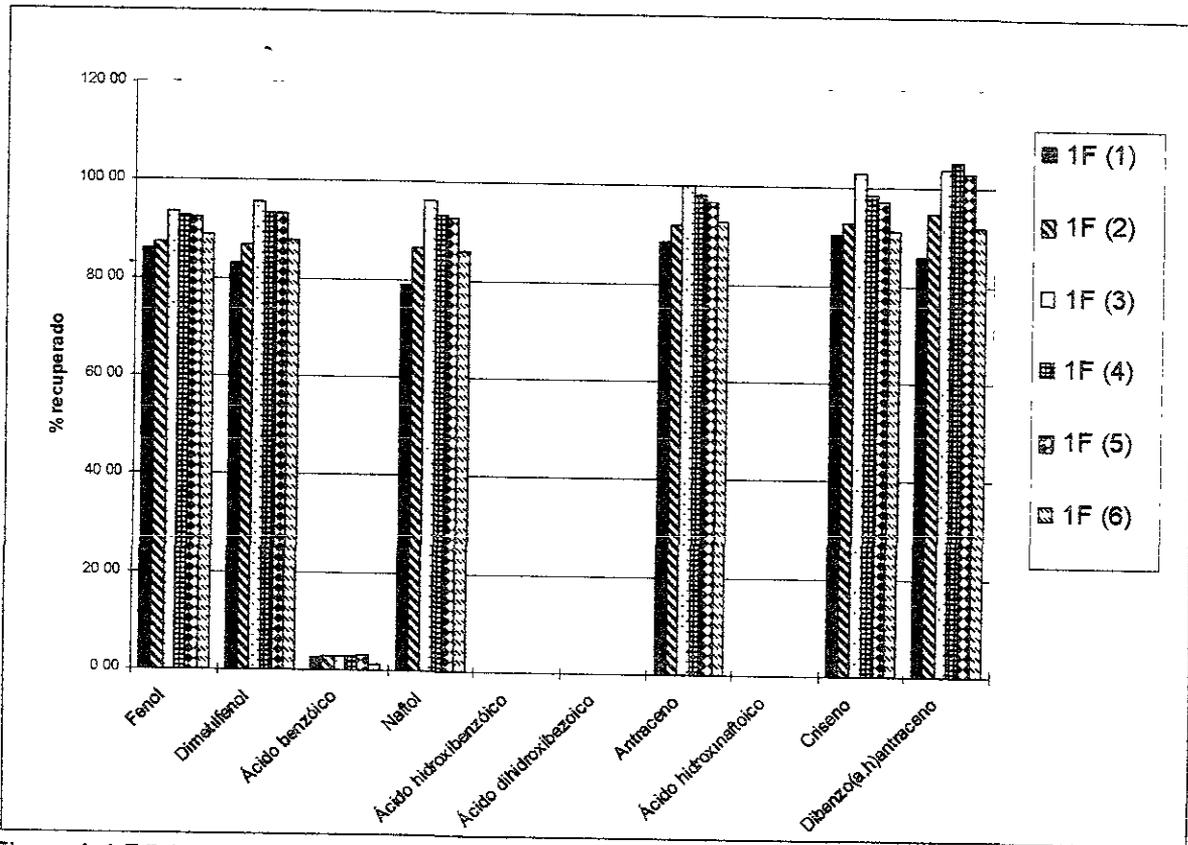


Figura A 1.7 Primera fracción del estándar Num.4, eluido con 7.5 mL de diclorometano en columna con 0.5g de sílica gel.

Aún cuando el porcentaje de recuperación es bueno, hay un inconveniente en la primera fracción eluida con diclorometano, ya que al momento de desorber los compuestos policíclicos aromáticos, también son eluidos los compuestos con grupo funcional fenilo (fenol, dimetilfenol y naftol), los cuales se pensaba se obtendrían en la segunda fracción. Sin embargo, el porcentaje de recuperación de los compuestos son muy cercanos al 100%, lo cual se debe indudablemente a que en esta ocasión los procesos de manipulación son controlados y es posible mantener un proceso reproducible. También para la segunda fracción el porcentaje de recuperación es aceptable en comparación con los experimentos anteriores que se observa en las tablas A 1.10, A 1.11, A 1.12 y es representado en la gráfica de la figura A 1.8, en este caso los compuestos que son eluidos pertenecen al grupo carboxilo. Recordando que en esta ocasión la segunda fracción se eluye con ácido acético en tres columnas y las tres muestras restantes con ácido oxálico.

Tabla A 1.10 2ª fracción estándar Num. 4 sílica gel 0.5 g 10 ml Metanol/ 1% ácido acético, concentraciones en ppm.

Sílica desactivada con 6% H ₂ O		Fenol	Dimetil fenol	Ácido benzóico	Naftol	Ácido hidróxi benzóico	Ácido dihidróxi bezóico	Antraceno	Ácido 1 hidróxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antracen
Gramos de sílica gel en la columna	Eluición con 10mL Ácido acético										
0,5	2F (1)	1.10	2.10	17.30		10.40	4.00	6.50	5.10	1.30	44.70
0,5	2F (2)	2.00	2.30	19.50	0.20	13.50	8.00	4.00	9.50	2.70	49.20
0,5	2F (3)	1.30	2.50	20.60	0.20	14.70	8.50	4.90	9.90	3.80	53.90

Tabla A 1.11 2ª fracción estándar Num. 4 sílica gel 0.5 g 10 ml metanol/ 1% ácido oxálico, concentraciones en ppm.

Sílica desactivada con 6% H ₂ O		Fenol	Dimetil fenol	Ácido benzóico	Naftol	Ácido hidróxi benzóico	Ácido dihidróxi bezóico	Antraceno	Ácido 1 hidróxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antracen
Gramos de sílica gel en la columna	Eluición con 10mL Ácido oxálico										
0,5	2F (3)	2.20	2.10	17.70		11.90	8.60	2.60	13.10	1.90	44.70
0,5	2F (5)	1.60	2.40	20.80	0.00	14.90	11.60	4.10	17.10	3.00	49.20
0,5	2F (6)	3.50	2.10	16.70	0.30	11.60	8.80	5.90	12.80	4.80	53.90

Tabla A 1.12 2ª Fracción estándar Num. 4 sílica gel 0.5 g 10 mL metanol/ 1% ácido acético y ácido oxálico, % recuperado.

Sílica desactivada con 6% H ₂ O		Fenol	Dimetil fenol	Ácido benzóico	Naftol	Ácido hidróxi benzóico	Ácido dihidróxi bezóico	Antraceno	Ácido 1 hidróxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antracen
Gramos de sílica gel en la columna	Eluición con 10mL Ácido oxálico										
0,5	2F (1)	0.49	11.39	70.61	0.00	66.81	26.79	2.07	30.24	0.51	0.00
0,5	2F (2)	0.89	12.48	79.59	0.98	86.72	53.57	1.27	56.32	1.07	0.00
0,5	2F (3)	0.58	13.56	84.08	0.98	94.43	56.92	1.56	58.70	1.50	0.00
0,5	2F (3)	0.98	11.39	72.24	0.00	76.45	57.59	0.83	77.67	0.75	0.00
0,5	2F (5)	0.71	13.02	84.90	0.00	95.72	77.68	1.30	101.38	1.19	0.00
0,5	2F (6)	1.55	11.39	68.16	1.47	74.52	58.93	1.87	75.89	1.90	0.00

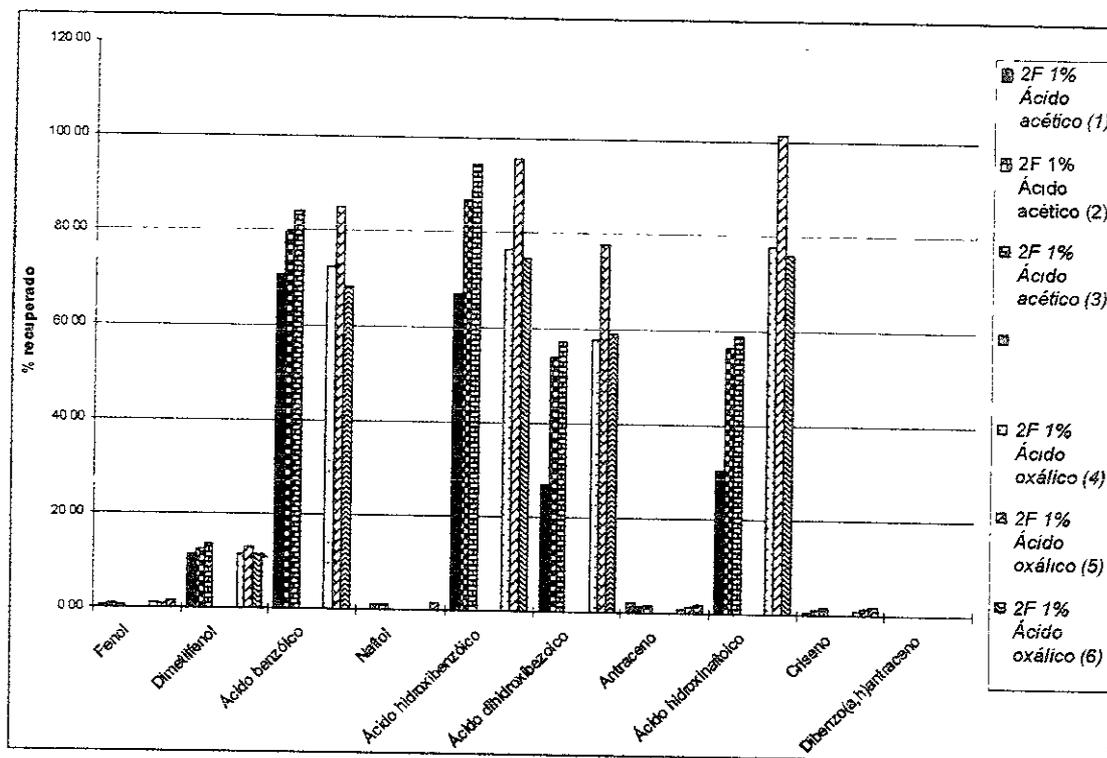


Figura A 1.8 2ª fracción del estándar Num.4 elución de tres ensayos con 10 mL con ácido acético y los tres restante con 10 mL de ácido oxálico en columna con 0.5 g de sílica gel

Cabe resaltar que el haber incorporado ácido oxálico en lugar de ácido acético, aumenta el porcentaje de recuperación de la segunda fracción. Este experimento sirvió para encontrar que sí es posible lograr el fraccionamiento con un buen porcentaje de recuperación, sin embargo la distribución de los diferentes grupos funcionales que conforman el estándar no es la adecuada, y teniendo en cuenta que uno de los objetivos es tener en la primera fracción solo compuestos policíclicos aromáticos se procedió a buscar las condiciones que permitieran lograr una mayor selectividad.

A 1.9 Experimento 5. Efecto de la polaridad de la sílica gel en el fraccionamiento del estándar num.4.

Teniendo en cuenta los resultados del experimento anterior, se realiza el siguiente experimento variando la polaridad de la sílica gel, esto es desactivándola con diferentes concentraciones de agua, con el fin de observar el efecto de la polaridad en la selectividad y fragmentación del estándar, suponiendo que a mayor cantidad de agua la retención de los grupos fenil hidroxilo es mayor. El estándar utilizado fue el mismo que en el experimento anterior y las condiciones en que se realizó el "clean-up" fueron las siguientes: por triplicado se montaron columnas con 0.5g de sílica gel desactivada con agua al 0, 6 y 8 %, las columnas se prepararon con el procedimiento señalado anteriormente y se adicionaron 2 mL del estándar Num.4, la primera fracción fue eluida con 10 mL de diclorometano y la segunda fracción fue eluida con 10 mL de ácido oxálico los resultados que se

muestran en la tabla A 1.13 y se ilustran en la figura A 1.9.

Tabla 3.4.12 Estudio de recuperación "Clean up" a 2 mL del estándar Num. 4, en columnas con 0.5 g sílica gel desactivada al 0%,6% y 8%, la 1ª Fracción eluida con 10 mL CH₂Cl₂ y la segunda con 10 mL de Metanol/ 1% ácido oxálico

mL	Fenol	Dimetil fenol	Ácido benzóico	Naftol	Ácido hidróxi benzóico	Ácido dihidróxi benzóico	Antraceno	Ácido 1 hidróxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
sílica gel 8% 1F CH ₂ Cl ₂	89.36	90.70	1.59	85.29	0.00	0.00	93.24	0.00	95.23	89.72
sílica gel 8% 2F Met-OH Ácido oxálico 1%	0.90	6.98	47.68	0.00	47.53	40.91	0.00	42.08	0.00	0.00
sílicagel 6% 1F CH ₂ Cl ₂	125.79	97.67	1.99	92.65	0.00	0.00	120.23	0.00	118.41	90.66
sílica gel 6% 2F Met-OH Ácido oxálico 1%	1.63	11.27	79.47	0.00	77.16	44.63	0.00	49.18	0.00	0.00
sílicagel 0% 2F Met-OH Ácido oxálico 1%	17.70	10.73	59.21	5.39	67.90	47.73	0.09	4.92	0.00	0.00

Al analizar los resultados se observa que no hay cambio en la selectividad de la columna ya que en los tres casos la segunda fracción sólo contiene a los compuestos con grupos carboxilo, y aún cuando en el caso de la desactivación al 0 % no se tienen los datos de la primera fracción, la segunda fracción no muestra cambios con respecto a las otras dos columnas en cuanto a los compuestos eluidos.

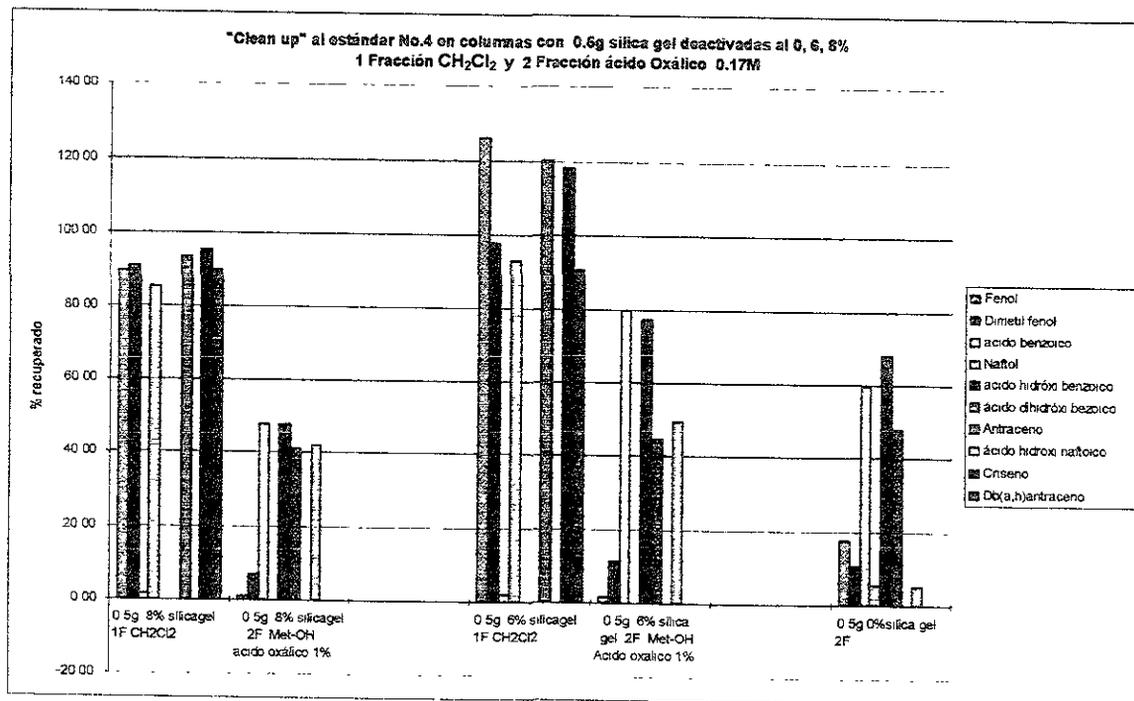


Figura A 1.9 Efecto de la desactivación de la sílica gel en la selectividad de fragmentación

Se puede observar que el efecto de la polaridad en la sílica-gel no influye en forma determinante en la selectividad cuando se utiliza diclorometano como eluyente para la primera fracción. La poca selectividad, se podría atribuir a que el diclorometano es un disolvente de mediana polaridad y por ende es capaz de eluir tanto a los HPA como a los compuestos fenilos (fenol, naftol y dimetil fenol). Sin embargo, es necesario conocer cómo se desarrolla el fenómeno de fraccionamiento de los compuestos del estándar a lo largo de la columna.

A 1.10 Experimento 6. Seguimiento del fraccionamiento del estándar num.4.

El seguimiento del "clean up" implica un procedimiento similar al del experimento anterior, pero esta vez las fracciones eluidas son recolectadas cada 2mL en viales de tal forma que los 10 mL de elución de la primera fracción son colectados en 5 viales y la segunda fracción eluida con 6 mL de ácido acético son colectadas en 3 viales conforme son desalojados de la columna, para su posterior análisis en el CG/MS de acuerdo a lo establecido en el protocolo, los resultados obtenidos se muestran en la tabla A 1.14 y se ilustran en la figura A 1.10.

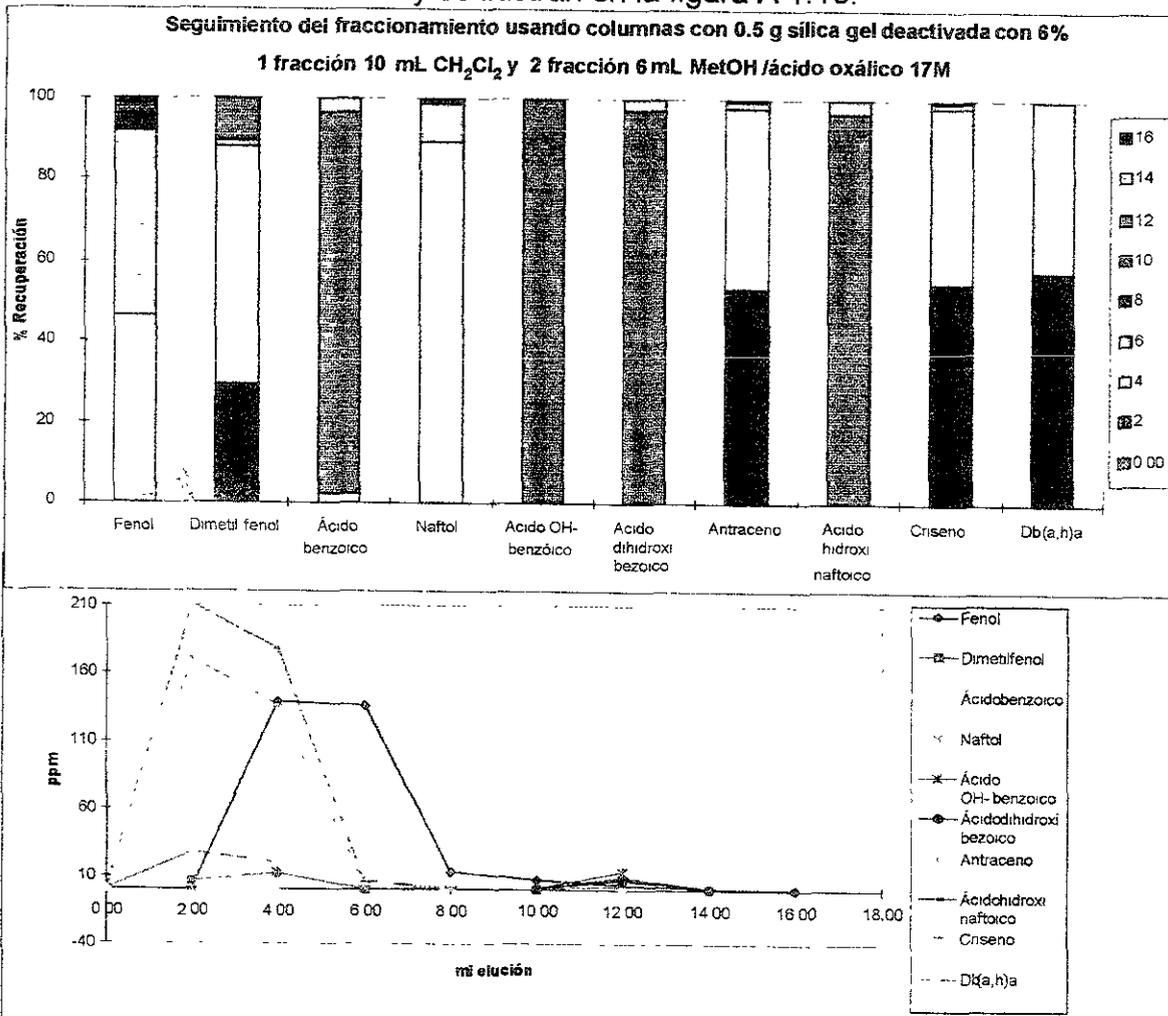


Figura A 1.10 Secuenciación del fraccionamiento o "clean-up" del estándar No.4

En la figura A 1.10 se observa con más claridad que los HPA (criseno, antraceno y dibenzo(a,h)antraceno) fueron eluidos prácticamente con los primeros dos mililitros de eluyente, al adicionar los 2mL de muestra estándar, ya que ésta tiene como disolvente el mismo con el que se eluye. Asimismo se puede observar que el fenol, dimetil fenol y naftol, comenzaron a eluirse al pasar de 4 a 6 mL de diclorometano, es por esta razón que al recuperar toda la primera fracción en un sólo vial existe una mezcla con los HPA. En cuanto a los compuestos que se obtienen en la segunda fracción se observa que al agregar 2 mL ya han sido eluidos con un gran porcentaje de recuperación. Una forma de lograr que en la primera fracción del estándar solo se eluyeran los HPA sin necesidad de cambiar el eluyente, sería ajustando el volumen de elución, lo cual no es viable. Cuando se tenga que trabajar con una muestra más compleja se tendrían que ajustar nuevamente. Por lo que se deben encontrar las condiciones en las cuales la columna sea selectiva no importando el volumen de elución.

Tabla A 1.14 Seguimiento del "clean up" del estándar Num. 4 en sílica gel desactivada al 6% y eluido con 10 mL de diclorometano y 6 mL ácido oxálico 0.17M en metanol

mL	Fenol	Dimetil fenol	Ácido benzóico	Naftol	Ácido hidróxi benzóico	Ácido dihidróxi bezóico	Antraceno	Ácido 1 hidróxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
0										
2	0.00	32.20	0.00	0.00	0.00	0.00	64.22	0.00	64.86	52.62
4	59.19	96.06	1.99	82.84	0.00	0.00	118.16	0.00	116.50	90.66
6	117.21	97.67	1.99	91.67	0.00	0.00	119.96	0.00	118.14	90.66
8	122.57	97.67	1.99	92.65	0.00	0.00	120.23	0.00	118.41	90.66
10	125.79	97.67	1.99	92.65	0.00	0.00	120.23	0.00	118.41	90.66
12	127.11	108.94	78.68	92.65	77.16	43.39	120.23	47.54	118.41	90.66
14	127.29	108.94	81.46	92.65	77.16	44.63	120.23	49.18	118.41	90.66
16	127.41	108.94	81.46	92.65	77.16	44.63	120.23	49.18	118.41	90.66

A 1.11 Experimento 7 Elección de la 1ª fracción de estándar Num. 4 utilizando hexano y diclorometano.

Por lo que se ha observado en los experimentos anteriores se puede deducir que la selectividad del proceso del "clean-up" no depende tanto de la polaridad de columna cromatográfica (desactivación con agua), como del eluyente utilizado, tal como lo muestra el experimento 6. Por esta razón y buscando cambiar las condiciones fraccionamiento la primera fracción es eluida con la mezcla (hexano/diclorometano) pensando que al eluir con un disolvente menos polar se recuperaran inicialmente los compuestos HPA como se sugiere en la norma UNEP/IAEA (1992), y después eluir con diclorometano los compuestos con polaridad intermedia (grupo fenilo), y la tercera fracción con ácido oxálico, de esta forma se tienen tres fracciones. Previendo que los HPA sean eluidos con los 2mL de diclorometano en que esta disuelto el estándar, antes de agregar este a la columna se hace una mezcla (1:1) con hexano, de modo que la concentración de los analitos en el estándar es la mitad de la inicial, lo cual se contempla al momento de hacer la relación de porcentaje, asimismo en otra columna se sigue el procedimiento señalado hasta el experimento 5 con el fin de comparar los

resultados los que se muestra en la tabla A 1.15. Los resultados indican que aun cuando la primera fracción es eluida con una mezcla hexano/diclorometano, los HPA quedan mezclados con los compuestos con grupo fenilo como se observa en la figura A 1.11. Una posible explicación a esto es el hecho de que en el acondicionamiento de la columna la sílica gel se adiciona diclorometano el cual permanece al agregar la mezcla hexano/diclorometano, ello facilita la elución de ambos grupos en la primera fracción.

