



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

07
27

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL SUBSUELO
SUBYACENTE A CANALES DE AGUAS RESIDUALES EN LA
ZONA DE CHALCO, ESTADO DE MÉXICO"**

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGO

Presenta

NORMA PÉREZ HERNÁNDEZ



México D.F. 1999

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

11

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
"Caracterización microbiológica del subsuelo subyacente a canales
de aguas residuales en la zona de Chalco, Estado de México"

realizado por Pérez Hernández Norma
con número de cuenta 8926416-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Dra. Susana Sayal Robónquez
Propietario
Propietario M. en C. Sergio Palacios Mayoresa
Propietario Dra. Alicia Brecha Franco
Suplente M. en I.B.P. Rosalinda Tania López
Suplente M. en I.B.P. Raúl Cano Colín

Susana Sayal Robónquez
[Firma]

Brecha
[Firma]
[Firma]

Edna M. Suárez Díaz
Consejo Departamental de Biología

Dra. Edna M. Suárez Díaz
Coordinadora de Licenciatura, Departamento de Biología

DEDICATORIAS

A Dios

Porque nunca me ha dejado caer

A mi mamá y papá

A ustedes les dedico mi vida, mi ser, mis victorias.

A mi hermano

Por su inmenso amor.

A Alfonso

Por su infinito amor, ternura y apoyo que me ha dado. Porque su presencia en mi vida me ha llenado de muchas ilusiones y me hace muy feliz saber que existe en mi vida.

A mis abuelos

Por habernos heredado su gran corazón y fortaleza.

A mi familia

Por todo el amor, apoyo y momentos maravillosos que han regalado a mi vida. Gracias a mi madrina Margarita, a mis tíos Carmen, Rosa, Germán, Héctor, Raquel, Alejandro, Gandhi, Delia, Enrique, Eva y Vera. A mis primas a las que he visto como mis hermanas, Diana, Sonia, Liz y Fabi. A todos los demás primos a los que quiero mucho y son parte de mi gran familia.

A mis amigos José y Lili Valverde

Gracias por todos los momentos tan grandiosos que hemos compartido juntos y por su amistad

A Lucy, Ady y Héctor, quienes han sido grandes amigos.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Ingeniería de la UNAM, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Al Dr. Jorge Romero del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM, por el apoyo Académico y técnico brindado al presente trabajo.

A la Dra. Susana Saval Bohórquez por la dirección del presente trabajo y su amistad.

A todos mis compañeros del Intituto por su apoyo y amistad.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

I. OBJETIVOS.....	1
-------------------	---

II. MARCO TEÓRICO

1. Definición de suelo y subsuelo.....	2
2. Funciones del suelo y subsuelo.....	3
3. El suelo como hábitat de la vida microbiana.....	5
4. Biodegradación de compuestos orgánicos contaminantes.....	19

III. ANTECEDENTES

1. Fuentes de contaminación del suelo y subsuelo.....	31
2. Sistema de drenaje en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM)....	35
3. Descarga de aguas residuales en canales a cielo abierto.....	36
4. Estudios previos en sitios de canal en la ZMCM.....	38
5. Estudios de caracterización microbiológica en el subsuelo.....	38

IV. ÁREA DE ESTUDIO

1. Localización geográfica.....	40
2. Fisiografía.....	40
3. Geología.....	42
4. Clima.....	43
5. Hidrología.....	44
6. Vegetación.....	45
7. Población.....	45
8. Actividades productivas.....	47

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1. Sitio de muestreo.....	48
2. Obtención de las muestras.....	50
3. Caracterización fisicoquímica.....	52
4. Caracterización microbiológica.....	53
5. Enriquecimiento de cultivos degradadores de tolueno.....	54
6. Cinéticas de la degradación de tolueno en el microcosmos.....	54
7. Identificación de cepas degradadoras de tolueno.....	56

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización fisicoquímica del material geológico.....	58
A. Contenido de sólidos.....	58
B. Humedad.....	59
C. pH.....	60
D. Materia orgánica.....	62
E. Nitrógeno amoniacal.....	63
F. Textura.....	63
2. Caracterización microbiológica.....	65
3. Enriquecimiento de cultivos degradadores de tolueno.....	75
4. Pruebas de biodegradación de tolueno en el microcosmos.....	76
5. Identificación de bacterias degradadoras de tolueno.....	85

CONCLUSIONES.....	86
-------------------	----

Recomendaciones para trabajos futuros.....	87
--	----

BIBLIOGRAFÍA.....	88
-------------------	----

APÉNDICES

1. Datos obtenidos para la determinación de textura.....	96
2. Cuantificación de bacterias en las secciones de suelos.....	97
3. Cinéticas de la degradación de tolueno.....	101
4. Identificación de bacterias degradadoras de tolueno.....	105

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

III. MARCO TEÓRICO

Figuras

- 3.1. Nutrientes requeridos por los microorganismos del suelo.
- 3.2. Ciclo del nitrógeno.
- 3.3. Ciclo del fósforo.
- 3.4. Ciclo del azufre.
- 3.5. Ciclo del carbono.
- 3.6. Ruta bioquímica de degradación del tolueno a catecol.
- 3.7. Rutas metabólicas de degradación del catecol.
- 3.8. Rutas metabólicas para obtención de energía.

IV. ÁREA DE ESTUDIO

Figuras

- 4.1. Ubicación geográfica de la Subcuenca de Chalco.
- 4.2. Corte geológico esquemático N-S de la Subcuenca de Chalco.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Figuras

- 5.1. Ubicación del sitio de muestreo.
- 5.2. Perfil del canal y ubicación del núcleo.
- 5.3. Procedimiento para la aclimatación y enriquecimiento de bacterias degradadoras de tolueno.

Tablas

- Tabla V.1. Identificación de las secciones de suelo estudiadas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figuras

6. 1. Perfil de pH y materia orgánica.
- 6.2. Gráfica de textura del suelo M.
- 6.3. Gráfica de textura del suelo N.
- 6.4. Distribución de bacterias heterótrofas a distintas profundidades.
- 6.5. Distribución de bacterias anaerobias hidrogenófilas y acetoclásticas.
- 6.6. Distribución de bacterias sulfatorreductoras y fermentativas.
- 6.7. Distribución de bacterias anaerobias utilizadoras de ácido propiónico y ácido butírico.
- 6.8. Enriquecimiento de cultivos degradadores de tolueno.
- 6.9. Curva de la cinética de degradación de tolueno en la muestra A.
- 6.10. Curva de la cinética de degradación de tolueno en la muestra I
- 6.11. Curva de la cinética de degradación de tolueno en la muestra K.
- 6.12. Curva de la cinética de degradación de tolueno en la muestra L.
- 6.13. Curva de crecimiento bacteriano en la muestra A.
- 6.14. Curva de crecimiento bacteriano en la muestra K.
- 6.15. Curva de crecimiento bacteriano en la muestra L.
- 6.16. Curva de pH para la muestra A.
- 6.17. Curva de pH para la muestra K.
- 6.18. Curva de pH para la muestra L.

Tablas

- Tabla VI.1. Resultados de sólidos volátiles, totales y fijos.
- Tabla VI.2. Resultados de la caracterización fisicoquímica.
- Tabla VI.3. Contenido de nitrógeno amoniacal.
- Tabla VI.4. Características de las cepas degradadoras de tolueno obtenidas por enriquecimiento.

RESUMEN

En la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) la descarga de aguas residuales a canales a cielo abierto es una práctica común desde hace muchos años hasta la actualidad. Estos canales no cuentan con una barrera física que impida la infiltración de contaminantes al subsuelo que, en la mayoría de los casos, son tóxicos y se encuentran por arriba de los límites permisibles. Con la finalidad de evaluar el papel que juegan los microorganismos del subsuelo en estos canales, se estudió un sitio en la zona de Chalco, donde se detectaron varios compuestos orgánicos en las aguas superficiales, entre ellos el tolueno en concentraciones de 1000 ppm. En estudios previos realizados en la misma zona se detectó la presencia de percloroetileno y tricloroetileno en agua intersticial y dado que estos compuestos son más volátiles que el tolueno; se asumió que el tolueno podría también estar presente. Para realizar el presente estudio se obtuvo un núcleo de material geológico, el cual fue seccionado para los diferentes análisis. La heterogeneidad del material fue variable encontrándose arcillas y arenas finas, cuyo contenido de materia orgánica varió de 1.15 a 25% y el pH de 3.9 a 8.7. El conteo total de bacterias por epifluorescencia resultó entre un intervalo de 2.58×10^5 a 2.25×10^6 bact/g de suelo seco mientras que el conteo en placa de bacterias heterótrofas, en medio con extracto de suelo varió entre 2.75×10^3 y 1.77×10^6 ufc/g suelo seco, y en medio PYG fue de 3.0×10^4 a 2.53×10^5 ufc/g suelo seco. Las bacterias anaerobias estuvieron en baja proporción encontrándose en mayor población el grupo de las fermentativas y metanógenas a partir de H_2 y CO_2 . Se intentó relizar un conteo de bacterias degradadoras de tolueno, pero estuvieron en proporción muy reducida, por lo que se decidió enriquecer la población degradadora realizando varias transferencias en medio líquido. Después de 4 meses, el conteo de bacterias degradadoras de tolueno obtenido en los cultivos aumentó a concentraciones de 1.3×10^3 a 7.6×10^6 ufc/ml en las diferentes secciones. Con los cuatro cultivos mejor desarrollados se realizaron cinéticas de degradación de tolueno en medio líquido. El cultivo más activo, proveniente de una profundidad de 4.35 m, degradó 1750 mg de tolueno en 10 días. Las bacterias, que mostraron tendencia a agruparse en forma de consorcios, se identificaron como *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens/putida* y *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN

Las actividades industriales en México comenzaron a desarrollarse durante el presente siglo sin una cultura de protección al ambiente. Como resultado aire, agua y suelo se han contaminado indiscriminadamente con desechos que en su mayoría son tóxicos. En México se le ha dado más importancia a la contaminación del aire y del agua. Sin embargo, suelo y subsuelo también han sufrido gran afectación, principalmente por la disposición de desechos sólidos municipales e industriales, derrames de hidrocarburos y compuestos químicos, así como el uso excesivo de insecticidas, herbicidas y otros agroquímicos.

Los microorganismos son los seres vivos más abundantes en la Tierra, estos se pueden encontrar prácticamente en cualquier parte, no obstante, el suelo y el agua son los hábitats preferidos, en los que encuentran las condiciones más propicias para su sobrevivencia. Cuando los microorganismos han permanecido en medios contaminados por largos periodos, éstos no sólo toleran y sobreviven a la presencia de los contaminantes, sino que son capaces de utilizar a los de tipo orgánico, como fuente de carbono y energía para satisfacer sus necesidades metabólicas, dando como resultado un proceso de selección natural.

Durante la última década se ha hecho especial énfasis en el papel que desempeñan los microorganismos nativos durante la descontaminación de suelos. Tales microorganismos que, por lo general constituyen comunidades bien organizadas, que forman parte de los ciclos biogeoquímicos y cuya capacidad para degradar los contaminantes orgánicos ha promovido el desarrollo de técnicas de saneamiento de suelos y acuíferos que en el terreno práctico se conocen como Biorremediación.

Uno de los aspectos indispensables para evaluar la posibilidad de aplicar técnicas de biorremediación en suelos contaminados es la caracterización microbiológica. Con ello es posible determinar el tipo de microorganismos presentes, su capacidad para tolerar diferentes

concentraciones de los contaminantes tóxicos y las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la biodegradación, tanto en el suelo como en el subsuelo.

El presente trabajo representa una experiencia de investigación de un caso real, en el que se realizó la caracterización de muestras de subsuelo de un sitio de canal donde se vierten aguas residuales industriales. Los objetivos que se establecieron se presentan a continuación.

I. OBJETIVOS

- Realizar una caracterización fisicoquímica y microbiológica del subsuelo subyacente a un canal de aguas residuales en la zona de Chalco, Estado de México.
- Conocer el potencial de las bacterias autóctonas para la degradación de compuestos orgánicos contaminantes, utilizando al tolueno como substrato modelo.
- Conocer el potencial de atenuación natural.

II. MARCO TEÓRICO

1. Definición de suelo y subsuelo

Para poder estudiar el suelo, así como su uso y conservación, se debe tener una definición clara de lo que es el suelo. Existen varias definiciones de suelo, por ejemplo para Alexander (1994 a) el suelo es el material exterior poco compacto de la superficie terrestre, es un estado característicamente diferente al lecho rocoso subyacente. Es la región en la que se sustenta la vida vegetal y de la cual las plantas obtienen soporte mecánico y sus nutrimentos. Para Aguilera (1989) el suelo es un medio en el cual se desarrollan las plantas y muchas formas de vida animal. Saval (1995), sin embargo considera que el suelo puede ser definido desde diferentes enfoques según el marco de referencia. La definición científico-tecnológica dice que el suelo es el material no consolidado sobre la superficie de la tierra, que ha sido formado mediante una dinámica natural a partir de la corteza terrestre con la influencia de factores genéticos y ambientales, a través de miles de años. La definición que puede englobar todos estos aspectos puede ser la siguiente: "El suelo es el producto de la alteración, de la remoción y de la organización de las capas superiores de la corteza terrestre bajo la acción de la vida, la atmósfera y de los cambios de temperatura que se manifiestan". Pero, ante todo, el suelo es un recurso natural lo que implica que es un medio complejo y dinámico en constante evolución, que esta bajo la influencia de su medio externo e interno, ambos constituidos por la hidrosfera,

atmósfera y biósfera. Las propiedades del suelo provienen de la interacción combinada de los tres factores mencionados anteriormente (Aguilar, 1995). La formación del suelo comienza cuando, la roca madre se ve alterada por los factores intempericos. La materia orgánica se mezcla con los sedimentos, alterando los minerales de éstos y formando el humus fresco. Al degradarse la materia orgánica, lo que fue el humus se convierte en ácido carbónico, agua, amonio y nitratos. Finalmente, los minerales y la materia orgánica son desplazados por el agua para así diferenciar el suelo en estratos de diferentes texturas, composiciones y colores, llamados horizontes.

El subsuelo puede ser definido como, el material que se encuentra entre la superficie del suelo y la roca madre. De esta forma el subsuelo lo constituyen todos los horizontes intermedios, ya que difícilmente pueden separarse suelo y subsuelo. Para Saval (1995) el suelo es la superficie y el subsuelo es la profundidad.

2. Funciones del suelo y subsuelo

Al suelo se le atribuyen seis funciones dentro de las cuales tres son ecológicas y tres son relacionadas con las actividades del hombre (Aguilar 1995). Las funciones son las siguientes:

1) Producción de biomasa. Abastece a los seres vivos de fuentes de energía para su sobrevivencia. Las plantas, que son los productores primarios, toman sus nutrimentos del suelo. Además, la producción de alimentos depende de la disponibilidad de terrenos agrícolas.

2) Capacidad de filtración, regulación y transformación para proteger el agua subterránea de la contaminación. Esta función se explica por la capacidad del suelo como filtro regulador y capa de protección. Los poros del suelo sirven como un filtro a través del cual pasan los contaminantes y pueden adherirse e incluso degradarse en función del tipo de sus componentes químicos. Es aquí cuando la microfauna y microflora del suelo juegan un papel importante, ya que son responsables de las reacciones de biotransformación de sustancias tóxicas. Cuando la

capacidad del suelo es rebasada, las sustancias contaminantes químicas orgánicas e inorgánicas, pasan al agua subterránea.

