



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MÉXICO**

**INSTITUTO DE GEOFÍSICA**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA TIERRA**

**“BIODISPONIBILIDAD Y TOXICIDAD DE HIDROCARBUROS  
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN SUELOS ORGÁNICOS  
CONTAMINADOS CON DERRAMES DE PETRÓLEO”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**(GEOLOGÍA AMBIENTAL)**

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

**ROSAURA PAEZ BISTRAIN**

**TUTORA: DRA. SILKE CRAM HEYDRICH**



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.

## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero y pleno agradecimiento a la Dra. Silke Cram Heydrich, por su dedicación en la dirección de este trabajo, por su confianza y paciencia. Muchas gracias.

A la Dra. Christina Siebe Gabrach por sus comentarios y sugerencias para la mejora de este trabajo.

Al Dr. Jesús Espinoza por sus observaciones para el mejor desarrollo de esta investigación y por la revisión de este documento.

A la Dra. Claudia Ponce de León Hill por el tiempo dedicado a la revisión y mejora de este trabajo de investigación.

Al Dr. Gilberto Díaz González por su apoyo y asesoría en la determinación de HAPs y por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Al Dr. Rutilio Ortiz Salinas por su apoyo en el análisis de suelo, en la determinación de HAPs y sobre todo por la amistad ganada en este proceso.

A la QFB. Claudia Luz Hernández Villegas por su asesoría técnica en el manejo del laboratorio bajo un sistema de calidad.

A la M en C. Estela Carmona Jiménez por su asesoría en los análisis físicos y químicos del suelo.

A los amigos y compañeros del LAFQA que de una u otra manera fueron un apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

A la Candidata a Dra. Guadalupe Ponce Velez por sus observaciones para mejorar la técnica de determinación de hidrocarburos en suelo, y por siempre estar ahí.

A las M en C. Claudia García Ruelas, Laura Bringas y a la Q. A. Enedina Chávez por su apoyo incondicional en todo momento y por su invaluable amistad.

Dedico este trabajo con todo mi amor:

A

Martín, Pamela, Melissa y Samantha  
por ser la luz de mi vida.

A mis padres  
Angela Bistrain y Daniel Paez

A

Sandy e Ivan



**Expreso mi reconocimiento a:**

Laboratorio de Análisis Físicos y Químicos del Ambiente del Instituto de Geografía UNAM, por el uso de sus instalaciones.

Al CONACYT por la beca otorgada durante la realización de la Maestría

Al proyecto CONACYT/SEMARNAT C1-2002-826 "Contaminación de suelos con hidrocarburos aromáticos policíclicos en el Estado de Tabasco: fuentes, disponibilidad y toxicidad" por los recursos otorgados para la realización de esta investigación.

**Índice**

<b>1 Introducción</b>	1
<b>2 Marco teórico</b>	
2.1 Hidrocarburos del petróleo	3
2.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos	4
2.3 Comportamiento de los hidrocarburos en el suelo	5
2.4 Transformación de los hidrocarburos en el suelo	11
2.5 Biodisponibilidad de los hidrocarburos en el suelo	12
2.6 Toxicidad de los hidrocarburos en el suelo	17
<b>3 Objetivos</b>	19
<b>4 Hipótesis</b>	19
<b>5 Metodología</b>	20
5.1 Determinación de HAPs Totales	21
5.2 Determinación de HAPs solubles	23
5.3 Ensayo de toxicidad y bioacumulación para lombrices ( <i>Eisenia fetida</i> )	24
<b>6 Resultados y discusión</b>	
6.1 Caracterización edafológica	26
6.2 Contenidos totales de HAPs (extracción soxhlet)	27
6.3 HAPs solubles (extracción acuosa en fase sólida)	30
6.4 Coeficientes de distribución de HAPs (Koc)	37
6.5 Ensayo de bioacumulación	39
6.6 Toxicidad aguda.	47
<b>7 Conclusiones y recomendaciones</b>	51
<b>8 Referencias</b>	52
<b>9 Anexos</b>	60

## Resumen

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) se han convertido en contaminantes cada vez más frecuentes en el suelo. Dado que estos contaminantes, tienen efectos tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos su presencia en el suelo puede presentar un riesgo de salud pública. El comportamiento y destino de las HAPs están influenciados por diferentes factores bióticos y abióticos. Uno de estos factores incluye la sorción en la materia orgánica del suelo, afectando la biodisponibilidad de los contaminantes con el tiempo. El objetivo general de este estudio fue la evaluación de la biodisponibilidad y toxicidad de HAPs en suelos con altos contenidos de materia orgánica que han sido afectados por derrames de petróleo en diferentes tiempos (antiguos y recientes). La metodología empleada comprendió técnicas de rutina en suelos para la determinación de pH, conductividad eléctrica, materia orgánica y textura. La determinación de HAPs totales en el suelo se realizó por cromatografía de gases con detector de ionización de flama, previa extracción Soxhlet y limpieza en columna de los extractos. La determinación de la fracción disponible de HAPs, se realizó mediante una extracción acuosa en fase sólida usando TENAX-TA y cuantificando por cromatografía de gases-FID. Para evaluar la toxicidad y posteriormente la bioacumulación se siguió el método recomendado por la OECD (1984), teniendo como organismo de prueba lombrices de tierra de la especie *Eisenia fetida*. Los HAPs determinados en todos los casos fueron los 16 que considera la EPA como prioritarios. Para los derrames recientes, los promedios de las concentraciones totales (suma de los 16 HAPs) van de  $75.6 \pm 27.7 \mu\text{g g}^{-1}$  a  $222 \pm 41.5 \mu\text{g g}^{-1}$ . En los derrames antiguos encontramos concentraciones desde  $15 \pm 2 \mu\text{g g}^{-1}$  hasta  $110 \pm 19 \mu\text{g g}^{-1}$ . En lo que respecta a las concentraciones obtenidas por extracción acuosa en fase sólida, esta represento entre el 1.5 y el 5 % de la concentración total. En este trabajo se calculo el coeficiente de distribución entre la materia orgánica del suelo y el agua (Koc) tanto para derrames recientes como antiguos, encontrandose que en ambos casos son más bajos que los calculados a partir de la fórmula empírica según Karickhoff. Estos resultados confirman que al persistir o envejecer los HAPs en el suelo, se van haciendo menos disponibles, ya que son secuestrados por la materia orgánica del suelo. En cuanto a la bioacumulación, la concentración de HAPs más alta determinada fue de  $3.17 \mu\text{g g}^{-1}$  en tejidos de lombriz, mientras que la más baja fue de  $0.84 \mu\text{g g}^{-1}$  lo que representa el 3.62, y 1.17% de la concentración total determinada en el suelo respectivamente. El factor de bioacumulación fue menor de 1 en la mayoría de los compuesto, sin embargo el antraceno (2.03), benzo(k)fluoranteno (1.14) y benzo(a)pireno (1.19) muestran un proceso de bioacumulación en los organismos expuestos. Respecto a la toxicidad aguda, estimada a partir del porcentaje de sobrevivencia de los organismos expuesto, la muestra más tóxica permitió solo el 50 % de sobrevivencia, mientras que los menos tóxicos tuvieron una sobrevivencia de 90 y 98 % respectivamente. En general, diversos investigadores han observado una disminución en la biodisponibilidad y por ende en la bioacumulación y el efecto tóxico de compuestos orgánicos conforme el tiempo de envejecimiento de los contaminantes aumenta.

## **1. INTRODUCCIÓN**

Un suelo contaminado se puede definir como aquel que tiene alteradas sus características biogeoquímicas con respecto a su estado natural, y que entraña un riesgo potencial con respecto al medio ambiente, la salud humana y los recursos naturales (I Congreso nacional del Medio Ambiente, España, 1999). En México, el problema de los suelos contaminados es importante, ya que se estima que de las 450 000 toneladas de residuos que se generan diariamente, aproximadamente 14 000 corresponden a residuos peligrosos (INE, 1996). Esto ha hecho que nuestro país cuente con gran cantidad de sitios contaminados por diversas actividades y que en la mayoría de los casos se desconozcan los niveles de afectación debido a la falta de monitoreo. Dicho problema tiende a agravarse con el tiempo, ya que está directamente relacionado con la producción cada vez mayor de residuos industriales, y con la inadecuada y a veces inexistente gestión de los mismos (Iturbe et al., 1999).

La industria petrolera en su conjunto ha tenido un gran impacto negativo en materia ambiental, y debido a la amplia gama de productos derivados del petróleo, no ha sido posible evaluar cuantitativamente la contaminación involucrada desde la fase de explotación hasta la obtención de los petroquímicos básicos (Saval, 1995).

En el sureste mexicano se encuentra un gran número de sitios contaminados a diferentes niveles, resultado de la actividad petrolera de aproximadamente 50 años. Particularmente en el estado de Tabasco es difícil determinar con exactitud la extensión de terrenos contaminados debido a los intereses políticos y económicos en la región (Adams, *et al.* 1999)

Son diversas las fuentes de contaminación asociadas con la explotación petrolera, pero cuatro de ellas son consideradas las más comunes: 1) lodos de perforación de tipo inversa y recortes, 2) derrames en suelo por tuberías corroídas, 3) "tiraderos" de desechos semisólidos, y 4) descargas de petroquímicas y refinerías, al ambiente sin control alguno (Adams, *et al.* 1999).

Los principales contaminantes considerados en el diagnóstico de suelos influenciados por actividades de la industria petrolera son compuestos inorgánicos; como vanadio y níquel presentes en el crudo, bario y cromo de los lodos de perforación; vanadio, níquel y

molibdeno de los catalizadores gastados; así como compuestos orgánicos, principalmente hidrocarburos del petróleo (aromáticos, poliaromáticos y parafinas); también fenoles, aminas y nitrilos de los procesos petroquímicos (Guzmán, *et al.* 1999). De los compuestos orgánicos mencionados, la Agencia para la Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA por sus siglas en inglés), ha identificado 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos como contaminantes prioritarios. Ellos son importantes ambientalmente debido a que muchos, individualmente, son genotóxicos causantes de mutaciones y de ciertos tipos de cáncer.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son liberados al ambiente de diversas fuentes, entre las que se encuentran por un lado las actividades relacionadas con la industria petrolera (derrames de crudo, disposición de agua residual, quema de derrames y emisiones de los quemadores), la quema de combustibles fósiles por automotores e industrias (gasolina, diesel, etc.), la quema intencional de vegetación, así como a fuentes naturales (incendios forestales y actividad volcánica) (Cole, 1994).

La cuantificación total de estos compuestos orgánicos puede demostrar la presencia de un contaminante en cantidades potencialmente tóxicas en el suelo. Sin embargo, esto no necesariamente refleja condiciones de toxicidad o mutagenicidad actual para la micro y macrobiota del suelo o para la población humana en el área, ya que esto más bien depende de la concentración que esta disponible para ser incorporada por los organismos. La disponibilidad de los HAPs está relacionada con el tiempo de residencia de los compuestos en el suelo. Los HAPs con mayor número de anillos son adsorbidos prácticamente de forma irreversible, después de periodos de residencia largos en el suelo (meses o años). Debido a esta unión irreversible el riesgo ambiental asociado a estos HAPs es mucho menor que el sugerido a partir de la concentración total encontrada. De ahí la importancia de realizar ensayos biológicos, complementarios a las determinaciones químicas, que permitan vislumbrar cuánto de los HAPs que se encuentran en el suelo puede ser transportado y acumulado por los organismos.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Hidrocarburos del petróleo

En la industria petrolera, la palabra "**crudo**" se refiere al petróleo en su forma natural no refinada, el cual es un líquido oleaginoso, inflamable, cuyo color varía de incoloro a negro, y consiste en una mezcla compleja de hidrocarburos con pequeñas cantidades de otros compuestos. Esta variedad de hidrocarburos forma una serie que va desde el asfalto grueso y pesado, o cera sólida a temperaturas ordinarias, hasta los aceites muy volátiles, tales como los que se encuentran en la gasolina, y técnicamente incluye también hidrocarburos gaseosos. En la tabla 1 se presenta la composición "promedio" de un petróleo crudo según Koons (1973) citado en Botello (1996).

**Tabla 1.** Composición típica de un petróleo crudo (Koons, 1973), citado en Botello (1996)

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

La proporción de los diferentes hidrocarburos que integran el petróleo crudo varía en cada yacimiento, de lo que resulta la existencia de petróleos crudos que varían desde un líquido opaco, negro y grueso, tan pesado como el agua y que contiene muy poco – algunas veces nada – de los hidrocarburos que se usan como gasolina, hasta aquellos crudos que pueden contener 40% o más de esos componentes de la gasolina, de color claro y transparente y con tres cuartos del peso del agua; en casos extremos, un

yacimiento puede producir solamente hidrocarburos que se convierten en gases al salir a la superficie.

El número de los componentes individuales en los diferentes tipos de petróleo es muy grande (más de 100 compuestos diferentes) y el dilema de interpretación se agrava, debido a la alteración del petróleo, ya sea por mecanismos fisicoquímicos ( i.e., foto-oxidación, evaporación, dilución) o bien por efecto de los microorganismos que están presentes en el suelo (Douglas, et al., 1996). Así la composición química de los petróleos de las diferentes regiones productoras, y aún los provenientes de una misma región, varían ampliamente, ya que contienen cientos de diferentes compuestos químicos originados y ensamblados de manera distinta durante su formación geoquímica (Botello, 1996). Estos factores también producen diferencias importantes en las propiedades ambientales tales como la solubilización, volatilización, oxidación fotoquímica y microbiológica y toxicidad biológica.

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

## **2.2 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) están asociados al aumento en la incidencia de diversos tipos de cáncer en el hombre. Algunos de estos compuestos son carcinógenos y/o mutágenos y posibles disruptores endócrinos, por lo que su determinación en muestras ambientales es importante para el control de exposición (Mastandrea *et al*, 2005).

Los HAPs son moléculas orgánicas no polares constituidas por dos o más anillos bencénicos íntimamente ligados o conectados en su estructura molecular. Estos pueden presentarse como no sustituidos o bien presentar una sustitución en un átomo de hidrógeno por grupos metilo. En la tabla 2 se dan algunas características de 31 HAP's de interés ambiental. Los compuestos van del naftaleno ( $C_{10}H_8$ , dos anillos) hasta el coroneno ( $C_{24}H_{12}$ , siete anillos); compuestos con nitrógeno, azufre y oxígeno son

frecuentemente incluidos en la clasificación de los HAPs. (Dzomback y Luthy, 1984). El petróleo crudo contiene de 0.2 a 7% de HAPs, el cual se incrementa con la gravedad específica del petróleo. En general los HAPs tienen baja solubilidad en agua, altos puntos de fusión y ebullición y baja presión de vapor. La solubilidad decrece, los puntos de ebullición y fusión se incrementan y la presión de vapor decrece con el incremento en el peso molecular (Kalf, *et al.*, 1997).

Podemos clasificarlos en dos clases de hidrocarburos aromáticos: los de bajo peso molecular que tienen de 2 a 3 anillos aromáticos como el naftaleno, fluoreno, fenantreno y antraceno y derivados, y los de alto peso molecular que tienen de 4 a 7 anillos aromáticos como el criseno, benzo(a)pireno y coroneno .

Sus características físicas y químicas varían de acuerdo a su peso molecular, y en consecuencia, su distribución y destino en el ambiente, lo mismo sus efectos en los sistemas biológicos. Los HAP's de alto peso molecular son relativamente inmóviles, y por ende, de baja volatilidad y solubilidad. Como regla general la persistencia del compuesto aumenta al aumentar su tamaño y por consecuencia tiende a bioacumularse.

Dieciséis HAP's (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoreno, benzo(k)fluoreno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(ah)antraceno y benzo(ghi)perileno) son considerados como contaminantes prioritarios por la Environmental Protection Agency (EPA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comunidad Económica Europea (CEE) debido a sus efectos carcinógenicos (Menzie *et al.*, 1992).

### **2.3 Comportamiento de los hidrocarburos en el suelo.**

Cuando un contaminante entra en el suelo, está sujeto a diferentes procesos, los cuales determinan si se degrada o persiste en el ambiente edáfico. Dichos procesos dependen de la combinación de diversos factores; entre los más importantes se encuentran las propiedades químicas de los compuestos, las propiedades del suelo, las condiciones climatológicas y las interacciones de la micro y macrobiota en el suelo (Figura 1) (Hatzinger y Alexander, 1995, Carmichael *et al.*, 1997).

Antes de que ocurra un derrame de petróleo, aire y agua están distribuidos en los espacios intersticiales de las diferentes zonas del suelo; después de que ocurre un derrame, los hidrocarburos del petróleo compiten con el agua y el aire por los espacios porosos. El vapor de los hidrocarburos puede rápidamente desplazar al aire, mientras que el volumen de los hidrocarburos líquidos compete con el agua por los espacios

intersticiales disponibles; moviéndose hacia abajo debido a la fuerza de gravedad, aunque puede ocurrir una migración horizontal debido a la fuerza de capilaridad entre el líquido derramado y las partículas del suelo (Cole, 1994).

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

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

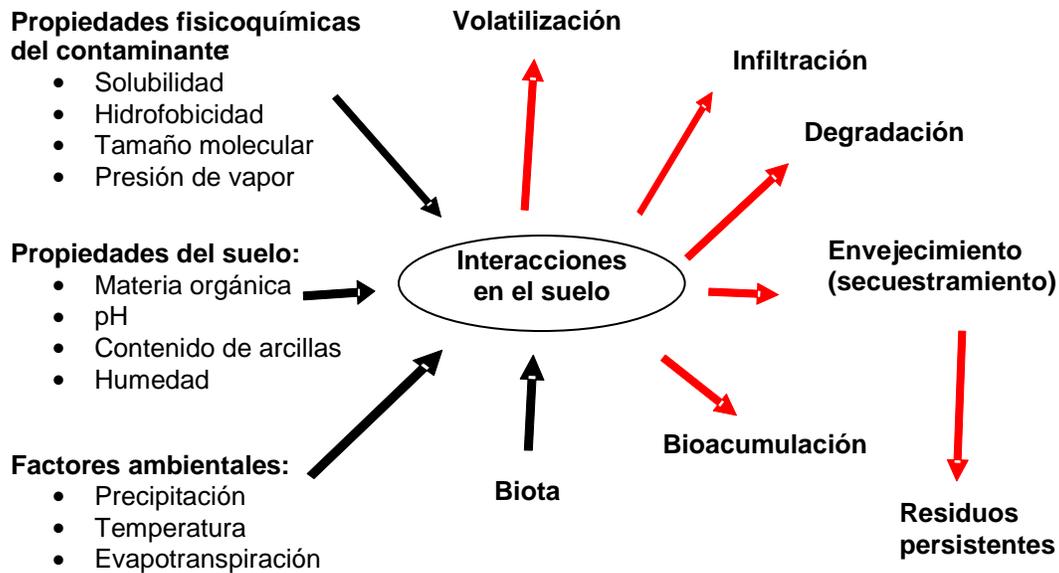
Continuación Tabla 2.

Compuesto	Peso Molecular	Fórmula Molecular	Número de anillos	Potencial Carcinogénico <sup>a</sup>	Solubilidad en agua µg/L	Enlistado como contaminante <sup>b</sup>
Benzo (j) fluoranteno	252	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	5	++		W
Benzo (k) fluoranteno	252	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	5	–		E, W
Benzo (a) pireno	252	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	5	+++	3.8	E, W
Benzo(e) pireno	252	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	5	–	5.5	
Perileno	252	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	5	–	0.4	
Dibenz (a,c) antraceno	278	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	5	+		
Dibenz (a,h) antraceno	278	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	5	+++	2.49	E
Antantreno	276	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	6	-		
Benzo (g,h,i) perileno	276	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	6		0.26	E, W
Dibenzo (a,h) pireno	302	C <sub>24</sub> H <sub>14</sub>	6	+++		
Dobenzo (a,i) pireno	302	C <sub>24</sub> H <sub>14</sub>	6	+++		
Dibenzo (a,l) pireno	302	C <sub>24</sub> H <sub>14</sub>		±		
Coroneno	300	C <sub>24</sub> H <sub>12</sub>	7	-	0.14	

<sup>a</sup> Hidrocarburos aromáticos policíclicos

<sup>a</sup> National Academy of Science (1992). – no carcinogénico; ± incierto; + carcinogénico; ++ y +++ fuertemente carcinogénico

<sup>b</sup> Lista de contaminantes en Environmental Protection Agency (E) y World Health Organization (W).



**Figura 1.** Factores que determinan el comportamiento y destino final de los hidrocarburos del petróleo en el suelo .

Los componentes de bajo peso molecular se evaporan rápidamente, variando cerca del 10% en los derrames de petróleo de crudos pesados y productos refinados (Diesel No. 6) hasta más de 75% para crudos ligeros y productos refinados (Diesel No. 2, gasolina). Menos del 5% del petróleo crudo y productos refinados (principalmente aromáticos de bajo peso molecular) se disuelven en agua. Los hidrocarburos expuestos a la luz solar, al aire o al agua pueden ser transformados a compuestos polares oxidados (foto-oxidación) (Albers, 2003).

La presión de vapor es uno de los factores más importantes que gobiernan la volatilización y provee información acerca de la volatilización bajo condiciones ambientales. Algunos factores que afectan dicho fenómeno son: el clima, sorción, hidrólisis y fototransformación. Estableciendo los siguientes enunciados:

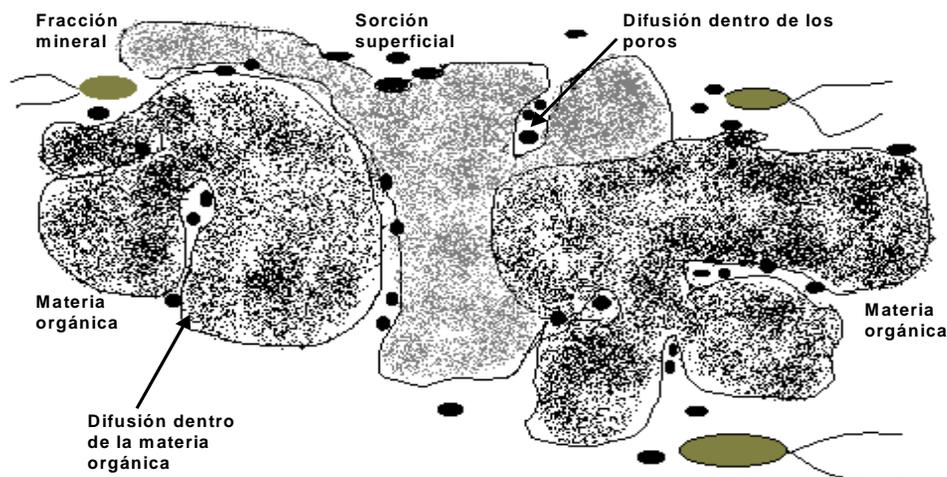
1. Un compuesto químico con una baja presión de vapor tiene una alta capacidad de adsorción o una alta solubilidad en agua siendo menos probable a volatilizarse.
2. Un compuesto químico con una alta presión de vapor tiene una baja capacidad de adsorción o una muy baja solubilidad al agua siendo más probable a volatilizarse.

La concentración de los solutos también tiene un efecto en la sorción de compuestos orgánicos como los HAP's, ya que al verse incrementada, la difusividad de los compuestos aumenta y la sorción disminuye (Braida, et al., 2001).

La importancia de la biota en el destino de los contaminantes orgánicos, se debe a que algunas poblaciones bacterianas responden favorablemente a la adición de parafinas y otros hidrocarburos alifáticos y aromáticos derivados del petróleo, provocando que estos sustratos vertidos en el suelo se transformen e incluso lleguen a desaparecer (Alexander, 1995).

En cuanto a las características del suelo, se ha observado que la lixiviación en texturas gruesas (suelos arenosos y grava) es más rápida que en texturas finas (suelos arcillosos), las cuales tienen mayor capacidad de retener los contaminantes y prevenir su alcance a aguas subterráneas. Además, otros parámetros dinámicos como permeabilidad, conductividad hidráulica y espacio poroso son dependientes de la textura. Por otra parte, el contenido de arcilla está correlacionado con la capacidad de campo, área superficial específica, capacidad de intercambio catiónico; Morrill et al. (1982), observo que las moléculas aromáticas como los HAP's, pueden interactuar con las superficies arcillosas a través de sus electrones p; por ejemplo, el benceno forma un complejo estable a través de sus electrones p en la arcilla o con el cobre, bajo la condición de tener un suelo seco como en el caso de la época de estiaje.

La profundidad de la capa freática determina el tiempo y espacio para la retención y degradación del contaminante previo a su penetración dentro del acuífero, dado por las propiedades de retención del perfil del suelo.



**Figura 2.** Esquema que muestra los posibles procesos de envejecimiento de los contaminantes en el suelo. Tomado de Semple *et. al.*, 2001.

La estructura del suelo es una característica importante ya que las fisuras, grietas o canales sirven como vías de transporte y permiten corrientes transitorias de grandes volúmenes de contaminantes a las aguas subterráneas. En la ausencia de tales canales, la agregación estructural de los suelos induce un flujo más rápido en los macroporos de los agregados, que dentro de los microporos donde los contaminantes potenciales pueden ser retenidos (figura 2). En ocasiones, la estructura del suelo favorece la tendencia para concentrarse en corrientes verticales o convergentes (llamados dedos) que generalmente comienzan en la transición de texturas finas a capas de textura granular, con un gran volumen de la zona superficial y siguiendo un transporte directo de contaminantes a la capa freática (Lesser, 1995).