Tabla A 1.15 "Clean up" de 2 mL del estándar Nun. 4 en columna con 0.5 g de sílica gel 6% 1 Fracción Hexano:CH₂Cl₂ 10mL, 2 Fracción CH₂Cl₂ 10ml, and 3F metanol/ácido oxálico 10mL, comparado con "Clean up" de 2 mL del estándar con 2 fracciones: 1ªFracción diclorometano, 2ª fracción Metanol/Ácido oxálico

mL	Fenol	Dimetil fenol	Acido benzóico	Naftol	Acido hidróxi benzóico	Acido dihidróxi bezoico	Antraceno	Acido 1 hidróxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
0.5 6% silicagel 1F hexano: CH ₂ Cl ₂	82.29	93.92	3.18	88.73	0.00	0.00	97.92	0.00	97.02	97.29
0.5 6% silicagel 2F CH ₂ Cl ₂	17.91	0.00	0.00	1.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.5 6% silicagel 3F Met-OH Ácido Oxálico	0.77	8.05	42.91	0.00	50.62	17.36	0.00	2.73	0.00	0.00
0.5g 6% silicagel 1F CH ₂ Cl ₂	125.79	97.67	1.99	92.65	0.00	0.00	120.23	0.00	118.41	90.66
0.5g 6% silicagel 2F Met-OH Ácido Oxálico	1.63	11.27	79.47	0.00	77.16	44.63	0.00	49.18	0.00	0.00

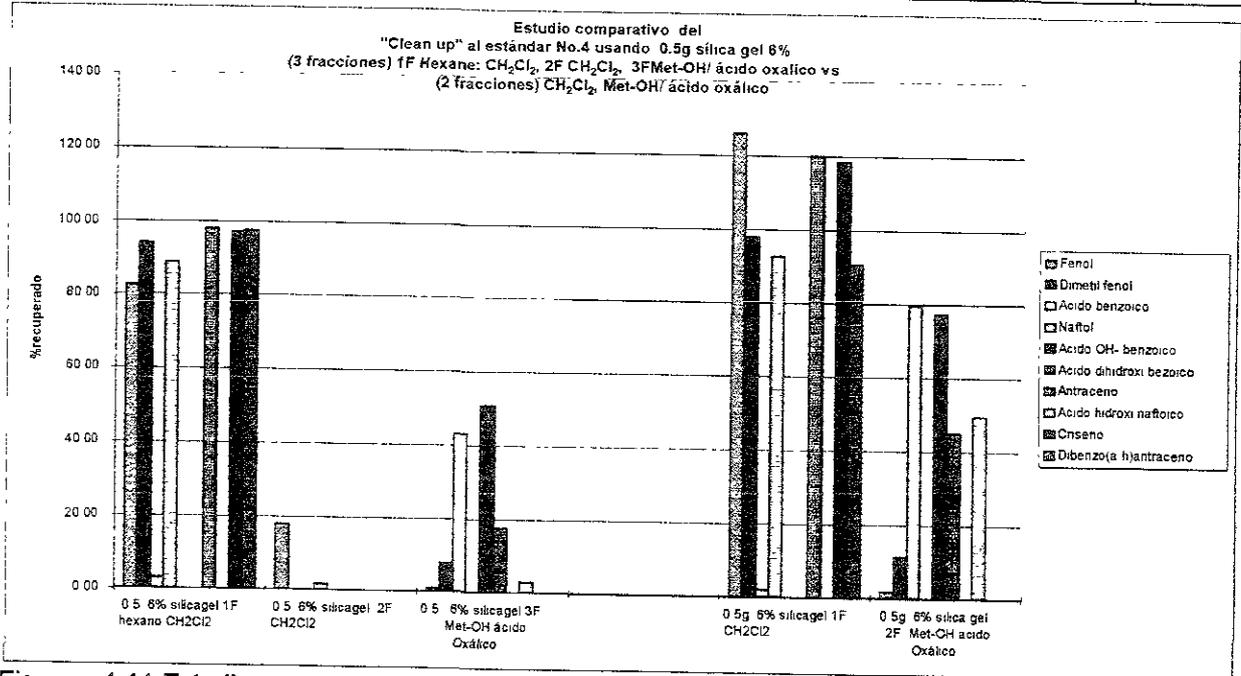


Figura a 1.11 Estudio comparativo del fraccionamiento del estándar Num.4 con 3 y 2 fracciones

Aún cuando en este experimento no se hayan logrado los resultados esperados, sirvió para hacer evidente que para que exista selectividad en el proceso de "Clean-up" se debe eliminar en lo posible el uso del diclorometano, tanto en la preparación de la columna cromatográfica como en el disolvente del estándar, sin embargo no se debe olvidar que el hecho de utilizar diclorometano en la solución estándar es con el propósito de simular al máximo a una muestra real, la cual proviene de un proceso de extracción con diclorometano. Además está el hecho de que este disolvente puede diluir a compuestos polares y no polares, por lo que si se elimina éste en su totalidad del estándar y se agrega en su lugar hexano, lo más probable es que los compuestos polares no se disuelvan. Por esta razón se lleva a cabo el siguiente experimento con el fin de encontrar hasta donde es posible eliminar al diclorometano del estándar y sustituirlo con hexano.

A 1.12 Experimento 8. Detección del volumen mínimo de diclorometano en la evaporación, para cambio de disolvente a hexano

El propósito fundamental en este experimento fue encontrar el volumen mínimo de diclorometano en la solución estándar con el que seguían disueltos los compuestos polares. Así 8 mL del estándar Num.4 se evaporaron en el rotoevaporador hasta que se observó la precipitación, lo cual sucedió al evaporar más de 6 mL. Con el fin de conocer el volumen la solución evaporada fue aforada en un matraz de 2 mL con diclorometano, observando que a este volumen no existía precipitación, esta solución se agregaría hexano hasta completar 8 mL, de ésta se tomaron tres muestras para su utilización y análisis cromatográfico respectivo. Las concentraciones obtenidas se compararon con los de una muestra de estándar Num. 4 en diclorometano en la tabla A 1,16 los resultados se

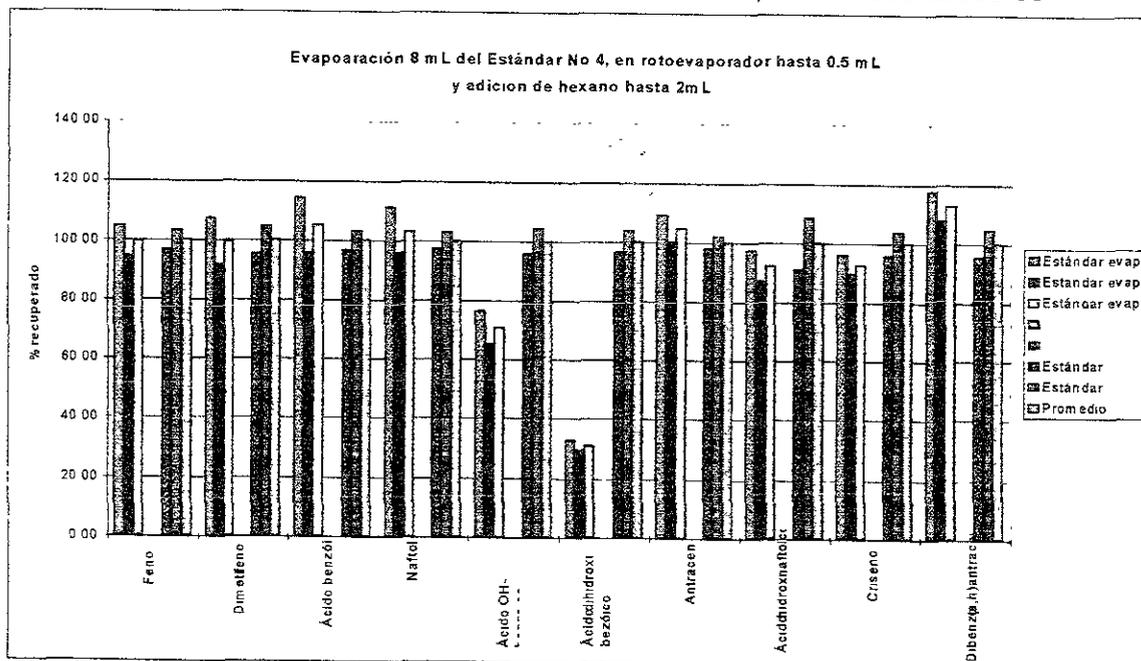


Figura A 1.12 8 mL de estándar Num.4 evaporados hasta 2 mL y aforados posteriormente hasta 8 mL con hexano.

muestran en forma de porcentaje recuperado. El resultado anterior se calcula al comparar el valor obtenido por el cromatógrafo contra el valor real del estándar tal como se observa en la figura A 1.12. Con los resultados obtenidos se puede observar que la sustitución del diclorometano por hexano es factible para 6 de los 7 posibles metabolitos del estándar, ya que para el ácido dihidróxi benzoico sólo se puede recuperar un 30 %. Sin embargo, para los otros 6 posibles metabolitos y 3 HPA el porcentaje de recuperación es aceptable.

Tabla A 1.16 Porcentaje de recuperación de 8 mL de estándar Num. 4 evaporado hasta 2 mL, adicionando hexano hasta 8 mL.

mL	Fenol	Dimetil fenol	Ácido benzoico	Naftol	Ácido hidróxi benzoico	Ácido dihidróxi benzoico	Antraceno	Ácido 1 hidróxi naftoico	crseno	Dibenzo (a,h) antraceno
Estándar evaporado	104.64	107.43	114.43	110.97	76.55	32.82	109.20	97.25	95.95	117.69
Estándar evaporado	94.57	91.70	95.63	95.82	64.97	29.47	100.08	87.17	89.71	107.88
Estándar evaporado	99.61	99.57	105.03	103.39	70.76	31.14	104.64	92.21	92.83	112.79
Estándar	97.01	95.50	96.85	97.28	95.84	96.44	97.92	91.32	95.87	95.38
Estándar	103.13	104.72	103.39	102.66	104.21	103.80	102.08	108.52	104.10	104.62
Promedio Estándar	100.07	100.11	100.12	99.97	100.03	100.12	100.00	99.92	99.98	100.00

A 1.13 Experimento 9. Fraccionamiento del estándar num. 4, utilizando hexano para la 1ª fracción, 2ª fracción diclorometano y la 3ª fracción con metanol/ácido oxálico.

En el experimento anterior se logró determinar la cantidad mínima de diclorometano que debe permanecer en el estándar, para mantener en solución los analitos de interés, en este experimento se plantearon los cambios que se deben efectuar en el proceso de "Clean -up", con el propósito de evitar en lo posible el uso de diclorometano al eluir la primera fracción, esperando con esto, que sólo se eluyeran los HPA. Para lograr esto se preparó la columna de fraccionamiento con el procedimiento señalado pero el disolvente con el que se preparó la suspensión de sílica -gel fue hexano en lugar de diclorometano, de esta forma la columna se acondicionó con hexano hasta el momento de agregar el estándar. En cuanto a la evaporación de diclorometano del estándar, en esta ocasión, cada 2 mL de estándar evaporaron hasta 0.5 mL usando el rotoevaporador para posteriormente aforar a 2 mL con hexano y para la concentración de cada uno de los componentes en solución, antes de fraccionarla. Se tomó una muestra de 70 µL para analizarla en el cromatógrafo por triplicado antes de hacer el fraccionamiento. Los resultados de este cambio de disolvente se muestran en la tabla A 1.17 y se ilustran en la figura A 1.13, el porcentaje de recuperación se obtiene comparando las muestras evaporadas contra muestras del estándar Num. 4 sin ningún tratamiento las cuales son comparadas a su vez con el valor teórico real.

Tabla A 1.17 Evaporación de 2mL de estándar Num.4 hasta 0.5mL y aforando con hexano hasta 2 mL, sililización 70.µL de estándar en hexano+ 70µL agente sililizante.

mL	Fenol	Dimetil fenol	Ácido benzóico	Naftol	Acido hidróxi benzóico	Acido dihidróxi benzóico	Antraceno	Acido 1 hidróxi naftóico	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
Estándar evap	94.09	92.78	95.22	97.28	88.77	20.76	101.38	92.51	98.05	101.92
Estándar evap	95.64	97.67	100.94	99.73	93.27	56.92	105.83	106.74	105.44	114.04
Estándar evap	94.86	95.23	98.08	98.50	91.02	38.84	103.61	99.63	101.74	107.98
Estándar	97.94	100.38	104.21	98.75	97.77	92.42	95.22	80.06	95.16	84.42
Estándar	100.74	100.38	97.26	100.22	101.63	103.80	102.02	105.56	101.25	105.00
Estándar	101.36	99.84	98.49	100.70	100.99	103.13	102.68	114.45	103.62	110.00
Promedio	100.01	100.20	99.99	99.89	100.13	99.79	99.97	100.02	100.01	99.81

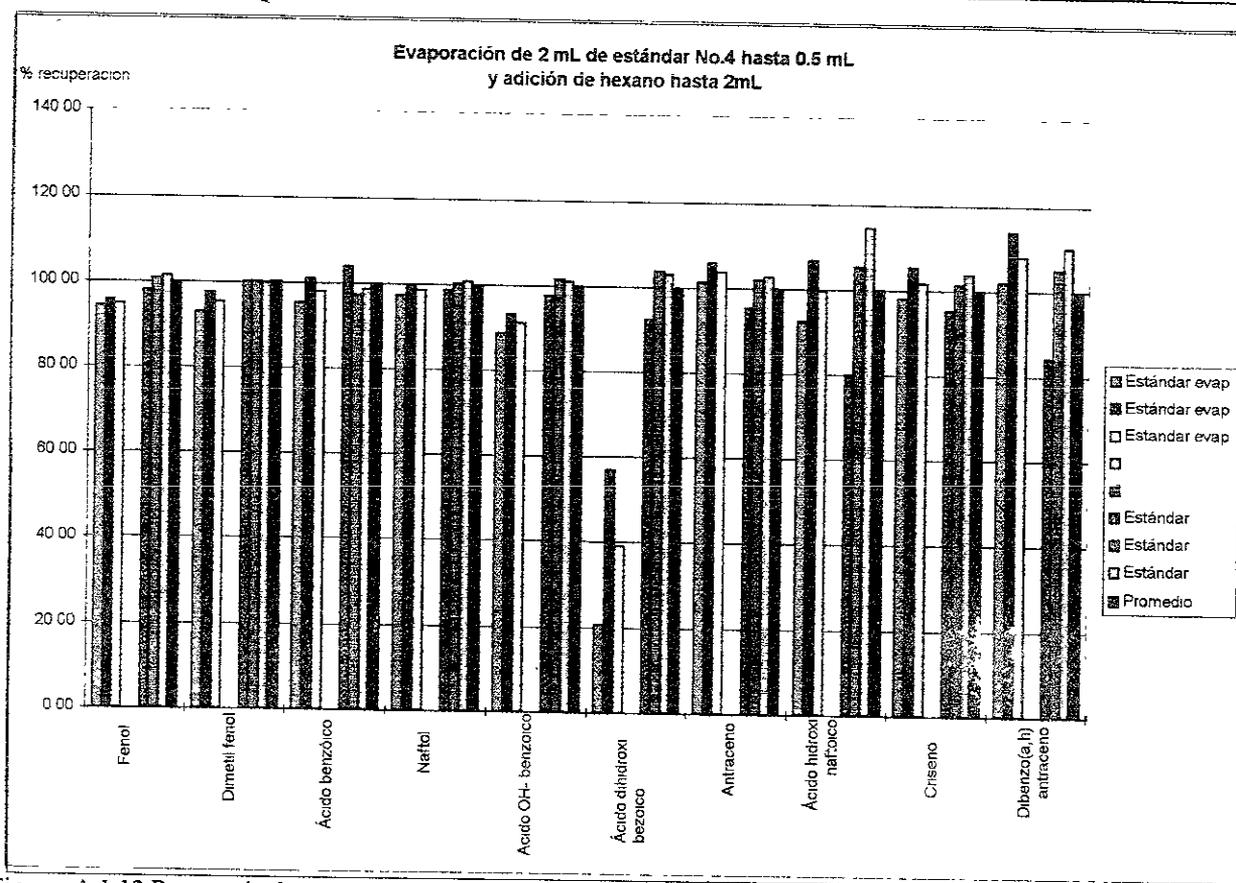


Figura A 1.13 Porcentaje de recuperación del estándar No.4 después de evaporar y disolver en hexano

Con referencia al proceso de fragmentación del estándar este experimento, se realizó con las siguientes condiciones, la primera fracción fue eluida con hexano, la segunda fracción con diclorometano, y la tercera con metanol/ácido oxálico, en dos columnas desactivadas al 6% y 8%. Los resultados se muestran en la tabla A 1.18 y se ilustran en la figura A 1.14. Los resultados del cambio de disolvente en el estándar, muestran que ésta contiene a los componentes del estándar en un

porcentaje muy similar que la solución inicial. Lo anterior garantiza la utilización del procedimiento en los siguientes experimentos donde así se requiera.

Tabla A 1.18 0.5 g sílica gel 1F hexano, 2F CH₂Cl₂, 3F MetOH ácido oxálico 0.17M. expresado como porcentaje recuperado.

mL	Fenol	Dimetil fenol	Ácido benzóico	Naftol	Ácido hidróxi benzóico	Ácido dihidróxi bezóico	Antraceno	Ácido 1 hidróxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
8% 1F hexano eluido 5mL	0.23	42.74	1.67	0.00	0.00	0.00	90.56	0.00	91.90	81.57
8% 2F CH ₂ Cl ₂ eluido 4ml	84.04	40.46	1.25	80.40	0.00	0.00	3.56	0.00	3.92	0.00
8% 3F Ácido oxálico 2ml	3.18	12.54	82.50	0.00	89.05	63.62	0.43	98.81	0.54	0.00
6% 1F hexano eluido 5ml	0.37	31.34	0.00	0.00	0.00	0.00	89.85	0.00	88.44	81.57
6% 2F CH ₂ Cl ₂ eluido 4ml	89.51	50.14	1.67	84.37	0.00	0.00	0.02	0.00	0.35	0.00
6% 3F Ácido oxálico 2ml	2.76	10.83	70.00	0.00	74.91	46.88	0.00	77.38	0.00	0.00

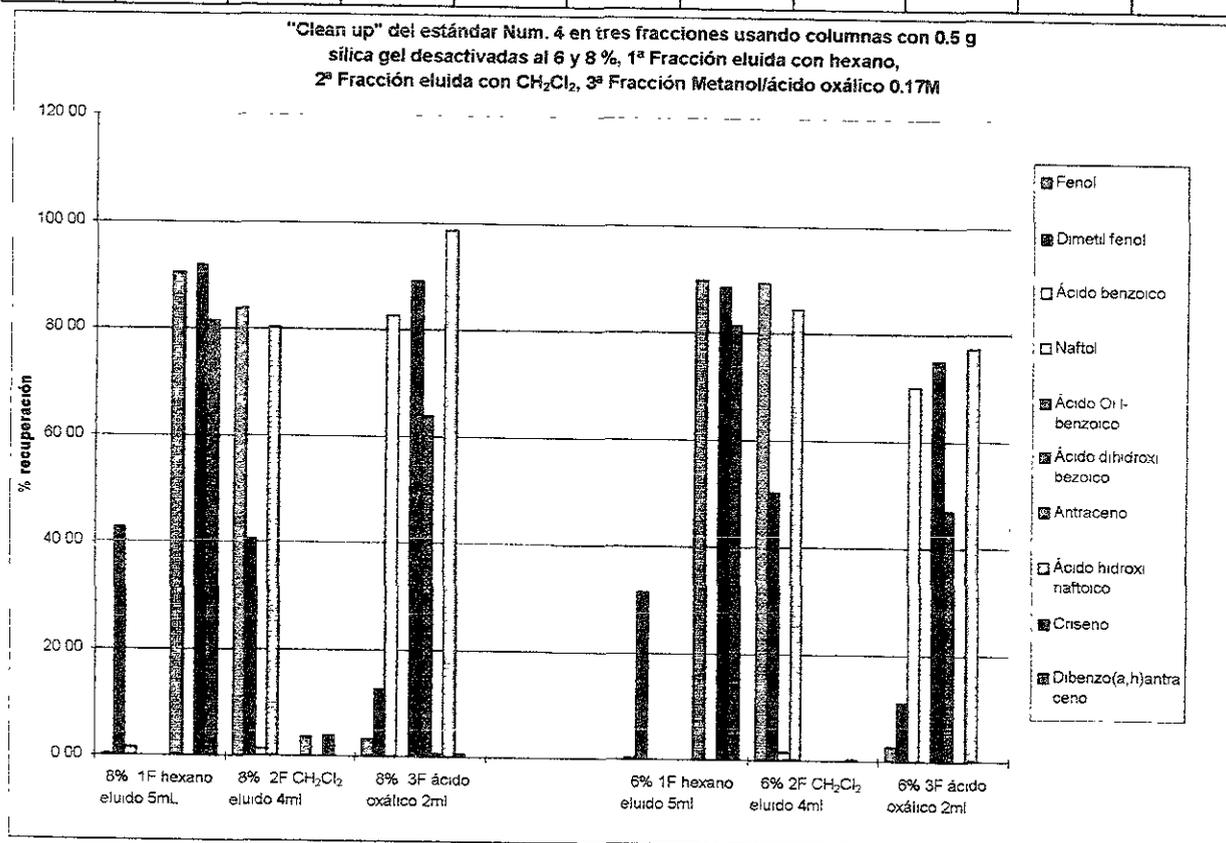


Figura A 1 14 Fraccionamiento de estándar Num.4 en tres fracciones.

Tal como se observa en la figura A 1.14, al eluir la primera fracción con hexano la selectividad que se logra se acerca más al objetivo deseado de tener en la primera

fracción a los HPA y en las siguientes a los otros compuestos, sin embargo, el proceso no es satisfactorio, ya que el dimetil fenol se eluye en la 1ª y 2ª fracción. Esto es fácil de explicar si recordamos el seguimiento del fraccionamiento realizado en el experimento 4, el cual muestra que algunos compuestos del grupo fenilo son eluidos con cantidades mínimas de diclorometano, en este caso se puede pensar que el compuesto es eluido casi instantáneamente con el cambio de eluyente es decir se encuentra en el límite, por lo que una parte queda en la primera fracción y otra en la segunda. Ello implica establecer en qué momento tiene que ser retirado el vial que recolecta la primera fracción.

A 1.14 Experimento 10. Detección de las condiciones óptimas para fraccionar el estándar Num 5, polaridad de silica gel y eluyente para la segunda fracción.

Con los experimentos anteriores se logró establecer un criterio para lograr la selectividad adecuada en la primera fracción del proceso, la cual depende del eluyente utilizado, por lo que en los experimentos sucesivos se buscará optimizar el procedimiento. Aún cuando, el experimento anterior deja en claro que la primera fracción tiene que ser eluida con hexano, con todo lo que esto implica en cuanto a la preparación de la columna y del estándar, falta encontrar las condiciones óptimas de desactivación de la silica gel y la selección de eluyentes para la segunda fracción, siendo este el objetivo principal del experimento. Con el propósito de contar con una muestra lo más representativa de una muestra real, se prepara un nuevo estándar que incluye un grupo cetona, denominado Estándar Num.5 el cual, usa como disolvente diclorometano, por lo que de acuerdo con lo establecido en el experimento anterior, antes fraccionarlo se debe evaporar el 75% del diclorometano y sustituirlo por hexano, los porcentajes de recuperación en este caso se muestran en la tabla A 1.19 y se ilustran en la figura A 1.15.

Tabla A 1.19 Porcentaje recuperado de la evaporación del estándar Num. 5, al cambiar el diclorometano por hexano.

mL	Fenol	Dimetil fenol	Ácido benzóico	Benzo quinona	Naftol	Ácido hidróxi benzóico	Ácido dihidróxi benzóico	Antraceno	Ácido 1 hidróxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
Estándar	105	101.69	103.68	92.83	101.47	104.50	105.44	102.94	106.00	102.55	102.40
Estándar	100.	104.41	102.66	105.22	103.30	102.09	101.26	101.83	104.52	99.79	103.13
Estándar	94.2	94.24	93.97	101.74	94.74	93.25	92.89	95.23	89.70	97.61	94.47
Promedio	100.	100.11	100.10	99.93	99.84	99.95	99.86	100.00	100.07	99.99	100.00
Estándar evaporado	91.0	84.75	85.29	125.00	86.19	62.70	9.21	57.19	85.99	92.82	93.27
Estándar evaporado	96.4	94.24	101.12	144.13	99.63	61.09	28.45	103.02	102.30	103.59	107.93
Estándar evaporado	112	115.25	108.78	154.13	110.64	81.99	17.57	118.90	114.90	119.45	129.57
Estándar evaporado	101.	98.31	100.10	154.57	99.63	61.90	6.69	106.51	94.89	106.70	110.10
Promedio estándar evaporado	100.	98.14	98.83	144.46	99.02	66.92	15.48	96.41	99.52	105.64	110.22

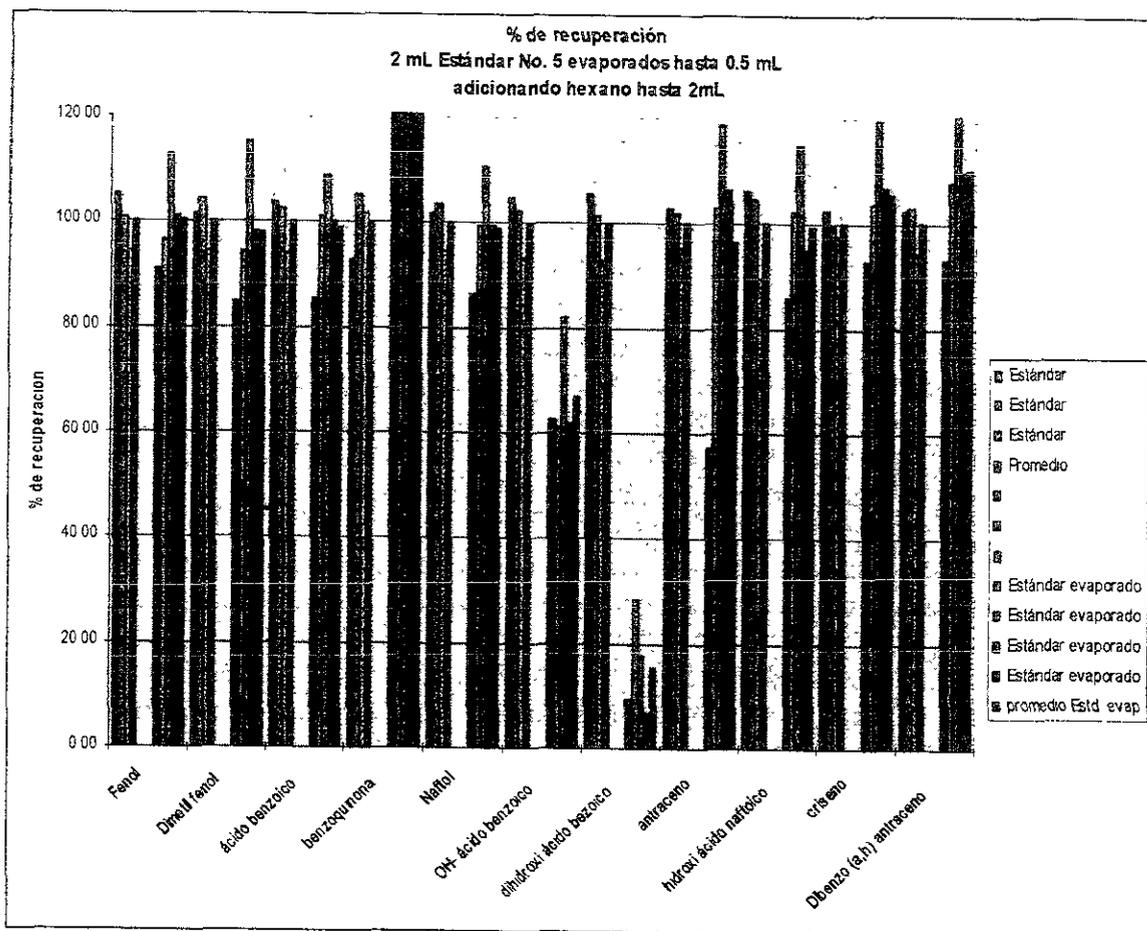


Figura A 1 15 porcentaje recuperado al cambio de disolvente en el estándar Num.5

Los resultados del estándar Num. 5 después de sustituir el disolvente muestran una recuperación menor que la obtenida para el estándar Num.4, lo cual se debe a un proceso de interferencia provocado por la adición del grupo cetona, no obstante esta reducción en el porcentaje de recuperación para algunos componentes del estándar, éste cumple con los requisitos suficientes para realizar el siguiente experimento. Con el fin de observar cual es la influencia que tiene la desactivación de la sílica gel en la eficiencia de recuperación se realizó por triplicado el "clean-up" del estándar Num.5 en hexano, utilizando sílica gel desactivada al 0% realizando el procedimiento estipulado en el experimento anterior para la primera fracción en las tres columnas, la segunda fracción se eluyó con ácido oxálico para dos columnas y en la columna restante la segunda fracción se eluyó con diclorometano y la tercera fracción en esta última con metanol /ácido oxálico, este procedimiento se llevó a cabo también para sílica gel desactivada al 3,6 y 8%. Los resultados obtenidos se presentan en las tablas A 1.20 a 1.23 y en las figuras A 1.16 a 1.19.