3) Es hábitat biológico y reserva genética. En el suelo se encuentran una gran diversidad de organismos de un gran número de taxa, que al interactuar unos con otros y con el ambiente, crean su propia selección natural, de tal modo que las especies genéticamente más fuertes sobreviven y dejen progenie y, así, se lleve a cabo el mecanismo de la evolución.

4) El suelo es el sitio para el establecimiento de infraestructura de las actividades humanas, como pueden ser casas habitación, industrias, lugares recreativos y deportivos, escuelas, y oficinas, entre otros.

5) Del suelo se obtienen todas las materias primas para la existencia del ser humano, y para su desarrollo.

6) Herencia cultural, el suelo ha dado "refugio" a los tesoros paleontológicos y arqueológicos que han dado al ser humano mucho de su conocimiento. Dichos objetos han permitido al hombre conocer su propia historia, así como la historia de la vida misma.

Aparte de las seis funciones mencionadas anteriormente, no se debe olvidar que la vida misma comenzó gracias al suelo, ya que fue en los pequeños cuerpos acuáticos, formados gracias a las arcillas (Lazcano, 1989) donde se dieron las condiciones óptimas para la formación de las primeras células, las cuales posteriormente evolucionaron para formar la biodiversidad como la conocemos hoy en día.

El subsuelo le proporciona protección y alimento a los seres vivos, muchos viven en madrigueras construidas por ellos mismos, además de que algunos obtienen alimento como tubérculos y raíces. Hace unos cuantos años el subsuelo protegía el agua subterránea que abastece al hombre, según Chávez (1993), tal protección al agua aún existe; los contaminantes son atenuados por el suelo y por las rocas subyacentes en la zona de aireación, los cuales

constituyen un filtro natural efectivo. En esta barrera tienen lugar diversos procesos que evitan, reducen o retardan la contaminación de los acuíferos. Estos procesos son: retención y eliminación de microorganismos, precipitación o adsorción de metales pesados, y volatilización, biodegradación de hidrocarburos, así como de compuestos orgánicos sintéticos, conocidos como xenobióticos.

El estudio del suelo ha atraído el interés de muchos científicos, tal vez porque se han dado cuenta de que aunque teóricamente es un recurso renovable, la formación de una capa de 1 cm de espesor tarda miles de años, por lo que es muy importante comenzar a cuidar sus características naturales. Por ejemplo, en el área que cubrió el derrame de lava del Xitle en el Pedregal de San Angel, D.F., la capa de suelo más profunda posee 30 cm de profundidad con un promedio de 4.5 ± 0.27 cm, y se tiene registro de que el volcán hizo erupción hace 2000 años (Cano-Santana y Meave, 1996).

3. El suelo como habitat de la vida microbiana

El suelo es un sistema muy complejo, por la gran variabilidad de material biológico y características físicas y químicas que posee. Para comprender la heterogeneidad, la complejidad y la estabilidad de los edafosistemas, es necesario conocer la interrelación con sus componentes físicos, químicos y biológicos.

En los organismos que habitan el suelo se incluyen plantas, animales y microorganismos, estos últimos son definidos como aquellos seres vivos que no pueden ser perceptibles al ojo humano (Stainer *et al* 1970).

Los estudios sobre los organismos del suelo pueden ser a diferentes niveles, por ejemplo existen científicos que se interesan más en el ciclo de los nutrimentos en el suelo, es decir, los ciclos biogeoquímicos. Los ecólogos estudian las interacciones de los diferentes grupos funcionales del suelo. Los agromicrobiólogos, estudian las relaciones de los microorganismos

con la rizósfera y el papel de éstos en el ciclo de nutrimentos en el suelo y su relación con las plantas. Los biotecnólogos obtienen microorganismos del suelo que son productores de compuestos químicos útiles al hombre, mismos que, por ingeniería genética incrementan los niveles o la velocidad de producción. Actualmente, ha surgido el interés por obtener del suelo microorganismos degradadores ó transformadores de contaminantes orgánicos.

El suelo tiene como parte de su constitución a diversos grupos de organismos, los cuales pueden ser microscópicos o macroscópicos. Dentro del primer grupo se encuentran bacterias, algas, virus, protozoarios y hongos; en el segundo grupo artrópodos, anélidos, moluscos y nemátodos. Las bacterias son los organismos más pequeños en el suelo, siempre y cuando no se considere a los virus como seres vivos.

Los organismos del suelo tienen una capacidad enorme para degradar materiales orgánicos. Las bacterias y los hongos constituyen la flora más importante de los suelos (Foth *et al.* 1980), ya que se encargan de reciclar la materia presente y abastecer así de nutrimentos al resto de los habitantes del suelo.

Las bacterias son los organismos más abundantes del suelo y exceden generalmente en número y clase a todos los demás organismos. Sin embargo, se ha visto que en suelos ácidos el mayor contenido de biomasa está constituido por los hongos (Foth *et al.* 1980; Wood, 1989). Se dice que un gramo de suelo superficial fértil puede contener entre 10⁶ y 10⁹ bacterias (Wood, 1989). Las bacterias no se distribuyen uniformemente en el suelo, pero pueden estar frecuentemente asociadas con substratos orgánicos.

De acuerdo con la reacción Gram, la cual depende de los componentes de la pared celular, las bacterias se dividen en Gram positivos y Gram negativos. Sin embargo, las bacterias del suelo se dividen de forma general en dos grupos basándose en sus necesidades energéticas: bacterias heterótrofas, que obtienen carbono y energía de las sustancias orgánicas complejas; y bacterias autótrofas, cuya fuente de energía es la oxidación de compuestos inorgánicos, como el dióxido de carbono, nitrógeno, acetato, azufre, hidrógeno y hierro, entre otros.

La mayor parte de las bacterias del suelo requieren oxígeno del aire, por lo cual reciben el nombre de aerobias. Algunas de estas pueden vivir en lugares donde el aire no llega, por lo cual se les llama aerobias facultativas. Otras por ejemplo no pueden vivir en presencia de oxígeno y son llamadas anaerobias.

La característica más importante de las bacterias como grupo es su versatilidad bioquímica (Wood, 1989). Un organismo como *Pseudomonas* sp. es capaz de metabolizar una amplia diversidad de compuestos químicos, incluyendo plaguicidas, *Nitrobacter* sp. solamente es capaz de obtener energía de la oxidación de nitritos a nitratos. *Thiobacillus ferroxidans* obtiene energía de la oxidación de compuestos sulfurosos reducidos y de iones fierro, en un pH óptimo de 2. *Clostridium* sp. es capaz de crecer en ausencia de oxígeno y puede obtener nitrógeno por la reducción del nitrógeno atmosférico. *Rhizobium* sp. forma nódulos de fijación de nitrógeno sobre las raíces de las plantas leguminosas.

De 190 géneros de bacterias conocidas (Wood, 1989) el 57%, con sus respectivas especies, pueden ser considerados como bacterias del suelo. Se cree que las transformaciones bioquímicas mencionadas anteriormente constituyen menos del 10% de la población bacteriana total (Wood, 1989). Los bacilos formadores de esporas y los actinomicetos también son comunes. Existen bacterias en las cuales se incluyen a los actinomicetos, que producen filamentos o micelios similares a los hongos, pero estos son de menor diámetro. Los actinomicetos como *Streptomyces* sp., tienen una gran importancia comercial, ya que son productores de antibióticos y el suelo es la fuente de aislamiento.

Los suelos también pueden contener bacterias que son patógenas para el hombre, como es el caso de *Clostridium* sp., el cual se encuentra tanto en el suelo como en heces fecales de animales. Entre los organismos anaerobios, encontramos a especies como *C. tetani* y *C. perfringens*, las cuales causan tétanos y gangrena, respectivamente. La bacteria *Bacillus anthracis* es común en el suelo y es patógena para los humanos, ya que causa la enfermedad del ántrax. Este tipo de bacilo puede persistir en el suelo durante muchos años, se conoce que en

los años cuarenta esta bacteria fue erradicada de un suelo por medio de tratamiento con formaldehído (Wood, 1989).

Las clases y abundancia de las bacterias dependen de los nutrimentos asimilables presentes, así como de las condiciones ambientales del suelo (Foth *et al.* 1980).

Los hongos, que son los organismos más importantes del suelo junto con las bacterias, con una estructura filamentososa son menos versátiles que las bacterias, es decir, su capacidad de degradación de compuestos químicos orgánicos, no es tan amplia como en el caso de las bacterias. Sus limitaciones pueden deberse a que todos son aerobios y que toman como fuente de energía compuestos orgánicos molecularmente muy grandes. Sin embargo, estos son más variables en su morfología.

Es difícil determinar exactamente la cantidad de células de hongos por gramo de suelo, debido a que sus micelios se fragmentan con mucha facilidad y además existen grupos como el de los Ascomycetes y Basidiomycetes, que son muy difíciles de crecer en medios de cultivo convencionales (Wood, 1989). Aproximadamente 690 especies de hongos, de 170 géneros, han sido aisladas del suelo. Los hongos producen un número variable de estructuras especializadas, las cuales van desde rizoides como es el caso de *Rhizopus* sp., pero en su mayoría producen esporas, las cuales les permiten colonizar una gran variedad de habitats y aumentar su sobrevivencia; clamidosporas que son estructuras de resistencia; vesículas, que almacenan nutrimentos y esclerocios, los cuales son estructuras de reproducción vegetativa. Además, producen una gran variedad de cuerpos fructíferos que se forman en una gran variedad de tamaños y grado de complejidad. Muchos de estos cuerpos fructíferos crecen en la superficie del suelo como lo es el caso de Basidiomycetes y Ascomycetes. Los hongos, sin embargo, son organismos muy susceptibles a la presencia de contaminantes. Dado el enfoque del presente trabajo se resaltarán la importancia y las características de las bacterias en suelo.

Como ya se mencionó anteriormente, el grupo de organismos bioquímicamente más versátil, es el de las bacterias. Muchas de las estrategias que éstas han adoptado para obtener sus

nutrimentos tienen una influencia importante y consecuencias para el ciclo de nutrientes en suelo. La Figura 2.1 muestra los nutrientes más requeridos por las bacterias del suelo.

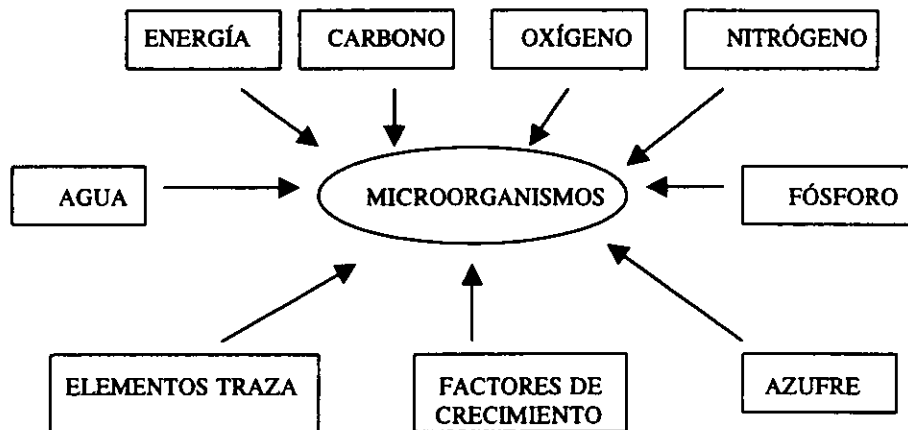


Figura. 2.1. Nutrientes requeridos por los microorganismos del suelo (Wood, 1989).

Las bacterias emplean tres vías para obtener energía, estas son: fermentación, respiración y fotosíntesis.

Fermentación (fosforilación a nivel sustrato). En esta ruta metabólica, los compuestos orgánicos sirven como donadores de electrones (agente reductor) y aceptores de electrones (agente oxidante). Se le llama también fermentación anaerobia, ya que muchos organismos obtienen energía química de combustibles orgánicos en ausencia de oxígeno molecular. Los combustibles más usados para la fermentación anaerobia son los azúcares, principalmente la D-glucosa, no obstante, algunas bacterias pueden obtener su energía a partir de la fermentación de moléculas combustibles como los ácidos grasos, los aminoácidos, las purinas o las pirimidinas, u otras según las especies. Este proceso en términos energéticos es ineficiente, ya que sólo se producen 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa (Leningher, 1983). Esta ruta metabólica la realizan bacterias heterótrofas anaerobias.

Respiración (fosforilación oxidativa). Es la vía más compleja y eficiente de generación de ATP, en la cual los compuestos orgánicos o inorgánicos sirven como donadores de electrones (compuestos oxidados) y los compuestos inorgánicos sirven como el aceptor final de electrones (compuestos reducidos). Los organismos aerobios obtienen la mayor parte de su energía de la respiración, que se define como la oxidación de los combustibles orgánicos por el oxígeno molecular, el cual actúa como el aceptor final de electrones en la respiración. Sin embargo, se sabe que muchos de los organismos son capaces de catalizar la oxidación de NH_4^+ o NO_2^- lo que constituye la base de la nitrificación (Alexander, 1994 a).

En condiciones anaerobias, sustancias como el NO_3^- , SO_4^{2-} y CO_2 , pueden reemplazar al oxígeno, y entonces se le llama respiración anaerobia, la cual constituye la base bioquímica de importantes procesos que ocurren en el suelo como la desnitrificación, la sulfatorreducción y la metanogénesis, respectivamente (Wood, 1989).

El rendimiento de la respiración aerobia es de 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. Esta ruta la realizan bacterias heterótrofas y quimioautótrofas. La mayoría de las bacterias son heterótrofas, lo cual es de gran importancia para la biorremediación de suelos, por su capacidad para utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos. Las quimioautótrofas utilizan energía obtenida de la transformación de materiales inorgánicos y su fuente de carbono es el CO_2 . Algunas especies están limitadas a oxidaciones inorgánicas y son consideradas como quimioautótrofas obligadas o estrictas, mientras que los facultativos pueden obtener energía de la oxidación tanto de materiales inorgánicos como de carbono orgánico.

Las bacterias quimioautótrofas pueden dividirse de la siguiente forma de acuerdo al elemento cuya oxidación las provee de energía:

I. Compuestos de nitrógeno oxidado

A. Amonio oxidado a nitrito: *Nitrosomonas*

B. Nitrito oxidado a nitrato: *Nitrobacter*

II. Compuestos inorgánicos de azufre convertido a sulfato: *Thiobacillus thiooxidans*.

III. Hierro ferroso convertido al estado férrico: *Thiobacillus ferrooxidans*

IV. Hidrógeno oxidado: varios géneros

La mayoría de los quimioautótrofos son aerobios estrictos, mientras que los que proliferan en ausencia de O_2 requieren de la presencia de una sustancia rica en oxígeno, nitratos o sulfatos como donadores de electrones y CO_2 para los oxidantes de hidrógeno productores de metano.

Fotosíntesis (fotofosforilación). Los microorganismos que obtienen energía por este medio reciben el nombre de fotoautótrofos, esto para distinguirlos de los que la obtienen de fuentes químicas, es decir, por respiración y fermentación, los cuales reciben el nombre de quimioautótrofos. En el primer caso la energía luminosa, la cual es su fuente de energía, es absorbida por un pigmento fotosintético, el más común es la clorofila, y el transportador de electrones es el agua. Esta ruta metabólica es usada por algunos géneros de bacterias. Nutricionalmente, estos son los organismos más primitivos, ya que tienen todos los atributos de la vida y sin embargo, satisfacen todas sus necesidades de un ambiente completamente inorgánico.