De las interacciones que se dan en la zona superficial se han conceptualizado algunas relaciones entre el suelo y los contaminantes orgánicos, a través de observaciones indirectas con adsorbentes naturales (Luthy et al., 1997), estableciendo los siguientes procesos:

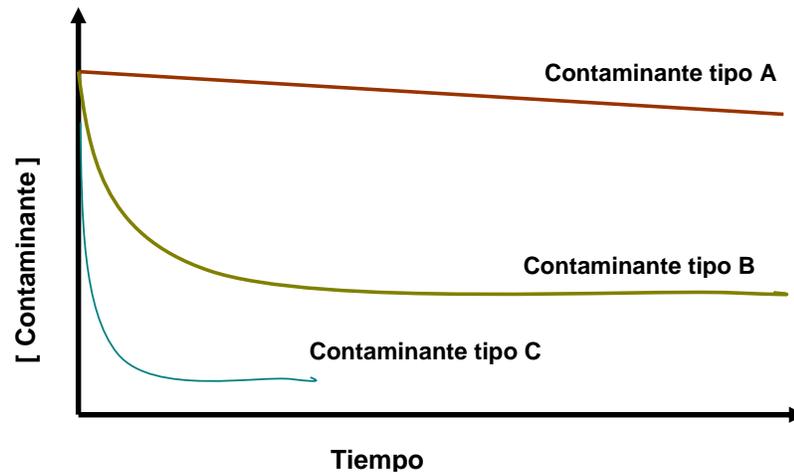
- a. Absorción a la materia orgánica amorfa o natural o en Líquidos de la Fase No Acuosa (LFNA) como es el caso del petróleo,
- b. Absorción a la materia orgánica condensada o en polímeros o residuos de combustión,
- c. Adsorción a superficies orgánicas húmedas (hollín),
- d. Adsorción en superficies minerales (cuarzo)
- e. Adsorción dentro de los microporos o en minerales microporosos (zeolitas) con superficies porosas a saturación de agua < 100 %.

La materia orgánica del suelo se ha correlacionado positivamente con la adsorción de compuestos orgánicos en numerosos estudios. Un efecto inmediato del aumento de este parámetro es el incremento de los sitios de adsorción, disminuyendo la concentración en la fase acuosa y gaseosa del contaminante orgánico como también su transporte y biodisponibilidad. La adsorción es afectada, además, por la hidrofobicidad del contaminante (Mackay et al., 1985).

El destino y comportamiento de los compuestos orgánicos como los HAPs está gobernado además, por factores ambientales tales como la temperatura, la precipitación y la evapotranspiración.

La figura 3 ilustra los patrones de pérdida de tres “tipos” de contaminantes. El tipo A describe a un compuesto químico altamente hidrofóbico, no volátil y no degradable, el

cual persiste en el suelo por largos períodos de tiempo, quizás décadas; el tipo B describe un compuesto químico que inicialmente se pierde del suelo, pero que conforme el tiempo de contacto se incrementa, la tasa de pérdida disminuye; el tipo C se pierde rápidamente y a veces desaparece por completo del suelo (Jones *et al.*, 1996; Semple *et al.*, 2001, Stokes *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Patrones de pérdida para diferentes tipos de contaminantes en el suelo. Tomado de Stokes *et al.*, 2006.

#### 2.4 Transformación de hidrocarburos en el suelo

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

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

Un compuesto orgánico puede ser fototransformado (fotólisis) tanto como pueda absorber luz solar; puede ocurrir en el aire, suelo, agua, plantas y animales. Los productos pueden ser químicos de alto y bajo peso molecular. Las influencias ambientales tienen un efecto en la velocidad de fototransformación, tales como: la profundidad del químico en el suelo y en el agua, sorción en el suelo y pH. La velocidad de fotólisis puede determinar la persistencia en el ambiente; entre más rápida sea la degradación es poco probable que

continúe en el ambiente (vida media < 30 días), si tiene una vida media de 30 a 90 días, el compuesto químico puede afectar algunos compartimentos del ambiente y, si tiene una vida media > 90 días, existen problemas de contaminación (Ney, 1990).

El comportamiento químico del suelo es fundamental para la degradación de muchos químicos orgánicos en una o más reacciones químicas (abióticas); en general, cinco reacciones pueden ocurrir en el suelo: hidrólisis, sustitución, eliminación, oxidación y reducción. Sólo dos reacciones pueden transformar los contaminantes orgánicos que se pueden considerar para este caso:

- Oxidación: Se presenta en el suelo afectando a muchos compuestos químicos aromáticos experimentando una oxidación de radical libre, por ejemplo, benceno, bencidina, etilbenceno, naftaleno y fenol.
- Reducción: Definido en términos de transferencia de electrones, involucra a compuestos orgánicos en sistemas de agua-arcilla. El efecto se acelera al aumento de agua sugiriendo la existencia del mecanismo de transferencia de un electrón donde la arcilla actúa como un aceptor .
- Degradación biológica: Las transformaciones microbianas de los compuestos químicos orgánicos son clasificadas de la siguiente manera: (1) biodegradación (el contaminante es usado como sustrato para el crecimiento); (2) comensalismo (el contaminante es transformado por reacciones metabólicas sin ser usado como fuente de energía); (3) acumulación (el contaminante es incorporado dentro del microorganismo); (4) polimerización o conjugación (el contaminante es ligado con otro compuesto orgánico); y (5) efectos secundarios de la actividad microbiana (el contaminante es transformado debido a un efecto microbiano indirecto, i.e., modificaciones de pH) (Bollag y Liu, 1990). En ecosistemas naturales la biodegradación de los compuestos orgánicos es debida principalmente a bacterias heterótrofas y actinomicetes, algunas bacterias autótrofas, hongos incluyendo basidiomicetes y levaduras, y protozoarios específicos (Pierzynski *et al.*, 1994).

## 2.5 Biodisponibilidad

Actualmente se ha incrementado el reconocimiento de que la respuesta de un ecosistema o una población en riesgo no es controlada por la concentración total de un contaminante que reside en un receptor, sino por la porción de éste, que es biológicamente disponible. Los efectos adversos que son exhibidos por estos contaminantes, son determinados por los procesos físico-químicos que permiten la retención y los procesos biológicos que

favorecen su liberación y acumulación en un ecosistema. La biodisponibilidad, es entonces una medida de la fracción de un contaminante que está disponible para ser absorbida, metabolizada y/o acumulada por organismos subsecuentes a lo largo de la cadena trófica. Es importante destacar que el contaminante que entra en receptores ecológicos o humanos, requiere satisfacer tres condiciones (Reible, 1999):

1. Exposición del receptor a la matriz en la cual el contaminante reside.
2. Existencia de una fracción del contaminante que no esté irreversiblemente secuestrada o complejada en la matriz en la cual reside.
3. La habilidad de un organismo para asimilar la fracción potencialmente disponible del contaminante.

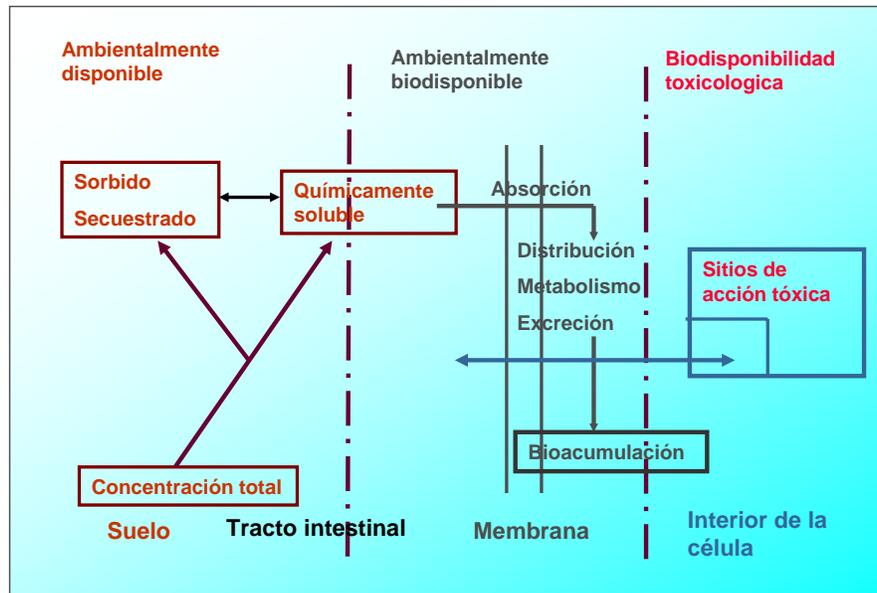
Kelsey et al. (1997) mostraron que la biodisponibilidad es diferente para diferentes organismos. Los microorganismos “ven” más compuestos disponibles que la lombrices, por ejemplo. Esto se puede explicar por el hecho de que debido a su tamaño, los microorganismos pueden penetrar en los microporos, en donde las lombrices no tienen acceso.

Los procesos intrasuelo en los que se ven involucrados los contaminantes, disminuyen la biodisponibilidad y promueven la formación de residuos no disponibles con el tiempo (Figura 4). Esta disminución en la disponibilidad de un compuesto con el tiempo, ha sido denominada “envejecimiento” (Hatzinger y Alexander, 1995).

La naturaleza y alcances del envejecimiento es dependiente primeramente de las características intrínsecas del contaminante, fundamentalmente de parámetros como la solubilidad en agua ( $K_{ow}$ ), y la presión de vapor y puede ocurrir en diferentes formas incluyendo: sorción dentro de los constituyentes inorgánicos del suelo (por la difusión de compuestos dentro de áreas espacialmente remotas, como los macro, micro y nano poros) ( Nam y Alexander, 1998; Pignatello y Xing, 1996; Ball y Roberts, 1991) y sorción dentro de la materia orgánica del suelo ( Nam, *et al.*, 1998; Xing y Pignatello, 1997; Brusseau *et al.*, 1991). La influencia de la materia orgánica del suelo ha sido propuesta por algunos investigadores como el factor más importante que domina las interacciones entre los contaminantes y el suelo (Brusseau et al., 1991; Cornelissen et al., 1998).

Se reconoce generalmente la existencia de tres reservorios de contaminantes asociados al suelo después del envejecimiento: 1) una fracción que se resorbe rápidamente; 2) una fracción que se resorbe lentamente y 3) una fracción que se denomina residuo enlazado o no extractable (Semple *et al.*, 2001).

La porción del contaminante que no es secuestrado puede ser denominado como ambientalmente disponible y será esta fracción la que esté en posibilidades de interactuar con los organismos del suelo (Lanno et al., 2004).



**Figura 4.** Modelo esquemático de la biodisponibilidad, según Lanno et al, 2004.

En general, la biodisponibilidad de compuestos orgánicos puede ser estudiada desde dos perspectivas diferentes: 1) biológica (biodegradación, toxicidad, bioacumulación) y 2) química (extracción de fracciones solubles).

1. Desde el punto de vista biológico, la concentración biodisponible de un compuesto es estimada utilizando organismos de diferentes niveles tróficos. Las investigaciones se han enfocado principalmente en la utilización de ensayos de biodegradación con microorganismos en donde se evalúa la mineralización de compuestos orgánicos marcados con  $^{14}\text{C}$  (Smith, *et al.*, 1997; Richterich *et al.*, 1998). Otras técnicas que se han desarrollado, inicialmente en el ambiente acuático, son los ensayos de bioluminiscencia; estas técnicas proveen un medio para evaluar la biodisponibilidad midiendo el impacto de los contaminantes ambientales en la actividad de microorganismos productores de luz. La luminiscencia esta ligada a la cadena transportadora de electrones del organismo, y es por lo tanto, una medida de la actividad metabólica de la célula (Sousa, *et al.*, 1998; Bundy, *et al.*, 2001; Paton, *et al.*, 2005). Otra evidencia experimental de la

biodisponibilidad de un contaminante, la proporcionan los ensayos de genotoxicidad (Alexander y Alexander, 1999; Alexander, et al., 1999; Haeseler et al., 1999).

Los estudios de bioacumulación pueden proveer una medida directa de la biodisponibilidad de un contaminante, cuando el análisis químico de un suelo o sedimento no lo hacen. La bioacumulación es el proceso que causa un incremento en la concentración de un compuesto químico en un organismo comparado con la que existe en el agua, suelo o sedimento en el que se desarrolla, debido a la absorción por todas las rutas de exposición incluyendo la absorción por la alimentación, transporte a través de la respiración y absorción dérmica. El factor de bioacumulación (FBA) es la relación de la concentración de un químico en el organismo  $C_B$  con la del suelo  $C_S$  (Mackay y Fraser, 2000):

$$FBA = C_B/C_S$$

La bioacumulación ocurre cuando la tasa a la cual un organismo ingiere un compuesto químico excede la tasa a la cual es excretado. Los ensayos de bioacumulación incluyen el estudio de residuos en organismos expuestos a un contaminante por un tiempo determinado y en condiciones controladas (Linthurst et al, 1995).

Las lombrices de tierra (Annelida: Oligochaeta) han sido usadas para medir la biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo realizando ensayos de bioacumulación (Belfroid et al., 1995; Ma et al., 1995; Meharg, 1996; Fitzgerald et al., 1997; Jager, 2004), ya que poseen cualidades necesarias para biomonitorrear ecosistemas terrestres contaminados. Entre las cualidades más importantes se encuentran: tamaño corporal grande, tamaño poblacional alto, fáciles de coleccionar e identificar, su relativa inmovilidad en el suelo, su estrecho contacto y alto consumo del sustrato proveen las propiedades óptimas para un bioindicador (Heimbach, 1992 ).

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

Las normas de la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD, 1984) y la European Economic Community (EEC, 1985), recomiendan a *Eisenia foetida* y *E. andrei* como organismos de prueba, debido a que ambas especies son comúnmente encontradas en compostas y pueden ser fácilmente cultivadas en el laboratorio en un sustrato de estiércol de caballo o vaca (OECD, 1984 ).

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

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

2. Con respecto a la determinación química de la biodisponibilidad, recientemente, se han desarrollado numerosos métodos de laboratorio para predecir la disponibilidad de algunos contaminantes, sin embargo ninguno de estos métodos ha sido extensivamente probado para hidrocarburos del petróleo. Dichas investigaciones se basan en la remoción de los hidrocarburos fácilmente disponibles mediante la extracción en fase sólida (SPE) (Cornelissen *et al.*, 1998; MacRead y Hall, 1998; Tang *et al.*, 1999; Morrison *et al.*, 2000) oxidación con persulfato (Cuypers *et al.*, 2000; Cuypers *et al.*, 2001), extracción con solventes (Kelsey *et al.*, 1997; Chung y Alexander 1999; Nam *et al.*, 1998), extracción supercrítica con CO<sub>2</sub> (Loibner, *et al.*, 1997; Hawthorne y Grabanski, 2000) y extracción con ciclodextrinas (Reid, *et al.*, 2000). De estos métodos, solo el SPE y la oxidación con persulfato han sido validados con muestras históricamente contaminadas, para predecir la biodisponibilidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados y plaguicidas.

## **2.6 Toxicidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).**

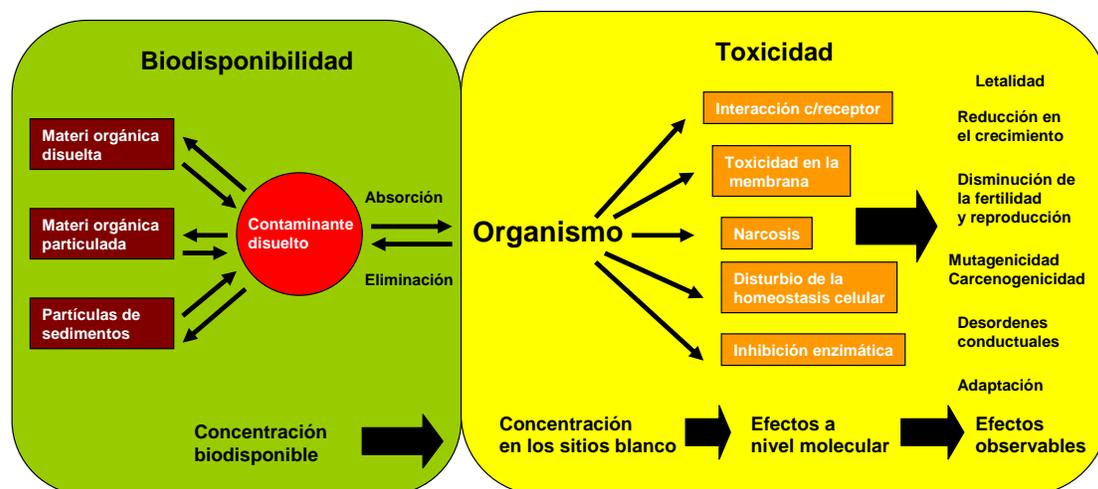
Los HAPs son altamente liposolubles y por lo tanto rápidamente absorbidos en el tracto intestinal de los mamíferos y otros organismos. Ellos son fácilmente distribuidos en una amplia variedad de tejidos con una marcada tendencia para localizarse en tejidos adiposos. Los HAPs por sí mismos son químicos relativamente no reactivos con respecto a macromoléculas biológicas en condiciones fisiológicas. Sin embargo, ellas requieren activación metabólica para manifestar genotoxicidad, incluyendo mutagenicidad y carcinogenicidad (Connell *et al.*, 1997). Una vez que han entrado al cuerpo, el sistema de defensa celular trabaja para “remover” estas sustancias extrañas mediante el metabolismo. El metabolismo de los HAPs en los mamíferos se da principalmente en el hígado y es catalizado por el sistema enzimático del citocromo P450, aunque otras enzimas metabólicas también están incluidas. Iniciado el metabolismo, los HAPs se convierten en moléculas más polares y solubles en agua para ser excretados fuera del organismo, hasta completar su remoción o el proceso de detoxificación biológica. Sin embargo, el metabolismo de algunos HAPs también genera intermediarios reactivos que son capaces de formar enlaces covalentes (aductos) con ácidos nucleicos, resultando de esta manera genotóxicos (Yu, 2002).

La toxicidad (aguda y subletal) de compuestos químicos como los HAPs, se puede incrementar significativamente si los organismos son expuestos a la irradiación UV (fototoxicidad) (Wernersdon, 2003). Debido a su estructura química, los HAPs absorben la luz en el visible (400-700 nm) y en la región del ultravioleta (280-400 nm) y son especialmente sensibles a los efectos fotoquímicos de la radiación UV ( Arfsten, *et al.*, 1996). Una vez que la energía luminosa es absorbida, los HAPs pueden pasar a un estado excitado de mayor energía que puede pasar un electrón o transferir energía a una molécula de oxígeno, solventes, o moléculas biológicas en la célula. La transferencia de un electrón a otras moléculas puede producir radicales libres que son usualmente reactivas hacia macromoléculas biológicas. Adicionalmente, el estado excitado de las moléculas de HAPs pueden reaccionar con otras moléculas co-existentes para generar intermediarios reactivos. Estas especies reactivas pueden dañar las membranas celulares, ácidos nucleicos, o proteínas, resultando en un proceso de toxicidad aguda o genotoxicidad. Aunque las proteínas y las membranas celulares pueden ser importantes órganos blanco fotodañados por los HAPs, la mayoría de las investigaciones se han concentrado en los daños ocasionados al ADN. Esto es posiblemente debido a la naturaleza carcinogénica de las moléculas de los HAPs, la cual es usualmente asociada

con la formación de aductores covalentes con el ADN después de la activación metabólica. Algunos de los daños al ADN que se han estudiado son: formación de aductores covalentes HAPs-ADN, rompimiento de una cadena de ADN, depurinación/depurimidación, y la oxidación de guanina a 8-hidroxi o 8-oxoguaniona (Yu, 2002).

La fototoxicidad inducida de los HAPs ha sido observada en diferentes especies, incluyendo peces, zooplancton, anfibios, células humanas y plantas; sin embargo, la respuesta fototóxica de los animales de laboratorio es dictada por la dosis de radiación UV, la concentración de HAPs y probablemente otros factores como la edad y la susceptibilidad genética (Arfsten, *et al.*, 1996). MacDonald y Chapman (2002) consideran que aunque la fototoxicidad de las HAPs ha sido bien demostrada en investigaciones de laboratorio, en diferentes taxas y los mecanismos de acción toxicológica han sido descritos, este fenómeno es afectado por factores físicos, químicos y biológicos, lo que hace que la relevancia ecológica de la fototoxicidad de las HAPs sea incierta.

En general, los efectos tóxicos de los compuestos antropogénicos sobre la biota y los ecosistemas son investigados en estrecha conexión con la química ambiental, ya que la biodisponibilidad de un contaminante, la cual es dependiente de procesos biogeoquímicos, es un factor importante en la evaluación ecotoxicológica y en la evaluación de riesgo. Por lo tanto, la fracción biodisponible es un parámetro crítico en la absorción y finalmente en la concentración en sitios blanco de los organismos, lo cual es crítico para la toxicidad (Figura 5).



**Figura 5.** Los efectos ecotoxicológicos son dependientes de la fracción biodisponible de los contaminantes. Las concentraciones en los órganos blanco inducen efectos moleculares que generan una amplia variedad de manifestaciones tóxicas en los organismos. Tomado de Fent (2004).

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo general

- ❖ Evaluar la biodisponibilidad y toxicidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos orgánicos afectados por derrames de petróleo ocurridos en diferentes tiempos (antiguos y recientes).

#### Objetivos particulares

- Comparar los contenidos totales y solubles de HAPs en muestras de suelo con derrames antiguos y recientes.
- Determinar si existe correlación entre la concentración total y soluble de HAPs con la concentración bioacumulada en tejidos de *Eisenia fetida* y estudiar como se modifica en los derrames recientes respecto de los antiguos.
- Correlacionar la mortalidad con las concentraciones de HAPs determinadas en tejidos de *E. fetida* y como ésta se modifica en los derrames recientes respecto de los antiguos.

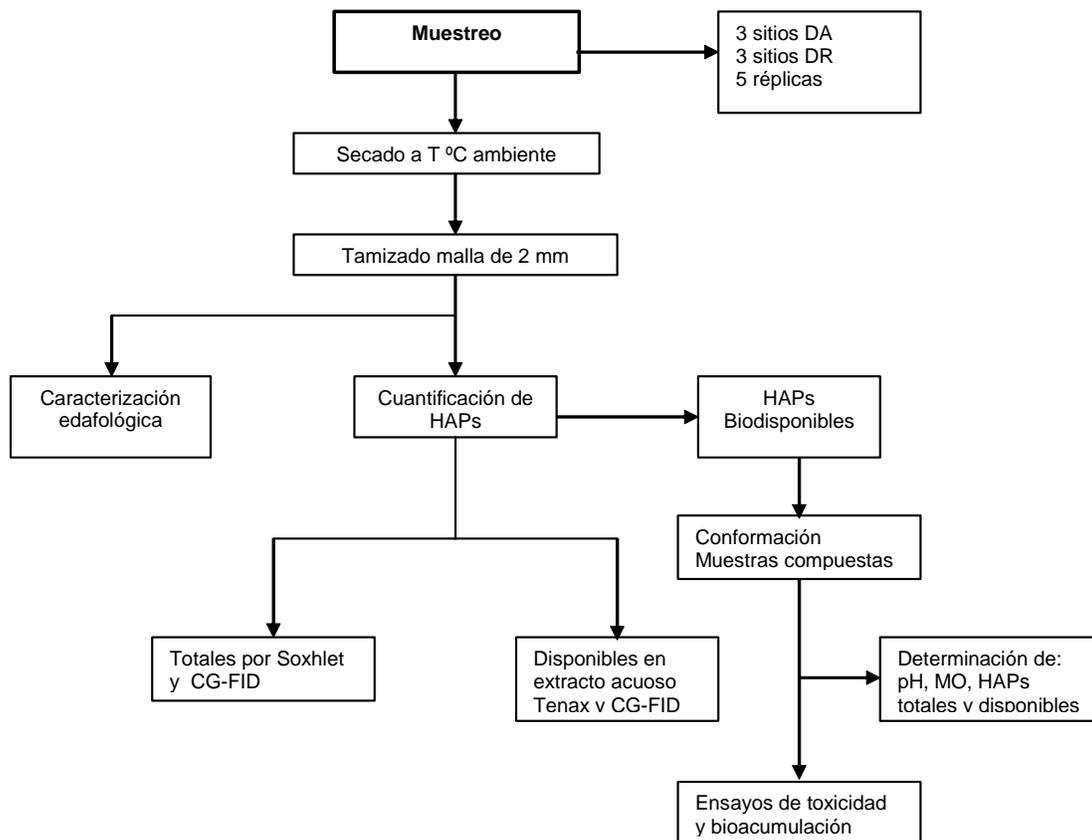
#### 4. HIPÓTESIS

- ❖ El porcentaje de HAPs disponibles será mayor en los suelos con derrames recientes que en los que presentan derrames antiguos, debido al envejecimiento.
  
- ❖ Se observará una correlación positiva entre la concentración disponible y la bioacumulación efectuada por *E. fetida*, ya que la concentración disponible es la que puede ser fácilmente absorbida por las diferentes vías de exposición a la que está sujeta *E. fetida*.
  
- ❖ La mortalidad ocasionada en organismos de *E. fetida* será proporcional a la fracción biodisponible de HAPs presentes en el suelo, pero será aún más evidente la correlación con la concentración bioacumulada por *E. fetida*.

## 5. METODOLOGÍA

Para esta investigación se realizó un muestreo dirigido en diferentes sitios que han sido contaminados con derrames de petróleo en el Estado de Tabasco (derrames recientes y antiguos).

En la figura 6 se muestra un esquema general de la metodología seguida en este trabajo, la cual inicia con el muestreo, en el que se tomaron 5 muestras que consistieron en muestras simples de aproximadamente 2 kg de suelo en 3 sitios con derrames recientes y 5 muestras en 3 sitios con derrames antiguos (tabla 3). Las muestras colectadas se secaron a temperatura ambiente y se tamizaron por una malla de 2 mm de apertura, se homogenizaron y se utilizaron para la determinación de parámetros fisicoquímicos como pH, conductividad eléctrica, materia orgánica y textura, variables importantes en el comportamiento de los contaminantes en el suelo. Se analizaron los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos establecidos por la EPA como contaminantes prioritarios mediante extracción Soxhlet y cromatografía de gases con detector de ionización de flama. Por otra parte, se conformaron muestras compuestas a las que se les hicieron determinaciones iniciales y se usaron para los ensayos de toxicidad y bioacumulación.