Tabla A 1.20 "Clea-up" del estándar Num.5 en columna con silica gel desactivada al 0 %

mL	Fenol	Dimetil fenol	Acido benzóico	Benzo quinona	Naftol	Acido hidróxi benzóico	Acido dihidróxi bezóico	Antraceno	Acido 1 hidróxi naftóico	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
SG 0% 1F a	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	118.06	0.00	107.97	104.69
SG 0% 2F a	86.34	83.59	86.30	100.00	19.75	76.88	26.82	1.32	94.60	1.68	3.27
SG 0% 2F(a) 70:100	85.65	76.54	86.01	111.31	44.80	117.29	116.18	2.49	84.60	4.07	9.11
SG 0% 1F b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	47.42	0.00	43.44	25.08
SG 0% 2F b	76.56	69.08	78.55	77.76	30.86	112.91	58.66	2.43	71.51	3.69	7.42
SG 0% 1F c	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	91.66	0.00	82.67	69.14
SG 0% 2F c CH ₂ Cl ₂	79.49	84.97	2.58	35.08	9.26	0.00	0.00	1.81	0.00	2.43	5.67
SG 0% 3F c Acido oxálico	1.16	11.05	70.80	57.22	0.00	64.86	29.33	0.00	68.53	0.00	0.00

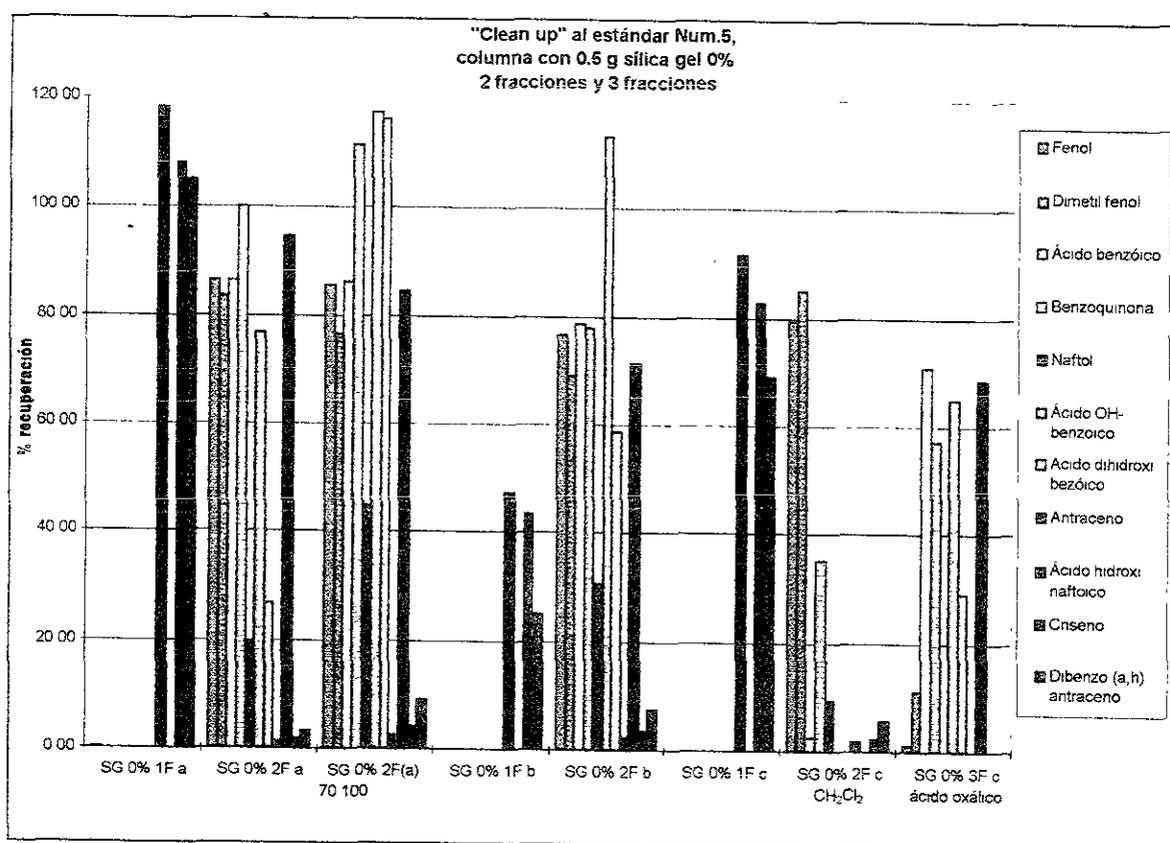


Figura A 1 16 Fraccionamiento del estándar Num-5, en las muestras a y b la primera fracción con hexano y la segunda con metanol / ácido oxálico, la acotación 70:100 significa la relación de la reacción de sililización. La muestra c se fraccionó en tres con hexano, diclorometano y ácido oxálico. En todos los casos se utilizó silica gel desactivada al 0%.

Tabla A 1.21 "Clea-up" del estándar Num.5 en columna con sílica gel desactivada al 3 %

mL	Fenol	Dimetil fenol	Acido benzoico	Benzo quinona	Naftol	Acido hidróxi benzoico	Acido dihidróxi benzoico	Antraceno	Acido 1 hidróxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
SG 3% 1F a	0.11	0.00	4.13	0.00	0.00	0.00	0.00	97.43	0.00	81.51	56.49
SG 3% 2F a	72.37	68.39	60.47	87.09	3.70	62.46	31.01	3.25	61.08	6.55	14.39
SG 3% 2F(a) 70:100	80.44	66.29	59.27	112.02	4.80	54.14	50.00	2.72	65.01	5.99	13.07
SG 3% 1F b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	84.98	0.00	74.87	58.89
SG 3% 2F b	45.52	29.71	32.56	46.53	0.00	34.83	10.06	0.62	18.62	2.57	3.05
SG 3% 1F c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	49.72	0.00	42.69	21.16
SG 3% 2F c	71.26	60.79	63.57	88.55	2.47	60.06	22.63	2.06	58.85	8.60	17.88
SG 3% 1F d	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	87.29	0.00	69.58	3.27
SG 3% 2F d	63.58	71.16	2.58	55.04	0.00	0.00	0.00	1.98	0.00	15.85	66.52
SG 3% 3F d	2.98	8.29	52.20	68.31	0.00	45.65	3.35	0.00	2.23	0.00	0.00

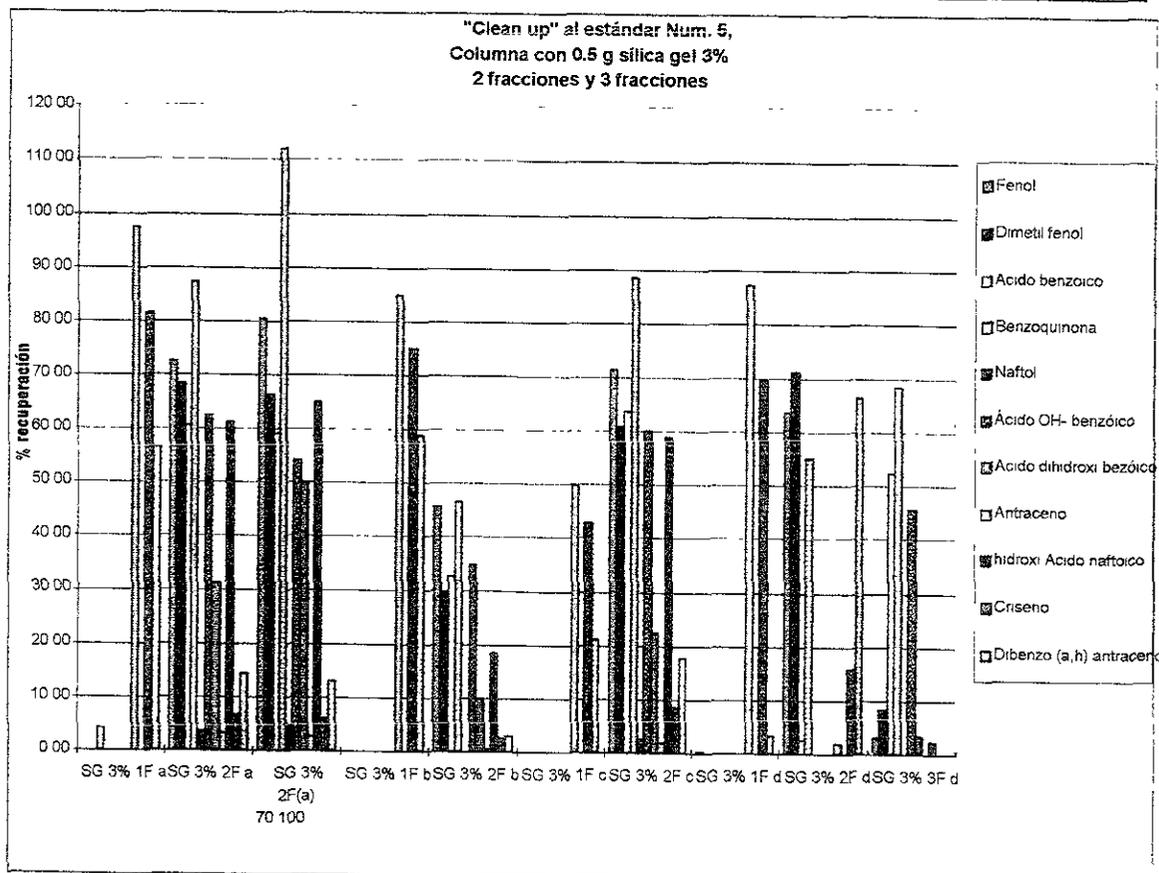


Figura A 1.17 Fraccionamiento del estándar Num-5, en las muestras a, b y c la primera fracción con hexano y la segunda con metanol / ácido oxálico , la acotación 70:100 significa la relación de la reacción de sililización. La muestra d se fraccionó en tres con hexano, diclorometano y ácido oxálico. En todos los casos se utilizó sílica gel desactivada al 3%.

Tabla A 1.22 "Clea-up" del estándar Num.5 en columna con silica gel desactivada al 6 %

mL	Fenol	Dimetil fenol	Acido benzóico	Benzo quinona	Naftol	Acido hidróxi benzóico	Acido dihidróxi bezoico	Antraceno	Acido 1 hidróxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
SG 6% 1F a	0.00	39.38	0.00	3.44	0.00	0.00	0.00	94.13	0.00	80.52	78.95
SG 6% 2F a	73.47	22.80	62.02	52.75	24.07	82.88	47.77	1.40	52.14	1.59	0.00
SG 6% 1F b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	89.43	0.00	80.90	65.65
SG 6% 2F b	41.21	26.94	31.01	39.97	0.00	31.23	5.03	0.70	16.39	0.84	1.74
SG 6% 1F c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	88.69	0.00	80.99	71.10
SG 6% 2F c	71.10	66.32	72.87	75.78	15.43	103.30	49.44	1.65	72.25	1.96	2.40
SG 6% 2F c 70:100uL	85.88	64.92	76.57	100.00	20.80	95.86	83.82	1.52	75.20	1.91	2.33
SG 6% 1F d	0.00	48.36	0.00	32.85	0.00	0.00	0.00	89.80	0.00	79.03	72.19
SG 6% 2F d CH ₂ Cl ₂	76.51	21.42	0.00	63.96	22.84	0.00	0.00	1.28	0.00	1.64	0.00
SG 6% 3F d Ácido oxálico	0.17	10.36	66.67	39.59	0.00	85.29	17.60	0.00	26.82	0.00	0.00

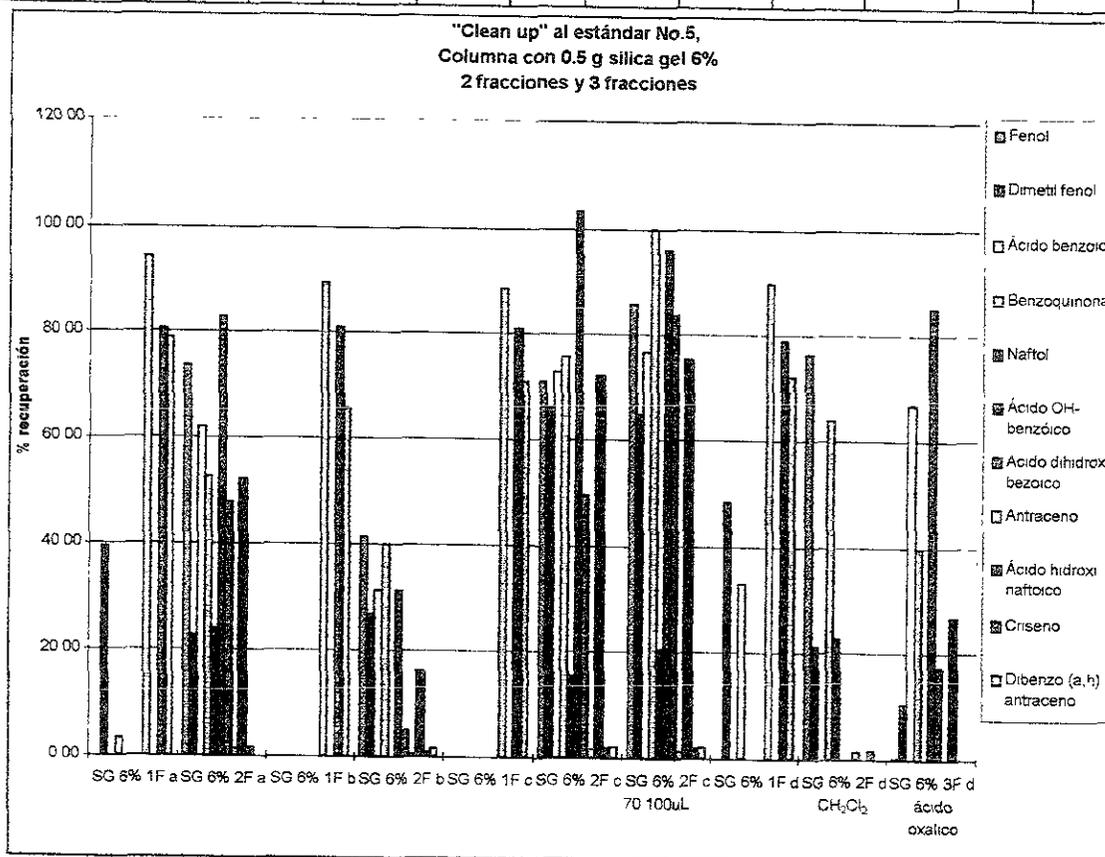


Figura A 1.18 Fraccionamiento del estándar No-5, en las muestras a, b y c, la primera fracción es con hexano y la segunda con metanol / ácido oxálico, la acotación 70:100 significa la relación de la reacción de sililización. La muestra "d" se fraccionó en tres con hexano, diclorometano y ácido oxálico. En todos los casos se utilizó silica gel desactivada al 6%.

Tabla A 1.23 "Clea-up" del estándar Num.5 en columna con sílica gel desactivada al 8 %

mL	Fenol	Dimetil fenol	Acido benzóico	Benzo quinona	Naftol	Acido hidróxi benzóico	Acido dihidróxi bezóico	Antraceno	Acido 1 hidróxi naftoico	Cnseno	Dibenzo (a,h) antraceno
SG 8% 1F a	0.00	11.74	0.00	2.12	0.00	0.00	0.00	33.00	0.00	29.09	17.23
SG 8% 2F a	55.90	15.89	37.21	38.85	27.78	37.24	18.44	0.45	0.00	0.51	0.00
SG 8% 1F b	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	47.46	0.00	42.51	27.92
SG 8% 2F b	35.35	19.34	59.43	54.07	2.47	62.46	7.54	2.35	17.13	1.73	0.00
SG 8% 1F c	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	86.84	0.00	79.31	72.19
SG 8% 2F c	68.94	60.79	72.87	78.49	3.09	78.08	33.52	1.11	71.51	1.08	0.00
SG 8% 2F c 70:100uL	77.37	65.60	78.67	105.00	4.00	80.08	60.29	1.05	79.90	1.08	0.00

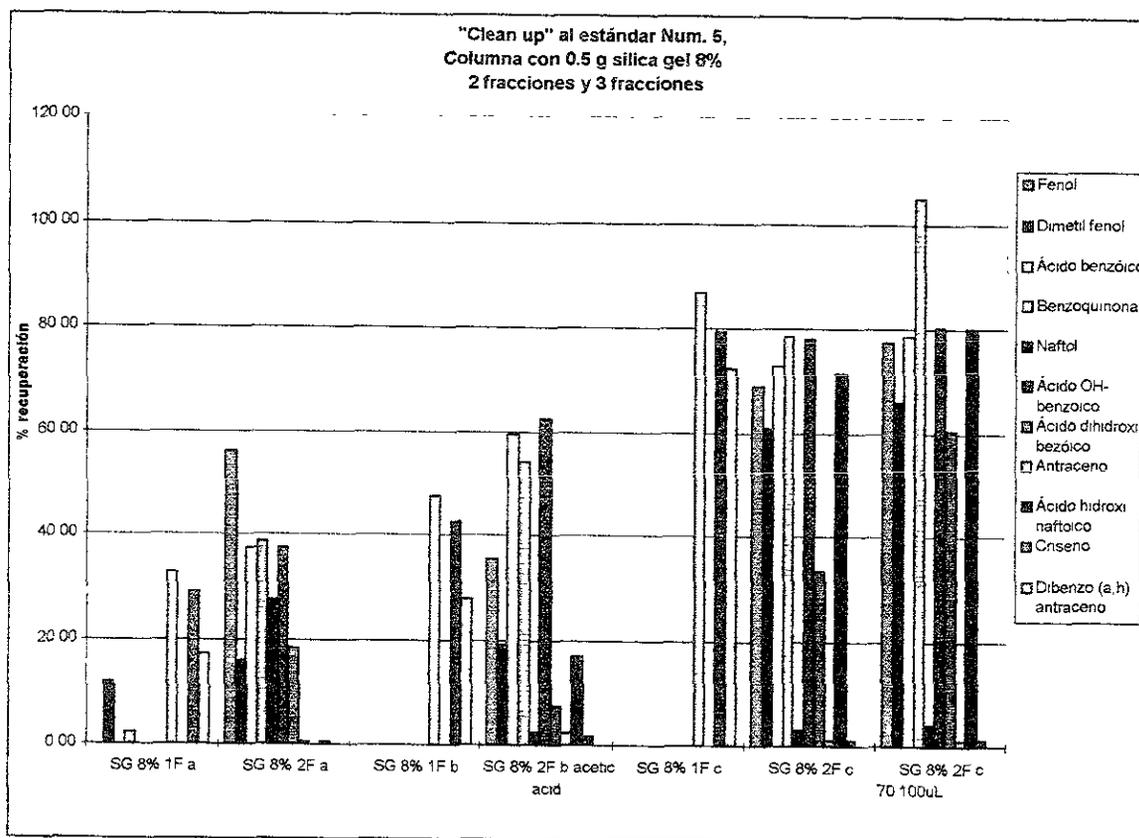


Figura A 1.19 Fraccionamiento del estándar Num.5, en las muestras a, b y c la primera fracción es con hexano y la segunda con metanol / ácido oxálico, la acotación 70:100 significa la relación de la reacción de sililización. En todos los casos se utilizó sílica gel desactivada al 8%.

En todos los casos se observa que cuando la relación de sililización es de 70:100, se existió una eficiencia mayor, también se observa que la interferencia que causa la adición de la cetona, provoca que no exista una uniformidad en los resultados, de manera que no se puede hacer comparaciones con certeza. También se observa que la aparición de dimetilfenol en la primera fracción se debe al tiempo en que se cambia el vial para recolectar la segunda fracción más que a la

selectividad de la columna, pues para una misma desactivación en la sílica gel se observa que en unas muestras aparece y para otras no. Asimismo, queda claro que para no existe una significativa diferencia en la eficiencia de recuperación cuando se hace el fraccionamiento en tres. Por todo esto se procedió primero a repetir el experimento antes planteado pero en esta ocasión se retiró la cetona.

Experimento 11. Obtencion de las condiciones optimas para fraccionar una muestra real.

Con el propósito de encontrar las condiciones óptimas para realizar el fraccionamiento de una muestra que sea representativa de los posibles metabolitos que surgen de la biodegradación de tres HPA, se prepara el estándar Num. 6 que contiene 6 posibles metabolitos y tres HPA. Teniendo en cuenta todos los experimentos anteriores, se preparan seis columnas con 0.5 g de sílica gel para cada uno de los siguientes porcentajes de desactivación al 0, 3, 6 y 8%, la suspensión e sílica gel. La columna se llena suspendiendo la sílica en hexano al igual que el acondicionamiento. En cada una de las columnas se depositan 2 mL del estándar Num.6 el cual está inicialmente disuelto en diclorometano, por lo que es necesario cambiarlo por hexano utilizando el rotoevaporador a una temperatura de 30 C y 300 mmHg, hasta un volumen de 0.5 mL para aforar posteriormente a 2 mL con hexano. Para comprobar la eficiencia durante este proceso se toman muestras de 70 μ L de algunos de los estándares así preparados antes de ser fraccionados, los resultados se presentan en la tabla A 1.24

Tabla A 1.24 Evaporación de 2mL de Estándar Num. 6 hasta 0.5 usando rotoevaporador , y aforando con hexano hasta 2 mL.

mL	Fenol	Dimetil fenol	Acido benzóico	Naftol	Acido hidroxi benzóico	Antraceno	Acido 1 hidróxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
Estd Num 6 Hexano 1	103.90	103.75	107.63	109.63	86.21	105.24	97.42	100.48	103.76
Estd. Num 6 Hexano 2	97.40	96.84	99.80	105.53	58.98	101.81	93.44	99.24	102.60
Estd. Num. 6 Hexano 3	90.91	89.92	90.02	93.24	72.60	97.70	98.41	95.01	94.84
Estd. Num. 6 Hexano 4	102.97	103.75	103.72	108.61	77.13	103.83	102.39	102.08	106.28
Estd. Num 6 Hexano 5	102.04	100.79	98.83	104.51	74.41	105.48	95.43	101.60	104.54
Estd. Num. 6 Hexano 6	102.97	102.77	102.74	109.63	83.48	103.26	100.40	102.04	104.73
Estd. Num. 6 Hexano 7	87.20	85.97	86.11	93.24	68.97	94.40	93.44	92.30	91.35
Estd. No 6 hex. promedio.	98.20	97.68	98.41	103.48	74.54	101.68	97.27	98.96	101.16

Como se puede observar en la figura A 1.20 la eficiencia del proceso de evaporación es aceptable para la mayoría de los compuestos.

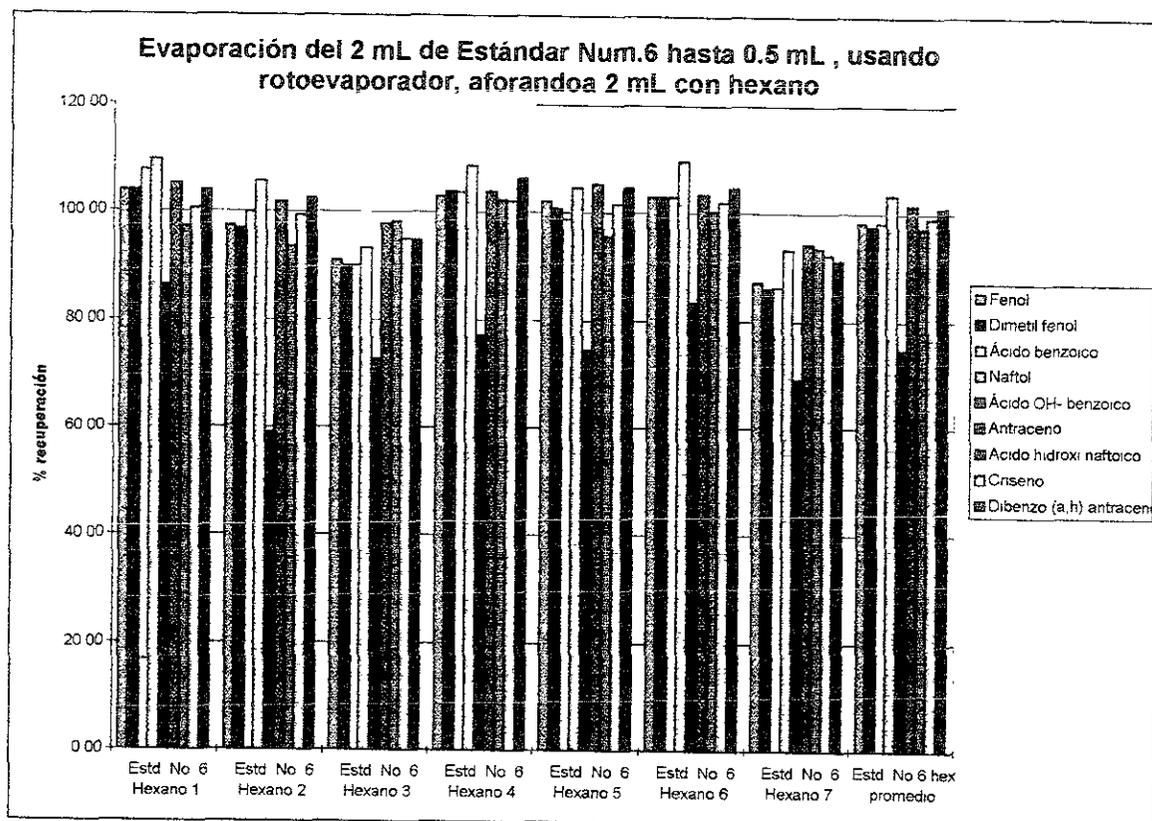


Figura A 1.20 Eficiencia del proceso de evaporación de estándar Num. 6

Una vez disuelto el estándar en hexano se procedió a fraccionamiento utilizando 7 mL de hexano para la primera fracción y 8 mL de ácido oxálico, tres columnas con a una concentración de 0.085M y las tres restantes con 0.17M. Los resultados para cada uno de los ensayos de silica gel deactivada a diferente porcentaje se presentan en las tablas A 1.25 a 1.28 en las figuras A 1.21 a 1.24.