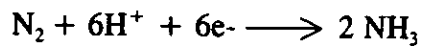
Los fotoautótrofos obtienen energía de la luz y su fuente de carbono es el dióxido de carbono; y los fotoheterótrofos, por ejemplo las bacterias verdes como *Chlorobium* sp., usan luz y carbono orgánico. Los quimioautótrofos (llamados también quimiolitótrofos) obtienen energía a partir de reacciones químicas y el carbono a partir del dióxido de carbono, un ejemplo de esto es la bacteria *Nitrosomonas europaea*, la cual obtiene su energía de la oxidación de NH_4^+ a NO_2^- , y *Nitrobacter* sp. de la oxidación de NO_2^- a NO_3^- ; dichas reacciones constituyen la nitrificación, el cual es un proceso sumamente importante en el ciclo del nitrógeno en suelos.

Los ciclos biogeoquímicos son fundamentales en el suelo, ya que gracias a estos se dan todos los procesos de obtención de energía y nutrimentos para los seres vivos. Se mencionará brevemente tales ciclos, como el ciclo del nitrógeno, del fósforo, del azufre y del carbono.

Ciclo del nitrógeno. El ciclo del nitrógeno es un proceso muy importante llevado a cabo por las bacterias del suelo, ya que por medio de éste las bacterias ayudan a biodegradar compuestos nitrogenados y, a su vez, generan otros que pueden ser asimilados por las plantas.

El ciclo del nitrógeno se puede dividir en tres procesos generales: la fijación de nitrógeno atmosférico, nitrificación y desnitrificación.

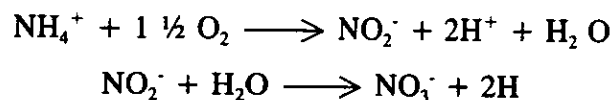
Fijación de nitrógeno. Este proceso es usado por algunas bacterias para obtener nitrógeno asimilable, y puede ser representado por la siguiente ecuación :



El nitrógeno atmosférico, representa el 79% de la composición total de la atmósfera, pero solo algunos organismos procariontes tienen la capacidad de fijar el N_2 atmosférico y reducirlo a NH_3 . Las bacterias fijadoras de nitrógeno crecen en ambientes aerobios y, para proteger a la nitrogenasa, enzima que le permite fijar el nitrógeno, del oxígeno, poseen mecanismos que les permiten mantener bajas concentraciones de oxígeno intracelular.

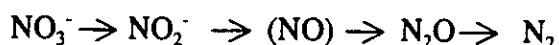
Nitrificación. La mineralización del nitrógeno orgánico ocurre cuando se forma el amonio, a partir de compuestos orgánicos de nitrógeno. El NH_3 es el estado más reducido del nitrógeno inorgánico, el cual sirve como punto de partida en el proceso conocido como nitrificación, es decir, la formación biológica de nitrito y nitrato a partir de compuestos que contienen nitrógeno reducido. La importancia de los organismos nitrificantes se basa en su gran capacidad para formar nitrato, que es la forma de nitrógeno asimilable para las plantas superiores.

La nitrificación involucra dos reacciones, las cuales son utilizadas por muy pocos géneros de bacterias quimioautótrofas. Las ecuaciones para representar esta etapa son las siguientes (Alexander, 1994 a):



Existen evidencias de que algunos organismos heterótrofos, como los hongos también oxidan amonio y compuestos de nitrógeno orgánico para producir NO_2 y NO_3 , pero las bases bioquímicas de este mecanismo aún no se conocen bien.

Desnitrificación. Este proceso engloba una serie de reacciones, que van a ser utilizadas por un amplio número de bacterias anaerobias facultativas en ausencia de oxígeno. Estas bacterias utilizan formas oxidadas de nitrógeno como una alternativa de aceptores de electrones. Es decir reducen óxidos de nitrógeno a nitrógeno gaseoso. La ecuación se puede representar de la siguiente forma:



La enzima responsable de llevar a cabo estas reacciones es la nitrato reductasa, la cual puede ser inhibida en concentraciones altas de oxígeno. En suelos con pH ácido, la nitrificación puede detenerse a nivel formación de óxido nitroso. El ciclo del nitrógeno se puede observar en la Figura 2.2.

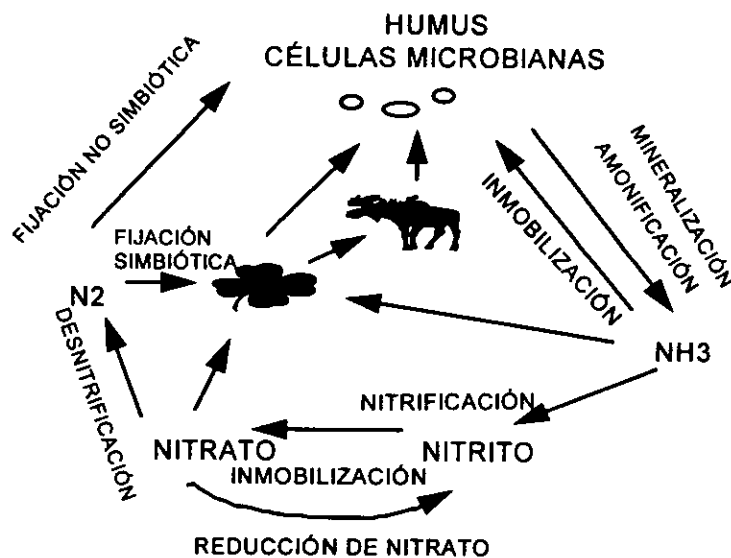


Figura 2.2. El ciclo del nitrógeno (Alexander, 1994).

Ciclo del Fósforo. Este elemento es el segundo de los nutrimentos requeridos por las plantas y los microorganismos. La existencia del ión fosfato en el suelo resulta de la disolución de los fosfatos nativos, de los fertilizantes aplicados y de la mineralización microbiana de los residuos animales y vegetales que se incorporan al mismo (Figura 2.3.).

A diferencia del nitrógeno, no existen compuestos inorgánicos de fósforo volátiles o que puedan lixiviarse. Esta estabilidad resulta de su baja solubilidad. La retención de este elemento, tanto por precipitación con Fe^{++} , Ca^{++} y Al^{+++} como por la adsorción en las arcillas, muy alta en algunos suelos, es causa de una reducción muy significativa de la cantidad de fósforo disponible para las plantas.

La mineralización del fósforo se lleva a cabo a partir de compuestos orgánicos polimerizados (proteínas, ácidos nucleicos) teniendo como resultado la liberación de ácido fosfórico. En este proceso intervienen varias bacterias, además de levaduras y hongos (Palacios y Gama, 1994).

La inmovilización de este elemento es equivalente a la absorción de los fosfatos solubles, tanto por las plantas como por los microorganismos, para cumplir su función en la síntesis celular.

Algunos microorganismos de la rizosfera tienen la capacidad de solubilizar los fosfatos de calcio nativos en cantidades superiores a sus propias demandas nutricionales. Entre las especies de bacterias solubilizadoras se encuentran *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Bacillus* y *Flavobacterium* (Palacios y Gama, 1994).

Ciclo del azufre. El azufre es otro de los nutrimentos esenciales para los seres vivos. Ocasionalmente, este elemento puede encontrarse en el suelo en cantidades insuficientes o en formas no aprovechables, por lo que muchas veces se aplica a los suelos de cultivo fertilizantes con azufre.

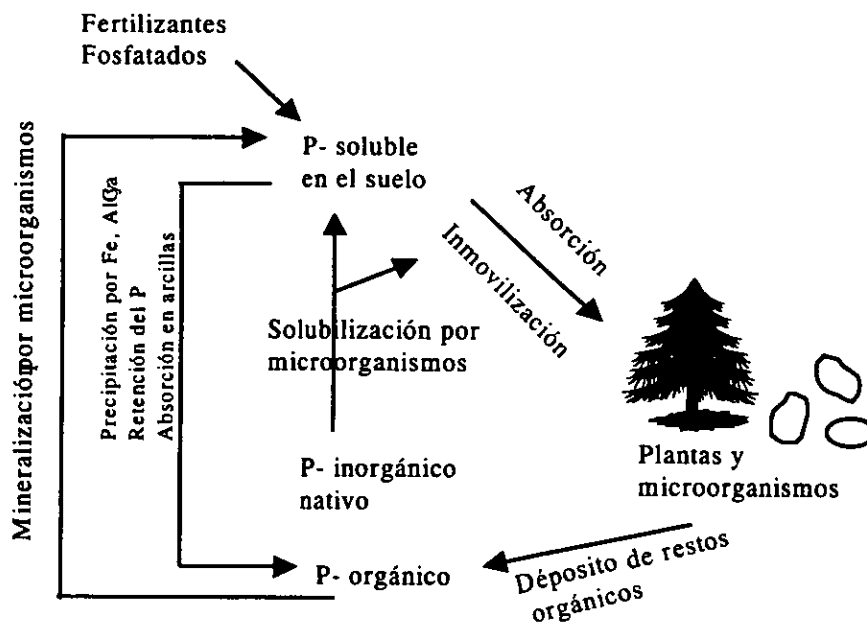


Figura 2.3. Ciclo del fósforo (Palacios y Gama, 1994).

El azufre, tanto en su forma orgánica como inorgánica, es metabolizable por la microflora del suelo. Durante su ciclo se distinguen los siguientes procesos: mineralización, descomposición o transformación de compuestos orgánicos de azufre a compuestos inorgánicos, asimilación o inmovilización de compuestos simples de azufre por la micro y macroflora, oxidación de compuestos y iones inorgánicos (sulfuros, tiosulfatos y azufre elemental), y reducción de sulfatos y otros iones a sulfuros.

Durante la asimilación, el azufre es tomado por la raíz de las plantas como ion sulfato, aunque, eventualmente, pueden asimilarlo directamente de algunos aminoácidos azufrados sin previa degradación. Una vez en los tejidos, los sulfatos se reducen a la forma de sulfhidrilos (-SH), éstos son indispensables para la síntesis de los aminoácidos azufrados (Figura 2.4.).

Las bacterias son el grupo más importante que participa en la mineralización del azufre. Entre las más importantes están: *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis* y *Escherichia coli*.

Los procesos microbianos de oxidación y reducción de azufre son eslabones fundamentales en el reciclaje de este nutriente. El dominio de uno u otro proceso dependerá de las condiciones del medio que afecten a la microflora.

La oxidación de azufre por bacterias del género *Thiobacillus thiooxidans* y *T. denitrificans* provoca la solubilización de minerales del suelo. El ácido sulfúrico, formado durante este proceso causa movilización de nutrientes en el suelo.

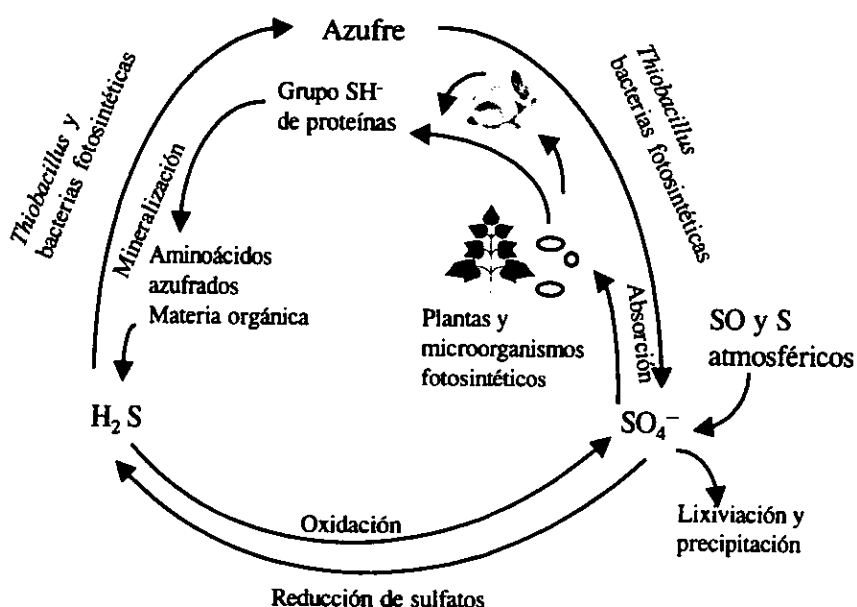


Figura 2.4. Ciclo del azufre (Palacios y Gama, 1994).

Ciclo del carbono. El ciclo del carbono da las bases sobre como los microorganismos heterótrofos se van a encargar de destruir los contaminantes orgánicos y los aprovechan como su fuente de carbono y energía (Figura 2.5).

El carbono constituye la estructura básica de los sistemas biológicos. A las temperaturas de la Tierra, el carbono es el elemento con mayor variedad de compuestos. Es probable que existan, aproximadamente, medio millón de compuestos de carbono conocidos. Sin embargo, de los 3 x

10^7 g de carbono/cm² de la corteza terrestre, solamente una porción relativamente pequeña se encuentra disponible para los sistemas biológicos (Palacios y Gama, 1994).

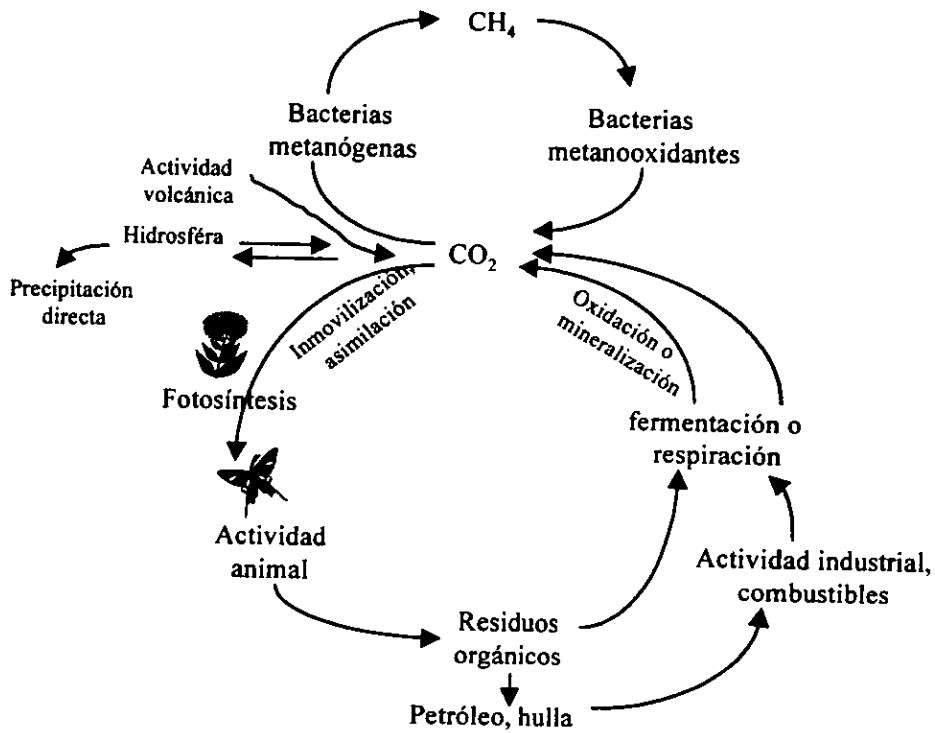


Figura 2.5. Ciclo del carbono (Palacios y Gama, 1994).