**Figura 6.** Esquema general de la metodología seguida en esta investigación.

### 5.1 Determinación de HAPs Totales (Cromatografía de gases)

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

Se colocaron 5 g del suelo contaminado (seco) en un cono de papel filtro. El cono se introdujo en un extractor soxhlet, que es conectado a un matraz de bola con 180 mL de una mezcla hexano:diclorometano (1:1) y a un refrigerante. Una vez montado el sistema de extracción, se colocó en una parrilla de calentamiento durante 8 hrs, a una temperatura constante que permitiera un reflujo de 4 ciclos por hora. Se colectó el extracto proveniente de la etapa anterior y se llevó a un roto evaporador hasta obtener un volumen aproximado de 5 mL.

Se hizo una separación y limpieza de los extractos obtenidos, utilizando columnas de vidrio de 2 cm de diámetro interno por 30 cm de longitud. Las cuales se empacaron en el orden siguiente: hexano + fibra de vidrio + sílica + alúmina + sulfato de sodio anhidro. Se añadió la muestra, se agregaron 20 mL de hexano para obtener la fracción 1 (HC alifáticos). La fracción 2 (HC aromáticos policíclicos) se obtuvo eluyendo con 30 ml de una mezcla hexano:diclorometano (9:1) + 20 mL de una mezcla hexano:diclorometano (1:1). Las dos fracciones por separado se evaporaron hasta un volumen aproximado de 2 mL. Se trasvasaron a viales y se llevan a sequedad, para su posterior reconstitución y análisis por cromatografía de gases.

Para el análisis cromatográfico, se utilizó un cromatógrafo de gases Varian 3400 CX con detector de ionización de flama equipado con una columna capilar DB-5 de sílice fundida (Chrompack-Varian) de 30 m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno, recubierta con 5% fenilmetilsilicona (espesor de capa de 0.25µm). Los análisis se llevaron a cabo en el modo split-splitless, utilizando N<sub>2</sub> como gas acarreador (1mL/min)

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

Los compuestos analizados, se identificaron y cuantificaron por el método de estándar externo; utilizando un estándar compuesto por 16 HAPs: Naftaleno (Naf), Acenaftileno (Acfti), Acenafteno (Ace), Fluoreno (Fluo), Fenantreno (Fen), Anttraceno (Ant), Fluoranteno (Fla), Pireno (Pir), Benzo(a)antraceno(BaA), Criseno (Cri),

Benzo(b)fluoranteno (BbF), Benzo(k)fluoranteno (BkF), Benzo(a)pireno (BaP), Indeno (1,2,3-c,d)pireno (Ind), Benzo(ghi)perileno (Bgh) y Dibenzo(a,h)antraceno (DbA).

El estándar utilizado fue de la marca SUPELCO, ampolleta de 1 mL de Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mix, 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en diclorometano : hexano (1:1). A partir de esta ampolla se preparó una solución madre de 80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , que se usó en la preparación de la curva de calibración tomando las alícuotas necesarias para tener concentraciones finales de 0.125, 0.250, 0.5, 2, 4, 8, 16, 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , todas ellas en isooctano de alta pureza.

Como parte del control de calidad se utilizó material de referencia proporcionado por el CENAM (DMR 199a), así como muestras adicionadas para obtener la eficiencia de la extracción y blancos de extracción. Las curvas de calibración y los resultados de la eficiencia de la extracción se encuentran en el anexo A.

Todos los disolventes utilizados fueron de la marca JT&Backer de alta pureza (grado HPLC).

## 5.2 Determinación de HAPs solubles

Para determinar la disponibilidad de los HAPs presentes en la muestra, se realizó una extracción en fase sólida, mediante el uso de TENAX-TA, obtenida de Scientific Instrument Services (malla 60-80; 177-250  $\mu\text{m}$ ) un polímero poroso basado en el 2,6-difenil-p-oxido de fenileno (Morrison et al., 2000 modificado de Cornelissen et al., 1997).

Antes de usar las esferas de TENAX TA, éstas fueron lavadas con acetona (5 mL/g) y hexano (5 mL/g), tres veces en cada disolvente, después de los lavados, se dejaron secar durante la noche a 75 °C.

Para el procedimiento de extracción se colocaron 2 g de muestra de suelo seco en tubos de centrífuga de vidrio, adicionando 45 mL de agua ultrapura y 0.6 g de esferas de TENAX, para tapar los tubos y evitar escurrimientos de la muestra, se utilizaron tapas de baquelita con rosca y contratapa de teflón. Una vez tapados los tubos, se sometieron a agitación orbital durante 14 días a 50 rpm. Concluido el tiempo de agitación, las muestras fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 30 min, esto permitió que las partículas de suelo se sedimentaran y las esferas de TENAX permanecieran en la parte superior del sobrenadante de donde fueron retiradas cuidadosamente utilizando una espátula y sometidas a extracción con 10 mL de una mezcla de hexano:diclorometano (1:1), para su posterior análisis por cromatografía de gases. El análisis de las muestras se realizó por

---

---

triplicado. Como parte del control de calidad se analizaron blancos (1 por cada 15 muestras) y material de referencia (DMR 199a).

### **5.3 Ensayo de toxicidad y bioacumulación para lombrices (*Eisenia foetida*)**

Una vez que se determinaron las concentraciones totales de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el total de las muestras colectadas, se realizaron análisis de varianza y pruebas de Tukey que permitieran agrupar muestras de suelo de edades y concentraciones semejantes, dando como resultado 3 muestras compuestas con edades de contaminación de 1.5, 20 y 30 años. La muestra contaminada más recientemente (1 semana) se dejó fuera de estos análisis debido a que la saturación de petróleo en el suelo, impidió su manejo. Las muestras compuestas fueron analizadas nuevamente para obtener los parámetros iniciales de cada muestra. Se obtuvieron las concentraciones de HAPs totales y disponibles para ser comparadas con las concentraciones determinadas en tejidos *E. foetida*.

Para evaluar la toxicidad y bioacumulación se siguió el método recomendado por la OCDE (1984) y con base en la metodología empleada por Tang y Alexander (1999) y Tang *et al.* (2002). Las lombrices empleadas fueron obtenidas del Instituto Nacional de Ecología (INEcol Xalapa), las cuales fueron recibidas en una composta de cáscara de café, sustrato que fue cambiado por una mezcla de residuos vegetales y estiércol de caballo seco y suelo para macetas. Después de seis meses fueron seleccionadas 250 lombrices adultas, con clitelo bien formado las cuales fueron mantenidas en aclimatación por un periodo de 2 semanas, usando una mezcla de residuos vegetales y suelo para macetas y a una temperatura de 20 +/-2 °C. Transcurrido el periodo de aclimatación, se seleccionaron lombrices de un peso aproximado de 0.5g cada una, se lavaron con agua corriente y se purgaron durante 24 hrs con papel húmedo. El ensayo se llevó a cabo en recipientes de 600 mL de capacidad en los que se colocaron 160 g de suelo, el cual se ajustó al 70% de su capacidad de campo con agua desionizada. El suelo humedecido se dejó reposar durante 24 hrs después de las cuales se introdujeron 10 lombrices en cada recipiente, y se incubaron a 20 +/-2 °C, en condiciones de oscuridad durante 14 días. Se incubó un lote control utilizando tierra para macetas, misma en la que fueron aclimatadas las lombrices antes de ser utilizadas en el ensayo.

Una vez transcurridos los 14 días, los organismos fueron cuidadosamente removidos, lavados y purgados por 24 hrs; se pesaron y se congelaron a -70°C, para después ser molidos con 10 g de sulfato de sodio anhidro en un mortero. Los tejidos así obtenidos

fueron sometidos a una hidrólisis alcalina en equipo soxhlet por 10 h, el extracto fue purificado en columnas empacadas con sílica y alúmina, se concentraron y analizaron en cromatografía de gases con detector de ionización de flama, para la determinación de HAPs.

El ensayo se llevo a cabo con 5 réplicas de cada muestra compuesta. La toxicidad fue estimada como el porcentaje de mortalidad al final de los 14 días de incubación. El ensayo se consideró válido teniendo un 100% de supervivencia en el control (OECD, 1984).

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Caracterización edafológica

En la tabla 3 se muestran algunas características de los suelos en los sitios de muestreo. Los suelos de la zona han sido clasificados como Histosoles y Gleysoles (INEGI, 1987) que se hallan sujetos a inundación gran parte del año. Los suelos son muy ricos en materia orgánica. Los valores de pH van de fuertemente ácidos a muy fuertemente ácidos. Las texturas de los suelos que pudieron analizarse van de franco arcillosas a arcillosas

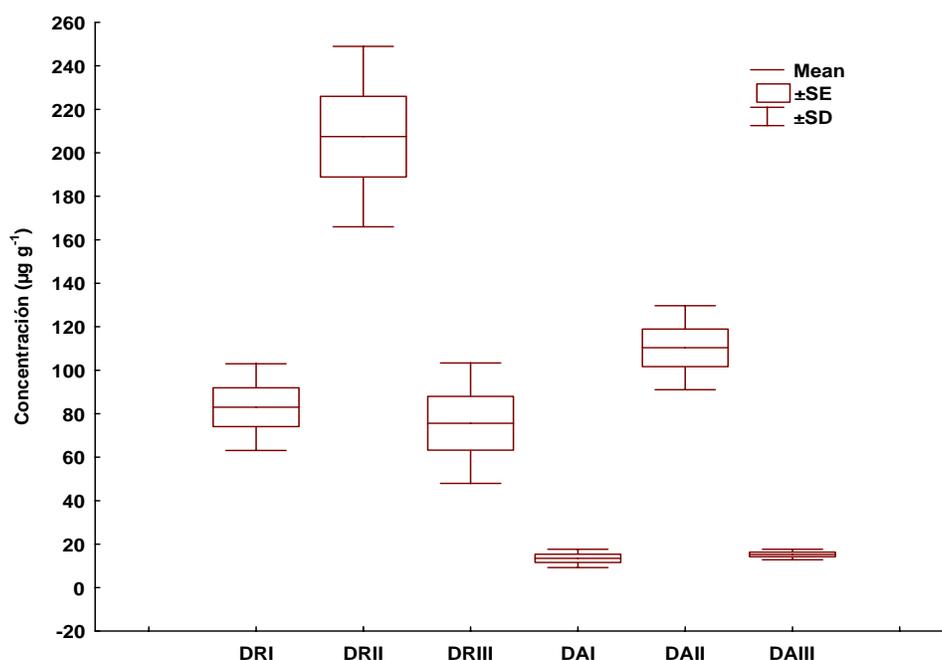
Tabla 3. Características de las muestras de suelo afectadas por derrames de hidrocarburos de diferentes edades

Derrame	Edad	Vegetación	pH	C.E ( $\mu$ S/cm)	M.O (%)	Textura	HAPs totales
DRI-1	1.5 años	Pasto alemán, pastura pelillo, espadañal, tembladera con nivel freático a 5 cm de la superficie	3.9	921	68	RA	103,00
DRI-2			4.3	1086	78	RA	76,04
DRI-3			4.7	679.5	74	CRA	53,40
DRI-4			4.9	847.5	91	RA	83,40
DRI-5			5.1	1040.5	73	R	99,33
DRII-1	1 semana	Pasto alemán	N.R	N.R	N.R	N.R	227,26
DRII-2			N.R	N.R	N.R	N.R	148,74
DRII-3			N.R	N.R	N.R	N.R	242,87
DRII-4			N.R	N.R	N.R	N.R	179,21
DRII-5			N.R	N.R	N.R	N.R	238,99
DRIII-1	1.5 años	Manglar seco (se seco después del derrame)	4.2	22.05	52	N:R	72,00
DRIII-2			4.8	19.6	52	N.R	107,86
DRIII-3			4.5	32.5	42	N.R	100,04
DRIII-4			4.7	18.2	52	N.R	47,04
DRIII-5			4.4	28.3	48	N.R	51,24
DAI-1	20 años	Pasto alemán	4.9	407.5	13	R	16,21
DAI-2			5.3	377.0	14	CR	6,90
DAI-3			5.1	476.0	11	R	16,52
DAI-4			5.6	594.0	21	C	11,63
DAI-5			5.2	748.5	20	CR	16,06
DAII-1	30 años	Manglar	4.8	** 648.0	65	R	113,26
DAII-2			4.3	6.9	84	CRA	84,54
DAII-3			4.4	5.4	65	R	132,11
DAII-4			4.2	7.2	82	RA	123,97
DAII-5			5.0	1524.0	72	C	97,74
DAIII-1	20 años	Pasto estrella de África	3.9	** 5.9	43	A	18,22
DAIII-2			4.1	4.1	65	A	17,06
DAIII-3			3.58	4.9	51	CRA	12,10
DAIII-4			3.0	5.9	52	CA	14,42
DAIII-5			2.7	6.7	66	CA	14,53

DA:derrame antiguo, DR :derrame reciente, NR: no realizado, RA : arcillo arenosa, CRA :franco arcillo arenosa, R : arcillosa, CA : franco arenosa, CR : franco arcillosa.

## 6.2 Contenidos totales de HAPs (extracción soxhlet)

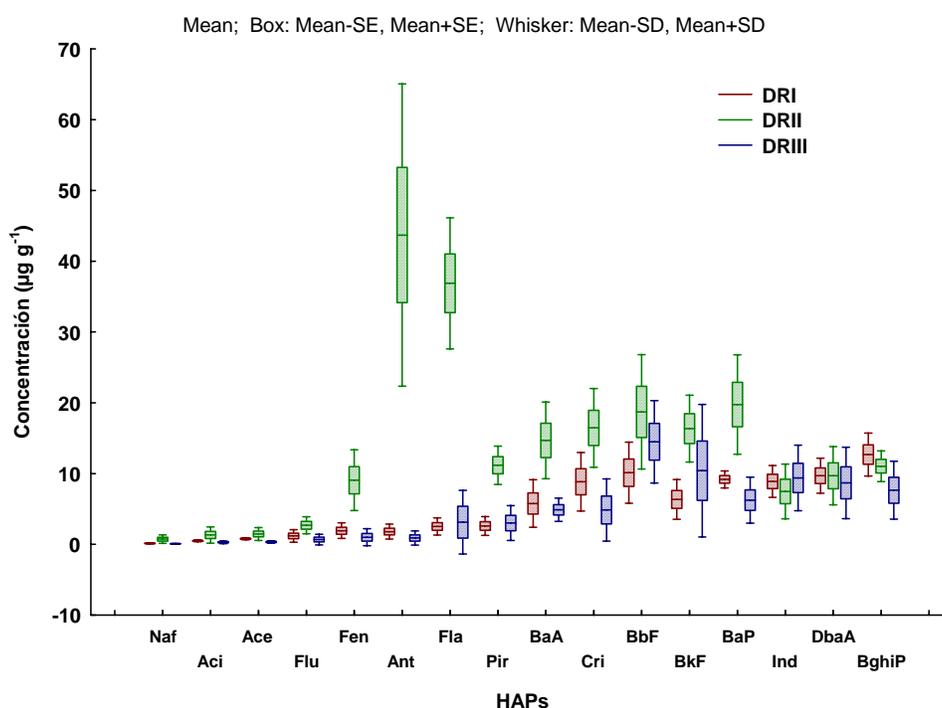
En la figura 7 se presenta la suma total de los 16 HAPs determinados en los derrames recientes (DR) y antiguos (DA), en la cual se puede apreciar la gran variabilidad que existe entre las concentraciones determinadas en cada muestra. Para los derrames recientes, las concentraciones van de  $76 \pm 27 \mu\text{g g}^{-1}$  (DRIII) a  $221 \pm 25 \mu\text{g g}^{-1}$  (DRII). En los derrames antiguos encontramos concentraciones desde  $15 \pm 2.4 \mu\text{g g}^{-1}$  (DAIII) hasta  $110 \pm 19.3 \mu\text{g g}^{-1}$  (DAII). En general, las concentraciones totales de HAPs son más altas en los derrames recientes que en los derrames antiguos, excepto en el derrame antiguo II en el que la concentración promedio se encuentra por arriba de las medias de los DRI y DRIII, lo cual parece indicar aportaciones recientes de crudo en el sitio. La variabilidad entre las muestras de un mismo sitio se explica debido a que los derrames no se distribuyen homogéneamente en el suelo. La variabilidad entre los sitios de muestreo denota las diferencias en las edades de los derrames y el origen distinto de los crudos derramados.



**Figura 7.** Contenido total de hidrocarburos aromáticos policíclicos en derrames recientes (DR) y antiguos (DA) en suelos de la planicie aluvial del estado de Tabasco (promedio de 5 muestras de campo).

En la figura 8 se observa como se distribuyen los 16 HAPs individuales, determinados en muestras de suelos afectados con derrames recientes; destaca el DRII en el que la mayoría de los compuestos se encuentran presentes por arriba de  $10 \mu\text{g g}^{-1}$ ; excepto el

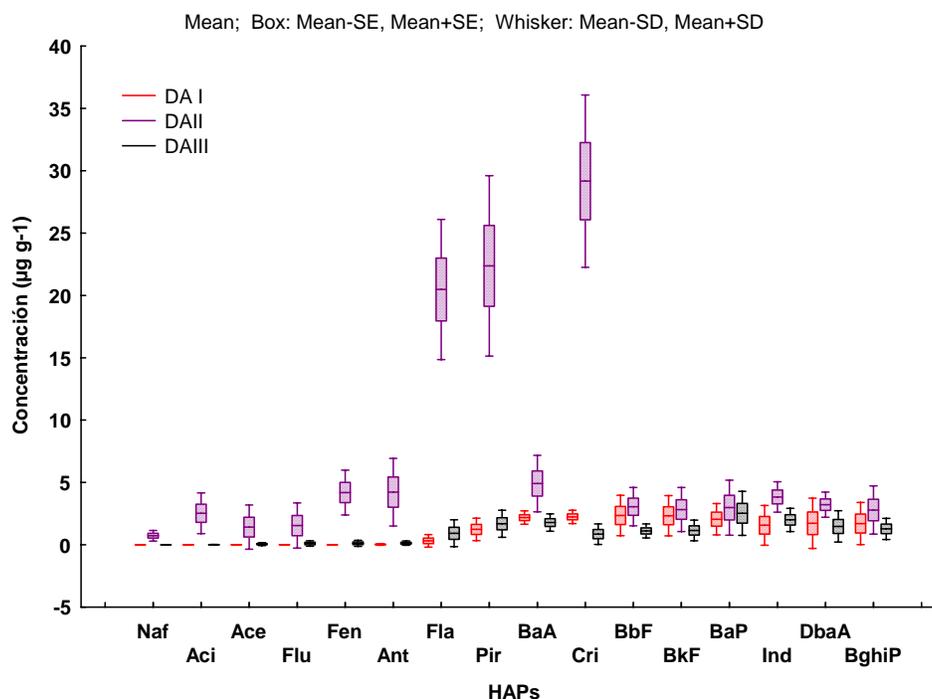
naftaleno, acenaftileno, acenafteno y fluoreno ( $0.58 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $1.08 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $1.81 \mu\text{g g}^{-1}$ , y  $5.77 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente). Mientras que en los derrames recientes DRI y DRIII, las concentraciones determinadas se encuentran en general por debajo de este valor. En los tres derrames recientes, encontramos que dominan los compuestos de 4 y 5 anillos como el criseno y benzo(b)fluoranteno; y benzo(a)pireno e indeno(1,2,3-cd)pireno respectivamente. Se observa también la presencia de compuestos de 2 y 3 anillos, de los que sobresalen el antraceno ( $1.63$  a  $11.11 \mu\text{g g}^{-1}$  en promedio) y el fluoranteno ( $5.74$  a  $17.45 \mu\text{g g}^{-1}$  en promedio).



**Figura 8.** Concentraciones promedio de los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos determinados en suelos afectados con derrames recientes (DR).

La distribución de las concentraciones promedio de los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos determinados en muestras de suelos afectados con derrames antiguos se muestra en la figura 9. En ella destaca el DAII en el que la mayoría de los compuestos se encuentran presentes por arriba de  $10 \mu\text{g g}^{-1}$ ; mientras que en los derrames antiguos DA I y DAIII, las concentraciones determinadas en su mayoría se encuentran por debajo de este valor.

Para los derrames antiguos la dominancia está marcada por compuestos de 4 y 5 anillos, con concentraciones de  $13.11 \mu\text{g g}^{-1}$  (DA III) a  $89.83 \mu\text{g g}^{-1}$  (DAII); y de  $11.13 \mu\text{g g}^{-1}$  (DAIII) a  $82.41 \mu\text{g g}^{-1}$  (DAII) en promedio, respectivamente. Los compuestos de 2 y 3 anillos prácticamente no se detectaron (DAI) o bien se detectaron en concentraciones bajas (DAIII), excepto para el DAII en donde se obtuvieron concentraciones promedio de  $3.08 \mu\text{g g}^{-1}$  para compuestos de 2 anillos y de  $20.53 \mu\text{g g}^{-1}$  para compuestos de 3 anillos.

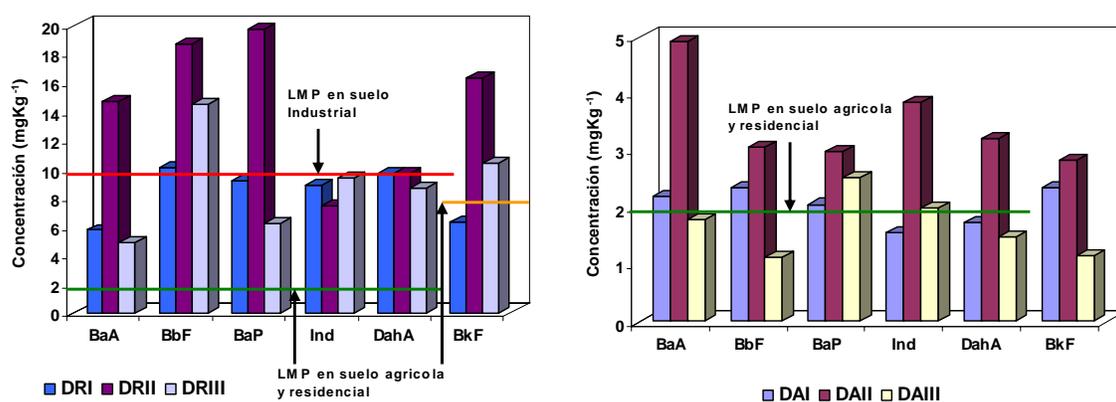


**Figura 9.** Concentraciones promedio de los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos determinados en suelos afectados con derrames antiguos (DA).

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 “que establece los límites permisibles de hidrocarburos en suelos y especificaciones para su caracterización y restauración”<sup>1</sup>, las concentraciones promedio determinadas en los derrames recientes, para benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, e indeno(1,2,3-cd)pireno, rebasan los límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo de uso predominantemente agrícola y residencial. Esto es en los derrames I y II, en donde todos los compuestos presentan valores que rebasan los límites permitidos en suelos de uso industria, excepto

<sup>1</sup> El límite máximo permisible para BaP, DbahA, BaA, BbF, Ind, en suelo de uso agrícola y residencial es de  $2 \mu\text{g g}^{-1}$  base seca, para los mismos compuestos en suelo de uso industrial, es de  $10 \mu\text{g g}^{-1}$ ; mientras que para el BkF es de  $8 \mu\text{g g}^{-1}$  en suelo de uso agrícola y residencial y de  $80 \mu\text{g g}^{-1}$  en suelo de uso industrial.

para el benzo(k)fluoranteno . Para el derrame III, todos los compuestos determinados que son considerados en la norma rebasan los límites máximos permitidos para suelos de uso agrícola y residencial; en lo que se refiere al uso industrial, el benzo(a)antraceno y el benzo(k)fluoranteno se encuentran por debajo de los límites máximos, mientras que el benzo(a)pireno se encuentra en el límite y el resto de los compuestos sobrepasa los límites máximos permitidos. En lo que respecta a los derrames antiguos, tres de los seis compuestos mencionados en la norma rebasan los límites para uso de suelo agrícola y residencial en el derrame DA I; en el DAIII sólo dos compuestos se encuentran fuera de estos límites, mientras que en el DAII son cinco los compuestos que rebasan los límites permisibles establecidos por la norma (Figura 10).

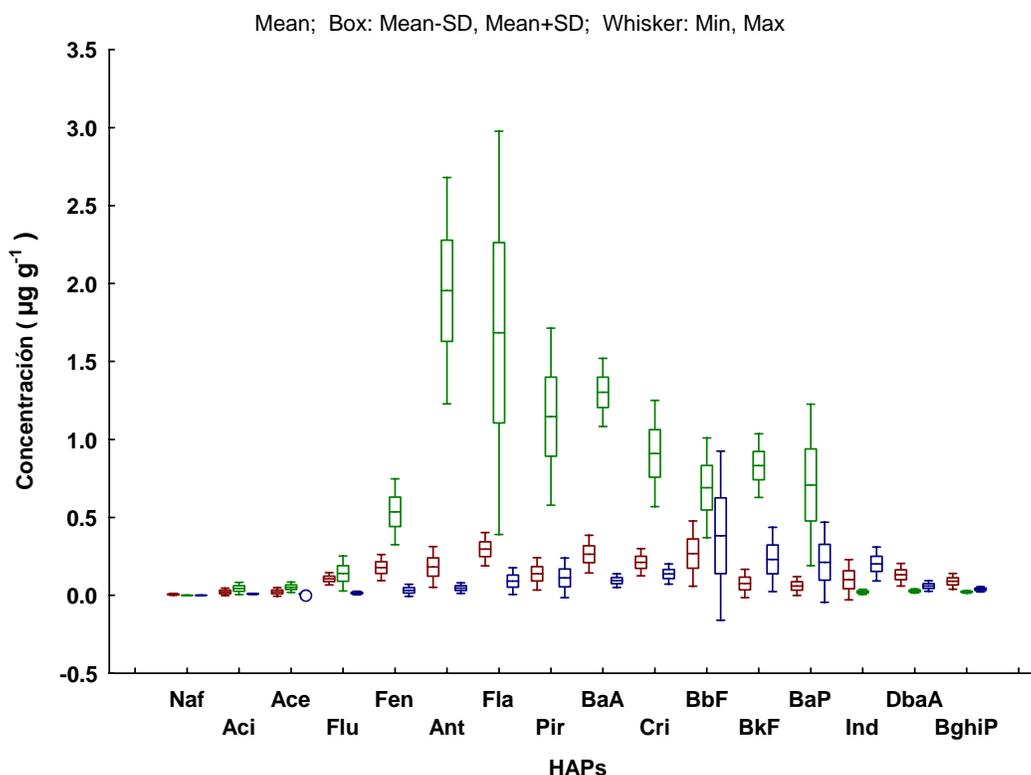


**Figura 10.** Concentraciones de los HAPs considerados en la NOM-138-Semarnat/SS-2003, en los derrames recientes y antiguos; las líneas marcan los límites máximos permisibles en suelos de diferentes usos, según la norma citada.