Tabla A 1.25 Fraccionamiento del estándar Num.6 utilizando columnas con 0.5 g sílica gel 0% H₂O 1ª fracción eluida con 7mL hexano y la 2ª Fracción con Met-OH/ ácido oxálico 0.17M y 0.085%, porcentaje de recuperado.

mL	Fenol	Dimetil fenol	Acido benzoico	Naftol	Acido hidróxi benzoico	Antraceno	Acido 1 hidróxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
1F (1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	92.60	0.00	84.56	80.53
2F (1) Acido Oxálico 0.17M	52.90	50.58	7.95	56.44	60.87	0.36	54.16	4.44	3.26
1F (2)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	89.63	0.00	82.26	73.82
2F (2) Acido Oxálico 0.17M	72.74	69.80	77.56	75.25	62.09	0.99	76.64	6.73	8.24
1F (3)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	84.04	0.00	79.44	66.34
2F (3) Acido Oxálico 0.17M	67.07	62.72	68.61	70.30	52.35	1.59	70.51	5.85	8.63
1F (4)	0.94	0.00	0.00	0.00	0.00	93.83	0.00	86.05	79.95
2F (4) Acido Oxálico 0.085M	64.24	56.65	79.55	75.25	79.13	0.52	61.31	6.21	8.24
1F (5)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	93.67	0.00	89.56	80.53
2F (5) Acido Oxálico 0.085M	52.90	43.50	75.57	69.31	79.13	0.52	60.29	4.35	5.18
1F (6)	0.94	0.00	0.00	0.00	0.00	87.73	0.00	83.87	69.79
2F (6) Acido Oxálico 0.085M	58.57	49.57	70.60	67.33	75.48	0.36	69.49	5.60	8.24

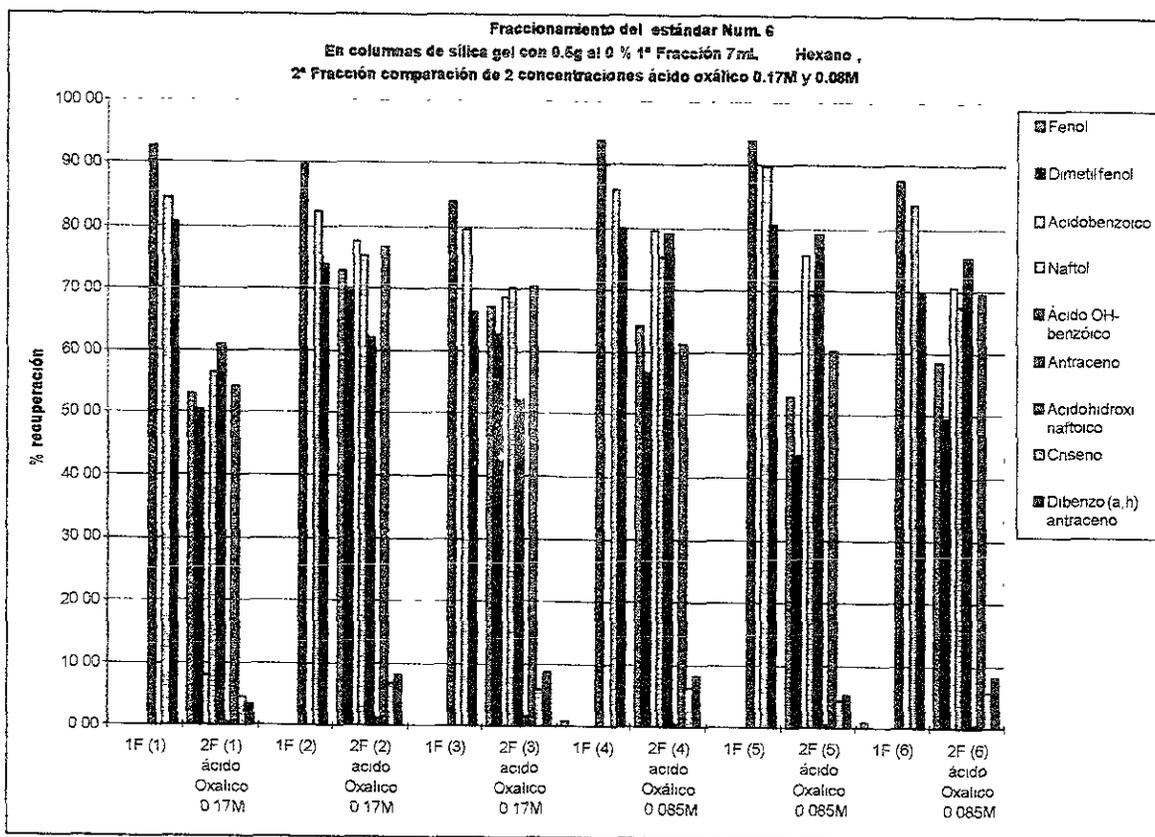


Figura A1.21 Fraccionamiento del Estándar Num.6 utilizando sílica gel desactivada al 0% y eluida la primera fracción con 7mL de hexano, para la segunda fracción tres muestra se eluyen con ácido oxálico 0.17 M y tres con 0.085M.

Tabla A 1.26 Fraccionamiento del estándar Num.6 utilizando columnas con 0.5 g sílica gel 3% H₂O 1ª fracción eluida con 7mL hexano y la 2ª Fracción con 2mL ácido oxálico 0.17M y 0.085%, porcentaje de recuperación.

mL	Fenol	Dimetil fenol	Ácido benzóico	Naftol	Ácido hidróxi benzóico	Antraceno	Ácido 1 hidróxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
1F (1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	93.79	0.00	92.46	85.89
2F (1) Ácido Oxálico 0.17M	66.13	61.71	68.61	74.26	60.87	0.75	66.42	1.77	3.64
1F (2)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	81.78	0.00	80.28	68.45
2F (2) Ácido Oxálico 0.17M	51.01	41.47	72.59	76.24	60.87	0.71	65.40	1.69	6.90
1F (3)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	87.37	0.00	86.13	79.57
2F (3) Ácido Oxálico 0.17M	73.68	67.77	76.56	77.23	69.39	0.20	83.80	0.32	1.53
1F (4)	0.00	13.15	0.00	0.00	0.00	94.78	0.00	95.44	92.60
2F (4) Ácido Oxálico 0.085M	67.07	49.57	77.56	79.21	79.13	0.20	68.47	0.32	0.00
1F (5)	0.00	7.08	0.00	0.00	0.00	85.35	0.00	83.35	78.80
2F (5) Ácido Oxálico 0.085M	58.57	44.51	68.61	76.24	64.52	0.00	60.29	0.00	0.00
1F (6)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	83.45	0.00	85.32	75.73
2F (6) Ácido Oxálico 0.085M	54.79	42.49	69.60	73.27	68.17	0.20	64.38	0.24	0.00

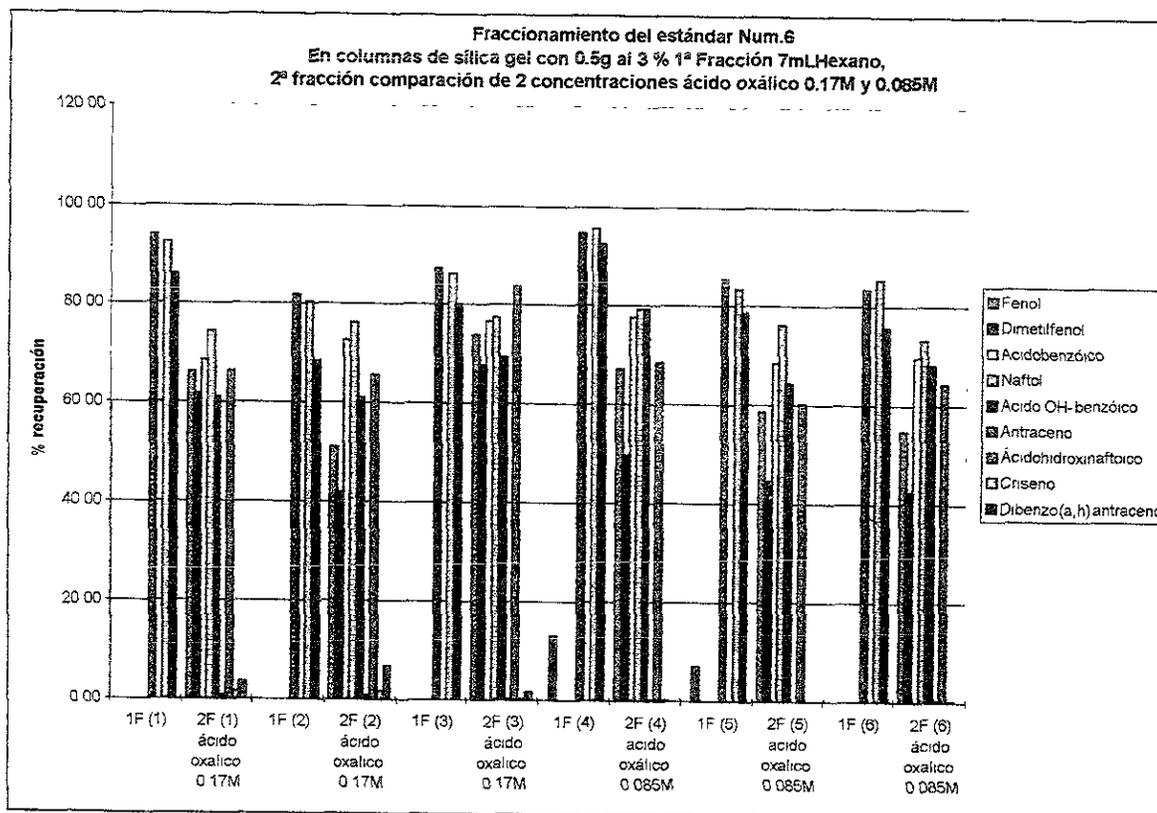


Figura A1.22 Fraccionamiento del Estándar Num.6 utilizando sílica gel desactivada al 3% y eluida la primera fracción con 7mL de hexano, para la segunda fracción tres muestra se eluyen con ácido oxálico 0.17 M y tres con 0.085M.

Tabla A 1.27 Fraccionamiento del estándar Num.6 utilizando columnas con 0.5 g silica gel 6% H₂O 1ª fracción eluida con 7mL hexano y la 2ª Fracción con Met-OH / ácido oxálico 0.17M y 0.085%, porcentaje de recuperado.

mL	Fenol	Dimetil fenol	Ácido benzoico	Naftol	Ácido hidróxi benzoico	Antraceno	Ácido 1 hidróxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
1F (1)	0.00	6.07	0.00	0.00	0.00	95.89	0.00	94.11	93.76
2F (1) Ácido Oxálico 0.17M	79.35	66.79	89.49	90.10	88.87	0.00	92.99	0.00	0.00
1F (2)	0.00	38.44	0.00	0.00	0.00	92.60	0.00	92.42	89.54
2F (2) Ácido Oxálico 0.17M	85.96	40.46	89.49	87.13	97.39	0.00	99.12	0.00	0.00
1F (3)	0.00	25.29	0.00	0.00	0.00	86.58	0.00	84.76	82.44
2F (3) Ácido Oxálico 0.17M	68.96	37.43	75.57	74.26	80.35	0.28	79.71	0.36	0.00
1F (4)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	82.10	0.00	79.40	78.80
2F (4) Ácido Oxálico 0.085M	55.74	42.49	74.57	75.25	65.74	0.28	63.36	0.40	0.00
1F (5)	0.00	47.54	0.00	0.00	0.00	94.78	0.00	93.27	91.65
2F (5) Ácido Oxálico 0.085M	51.01	15.17	72.59	72.28	71.83	0.00	64.38	0.16	0.00
1F (6)	0.00	9.10	0.00	0.00	0.00	86.78	0.00	86.13	80.33
2F (6) Ácido Oxálico 0.085M	39.68	23.27	61.65	65.35	59.65	0.00	56.20	0.28	0.00

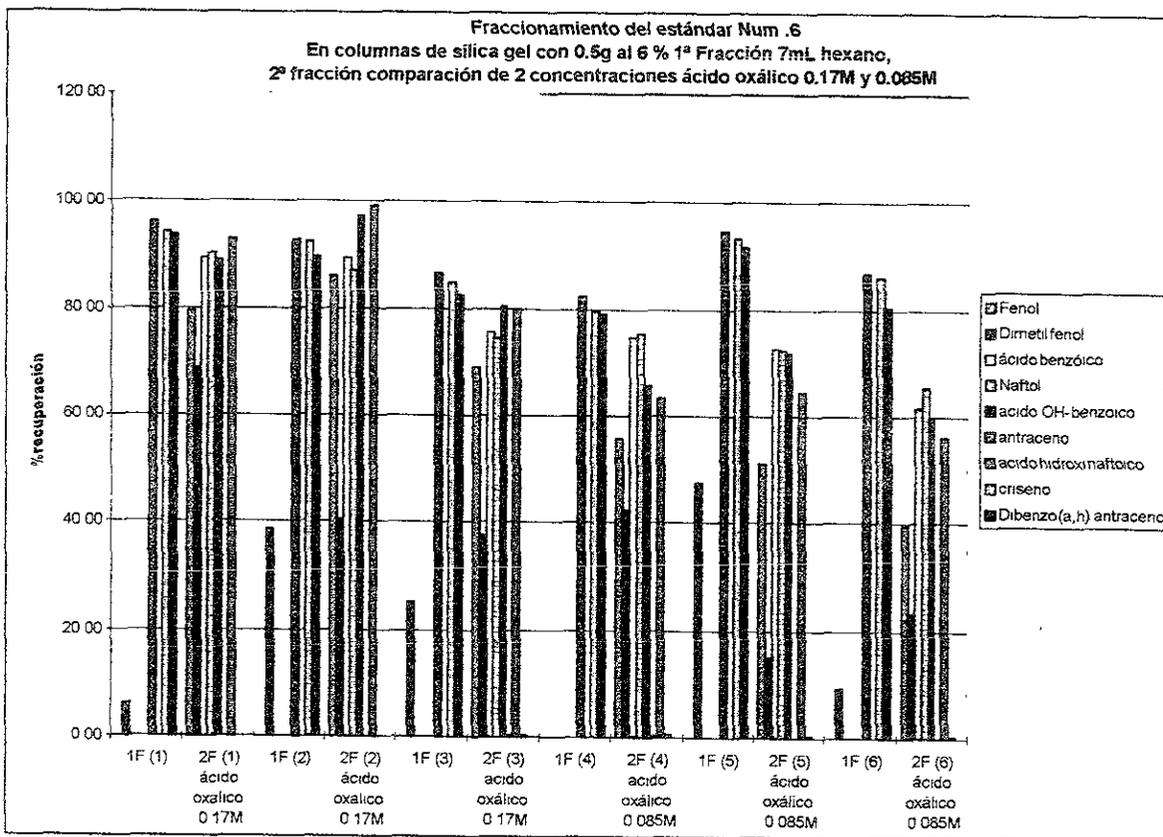


Figura A1.23 Fraccionamiento del estándar Num.6 utilizando silica gel desactivada al 6% y eluida la primera fracción con 7mL de hexano, para la segunda fracción tres muestra se eluyen con ácido oxálico 0.17 M y tres con 0.085M.

Tabla A 1.28 Fraccionamiento del estándar Num.6 utilizando columnas con 0.5 g sílica gel 8% H₂O 1ª fracción eluida con 7mL hexano y la 2ª Fracción con Met-OH / ácido oxálico 0.17M % porcentaje de recuperado.

mL	Fenol	Ácido benzóico	Naftol	Ácido hidroxi benzóico	Antraceno	Ácido 1 hidroxi naftoico	Criseno	Dibenzo (a,h) antraceno
1 fracción Hexano(a)	0.00	0.00	0.00	0.00	95.89	0.00	94.11	93.76
2 Fracción Met-OH/Ácido Oxálico (a)	79.35	89.49	90.10	88.87	0.00	92.99	0.00	0.00
1 fracción Hexano(b)	0.00	0.00	0.00	0.00	92.60	0.00	92.42	89.54
2 Fracción Met-OH/Ácido Oxálico (b)	85.96	89.49	87.13	97.39	0.00	99.12	0.00	0.00
1 fracción Hexano(c)	0.00	0.00	0.00	0.00	92.60	0.00	90.66	88.18
2 Fracción Met-OH/Ácido Oxálico (c)	73.76	80.83	79.43	85.94	0.30	85.26	0.39	0.00

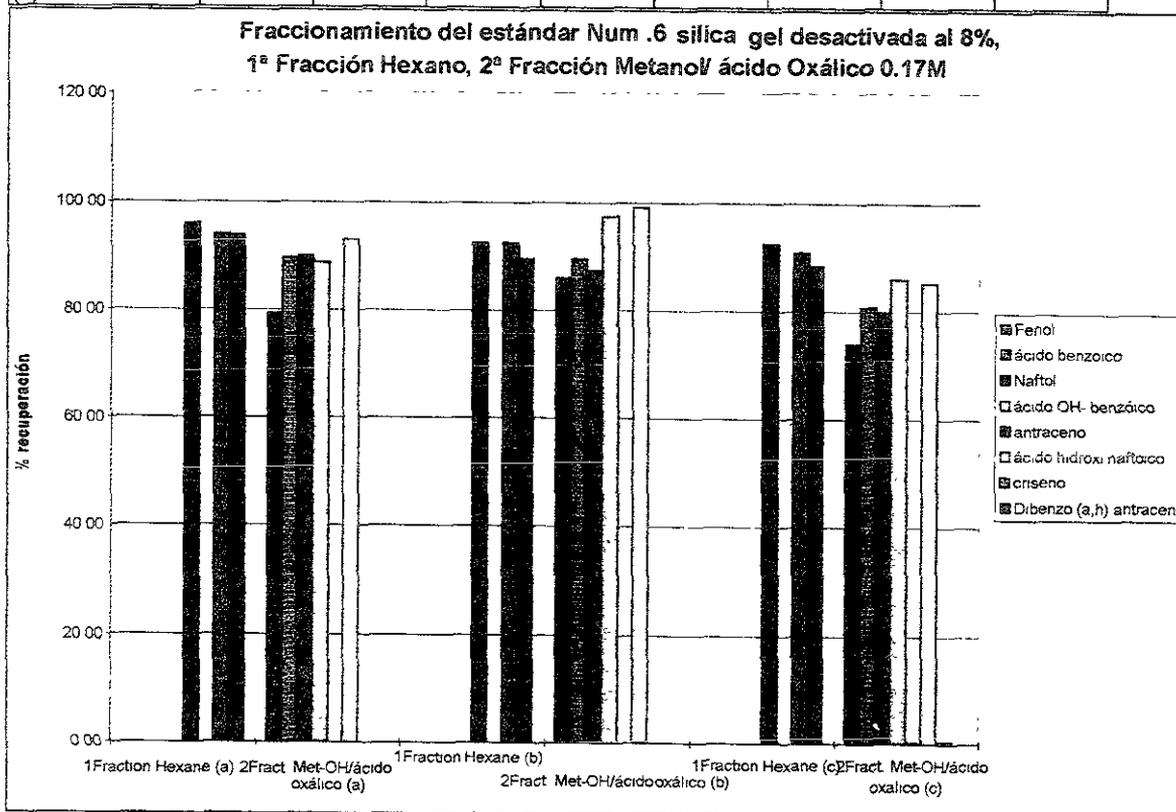


Figura A1.24 Fraccionamiento del estándar Num.6 utilizando sílica gel desactivada al 8% y eluida la primera fracción con 7mL de hexano, para la segunda fracción se eluyen con ácido oxálico 0.17 M.

Como se puede observar las condiciones óptimas para lograr una buena selectividad y una alta eficiencia en el fraccionamiento del estándar Num.6 se logra con sílica desactivada al 8%. En los otros ensayos, si bien se logra la selectividad en la segunda fracción es con un bajo porcentaje de recuperación.

Anexo 2. RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

A 2.1 Curvas patrón

En este anexo se reportan sólo los datos experimentales de los ensayos de biodegradación tal como fueron obtenidos del análisis cromatográfico, para posteriormente realizar un análisis de estos resultados en el anexo 3.

El análisis cuantitativo de las muestras se realizó en un cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas, el cual se calibró con un estándar de los compuestos HPA en concentraciones de 1 a 100 ppm con el propósito de establecer si existía linealidad entre la concentración de HPA y la respuesta del detector, con el propósito de trabajar en forma confiable, lo cual se cumplió para el intervalo de concentraciones de 10 a 100 ppm. Cabe aclarar que las muestras con HPA para calibrar el equipo se inyectaron al mismo tiempo que las muestras del suelo del estudio de biodegradación, con objeto de que todos los análisis fueran realizados en idénticas condiciones. Se obtuvieron coeficientes de regresión de 0.94 o menor, lo que muy probable se deba a que las condiciones de respuesta del detector de masas varíen a lo largo del tiempo, especialmente si el análisis se realiza en forma continua con una duración de 40 horas, aproximadamente. La cuantificación de los análisis cromatográficos se realizó mediante el programa interno con que cuenta el procesador del cromatógrafo, para lo cual se construye una curva patrón utilizando los datos de los estándares de HPA, inyectados junto con las muestras, correlacionando el área de los picos con la concentración correspondiente. Los resultados derivados de la fase experimental se presentan en las tablas siguientes

Antraceno

Conc ppm	Area
1.09	646021
20.8	20332131
41.6	65981204
71.5	67227787
109.28	101486325

Criseno

Conc ppm	Area
1.08	4523944
19.95	22083648
39.7	58971393
75.9	71861338
107.92	110049954

Dibenzo(a,h)
antraceno

Conc ppm	Area
0.51	345943
10.78	18032781
21.55	60286498
38.77	69819602
67.76	107938214

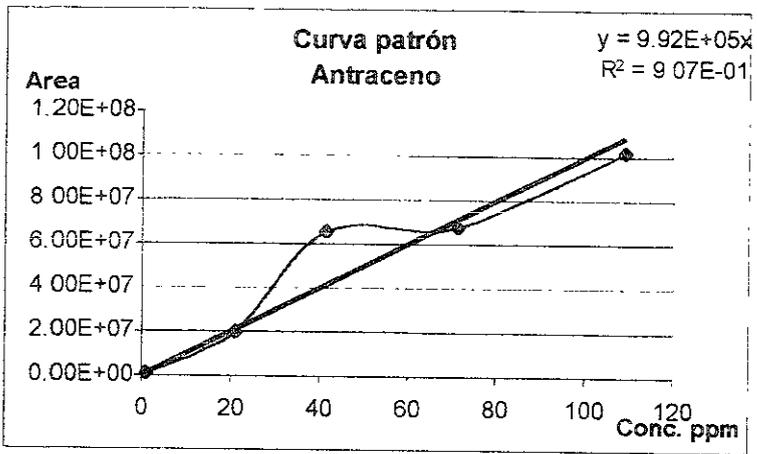


Figura A 2.0a Curva patrón de antraceno

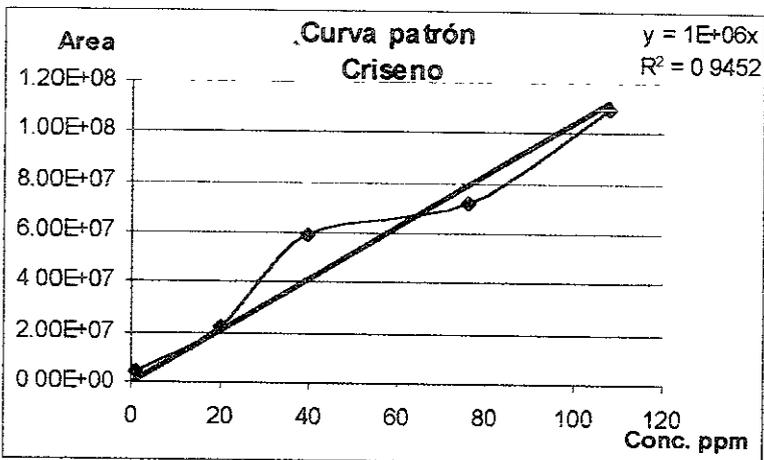


Figura A 2.0b Curva patrón de criseno

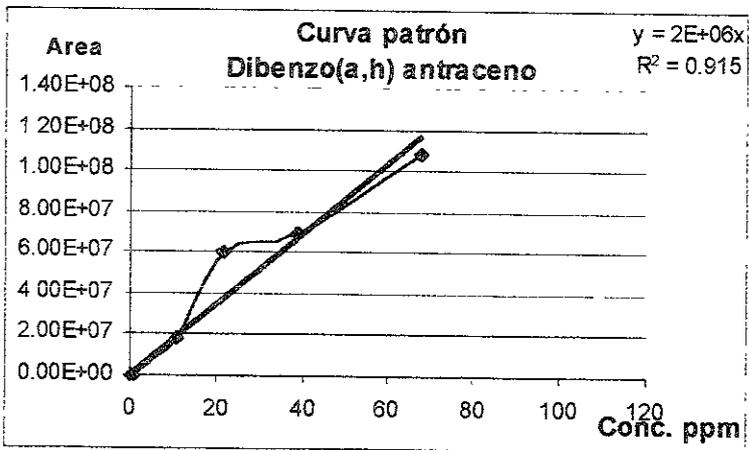


Figura A 2.0c Curva patrón de dibenzo(a,h)antraceno

Asimismo se debe considerar que la concentración inicial del antraceno y criseno en los suelos 2 y 3 fue de alrededor de 500 ppm y teniendo en cuenta que de los 10 g aproximadamente de mezcla que se depositaron en el cartucho para el proceso de extracción, 5 g son de suelo y que el volumen final de extracto crudo es 2.5 mL después de la evaporación, lo más probable es que la concentración de Criseno o antraceno en el extracto crudo estuviera alrededor de 1000 ppm, y recordando que intervalo de linealidad en la curva patrón de cuantificación de HPA es para muestras que están dentro del intervalo de 0 a 100 ppm, fue necesario diluir las muestras al momento de hacer el análisis del extracto crudo.

A 2.2 Análisis cromatográfico del suelo con inóculo (tratamiento 1)

Para el tratamiento 1 la toma de muestras fue conforme a lo programado, el procedimiento de extracción se realizó de acuerdo con el protocolo señalado, las cantidades que se mezclaron con Na_2SO_4 (sulfato de sodio) y suelo se indican en la tabla A 1.1, el peso de suelo seco se calculó tomando en cuenta la cantidad de agua.

Tabla A 1.1 Condiciones experimentales en la extracción del suelo con inóculo (tratamiento 1).

Día	Peso del vaso	Peso de la muestra	Na_2SO_4 adicionado	Peso (g) Cartucho a	Peso (g) Cartucho b	Peso (g) Suelo seco a	Peso (g) Suelo seco b
0	741.800	10.979	10.965	9.783	10.212	4.000	4.175
4	730.919	10.881	10.833	9.943	10.929	4.071	4.475
8	720.262	10.657	10.765	10.951	9.859	4.452	4.008
16	710.091	10.171	10.180	10.212	10.034	4.170	4.098
32	699.631	10.460	10.456	9.912	11.221	4.050	4.585
64	688.914	10.717	10.715	10.385	10.815	4.243	4.419
80	677.777	11.137	11.137	10.780	9.816	4.404	4.010
132	667.545	10.232	10.229	10.315	10.798	4.215	4.412

La extracción se llevó a cabo todas las muestras pero el análisis cromatográfico sólo a la de los días 0,16 y 90, no encontrando concentración de HPA .

A 2.3 Análisis cromatográfico del suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2)

La extracción en el tratamiento 2, que inicialmente tuvo una concentración de 500 ppm, se realizó con las condiciones señaladas en la tabla A 1.2

Tabla A 1.2 Condiciones experimentales en la extracción de muestras de suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2).

Día	Peso del vaso	Peso de la muestra	Na_2SO_4 adicionado	Peso (g) Cartucho a	Peso (g) Cartucho b	Peso (g) Suelo seco a	Peso (g) Suelo seco b
0	765.700	10.863	10.862	9.790	10.309	4.000	4.212
4	755.029	10.671	10.646	10.028	10.108	4.102	4.135
8	744.642	10.387	10.333	10.544	8.354	4.319	3.422
16	734.359	10.283	10.279	10.093	10.347	4.124	4.228
32	723.770	10.589	10.771	9.996	11.049	4.049	4.476
64	712.850	10.920	10.923	10.390	10.909	4.244	4.456
80	700.967	11.883	11.883	10.650	11.063	4.351	4.520
132	690.834	10.133	10.132	10.320	10.452	4.217	4.271

El tratamiento 2 sirve como referencia para observar la posible remoción de los HPA por factores abióticos entre los que se encuentran el proceso de extracción.