En los tejidos vegetales y las células microbianas el carbono, como elemento constitutivo, representa del 40 al 50% de su peso total.

Los organismos fotosintéticos utilizan el CO₂, como única fuente de carbono, para la síntesis de la materia carbonácea o materia orgánica preformada, con lo que se abastece al mundo animal y a los microorganismos organotróficos; proceso que corresponde a la asimilación o inmovilización del carbono. Estos mismos organismos, al utilizar los compuestos orgánicos para la respiración o como sustrato para la fermentación, devuelven el carbono a la atmósfera como CO₂ (fase de oxidación o mineralización). En la ausencia de oxígeno, las bacterias quimiolitotróficas metanogénicas y metanooxidantes, al generar y oxidar el metano,

respectivamente, participan en las fases de inmovilización y mineralización. Por tanto, en la secuencia cíclica del carbono es fundamental en el metabolismo microbiano.

En el suelo los restos orgánicos de plantas y animales son transformados por la microflora organotrófica, bajo determinadas condiciones ambientales, en compuestos orgánicos heterogéneos, muy estables, conocidos como humus o fracción orgánica del suelo. Cuando la oxidación de esta fracción orgánica supera a la síntesis de la misma, ocurre la degradación biológica del suelo y, consecuentemente la pérdida de su capacidad productiva.

4 Biodegradación de compuestos orgánicos contaminantes

Para su crecimiento, los organismos toman de su ambiente todas las sustancias que requieren para la síntesis de sus materiales celulares, así como para la obtención de energía. En la naturaleza las bacterias y los hongos son los responsables de oxidar la materia orgánica. Estos organismos descomponen los cuerpos de plantas y animales muertos, así como varios productos orgánicos excretados por los animales, ya sea por el proceso de fotosíntesis y/o respiración. La transformación del carbono y el oxígeno son una obligación para ambos grupos microbianos.

Los constituyentes orgánicos de las plantas son altamente resistentes al ataque de los microbios, por esta razón es que son más acumulables en la naturaleza, aún cuando otros compuestos orgánicos ya han sido mineralizados. La degradación del humus acumulado en suelo es altamente variable y depende de muchos factores químicos y físicos, tales como temperatura, humedad, pH y disponibilidad de oxígeno.

Los microorganismos son extraordinariamente diversos con respecto a la clase y número de compuestos orgánicos que pueden usar como principal fuente de carbono y energía. La gran diversidad de fuentes de carbono orgánico se puede ver porque, naturalmente no existe un compuesto orgánico que no pueda ser usado como una fuente de carbono y energía por los microorganismos (Stainer, 1970). Esta extraordinaria variación, con respecto a sus requerimientos de carbono es uno de los más fascinantes aspectos de la fisiología microbiana.

Algunos organismos obtienen su fuente de energía de la oxidación de compuestos inorgánicos, típicamente oxidan el CO_2 como fuente principal de carbono celular. La conversión de CO_2 para formar constituyentes orgánicos celulares es un proceso reductivo, que requiere una entrada de energía la cual obtienen principalmente de la luz.

La mayoría de los organismos obtienen carbono principalmente de nutrientes orgánicos, para cubrir sus necesidades energéticas. Mucho del carbono presente en los substratos orgánicos entran a la ruta metabólica de obtención de energía. Los substratos orgánicos tienen un papel nutricional dual: estos sirven al mismo tiempo como una fuente de carbono y como una fuente de energía. Muchos microorganismos pueden usar un solo compuesto orgánico para cubrir completamente sus necesidades nutricionales. Otros, sin embargo no pueden crecer con una sola clase de compuestos orgánicos y necesitan un número variable de otros compuestos adicionales como nutrientes.

Existen muchos organismos sumamente versátiles para degradar diferentes compuestos orgánicos y así obtener carbono. Por ejemplo el género de bacterias *Pseudomonas* puede usar, por lo menos, 90 diferentes compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía (Stainer, 1970).

El CO_2 es normalmente producido en grandes cantidades por los organismos que usan compuestos orgánicos.

La mayoría de las bacterias pueden descomponer proteínas y sus productos de degradación, y liberar amoníaco, uno de los componentes, éste se desprende antes de consumirse el residuo orgánico ácido, en particular como elemento energético. Como ya se mencionó en el anterior inciso, la producción de NH_4^+ es una fase esencial en el proceso de formación de nitratos en el suelo.

La descomposición de especies nitrogenadas y su aprovechamiento como fuentes de energía ocurren solo cuando no hay carbohidratos de fácil consumo. En presencia de un carbohidrato

que fermente con rapidez, las bacterias toman su energía del mismo y utilizan los compuestos nitrogenados sólo para fines plásticos, con lo que disminuye notablemente la producción de amoníaco y nitratos. Por lo tanto sólo se llega al rendimiento máximo de amoníaco cuando no se dispone de un carbohidrato de asimilación rápida (Salle, 1965).

El nitrógeno y el azufre existen en los compuestos orgánicos de las células, principalmente en formas reducidas, como grupos amino y sulfidril, respectivamente. Los requerimientos de estos dos compuestos pueden ser obtenidos frecuentemente a través de los nutrimentos orgánicos, los cuales los contienen en combinación reducida (aminoácidos, o algún complejo proteínico como las peptonas). Tales compuestos pueden también provenir seguramente de fuentes de energía y carbono orgánico, satisfaciendo simultáneamente los requerimientos celulares de carbono, nitrógeno, azufre y energía.

Algunos estudios han demostrado, que naturalmente existen microorganismos o consorcios de microorganismos, que pueden degradar contaminantes específicos o diferentes clases de éstos. Estos estudios también revelan patrones de degradación, esenciales en la vía de desintoxicación y mineralización (Jespersen *et al.* 1993).

La biodegradación de contaminantes, al igual que todos los compuestos orgánicos, requiere de una fuente de carbono, un aceptor de electrones y micronutrimentos. El contaminante puede ser la fuente de carbono o el substrato primario para los microorganismos. Algunas veces puede ser requerido algún cosustrato para "disparar" la producción de enzimas necesarias para degradar el substrato primario, otros contaminantes pueden ser cometabolizados directamente al mismo tiempo que el substrato primario.

Los microorganismos requieren diferentes aceptores de electrones. El oxígeno es el aceptor usado por las bacterias aerobias, mientras que las bacterias anaerobias pueden usar nitratos, sulfatos o CO₂. En todos los el fósforo y nitrógeno son requeridos como nutrimentos para el desarrollo y crecimiento.

El pH neutro, entre 6.5 y 7.5, es requerido típicamente para un crecimiento óptimo de bacterias. La temperatura afecta la cinética de las reacciones bioquímicas y el crecimiento de los microorganismos encargados de la degradación. En los procesos aerobios la degradación de los contaminantes orgánicos ocurre, preferentemente, en un intervalo de temperatura entre 15 y 40° C.

Los microorganismos tienen la capacidad natural de destruir compuestos orgánicos de su medio para obtener de ellos energía y carbono. En los últimos años, esta capacidad, ha sido aprovechada por el hombre para tratar de eliminar del ambiente contaminantes orgánicos que se han vertido en éste y que han producido un especial impacto en suelo y acuíferos, como los químicos orgánicos halogenados, los cuales incluyen los solventes sintéticos clorados e hidrocarburos aromáticos de productos del petróleo, (Feenestra y Cherry, 1988). Algunos de ellos tienen un alto potencial de volatilización y reciben el nombre de compuestos orgánicos volátiles (COVs).

En los Estados Unidos los contaminantes orgánicos identificados más frecuentemente en el agua subterránea son: tetracloruro de carbono, clorobenceno, 1,2- dicloroetano, 1,2-dicloroetileno, tetracloroetileno también conocido como percloroetileno, 1,1,1- tricloroetano, tricloroetileno, benceno, tolueno y xilenos (Mazari 1992). En México los contaminantes más comunes son los hidrocarburos.

Los ríos tienen un papel importante en la contaminación de los acuíferos en Europa, ya que una fracción considerable de las aguas subterráneas es recargada a través de la infiltración de los ríos (Schwerzenbach *et al.*, 1983). Estos estudios incluyen investigaciones acerca de la infiltración de los microcontaminantes desde el agua del río hacia el subsuelo. Dichos trabajos son importantes porque representan un escenario similar al de los canales de aguas residuales en la Ciudad de México, por las características de la calidad de agua y la geología de cada uno de estos sitios (Mazari, 1992). Estos estudios han demostrado que los COVs se mueven rápidamente en el susuelo. Sin embargo, si un río es recargado permanentemente con tales

químicos, a la larga los acuíferos pueden ser contaminados, solo algunos de estos compuestos son retenidos en el suelo o transformados durante la infiltración.

Muchos contaminantes orgánicos son completamente resistentes a las transformaciones químicas y biológicas, a las que se ven sometidos en las condiciones típicas del suelo y la eliminación no es probable que ocurra. Sin embargo, para otros las reacciones químicas como hidrólisis o dehidrohalogenación y/o las transformaciones biológicas pueden ser importantes. De hecho, los procesos biológicos son los responsables de la mayor eliminación de algunos compuestos volátiles, predominantemente en los primeros metros de infiltración (Schwarzenbach *et al.*, 1983).

El tratamiento biológico del suelo ha sido un método muy utilizado en los últimos años para descontaminar éste de residuos del petróleo. Este es considerado como un buen método de tratamiento para diesel, gasolina y algunos constituyentes del petróleo crudo y aceite (Jespersen *et al.* 1993). Los derivados del petróleo tienen hidrocarburos aromáticos, tales como: benceno, etilbenceno, xileno y tolueno, donde el benceno es tóxico y son comunmente conocidos como BTEX.

Muchos microorganismos del suelo son capaces de destruir hidrocarburos aromáticos y sus derivados. Las bacterias relacionadas con la descomposición aerobia están ampliamente distribuidas en casi todos los suelos y contienen microorganismos que crecen en una gran variedad de estos compuestos. Todos los hidrocarburos aromáticos que se encuentran naturalmente y muchos que son sintetizados pueden ser metabolizados. La concentración de bacterias que pueden mostrar degradación de benceno, tolueno, vainillina y fenantreno, según su localización, fluctúa entre 10^2 y 10^6 por gramo de suelo.

Las fases iniciales de las vías metabólicas son muy variadas, dependiendo del tipo de contaminante metabolizado. Sin embargo, las reacciones se orientan en una dirección tal que sólo se producen unos pocos intermediarios comunes, los cuales son entonces metabolizados

por unos cuantos procesos semejantes. Los más comunes de estos intermediarios son: el catecol, ácido protocatéquico y, en menor grado, el ácido gentisínico.

La primera fase del metabolismo del tolueno es, frecuentemente, la modificación o eliminación de sustituyentes en el anillo de benceno y la introducción de grupos hidroxilo. Pero antes de esto, los grupos metilo son convertidos a grupos carboxilo antes de la ruptura del anillo; ésta reacción se realiza gradualmente. Sin embargo, algunas veces el metilo no es eliminado antes de que el anillo sea abierto. Entonces con frecuencia pero no siempre, el carboxilo es eliminado antes de la ruptura del anillo y después, el metoxilo es reemplazado por un hidroxilo y da lugar a formaldehído. Las cadenas alifáticas largas son acortadas para producir un residuo con uno o dos átomos de carbono menos. Esto ocurre gradualmente por β -oxidación.

La abertura del anillo casi siempre requiere de la adición de oxígeno que proviene del O_2 . Esta necesidad por O_2 determina que los organismos involucrados sean aerobios. Los tres intermediarios centrales son degradados por cinco vías metabólicas esencialmente semejantes. Los cinco productos de estas vías (ácidos succínico, fumárico, pirúvico y acético, así como acetaldehído) son fácilmente utilizables por la célula.

El tolueno se ha encontrado en aguas residuales de origen industrial que corren en canales a cielo abierto (Mazari, 1992). El potencial para biodegradar tolueno se ha visto principalmente en el grupo de las *Pseudomonas*. Estas pueden metabolizar el tolueno por medio del plásmido TOL, el cual codifica las enzimas para la degradación de este compuesto (Burlage *et al.* 1989). Como ya se mencionó anteriormente, la degradación del tolueno lleva a un producto intermediario que es el catecol (Figura 2.6.). Posteriormente, este puede ser metabolizado por medio de dos vías (Figura 2.7.), para así obtener ácidos orgánicos que posteriormente van a entrar al metabolismo para obtener energía (Figura 2.8.).

Para que ocurra la degradación de contaminantes orgánicos es necesario un periodo de aclimatación, en el cual no necesariamente se observa la destrucción del contaminante.

DEGRADACIÓN DE TOLUENO

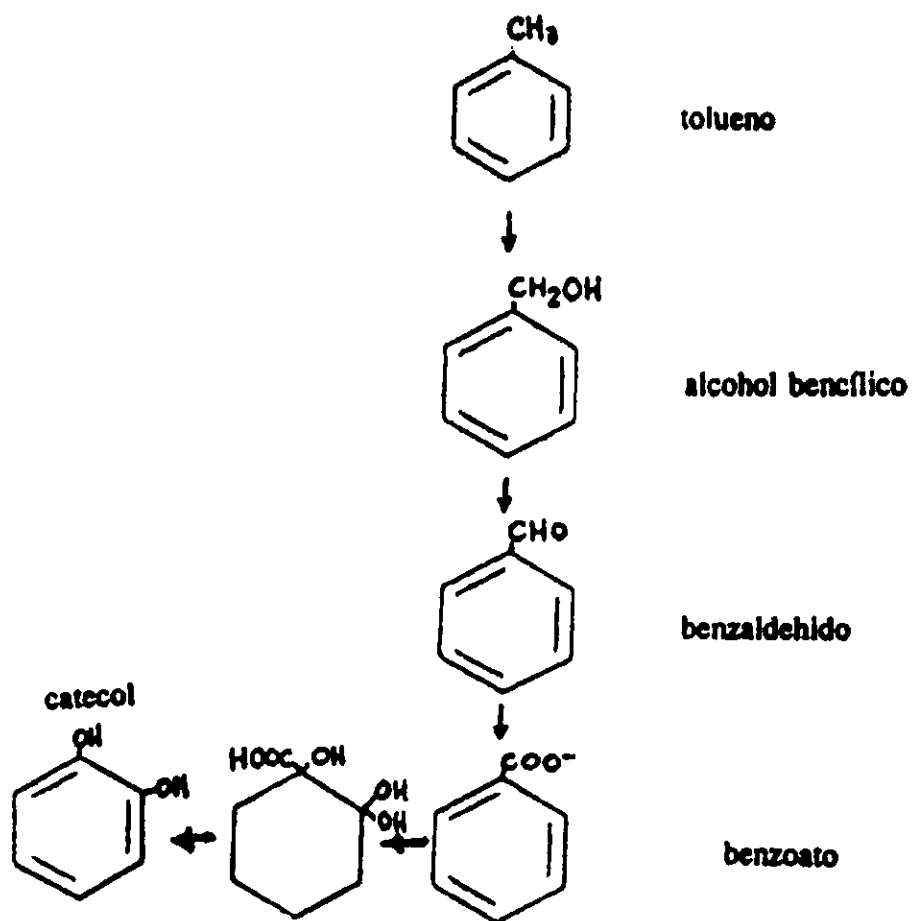


Figura 2.6. Ruta de degradación del tolueno a catecol (Burlage, 1989)