### 6.3 HAPs solubles (extracción acuosa en fase sólida)

En la figura 11, se presentan las concentraciones individuales de los 16 HAPs obtenidos por extracción acuosa en fase sólida de los derrames recientes, en la cual podemos observar que para el derrame DRI las concentraciones medias se encuentran entre  $0.01 \pm 0.005 \mu\text{g g}^{-1}$  (naftaleno) y  $0.30 \pm 0.12 \mu\text{g g}^{-1}$  (fluoranteno), teniendo el siguiente comportamiento en orden descendente de los compuestos dominantes en este derrame: fluoranteno > benzo(b)fluoranteno > benzo(a)antraceno > criseno > fenantreno = antraceno > pireno. En el DRII las concentraciones promedio van de N.D (naftaleno) a  $1.95 \pm 0.73 \mu\text{g g}^{-1}$  (antraceno), con los siguientes compuestos dominantes: antraceno > fluoranteno > benzo(a)antraceno > pireno > criseno. Finalmente para el DRIII las concentraciones varían de N.D (naftaleno) a  $0.38 \pm 0.54$  (benzo(b)fluoranteno) con los

siguientes compuestos dominantes: benzo(b)fluoranteno > benzo(k)fluoranteno > benzo(a)pireno > pireno > indeno (1,2,3, c,d) perileno. En general los compuestos dominantes son compuestos de 3, 4 y 5 anillos aromáticos cuyas características fisicoquímicas favorecen su persistencia en el suelo. Las concentraciones obtenidas en las extracciones acuosas se encuentran 1 ó 2 ordenes de magnitud por debajo de las concentraciones obtenidas a partir de extracciones exhaustivas en el sistema soxhlet.

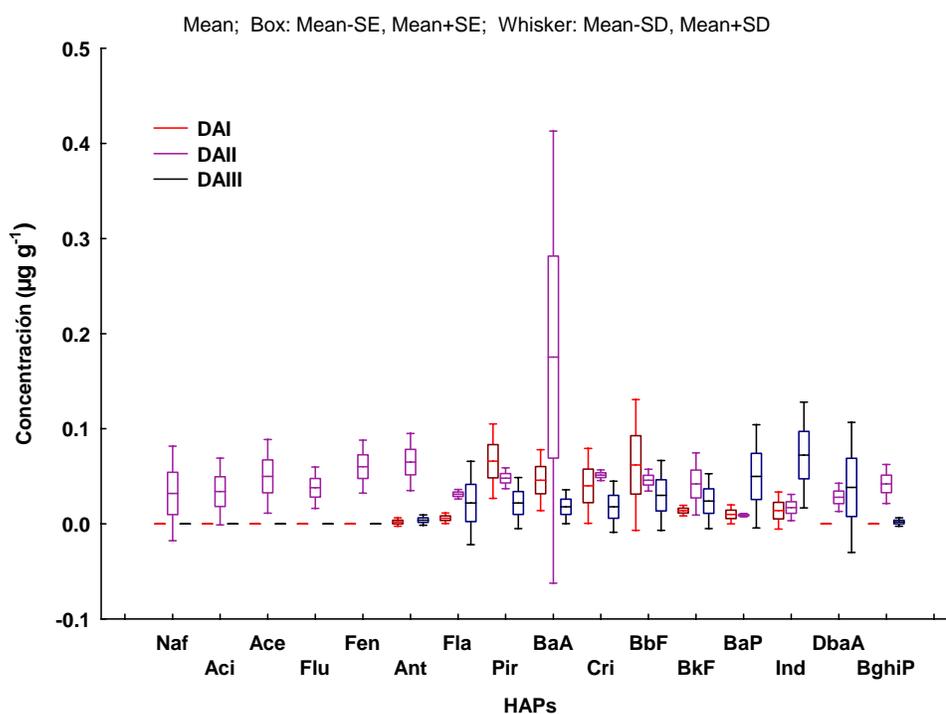


**Figura 11.** Concentraciones solubles promedio de los 16 HAPs analizados, obtenidas mediante extracción acuosa en fase sólida en derrames recientes.

La figura 12 muestra las concentraciones promedio y sus desviaciones obtenidas en los derrames antiguos. Aquí podemos observar que para los derrames DA I y DAIII las concentraciones van desde los no detectables, en los primeros seis compuestos, hasta  $0.07 \mu\text{g g}^{-1}$  para el pireno en el DA I y  $0.05 \mu\text{g g}^{-1}$  para el indeno(1,2,3-cd)pireno en el DAIII. Los siguientes compuestos se observan como dominantes en el DA I: pireno > benzo(b)fluoranteno > benzo(a)antraceno > criseno; mientras que en el DAIII la dominancia es como sigue: indeno(1,2,3, cd)perileno > benzo(a)pireno > Dibenzo(a,h)antraceno > Benzo(b)fluoranteno. En el DAII las concentraciones obtenidas varían de  $0.01 \mu\text{g g}^{-1}$  para el benzo(a)pireno, hasta  $0.18 \pm 0.23 \mu\text{g g}^{-1}$  para el benzo(a)antraceno, teniendo a los

siguientes compuestos como dominantes: benzo(a)antraceno > antraceno > acenafteno = = pireno = criseno = benzo(b)fluoranteno. Las concentraciones obtenidas mediante extracción acuosa son dos y hasta tres órdenes de magnitud menores a los detectados para estas mismas muestras en la extracción en sistema soxhlet.

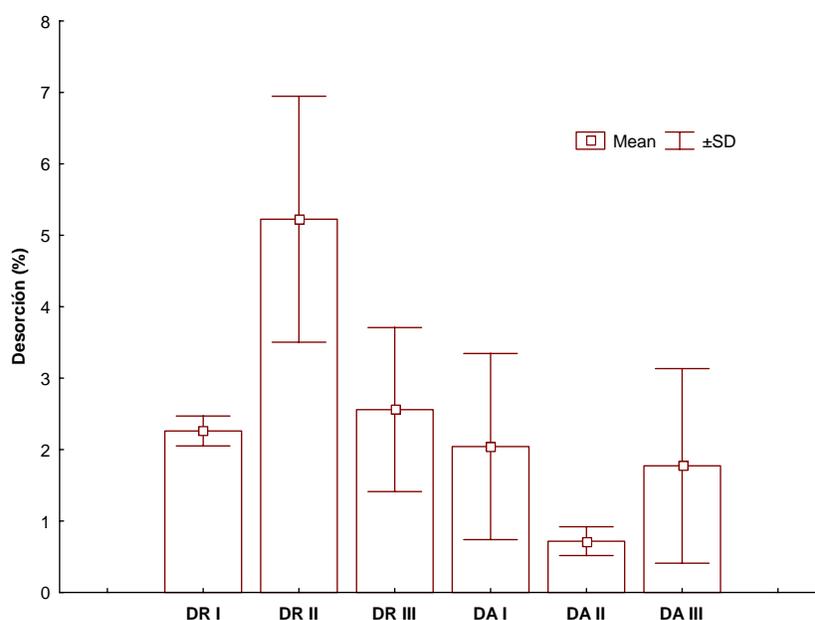
En el marco de estos experimentos podemos considerar que los HAPs disponibles son aquellos que se encontraron en la fase acuosa y que serán éstos, los que en determinado momento pueden estar accesibles para los organismos o bien moverse a través del suelo, tanto horizontal como verticalmente. Se ha sugerido que la fracción biodisponible de un contaminante en el suelo es la que reside en el agua de poro, ya que es la que mejor correlaciona con la bioacumulación y la toxicidad en lombrices (Van Gestel y Ma, 1988, 1990; Belfriod et al., 1994; Tang y Alexander, 1999; Tang et al., 2002). También se ha visto que la obtención del agua de poro es un proceso sumamente difícil, por lo que se ha aceptado el uso de los extractos acuosos para la estimación de contaminantes en la solución del suelo (Lanno et al., 2004).



**Figura 12.** . Concentraciones promedio de los 16 HAPs analizados, obtenidas mediante extracción acuosa en fase sólida en derrames antiguos.

En las tablas 4 y 5 se presentan de manera condensada los valores de concentración promedio obtenidos para los 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos analizados tanto por

extracción soxhlet, como por extracción en fase sólida y sus correspondientes porcentajes de desorción, calculados éstos considerando que las concentraciones obtenidas por soxhlet sean los contenidos totales en el suelo y las concentraciones en la fase acuosa son las desorbidas de la solución del suelo. En la figura 13 se muestra el comportamiento de desorción de los HAPs totales, en dicha figura podemos observar el siguiente comportamiento: DR II > DR III > DR I > DA I > DA III > DA II. Estadísticamente solo existe diferencias significativas entre el DR II y el resto de los derrames, entre los cuales no existen diferencias significativas con un valor de  $p = 0.117$  ( prueba de Kruskal-Wallis).



**Figura 13.** Porcentajes de desorción calculados a partir de las extracciones soxhlet y las extracciones en fase acuosa para los HAPs totales.

La representación grafica del comportamiento de desorción de los HAPs individuales en los derrames recientes y antiguos se muestra en las figuras 14 y 15 respectivamente; en las cuales se puede ver que a pesar de que los compuestos dominantes en la extracción soxhlet fueron compuestos de alto peso molecular (poco solubles), no son éstos los que observan un mayor porcentaje de desorción, sino los compuestos de bajo peso molecular, como los que en seguida se mencionan: fluoranteno (12 %, DRI) > antraceno = pireno (10 % DRI y DR II) > benzo(a)antraceno (9 %, DR II) > fluoreno = fenantreno (8 % DRI); el resto de los compuestos se encuentran por debajo del 8 % de desorción. En los DA, el comportamiento se observó de la siguiente manera: pireno (5%, DA I) > naftaleno = acenafteno = benzo(a)antraceno (4%, DA II) > fluoranteno = benzo(b)fluoranteno (3%,

DAIII). Los compuestos con los mayores porcentajes de desorción son aquellos cuyas características fisicoquímicas los hacen relativamente más solubles al agua (Dzomback y Luthy, 1984).

**Tabla 4.** HAPs totales (extracción soxhlet), disponibles (extracción en fase sólida) y porcentajes de desorción obtenidos en muestras de suelo afectadas con derrames recientes (cada valor es promedio de 5 muestras de campo).

Compuesto	Extracción soxhlet			Extracción en fase sólida			Desorción		
	DR I	DR II	DR III	DR I	DR II	DR III	DR I	DR II	DR III
Naftaleno	0.14	0.74	0.08	0.01	0.00	0.00	4	0	0
Acenaftileno	0.50	1.32	0.23	0.02	0.04	0.01	4	5	6
Acenafteno	0.80	1.47	0.35	0.02	0.05	0.01	3	4	3
Fluoreno	1.19	2.69	0.68	0.11	0.14	0.01	14	5	2
Fenantreno	1.93	9.07	1.00	0.18	0.54	0.03	14	7	6
Antraceno	1.80	43.70	0.90	0.18	1.95	0.05	9	6	6
Fluoranteno	2.52	36.88	3.19	0.30	1.68	0.09	12	5	11
Pireno	2.60	11.18	3.02	0.14	1.15	0.11	5	10	6
Benzo(a)antraceno	5.77	14.68	4.88	0.26	1.30	0.09	5	10	2
Criseno	8.84	16.45	4.85	0.21	0.91	0.14	3	6	4
Benzo(b)fluoranteno	10.13	18.72	14.50	0.27	0.69	0.38	2	4	2
Benzo(k)fluoranteno	6.35	16.35	10.40	0.08	0.83	0.23	1	5	3
Benzo(a)pireno	9.18	19.75	6.24	0.06	0.71	0.21	1	4	3
Indeno(1,2,3)	8.89	7.47	9.38	0.10	0.02	0.20	1	0	2
Dibenzo(a,h)	9.70	9.69	8.68	0.13	0.03	0.06	1	0	1
Benzo(ghi)perileno	12.69	11.04	7.65	0.09	0.02	0.04	1	0	1
Total	83.03	207.41	75.64	2.15	10.07	2.00	3	5	3

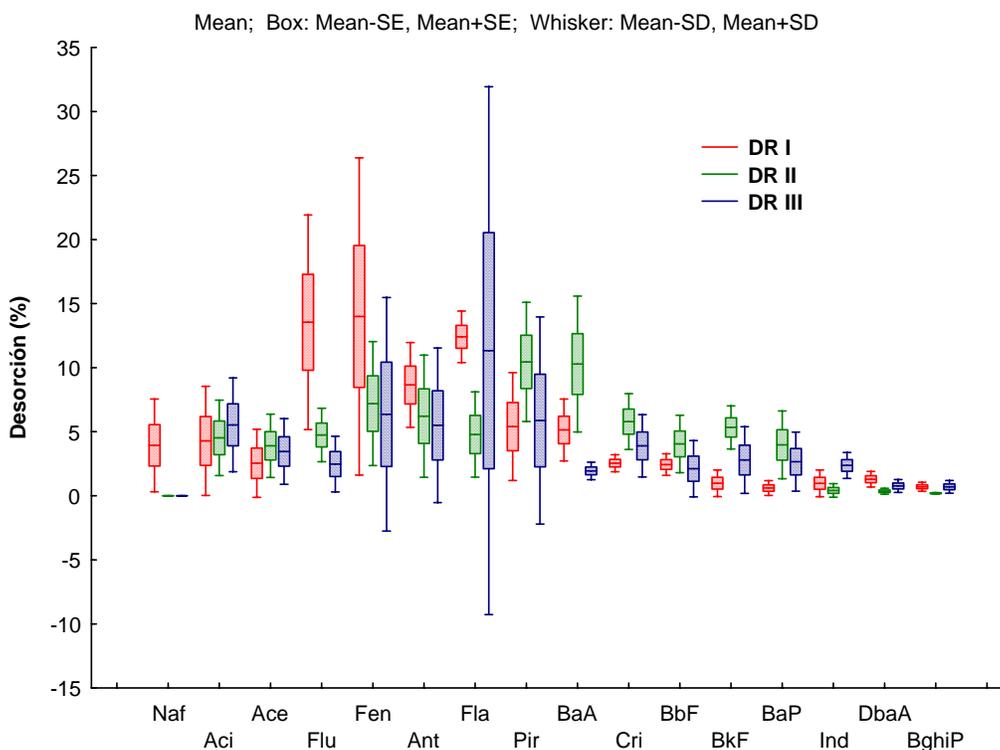
Para los derrames antiguos se observan porcentajes de desorción relativamente menores que los obtenidos para los derrames recientes, debido esto, probablemente a los diferentes mecanismos de envejecimiento que se han descrito para los contaminantes orgánicos en el suelo. Entre ellos se encuentra la partición dentro y sobre la materia orgánica (Chiou *et al.*, 1983), o la difusión dentro de los macro y microporos tridimensionales de las partículas del suelo (Steinberg *et al.*, 1987). Modelos más recientes han reconocido que el proceso de secuestro más probable comprende los dos mecanismos individuales. Weber *et al.* (1992), Weber and Huang (1996) y Xing y Pignatello (1997) han descrito modelos de dos fases para explicar el proceso inherente a las interacciones entre contaminantes hidrofóbicos y las partículas del suelo; la primera de desorción rápida y una segunda en donde el proceso de desorción se hace lento. Esto es difícil de reconocer en condiciones reales, en donde los contaminantes han estado sometidos al intemperismo y los aportes han sido intermitentes en largos periodos de tiempo.

**Tabla 5.** HAPs totales (extracción soxhlet), disponibles (extracción en fase sólida) y porcentajes de desorción obtenidos en muestras de suelo afectadas con derrames antiguos (cada valor es promedio de 5 muestras de campo).

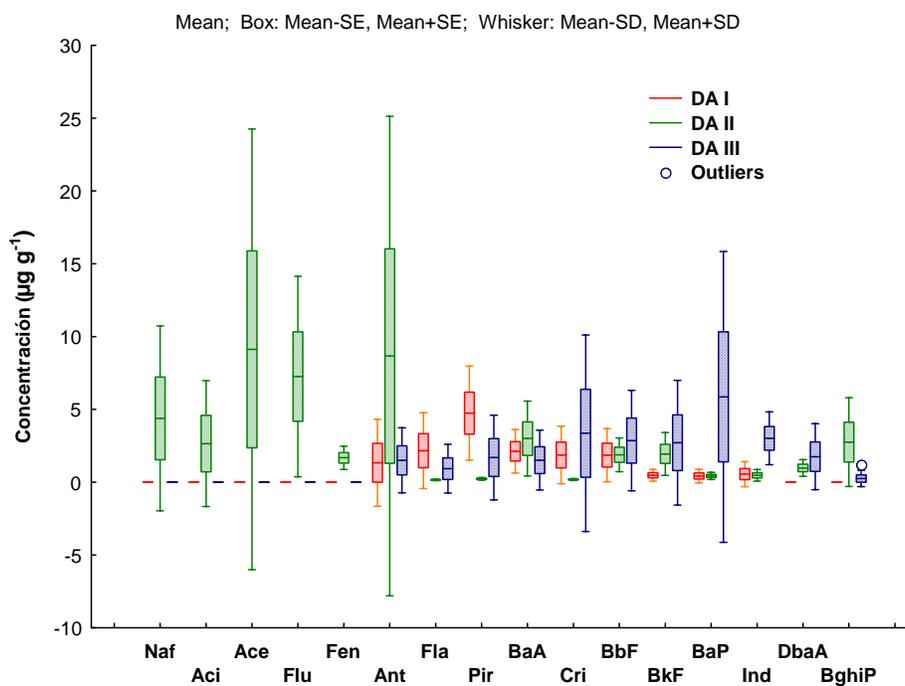
Compuesto	Extracción soxhlet			Extracción en fase sólida			Desorción		
	DA I	DA II	DA III	DA I	DA II	DA III	DA I	DA II	DA III
Naftaleno	0.00	0.73	0.00	0.00	0.03	0.00	0	4	0
Acenaftileno	0.00	2.53	0.01	0.00	0.03	0.00	0	3	0
Acenafteno	0.00	1.42	0.06	0.00	0.05	0.00	0	9	0
Fluoreno	0.00	1.55	0.11	0.00	0.04	0.00	0	7	0
Fenantreno	0.00	4.19	0.12	0.00	0.06	0.00	0	2	0
Antraceno	0.03	4.23	0.14	0.00	0.07	0.00	1	9	2
Fluoranteno	0.32	20.48	0.92	0.01	0.03	0.02	2	0	1
Pireno	1.24	22.37	1.69	0.07	0.05	0.02	5	0	2
Benzo(a)antraceno	2.19	4.91	1.79	0.05	0.18	0.02	2	3	2
Criseno	2.24	29.17	0.86	0.04	0.05	0.02	2	0	3
Benzo(b)fluoranteno	2.35	3.06	1.12	0.06	0.05	0.03	2	2	3
Benzo(k)fluoranteno	2.34	2.83	1.16	0.01	0.04	0.02	0	2	3
Benzo(a)pireno	2.06	2.98	2.53	0.01	0.01	0.05	0	0	6
Indeno(1,2,3)	1.57	3.84	2.00	0.01	0.02	0.07	1	0	3
Dibenzo(a,h)	1.73	3.22	1.48	0.00	0.03	0.04	0	1	2
Benzo(ghi)perileno	1.71	2.79	1.28	0.00	0.04	0.00	0	3	0
Total	13.46	110.32	15.27	0.26	0.78	0.30	2	1	2

Bogan y Sullivan (2003) encontraron que en suelos con diferentes características, los cuales fueron contaminados con fenantreno y pireno y después envejecidos por 120 días, el secuestro de los contaminantes en las partículas del suelo se incrementó conforme se incrementaba el tiempo de contacto. El parámetro más importante que gobernó este proceso fue el contenido de carbono orgánico total, como parte de la materia orgánica. El hecho de que el mismo compuesto (a la misma concentración inicial) se desorba en diferentes porcentajes en diferentes muestras, pone en evidencia el efecto de las características del suelo sobre la disponibilidad de los compuestos orgánicos en el suelo. Según Li et al (2007) el contenido de materia orgánica es el factor más importante en el efecto de envejecimiento de los compuestos orgánicos. Teniendo en cuenta este hecho, en los suelos orgánicos el tiempo no es tan significativo como en el caso de los suelos con bajo contenido de materia orgánica. En este tipo de suelos el contenido de arcillas juega un papel importante en el movimiento de los contaminantes; regulando su desplazamiento de sitios de “rápida desorción” a sitios de baja desorción” a lo largo del tiempo.

Comparando estadísticamente ( prueba de Kruskal-Wallis) los porcentajes de desorción de los HAPs totales de los derrames analizados, excepto el DRII (menos de 1 año), podemos decir que no existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la cantidad de HAPs que se desorbe de suelos en donde los derrames de petróleo crudo tienen más de un año de haber ocurrido, lo anterior concuerda con lo que Li *et al* (2007) proponen.



**Figura 14.** Porcentajes de desorción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos afectados por derrames recientes de petróleo (promedio de 5 muestras).



**Figura 15.** Porcentajes de desorción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos afectados por derrames antiguos de petróleo (promedio de 5 muestras).

**6.4 Coeficientes de distribución de HAPs entre la fase acuosa y el carbono orgánico del suelo (Koc)**

El coeficiente de distribución (Kd) de los HAPs entre la fase sólida del suelo y el agua de poro depende en gran medida del carbón orgánico del suelo y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$Koc = Kd/foc$$

En este trabajo se calculó el coeficiente de distribución entre la materia orgánica del suelo y el agua (Koc) a partir de los contenidos totales de HAPs (extracciones soxleth), las concentraciones biodisponibles (extracción en fase sólida) y el contenido de materia orgánica del suelo. Los valores obtenidos se compararon con el Koc calculado a partir de una ecuación empírica ( $Koc = Kow - 0.317$ ) según Karickoff (1981). Los datos correspondientes de Kow para cada compuesto se tomaron de la base de datos presentada por Mackay et al. (1992).

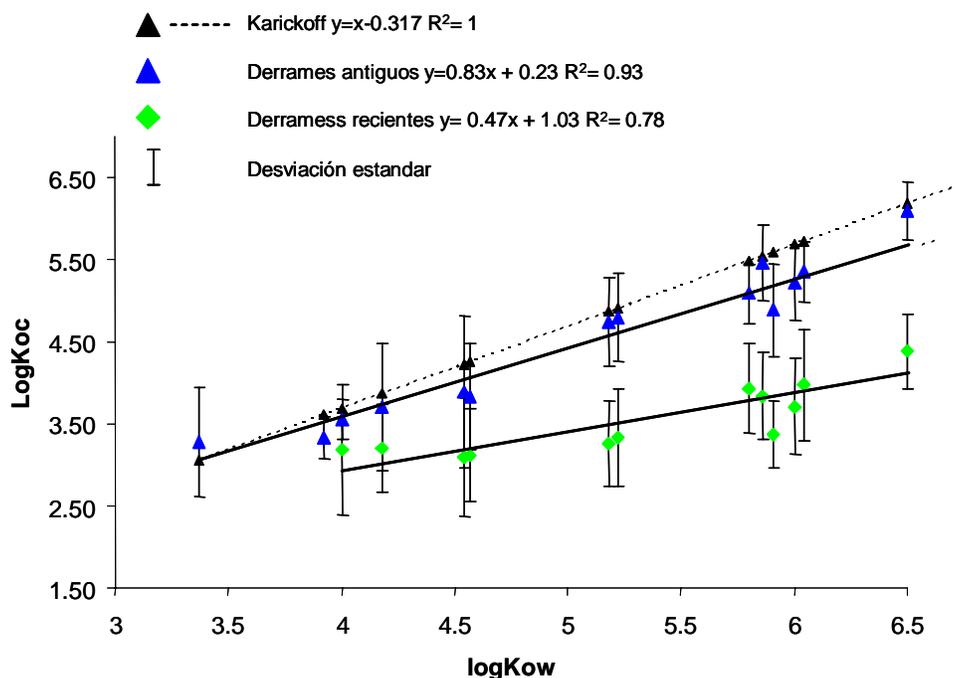
La tabla 6 muestra los promedios (5 muestras por sitio) de logKoc de algunos HAPs en 3 derrames antiguos y 3 recientes y muestra también los valores de logKoc calculados según Karickoff. En la figura 8 se comparan los logKoc calculados según Karickoff y los obtenidos experimentalmente de los derrames recientes y los antiguos graficados contra el log Kow.