Los extractos fueron obtenidos por duplicado (a) y (b), para los ensayos correspondiente a los días 0, 4, 8, 16 y 90, después de ser fraccionados se diluyen 1:10, se sililizan y analizan en el cromatógrafo de gases, los datos para la primera fracción (HPA) se reportan en la tabla A 1.3.

Tabla A 1.3 Resultados del análisis cromatográfico de HPA en los extractos del suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2), concentración en ppm

Muestra /día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
2a día 0	25.400	29.100	1.400
2a día 4	52.050	50.346	2.974
2a día 8	13.580	12.724	0.740
2a día 16	28.500	27.000	1.540
2a día 90	59.289	56.670	3.148
2b día 0	22.800	25.800	1.300
2b día 4	49.383	48.535	2.968
2b día 8	10.813	9.662	0.596
2b día 16	26.500	24.500	1.490
2b día 90	62.088	58.200	3.281

Una vez obtenidos estos datos, se calculó la concentración de los HPA, corrigiendo por los factores de dilución y por la cantidad de suelo seco en la muestra, los resultados se reportan en la tabla A 2.4.

Tabla A 2.4 Concentración (ppm) en los extractos (a) y (b) del suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2), valores corregidos por el factor de dilución.

Muestra /Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
2a día 0	158.749	181.874	8.750
2a día 4	317.233	306.845	18.126
2a día 8	78.602	73.652	4.286
2a día 16	172.751	163.659	9.335
2a día 90	340.649	325.601	18.088
2b día 0	135.325	153.131	7.716
2b día 4	298.600	293.476	17.946
2b día 8	78.997	70.589	4.351
2b día 16	156.685	144.860	8.810
2b día 90	343.412	321.907	18.146

Como se observa en la figura A 2.1 la concentración inicial resulta menor que la que se tiene para el día 90, lo cual no es congruente, ya que al día cero la concentración debería ser la máxima, este comportamiento se explica en el anexo 3 correspondiente al análisis de resultados.

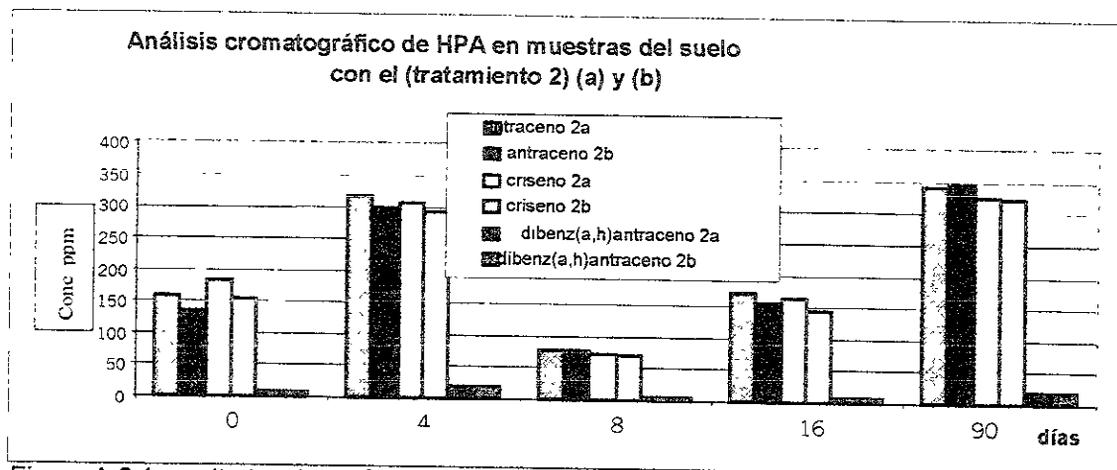


Figura A 2.1 resultados del análisis cromatográfico de HPA en el tratamiento 2(a) y (b)

A 2.4 Análisis cromatográfico del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3)

Para el ensayo de biodegradación (tratamiento 3), para la extracción las muestras se procesaron con las condiciones señaladas en la tabla A 2.5

Tabla A 2.5 Condiciones experimentales en las muestras para extracción del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

Día	Peso de Vaso	Peso de la muestra	Na ₂ SO ₄ adicionado	Peso (g) Cartucho a	Peso (g) Cartucho b	Peso (g) Suelo seco a	Peso (g) Suelo seco b
0	770.100	10.029	10.029	8.445	10.014	3.450	4.091
4	759.240	10.860	10.877	10.710	10.186	4.372	4.158
8	748.640	10.600	10.608	10.603	11.253	4.330	4.596
16	738.459	10.181	10.100	10.305	10.200	4.227	4.184
32	728.212	10.247	10.248	9.789	10.653	3.999	4.352
64	717.130	11.082	10.086	10.427	10.387	4.461	4.443
80	705.988	11.142	10.265	10.595	11.253	4.506	4.786
132	695.079	10.909	10.913	10.295	11.746	4.205	4.798

Como se observa la extracción de las muestras se lleva a cabo por duplicado denominadas (a) y (b) y antes de someterlas al fraccionamiento o "Clean up", se tomó una muestra de 70 μ L de cada extracto denominado "crudo" con el propósito de evaluar el proceso de fragmentación. Una vez que las muestras fueron fraccionadas, se ajustó el volumen evaporando el disolvente en el rotoevaporador y aforando a 2 mL con el correspondiente disolvente. Se tomaron 24 μ L la primera fracción, se diluyeron con diclorometano hasta 70 μ L, de modo que la concentración de HPA permaneciera dentro del intervalo de respuesta lineal. Se llevó a cabo el análisis en el cromatógrafo de gases previa reacción de silylación siguiendo el protocolo mencionado en el capítulo 3, en las tablas A 2.6, 2.7 y 2.8 se presentan los datos obtenidos del análisis cromatográfico, corregidos por los respectivos factores de dilución y la cantidad de suelo seco.

Tabla A 2.6 Concentración de Antraceno en los extractos (a) y (b) del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3), valores corregidos por el factor de dilución.

Día	Antraceno 1Fa	Antraceno crudo a	Antraceno 1Fb	Antraceno crudo b	Promedio
0	159.18	195.44	169.26	213.30	184.29
4	346.50	480.30	373.14	519.43	429.84
8	109.69	123.39	90.84	110.17	108.52
16	242.49	271.03	278.84	284.42	269.19
32	198.16	257.88	187.26	259.20	225.63
64	174.31	215.00	294.65	338.70	255.66
80	80.56	92.85	131.28	133.20	109.47
132	7.04	7.37	7.19	7.50	7.28

Tabla A 2.7 Concentración de Criseno en los extractos (a) y (b) del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3), valores corregidos por el factor de dilución.

Día	Criseno 1F a	Criseno crudo a	Criseno 1F b	Criseno crudo b	Promedio
0	167.37	212.08	175.43	228.41	195.82
4	310.48	447.21	331.62	460.52	387.46
8	93.53	109.92	78.88	100.02	95.59
16	217.05	245.64	248.17	258.72	242.40
32	221.29	291.14	220.00	297.11	257.39
64	338.52	508.46	441.00	525.12	453.28
80	277.85	317.08	307.61	363.98	316.63
132	134.63	136.57	121.67	135.97	132.21

Tabla A 2.7 Concentración de Dibenzo(a,h)antraceno en los extractos (a) y (b) del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3), valores corregidos por el factor de dilución.

Día	Dibenzo 1F a	Dibenzo crudo a	Dibenzo 1F b	Dibenzo crudo b	Promedio
0	8.45	10.82	8.31	10.27	9.46
4	19.44	30.95	19.08	26.45	23.98
8	4.85	6.03	8.00	6.40	6.32
16	12.42	14.90	13.94	13.74	13.75
32	11.88	18.67	10.91	14.13	13.90
64	18.50	33.48	26.88	38.22	29.27
80	23.41	27.16	30.93	34.48	28.99
132	11.60	11.65	11.67	12.84	11.94

Como se observa en las figuras A 2.2, 2.3 y 2.4 la concentración de los diferentes HPA tiene un comportamiento irregular fuera de lo previsto, sin embargo, los tres compuestos siguen un patrón muy similar y proporcional, como se puede ver inicialmente la concentración es menor al día cuatro para después bajar y subir, la explicación a este comportamiento se hace en el anexo 3.

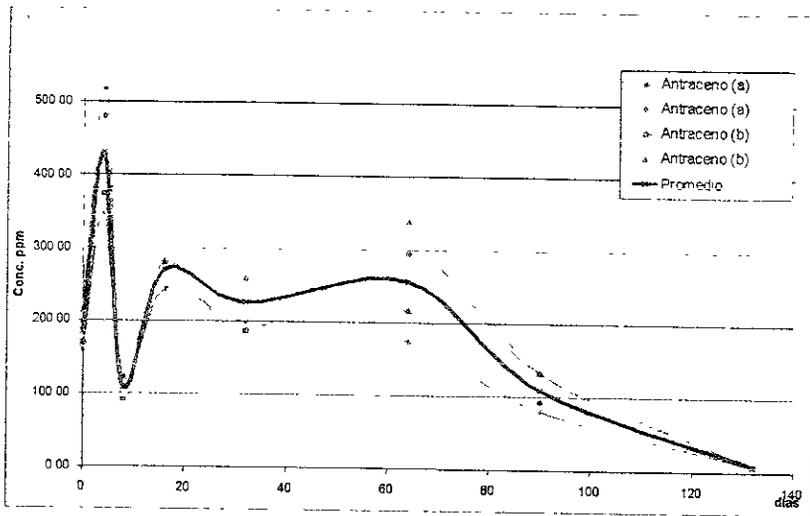


Figura A 2. 2 Análisis cromatográfico de Antraceno en los extractos (a) y (b) del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

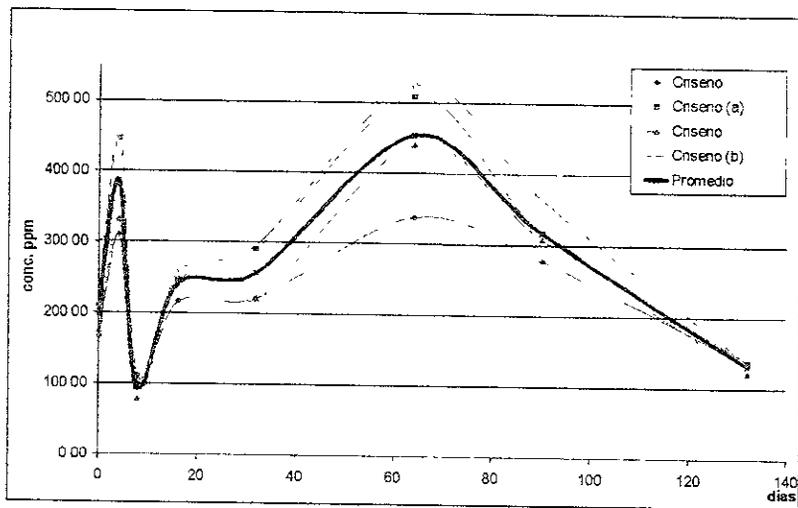


Figura A 2. 3 Análisis cromatográfico de criseno en los extractos (a) y (b) del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

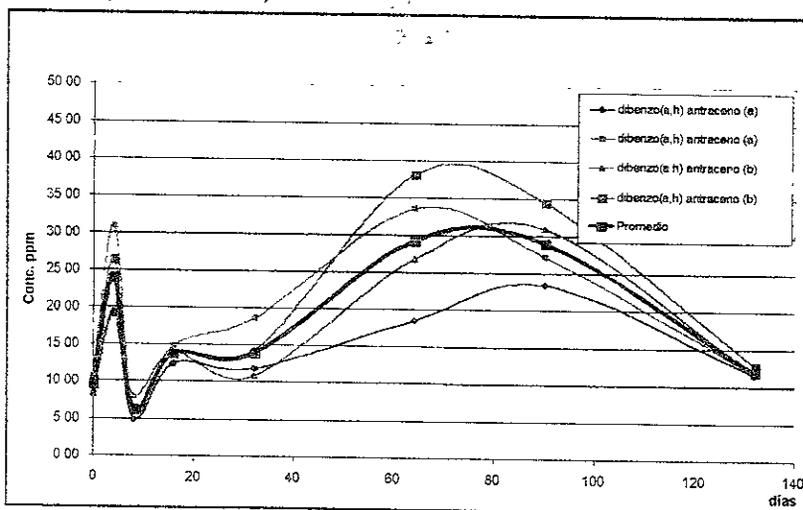


Figura A 2. 4 Análisis cromatográfico de dibenzo(a,h)antraceno en los extractos (a) y (b) del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

A 2.5 Análisis cromatográfico de los suelos con adición de nutrimentos (tratamiento 5, 6, 7 y 8).

El procedimiento utilizado en las muestras de suelo adicionados con nutrimentos (tratamientos 5, 6, 7 y 8) para el análisis cromatográfico es similar al que se utilizó en los suelos anteriores. Sin embargo el proceso de extracción no se realizó por duplicado, dado que la cantidad de suelo que se tomó fue de aproximadamente 5 g, para cada uno de estos ensayos. Con las condiciones experimentales que se muestra en la tabla A 2.8, 2.9, 2.10 y 2.11.

Tabla A 2.8 Condiciones experimentales en las muestras para extracción del suelo con relación C:P 100:1 (tratamiento 5).

Día	Peso de Vaso	Peso de la muestra	Na ₂ SO ₄ adicionado	Peso (g) Cartucho	Peso (g) Suelo seco
0	194.35	5.49	5.49	11.70	4.78
5	188.89	5.11	5.12	10.77	4.40
8	183.78	5.03	5.03	10.13	4.14
16	178.75	5.12	5.12	10.28	4.20
33	173.63	5.40	5.41	11.25	4.59

Tabla A 2.9 Condiciones experimentales en las muestras para extracción del suelo con relación C:N:P 100:10:1 (tratamiento 6).

Día	Peso de Vaso	Peso de la muestra	Na ₂ SO ₄ adicionado	Peso (g) Cartucho	Peso (g) Suelo seco
0	195.69	5.37	5.37	11.28	4.61
5	190.60	5.44	5.44	11.36	4.64
8	185.16	5.16	5.16	10.62	4.34
16	180.00	5.29	5.29	10.72	4.38
33	174.72	5.26	5.28	10.73	4.38

Tabla A 2.10 Condiciones experimentales en las muestras para extracción del suelo con relación C:N:P 100:10:1, pH 4.2 (tratamiento 7).

Día	Peso de Vaso	Peso de la muestra	Na ₂ SO ₄ adicionado	Peso (g) Cartucho	Peso (g) Suelo seco
0	191.43	5.36	5.36	10.49	4.29
5	186.50	5.10	5.10	10.57	4.32
8	181.40	5.16	5.16	10.49	4.28
16	176.24	5.26	5.67	11.25	4.43
33	170.98	5.79	5.80	12.11	4.95

Los datos obtenidos del análisis cromatográfico de los ensayos de biodegradación de HPA en los suelos con adición de nutrimentos (tratamientos 5, 6 7 y 8) se corrigen por el factor de dilución y por la cantidad de suelo seco en la muestra correspondiente, los resultados se reportan a en las tablas A 2.11, - A 2.14 y en las figuras A 2. 5, - A 2.8

Tabla A 2.11 Condiciones experimentales en las muestras para extracción del suelo con relación C:N:P 100:10:1, pH 9.2 (tratamiento 8).

Día	Peso de Vaso	Peso de la muestra	Na ₂ SO ₄ adicionado	Peso (g) Cartucho	Peso (g) Suelo seco
0	193.14	5.78	5.78	11.97	4.89
5	187.88	5.05	5.05	10.41	4.25
8	182.83	5.41	5.41	11.12	4.54
16	177.43	5.15	5.14	10.30	4.21
33	172.28	5.00	5.01	10.58	4.32

Tabla A 2.12 Concentración (ppm) en el extracto del suelo con relación C:P 100:1 (tratamiento 5), valores corregidos por el factor de dilución.

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
0	232.34	231.41	11.79
5	103.12	94.64	6.00
8	262.45	283.08	20.67
16	205.94	210.11	15.87
32	113.34	127.13	9.42

Tabla A 2.12 Concentración (ppm) en el extracto del suelo con relación C:N:P 100:10:1 (tratamiento 6), valores corregidos por el factor de dilución.

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
0	172.17	174.43	13.79
5	191.61	194.74	16.18
8	267.77	298.09	23.42
16	56.96	53.57	8.79
32	131.39	129.30	19.97

Tabla A 2.12 Concentración (ppm) en el extracto del suelo con relación C:N:P 100:10:1, pH 4.2 (tratamiento 7), valores corregidos por el factor de dilución.

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
0	212.21	218.97	18.07
5	96.75	94.94	7.82
8	223.97	207.48	19.43
16	192.40	196.09	17.48

Tabla A 2.12 Concentración (ppm) en el extracto del suelo con relación C:N:P 100:10:1, pH 9.2 (tratamiento 8), valores corregidos por el factor de dilución.

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
0	182.45	187.06	14.10
5	218.01	225.43	17.62
8	212.84	211.50	15.46

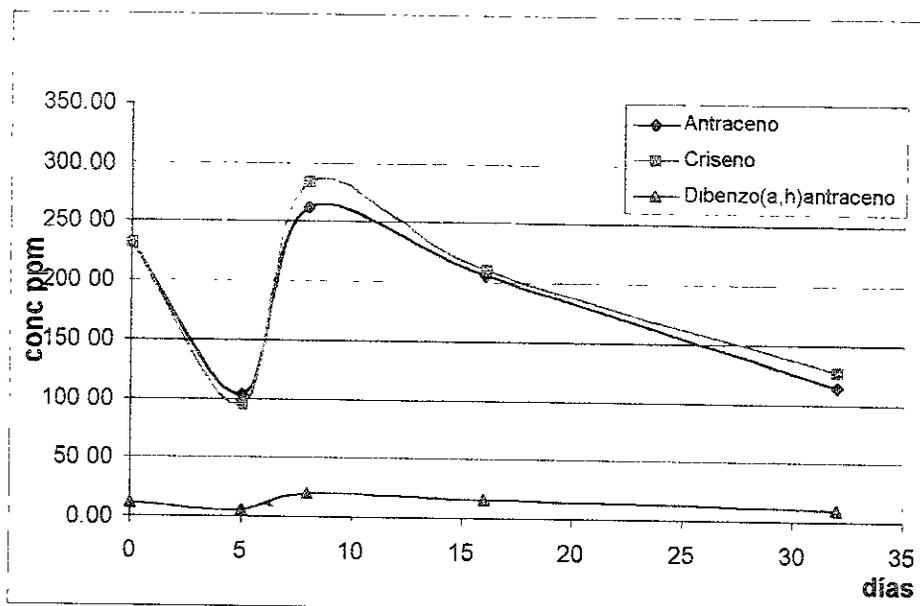


Figura 2.5 Análisis cromatográfico de los extractos del suelo con relación C:P 100:1 (tratamiento 5)

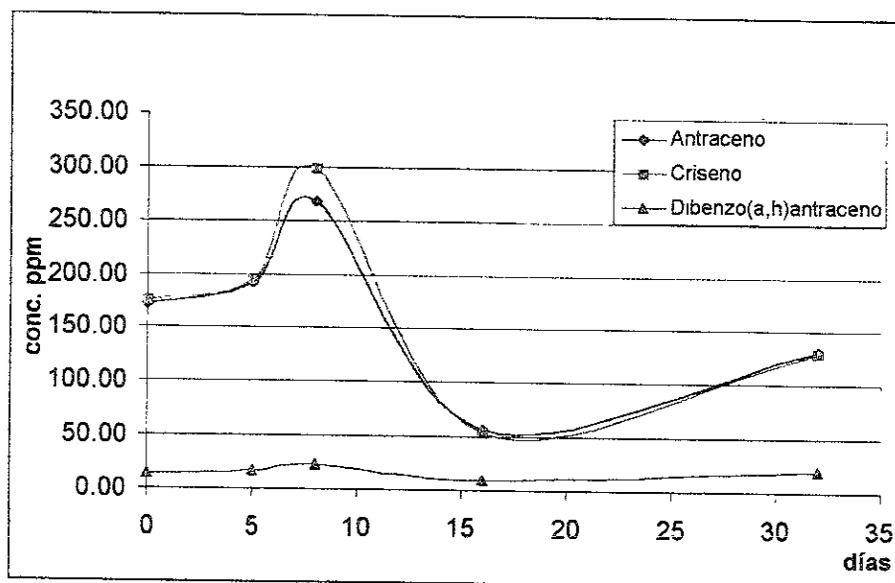


Figura 2.6 Análisis cromatográfico de los extractos del suelo con relación C:N:P 100:10:1 (tratamiento 6)

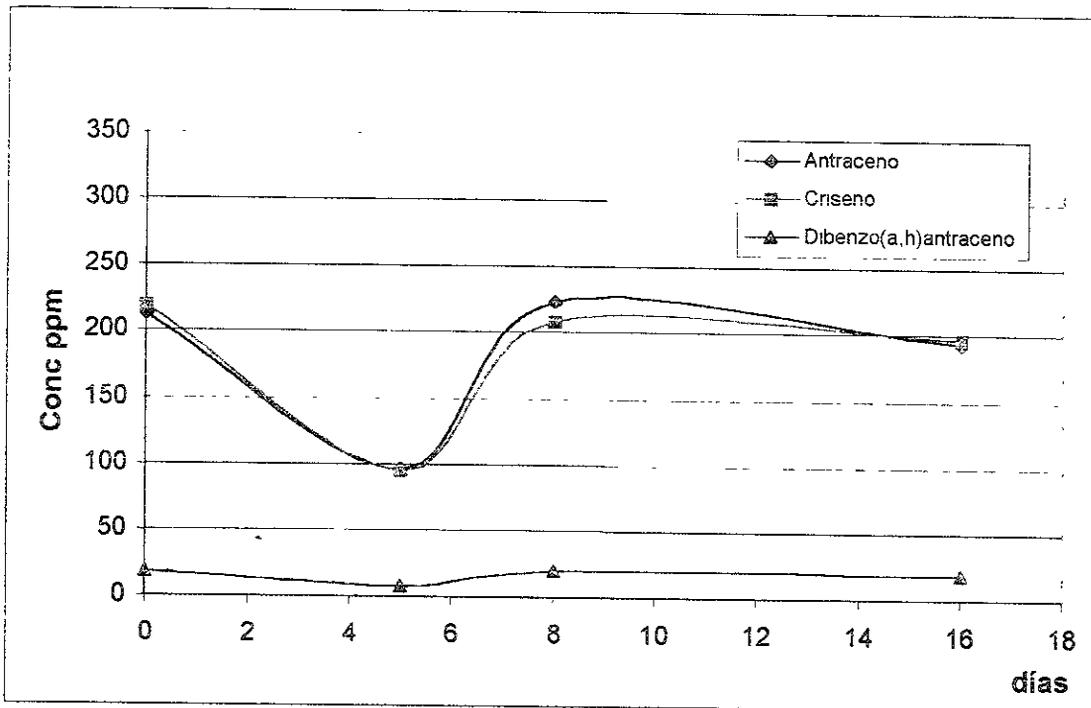


Figura 2.7 Análisis cromatográfico de los extractos del suelo con relación C:N:P 100:10:1 pH 4.2 (tratamiento 7).

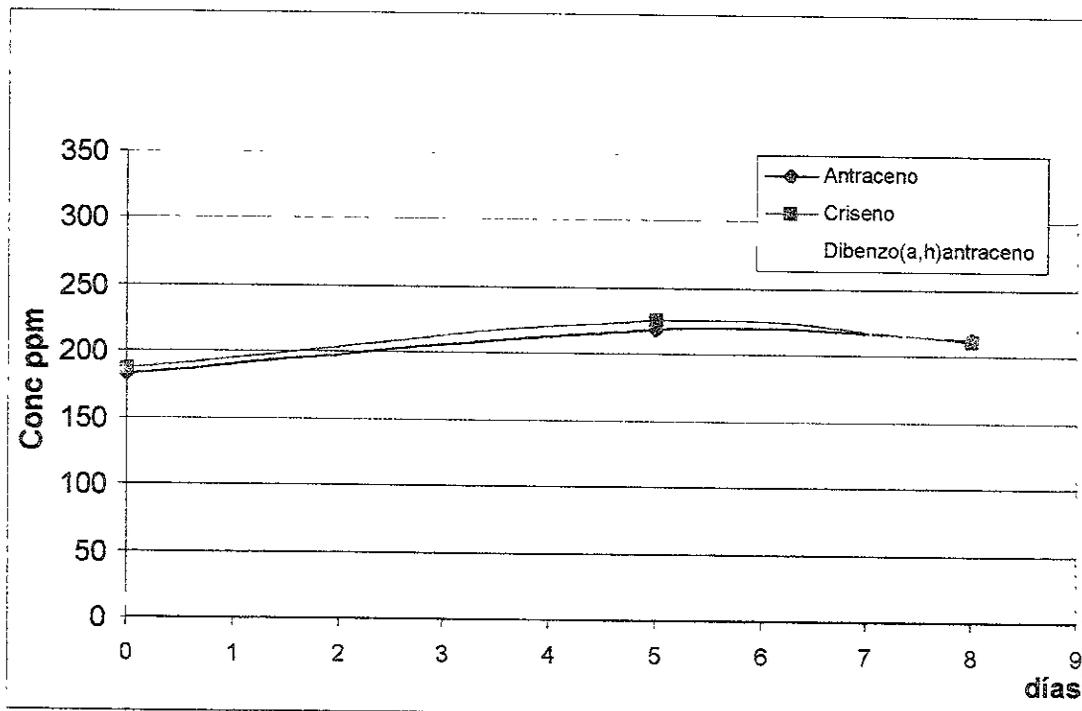


Figura 2.8 Análisis cromatográfico a los extractos del suelo con relación C:N:P 100:10:1 pH 9.2 (tratamiento 8).

Los resultados obtenidos en los ensayos de inducción de biodegradación; en los tratamientos 5, 6, 7 y 8 tienen un patrón similar al observado en los tratamientos 2 y 3.

Anexo 3. PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES

A 3.1 Resultados del suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2).

En el anexo 2 fueron reportados los datos experimentales tal como se obtuvieron en cada uno de los ensayos, corresponde a este anexo la explicación e interpretación de los resultados. El análisis comienza con los resultados del suelo con azida de sodio (tratamiento 2), este ensayo fue planteado para observar la remoción por factores abióticos, ya que al agregar la azida de sodio se garantiza la nula actividad microbiológica. Se sabe también que los HPA son compuestos que difícilmente se evaporan. Con base en lo anterior, la concentración de HPA en el tratamiento 2 debe permanecer sin variaciones, para antraceno y criseno 500 ppm y para dibenzo(a,h)antraceno 50 ppm. Sin embargo, al observar los resultados del anexo 2 tabla A 2.4 las concentraciones de HPA permanecen por debajo de los valores mencionados, aún en el día cero, manteniendo variaciones como se muestran en la figura A 2.1, debido principalmente a la eficiencia del proceso de extracción y la adsorción entre los HPA con el suelo. El cálculo de la eficiencia de extracción se hace dividiendo los valores encontrados de antraceno y criseno entre 500 y los de dibenzo(a,h)antraceno entre 50, de esta forma se obtienen los resultados de la tabla A 3.1

Con estos datos se elaboró la gráfica A 3.1 y A 3.2 donde se puede observar que la eficiencia de extracción no es la misma para cada uno de los días de muestreo. También se observa que durante la extracción hay una selectividad del disolvente empleado para cada uno de los HPA, asimismo se encontró una relación entre la eficiencia de extracción del dibenzo(a,h)antraceno con la del antraceno y criseno. De esta forma se logró determinar que, sí la eficiencia de extracción del dibenzo(a,h)antraceno aumenta, existe un aumento en forma proporcional para el criseno y antraceno.