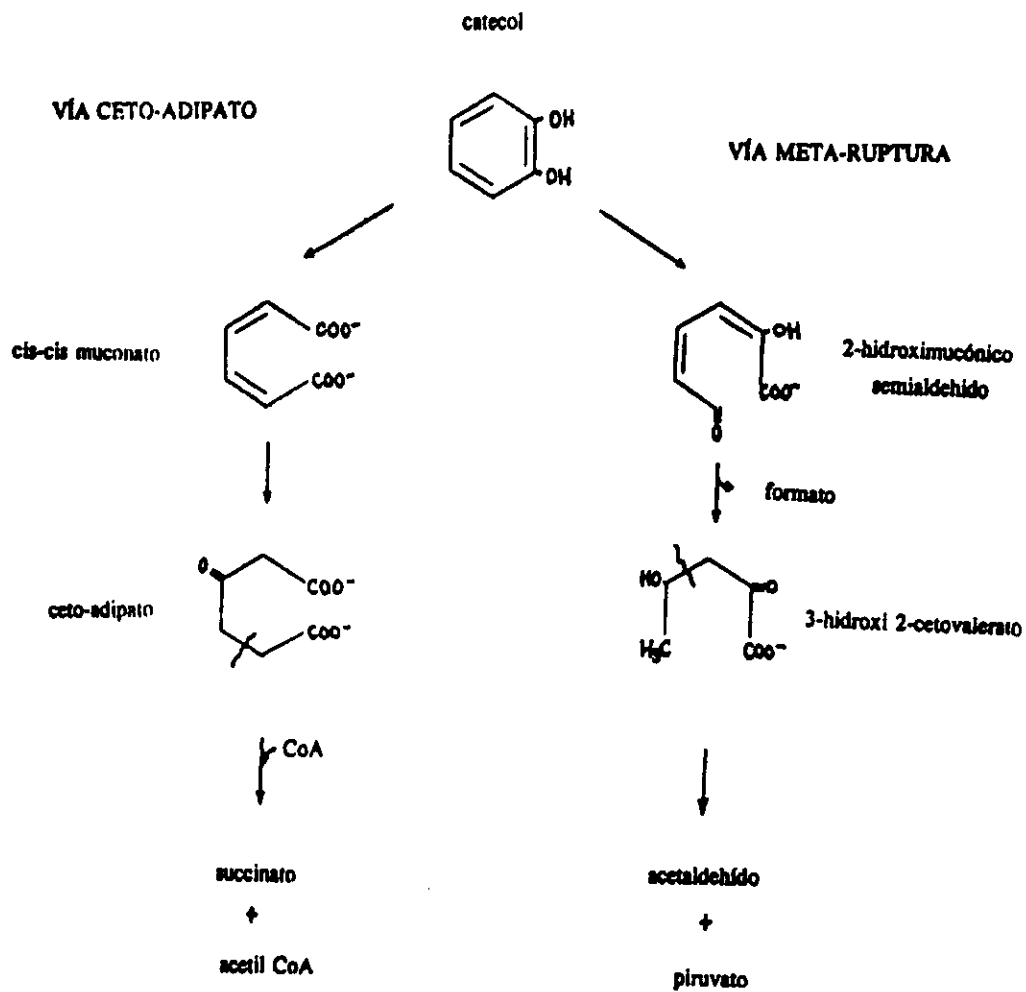


Figura 2.7. Rutas metabólicas de degradación del catecol (Burlage, 1989)

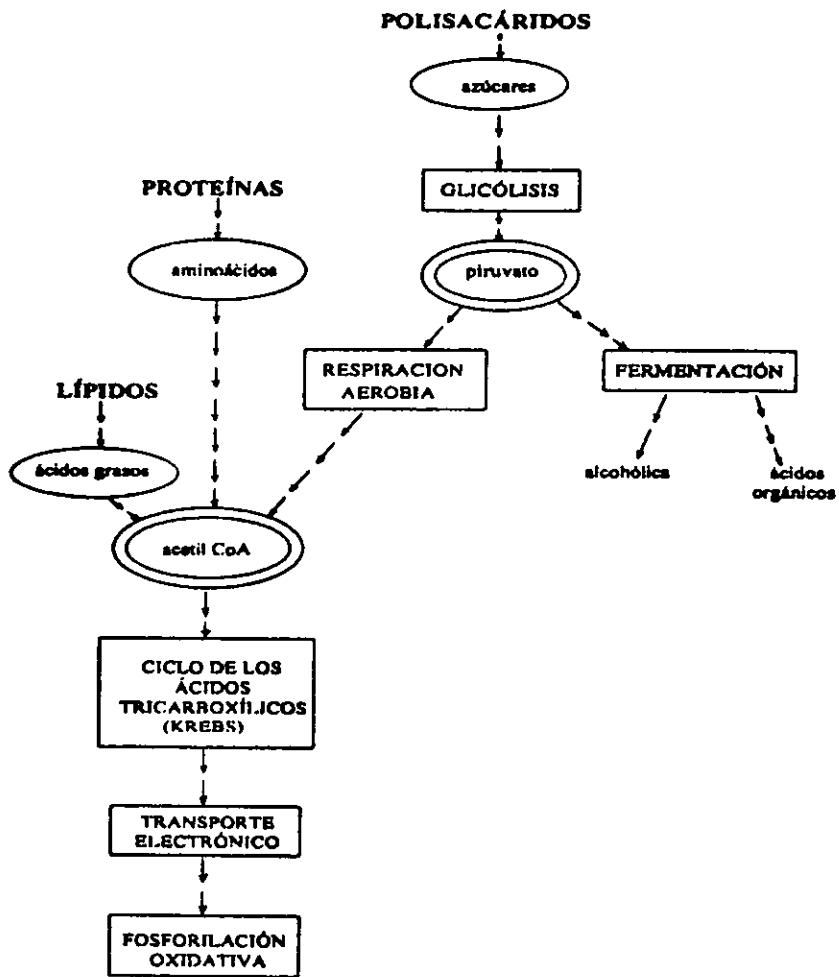


Figura 2.8. Rutas metabólicas para la obtención de energía (Saval, 1996)

El periodo de aclimatación varia considerablemente, este puede ser lento o rápido, desde una hora a varios meses. La duración depende de la variedad de compuestos químicos, así como su estructura química, de la concentración del compuesto y las condiciones microambientales.

El término de la fase de aclimatación se considera como el inicio del periodo de una biodegradación detectable (Alexander 1994). Después de la fase de aclimatación, la tasa de metabolismo para degradar el químico puede ser lenta o rápida, sin embargo, cuando una segunda adición del químico es realizada durante el periodo de aclimatación, la degradación de este incrementa notablemente. Una marcada reducción en el periodo de aclimatación ha sido notada en suelos preparados anteriormente con el contaminante de interés (Alexander 1994). Se asume generalmente que la biodegradación es detectada inmediatamente siguiendo la segunda adición del químico porque los organismos responsables de la transformación, crecen a expensas del contaminante orgánico añadido en la primera ocasión. Con las subsecuentes adiciones se conseguirá un incremento de los organismos degradadores, siguiendo un tratamiento repetido con el contaminante. Esta es la base de las técnicas de enriquecimiento.

Una vez que la comunidad de microorganismos ha sido aclimatada para un sustrato en particular y la actividad se ha notado, la comunidad puede conservar este estado de actividad por algún tiempo y esta actividad puede reducirse por dos posibles razones, la reducción en número o biomasa de los microorganismos responsables, o bien la reducción en la actividad metabólica en ausencia del contaminante específico.

La aclimatación de una comunidad microbiana para un sustrato, frecuentemente resulta también, en la aclimatación simultánea para moléculas estructuralmente relacionadas, sin embargo, las especies favorecidas con la primera adición pueden destruir rápidamente los análogos. Se ha observado, por ejemplo, que ocurre una aclimatación simultánea de análogos en la transformación de distintos hidrocarburos aromáticos policíclicos; esto siguiendo la aclimatación de otros policíclicos o benceno (Baver y Capone 1988).

El proceso de aclimatación es afectado por diversos factores ambientales. La temperatura, el pH y la presencia de oxígeno son factores importantes que afectan la duración de la etapa de aclimatación. La concentración de nitrógeno y/o fósforo puede ser importante en algunos ambientes naturales, ya que en algunos suelos y cuerpos de agua, estas concentraciones son bajas y pueden limitar el crecimiento microbiano (Lewis *et al.* 1986).

La concentración del contaminante también es importante y esto va a afectar también el tiempo de aclimatación. Si esta concentración es alta puede ser inhibitoria y si es baja puede no ser suficiente para soportar el desarrollo microbiano.

En ambientes naturales, la duración del periodo de aclimatación no es fija y puede variar de sitio a sitio, ya que algunas comunidades microbianas pueden aclimatarse para un determinado compuesto y otras no. Muchos factores intervienen para que se de el proceso de aclimatación de comunidades microbianas para la biodegradación de compuestos orgánicos en ambientes naturales, como suelo y agua. Algunas causas han surgido de estudios recientes, realizados comparando poblaciones microbianas en su ecosistema natural y en cultivos puros. En estos estudios se ha observado que solo actúan unos pocos organismos de todos los géneros y especies que habitan en el ecosistema. Sin embargo, las causas de la aclimatación son siempre las mismas: proliferación de pequeñas poblaciones, presencia de tóxicos en el ambiente, predación por protozoarios, aparición de nuevos genotipos y diauxia.

Proliferación de pequeñas poblaciones. Los suelos, las aguas naturales, el aire y las aguas residuales contienen, típicamente, pequeñas poblaciones de microorganismos actuando sobre muchos compuestos orgánicos sintéticos, los cuales los proveen de fuentes de energía para su crecimiento. La población es pequeña porque los recursos son limitados, entonces, la degradación de los microorganismos no es detectable pero, si se le brindan las condiciones requeridas para metabolizar más rápido el contaminante, estas comienzan a dividirse y la desaparición del contaminante comienza. Por ejemplo, en ambientes en los cuales la concentración de fósforo y nitrógeno u otros posibles nutrimentos inorgánicos son bajos, la fase de aclimatación es larga y la adición de estos nutrimentos puede cortarla. En este caso, el

tiempo es lo más importante para que se tengan células suficientes para la degradación del contaminante. La aclimatación puede ser larga en altas concentraciones del sustrato, igual que cuando se pone una concentración baja. Otra razón de la larga aclimatación es el nivel de toxicidad del compuesto.

Presencia de Tóxicos. Existen dos circunstancias comunes en las cuales la presencia de inhibidores pueden afectar el tiempo de aclimatación para el éxito de una rápida biodegradación. En la primera, el compuesto puede estar presente en niveles muy altos lo cual provoca que existan pocos organismos biodegradadores capaces de crecer y metabolizar, pero en este caso la biodegradación no será detectable salvo si las especies son capaces de aumentar su biomasa y hacer que esta degradación sea detectable. Esto puede estar sucediendo en las descargas de aguas residuales y derrames accidentales, en donde existen altas concentraciones de químicos. En el segundo caso, muchos sitios contaminados con compuestos tóxicos tienen mezclas de compuestos los cuales pueden ser inhibidores para los microorganismos. Cuando los tóxicos desaparecen por biodegradación, destrucción no enzimática, sorción o volatilización, el periodo de no destrucción del contaminante es substituido ahora por una pérdida marcada del contaminante. Los tóxicos pueden actuar de dos formas: causar la inhibición de los microorganismos y el tiempo de una biodegradación no detectable se prolonga; los tóxicos pueden ser eliminados y, entonces, los microorganismos son capaces de proliferar haciendo el periodo de aclimatación más corto y, con el tiempo, se multiplicarían los microorganismos de las especies degradadoras.

Predación por protozoarios. En muchos ecosistemas naturales, principalmente acuáticos, existe un alto número de poblaciones de protozoarios. Estos se alimentan y multiplican gracias a las bacterias presentes. Debido a la predación se reduce la abundancia de estas, especialmente si las densidades de los protozoarios son altas, es como cuando disminuye la población bacteriana porque el suministro de nutrimentos orgánicos utilizables son reducidos. Los protozoarios pueden provocar que la fase de aclimatación sea larga, ya que al comerse a las bacterias, pueden provocar que la biomasa de estas no sea suficiente para que la degradación

sea detectable. Así que existe una correlación entre el consumo de bacterias por protozoarios y el tiempo de aclimatación (Wiggins y Alexander, 1988).

Aparición de nuevos genotipos. Las bacterias y los hongos pueden presentar cambios genéticos como resultado de mutaciones que aparecen en la población o la transferencia de información genética de una especie a otra. Tales eventos ocurren con una frecuencia baja, por lo que, sólo unas pocas células en la población representan un nuevo genotipo que posee características fisiológicas que le dan una ventaja selectiva la cual, que con el tiempo, se multiplicará. El hecho de poseer las enzimas para degradar nuevos sustratos y utilizar estos como fuente de carbono y energía, dan una ventaja selectiva a los microorganismos sintetizadores de estas enzimas sobre los miembros de las comunidades biológicas que no son capaces de crecer a expensas de un sustrato específico. Entonces, la aclimatación podría reflejar el tiempo requerido por los organismos para la transferencia de genes y alcanzar una alta densidad poblacional. Sin embargo, la adquisición de ciertas características no siempre obedece al "apareamiento" de nuevos genotipos, también puede ser consecuencia de la activación de genes propios del genoma. Más bien la transferencia de nuevos genes producto de una mutación conduciría a un mecanismo biológico llamado evolución. Esto llevaría más tiempo que el que tomaría accionar mecanismos genéticos que ya traen consigo los microorganismos.

Diauxia. El crecimiento bifásico y la utilización secuencial de dos sustratos es conocido como diauxia. La fuente de carbono que permite un rápido crecimiento usualmente es metabolizado primero. La diauxia se caracteriza por la represión de la síntesis de las enzimas ocupadas durante el metabolismo de la primera fuente de carbono, esto sería el primer paso para la degradación de la segunda fuente de carbono. La utilización de un compuesto orgánico en preferencia a un segundo ha sido una explicación para la aclimatación, ya que aquí el contaminante es el segundo sustrato, y la pérdida de este no se detecta hasta que el suministro del primero está agotado. La utilización diauxica de sustrato y, de este modo, una aparente aclimatación anterior a usar un segundo, puede ocurrir por ejemplo con compuestos fosfatados.

Pseudomonas testosteroni usa fósforo inorgánico antes del metilfosfanato como su fuente de

fósforo para su crecimiento pareciendo, en un principio, que el fosfanato no es degradado. Solo cuando el fósforo inorgánico es consumido, la desaparición de la segunda fuente de fósforo ocurre (Alexander, 1994 b). En ambientes naturales existen comunidades heterogéneas de bacterias con una variedad de compuestos que serán usados por diferentes especies y estas usarán el nutrimento de su preferencia.