**Tabla 6.** Coeficientes de distribución Koc de HAPs en derrames antiguos y recientes

HAPs	LogK <sub>ow</sub> Mackay	LogK <sub>oc</sub> Karickoff	LogK <sub>oc</sub>			Promedio	Des. vest	LogK <sub>oc</sub>			Promedio	Des. vest		
			DRI	DRII	DRIII			DAI	DAII	DAIII				
Naftaleno	3.37	3.05	3.48	3.18							3.28	3.28	0.67	
Acenafteno	3.92	3.60	3.21	2.61	3.74	<b>2.89</b>	<b>0.66</b>				3.34	3.34	0.26	
Acenaftileno	4.00	3.68	3.21	2.55	2.91	<b>3.19</b>	<b>0.79</b>				3.55	3.55	0.24	
Fluoreno	4.18	3.86	3.25	2.82	3.65	<b>3.21</b>	<b>0.53</b>				3.57	4.35	3.70	0.78
Fenantreno	4.57	4.25	3.24	2.70	3.49	<b>3.12</b>	<b>0.57</b>				3.83	3.84	3.83	0.65
Antraceno	4.54	4.22	3.54	2.45	3.36	<b>3.10</b>	<b>0.72</b>	5.38	4.15	3.45	3.89	3.89	0.92	
Fluoranteno	5.22	4.90	3.43	2.75	3.82	<b>3.33</b>	<b>0.59</b>	5.18	4.40	5.21	4.80	4.80	0.53	
Pireno	5.18	4.86	3.38	2.97	3.43	<b>3.26</b>	<b>0.53</b>	5.16	4.33	4.83	4.74	4.74	0.53	
Benzo(a) antraceno	5.91	5.59	3.41	3.14	3.57	<b>3.38</b>	<b>0.41</b>	5.26	4.60	4.85	4.88	4.88	0.56	
Criseno	5.86	5.54	4.43	3.33	3.77	<b>3.84</b>	<b>0.52</b>	5.35	5.79	4.81	5.46	5.46	0.47	
Benzo(b) fluoranteno	5.80	5.48	4.46	3.47	3.87	<b>3.93</b>	<b>0.55</b>	5.18	5.00	5.07	5.09	5.09	0.37	
Benzo(k) fluoranteno	6.00	5.68	4.22	3.15	3.76	<b>3.71</b>	<b>0.58</b>	5.37	5.05	5.26	5.22	5.22	0.47	
Benzo(a) pireno	6.04	5.72	4.62	3.46	3.84	<b>3.97</b>	<b>0.68</b>	5.24	5.43	5.30	5.34	5.34	0.37	
Indeno(1,2, 3-c-d)			4.37	5.34	3.69	<b>4.47</b>	<b>0.78</b>	5.54	5.53	5.41	5.49	5.49	0.33	
Dibenzo(a,h) ) antraceno	6.75	6.43	4.14	5.00	4.14	<b>4.45</b>	<b>0.55</b>	5.13	5.71	5.33	5.44	5.44	0.43	
Benzo(ghi) perileno	6.50	6.18	4.26	4.76	4.07	<b>4.38</b>	<b>0.45</b>	5.83	6.04	6.29	6.09	6.09	0.35	

Los altos contenidos de materia orgánica de estos suelos (tabla 3) harían suponer que los HAPs presentes estarían fuertemente retenidos por la matriz orgánica, resultando en altos coeficientes de distribución. Sin embargo se confirma lo descrito por Cram et al. 2004, que al contrario de lo esperado por los altos contenidos de materia orgánica, se presentan Koc más bajos. Varios autores han encontrado que las sustancias húmicas disueltas y coloidales favorecen la solubilidad de compuestos orgánicos no polares relativamente insolubles (Wilcke, 2000; Haitzer, et al., 1999; Raber et al., 1997; Senesi, 1993; Chiou, et al., 1986; Landrum et al., 1984).

En general los Koc medidos, tanto para derrames recientes como antiguos son más bajos que los calculados a partir de la fórmula empírica (fig. 16). Los Koc de derrames antiguos siguen una función muy similar a la de Karickhoff, en cambio los derrames recientes son aproximadamente un orden de magnitud más bajos, sobre todo para los HAPs de mayor peso molecular y no muestran una dependencia con el logKow. Estos resultados confirman lo expuesto por Alexander (2000), que encontro que al persistir o envejecer los HAPs en el suelo, se van haciendo menos disponibles, ya que son secuestrados por la materia orgánica del suelo.



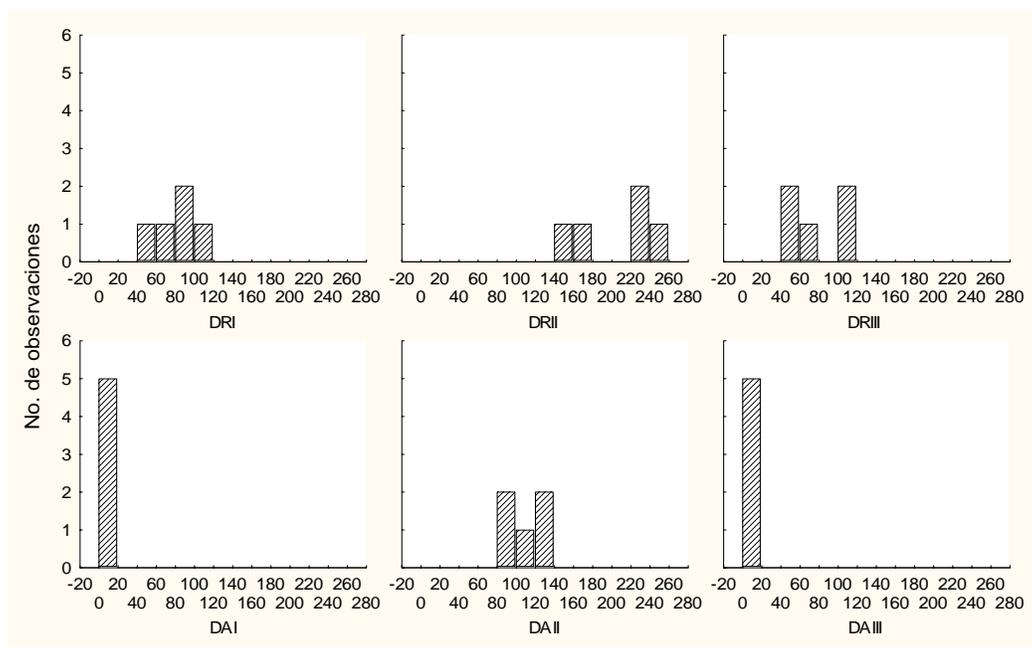
**Figura 16.** Comparación entre los valores de Koc medidos en derrames recientes y antiguos y con los Koc estimados con la ecuación empírica de Karickhoff.

La utilización de ecuaciones empíricas para la determinación del  $K_{OC}$ , asume que todo el carbono orgánico tendrá una interacción idéntica con un contaminante orgánico no polar. Sin embargo también se reconoce que la naturaleza de la materia orgánica presente en los suelos juega un papel importante en la distribución de los compuestos orgánicos, la mayoría de los estudios sobre  $K_{OC}$  se ha realizado en sedimentos o en suelos con bajos contenidos de materia orgánica. En suelos orgánicos Krauss et al (2000) reportan correlaciones significativas de los  $K_{OC}$  calculados con los  $K_{ow}$  en horizontes O de suelos forestales, en cambio se menciona que los  $K_{OC}$  de HAPs en hollin (soot) son varios órdenes de magnitud más altos que los que se predicen a partir del  $K_{ow}$  (Naes et al, 1998). Investigaciones hechas por Gao *et al* (1998) demuestran que el carbono orgánico disuelto en el agua de poro influye sobre el  $K_{oc}$ , resultando en  $K_{oc}$  más bajos que los calculados a partir del  $K_{ow}$ . En horizontes hísticos (H), como los que se reportan en este trabajo, los  $K_{oc}$  medidos son consistentemente más bajos que los calculados con ecuaciones empíricas (Cram et al 2004).

Esta situación también tiene implicaciones sobre el riesgo que representan estos HAPs en el ambiente, ya que mientras más antiguos sean los derrames en suelos orgánicos, menos disponibles estarán los HAPs, aunque no hay que perder de vista que al aumentar el carbono orgánico disuelto, aumenta la concentración de HAPs en solución.

### **6.5 Ensayo de bioacumulación**

Una vez caracterizados los derrames tanto antiguos como recientes y después de realizar pruebas estadísticas (ANOVA y prueba de Tukey) con ayuda del programa STATISTICA para Windows ver. 6.0; se conformaron muestras compuestas entre los derrames en los que no se establecieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en cuanto a concentraciones de HAPs totales e individuales. Además se tomó en consideración que fueran derrames de aproximadamente la misma edad. Al final se conformaron 3 muestras como resultado de combinar DRI y DRIII en MC1 (1.5 años); DAI y DAIII en MC2 (20 años) y quedando el DAII diferente a todos los anteriores como MC3. En la figura 16 se muestran los histogramas de frecuencia que permiten visualizar los derrames cuyas composiciones y concentraciones de HAPs fueron más parecidas entre sí.



**Figura 17.** Histogramas de frecuencia para los tres derrames recientes y antiguos a partir de los cuales se conformaron muestras compuestas para llevar a cabo los ensayos de toxicidad y bioacumulación.

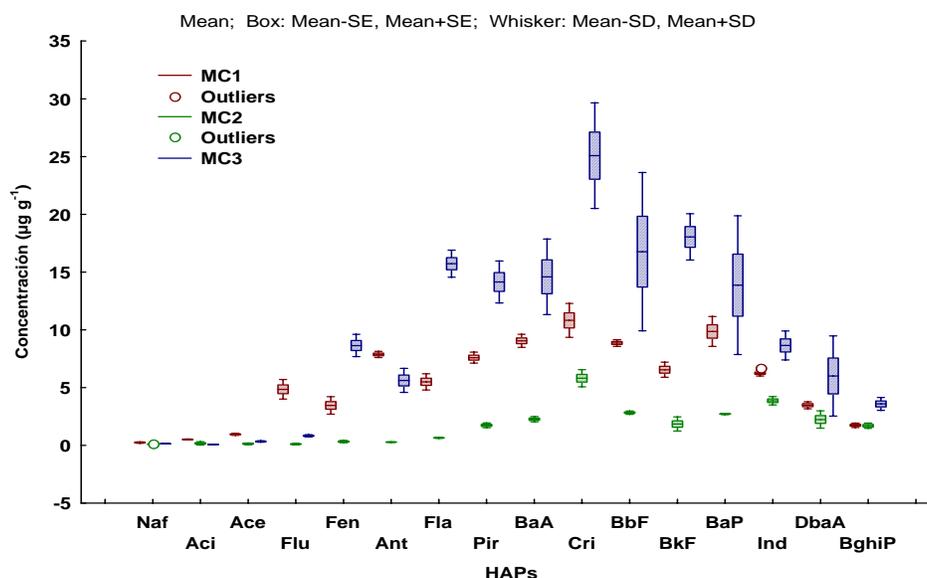
La caracterización de las muestras compuestas conformadas se presenta de manera resumida en la tabla 7. En ella se observa que las tres muestras presentan un pH ácido y un alto contenido de materia orgánica, comparables a los determinados para las muestras individuales (tabla 1). El rango de concentración total de HAPs mediante extracción soxhlet varía de  $26.85 \mu\text{g g}^{-1}$ , en la muestra compuesta con derrame antiguo de 20 años, a  $152.1 \mu\text{g g}^{-1}$ , en la muestra con un derrame de 30 años; valores que se encuentran en el mismo orden de magnitud que los valores determinados para las muestras individuales. En lo que respecta a las concentraciones obtenidas por extracción acuosa en fase sólida, si bien se encuentran en el mismo orden de magnitud que las muestras individuales, la concentración desorbida de la MC1 ( $3.53 \mu\text{g g}^{-1}$ ) es mayor que la correspondiente a cada una de las muestras con las cuales se conformo ( $2.1$  y  $2.0 \mu\text{g g}^{-1}$ ), lo mismo sucede en el caso de la MC2 ( $0.82 \mu\text{g g}^{-1}$ ) y las muestras individuales ( $0.27$  y  $0.25 \mu\text{g g}^{-1}$ ). En el caso de la MC3 también se registro un aumento en la concentración que se desorbio hacia la fase acuosa. Estas variaciones pueden ser atribuidas a la heterogeneidad del suelo y a que las condiciones de las partículas del suelo (orgánicas y minerales) determinan el estado de “combinación” de los compuestos orgánicos en el suelo y por lo tanto la magnitud de la desorción y biodisponibilidad de los mismos (Li *et al.* 2007).

**Tabla 7.** Principales características de las muestras compuestas conformadas para llevar a cabo ensayos de bioacumulación y pruebas de toxicidad aguda.

Derrame	Edad (años)	pH	M. O. (%)	ExS*	EFS*	* <i>E. andrei</i>	Disponible (%)	Bioacumulado (%)
MC1	1.5	4.5	47	87.64	3.53	3.17	4	4
MC2	20	4.0	65	26.85	0.82	0.84	3	3
MC3	30	4.7	51	152.1	1.29	1.78	0.9	1

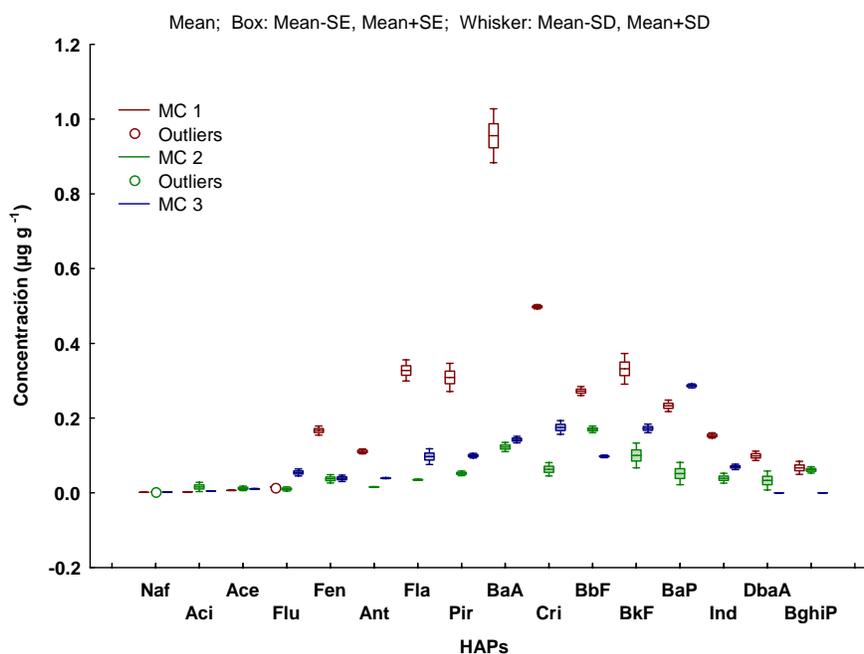
\*Concentración en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de la suma de 16 HAPs

En las figuras 18 se muestran la distribución y dispersión de las concentraciones de HAPs individuales determinadas en muestras compuestas, en donde observamos que los valores más altos de concentración corresponden a la muestra compuesta 3 cuya edad aproximada es de 30 años, mientras que las concentraciones más bajas se registraron para la MC2. En las tres muestras compuestas destacan 6 compuestos por sus altas concentraciones que son: antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, y benzo(a)pireno; los cuales fueron determinados también en tejidos de la lombriz de tierra *Eisenia andrei* (Tabla 8). En lo que respecta a la extracción en medio acuoso, observamos que las concentraciones determinadas para cada uno de los compuestos (fig. 19) todas se encuentran por debajo de  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  y que la mayor desorción se obtuvo para la MC 1 y la menor para la MC3 (fig. 20), siendo estas las muestras con derrames más recientes y más antiguos respectivamente.

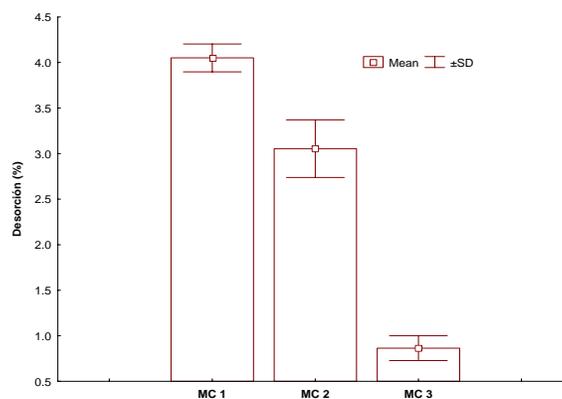


**Figura 18.** Concentraciones promedio de HAPs en muestras de suelo compuestas para la realización de ensayos de bioacumulación y toxicidad aguda. Concentraciones obtenidas por extracción soxhlet.

En los tejidos de lombriz expuestas a la MC1 además se detectaron fluoreno, fenentreno y benzo(k)fluoranteno. La concentración más alta de HAPs totales se registró en los organismos expuestos a la MC1, mientras que la más baja fue determinada en las lombrices expuestas a la MC2 (tabla 8). Las concentraciones determinadas en *E. andrei* representan el 3.62, 3.13, y 1.17% de la concentración total determinada en el suelo de las MC1, MC2 y MC3 respectivamente (fig. 21).



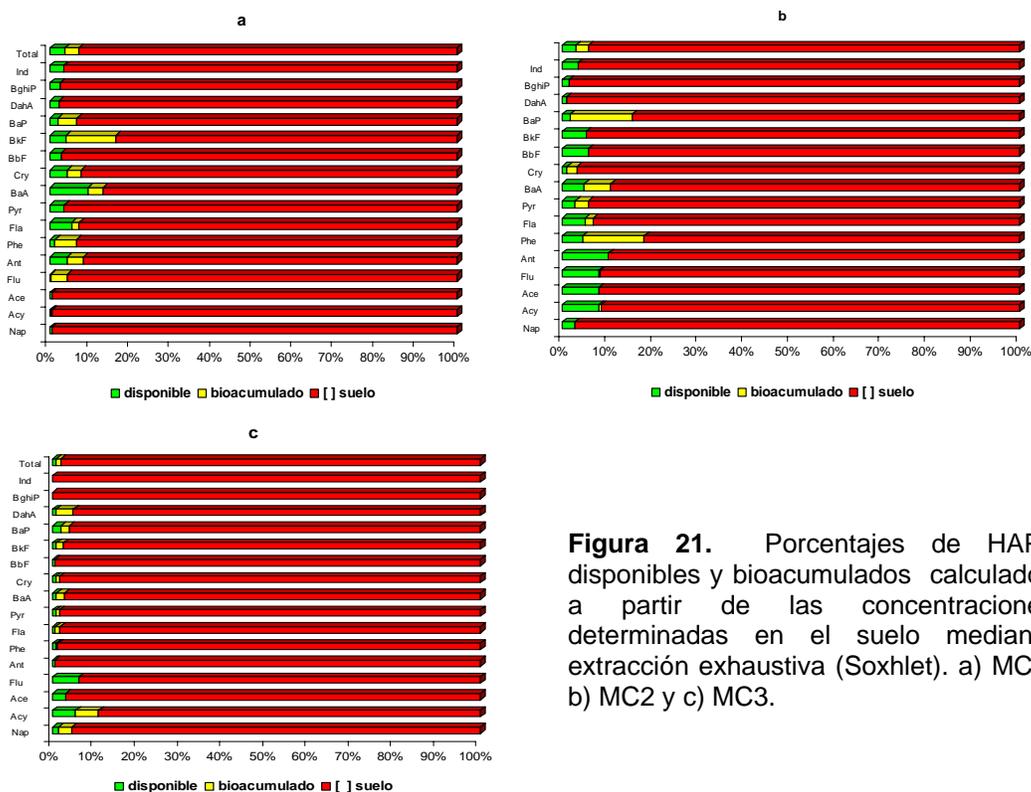
**Figura 19.** Concentraciones promedio de HAPs en muestras de suelo compuestas para la realización de ensayos de bioacumulación y toxicidad aguda. Concentraciones obtenidas por extracción acuosa en fase sólida.



**Figura 20.** Porcentajes de desorción calculados para los HAPs totales determinados en las muestras compuestas empleadas en bioensayos de toxicidad.

**Tabla 8.** Concentraciones promedio de HAPs obtenidas mediante extracción exhaustiva (Soxhlet), extracción ligera (acuosa) y las concentraciones determinadas en los tejidos de la lombriz de tierra *E. andrei*. Las concentraciones están dadas en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco.

Compuesto	Extracción soxhlet*						Extracción en fase sólida*						Concentración en <i>E. Andrei</i> *						
	MC1		MC2		MC3		MC1		MC2		MC3		MC1		MC2		MC3		
	Promedio	Desvest	Promedio	Desvest	Promedio	Desvest	Promedio	Desvest	Promedio	Desvest	Promedio	Desvest	Promedio	Desvest	Promedio	Desvest	Promedio	Desvest	
Naftaleno	0,25	0,07	0,10	0,01	0,15	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acenafileno	0,52	0,04	0,18	0,14	0,08	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acenafeno	0,96	0,08	0,14	0,07	0,34	0,06	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fluoreno	4,86	0,84	0,12	0,06	0,83	0,10	0,02	0,00	0,01	0,01	0,05	0,01	0,21	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fenantreno	3,46	0,76	0,33	0,10	8,65	0,96	0,17	0,01	0,04	0,01	0,04	0,01	0,15	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Antraceno	7,88	0,27	0,29	0,02	5,63	1,04	0,11	0,01	0,02	0,00	0,04	0,00	0,45	0,11	0,05	0,05	0,03	0,01	0,01
Fluoranteno	5,50	0,69	0,65	0,03	15,73	1,17	0,32	0,03	0,04	0,00	0,10	0,02	0,11	0,03	0,06	0,01	0,18	0,01	0,01
Pireno	7,60	0,48	1,74	0,21	14,14	1,82	0,29	0,04	0,05	0,01	0,10	0,01	0,06	0,01	0,05	0,01	0,13	0,01	0,01
Benzo(a)antraceno	9,05	0,56	2,27	0,23	14,59	3,28	0,99	0,07	0,12	0,01	0,14	0,01	0,38	0,10	0,15	0,02	0,26	0,03	0,03
Criseno	10,82	1,46	5,81	0,75	25,08	4,57	0,50	0,01	0,06	0,02	0,18	0,02	0,41	0,09	0,13	0,03	0,23	0,08	0,08
Benzo(b)fluoranteno	8,86	0,30	2,83	0,15	16,77	6,85	0,27	0,01	0,17	0,01	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Benzo(k)fluoranteno	6,55	0,65	1,85	0,62	18,04	2,01	0,31	0,04	0,10	0,03	0,17	0,01	0,97	0,01	0,00	0,00	0,31	0,08	0,08
Benzo(a)pireno	9,86	1,30	2,72	0,05	13,87	6,00	0,23	0,02	0,05	0,03	0,29	0,01	0,49	0,03	0,44	0,03	0,27	0,01	0,01
Indeno(1,2,3)	6,25	0,24	3,87	0,36	8,65	1,25	0,15	0,01	0,04	0,01	0,07	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,01	0,01
Dibenzo(a,h)	3,48	0,30	2,24	0,75	6,01	3,47	0,10	0,01	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Benzo(ghi)perileno	1,75	0,19	1,71	0,24	3,59	0,56	0,06	0,02	0,06	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Total</b>	<b>87,641587</b>	<b>2,76</b>	<b>26,83</b>	<b>1,74</b>	<b>152,14</b>	<b>25,86</b>	<b>3,53</b>	<b>0,07</b>	<b>0,82</b>	<b>0,09</b>	<b>1,29</b>	<b>0,03</b>	<b>3,23</b>	<b>0,16</b>	<b>0,88</b>	<b>0,05</b>	<b>1,78</b>	<b>0,06</b>	<b>0,06</b>



**Figura 21.** Porcentajes de HAPs disponibles y bioacumulados calculados a partir de las concentraciones determinadas en el suelo mediante extracción exhaustiva (Soxhlet). a) MC1, b) MC2 y c) MC3.

En la tabla 9 se presentan los valores del factor de acumulación biota-suelo (FABS) calculado como la concentración en el tejido del organismo normalizado con el contenido de lípidos (1.8 % según Wagman, *et al.*, 2001) entre la concentración del contaminante en el suelo, normalizados a la fracción de carbono orgánico, para los compuestos identificados en los tejidos de lombriz. El FABS es menor de 1 para la mayoría de los compuestos, sin embargo, algunos compuestos como el antraceno (2.03), benzo(k)fluoranteno (1.14) y benzo(a)pireno (1.19) muestran un proceso de bioacumulación en los organismos expuestos. La teoría más ampliamente aceptada respecto a la absorción de los contaminantes por los organismos del suelo es la teoría del equilibrio de partición (EP); para los compuestos orgánicos persistentes la biodisponibilidad esta controlada por el equilibrio de partición entre el suelo, el agua y los organismos (Sjim *et al.*, 2000; Jager *et al.*, 2005; Bergknut, *et al.*, 2007). La bioacumulación es influenciada por los mecanismos de depuración como la excreción, el crecimiento, los procesos reproductivos y los procesos de biotransformación, en donde los compuestos padres son convertidos en otros más o menos tóxicos que los originales, mediante la intervención de diferentes grupos de enzimas (Mackay, 2000; Sijm, 2000). En este caso la concentración de HAPs ligeros fue suficiente para ejercer un efecto de narcosis que redujo la actividad de los organismos y por lo tanto la tasa de ingesta de suelo. Otra consideración importante es la expuesta por Jager *et al.* (2003a), quienes encontraron que muchos de los compuestos detectados en el agua de poro (disponibles) estaban asociados a la materia orgánica disuelta y por lo tanto no estuvieron directamente disponibles para ser absorbidos por los organismos de prueba (*E. andrei*).