Tabla A 3.1 Eficiencia de extracción de HPA en el suelo con azida de sodio (tratamiento 2).

Muestra /Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
2a / 0	0.271	0.306	0.154
2a / 4	0.597	0.587	0.359
2a / 8	0.158	0.141	0.087
2a / 16	0.313	0.290	0.176
2a / 90	0.687	0.644	0.363
2b / 0	0.294	0.335	0.165
2b / 4	0.616	0.600	0.361
2b / 8	0.158	0.144	0.086
2b / 16	0.329	0.309	0.181
2b / 90	0.684	0.648	0.362

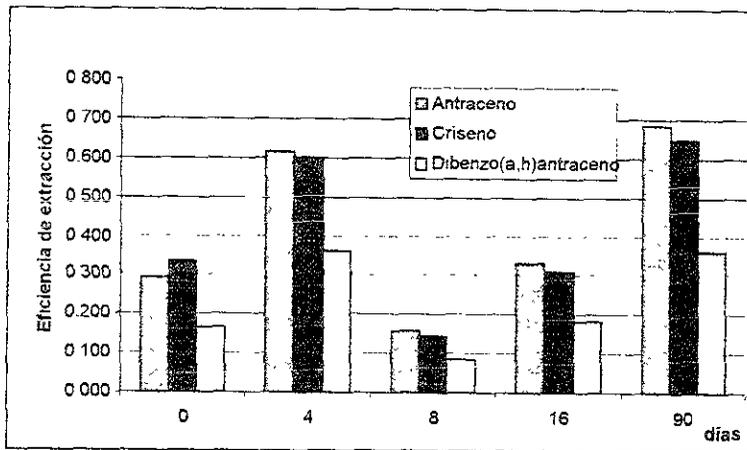


Figura A 3.1 Eficiencia de extracción en el suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2) 2a.

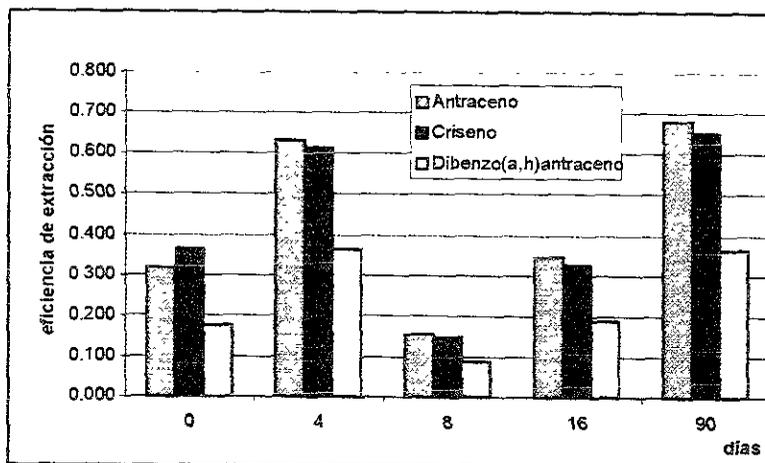


Figura A 3.2 Eficiencia de extracción en el suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2) 2b.

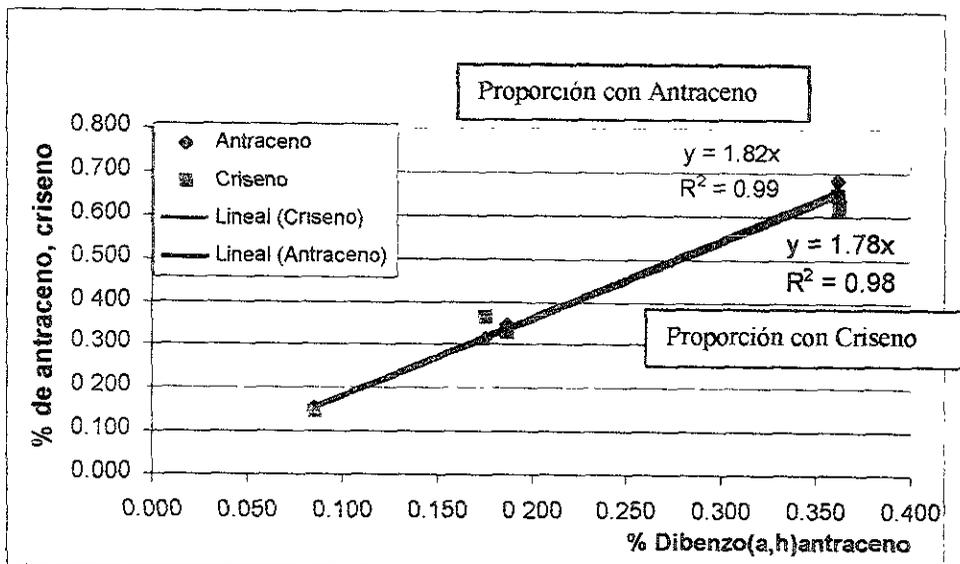


Figura A 3.3 Proporción de dibenzo(a,h)antraceno con criseno y antraceno en la muestra 2a del suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2).

Para encontrar cual es la proporción entre la eficiencia criseno y/o antraceno con el dibenzo(a,h)antraceno se elaboran las figuras A 3.3 y 3.4, donde mediante el análisis de regresión lineal se obtiene la proporción que mantienen.

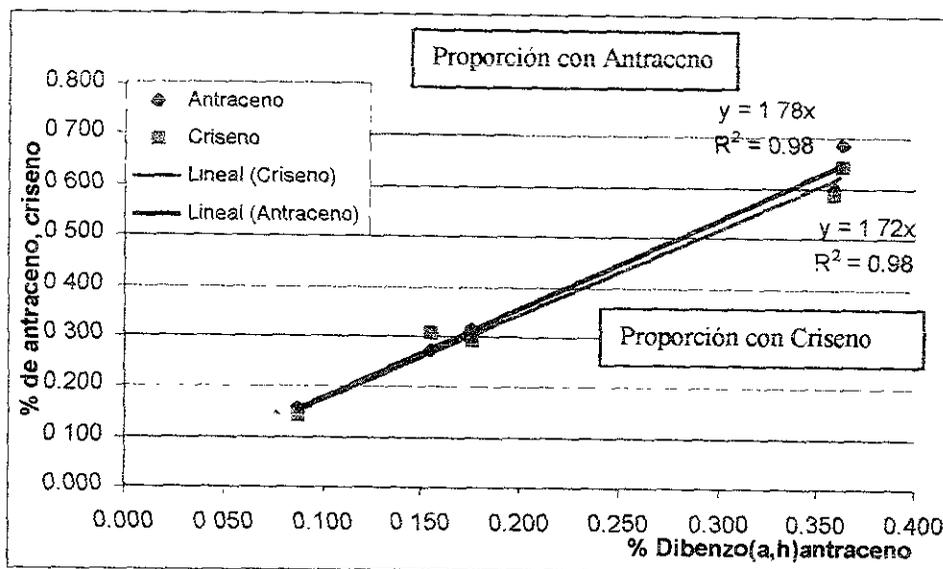


Figura A 3.4 Proporción de dibenzo(a,h)antraceno con criseno y antraceno en la muestra 2b del suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2).

Como se puede observar los valores de correlación para el criseno y antraceno en las muestras 2a y 2b, son muy parecidos. Sin embargo la verdadera importancia de esta correlación, radica en el hecho que al conocer la eficiencia de extracción del dibenzo(a,h)antraceno se puede calcular la de extracción de los otros dos compuestos. Considerando además que este es un compuesto que difícilmente se llega a degradar, se puede utilizar entonces como estándar interno.

De esta forma los valores obtenidos en la tabla A2.4 son corregidos por un factor, que está determinado por la proporción del criseno o antraceno con el estándar interno y por la eficiencia de extracción, encontrando así la concentración de HPA en suelo, como se observa en la tabla A 3.2

Tabla A 3.2 Concentración de HPA en las muestras 2(a) y 2(b) el suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2).

Muestra /Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno	% remoción Antraceno	% remoción Criseno
2a / 0	498.43	513.53	50.00	0.31	-2.71
2a / 4	480.82	418.24	50.00	3.84	16.35
2a / 8	503.84	424.57	50.00	-0.77	15.09
2a / 16	508.42	433.16	50.00	-1.68	13.37
2a / 90	517.40	444.74	50.00	-3.48	11.05
2b / 0	492.65	484.62	50.00	1.47	3.08
2b / 4	467.37	399.32	50.00	6.53	20.14
2b / 8	509.97	396.14	50.00	-1.99	20.77
2b / 16	499.59	401.51	50.00	0.08	19.70
2b / 90	531.59	433.18	50.00	-6.32	13.36

De igual forma, con los datos de la tabla A2.4 se calculan los resultados promedio para las muestras 2a y 2b en la tabla A3.3, y aplicando el procedimiento que se realizó para las muestras individuales se obtiene la proporción para el criseno y antraceno con el dibenzo(a,h)antraceno figura A3.5 y con esto se obtiene el promedio de remoción por factores abióticos figura A 3.6

Tabla 3.3 Correlación promedio de dibenzo(a,h)antraceno con criseno y antraceno de las muestras 2a y 2b.

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno
0	147.037	167.503	8.233
4	307.916	300.161	18.036
8	78.799	72.121	4.319
16	164.718	154.259	9.072
90	342.030	323.754	18.117

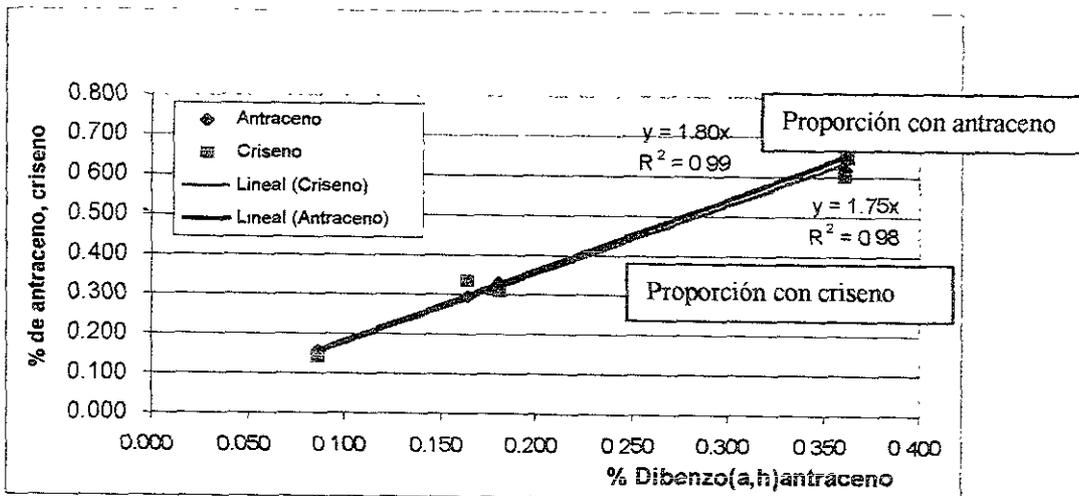


Figura A 3.5 Proporción de dibenzo(a,h)antraceno con criseno y antraceno promedio de las muestras 2a y 2b.

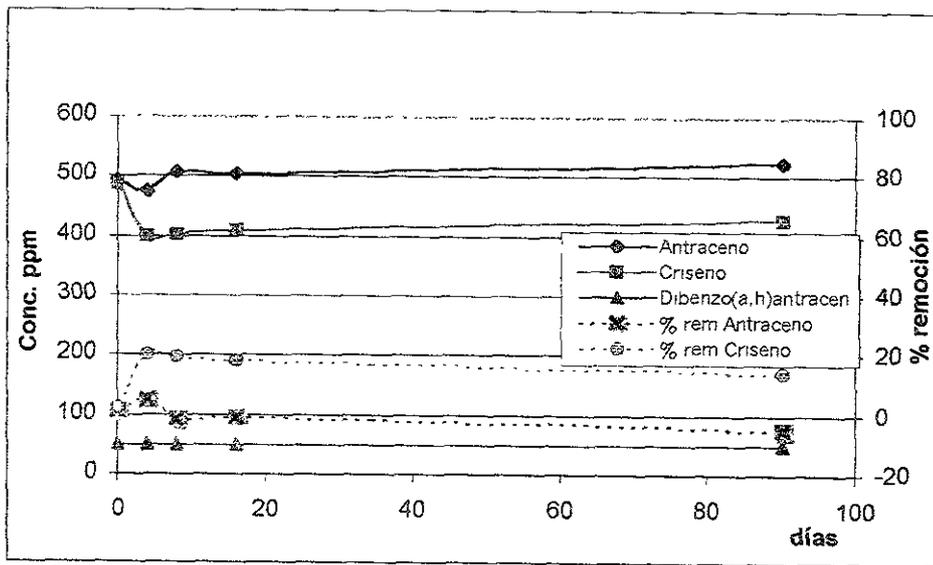


Figura A 3.6 Degradación abiótica promedio en el suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2).

A 3.2 Análisis de resultados del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

En el suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3) se observa un comportamiento similar al del suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2). De la extracción que se realizó por duplicado, se hizo el análisis de las muestras de suelo antes de realizar el fraccionamiento o "clean up" tabla A 3.1 y después del fraccionamiento tabla A 3.2. lo cual permite evaluar la eficiencia de recuperación en el "clean up".

Tabla A 3.1 Análisis cromatográfico de los extractos 3(a) y 3(b) del suelo "crudo" con HPA e inóculo antes del fraccionamiento.

Muestra Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno	Muestra día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
(a) 0	195.44	212.08	10.82	(b) 0	213.30	228.41	10.27
(a) 4	480.30	447.21	30.95	(b) 4	519.43	460.52	26.45
(a) 8	123.39	109.92	6.03	(b) 8	110.17	100.02	6.40
(a) 16	271.03	245.64	14.90	(b) 16	284.42	258.72	13.74
(a) 32	257.88	291.14	18.67	(b) 32	259.20	297.11	14.13
(a) 64	215.00	508.46	33.48	(b) 64	338.70	525.12	38.22
(a) 80	92.85	317.08	27.16	(b) 80	133.20	363.98	34.48
(a)132	7.37	136.57	11.65	(b)132	7.50	135.97	12.84

Tabla A 3.2 Análisis cromatográfico de la primera fracción de los extractos de las muestras 3(a) y 3(b) del suelo con HPA e inóculo (tratamiento3).

Muestra Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno	Muestra día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
(a) 0	159.18	167.37	8.45	(b) 0	169.26	175.43	8.31
(a) 4	346.50	310.48	19.44	(b) 4	373.14	331.62	19.08
(a) 8	109.69	93.53	4.85	(b) 8	90.84	78.88	4.57
(a) 16	242.49	217.05	12.42	(b) 16	278.84	248.17	13.94
(a) 32	198.16	221.29	11.88	(b) 32	187.26	220.00	10.91
(a) 64	174.31	338.52	18.50	(b) 64	294.65	441.00	26.88
(a) 80	80.56	277.85	23.41	(b) 80	131.28	307.61	30.93
(a)132	7.04	134.63	11.60	(b)132	7.19	121.67	11.67

Tabla A 3.3 Porcentaje de recuperación el fraccionamiento de los extractos de las muestras 3(a) y 3(b) del suelo con HPA e inóculo (tratamiento3).

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno		Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
(a) 0	81.45	78.92	78.09	(b) 0	79.35	76.81	80.95
(a) 4	72.14	69.43	62.81	(b) 4	71.84	72.01	72.12
(a) 8	88.90	85.08	80.36	(b) 8	82.46	78.86	71.43
(a) 16	89.47	88.36	83.33	(b) 16	98.04	95.92	101.45
(a) 32	76.84	76.01	63.62	(b) 32	72.24	74.05	77.26
(a) 64	81.07	66.58	55.25	(b) 64	86.99	83.98	70.33
(a) 80	86.76	87.63	86.19	(b) 80	98.56	84.51	89.70
(a)132	95.48	98.57	99.59	(b)132	95.83	89.48	90.91
promedio	84.01	81.32	76.15	promedio	85.66	81.95	81.77

En la tabla A 3.3 se observa que el fraccionamiento de los extractos del suelo tres se llevó a cabo con un 85 por ciento de eficiencia promedio, que si bien no es la mejor que se podría obtener, es aceptable. Lo importante en este caso es observar que los resultados de los tres HPA para cada uno de los días en que se realizó la extracción presentan un patrón de comportamiento similar, durante el proceso de análisis tal como se muestra en tablas A 3.4, 3.5 y 3.6

Tabla A3.4 Promedio del análisis cromatográfico de antraceno en los extractos 3a y 3b.

Día	Antraceno 1Fa	Antraceno crudo a	Antraceno 1Fb	Antraceno crudo b	Promedio	Desviación estándar
0	159.18	195.44	169.26	213.30	184.29	± 24.64
4	346.50	480.30	373.14	519.43	429.84	± 83.13
8	109.69	123.39	90.84	110.17	108.52	± 13.39
16	242.49	271.03	278.84	284.42	269.19	± 18.63
32	198.16	257.88	187.26	259.20	225.63	± 38.27
64	174.31	215.00	294.65	338.70	255.66	± 74.58
90	80.56	92.85	131.28	133.20	109.47	± 26.78
132	7.04	7.37	7.19	7.50	7.28	± 0.20

Tabla A 3.5 Promedio del análisis cromatográfico de criseno en los extractos del suelo 3

Día	Criseno 1F a	Criseno crudo a	Criseno 1F b	Criseno crudo b	Promedio	Desviación estándar
0	167.37	212.08	175.43	228.41	195.82	± 29.16
4	310.48	447.21	331.62	460.52	387.46	± 77.36
8	93.53	109.92	78.88	100.02	95.59	± 13.02
16	217.05	245.64	248.17	258.72	242.40	± 17.82
32	221.29	291.14	220.00	297.11	257.39	± 42.49
64	338.52	508.46	441.00	525.12	453.28	± 84.71
90	277.85	317.08	307.61	363.98	316.63	± 35.72
132	134.63	136.57	121.67	135.97	132.21	± 7.07

Tabla A 3.6 Promedio del análisis cromatográfico de dibenzo(a,h) antraceno en los extractos del suelo 3

Día	Dibenzo 1F a	Dibenzo crudo a	Dibenzo 1F b	Dibenzo crudo b	Promedio	Desviación estándar
0	8.45	10.82	8.31	10.27	9.46	± 1.27
4	19.44	30.95	19.08	26.45	23.98	± 5.76
8	4.85	6.03	8.00	6.40	6.32	± 1.30
16	12.42	14.90	13.94	13.74	13.75	± 1.02
32	11.88	18.67	10.91	14.13	13.90	± 3.46
64	18.50	33.48	26.88	38.22	29.27	± 8.56
90	23.41	27.16	30.93	34.48	28.99	± 4.77
132	11.60	11.65	11.67	12.84	11.94	± 0.60

Como se observa en las tablas A 3.4, 3.5, 3.6, el comportamiento de los 3 HPA para cada uno de los días en que se muestreó, el cambió es en forma similar para cada uno de los extractos analizados. Éste comportamiento se debe principalmente a los factores abióticos de retención (observados en el tratamiento 2). Los cambios que se producen en el suelo a nivel microscópico, son los que originan una mayor o menor adsorción de los HPA.

Tal como sucedió en tratamiento 2, para obtener las concentraciones de los HPA en el suelo se utilizó al dibenzo(a,h)antraceno como estándar interno. Para lo cual se tomó en cuenta la eficiencia de extracción de éste y la proporción que mantiene con cada uno de los otros dos HPA. Como se observa para un incremento de dibenzo(a,h)antraceno existe un incremento proporcional para el criseno y antraceno, tal como se muestra en la tabla A 3.8.

Tabla 3.8 Promedio de análisis cromatográficos de los extractos del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno
0	184.29	195.82	9.46
4	429.84	387.46	23.98
8	108.52	95.59	6.32
16	269.19	242.40	13.75
32	225.63	257.39	13.90
64	255.66	453.28	29.27
90	109.47	316.63	28.99
132	7.28	132.21	11.94

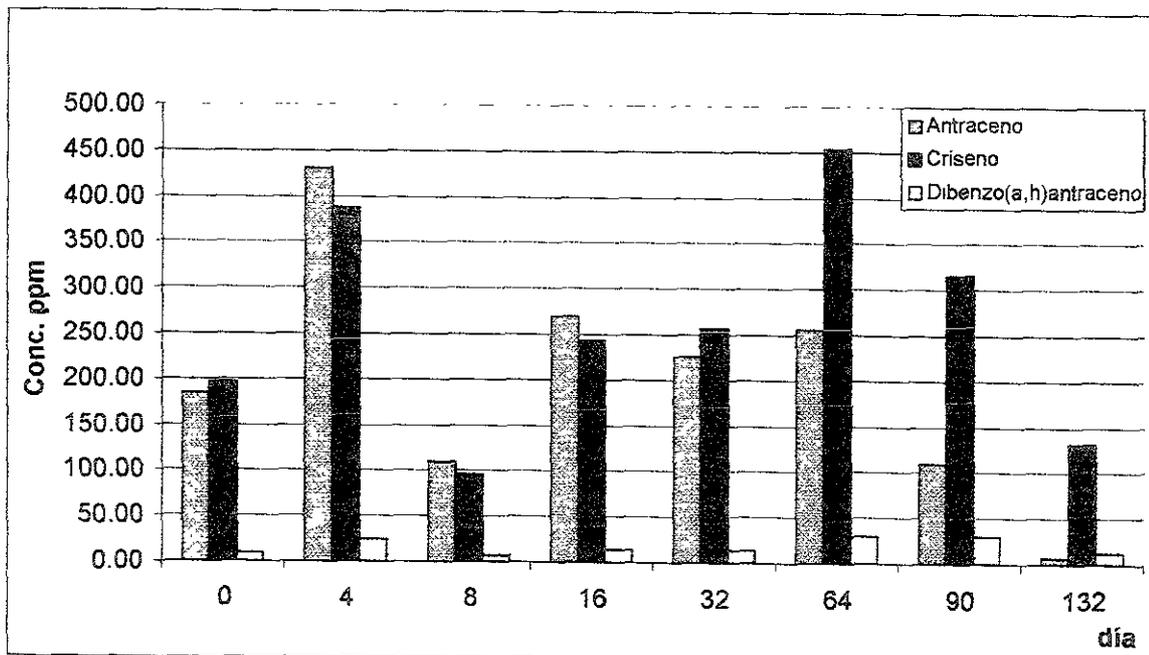


Figura 3.4 Eficiencia de extracción de los resultados promedio para el suelo 3

Para estimar de la concentración en el suelo se calcula primero la eficiencia de extracción, esto es el porcentaje con respecto a la concentración inicial teórica de 500 ppm para criseno y antraceno y 50 ppm para el dibenzo(a,h)antraceno, tal como se muestra en la figura A 3.5 correspondiente a la tabla A 3. 9

Tabla 3.9 Porcentaje recuperado durante la extracción de muestras del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	36.858857	39.164332	18.922576
4	85.968699	77.491231	47.961857
8	21.704914	19.117055	12.63893
16	53.838731	48.479284	27.504415
32	45.125545	51.477011	27.793579
64	51.132924	90.655384	58.536685
90	21.894693	63.326319	57.98874
132	1.4551686	26.442261	23.882767

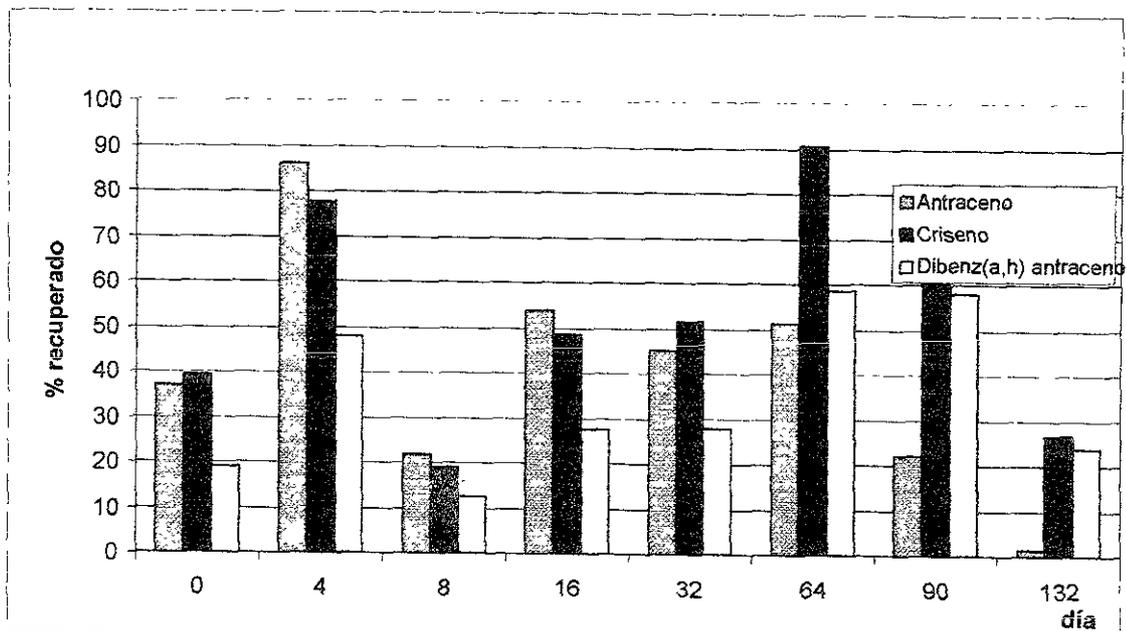


Figura A 3.5 Porcentaje recuperado en la extracción del los HPA, en el suelo con HPA e inoculo (tratamiento 3).

Siguiendo con el procedimiento de cálculo indicado se debe obtener la relación de proporcionalidad que existe entre el estándar interno y los otros dos HPA, observando en este caso que la linealidad sólo se cumplió para los primeros 32 días, como se reporta en la tabla A 3.10 y se ilustra en la figura A 3.6, se observa que la proporción entre el antraceno y el dibenzo(a,h) antraceno es de 1.8 veces y con el criseno de 1.72 veces.