Inducción enzimática y fase lag. Los microorganismos producen muchas enzimas y, a pesar de no tener el sustrato, estas están presentes. Este tipo de enzimas se conocen como enzimas constitutivas. Contrariamente, las enzimas inducibles son formadas en cantidades considerables solo cuando el sustrato o, algunas veces, un químico o metabolito relacionado estructuralmente está presente. El inductor es la molécula específica que está involucrada para desencadenar el proceso de inducción. La enzima inducible puede ser detectada en ausencia del inductor, pero sus niveles son bajos. Muchas enzimas involucradas en las primeras etapas del abatimiento en la síntesis de compuestos, son inducibles. Como la inducción enzimática es usualmente completada en minutos u horas y las fases de aclimatación frecuentemente duran semanas, se dice que la primera porción en la mitad del tiempo en el periodo de aclimatación, correspondería a el tiempo para la inducción de enzimas catabólicas. Si el primer paso en el metabolismo de un compuesto requiere la biosíntesis de enzimas inducibles y las condiciones impiden tal síntesis, el compuesto no será degradado. Durante la fase lag, los organismos no se multiplican, sino que se encuentran en un estado pasivo. Subsecuentemente, los organismos comienzan un rápido crecimiento y empieza la fase exponencial. En los periodos de aclimatación se ha visto que la fase lag es un periodo muy largo.

En el laboratorio, el seguimiento de la pérdida de un contaminante es muy importante, ya que de esto se parte para saber si se está llevando a cabo una biodegradación de éste por parte de las bacterias. La pérdida del contaminante muchas veces no se hace siguiendo el CO_2 , ya que en la fase de aclimatación se pueden formar muchos productos intermediarios difíciles de detectar e identificar.

Existen modelos matemáticos para explicar las cinéticas de la degradación por el orden de reacción. Tendremos, de este modo, reacciones de orden cero y de primer orden. Las cinéticas de orden cero son aquellas en las que la tasa de transformación de un sustrato es independiente de la concentración del mismo, porque la tasa de reacción está determinada por otros factores. Este tipo de reacción se presenta en algunas de las siguientes circunstancias.

- Los nutrientes a algún otro factor que limitan el crecimiento de la población activa está disponible para estos como una tasa constante, pero llega un momento en que esta no cubre completamente la demanda de los organismos. Por ejemplo una limitación por oxígeno.
- Los microorganismos usan una gran cantidad de elementos nutricionales esenciales para su crecimiento, por lo que al agotarse afecta su tasa de multiplicación y por lo tanto no pueden degradar el sustrato.
- El incremento en el número de organismos activos tarda en la degradación de un compuesto orgánico, como resultado de una segunda adición y/o incremento del químico.
- La población está creciendo bajo cierto compuesto como fuente de carbono el cual tiene baja solubilidad en agua y la cantidad en solución acuosa ha sido completamente consumida, por ejemplo en hidrocarburos aromáticos policíclicos. El crecimiento lineal en cultivos puros frecuentemente sigue a un periodo de crecimiento logarítmico, en el que la población inicial de microorganismos es probable que primero crezca exclusivamente del químico soluble u otros nutrientes orgánicos disueltos y cuando el suministro de estos se agota empiezan a usar el químico que no está en la fase acuosa.

En las reacciones de primer orden la tasa de transformación de un sustrato es proporcional a la concentración del mismo, o sea que es dependiente de la concentración del sustrato. Estas tienen lugar a una velocidad exactamente proporcional a la concentración de un reaccionante.

La explicación que se da para que ocurra una cinética de primer orden está en relación a la densidad de bacterias activas sobre el sustrato y la concentración de éste. Cada una de estas

células no se reproducen porque la concentración del sustrato no es suficientemente alta para soportar el crecimiento o hay un crecimiento porque existe suficiente carbono para permitir que la población activa aumente.

III. ANTECEDENTES

1. Fuentes de contaminación del suelo y subsuelo

Durante los últimos años el suelo ha sido afectado por la presencia de contaminantes provenientes de varias fuentes. Esto se debe principalmente al alto crecimiento demográfico y a la mala administración de los recursos.

En las zonas agrícolas gran cantidad de sales y diversos compuestos químicos derivados del lavado de los suelos, del riego con aguas residuales, así como la aplicación de fertilizantes y plaguicidas, ingresan al subsuelo acarreados por la infiltración del agua de riego e incluso son desalojados por medio del drenaje hasta alcanzar los mantos freáticos. En el medio rural, las fosas sépticas y letrinas, las aguas residuales descargadas al terreno o a corrientes superficiales y las instalaciones pecuarias, generan una carga contaminante (Chávez, 1993).

Durante las últimas décadas el subsuelo ha recibido de todo tipo de contaminantes biológicos y químicos inorgánicos y orgánicos. Gracias a los procesos de amortiguación del suelo, es que no se han llegado a contaminar muchos acuíferos, aunque existen otros que han sufrido daños irreversibles, como son los acuíferos de Valle de León, Gto., Celaya, Gto., y el Valle del Mezquital, Hgo. (Chávez, 1993).

En las áreas urbanas e industriales los focos de contaminación son las fugas en los depósitos de hidrocarburos y de efluentes líquidos, las descargas de aguas residuales, la depositación de residuos en tiraderos o rellenos sanitarios y las fugas en las redes de alcantarillado.

El área de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM), es el mayor centro de actividades industriales. Estas actividades son una de las principales fuentes de contaminación que afectan al agua superficial y por lo tanto al subsuelo.

Contaminantes biológicos

Los contaminantes biológicos más importantes en la naturaleza son las bacterias patógenas y los virus. En México, las enfermedades infecciosas y parasitarias son las causantes más comunes de muerte, principalmente en infantes (Consejo Asesor en Epidemiología, 1990). Esto se debe en gran medida a la baja calidad del agua potable. Los virus y las bacterias patógenas para el humano provienen, en gran medida, de los desechos sólidos y aguas residuales domésticas. Estas pueden ser filtradas a través del suelo, desde sus fuentes de origen al agua subterránea (Mazari, 1992).

Los contaminantes microbianos están también presentes en desechos médicos (Lee *et al.* 1991), los cuales muy probablemente se colectan y depositan en basureros municipales principalmente (Mazari, 1992). De los basureros o rellenos sanitarios pueden migrar los microbios patógenos a través del suelo y llegar al acuífero. Se ha visto que los organismos se comportan como partículas móviles. En pruebas controladas a nivel de laboratorio se ha observado que los microorganismos migran varios metros en forma descendente, por filtración, a través de un medio arenoso;

posteriormente, su número disminuye pero, si existen fracturas, la migración es más rápida y el número de organismos filtrados hacia la parte final puede ser mayor (Harvey *et al.* 1989).

Contaminantes Químicos

La otra fuente de contaminación importante en las aguas residuales que se generan en la ZMCM son los químicos orgánicos e inorgánicos usados en actividades comerciales, agrícolas, industriales y caseras.

Contaminantes Inorgánicos. En las actividades comerciales e industriales se usan una gran variedad de materiales químicos inorgánicos, los cuales son dispuestos al ambiente en forma accidental o en contenedores inadecuados. Por las condiciones fisicoquímicas e hidrológicas de la capa de suelo subyacente a estos materiales, la migración de los contaminantes inorgánicos puede ser limitada. Sin embargo, no pueden pasar desapercibidos como contaminantes de agua subterránea.

Combustibles derivados del Petróleo. Las instalaciones que manejan combustibles son otra fuente de contaminación, ya que éstas se descargan en grandes cantidades al drenaje. Esto puede ejemplificarse con la explosión en Guadalajara en 1992 debida, aparentemente, a la presencia de gasolina dentro del alcantarillado. El transporte de gasolina, así como de otros productos derivados del petróleo también son una fuente de contaminación para los suelos y acuíferos, debido a las fugas de los tanques de almacenamiento y ductos.

Solventes Orgánicos Halogenados. Estos son compuestos generados por las industrias fabricantes y armadoras de aparatos electrónicos y metales, ejemplos de ellos son el percloroetileno (PCE) y el tricloroetileno (TCE). Dichos compuestos son utilizados en grandes cantidades como desgrasantes, también se usan en las tintorerías. Estos solventes son más densos que el agua, y en algunos casos han migrado a los acuíferos subyacentes disolviéndose lentamente dentro del acuífero, por lo que en muchos sitios este proceso ha sido la causa de la contaminación de acuíferos en países industrializados (Mazari, 1992).

En la ZMCM hasta 1992, se concentraban 100 industrias manufactureras de productos electrónicos al norte de la ciudad. Este tipo de industrias está utilizando probablemente solventes orgánicos y algunas de éstas se localizan en una área de transición con una pequeña o no suficiente capa de suelo capaz de proteger al acuífero (Mazari, 1992).

Desechos Sólidos Domésticos. La Ciudad de México generaba en 1994 aproximadamente 80 746 toneladas de desechos sólidos por día de los cuales el 44% provienen de la industria y el 56% de desechos domésticos (TEOREMA, 1995).

Cinco de los seis rellenos sanitarios en la ZMCM fueron designados para desechos municipales. Sin embargo, nunca se determinó un área para almacenar los desechos peligrosos, por lo que se recibían hasta 1992 todos los desechos (Mazari, 1992).

Se tiene información de manera extraoficial de que muchas industrias almacenan porciones de sus desechos sólidos dentro de su propiedad. Existen otros sitios clandestinos de depósito en el área urbana, pero se cree que la mayoría reciben principalmente desechos sólidos. En algunos casos los cañones, barrancas o las viejas minas en las zonas montañosas, se han convertido en tiraderos a cielo abierto.

Los contaminantes orgánicos se pueden filtrar al subsuelo desde los rellenos sanitarios. Se tiene conocimiento de dicho proceso pero oficialmente no se ha publicado. En algunos sitios la contaminación se ha movido a través de los suelos que son permeables, mientras que en otros la migración está ocurriendo aparentemente a través de una área de fracturas del suelo (Mazari, 1992).

Uno de los rellenos sanitarios localizado en la zona de transición permanece en operación, la cual tiene una mínima barrera natural para impedir la migración al subsuelo. La contaminación ocasionada por los rellenos sanitarios en la ZMCM merece más atención de la que se le ha dado en realidad.

2. Sistema de drenaje en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México

Más del 90% de los desechos líquidos industriales en la Ciudad de México, con un total de 1.5 millones de toneladas anuales, son depositadas en el drenaje sin un tratamiento previo. No es conocida del todo la composición de los desechos pero, debido a la gran variedad de industrias, se puede asumir que estos desechos contienen químicos tóxicos. Esto es de gran interés, ya que no se tiene control de esta fuente de contaminación y por lo tanto no se sabe la variedad de contaminantes que este aporte al subsuelo.

Sólo existen diez plantas de tratamiento de aguas residuales en la ZMCM, que funcionan principalmente mediante un sistema de lecho de lodos, con una capacidad para tratar 5 m³/s (Mazari, 1992). El agua tratada que representa solamente el 7% de la total generada es utilizada para regar áreas verdes dentro de la ciudad y para la recarga del canal de agricultura en la zona de Xochimilco (DDF y El Colegio Nacional , 1987).

En la Ciudad de México las aguas negras en algunos casos se disponen en pozos y tanques sépticos. En 1987 se estimó que el 26% de la población de la ZMCM no contaba con servicio de drenaje (DDF y El Colegio Nacional, 1987).

El sistema de alcantarillado es probable que no se encuentre en las mejores condiciones, ya sea por una instalación inapropiada o es muy probable que el deterioro sea por actividades de construcción, hundimientos y temblores. También es probable que los primeros trabajos se hayan hecho con más cuidado que los modernos, sin embargo, los primeros fueron construidos a poca profundidad en comparación con los segundos. Algunas de las secciones nuevas del sistema de drenaje han sido instaladas en zonas montañosas, y las fugas de muchas de estas nuevas secciones pueden ser de gran importancia, si se tiene en consideración la recarga del acuífero.

Existe una sobreexplotación del acuífero de la Cuenca de México, lo que podría acarrear un deterioro en la calidad del agua y la aceleración de la filtración de los contaminantes a través del subsuelo debido al bombeo continuo de agua.

Durante los años 70's la oficina encargada del Subsistema de Drenaje construyó un almacén para depositar las aguas durante la época de lluvias. Sin embargo, hoy en día los sistemas de drenaje pluvial y de aguas residuales operan al mismo tiempo en la época de lluvias. En el área central de la ZMCM, este sistema se construyó en las arcillas lacustres a través de partes que requirieron excavación dentro del acuífero. El departamento encargado de la construcción considera que éste es a prueba de fuga, pero la realidad es que, ocasionalmente, se requiere reparar en la época de estiaje, por lo que se puede pensar que la aseveración anterior no es del todo cierta. A pesar de esto, no existen monitoreos para determinar si este sistema libera una cantidad significativa de contaminantes para el acuífero dentro de la zona de transición (Mazari 1992).

Existen al norte dos reservorios de aguas residuales llamados Requena y Endhó, de los cuales se toma agua para la irrigación de áreas agrícolas del estado de Hidalgo, esto también puede causar daños a los acuíferos hidalguenses. Finalmente, las aguas residuales se vierten en el Golfo de México a través del Sistema de Río Tula-Moctezuma-Pánuco (Mazari, 1992).

3. Descarga de aguas residuales en canales a cielo abierto

Las aguas residuales de la ZMCM son vertidas en redes de canales y colectores semiprofundos que cruzan la zona. Este sistema incluye tres canales a cielo abierto que son el Gran Canal de Desagüe, el Río de los Remedios y el Canal Nacional, los cuales no cuentan con una barrera física para evitar la infiltración de sustancias tóxicas hacia el subsuelo y posteriormente al acuífero. Estos comunican con el subsistema de drenaje profundo, reservorios, estaciones de bombeo y alcantarillado (DDF, 1988).

El Gran Canal de Desagüe fue construido a principios de siglo y operó para sacar el agua desde las partes bajas del sistema de drenaje, dar origen al canal y seguir su marcha sacando el agua de la ZMCM por gravedad. Debido al subsecuente crecimiento demográfico se necesitaron estaciones de descarga que operaran junto con el canal. El Río de los Remedios, originalmente era un río natural que desembocaba en una parte del norte de la Ciudad de México. Desde hace varias décadas este Río ha sido usado para acarrear aguas residuales domésticas e industriales. Es

importante mencionar que ninguno de estos canales tienen un recubrimiento en su lecho que proteja al subsuelo, excepto en uniones y otros sitios erosionados (Mazari, 1992).

La mayor parte de las sustancias contaminantes se depositan sobre los sedimentos lacustres arcillosos (acuitardo lacustre), los cuales representan la única barrera entre estos y el acuífero. El acuitardo superficial de arcilla que ocupa lo que fue la zona lacustre de la Cuenca de México se ha considerado como una capa impermeable que impide la migración de contaminantes hacia el acuífero. Sin embargo, en estudios hidrológicos y de mecánica de suelos en la Cuenca de México se han detectado fracturas y grietas en la formación arcillosa en lugares como el Lago de Texcoco, Río Churubusco y la Subcuenca de Chalco (Ortega *et al.* 1993). Estas fracturas facilitan el transporte de solutos a través de depósitos arcillosos.

En las zonas lacustres de Mixquic, Tláhuac y Xochimilco, drenan cuencas que llevan aguas residuales, las cuales son una fuente de contaminación para el subsuelo y, por lo tanto, posteriormente lo podrían ser para el acuífero.

El hecho de que los canales estén sin protección en su mayor parte, representa un peligro latente debido a la migración de contaminantes desde el canal, hasta llegar al acuífero. Esto merece atención especial si se considera que esta parte del drenaje está al norte de la ZMCM, en la zona de transición. Prácticamente, no existen estudios que demuestren si la migración de contaminantes ha sido significativa, así como si ha ocurrido desde los canales a través de la zona de transición. Esto debe tener gran prioridad considerando la proximidad de las recargas de los pozos en esta área.