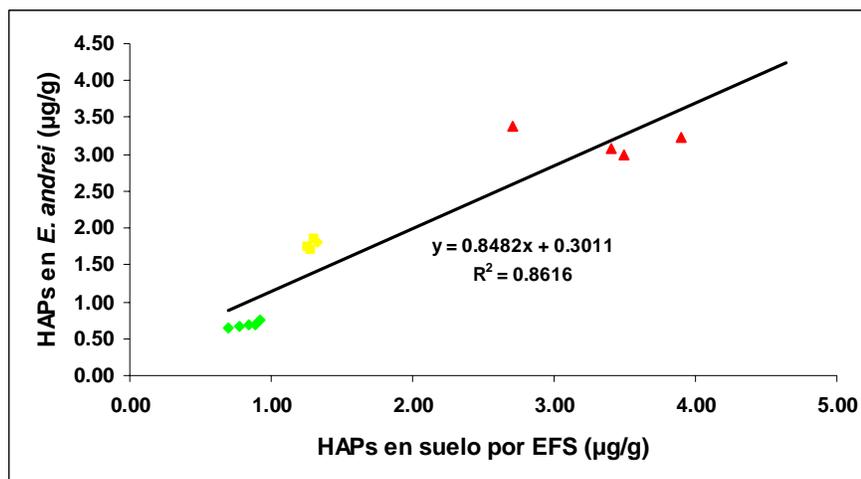
**Tabla 9.** Valores del factor de acumulación biota-suelo calculados para cada uno de los HAPs determinados en los tejidos de *E andrei*, en las diferentes muestras compuestas.

Compuesto	FABS		
	MC 1	MC 2	MC 3
Acenaftileno	0.01	0.07	0.60
Fluoreno	0.33	0.03	
Fenantreno	0.33		
Antraceno	0.44	2.03	0.05
Fluoranteno	0.16	0.22	0.11
Pireno	0.00	0.38	0.09
Benzo(a)antraceno	0.32	0.80	0.18
Criseno	0.29	0.28	0.09
Benzo(k)fluo	1.14		0.17
Benzo(a)pireno	0.38	1.99	0.19
Indeno(1,2,3)			0.43
TOTAL	0.28	0.38	0.12

En la literatura se encuentran numerosos estudios sobre la absorción de HAPs por lombrices de tierra, pero las metodologías difieren en varios aspectos (especie, tiempo de incubación, relación lombrices-suelo, concentración del contaminante y edad); así como la expresión de los resultados (concentraciones que pueden estar o no normalizadas al contenido de lípidos, relaciones de lípidos normalizados con el contenido de carbono orgánico) lo que hace difícil la comparación directa con otras investigaciones. Así por ejemplo, Ma, *et al.*, (1995) determinó factores de bioacumulación para el fenantreno y el fluoranteno de 0.097 y 0.572 respectivamente, para *Lumbricus rubellus* después de haber sido expuesta durante 14 días, demostrando que el fluoranteno es más acumulable que el fenantreno, partiendo de la misma concentración inicial de ambos compuestos; mientras que en esta investigación, como observamos en la tabla 9, para las lombrices expuestas a la MC1, el fenantreno es más acumulable que el fluoranteno, lo cual evidencia que trabajar con mezclas complejas en muestras reales pueden favorecer sinergismos que cambian el comportamiento de los compuestos individuales. White *et al.* (1999) demostró que la adición de pireno fresco podía favorecer la biodisponibilidad del fenantreno envejecido por el desplazamiento competitivo del fenantreno de los sitios de sorción. Parrish *et al.* (2006) determinó concentraciones de 0.204 y 0.084  $\mu\text{g g}^{-1}$  de HAPs totales en *E foetida* y *Lumbricus terrestris* respectivamente, después de haber sido expuestas a un suelo contaminado con 36.3  $\mu\text{g g}^{-1}$  de HAPs totales. Los valores determinados para *E foetida* por Parrish *et al.*, coinciden en orden de magnitud con los determinados en esta investigación para la MC 2. Sin embargo, el valor nominal de HAPs en tejidos de lombriz determinado en esta investigación es mayor, mientras que la concentración en el suelo es menor; lo cual apoya que el efecto de las interacciones que se dan en una matriz tan compleja como el suelo y los contaminantes vertidos en él durante largos periodos de tiempo pueden modificar el comportamiento de los contaminantes de manera importante. En general, diversos investigadores han observado una disminución en la biodisponibilidad y por ende en la bioacumulación de compuestos orgánicos conforme el tiempo de envejecimiento de los contaminantes aumenta. Así por ejemplo, Jager *et al.* (2000), en un estudio realizado sobre el comportamiento toxicocinético de algunos HAPs, estimó factores de bioacumulación para fenantreno, pireno, fluoranteno y benzoapireno obteniendo un pico máximo a los siete días de exposición, disminuyendo éste hacia los 14 días (0.5, 2, 4, y 1 Kgoc/Kg lip. respectivamente) atribuyendo esto al establecimiento de un equilibrio de partición entre el agua del suelo y la fase interna del organismo (agua y lípidos). Este efecto fue observado por Johnson *et al.* (2002) para el pireno y el

benzo(a)antraceno, quienes concluyeron que el proceso de envejecimiento de los contaminantes disminuye su disponibilidad para los organismos. Tang *et al.* (2002) llegaron a la misma conclusión al exponer organismos de *E fetida* a HAPs frescos y envejecidos, encontrando mayores concentraciones de hidrocarburos en los organismos expuestos a los contaminantes frescos que en los organismos expuestos a los contaminantes envejecidos. Lo anterior coincide con lo encontrado en esta investigación, ya que los valores más bajos del factor de bioacumulación se presentan en organismos expuestos a la MC3 que es la que registra los derrames más antiguos.

Tomando en cuenta los valores totales para cada mecanismo de extracción y las concentraciones de HAPs en los tejidos de lombriz, se realizaron correlaciones entre ellas; obteniéndose una correlación altamente significativa solo para la realizada entre la extracción en fase sólida y la concentración en tejidos de *E. andrei* (figura 22). Por otra parte, de los compuestos individuales determinados en los tejidos de *E. andrei* expuestos al suelo contaminado, solo 3 de los 6 comunes en los tres niveles de exposición muestran una correlación positiva y significativa (Tabla 10); estos son el antraceno, benzo(a)antraceno y criseno, compuestos cuyas características los hacen persistentes en el suelo y apropiados para ser tomados por las lombrices via ingestión y dada su liposolubilidad ( $\log K_{ow}$  4.5 a 5.9) pasar del intestino a los tejidos de la lombriz en los que se acumulan y difícilmente se degradan. Por otra parte, Sevendrup *et al.* (2002) y Eom *et al.* (2007) encontraron que estos compuestos no observan efectos tóxicos para *Folsomia fimetaria* y *Eisenia andrei*, atribuyendo esto a su baja disposición en el agua de poro.



**Figura 22.** Correlación entre los HAPs totales determinados por extracción en fase sólida y los HAPs totales determinados en tejidos de *E. Andrei*.

**Tabla 10.** Valores de los coeficientes de correlación entre las concentraciones de HAPs obtenidas en suelo mediante extracción acuosa en fase s $\acute{o}$ lida y en tejidos de *E. andrei*.

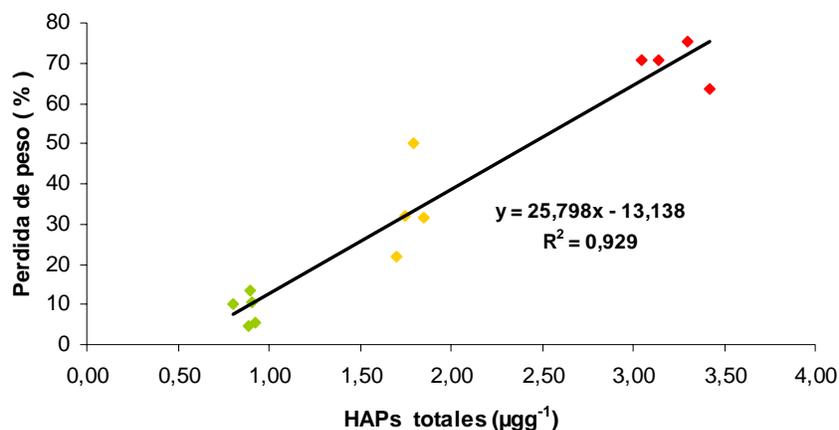
Suelo EFS vs Tejidos de <i>E. andrei</i>	Coeficiente de correlaci $\acute{o}$ n de Pearson
Antraceno	0.913
Fluoranteno	0.137
Pireno	-0.186
Benzo(a)antraceno	0.748
Criseno	0.900
Benzo(a)pireno	-0.488

### 6.6 Toxicidad aguda.

La toxicidad aguda, se estimad $\acute{o}$  a partir del porcentaje de supervivencia de los organismos expuesto. La muestra m $\acute{a}$ s t $\acute{o}$ xica (con el menor n $\acute{u}$ mero de supervivientes) fue la MC1 con un 50 % de supervivencia y cuya edad aproximada de contaminaci $\acute{o}$ n es de a $\acute{n}$ o y medio. Las muestras menos t $\acute{o}$ xicas fueron la MC3 y MC2 con una supervivencia de 90 y 98 % respectivamente y con edades de contaminaci $\acute{o}$ n de 30 y 20 a $\acute{n}$ os respectivamente. Los efectos observados en los organismos que sobrevivieron, fueron p $\acute{e}$ rdua de la movilidad y la consecuente p $\acute{e}$ rdua de peso (tabla 11) debido a la disminuci $\acute{o}$ n en el consumo de alimento. Este efecto fue mayor en la MC 1 en donde los organismos permanecieron en la superficie del suelo en la unidad experimental, no se observ $\acute{o}$  la formaci $\acute{o}$ n de galer $\acute{i}$ as, tampoco fue evidente la depositaci $\acute{o}$ n de excretas. Estos efectos pueden ser atribuidos a la narcosis que causan los HAPs m $\acute{a}$ s ligeros sobre los organismos (Jager *et al.*, 2000) y por la difusi $\acute{o}$ n de estos compuestos a trav $\acute{e}$ s de la dermis ocasionando la deshidrataci $\acute{o}$ n de los mismos. La p $\acute{e}$ rdua de peso en esta investigaci $\acute{o}$ n se correlaciona significativa y positivamente (figura 23) con las concentraciones totales de HAPs en el suelo; al respecto, Shin y Kim (2001) observaron una disminuci $\acute{o}$ n en el incremento de la biomasa de *E. fetida* conforme aumentaba la concentraci $\acute{o}$ n de fenantreno en el suelo; mientras que Eijsackers *et al.*, (2001) encontro que la perdida de peso de las lombrices no se correlacionaba con la concentraci $\acute{o}$ n total de HAPs en sedimentos con contaminaci $\acute{o}$ n fresca y envejecidos.

**Tabla 11.** Pesos de los 10 organismos colocados en cada unidad experimental, al inicio y al final de la exposición al suelo contaminado.

Unidad experimental	Peso inicial	Peso final	Perdida de peso (%)
MC1a	3,4886	1,0136	71
MC1b	4,5081	1,1162	75
MC1c	4,0264	1,4748	63
MC1d	3,5139	1,0327	71
MC1e	3,0473	*	
		Promedio	<b>70</b>
		Des vest	5
MC2a	2,9775	2,65914	11
MC2b	2,7752	2,49465	10
MC2c	3,5948	3,4003	5
MC2d	3,526	3,36394	5
MC2e	4,0182	3,4743	14
		Promedio	<b>9</b>
		Des vest	4
MC3a	3,084	2,12826	31
MC3b	3,8587	1,9325	50
MC3c	2,904	2,26877	22
MC3d	3,2774	2,2262	32
MC3e	2,5907	**	
		Promedio	<b>34</b>
		Des vest	12



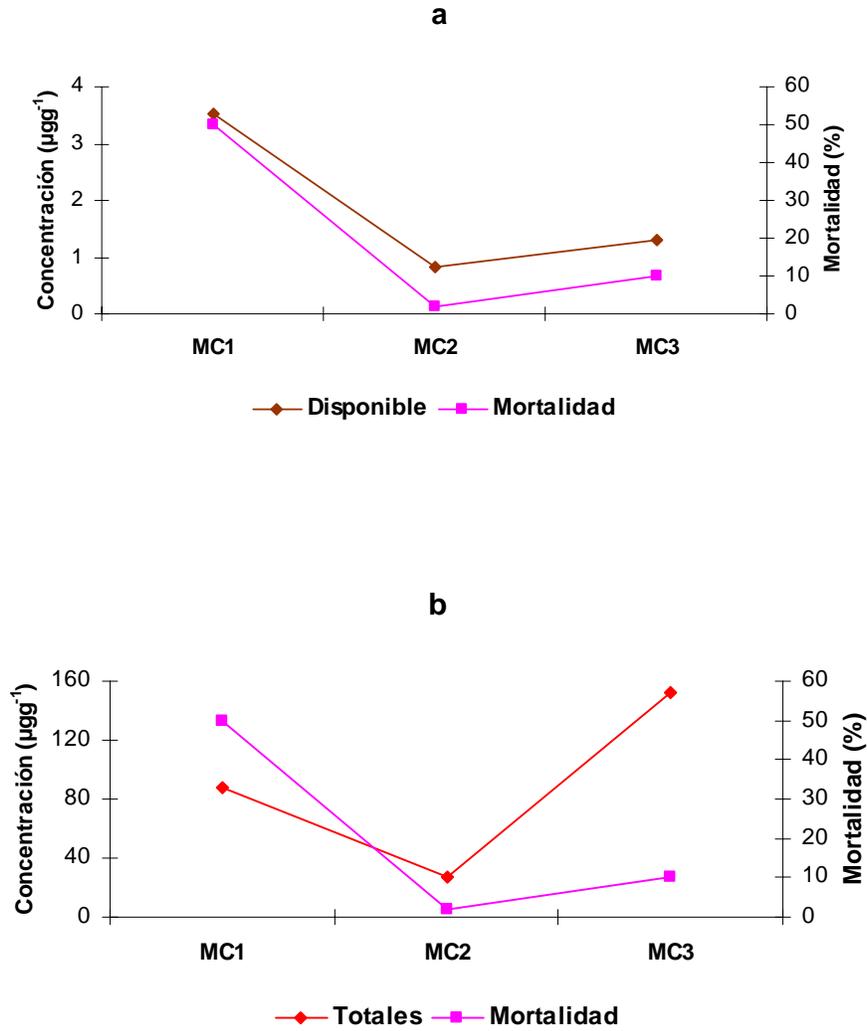
**Figura 23.** Grafica que muestra la correlación que existe entre la concentración de HAPs totales contenidos en el suelo y la pérdida de peso ocurrida en organismos de *E. andrei*.

En los casos en donde la supervivencia fue mayor, las lombrices se movieron hacia zonas más profundas en el suelo, y la presencia de excretas en la superficie del suelo indica que los organismos se alimentaron durante el experimento; esto corrobora lo expuesto por Jager et al., (2003a) y Fleuren et al., (2003), quienes observaron que a pesar de que *Eisenia andrei* es una lombriz compostera, ésta es capaz de alimentarse de suelo

seleccionando la fracción más enriquecida de materia orgánica. Eijsackers, et al., (2001) realizaron ensayos con sedimentos de turba (10-40% de materia orgánica) enriquecidos con HAPs (fenantreno, antraceno, fluoranteno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(ghi)perileno) en concentraciones de 0.1 a 1  $\mu\text{g g}^{-1}$ , en los que no observaron efectos adversos en la supervivencia y reproducción de los organismos y la acumulación de los HAPs fue muy limitada lo que no permitió determinar concentraciones medibles de HAPs en tejidos de *E. fetida*. Atribuyen esto, más que a la capacidad de metabolizarlos, a la capacidad de las lombrices para mejorar las “condiciones de trabajo” de los microorganismos degradadores de HAPs.

La interpretación de la toxicidad debe considerar los factores bióticos y abióticos que modifican la partición y la biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos; esto es evidente entre los DC1 y DC3 en donde no existe diferencia significativa entre los contenidos totales de HAPs, pero sí hay diferencia en cuanto a la toxicidad y a la desorción de HAPs a la fase acuosa, lo que puede atribuirse a las diferencias en las edades de los derrames y a los contenidos de materia orgánica, ya que en donde hay mayor toxicidad y desorción es en el derrame más reciente y con menor contenido de materia orgánica. Shakir y Weaver (2002) realizaron experimentos de supervivencia en suelos contaminados con petróleo fresco y petróleo intemperizado, teniendo una mayor supervivencia en el segundo caso que en el primero, aunque la supervivencia fue de 0 para ambos casos después de 10 días a una concentración de 2.5 % de petróleo en el suelo. Eom *et al*, (2007) quienes evaluaron la toxicidad para un sitio contaminado por una productora de coque, cuya concentración de HAPs totales fue de  $2634 \pm 241 \text{ mg Kg}^{-1}$  y las concentraciones individuales fueron de 4.6 a 561  $\text{mg Kg}^{-1}$  (acenaftileno y fluoranteno respectivamente), encontraron que el fluoreno, fenantreno, fluoranteno, y pireno son los compuestos que explican la toxicidad del suelo para colembolos y lombrices de suelo, con valores de concentración letal 50% de 76, 281, 415 y 280  $\text{mg Kg}^{-1}$  respectivamente, concentraciones que son uno y dos órdenes de magnitud mayores a los encontrados en esta investigación en la muestra que observo un 50 % de supervivencia.

En la figura 24 se muestran las concentraciones totales de HAPs bioacumulados y disponibles a partir de las concentraciones de HAPs presentes en el suelo de las muestras MC1, MC2 y MC3 y sus correspondientes porcentajes de supervivencia.



**Figura 24.** Comportamiento de la mortalidad de organismos de *E. andrei* y HAPs disponibles (a) y totales (b), en las diferentes muestras compuestas.

## Conclusiones

- Estos resultados demuestran que solo una fracción del total de HAPs contenidos en el suelo pasa a la fase acuosa del suelo y por lo tanto solo una fracción del total está disponible y accesible a los organismos del suelo.
- Estadísticamente no existen diferencias significativas entre los porcentajes de desorción de HAPs en suelos afectados por derrames de diferentes edades, cuando estos son mayores de un año y los suelos son ricos en materia orgánica.
- El proceso de desorción de HAPs es afectado por el contenido de materia orgánica disuelta en la fase acuosa, haciendo que los coeficientes de distribución entre la materia orgánica del suelo y el agua ( $K_{oc}$ ), sean menores a los calculados empíricamente.
- Las concentraciones de HAPs obtenidas en extractos acuosos correlacionan mejor con las concentraciones determinadas en tejidos de *E. andrei*, que las concentraciones totales en el suelo.
- La mortalidad de *E. andrei* se correlaciona mejor con la concentración de HAPs determinadas en extractos acuosos que con las concentraciones totales determinadas en el suelo.

## Recomendaciones

- Es necesario evaluar la influencia que tienen los distintos tipos de materia orgánica (calidad y cantidad) sobre el  $K_{oc}$  de los HAPs.
- Para tener una mejor idea de los daños ocasionados por los HAPs en los organismos, se recomienda la realización de ensayos de genotoxicidad y de toxicidad crónica.
- Con el fin de realizar una mejor evaluación de la biodisponibilidad y toxicidad en suelos contaminados con compuestos orgánicos persistentes, se deben incluir al menos dos especies más de organismos de diferentes niveles tróficos.
- Debido a que la biodisponibilidad varía de acuerdo al compuesto o mezcla de compuestos en particular, suelo y tiempo de envejecimiento, es necesaria la realización de bioensayos para medir la biodisponibilidad.

## REFERENCIAS

- Abdul Rida, A. M. Y Bouché M. B. 1997. Earthworm toxicology: from acute to chronic test. *Soil Biol. Biochem.* 29: 699-703.
- Albers, P.H. 2003. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons, p. 342-349. In: Hoffman, D. J., Burton, G. A. y Rattner, B. A. (Eds.) *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publisher. Boca Raton, Florida.
- Alexander, M. 1995. How toxic are toxic chemicals in soil?. *Environmental Science and Technology* 29 (11): 2713-2717.
- Alexander, M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental contaminants. *Environmental Science and Technology*. 34: 4259-4265.
- Alexander, R. and Alexander M. 1999. Genotoxicity of two polycyclic aromatic hydrocarbons declines as they age in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (6): 1140-1143.
- Alexander, R. Chung, N. and Alexander, M. 1999. Solid phase genotoxicity assay for organic compounds in soil. *Environm. Toxicol. Chem.* 15 (2): 420- 425.
- Arfsten, D. P., Schaeffer, D. J., Mulveny, C. D. 1996. The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals and plants : a review. 33 : 1-24.
- Ball, W. P. y Roberts, P. V. 1991. Long-term sorption of halogenated organic chemicals by acuifer material 1. Equilibrium. *Environmental Science and Technology* 25: 1237-1249.
- Bartha, R. 1986. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microbial Ecology*. 12:155-172
- Belfroid, A.C., Seinen, W., Van Gestel, K. C. A. M., Hermes, J. L. M., Van Leeuwen, K. J. 1995. Modelling the accumulation of hydrophobic organic chemicals in earthworms-application of the equilibrium partitioning theory. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2: 5-15.
- Bergknut, M, E. Sehlin, S. Lundstedt, P. L. Andersson, P. Haglund, M. Tysklind. 2007. Comparison of techniques for estimating PAH bioavailability: Uptake in *Eisenia fetida*, passive samplers and leaching using various solvents and additives. *Environmental Pollution*. 145: 154-160.
- Bogan W. B. y W. R. Sullivan. 2003. Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere*. 52: 1717-1726.

- 
- 
- Bollag, J. -M. and S. -Y. Liu. 1990. Biological transformation processes of pesticides. P. 169-211. In H.H. Cheng (ed.) Pesticides in the soil environment: Processes, impacts, and modeling. SSSA Book Ser. 2. SSSA, Madison, WI.
- Botello, A. V. 1996. Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo, p. 203-210. In: A. V. Botello, J. L. Rojas-Galaviz, J. A. Benítez, y D. Zárate-Lomelí (Eds.) Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. EPOMEX Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche. México, 666 p.
- Bouwer, E. J. y Zehnder, A. J. 1993. Bioremediation of organic compounds-putting microbial metabolism to work. Trends in Biotechnology. 11(8): 360- 367.
- Braida, J. W., White, C. J., Ferrandino, J. F. y Pignatello, J. J. 2001. Effect of solute concentration on sorption of polyaromatic hydrocarbons in soil: uptakes rates. Environmental Science and Technology. 35: 2765-2772.
- Brusseau, M. L., Jessup, R. E y Rao, P. S. C. 1991. Nonequilibrium sorption of organic chemicals: elucidation of rate-limiting processes. Environmental Science and Technology 25: 134-142.
- Bundy, J.B., Campbell, C.D y Paton, G.I 2001. Comparison of response of six different luminescent bacterial bioassays to bioremediation of five contrasting oils. Journal of Environmental Monitoring. 3: 404-410.
- Carmichael, L. M., Christman, R. F. y Pfaender, F. J. 1997. Desorption and mineralization kinetics of phenanthrene and chrysene in contaminated soils. Environmental Science and Technology. 31: 126-132.
- Chiou, C.T., Malcolm, R. L., Brinton, T. I. y Kile, D. E.1986. Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids. *Environmental Science and Technology*. 20: 502-508.
- Chiou, C. , McGroddy, S. and Kile D. 1998. Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments. *Environmental Science and Technology*. 32, 264-269.
- Chung, N., & Alexander, M. 1999. Effect of concentration on sequestration and bioavailability of two polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* 33: 3605-3608.
- Cole, M.1994. Assessment and Remediation of Petroleum Contaminated Sites. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. Pp. 75-90.

- 
- 
- Connell, D. W., Hawker, D. W., Warne, M. J., Vowles, P. P. 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). In Introduction into Environmental Chemistry. McCombs, K., Starkweather, A. W., Eds.; CRC Press LLC; Boca Raton, Florida. Pp. 205-217
- Cornelissen, G., Rigterink, H., Ferdinandy, M. and van Noort, P. 1998. Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extend of bioremediation. *Environmental Science and Technology* 32, 966-970.
- Cram, S., Siebe, C., Ortíz-Salinas R. y Herre, A. 2004. Mobility and persistente of petroleum hydrocarbons in peat soils of Southeastern Mexico. *Soil and Sediment Contamination*. 13: 341-360.
- Cuypers, C., Grotenhuis, T., Joziase, J. & Rulkens, W. 2000. Rapid persulfate oxidation predicts PAH bioavailability in soil and sediments. *Environmental Science and Technology* 34: 2057-2063.
- Cuypers, C., Clemens, R., Grotenhuis, T. & Rulkens, W. 2001. Prediction of petroleum hydrocarbon bioavailability in contaminated soils and sediments. *Soil and Sediment Contamination*, 10: 459-482.
- Douglas, G., Bence, E., Prince, R. McMillen, S. and Butler, E. 1996. Environmental stability of selected petroleum hydrocarbon source and weathering ratios. *Environmental Science and Technology* 30: 2332-2339.
- Dzomback, D.A. y Luthy, R. G. 1984. Estimating adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Soil Science*. 137: 292-307.
- Eijsackers, H. Van Gestel, C. A. M., De Jonge, S. Mujs, B., and Slijkerman, D. 2001. Polycyclic aromatic hydrocarbon-polluted dredged peat sediments and earthworms: a mutual interference. *Ecotoxicology*. 10: 35-50.
- Eom, I. C., C. Rast, A. M. Veber, P. Vasseur. 2007. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67: 190-205.
- Fent, K. 2004: Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*. 205 : 223-240.
- Fitzgerald, G. D., Lanno, R. P., Klee, U., Farwell, A. and Dixopn, D. G. 1997. Critical body residues (CBRs) : application in the assessment of pentachlorophenol toxicity to *Eisenia fetida* in artificial soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 26 (3/4) : 685-688.
- Fleuren, J. L. R. H., Jager, T., Roelofs, W., De Groot, A., Baerselman, R. and Peijnenburg, M. G. J. W. 2003. Feeding behaviour of *Eisenia andrei* in two different6 field contaminated soils. *Pedobiologia*. 47 : 670-675.