Tabla A 3.10 Correlación de dibenzo(a,h)antraceno con criseno y antraceno en el suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

Dibenzo(a,h)antraceno	Antraceno	Criseno
18.92	36.86	39.16
47.96	85.97	77.49
12.64	21.70	19.12
27.50	53.84	48.48
27.79	45.13	51.48

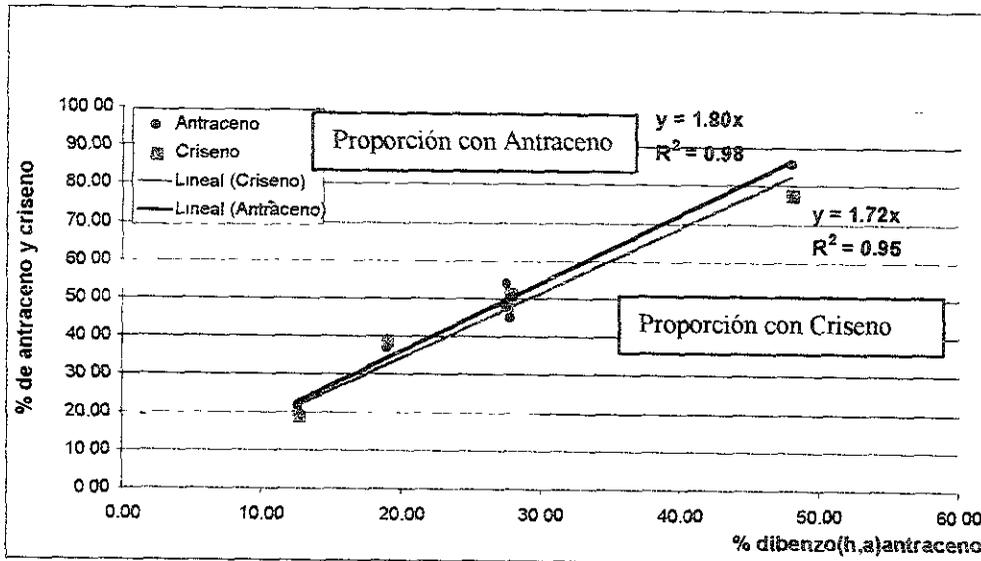


Fig 3.6 Proporción del dibenzo(h,a)antraceno con criseno y antraceno en el suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

Haber encontrado que la linealidad de correlación entre el estándar interno y los otros dos HPA solo se cumplió para los primeros 32 días se debe a que a diferencia del suelo dos, en el suelo tres hay biodegradación del antraceno y criseno (anexo 4). Sin embargo, se debe recordar que el dibenzo(a,h)antraceno no se degrada, y que para calcular la concentración de antraceno y criseno en suelo con respecto al estándar interno es necesario estimar la relación de proporcionalidad entre los porcentajes de extracción, lo cual se realiza con los datos que presenten esta linealidad y se supone igual para el resto de los datos.

Tabla A 3.11 Normalización de antraceno y criseno con respecto al dibenzo(a,h)antraceno en el tratamiento 3.

Día	Antraceno	Criseno	dibenz(a,h)antraceno
0.00	1.08	1.20	1.00
4.00	1.00	0.94	1.00
8.00	0.95	0.88	1.00
16.00	1.09	1.02	1.00
32.00	0.90	1.08	1.00
64.00	0.49	0.90	1.00
90.00	0.21	0.63	1.00
132.00	0.03	0.64	1.00

Tomar al dibenzo(a,h)antraceno como estándar interno implica que éste debe tenerse como a la unidad y expresar los otros dos compuestos en función del primero, de acuerdo al relación de proporción que mantienen. De esta forma los porcentajes reportados para antraceno y criseno se dividen entre 1.8 y 1.72 respectivamente para dividirse a su vez entre el porcentaje de dibenzo(a,h)antraceno del día de la muestra correspondiente tal como se señala en la tabla A 3.11. Posteriormente se multiplican los resultados obtenidos de esta normalización de antraceno, criseno y dibenzo(a,h)antraceno por un factor que permite obtener la concentración inicial teórica para el día cero. Este factor se utiliza los días sucesivos, para antraceno y criseno respectivamente. De esta forma se tienen las concentraciones que existen realmente en el suelo, las cuales se reportan en la tabla A 3.12 integrando en ésta el porcentaje de remoción que se calcula a partir de la concentración inicial encontrada.

Tabla A 3.12 Concentración promedio de HPA, en el suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

Día	Conc. ppm Antraceno	Conc. ppm Criseno	Conc. ppm Dibenzo(a,h) antraceno	remoción antraceno	remoción Criseno	remoción dibenzo(a,h) antraceno
0.00	497.79	500.58	50.00	0.00	0.00	0.00
4.00	458.07	390.77	50.00	7.98	21.94	0.00
8.00	438.87	365.83	50.00	11.84	26.92	0.00
16.00	500.24	426.30	50.00	-0.49	14.84	0.00
32.00	414.92	447.95	50.00	16.65	10.51	0.00
64.00	223.23	374.57	50.00	55.16	25.17	0.00
90.00	96.49	264.12	50.00	80.62	47.24	0.00
132.00	15.57	267.78	50.00	96.87	46.51	0.00

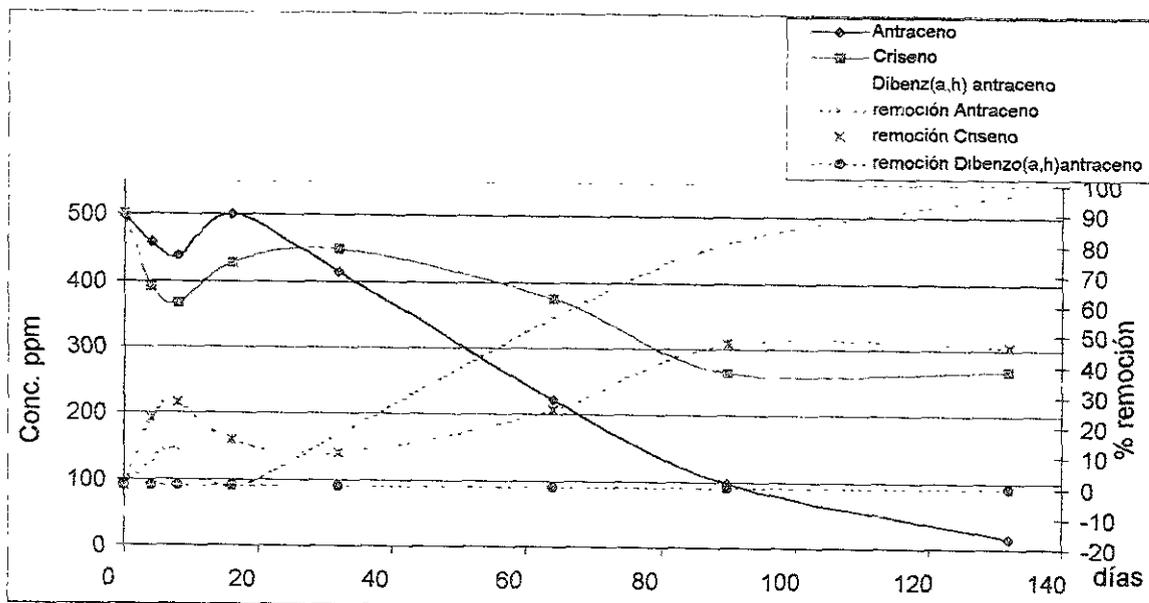


Figura A 3 7. Concentración promedio de HPA, en un suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

El cálculo de la concentración de HPA en el tratamiento 3, tiene como sustento el procedimiento que se estableció para evaluar los factores abióticos que se presentan en el tratamiento 2. Teniendo en cuenta que los resultados iniciales obtenidos en los tratamientos 5, 6, 7 y 8, tienen un comportamiento similar al que presenta los resultados iniciales del tratamiento 2, ver anexo 2. Se establece entonces que, para encontrar la concentración en estos suelos se utilice al dibenzo(a,h) antraceno como estándar interno. Siguiendo el procedimiento que se hizo para los datos promedio del tratamiento 2, incluso para establecer que dicho procedimiento tiene validez cuando se aplica en forma individual, se aplicará para cada una de las series de resultados del suelo tres, para posteriormente aplicarse a los suelos restantes. Asimismo como evidencia de que en el tratamiento 3 la remoción de HPA es por un microorganismo se lleva a cabo la cuenta en placa de las unidades formadoras de colonias (UFC) siguiendo el procedimiento del anexo 4. Dado que el procesamiento de los resultados se hará en forma repetitiva se hace una secuencia de cada uno de los pasos a seguir:

- Los resultados del análisis cromatográfico (anexo 2) se corrigen por el factor de dilución correspondiente quedando expresada la concentración en ppm (mg HPA por kg de suelo seco), Con los resultados obtenidos se calcula la eficiencia de extracción al ser divididos entre la concentración teórica agregada, antraceno y criseno entre 500ppm y 50ppm para dibenzo(a,h)antraceno.
- El factor de proporción se obtiene al hacer la correlación de la eficiencia de extracción del dibenzo(a,h)antraceno con la de antraceno y criseno, mediante el análisis estadístico de regresión lineal en los casos en que esto sea posible, de lo contrario la estimación de proporcionalidad se hará con datos obtenidos para el día cero.
- El porcentaje de antraceno y criseno se divide entre el factor de proporción correspondiente que se obtiene en el paso anterior y posteriormente se divide entre el porcentaje de dibenzo(a,h)antraceno correspondiente incluso este mismo
- Los resultados obtenidos para el antraceno y criseno se multiplican por 500 y 50 para el dibenzo(a,h)antraceno obteniendo de esta forma la concentración de HPA en el suelo

A continuación se presentan los resultados que surgen en cada uno de los pasos de la secuencia de cálculo establecida, comenzando con las muestras de extracto crudo y primera fracción del "clean up" de suelo con HPA e inóculo de las series (a) y (b), de esta forma se obtiene la concentración real para cada una de la series con lo que se calcula el promedio y la desviación estándar de cada uno de los días de muestreo, la cual se compara con la obtenida a partir de los resultados promedio que se reportan en la tabla A 3 12.

Tablas A3 13. Muestra de tratamiento 3 a. a) Concentración inicial corregida por factor de dilución. b) Porcentaje de recuperación en la extracción. c) Proporción de Dibenzo(a,h)antraceno con el antraceno y criseno

a)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	159.18	167.37	8.45
4	346.50	310.48	19.44
8	109.69	93.53	4.85
16	242.49	217.05	12.42
32	198.16	221.29	11.88
64	174.31	338.52	18.50
80	80.56	277.85	23.41
132	7.04	134.63	11.60

b)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	0.32	0.33	0.17
4	0.69	0.62	0.39
8	0.22	0.19	0.10
16	0.48	0.43	0.25
32	0.40	0.44	0.24
64	0.35	0.68	0.37
80	0.16	0.56	0.47
132	0.01	0.27	0.23

c)

Dibenz(a,h) antraceno	Antraceno	Criseno
0.17	0.32	0.33
0.39	0.69	0.62
0.10	0.22	0.19
0.25	0.48	0.43
0.24	0.40	0.44
0.37	0.35	0.68
0.47	0.16	0.56
0.23	0.01	0.27

Proporción

Criseno = 1.72 veces

Antraceno = 1.82 veces

Dibenzo(a,h) antraceno

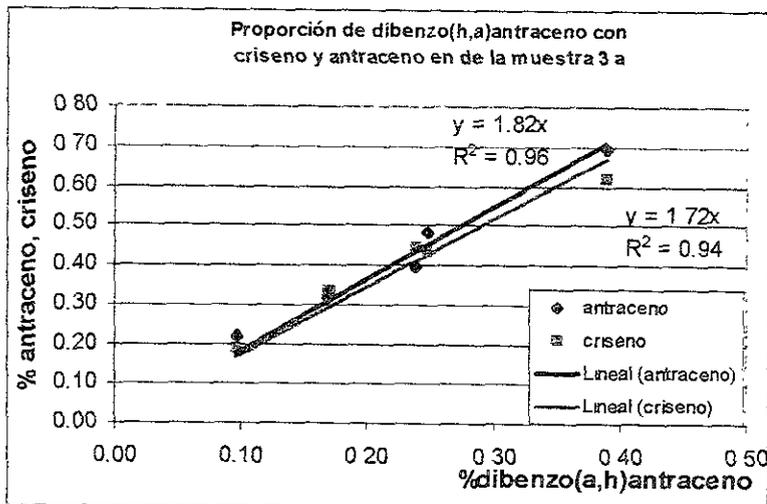


Figura A3 8. Proporción de Dibenzo(a,h) antraceno con el antraceno y criseno

Tablas A3 14. Muestra de tratamiento 3 a. a) Porcentaje antraceno o criseno entre la proporción correspondiente. b) División de antraceno, criseno entre el porcentaje de Dibenz(a,h)antraceno. c) Concentración de HPA en la muestra 3a del tratamiento 3.

a)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	0.17	0.19	0.17
4	0.38	0.36	0.39
8	0.12	0.11	0.10
16	0.27	0.25	0.25
32	0.22	0.26	0.24
64	0.19	0.39	0.37
80	0.09	0.32	0.47
132	0.01	0.16	0.23

b)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	1.04	1.15	1.00
4	0.98	0.93	1.00
8	1.24	1.12	1.00
16	1.07	1.02	1.00
32	0.92	1.08	1.00
64	0.52	1.06	1.00
80	0.19	0.69	1.00
132	0.03	0.67	1.00

c)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	496.88	500.99	50.00
4	470.07	403.91	50.00
8	596.55	487.75	50.00
16	514.91	441.99	50.00
32	440.02	471.21	50.00
64	248.55	462.90	50.00
80	90.75	300.13	50.00
132	16.00	293.41	50.00

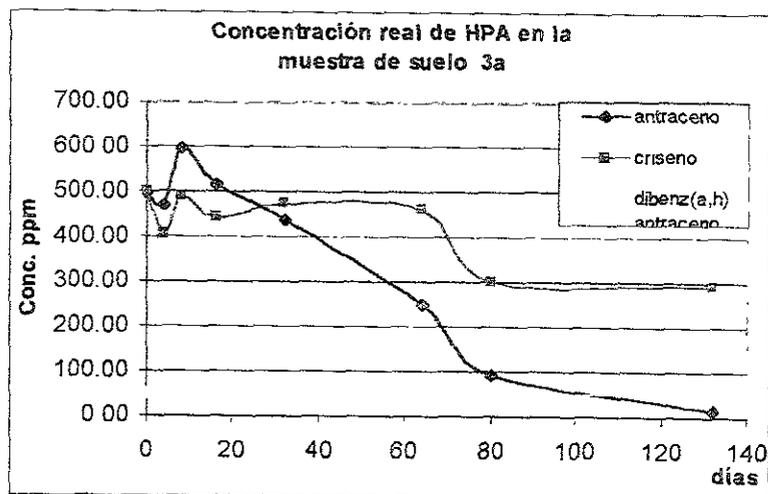


Figura A3 9. Concentración de HPA en la muestra de tratamiento 3a

Tablas A3 15. Muestra de tratamiento 3 a "crudo. a) Concentración inicial corregida por factor de dilución. b) Porcentaje de recuperación en la extracción. c) Proporción de dibenzo(a,h)antraceno con el antraceno y criseno

a)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
0	195.44	212.08	10.82
4	480.30	447.21	30.95
8	123.39	109.92	6.03
16	271.03	245.64	14.90
32	257.88	291.14	18.67
64	215.00	508.46	33.48
80	92.85	317.08	27.16
132	7.37	136.57	11.65

b)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
0	0.39	0.42	0.22
4	0.96	0.89	0.62
8	0.25	0.22	0.12
16	0.54	0.49	0.30
32	0.52	0.58	0.37
64	0.43	1.02	0.67
80	0.19	0.63	0.54
132	0.01	0.27	0.23

c)

Dibenz(a,h) antraceno	Antraceno	Criseno
0.22	0.39	0.42
0.62	0.96	0.89
0.12	0.25	0.22
0.30	0.54	0.49
0.37	0.52	0.58
0.67	0.43	1.02
0.54	0.19	0.63
0.23	0.01	0.27

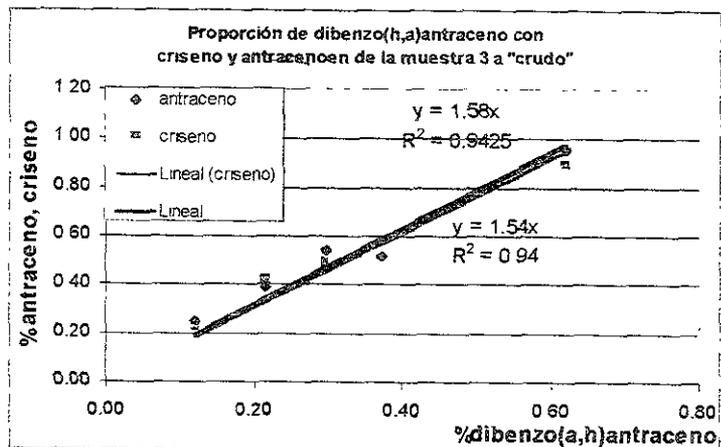


Figura A3 10. Proporción de Dibenzo(a,h) antraceno con el antraceno y criseno

Tablas A3 16. Muestra de tratamiento 3 a "crudo". a) División de porcentaje antraceno, criseno entre la proporción correspondiente. b) división de antraceno, criseno entre el porcentaje de Dibenz(a,h)antraceno. c) Concentración de HPA en la muestra 3 a "crudo" del tratamiento 3

a)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	0.25	0.28	0.22
4	0.61	0.58	0.62
8	0.16	0.14	0.12
16	0.34	0.32	0.30
32	0.33	0.38	0.37
64	0.27	0.66	0.67
80	0.12	0.41	0.54
132	0.01	0.18	0.23

b)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	1.14	1.27	1.00
4	0.98	0.94	1.00
8	1.29	1.18	1.00
16	1.15	1.07	1.00
32	0.87	1.01	1.00
64	0.41	0.99	1.00
80	0.22	0.76	1.00
132	0.04	0.76	1.00

c)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	503.01	509.09	50.00
4	432.13	375.28	50.00
8	569.39	473.10	50.00
16	506.42	428.09	50.00
32	384.65	405.03	50.00
64	178.84	394.48	50.00
80	95.19	303.20	50.00
132	17.62	304.45	50.00

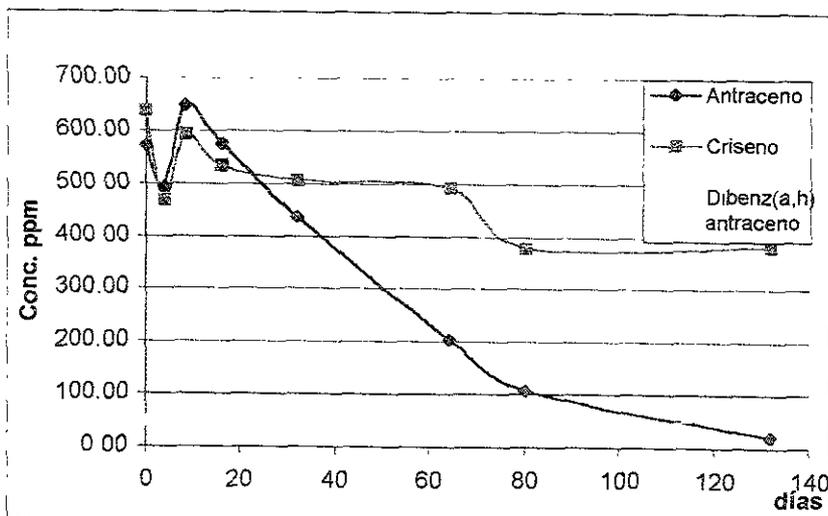


Figura A3 11. Concentración de HPA en el suelo con tratamiento 3a "crudo"

Tablas A3 17. Muestra de tratamiento 3 b. a) Concentración inicial corregida por factor de dilución. b) Porcentaje de recuperación en la extracción. c) Proporción de Dibenzo(a,h)antraceno con el antraceno y criseno

a)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	169.26	175.43	8.31
4	373.14	331.62	19.08
8	90.84	78.88	4.57
16	278.84	248.17	13.94
32	187.26	220.00	10.91
64	294.65	441.00	26.88
80	131.28	307.61	30.93
132	7.19	121.67	11.67

b)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	0.34	0.35	0.17
4	0.75	0.66	0.38
8	0.18	0.16	0.09
16	0.56	0.50	0.28
32	0.37	0.44	0.22
64	0.59	0.88	0.54
80	0.26	0.62	0.62
132	0.01	0.24	0.23

c)

Dibenz(a,h) antraceno	Antraceno	Criseno
0.15	0.34	0.35
0.38	0.75	0.66
0.09	0.18	0.16
0.28	0.56	0.50
0.22	0.37	0.44
0.54	0.59	0.88
0.62	0.26	0.62
0.23	0.01	0.24

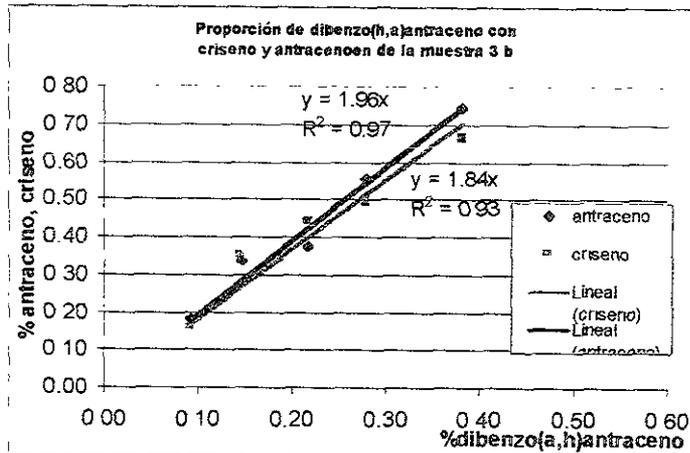


Figura A3 12. Proporción de Dibenzo(a,h) antraceno con el antraceno y criseno

Tablas A3 18. Muestra de tratamiento 3 b. a) División de porcentaje antraceno, criseno entre la proporción correspondiente. b) división de antraceno, criseno entre el porcentaje de Dibenz(a,h)antraceno. c) Concentración de HPA en la muestra 3b del tratamiento 3

a)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	0.17	0.19	0.17
4	0.38	0.36	0.38
8	0.09	0.09	0.09
16	0.28	0.27	0.28
32	0.19	0.24	0.22
64	0.30	0.48	0.54
80	0.13	0.33	0.62
132	0.01	0.13	0.23

b)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	1.04	1.15	1.00
4	1.00	0.94	1.00
8	1.01	0.94	1.00
16	1.02	0.97	1.00
32	0.88	1.10	1.00
64	0.56	0.89	1.00
80	0.22	0.54	1.00
132	0.03	0.57	1.00

c)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	498.80	504.81	50.00
4	478.99	415.66	50.00
8	486.88	412.78	50.00
16	489.80	425.65	50.00
32	420.19	482.04	50.00
64	268.46	392.34	50.00
80	103.96	237.86	50.00
132	15.09	249.29	50.00

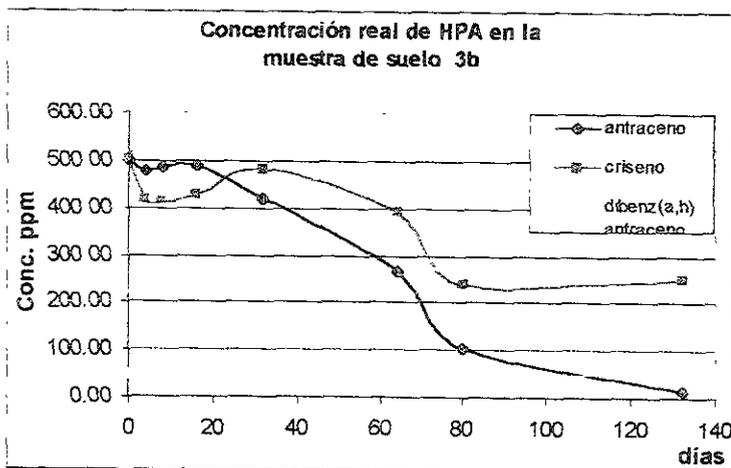


Figura A3 13. Concentración de HPA en el suelo con tratamiento 3b

Tablas A3 19. Muestra de tratamiento 3 b "crudo". a) Concentración inicial corregida por factor de dilución. b) Porcentaje de recuperación en la extracción. c) Proporción de Dibenzo(a,h)antraceno con el antraceno y criseno

a)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	213.30	228.41	10.27
4	519.43	460.52	26.45
8	110.17	100.02	6.40
16	284.42	258.72	13.74
32	259.20	297.11	14.13
64	338.70	525.12	38.22
80	133.20	363.98	34.48
132	7.50	135.97	12.84

b)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	0.43	0.46	0.21
4	1.04	0.92	0.53
8	0.22	0.20	0.13
16	0.57	0.52	0.27
32	0.52	0.59	0.28
64	0.68	1.05	0.76
80	0.27	0.73	0.69
132	0.02	0.27	0.26

c)

Dibenz(a,h) antraceno	Antraceno	Criseno
0.26	0.43	0.46
0.53	1.04	0.92
0.13	0.22	0.20
0.27	0.57	0.52
0.28	0.52	0.59
0.76	0.68	1.05
0.69	0.27	0.73
0.26	0.02	0.27

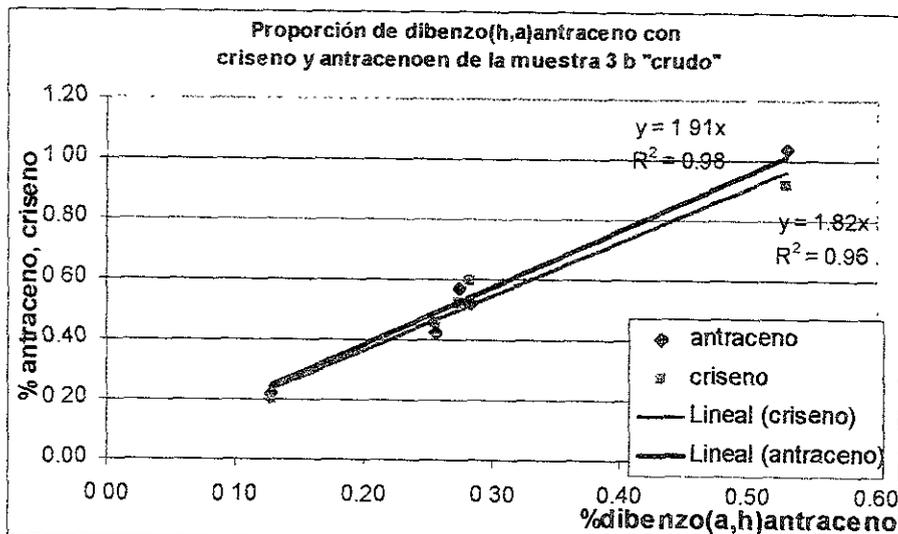


Figura A3 14. Proporción de Dibenzo(a,h) antraceno con el antraceno y criseno

Tablas A3 20. Muestra de tratamiento 3 b "crudo". a) División de porcentaje antraceno ,criseno entre la proporción correspondiente. b) división de antraceno, criseno entre el porcentaje de Dibenz(a,h)antraceno. c) Concentración de HPA en la muestra 3b "crudo" del tratamiento 3

a)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antracene
0	0.22	0.25	0.21
4	0.54	0.51	0.53
8	0.12	0.11	0.13
16	0.30	0.28	0.27
32	0.27	0.33	0.28
64	0.35	0.58	0.76
80	0.14	0.40	0.69
132	0.01	0.15	0.26

b)

día	antraceno	criseno	dibenz(a,h) antracene
0	1.09	1.22	1.00
4	1.03	0.96	1.00
8	0.90	0.86	1.00
16	1.08	1.03	1.00
32	0.96	1.16	1.00
64	0.46	0.75	1.00
80	0.20	0.58	1.00
132	0.03	0.58	1.00

c)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenz(a,h) antraceno
0	500.41	501.24	50.00
4	472.92	392.18	50.00
8	414.78	352.22	50.00
16	498.43	424.10	50.00
32	441.93	473.82	50.00
64	213.43	309.51	50.00
80	93.05	237.84	50.00
132	14.07	238.59	50.00