El potencial de contaminación del subsuelo a través de los canales también existe en el área lacustre por los gradientes hidráulicos hacia abajo, con la probabilidad de que se incrementen con el tiempo. Las fracturas han sido observadas hasta 15 m de profundidad y si se considera que los gradientes hidráulicos están en descenso, por lo que se espera que la infiltración se acelere con el tiempo. Debido a lo expuesto anteriormente, se estableció la necesidad cambiar algunos de estos

canales a sistemas de drenaje entubados, de los cuales el Gran Canal es la obra más avanzada (Mazari, 1992).

4. Estudios previos en sitios de canal en la ZMCM

Durante la caracterización de las aguas residuales superficiales de canales de la Subcuenca de Chalco, Mazari *et al.* (1994) encontraron que las aguas vértidas en dichos canales no solamente son de origen industrial sino también doméstico. Estos autores detectaron tolueno en concentraciones de hasta 1000 ppm en las aguas residuales superficiales que corren por Chalco. También detectaron hidrocarburos lineales derivados del petróleo, componentes típicos de la mezcla nafta que contiene solventes de baja calidad los cuales, probablemente provenían de pinturas utilizadas por la industria textil y papelera de la zona. Asimismo, detectaron la presencia de tricloroetileno y percloroetileno en muestras de agua intersticial extraída del subsuelo a 3.0 y 3.5 m de profundidad. El hecho de haber encontrado a esa profundidad estos compuestos orgánicos, más volátiles que el tolueno y que otros hidrocarburos de uso industrial, es indicativo de una migración descendente. En estudios realizados por Cabrera y Rodríguez (1995), se indicó que en muestras de material geológico extraído de 3.0 a 4.0 m de profundidad, se encontró una alta concentración de materia orgánica, lo que coincide con una mayor acumulación de contaminantes orgánicos a esa profundidad. A lo anterior habría que adicionar la detección de pequeñas concentraciones de sustancias activas al azul de metileno (SAAM), indicadoras de la presencia de detergentes, en muestras de agua intersticial a las mismas profundidades (Saval y Mazari, 1996).

5. Estudios de caracterización microbiológica en el subsuelo

Recientemente, los problemas de limpieza y restauración ambiental han despertado gran interés en la microbiología del suelo y subsuelo. Entender la ecología microbiana es necesario para poder saber el efecto de los microorganismos durante la biorremediación *in situ*. La distribución de los contaminantes y bacterias en el suelo, depende de las condiciones ambientales que se den en éste. Existen estudios que muestran la distribución y abundancia de los microorganismos en el

subsuelo debido a que muchos de éstos son capaces de degradar una gran cantidad de compuestos orgánicos, incluyendo hidrocarburos aromáticos (Stevens *et al.* 1993). Las bacterias son los microorganismos más versátiles, ya que podemos encontrarlas en una gran gama de ambientes, incluso en ambientes con radionucléotidos, en donde los absorben y dispersan a través del suelo y agua, lo cual es un gran problema en zonas donde se manejan desechos radiactivos (Pedersen y Ekendal, 1990). Es así que, para saber si se puede llevar a cabo una biorremediación del suelo, o bien si existe capacidad de atenuación natural es necesario, como primer paso, caracterizar el lugar para entender el comportamiento de los contaminantes en el sitio y la influencia de las variables físicas y químicas sobre la actividad microbiana.

Durante la última década, el subsuelo ha sido objeto de múltiples investigaciones microbiológicas encaminadas a conocer el papel que desempeñan los microorganismos para evitar la contaminación de las aguas subterráneas. Se han encontrado una gran variedad de microorganismos en los acuíferos y en suelo no saturado, pero su actividad puede ser más baja que en zonas superficiales, por la limitación de nutrientes inorgánicos (Kieft *et al.* 1993).

Las comunidades microbianas tienen gran importancia por su participación en los procesos biogeoquímicos y su potencial para una biodegradación *in situ* de los contaminantes orgánicos. Aunque se creía que los microorganismos de zonas no saturadas tenían un metabolismo más bajo que el de zonas saturadas, en suelos influenciados por la descarga de aguas residuales, se han encontrado más bacterias capaces de mineralizar substratos orgánicos más rápidamente que los de las zonas no contaminadas debido al aporte de nutrientes (Fredrickson *et al.* 1994; Brockman *et al.* 1992).

Estos antecedentes sirvieron como base para desarrollar la presente investigación que tuvo como meta conocer las características del microambiente en un sitio de canal de la Subcuenca de Chalco y evaluar la capacidad de las bacterias autóctonas para degradar compuestos orgánicos, utilizando al tolueno como substrato modelo.

IV. ÁREA DE ESTUDIO

1. Localización Geográfica

La Subcuenca de Chalco se encuentra ubicada en la porción sur de la Cuenca de México y al suroeste de la Ciudad de México (Figura 4.1) entre los paralelos 19° 12' y 19° 19' de latitud norte y los meridianos 98° 55' y 99° 00' de longitud oeste, su altitud es de 2,240 msnm, ocupando un área de 1,124 km² (Bellia *et al.* 1992).

La subcuenca de Chalco limita al norte con la Sierra de Santa Catarina, el volcán La Caldera y el Cerro Tlapacoya; al sur con la Sierra Chichinautzin; al suroeste con el Cerro de Cocotitlán y al suroeste con el volcán Teúhtli (Rodríguez y González, 1989).

2. Fisiografía

La Cuenca de México se encuentra localizada al sur de la meseta central, en el centro del Eje Neovolcánico, llamado también Faja Transvolcánica Mexicana. Posee un contorno irregular y alargado de norte a sur, con un eje mayor de 110 km de longitud

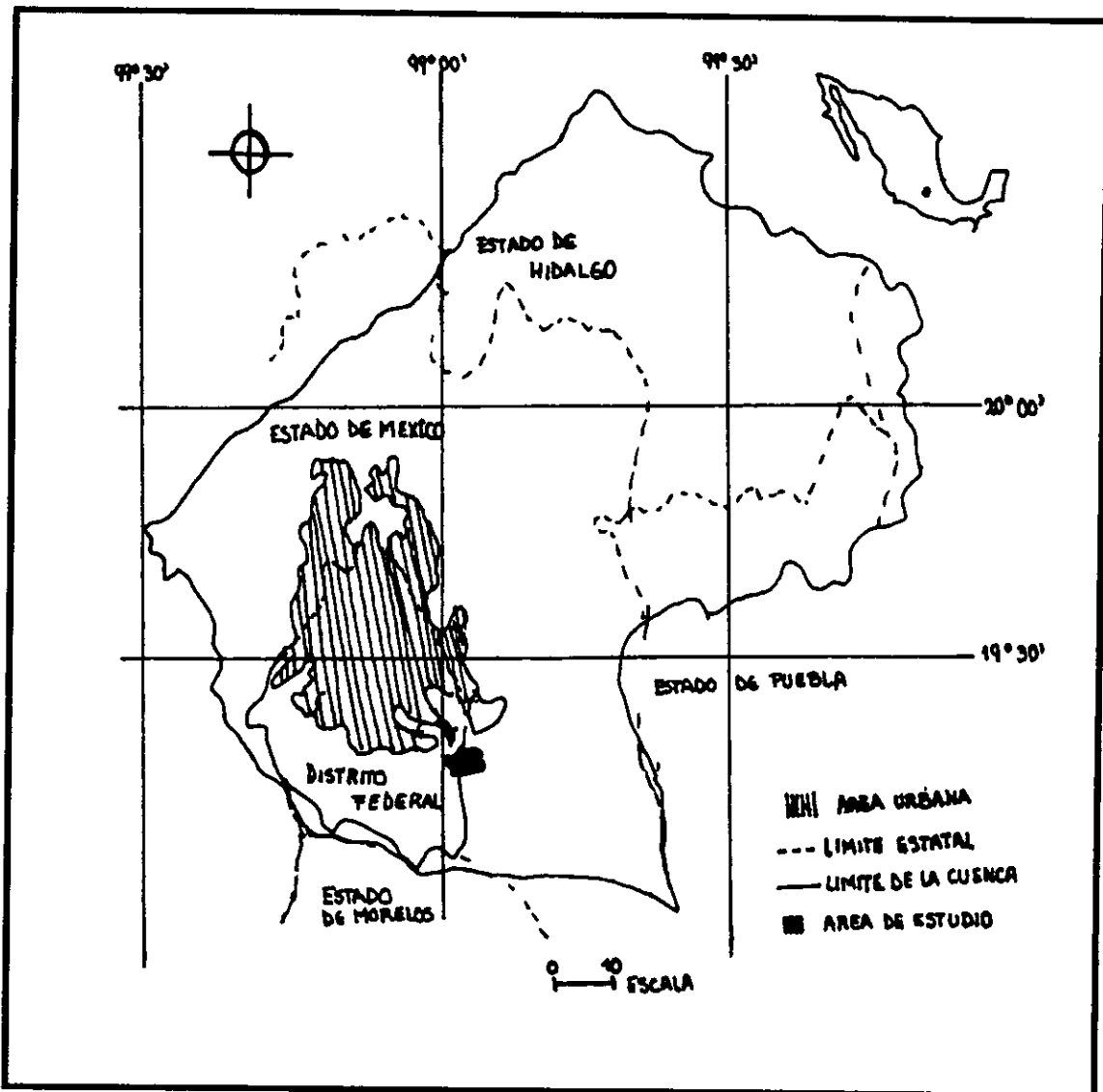


Figura 4.1. Ubicación geográfica del sitio de muestreo

y eje menor de 80 km aproximadamente. La cuenca se encuentra rodeada por elevaciones montañosas, al norte por la Sierra de Tezontlalpan, Tepetzotlán y Pachuca, siendo su altura máxima de 3,000 m. Al sur se encuentra la Sierra del Ajusco y Chichinautzin, que alcanzan una altura de 3800 a 3,900 m; al oeste la Sierra de Monte Alto, Monte Bajo y Las Cruces con una altura de 3,600 m; al este la Sierra Nevada, en donde sobresalen el Popocatepetl con 5,747 m y el Iztaccíhuatl con 5,286 m de altura (Valverde y Aguilar, 1987).

3. Geología

La Cuenca de México se formó durante procesos volcánicos y tectónicos a partir del Eoceno Superior. Los depósitos piroclásticos de diferentes tipos afloran en la región y frecuentemente se intercalan entre rocas provenientes directamente de los derrames lávicos.

La Subcuenca de Chalco se ha formado a través de procesos tales como intemperismo, erosión, acumulación de sedimentos y tectonismo que, ha su vez, han provocado vulcanismo. Esta zona se encuentra constituida por conos cineríticos, abanicos volcánicos, laderas, colados de lavas andesíticas y andesitas basálticas. La Figura 4.2 muestra un corte geológico de la Subcuenca de Chalco (Rodríguez y González, 1989).

El área se encuentra limitada al norte por rocas del Mioceno y Plioceno de la Sierra de Santa Catarina, al sur por derrames de lavas y tobas andesíticas dacíticas y riolitas que constituyen el volcán Teúhtli (Rodríguez, 1987) el cual forma parte de la Sierra Chichinautzin. Al este y oeste tienen un espesor variable de sedimentos lacustre y aluviales de edad cuaternaria; localizándose materiales piroclásticos de grueso a fino (Bellia *et al.*, 1992). Ortega *et al.* (1993) encuentran que el acuitardo lacustre de la Subcuenca de Chalco, presenta un espesor hasta de 300 m en su parte media. Mencionan que, bajo condiciones naturales, el flujo de agua subterránea en el acuitardo lacustre era ascendente y que debido a la influencia del acuífero regional los gradientes se han invertido. En áreas donde el espesor de los sedimentos lacustres es menor a 100 m se tiene flujo descendente mientras que, en áreas donde el espesor es mayor

a 100 m, el gradiente aún no se invierte. La explotación del acuífero está generando la consolidación acelerada del acuitardo lacustre, el intervalo de consolidación actual es de 0.40 m/año. Estas condiciones de explotación y consolidación fueron similares a las que existieron en México en los años 60's. Se han realizado estudios acerca del transporte de solutos no reactivos en la Planicie de Chalco, los cuales muestran que en algunas áreas el transporte está controlado por fracturas.

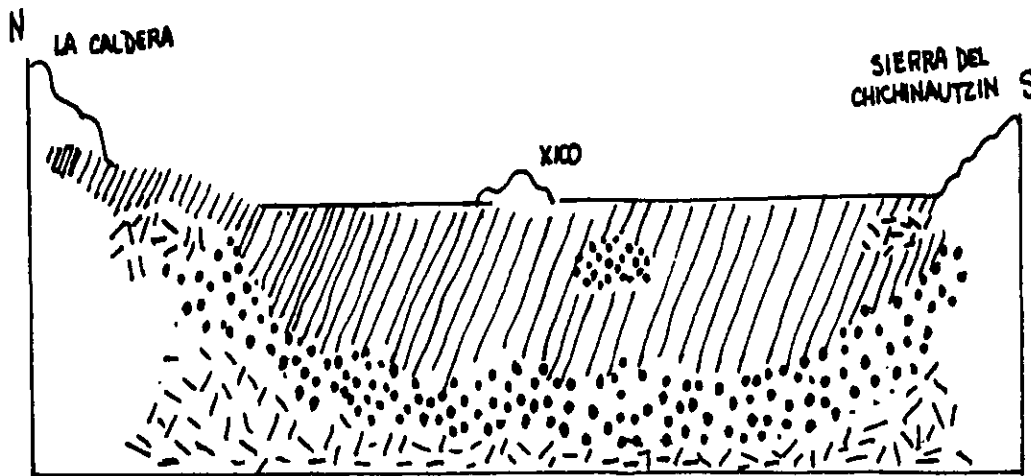


Figura 4.2. Corte geológico esquemático de N-S de la Subcuenca de Chalco (Rodríguez y González, 1989).
 Formación arcillosa // // // // //, material granular ::::: :::::, roca ígnea //-\ //-\.

4. Clima

De acuerdo a García (1981) la Cuenca de México presenta un clima (Cw) templado-subhúmedo con una temperatura media anual de 15 °C y una precipitación media anual de 700 mm, con lluvias escasas en el norte y noroeste.

El clima está determinado por sistemas atmosféricos tropicales y extratropicales, distinguiéndose así dos estaciones climáticas bien definidas: la época de secas, que comprende de noviembre a abril; y la época de lluvias, que comprende de mayo a octubre.

La Subcuenca de Chalco presenta una temperatura máxima anual de 25.5 °C, una temperatura mínima anual de 8.9 °C y una precipitación media anual de 754 mm (García, 1981).

5. Hidrología

El patrón hidrológico que presenta la cuenca ha cambiado debido a la explotación de los sistemas de acuíferos. Esto ha originado problemas tales como el hundimiento de la Ciudad de México, cambios en la mecánica del subsuelo, modificación de los cauces de los ríos, los cuales ahora se utilizan como drenajes de aguas residuales, sobreexplotación de acuíferos y disminución de infiltración de agua debido al crecimiento urbano (Guerra y Mora, 1989).

La Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) recibe el aporte de agua de una gran cantidad de ríos, muchos de los cuales en época de lluvias son los principales afluentes que bajan de la Sierra Chichinautzin al suroeste y poniente de la ciudad para la recarga de los acuíferos. En el norte el número de corrientes es menor dado que la precipitación en estos lugares es más baja.