- Gao, J. P., Maguhn, J., Spitzauer, P. y Kettrup, A. 1998. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in pore water and sediment of a small aquatic ecosystems. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 69 : 227-242.
- Guerin, F. W. y Boyd, A. S. 1997. Bioavailability of naphthalene associated with natural and synthetic sorbents. *Water Research*. 31: 1504-1512.
- Haeseler, F., Blanchet, D., Druelle, V., Werner, P. and Vandecasteele, J.P. 1999. Ecotoxicological assesment of soils of former manufactured gas plant sites: bioremediation potential and pollutant mobility. *Environ. Sci. Technol* 33(24):4379 - 4384.
- Haitzer, M., Abbt-Braun, G., Traunspurger, W., y Seinberg, W. E. C. 1999. Effects of humic substances on the bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons: correlations with spectroscopic and chemical properties of humic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18(12) : 2782-2788.
- Hatzinger, P. B. y Alexander, M. 1995. Effect of ageing of chemicals in soil upon their degradabilidad and extractability. *Environmental Science and Technology*. 39: 537- 545.
- Hawthorne, S. B. and Grabanski, C. B. 2000. Correlating selective supercritical fluid extraction with bioremediation behavior of Pahs in a field treatment plot. *Environmental Science and Technology* 34: 4103-4110.
- Heimbach, F. 1992. In: Becker, H., P. J. Greig-Smith y Heimbach F. (Eds.) *Ecotoxicology of Earthworm*. Intercept Press, Andover, Hants, HK.
- Hwang, S. y Cutright, T. J. 2002. The impact of contact time on pyrene sorptive behaviour by a sandy-loam soil. *Environmentall Pollution*. 117: 371-378.
- Jager, T. 2004. Modeling ingestion as an exposure route for organic chemicals in earthworms (Ologochaeta). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 57: 30-38.
- Jager, T., Antón, S. F. A., Muijs, B. Van Der Velde, E. G. and Posthuma, L. 2000. Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19 (4): 953-961.
- Jager, T., Baerselman, R., Dijkman, E., De Groot, C. A., Hogendoorn, A. E., De Jong, A., Kruitbosch, W. J. A. and Peijnenburg, M. G. W. J. 2003a. Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworm (*Eisenia Andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22(4): 767-775.
- Jager, T., Fleuren, J. L. R. H., Roelofs, W. De Groot C. A. 2003b. Feeding activity of the earthworm *Eisenia andrei* in artificial soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 35 : 313-322.

- Johnson, L. D., Jones, C. K., Langdon, J. C., Pearce, G. T., Semple, T. K. 2002. Temporal changes in earthworm availability and extractability of polycyclic aromatic in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 34. 1363-1370.
- Jones, K. C., Alcock, R. E., Johnson, D. L., Northcott, G. L., Semple, K. T. y Woolgar, P. J. 1996. Organic chemicals in contaminated land: analysis, significance and research priorities. *Land Contamination and Reclamation*. 4: 189-197.
- Kalf D.F.; Crommentuijn T.; van de Plassche E.J. 1997. Environmental quality objectives for 10 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 36(1): 89-97.
- Karickhoff SW. 1981. Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. *Chemosphere*. 10: 833 – 846.
- Kelsey, J., Kottler, B and Alexander M. 1997: Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environmental Science and Technology* 31: 214-217
- Landrum, P. F., Nihart, S. R., Eadle, B. J. y Gardner, W. S. 1984. Reverse-phase separation method for determining pollutant binding to Aldrich humic acid and dissolved organic carbon of natural waters. *Environmental Science and Technology*. 18: 187 -197.
- Lanno, R., Wells, J., Conder, K., Bradham, y Basta, N. 2004. The bioavailability of chemicals in soils for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 57: 39-47.
- Lesser, I, J. M. 1995. Prospección de contaminación de acuíferos por hidrocarburos. *Geologos*. 1(6): 5-8.
- Li, J., Sun H., y Zhang Y. 2007. Desorption of pyrene from freshly-amended and aged soils and its relationship to bioaccumulation in earthworms. *Soil and Sediment Contamination*. 16: 79-87.
- Linthurst, R. A., Bourdeau, P. y Tardiff, R. G. 1995. *Methods to Assess the Effects of Chemicals on Ecosystems*. Wiley, New York.
- Loibner, A.P., Gartner, M., Schlegl, M., Hautzenberger, I., y Braun, R. 1997. PAHS: rapid estimation of their bioavailability in soil. In: *In Situ and On Site Biorremediation*, Vol. 4(5), pp. 617-622. (Leeson, A. and Alleman, B. C., Eds.) Columbus OH, Battelle Press.
- Luthy, R. G., Aiken, G. R., Brusseau, M. L., Cunningham, S.D, Gschwend, P. M., Pignatello, J. J., Reinhard, M., Traina, S. J., Weber, W. J., y Westall, J.C. 1997. Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. *Environmental Science and Technology*. 32: 709-713.

- 
- 
- Ma, W.C., Immerzel, J., Bodt, 1995. Earthworm and food interactions on bioaccumulation and disappearance in soil of polycyclic aromatic hydrocarbons: studies on phenanthrene and fluoranthene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 32: 226-232.
- MacDonald G. B. y Chapman, M. P. 2002. PAH phototoxicity-an ecologically irrelevant phenomenon? *Marine Pollution Bulletin*. 44: 1321- 1326.
- Mackay, M. D., Roberts, P. V. y Cherry, J. A. 1985. Transport of organic contaminants in groundwater. *Environmental Science and Technology*. 19 (5): 384-392.
- Mackay, D., Shiu, W. Y. y Ma, K. C. 1992. *Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals*, Vol. II. Lewis Publishers/CRC Press, Boca Raton, FL.
- Mackay, D y A. Fraser. 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution*. 110: 375-391.
- MacRae , J. D. & Hall, K. J. 1998. Comparison of methods used to determine the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment. *Environmental Science and Technology* 32: 3785-3788.
- Meharg, A. A. 1996. Bioavailability of atrazine to soil microbes in the presence of the earthworm *Lumbricus terrestris* . *Soil Biology and Biochemistry* 28: 555-559.
- Menzie, C. A., Potocki, B. B., Santodonato, J. 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science and Technology*. 26: 1278-1284.
- Morrison, D., Robertson, B. and Alexander, M. 2000. Bioavailability to earthworms of aged DDT, DDE, DDD and dieldrin in soil. *Environmental Science and Technology* 34: 709-713.
- Morrill, L. G., Mahilum, B. C. y Mohiuddin, S. H. 1982. Organic compounds in soils: sorption, degradation and persistence. Ann Arbor Science Publishers. Michigan.
- Nam, K y Alexander M. 1998. Role of nanoporosity and hydrophobicity in sequestration and bioavailability: test with model solids. *Environmental Science and Technology*. 32: 71-74.
- Naes, K., Axelman, J., Naf, C., y Broman, D. 1998. Role of soot carbon and other carbon matrices in the distribution of PAHs among particles, DOC and the dissolved phase in the effluent and recipient waters of an aluminum reduction plant. *Environmental Science and Technology*. 32 : 1786-1792.

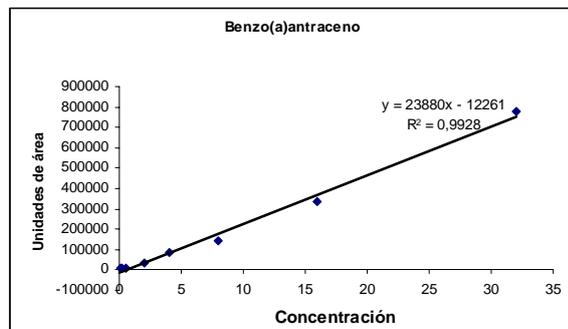
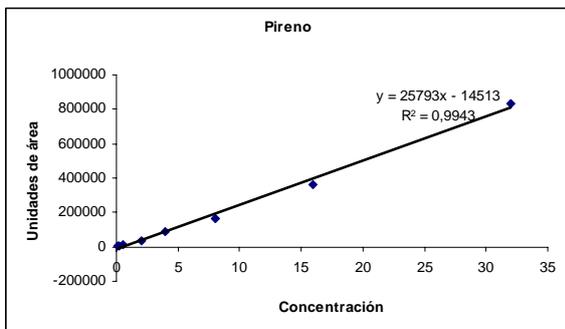
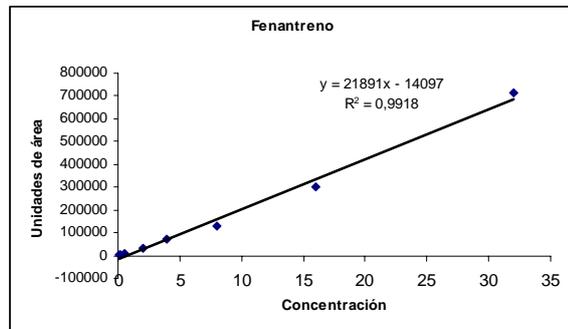
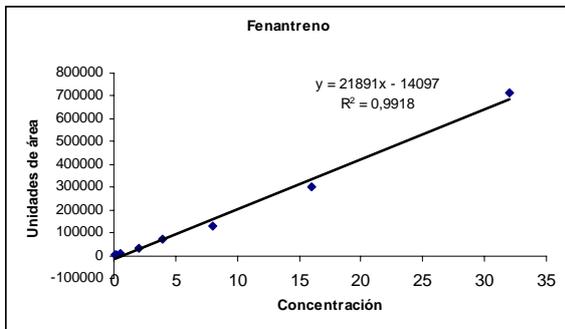
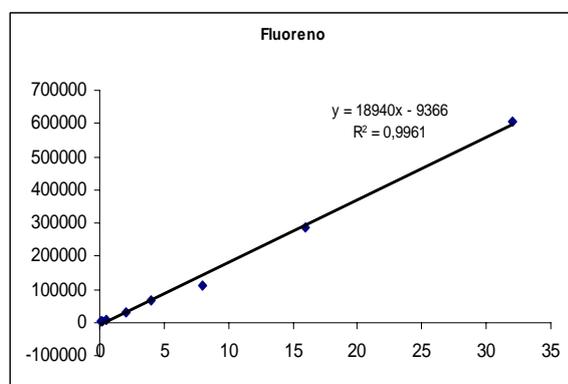
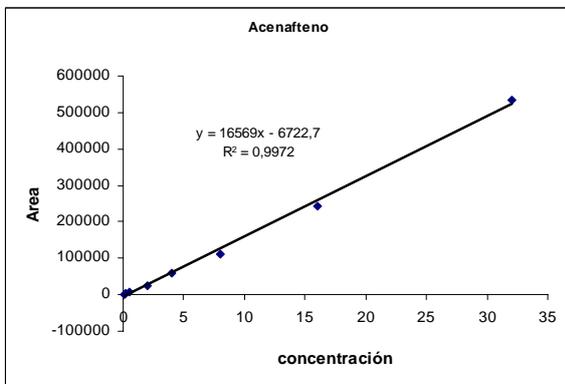
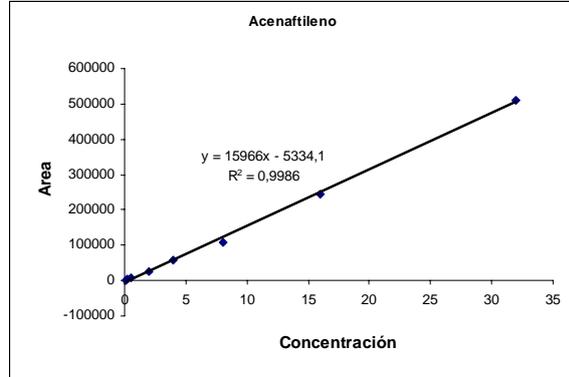
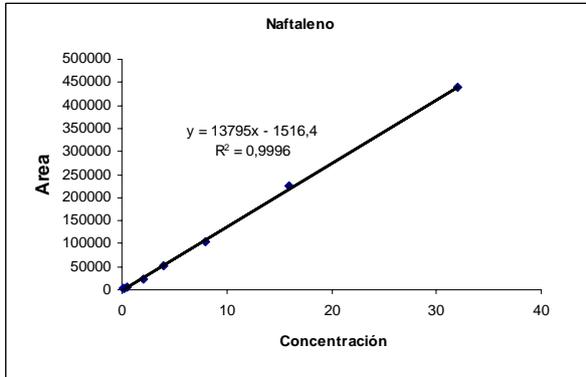
- 
- 
- Nam, K., Chung, N. and Alexander, M. 1998: Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. *Environmental Science and Technology* 32, 3785- 3788.
- Ney, R. E.1990. *Fate and Transport of Organic Chemicals in the Environment*. Government Institute. Maryland. Pp. 9-227.
- Ortíz, R. 2001. Migración de hidrocarburos en suelos orgánicos cercanos a sitios de explotación petrolera. Tesis de maestría (biología). Facultad de Ciencias, UNAM.
- Paton, G. I., Killham, K., Weitz, H. J. y Semple K.T. 2005. Biological tools for the assessment of contaminated land: applied soil ecotoxicology. *Soil Use and Management*. 21: 487-499.
- Parrish, D. Z., White, C. J., Isleyen, M., Gent, P. N. M., Iannucci-Berger, W., Eitzer, D. B., Kelsey, W. J. y Mattina, I. M. 2006. Accumulation of weathered polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by plant and earthworm species. *Chemosphere*, 64(4):609-618.
- Pignatello, J. J. y Xing, B. 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environmental Science and Technology* 30: 1-11.
- Pierzynski, M. G., Sims, T. J. y Vance, F. G. 1994. *Soils and Environmental Quality*. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida. Pp. 20-39 y 185-200.
- Raber, B. y Kögel-Knabner, I. 1997. Influence of origin and properties of dissolved organic matter on the partition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *European Journal of Soil Science*. 48: 443 – 455.
- Reible, D.D. 1999. *Bioavailability*. Hazardous Substance Research Center, Louisiana State University.
- Reid, B., Jones, K. and Semple, K. 2000. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments. *Environm. Poll.* 108: 103- 112.
- Richterich, K., Berger, H., y Steber, J. 1998. The two phase closed bottle test –a suitable method for the determination of readily biodegradability of poorly soluble compounds. *Chemosphere*. 37: 319-326.
- Santer, P. 1997. *Bioremediation and Ecotoxicological Evaluation of Diesel-Contaminated Soil*. Diplomarbeit Durchgesürt Am Ifa Tull Aberteilungum Weltbiotechnologie Universität Fur Boden Kultur. Wien. 94 pp.
- Semple, K. T., Reid, B. J. y Fermor, T. R. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants: a review. *Environmental Pollution*. 112: 269-283.

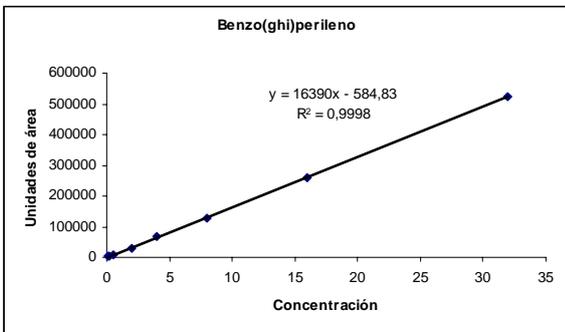
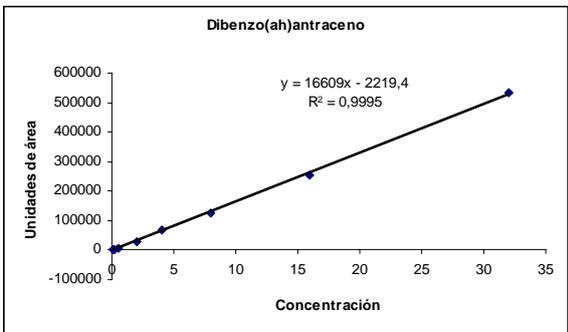
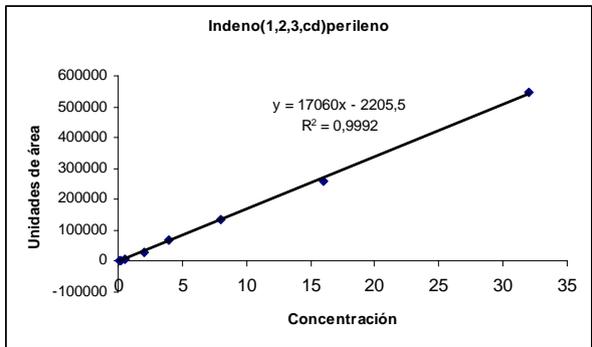
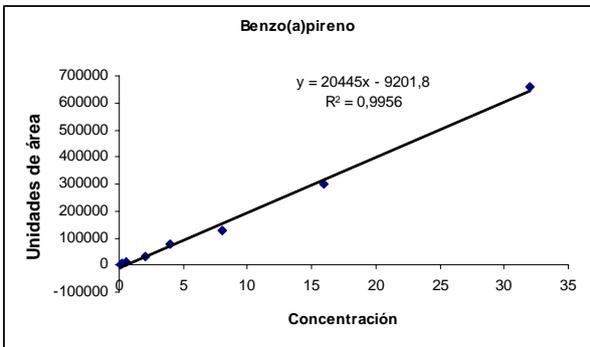
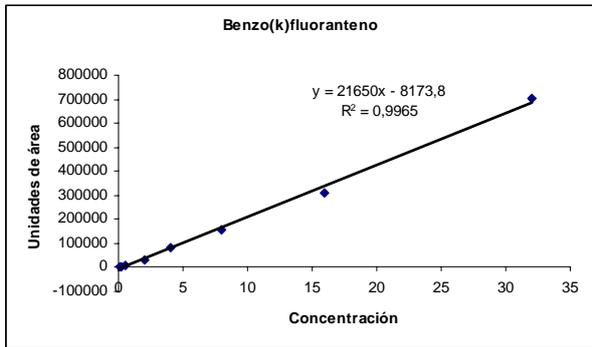
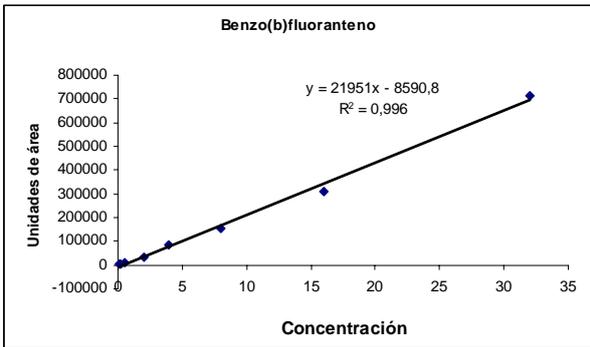
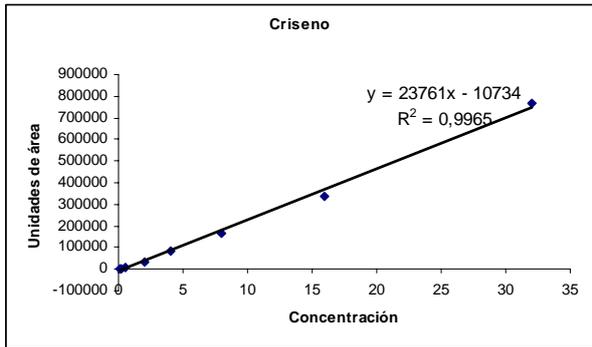
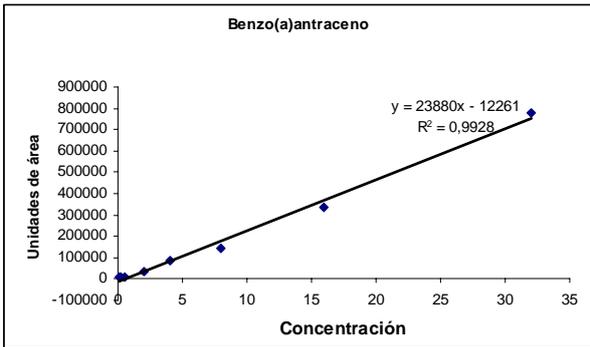
- Senesi, N. 1993. Nature of interactions between organic chemicals and dissolved humic substances and the influence of environmental factors. In: Organic substances in soil and water, Special publication No.135, pp. 73-101 (Beck, A.J. Jones, K.C., Hayes, M.H.B. and Mingelgrin, U., Eds), Royal Society of Chemistry, UK.
- Shakir, H. S. y Weaver, R. W. 2002. Earthworm survival in oil contaminated soil. *Plant and Soil*. 240: 127-132.
- Shin, K-H. y Kim, K-W. 2001. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil using earthworm (*Eisenia foetida*). *Environmental Monitoring and Assessment*. 70: 93-103.
- Sijm, D., R. Kraaij y A. Belfroid. 2000. Bioavailability in soil or sediment: exposure of different organisms and approaches to study it. *Environm. Poll*. 108: 113-119.
- Smith, M. J., Lethbridge, G. y Burns, R. G. 1997. Bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. *FEMS Microbiology Letters*. 152: 141-147.
- Sousa, S., Duffy, C., Weitz, H y Glober, L. A., Hender, E. B. y Kilham K. 1998. Use of a lux-modified bacterial biosensor to identify constrains to bioremediation of BTEX-contaminated sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17: 1039- 1045.
- Steimberg, S. M., Pignatello, J. J., Sawhney, B. L. 1987. Persistence of 1,2-dibromoethano in soils: entrapment in interparticle micropores. *Environmental Science and Technology*. 21: 1201-1208.
- Stokes, D. J. Paton, G. I. y Semple, K. T. 2006. Behaviour and assessment of bioavailability of organic contaminants in soil: relevance for risk assessment an remediation. *Soil Use and Management*. 21: 475-486.
- Sverdrup, E. L., Nielsen, T. y Krogh, P. H. 2002. Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. *Environmental Science and Technology*. 36: 2429-2435.
- Tang, J. and Alexander, M. 1999. Mild extractability and bioavalability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ. Toxicol Chem*. 18 (12): 2711-2714.
- Tang, J., Liste, H H. y Alexander, M. 2002. Chemical assays of availability to earthworms of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere*. 48 : 35-42.
- Van Gestel, C. A. M. y Ma, W. C. 1988. Bioaccumulation of chlorophenols in earthworm in relation to bioavailability in soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 5: 289-297.
- Wagman, N., Strandberg, B., Tysklind, M., 2001. Dietary uptake and elimination of selected polychlorinated biphenyl congeners and hexachlorobenzene in earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 1778-1784.

- 
- 
- Weber, J. W. y Huang, W. 1996. A Distributed Reactivity Model for Sorption by Soils and Sediments. 4. Intraparticle Heterogeneity and Phase-Distribution Relationships under Nonequilibrium Conditions. *Environmental Science and Technology*. 30: 881- 888.
- Weber, J. W., McGinley, M. P. y Katz, E. L. 1992. A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. 1. Conceptual basis and equilibrium assessments. *Environmental Science and Technology*. 26: 1955-1962.
- Wernersson A-S. 2003. Predicting petroleum phototoxicity. *Ecotoxicology and environmental Safety*. 54: 355-365.
- White, J., Hunter, M., Nam, K., Pignatello, J. And Alexander, M. 1999: Correlation between biological and physical availabilities of phenantrene in soils and soil humin in aging experiments. *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (8): 1720-1727.
- Wilcke, W. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil—A review. *Journal Plant Nutrition and Soil Science*. 163:229–248.
- Wise, D. L. y Trantolo, D. J.1994. Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soil. Dekker, Inc. New York, EUA. Pp 149-599.
- Xing,B y Pignatello, J.J. 1997.Dual-mode sorption of low-polarity compounds in glassy poly(vinylchloride) and soil organic matter. *Environmental Science and Technology*. 31: 792-799.
- Yu, H. 2002. Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons : photochemistry and phototoxicity. *Jurnal of Environmental Science and Health. Part C- Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*. C20 (2) : 149-183.
- Zang, Y, Y. Zhong, Y. Luo y Z. M. Kong. 2000. Genotoxicity of tow novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*. 108: 271-278.

## 9. Anexos

Anexo 1. Curvas de calibración en los cálculos de concentración de los 16 HAPs analizados.





**Anexo 2.** Analisis del material de referencia empleado como control durante el análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos en esta investigación.

Compuesto	Concentración BAM-MR5 ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )			Valor de referencia	Recuperación (%)			Promedio	Des vest	CVR (%)
	a	b	c		a	b	c			
Naftaleno	0,853	1,097	0,949	2,78	31	39	34	35	4	13
Acenaftileno	0,918	0,583	1,139	1,59	85	84	85	85	1	1
Fluoreno	1,643	1,835	1,774	2,57	64	71	69	68	4	6
Fenantreno	8,924	9,672	9,427	13,45	66	72	70	69	3	4
Antraceno	2,637	2,856	2,784	3,7	71	77	75	75	3	4
Fluoranteno	10,406	10,496	10,439	15,94	65	66	65	66	0	0
Pireno	11,665	12,741	12,392	12,76	91	100	97	96	4	4
Benzo(a)antr	6,129	5,370	6,562	7,25	85	74	91	83	8	10
Criseno	6,611	5,838	7,045	6,76	98	86	104	96	9	9
Benzo(b)fluor	6,283	5,307	6,866	7,16	88	74	96	86	11	13
Benzo(k)fluor	4,896	4,200	4,389	3,75	131	112	117	120	10	8
Benzo(a)pireno	5,952	5,193	6,387	7,89	75	66	81	74	8	10
Indeno(123cd)pireno	4,901	4,116	5,372	5,26	93	78	102	91	12	13
Dibenzo(ah)antraceno	1,136	1,217	1,393	1,67	68	73	83	75	8	11
Benzo(ghi)perileno	4,052	3,743	4,039	5,65	72	66	71	70	3	4

**Anexo 3.** Concentraciones de los 16 HAPS determinados mediante extracción soxhlet en las 5 muestras de campo colectadas en sitios con derrames recientes y antiguos. Las concentraciones se encuentran en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco.