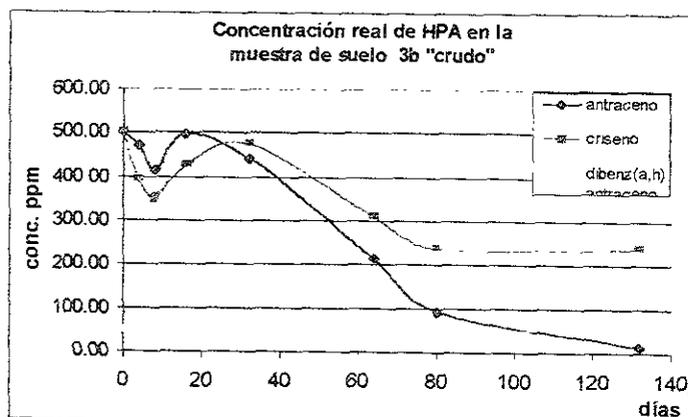


Figura A3 15. Concentración de HPA en la muestra de tratamiento 3b "crudo"

días	antraceno (a)	antraceno "crudo" (a)	antraceno (b)	antraceno "crudo" (b)	promedio	desviación estándar
0	496.88	503.01	498.80	500.41	499.77	± 2.59
4	470.07	432.13	478.99	472.92	463.53	± 21.26
8	596.55	569.39	486.88	414.78	516.90	± 82.52
16	514.91	506.42	489.80	498.43	502.39	± 10.76
32	440.02	384.65	420.19	441.93	421.70	± 26.58
64	248.55	178.84	268.46	213.43	227.32	± 39.53
80	90.75	95.19	103.96	93.05	95.74	± 5.78
132	16.00	17.62	15.09	14.07	15.69	± 1.50

días	criseno (a)	Criseno "crudo" (a)	criseno (b)	Criseno "crudo" (b)	promedio	desviación estándar
0	500.99	509.09	504.81	501.24	504.03	± 3.80
4	403.91	375.28	415.66	392.18	396.76	± 17.23
8	487.75	473.10	412.78	352.22	431.46	± 62.00
16	441.99	428.09	425.65	424.10	429.96	± 8.18
32	471.21	405.03	482.04	473.82	458.02	± 35.63
64	462.90	394.48	392.34	309.51	389.81	± 62.76
80	300.13	303.20	237.86	237.84	269.76	± 36.87
132	293.41	304.45	249.29	238.59	271.44	± 32.37

A 3.3 Análisis de resultados en el suelo con relación C:P 100:1 (tratamiento 5)

Tablas A3 30. Muestra de tratamiento 5. a) Concentración inicial corregida por factor de dilución. b) Porcentaje de recuperación en la extracción. c) Proporción de Dibenzo(a,h)antraceno con el antraceno y criseno

a)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
0	232.34	231.41	11.79
5	103.12	94.64	6.00
8	262.45	283.08	20.67
16	205.94	210.11	15.87
32	113.34	127.13	9.42

B)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
0	0.465	0.463	0.236
5	0.206	0.189	0.120
8	0.525	0.566	0.413
16	0.412	0.420	0.317
32	0.227	0.254	0.188

C)

Día	Antraceno	Criseno
0.236	0.465	0.463
0.120	0.206	0.189
0.413	0.525	0.566
0.317	0.412	0.420
0.188	0.227	0.254

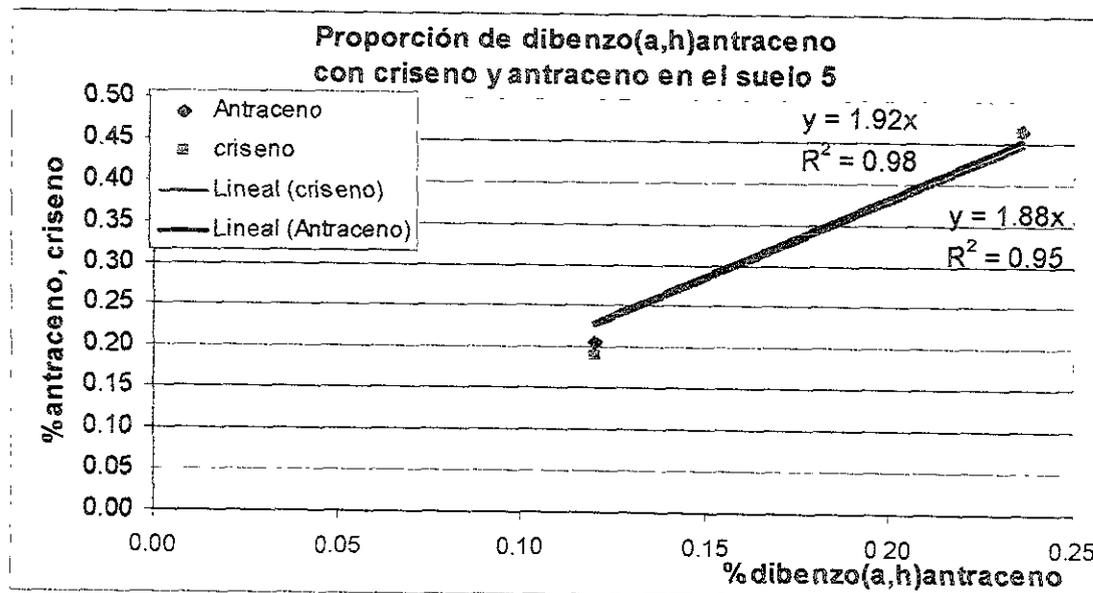


Figura A3 25. Proporción de Dibenzo(a,h) antraceno con el antraceno y criseno

Tablas A3 31. Muestra de tratamiento 5. a) División de porcentaje antraceno ,criseno entre la proporción correspondiente. b) división de antraceno, criseno entre el porcentaje de Dibenzo(a,h)antraceno. c) Concentración de HPA en el tratamiento 5

a)

Día	Antraceno	criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
0	0.24	0.25	0.24
5	0.11	0.10	0.12
8	0.27	0.30	0.41
16	0.22	0.22	0.32
32	0.12	0.14	0.19

B)

Día	Antraceno	criseno	Dibenzo(a,h) antraceno
0	1.03	1.04	1.00
5	0.90	0.84	1.00
8	0.66	0.73	1.00
16	0.68	0.70	1.00
32	0.63	0.72	1.00

c)

Día	Antraceno	criseno	Dibenzo(a,h) antraceno	% rem Antraceno	% rem Criseno
0	515.87	522.01	50.00	0.00	0.00
5	450.02	419.60	50.00	12.76	19.62
8	332.45	364.29	50.00	35.56	30.21
16	339.62	352.01	50.00	34.17	32.57
32	315.11	359.09	50.00	38.92	31.21

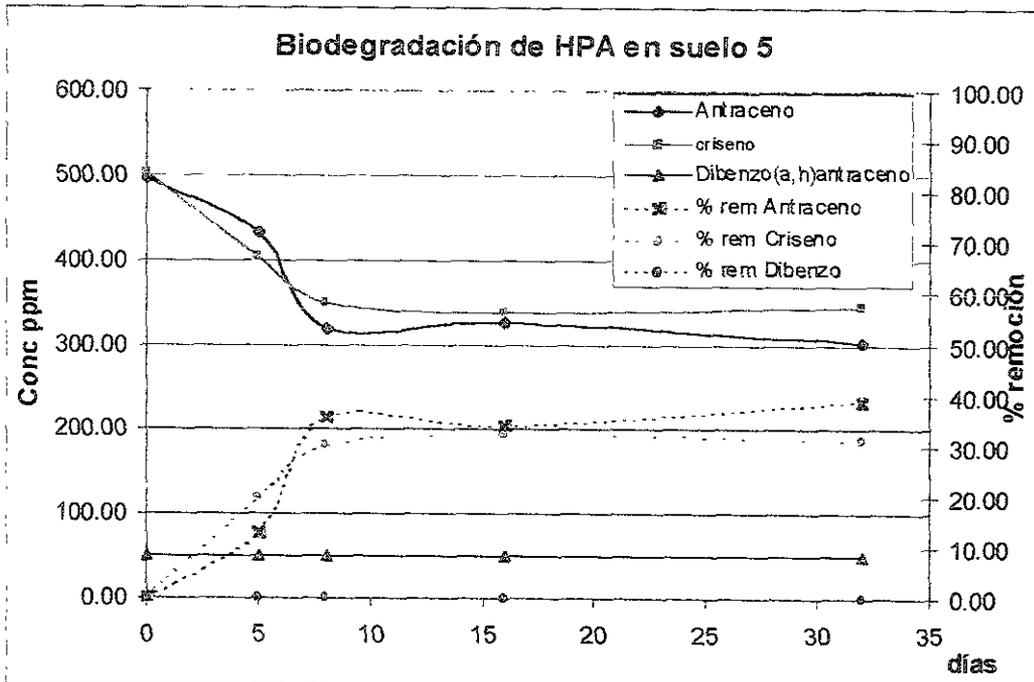


Figura A3 26. Concentración de HPA en la muestra de tratamiento 5

A 3.4 Análisis de resultados en el suelo con relación C:N:P 100:10:1 (tratamiento 6)

Tablas A3 32. Muestra de tratamiento 6. a) Concentración inicial corregida por factor de dilución. b) Porcentaje de recuperación en la extracción. c) Proporción de Dibenzo(a,h)antraceno con el antraceno y criseno

a)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno
0	172.17	174.43	13.79
5	191.61	194.74	16.18
8	267.77	298.09	23.42
16	56.96	53.57	8.79
32	131.39	129.30	19.97

B)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno
0	34.43	34.89	27.58
5	38.32	38.95	32.35
8	53.55	59.62	46.83
16	11.39	10.71	17.57
32	26.28	25.86	39.94

c)

Dibenzo(a,h)antraceno	Antraceno	Criseno
27.578	34.433	34.885
32.354	38.323	38.948
46.833	53.553	59.618
17.574	11.392	10.714
39.938	26.279	25.860

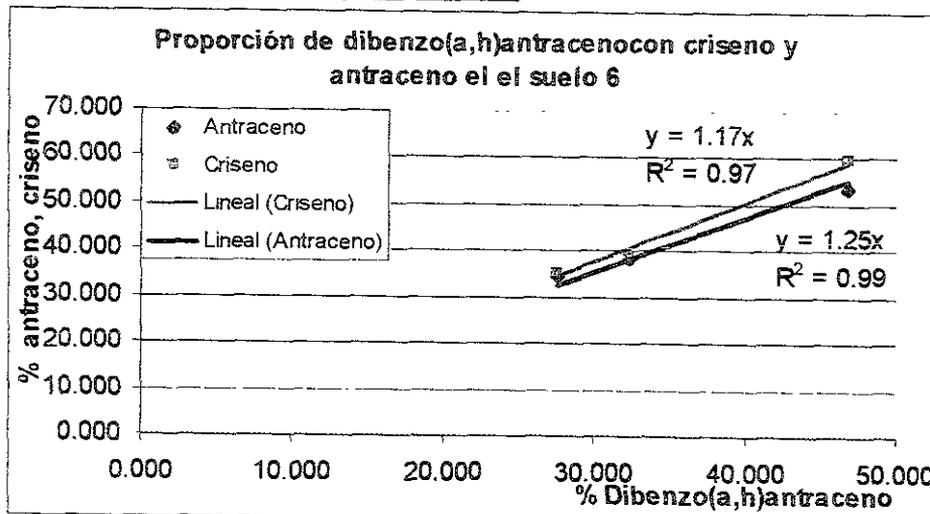


Figura A3 27. Proporción de Dibenzo(a,h) antraceno con el antraceno y criseno

Tablas A3 33. Muestra de tratamiento 6. a) División de porcentaje antraceno, criseno entre la proporción correspondiente
 b) división de antraceno, criseno entre el porcentaje de Dibenzo(a,h)antraceno
 c) Concentración de HPA en el tratamiento 6

a)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno
0	29.43	27.91	27.58
5	32.75	31.16	32.35
8	45.77	47.69	46.83
16	9.74	8.57	17.57
32	22.46	20.69	39.94

B)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno
0	1.07	1.01	1.00
5	1.01	0.96	1.00
8	0.98	1.02	1.00
16	0.55	0.49	1.00
32	0.56	0.52	1.00

c)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno	% rem Ant	% rem Criseno
0.00	495.18	499.56	50.00	0.96	0.09
5.00	521.94	500.79	50.00	-4.39	-0.16
8.00	486.14	440.31	50.00	2.77	11.94
16.00	464.07	462.42	50.00	7.19	7.52
32.00	261.51	259.00	50.00	47.30	48.81

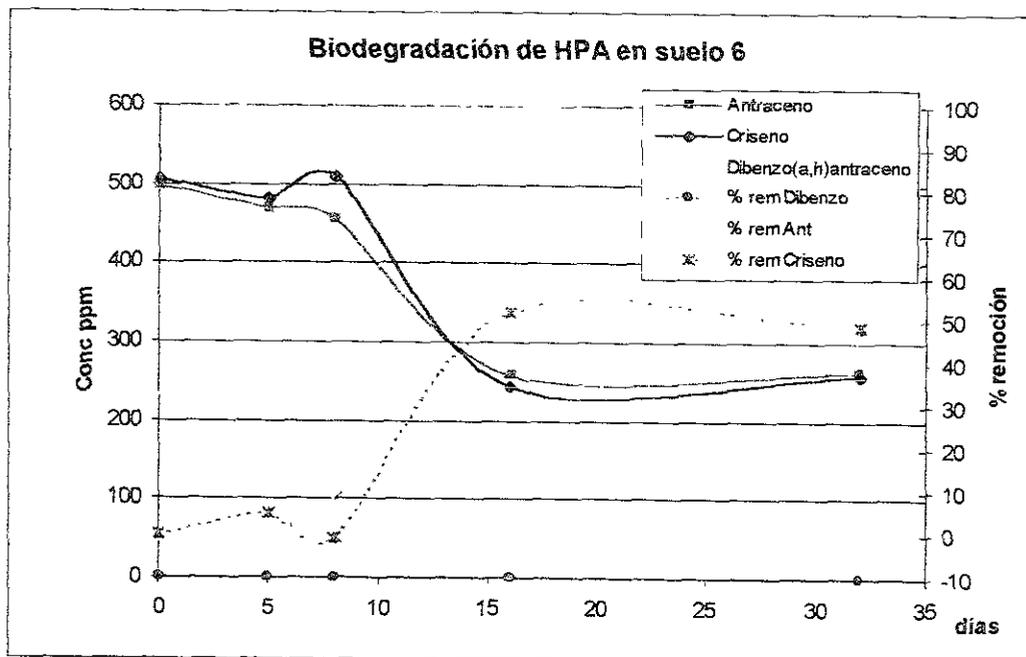


Figura A3 28. Concentración de HPA en el tratamiento 6

A 3.5 Análisis de resultados en el suelo con relación C:N:P 100:10:1 pH=4.2 (tratamiento 7)

Tablas A3 34. Muestra del suelo con tratamiento 7. a) Concentración inicial corregida por factor de dilución. b) Porcentaje de recuperación en la extracción. c) Proporción de Dibenzo(a,h)antraceno con el antraceno y criseno

a)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno
0	212.21	218.97	18.07
5	96.75	94.94	7.82
8	223.97	207.48	19.43
16	192.40	196.09	17.48

b)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno
0	42.44	43.79	36.15
5	19.35	18.99	15.63
8	44.79	41.50	38.86
16	38.48	39.22	34.97

c)

Dibenzo(a,h)antraceno	Antraceno	Criseno
36.15	42.44	43.79
15.63	19.35	18.99
38.86	44.79	41.50
34.97	38.48	39.22

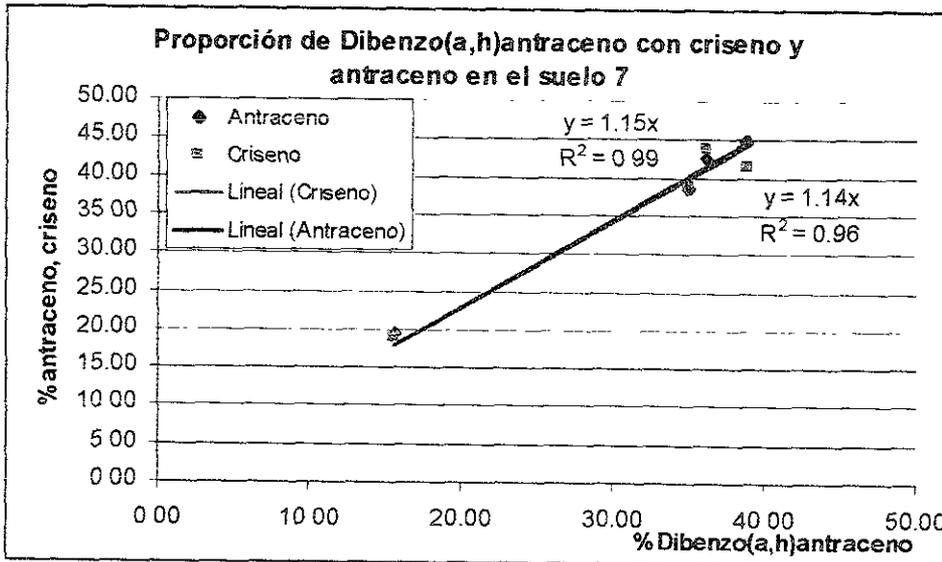


Figura A3 29. Proporción de Dibenzo(a,h) antraceno con el antraceno y criseno

Tablas A3 35. Muestra de tratamiento 7. a) División de porcentaje antraceno, criseno entre la proporción correspondiente. b) división de antraceno, criseno entre el porcentaje de Dibenzo(a,h)antraceno. c) Concentración de HPA el tratamiento 7.

a)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno
0	36.91	38.58	36.15
5	16.83	16.73	15.63
8	38.95	36.56	38.86
16	33.46	34.55	34.97

b)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno
0	1.02	1.07	1.00
5	1.08	1.07	1.00
8	1.00	0.94	1.00
16	0.96	0.99	1.00

c)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno	% remo Antrac	% rem Criseno
0	495.18	499.56	50.00	0.96	0.09
5	511.17	500.79	50.00	-2.23	-0.16
8	486.14	440.31	50.00	2.77	11.94
16	464.07	462.42	50.00	7.19	7.52

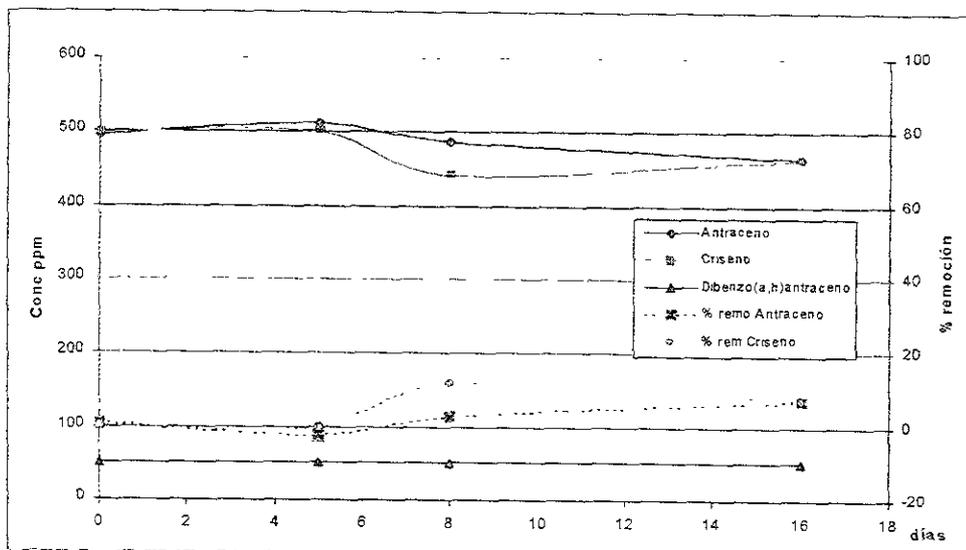


Figura A3 30. Concentración de HPA en el suelo con relación C:N:P 100:10:1, pH 4.2 (tratamiento 7)

A 3.6 Análisis de resultados en el suelo con relación C:N:P 100:10:1 pH=9.2 (tratamiento 8)

Tablas A3 36. Muestra de tratamiento 8. a) Concentración inicial corregida por factor de dilución. b) Porcentaje de recuperación en la extracción. c) Proporción de Dibenzo(a,h)antraceno con el antraceno y criseno.

a)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno
0	182.45	187.06	14.10
5	218.01	225.43	17.62
8	212.84	211.50	15.46

b)

Día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno
0	36.49	37.41	28.20
5	43.60	45.09	35.24
8	42.57	42.30	30.92

c)

Dibenzo(a,h)antraceno	Antraceno	Criseno
28.20	36.49	37.41
35.24	43.60	45.09
30.92	42.57	42.30

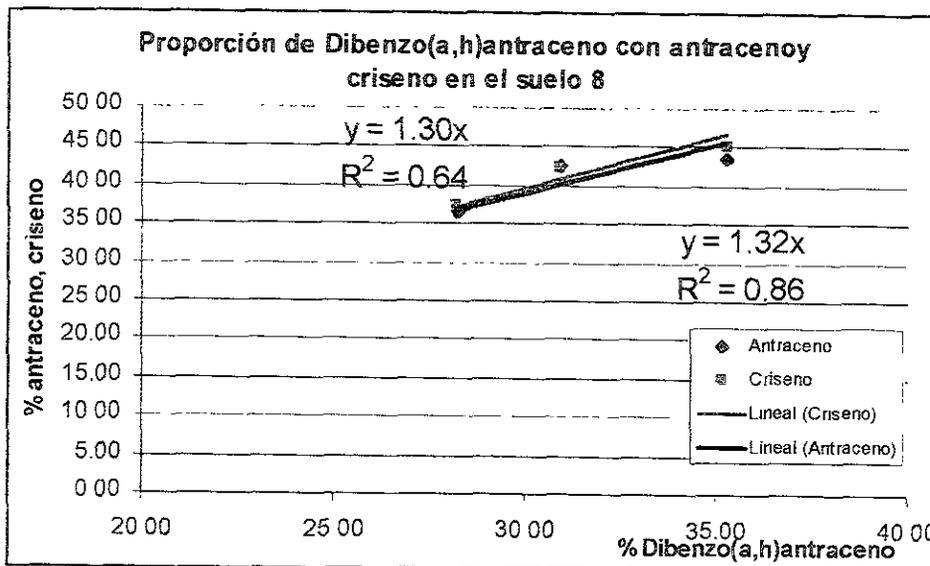


Figura A3 31. Proporción de Dibenzo(a,h) antraceno con el antraceno y criseno.

Tablas A3 37. Muestra de tratamiento 8. a) División de porcentaje de antraceno, criseno entre la proporción correspondiente. b) división de antraceno, criseno entre el porcentaje de Dibenzo(a,h)antraceno. c) Concentración de HPA en el suelo con relación C:N:P 100:10 1, pH 9.2 (tratamiento 8).

a)

día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno
0	28.07	28.34	28.20
5	33.54	34.16	35.24
8	32.74	32.05	30.92

b)

día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno
0	1.00	1.01	1.00
5	0.95	0.97	1.00
8	1.06	1.04	1.00

c)

día	Antraceno	Criseno	Dibenzo(a,h)antraceno	% remo Antrac	% rem Criseno
0	497.74	502.59	50.00	6.00	3.02
5	490.10	499.11	50.00	1.98	0.18
8	508.36	497.52	50.00	-1.67	0.50

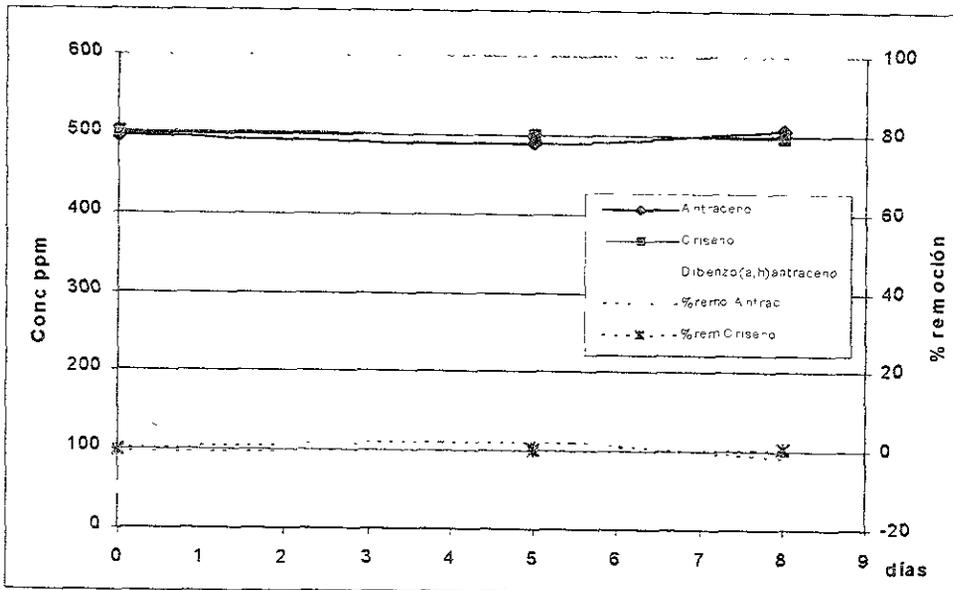


Figura A3 32. Concentración de HPA en el tratamiento 8.

Anexo 4 MÉTODO MICROBIOLÓGICO PARA CUANTIFICACIÓN DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)

Como se indicó en el capítulo 4, la disminución de antraceno o criseno durante los diferentes tratamientos realizados en el suelo se debe a degradación de los microorganismos. Sin embargo, con el fin de aportar mas evidencias que permitan comprobar que la remoción de los HPA es por microorganismos, se procedió a determinar la cantidad de microorganismos presentes. Para lograr aislar y cuantificar los microorganismos se propuso el medio de cultivo utilizado por Ronald D. Flechter (Wise y Trantolo, 1994) que se describe a continuación a continuación:

En un tubo de ensaye se preparará una fase sólida* constituida por fosfatos y nitratos, y una fase líquida de hidrocarburo sobrenadante sobre la fase sólida. De este modo el microorganismo toma los nutrientes necesarios de la fase sólida y la fuente de carbono la proporciona el hidrocarburo. Se utilizo como hidrocarburo antraceno y criseno manteniendo concentraciones similares a las de suelo contaminado (500 ppm en hexano).

El inóculo a cuantificar se obtuvo de la dilución de un gramo de suelo contaminado en 100 mL de caldo "Casoy", del cual se tomó 0.2 mL que se depositan en el hidrocarburo sobrenadante.

Después de una semana se tomó una alicuota del hidrocarburo sobrenadante y se sembró en cajas de petri con medio de "Trypticase-Soya-Agar" dejando incubar por 48 horas, después de esto se procediendo a contar las colonias formadas.

* Fase sólida

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
NaNO ₃	0.5 g
CaCl ₂	0.02 g
MgSO ₂	0.2 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1.0 g
Agar	15.0 g
H ₂ O	1000 mL