Compuesto	DRI-1	DRI-2	DRI-3	DRI-4	DRI-5	Pomedio	Desvest	DRII-1	DRII-2	DRII-3	DRII-4	DRII-5	Pomedio	Desvest	DRIII-1	DRIII-2	DRIII-3	DRIII-4	DRIII-5	Pomedio	Desvest
Naftaleno	0,15	0,17	0,14	0,00	0,23	0,14	0,08	1,67	0,99	0,60	0,20	0,26	0,74	0,61	0,042	0,12	0,06	0,10	0,10	0,08	0,03
Acenaftileno	0,32	0,49	0,56	0,68	0,45	0,50	0,13	1,96	2,98	0,99	0,42	0,27	1,32	1,14	0,456	0,14	0,25	0,51	0,09	0,29	0,19
Acenafteno	0,72	1,02	0,64	0,75	0,85	0,80	0,15	2,76	1,93	1,42	0,69	0,55	1,47	0,91	0,446	0,54	0,14	0,20	0,40	0,34	0,17
Fluoreno	1,09	1,21	0,23	2,61	0,82	1,19	0,88	4,02	1,98	3,83	1,20	2,44	2,69	1,21	0,617	1,93	0,69	0,17	0,00	0,68	0,76
Fenantreno	2,65	1,98	0,28	3,15	1,58	1,93	1,10	15,99	7,95	6,80	4,71	9,89	9,07	4,30	0,472	2,84	1,58	0,12	0,00	1,00	1,20
Antraceno	3,05	1,32	0,27	2,34	2,03	1,80	1,06	16,35	45,91	58,40	28,91	68,92	43,70	21,35	0,491	0,53	2,59	0,91	0,00	0,90	1,00
Fluoranteno	4,19	1,95	0,96	3,12	2,40	2,52	1,22	32,98	50,78	35,38	39,58	25,68	36,88	9,27	0,487	9,82	1,64	3,40	0,61	3,19	3,89
Pireno	3,15	2,38	0,70	2,40	4,35	2,60	1,33	14,82	7,90	11,19	9,35	12,62	11,18	2,71	1,586	2,34	7,39	1,85	1,93	3,02	2,46
Benzo(a)antraceno	8,66	6,31	1,09	3,77	9,01	5,77	3,36	8,85	16,07	15,95	10,16	22,39	14,68	5,42	4,430	6,19	6,93	3,98	2,89	4,88	1,65
Criseno	12,20	5,61	3,55	9,82	13,02	8,84	4,13	24,45	10,59	12,89	14,74	19,60	16,45	5,56	2,071	4,66	12,47	1,96	3,09	4,85	4,39
Benzo(b)fluoranteno	16,06	6,42	5,57	10,28	12,32	10,13	4,32	30,18	15,98	12,89	10,78	23,76	18,72	8,08	13,781	11,47	23,10	7,57	16,56	14,49	5,83
Benzo(k)fluoranteno	9,87	7,96	6,96	3,73	3,24	6,35	2,82	24,00	15,18	16,51	14,92	11,16	16,35	4,72	6,285	27,06	7,92	5,65	5,11	10,41	9,37
Benzo(a)pireno	10,98	8,19	9,21	9,55	7,98	9,18	1,20	18,70	17,03	28,54	24,28	10,21	19,75	7,02	6,250	8,89	10,01	2,67	3,40	6,24	3,24
Indeno(1,2,3)	8,29	7,98	6,12	10,02	12,05	8,89	2,24	3,71	6,36	10,39	4,33	12,58	7,47	3,87	13,919	12,93	9,56	2,24	8,25	9,38	4,62
Dibenzo(a,h)	10,06	12,52	5,93	9,02	10,98	9,70	2,47	12,85	5,25	14,98	6,72	8,67	9,69	4,11	14,502	9,70	2,20	12,05	4,97	8,69	5,05
Benzo(ghi)perileno	11,56	10,53	11,18	12,16	18,02	12,69	3,04	13,99	10,86	12,10	8,24	10,00	11,04	2,17	8,550	8,70	13,53	3,65	3,84	7,65	4,09
<b>Total</b>	<b>103,00</b>	<b>76,04</b>	<b>53,40</b>	<b>83,40</b>	<b>99,33</b>	<b>83,03</b>	<b>19,95</b>	<b>227,26</b>	<b>148,74</b>	<b>242,87</b>	<b>179,21</b>	<b>238,99</b>	<b>221,21</b>	<b>41,49</b>	<b>72,00</b>	<b>107,86</b>	<b>100,04</b>	<b>47,04</b>	<b>51,24</b>	<b>75,64</b>	<b>27,66</b>

Compuesto	DAI-1	DAI-2	DAI-3	DAI-4	DAI-5	Pomedio	Desvest	DAII-1	DAII-2	DAII-3	DAII-4	DAII-5	Pomedio	Desvest	DAIII-1	DAIII-2	DAIII-3	DAIII-4	DAIII-5	Pomedio	Desvest
Naftaleno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,62	0,77	1,45	0,45	0,37	0,73	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acenaftileno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12	0,87	2,56	4,83	3,29	2,53	1,63	0,00	0,04	0,00	0,03	0,00	0,02	0,02
Acenafteno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	2,21	4,20	0,25	0,40	1,42	1,78	0,00	0,25	0,00	0,03	0,00	0,06	0,11
Fluoreno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	4,35	2,42	0,51	0,26	1,55	1,81	0,00	0,50	0,00	0,03	0,00	0,11	0,22
Fenantreno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,35	1,98	6,90	4,28	4,46	4,19	1,80	0,00	0,55	0,01	0,06	0,00	0,12	0,24
Antraceno	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,03	0,07	7,39	4,98	5,46	3,09	0,21	4,23	2,72	0,00	0,40	0,00	0,08	0,20	0,14	0,17
Fluoranteno	0,00	0,20	0,20	0,00	1,20	0,32	0,50	25,00	12,60	19,13	26,78	18,90	20,48	5,62	0,00	1,27	0,00	0,75	2,60	0,93	1,08
Pireno	1,60	2,40	0,80	0,00	1,40	1,24	0,90	32,97	15,93	20,38	26,25	16,33	22,37	7,23	2,02	1,00	0,88	1,09	3,45	1,69	1,08
Benzo(a)antraceno	3,09	1,80	1,80	2,00	2,24	<b>2,19</b>	0,54	3,12	3,29	8,09	6,53	3,54	<b>4,91</b>	2,26	2,04	1,60	0,80	2,70	1,80	1,79	0,69
Criseno	3,15	1,80	2,04	2,00	2,22	2,24	0,53	20,49	24,41	32,98	29,96	38,00	29,17	6,91	2,10	0,60	0,00	1,20	0,39	0,86	0,82
Benzo(b)fluoranteno	4,56	0,00	2,35	2,60	2,24	<b>2,35</b>	1,62	3,44	2,39	5,45	2,69	1,34	<b>3,06</b>	1,53	2,04	0,80	0,60	1,00	1,15	1,12	0,56
Benzo(k)fluoranteno	2,40	0,00	4,54	2,60	2,14	2,34	1,61	1,97	1,30	5,85	2,72	2,33	2,83	1,76	2,40	0,40	0,60	0,80	1,60	1,16	0,83
Benzo(a)pireno	3,40	0,00	2,04	2,42	2,42	<b>2,06</b>	1,25	1,60	1,31	6,53	3,78	1,70	<b>2,99</b>	2,21	5,20	1,90	2,60	2,65	0,30	<b>2,53</b>	1,77
Indeno(1,2,3)	3,75	0,00	2,04	0,00	2,04	1,57	1,59	2,92	3,46	5,98	3,59	3,25	<b>3,84</b>	1,22	0,80	2,20	3,20	2,40	1,40	<b>2,00</b>	0,93
Dibenzo(a,h)	4,92	0,00	2,08	0,00	1,65	1,73	2,02	3,17	2,53	2,83	4,98	2,61	<b>3,22</b>	1,01	0,20	2,85	2,80	0,80	0,74	1,48	1,25
Benzo(ghi)perileno	2,60	0,00	3,85	0,00	2,09	1,71	1,69	5,85	2,16	1,90	3,29	0,76	2,79	1,93	1,40	2,70	0,60	0,80	0,89	1,28	0,85
<b>Total</b>	<b>16,21</b>	<b>6,90</b>	<b>16,52</b>	<b>11,63</b>	<b>16,06</b>	<b>17,77</b>	<b>4,19</b>	<b>113,26</b>	<b>84,54</b>	<b>132,11</b>	<b>123,97</b>	<b>97,74</b>	<b>110,33</b>	<b>19,32</b>	<b>18,22</b>	<b>17,06</b>	<b>12,10</b>	<b>14,42</b>	<b>14,53</b>	<b>15,27</b>	<b>2,41</b>

**Anexo 4.** Concentraciones de los 16 HAPS determinados mediante extracción acuosa en fase sólida (TENAX) en las 5 muestras de campo colectadas en sitios con derrames recientes y antiguos. Las concentraciones se encuentran en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco.

Compuesto	DRI-1	DRI-2	DRI-3	DRI-4	DRI-5	Promedio Desvest	DRII-1	DRII-2	DRII-3	DRII-4	DRII-5	Promedio Desvest	DRIII-1	DRIII-2	DRIII-3	DRIII-4	DRIII-5	Promedio Desvest				
Naftaleno	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,005	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	
Acenaftileno	0,01	0,03	0,06	0,01	0,00	0,02	0,024	0,10	0,02	0,07	0,01	0,02	0,04	0,039	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,002
Acenafteno	0,01	0,07	0,02	0,01	0,00	0,02	0,028	0,09	0,03	0,08	0,05	0,01	0,05	0,033	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,003
Fluoreno	0,13	0,15	0,06	0,07	0,12	0,11	0,039	0,20	0,08	0,31	0,05	0,06	0,14	0,112	0,01	0,03	0,02	0,01	0,00	0,01	0,01	0,011
Fenantreno	0,13	0,23	0,10	0,30	0,13	0,18	0,084	0,70	0,55	0,56	0,69	0,18	0,54	0,211	0,10	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	0,039
Antraceno	0,34	0,09	0,01	0,24	0,23	0,18	0,131	1,91	1,55	1,49	3,22	1,60	1,95	0,726	0,07	0,01	0,06	0,08	0,01	0,05	0,05	0,034
Fluoranteno	0,41	0,24	0,14	0,35	0,34	0,30	0,106	0,92	0,63	1,42	3,90	1,55	1,68	1,294	0,24	0,10	0,04	0,06	0,02	0,09	0,09	0,086
Pireno	0,17	0,18	0,01	0,27	0,06	0,14	0,103	0,69	0,88	1,74	0,64	1,78	1,15	0,568	0,31	0,17	0,04	0,03	0,01	0,11	0,127	
Benzo(a)antraceno	0,30	0,31	0,05	0,35	0,31	0,26	0,121	1,58	0,98	1,30	1,39	1,26	1,30	0,218	0,06	0,16	0,09	0,11	0,05	0,09	0,09	0,044
Criseno	0,24	0,12	0,13	0,24	0,33	0,21	0,088	0,79	0,63	0,59	1,34	1,20	0,91	0,341	0,12	0,18	0,21	0,13	0,04	0,14	0,065	
Benzo(b)fluoranteno	0,63	0,12	0,13	0,21	0,25	0,27	0,210	0,88	0,15	0,78	0,68	0,96	0,69	0,320	0,12	0,29	1,34	0,06	0,10	0,38	0,543	
Benzo(k)fluoranteno	0,19	0,01	0,16	0,01	0,01	0,08	0,091	0,82	0,76	0,75	1,18	0,65	0,83	0,204	0,13	0,25	0,58	0,07	0,12	0,23	0,206	
Benzo(a)pireno	0,14	0,02	0,11	0,02	0,01	0,06	0,060	0,72	0,33	0,24	1,55	0,70	0,71	0,517	0,09	0,26	0,64	0,06	0,01	0,21	0,257	
Indeno(1,2,3)	0,11	0,01	0,03	0,03	0,32	0,10	0,129	0,05	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,016	0,24	0,13	0,34	0,06	0,24	0,20	0,108	
Dibenzo(a,h)	0,11	0,14	0,03	0,15	0,23	0,13	0,072	0,04	0,03	0,01	0,04	0,02	0,03	0,013	0,09	0,08	0,01	0,04	0,08	0,06	0,034	
Benzo(ghi)perileno	0,11	0,11	0,06	0,02	0,15	0,09	0,050	0,03	0,02	0,03	0,02	0,01	0,02	0,008	0,02	0,06	0,02	0,04	0,05	0,04	0,017	
Totales	3,04	1,84	1,11	2,28	2,49	2,15	0,725	9,52	6,65	12,21	14,77	10,02	10,63	3,045	1,62	1,82	4,41	1,34	0,82	2,00	1,397	

Compuesto	DAI-1	DAI-2	DAI-3	DAI-4	DAI-5	Promedio Desvest	DAII-1	DAII-2	DAII-3	DAII-4	DAII-5	Promedio Desvest	DAIII-1	DAIII-2	DAIII-3	DAIII-4	DAIII-5	Promedio Desvest			
Naftaleno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,12	0,02	0,01	0,01	0,03	0,050	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000
Acenaftileno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,01	0,09	0,03	0,04	0,00	0,03	0,035	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000
Acenafteno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,06	0,08	0,09	0,02	0,05	0,039	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000
Fluoreno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,01	0,04	0,03	0,07	0,04	0,04	0,022	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000
Fenantreno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,08	0,04	0,02	0,08	0,08	0,06	0,028	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000
Antraceno	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,004	0,02	0,08	0,10	0,05	0,08	0,07	0,030	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,005
Fluoranteno	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,005	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,005	0,00	0,01	0,00	0,00	0,10	0,02	0,044
Pireno	0,07	0,10	0,07	0,00	0,09	0,07	0,039	0,06	0,06	0,04	0,04	0,04	0,05	0,011	0,01	0,00	0,06	0,00	0,04	0,02	0,027
Benzo(a)antraceno	0,08	0,05	0,07	0,00	0,03	0,05	0,032	0,09	0,06	0,60	0,06	0,07	0,18	0,238	0,03	0,00	0,04	0,00	0,02	0,02	0,018
Criseno	0,05	0,06	0,09	0,00	0,00	0,04	0,039	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,006	0,03	0,00	0,00	0,00	0,06	0,02	0,027
Benzo(b)fluoranteno	0,17	0,01	0,09	0,01	0,03	0,06	0,069	0,06	0,05	0,04	0,03	0,05	0,05	0,011	0,03	0,00	0,03	0,00	0,09	0,03	0,037
Benzo(k)fluoranteno	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,005	0,01	0,04	0,01	0,08	0,07	0,04	0,033	0,01	0,00	0,06	0,00	0,05	0,02	0,029
Benzo(a)pireno	0,01	0,00	0,02	0,02	0,00	0,01	0,010	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,002	0,05	0,00	0,13	0,00	0,07	0,05	0,054
Indeno(1,2,3)	0,03	0,00	0,04	0,00	0,00	0,01	0,019	0,01	0,02	0,01	0,04	0,01	0,02	0,014	0,00	0,10	0,14	0,09	0,03	0,07	0,056
Dibenzo(a,h)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,03	0,03	0,05	0,01	0,02	0,03	0,015	0,00	0,02	0,16	0,00	0,01	0,04	0,068
Benzo(ghi)perileno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,04	0,06	0,04	0,01	0,06	0,04	0,020	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,004
Totales	0,43	0,25	0,41	0,04	0,18	0,26	0,163	0,61	0,84	1,15	0,70	0,62	0,78	0,224	0,16	0,14	0,62	0,10	0,48	0,30	0,234

**Anexo 5.** Concentraciones de los 16 HAPS determinados mediante extracción soxhlet en muestras compuestas usadas en bioensayos de toxicidad y acumulación. Las concentraciones se encuentran en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco.

Compuesto	MC1-1	MC1-2	MC1-3	MC1-4	MC1-5	Prom	DS	MC2-1	MC2-2	MC2-3	MC2-4	MC2-5	Prom	DS	MC3-1	MC3-2	MC3-3	MC3-4	MC3-5	Prom	DS
<b>Naftaleno</b>	0,22	0,19	0,36	0,27	0,22	0,25	0,07	0,09	0,11	0,09	0,09	0,09	0,10	0,01	0,16	0,17	0,12	0,16	0,14	0,15	0,02
<b>Acenaftileno</b>	0,54	0,45	0,50	0,54	0,54	0,52	0,04	0,03	0,28	0,31	0,26	0,03	0,18	0,14	0,08	0,10	0,06	0,08	0,07	0,08	0,01
<b>Acenafteno</b>	1,00	0,96	1,03	1,00	0,82	0,96	0,08	0,08	0,08	0,14	0,14	0,25	0,14	0,07	0,34	0,43	0,27	0,36	0,30	0,34	0,06
<b>Fluoreno</b>	6,35	4,42	4,65	4,42	4,42	4,86	0,84	0,08	0,14	0,08	0,22	0,08	0,12	0,06	0,88	0,90	0,69	0,92	0,77	0,83	0,10
<b>Fenantreno</b>	3,23	3,09	4,81	3,09	3,09	3,46	0,76	0,36	0,17	0,42	0,36	0,36	0,33	0,10	9,37	8,58	7,32	9,76	8,22	8,65	0,96
<b>Antraceno</b>	7,90	7,60	8,30	7,70	7,90	7,88	0,27	0,28	0,32	0,30	0,28	0,28	0,29	0,02	5,76	7,20	4,58	5,82	4,77	5,63	1,04
<b>Fluoranteno</b>	6,05	4,64	5,85	4,86	6,10	5,50	0,69	0,63	0,70	0,66	0,63	0,63	0,65	0,03	17,22	15,23	14,08	16,27	15,86	15,73	1,17
<b>Pireno</b>	7,55	6,85	7,55	8,08	7,95	7,60	0,48	1,57	1,95	1,97	1,53	1,69	1,74	0,21	15,69	12,63	12,26	16,35	13,77	14,14	1,82
<b>Benzo(a)antraceno</b>	8,70	9,94	8,64	9,27	8,70	9,05	0,56	2,29	1,92	2,22	2,42	2,51	2,27	0,23	11,19	16,58	10,86	17,49	16,83	14,59	3,28
<b>Criseno</b>	10,00	13,16	10,62	9,28	11,06	10,82	1,46	6,47	5,03	5,00	6,08	6,48	5,81	0,75	25,29	31,80	19,76	26,35	22,19	25,08	4,57
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	8,37	9,14	8,85	9,04	8,90	8,86	0,30	2,80	2,62	2,94	3,00	2,80	2,83	0,15	14,90	28,71	11,64	15,52	13,07	16,77	6,85
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	6,38	7,35	7,08	5,80	6,13	6,55	0,65	1,94	0,79	2,00	2,38	2,16	1,85	0,62	19,53	17,95	15,26	20,34	17,13	18,04	2,01
<b>Benzo(a)pireno</b>	9,88	11,69	8,42	8,88	10,46	9,86	1,30	2,71	2,67	2,73	2,69	2,80	2,72	0,05	12,16	24,37	9,50	12,66	10,66	13,87	6,00
<b>Indeno(1,2,3)</b>	6,14	6,67	6,14	6,14	6,14	6,25	0,24	3,54	4,43	3,56	3,87	3,93	3,87	0,36	8,94	10,17	6,99	9,31	7,84	8,65	1,25
<b>Dibenzo(a,h)</b>	3,90	3,06	3,54	3,47	3,42	3,48	0,30	3,00	1,78	1,63	1,66	3,11	2,24	0,75	4,84	12,15	3,78	5,04	4,24	6,01	3,47
<b>Benzo(ghi)perileno</b>	1,76	2,04	1,76	1,68	1,50	1,75	0,19	1,58	1,36	1,92	1,75	1,92	1,71	0,24	4,06	2,93	3,17	4,23	3,56	3,59	0,56
<b>Total</b>	87,98	91,25	88,11	83,52	87,35	87,64	2,76	27,44	24,36	25,99	27,36	29,00	26,83	1,74	150,41	189,89	120,32	160,66	139,43	152,14	25,86

**Anexo 6.** Concentraciones de los 16 HAPS determinados mediante extracción acuosa en fase sólida (TENAX) en las 5 muestras de campo colectadas en sitios con derrames recientes y antiguos. Las concentraciones se encuentran en  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco.

Compuesto	MC1-1	MC1-2	MC1-3	MC1-4	MC1-5	Prom	DS	MC2-1	MC2-2	MC2-3	MC2-4	MC2-5	Prom	DS	MC3-1	MC3-2	MC3-3	MC3-4	MC3-5	Prom	DS	
<b>Naftaleno</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Acenaftileno</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,03	0,02	0,00	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
<b>Acenafteno</b>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
<b>Fluoreno</b>	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,00	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,07	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,01
<b>Fenantreno</b>	0,16	0,18	0,15	0,18	0,18	0,17	0,01	0,04	0,02	0,05	0,04	0,04	0,04	0,01	0,04	0,03	0,05	0,03	0,03	0,03	0,04	0,01
<b>Antraceno</b>	0,10	0,11	0,12	0,10	0,11	0,11	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,00
<b>Fluoranteno</b>	0,30	0,32	0,34	0,30	0,37	0,33	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03	0,04	0,00	0,11	0,07	0,08	0,11	0,11	0,10	0,10	0,02
<b>Pireno</b>	0,29	0,29	0,31	0,27	0,37	0,31	0,04	0,05	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,01	0,10	0,09	0,11	0,10	0,10	0,10	0,10	0,01
<b>Benzo(a)antraceno</b>	0,91	1,03	0,89	1,04	0,91	0,96	0,07	0,12	0,10	0,12	0,13	0,14	0,12	0,01	0,14	0,16	0,15	0,14	0,14	0,14	0,14	0,01
<b>Criseno</b>	0,49	0,49	0,50	0,49	0,50	0,50	0,01	0,08	0,05	0,05	0,05	0,08	0,06	0,02	0,16	0,21	0,17	0,17	0,17	0,17	0,18	0,02
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	0,26	0,28	0,26	0,27	0,28	0,27	0,01	0,17	0,16	0,18	0,18	0,17	0,17	0,01	0,10	0,10	0,10	0,09	0,10	0,10	0,10	0,00
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	0,37	0,27	0,32	0,34	0,36	0,33	0,04	0,10	0,04	0,11	0,13	0,12	0,10	0,03	0,17	0,19	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,01
<b>Benzo(a)pireno</b>	0,24	0,23	0,25	0,21	0,23	0,23	0,02	0,05	0,04	0,10	0,05	0,02	0,05	0,03	0,29	0,29	0,28	0,29	0,29	0,29	0,29	0,01
<b>Indeno(1,2,3)</b>	0,15	0,15	0,14	0,16	0,16	0,15	0,01	0,03	0,06	0,03	0,04	0,04	0,04	0,01	0,07	0,08	0,07	0,06	0,07	0,07	0,01	
<b>Dibenzo(a,h)</b>	0,09	0,11	0,12	0,08	0,09	0,10	0,01	0,01	0,01	0,06	0,06	0,03	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Benzo(ghi)perileno</b>	0,10	0,06	0,06	0,07	0,06	0,07	0,02	0,06	0,05	0,07	0,06	0,07	0,06	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Total</b>	3,50	3,56	3,49	3,55	3,66	3,55	0,07	0,77	0,70	0,92	0,89	0,84	0,82	0,09	1,31	1,33	1,28	1,26	1,28	1,29	0,03	

**Anexo 7.** Concentraciones de HAPs determinados en tejidos de lombriz *E. fetida* después de haber sido expuesta a diferentes muestras de suelo compuestas, contaminadas.

Compuesto	MC1-1	MC1-2	MC1-3	MC1-4	Prom	DS	MC2-1	MC2-2	MC2-3	MC2-4	MC2-5	Prom	DS	MC3-1	MC3-2	MC3-3	MC3-4	Prom	DS	
Naftaleno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acenaftileno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,02	0,00	0,01	
Acenafteno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,00	0,00	0,00	
Fluoreno	0,16	0,26	0,21	0,19	0,21	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,00	0,00	0,00	
Fenantreno	0,15	0,14	0,13	0,17	0,15	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,00	0,00	0,00	
Antraceno	0,58	0,47	0,44	0,31	0,45	0,11	0,03	0,03	0,13	0,01	0,04	0,05	0,05	0,03	0,025	0,02	0,03	0,03	0,01	
Fluoranteno	0,16	0,09	0,10	0,10	0,11	0,03	0,08	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06	0,01	0,19	0,189	0,17	0,17	0,18	0,01	
Pireno	0,06	0,06	0,05	0,06	0,06	0,01	0,04	0,05	0,07	0,04	0,05	0,05	0,01	0,14	0,136	0,11	0,15	0,13	0,01	
Benzo(a)antraceno	0,30	0,33	0,53	0,35	0,38	0,10	0,16	0,15	0,12	0,16	0,14	0,15	0,02	0,28	0,222	0,28	0,26	0,26	0,03	
Criseno	0,29	0,48	0,46	0,41	0,41	0,09	0,13	0,09	0,14	0,14	0,17	0,13	0,03	0,25	0,273	0,27	0,11	0,23	0,08	
Benzo(b)fluo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,00	0,00	0,00	
Benzo(k)fluo	0,98	0,97	0,95	0,97	0,97	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,32	0,314	0,20	0,396	0,31	0,08	
Benzo(a)pireno	0,46	0,49	0,53	0,47	0,49	0,03	0,46	0,42	0,40	0,46	0,44	0,44	0,03	0,29	0,267	0,26	0,25	0,27	0,01	
Indeno(1,2,3)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,367	0,39	0,36	0,37	0,01	
Dibenzo(a,h)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,00	0,00	0,00	
Benzo(ghi)perileno	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,00	0,00	0,00	
<b>TOTAL</b>	<b>3,14</b>	<b>3,30</b>	<b>3,42</b>	<b>3,05</b>	<b>3,23</b>	<b>0,16</b>	<b>0,91</b>	<b>0,81</b>	<b>0,92</b>	<b>0,89</b>	<b>0,90</b>	<b>0,88</b>	<b>0,05</b>	<b>1,85</b>	<b>1,80</b>	<b>1,71</b>	<b>1,75</b>	<b>1,78</b>	<b>0,06</b>	