El drenaje de la ZMCM es un sistema complejo combinado de aguas negras y pluviales que consta de canales de drenaje no revestidos, colectores semi-profundos revestidos y un sistema de drenaje profundo revestido; por el que se desalojan tanto las aguas residuales generadas en la ciudad como los escurrimientos superficiales producto de precipitaciones pluviales en la zona urbana (DDF, 1975).

6. Vegetación

En los alrededores de la Cuenca de México se observan una gran diversidad de especies vegetales, que se debe principalmente a las diferencias altitudinales y a la precipitación (Rzedowski y Rzedowski, 1979). La vegetación que predomina en la actualidad en la cuenca es: bosque de oyamel, bosque de pino y bosque de encino.

Debido a la variación topográfica y climática pero principalmente a la actividad antropogénica, actualmente la vegetación en la Zona de Chalco se limita a la vegetación secundaria del tipo de matorrales y manchones de encinos. Asimismo los cultivos que se practican en la región son: maíz, frijol, calabaza y pastos naturales (Melo y Oropeza, 1987).

7. Población

El crecimiento de la Ciudad de México es causa de una gran preocupación, no solo por las consecuencias sociales de esta inmensa concentración económica y la asimetría que representa con respecto al resto del país sino, también, por las consecuencias ecológicas (Ezcurra, 1992).

Una de las causas de la problemática que sufre la ZMCM ha sido su acelerado ritmo de incremento poblacional y la expansión de la mancha urbana a partir de la década de los cuarentas. La inmigración representa un problema de suma importancia ya que ésta es la que mantiene las altas tasas de crecimiento poblacional y no el crecimiento reproductivo de la población (Ezcurra, 1990).

Para el año 2000 la mancha urbana de la ciudad ocupará aproximadamente 2,500 km², el 92% de esa inmensa área urbana estará ocupada por edificios y calles, mientras que sólo el 6% de la misma serán parques y áreas verdes (Ezcurra, 1992). Así la Ciudad de México cambiará su mezcla de ambientes urbanos y rurales, que era su característica más típica durante la primera

mitad de este siglo, a un ambiente sobrepoblado, con una mínima área de espacios verdes o espacios públicos abiertos (Cabrera y Rodríguez, 1995).

Con el alto crecimiento demográfico de la ZMCM, se espera que la población llegue a 25 millones el año 2000. Lo anterior lleva a la ZMCM a la necesidad de crear un número de empleos semejante al que se encuentra en la actualidad en 12 años. Esto se refiere a una expansión de la planta industrial y de servicios de diversa índole en la zona, lo cual requerirá de una inversión considerable y el uso y agrandamiento territorial de la misma (Cabrera, 1990).

A nivel municipal se presentan diferencias considerables en el ritmo de crecimiento poblacional. Existen municipios con un fuerte crecimiento poblacional, tal es el caso del municipio de Chalco con un 14% con respecto a los principales municipios del Estado de México. La mayor parte de la población del municipio de Chalco es población urbana con un 97% y con un 3% de población rural (INEGI, 1990).

El municipio de Chalco tiene una población total de 282,940 y una participación económica total de 43.4%. El municipio que rodea el área de estudio es Ixtapaluca con una población total de 137,357 habitantes (INEGI, 1990).

En cuanto a servicios públicos, Chalco presenta un porcentaje de 28.6% con respecto al agua entubada, siendo este porcentaje uno de los más bajos con respecto al resto de los demás municipios del Estado de México. Chalco tiene un 23.7% de viviendas particulares con drenaje y un 94.7% con energía eléctrica, mientras que Ixtapaluca tiene un 71.2% de viviendas particulares con agua entubada, el 58.8% con drenaje y un 90.9% con energía eléctrica (INEGI, 1990).

8. Actividades Productivas

El proceso de industrialización en México empezó a partir de los años cuarenta, con el crecimiento acelerado del sector industrial. Desde 1930 y hasta la fecha, la Ciudad de México ocupa el primer lugar en concentración de la industria nacional. El estado de México ocupa el segundo lugar en importancia industrial a nivel nacional (Sistema Bancos de Comercio, 1976).

En 1980 fue notable la aparición de la industrialización en Chalco e Ixtapaluca, en el oriente de la mancha urbana, siguiendo el eje de la autopista a Puebla. En 1980 se censaron 138 establecimientos industriales en Chalco.

Las industrias más importantes dentro del municipio de Chalco son: la industria papelera, textil y electrónica; además se observan fábricas de gelatinas, detergentes y jabones, así como vinos y derivados lácteos. Estas descargan sus desechos residuales a los canales de drenaje que, en épocas de secas, es utilizada para riegos de cultivos como: alfalfa, poro, cebada y maíz (Cabrera y Rodríguez, 1995).

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1. Sitio de Muestreo

Se realizó una visita prospectiva por la Subcuenca de Chalco. Se identificaron y recorrieron diferentes canales de drenaje localizados alrededor de la zona rural, urbana e industrial.

Durante el recorrido de la zona urbana se observó la falta de servicios básicos, principalmente el drenaje, por lo que debido a la carencia de éste, las aguas residuales sin tratamiento previo, son vertidas a canales a cielo abierto. Asimismo, se pudieron detectar industrias de electrónicos, alimentos, papelera, textil, de pinturas y tintes, entre otras, algunas de ellas clandestinas. Las aguas residuales presentaron diferentes coloraciones, pero no se identificaron sus fuentes de origen, por lo que se asume que provienen de algún tipo de drenaje subterráneo, para salir posteriormente a la superficie.

Las observaciones anteriores permitieron ubicar el sitio de muestreo a un costado de la empresa Panasonic a 400 m de la autopista México-Puebla. La ubicación del sitio de muestreo se presenta en la Figura 5.1.

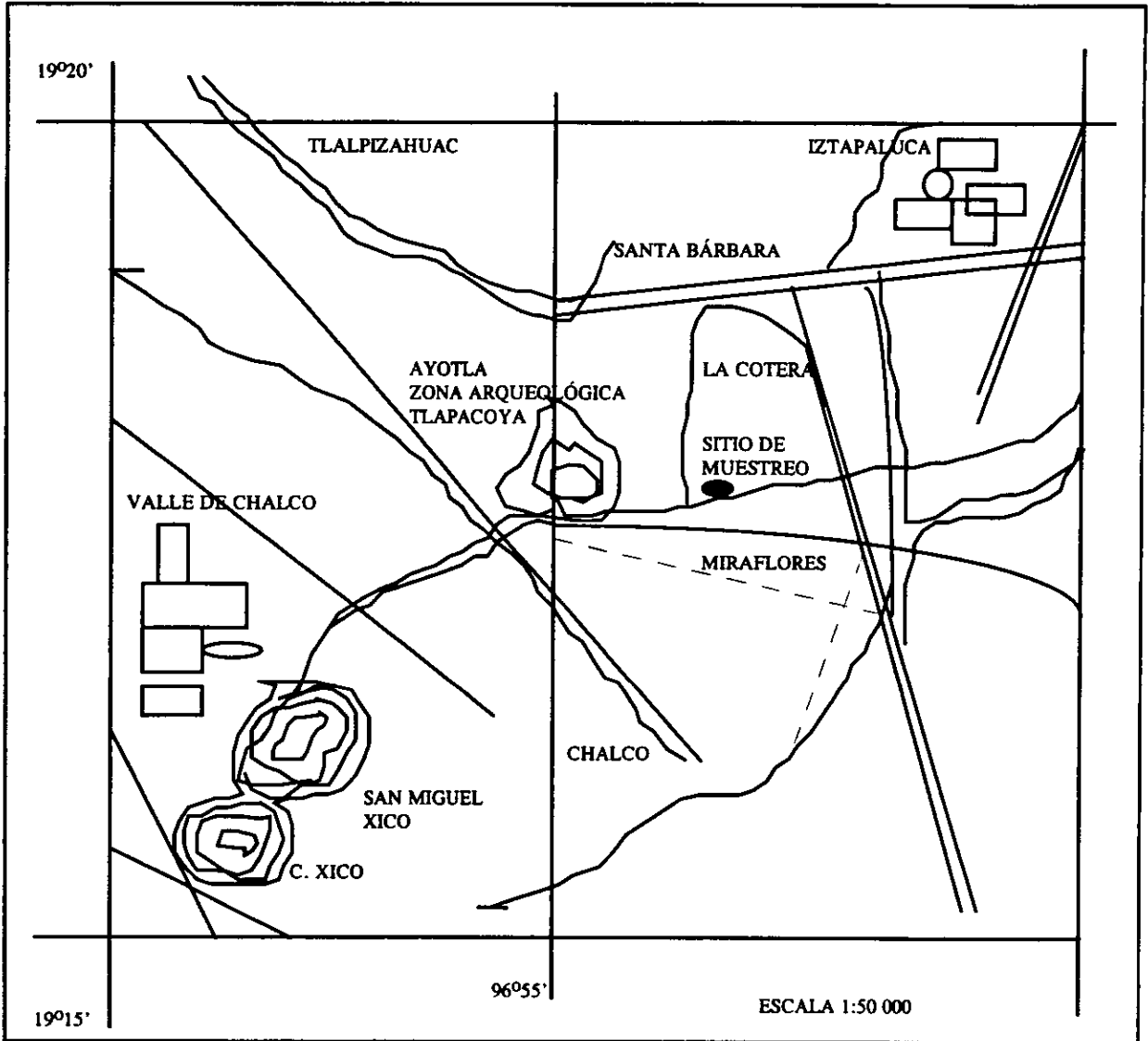


Figura 5.1. Ubicación del sitio de muestreo

2. Obtención de las Muestras

Para la extracción del núcleo de material geológico se utilizó un nucleador de barril, se armó un andamio y se acomodaron tablas de madera para que el muestreo se llevara a cabo a un ángulo aproximado de 42° con respecto a la horizontal, adyacente al canal (Figura 5.2.).

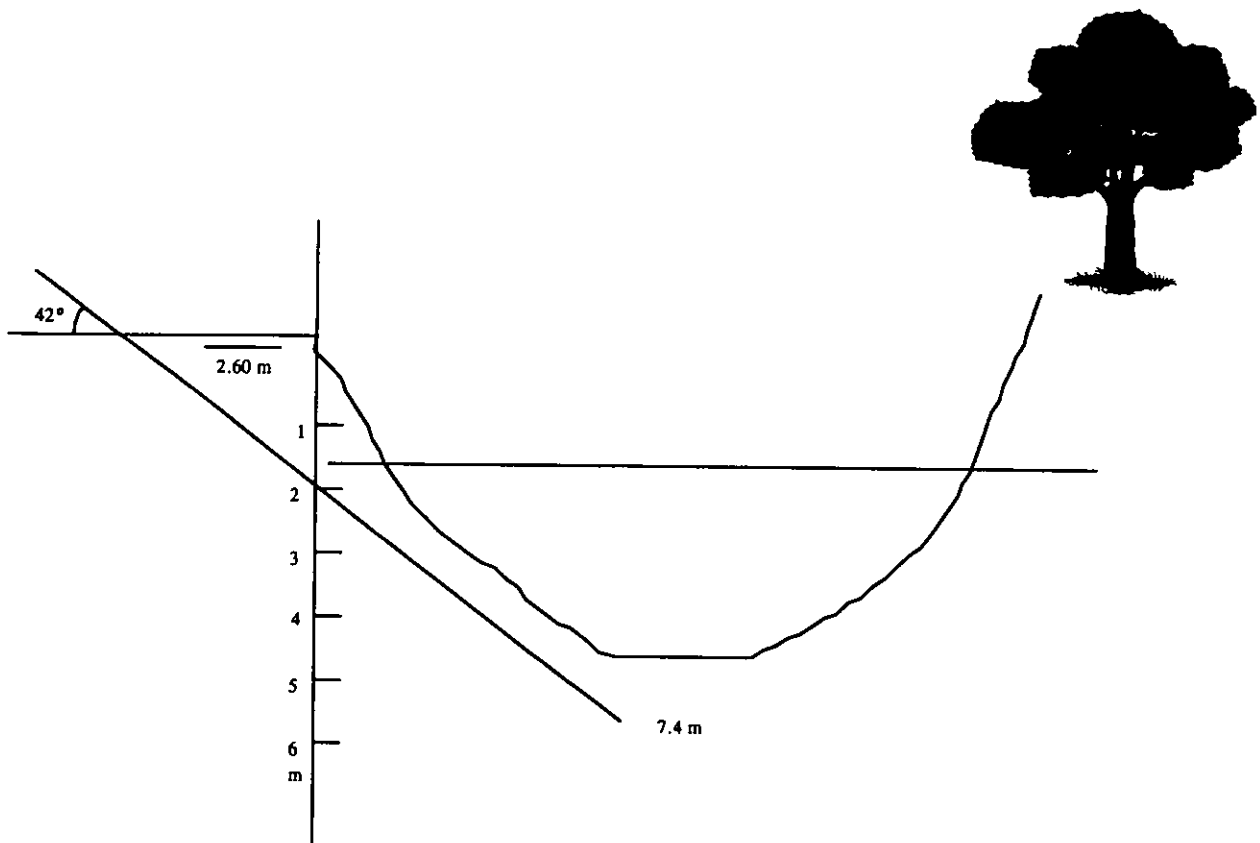


Figura 5.2. Perfil del canal y ubicación del núcleo

Se tomó un sólo núcleo de 7.4 m de longitud, equivalente a 5.5 m de profundidad vertical en diferentes tramos de 5 cm de diámetro. Una vez extraído, cada tramo se selló perfectamente en los extremos con tapones de plástico y se etiquetó. Todos los tramos se mantuvieron en hielo, para transportarlos al laboratorio y almacenarlos en un cuarto frío a 4°C hasta su uso. El núcleo fue dividido en secciones de diferente longitud para los diversos análisis. A cada una de las secciones se le asignó una letra en orden alfabético, con el fin de facilitar su identificación. La profundidad correspondiente se indica en la Tabla V.1.

TABLA. V.1. Identificación de las secciones de suelo estudiadas

MUESTRA	PROFUNDIDAD VERTICAL (m)	ALTURA DE LA SECCIÓN (cm)	PROFUNDIDAD VERTICAL PROMEDIO (m)	VOLUMEN DE LA MUESTRA (cm ³)
A	1.44 - 1.52	8	1.49	157.08
B	1.89 - 1.96	7	1.93	137.44
C	2.09 - 2.11	2	2.10	39.27
D	2.45 - 2.47	2	2.46	39.27
E	2.69 - 2.77	8	2.73	157.08
F	3.14 - 3.21	7	3.18	137.44
G	3.44 - 3.46	2	3.45	39.27
H	3.46 - 3.48	2	3.47	39.27
I	3.59 - 3.67	8	3.63	157.08
J	4.0 - 4.8	8	4.04	157.08
K	4.34 - 4.36	2	4.35	19.64
L	4.48 - 4.52	4	4.50	78.54
M	4.63 - 4.70	7	4.67	137.44
N	4.96 - 5.04	8	5.0	157.08
O	5.41 - 5.48	7	5.45	137.44
P	5.48 - 5.50	2	5.49	39.27

3. Caracterización Físicoquímica

Se cuantificó la cantidad de sólidos totales, fijos y volátiles de cada una de las muestras de suelo, de acuerdo con APHA (1990), con algunas modificaciones.

La cuantificación de materia orgánica se realizó mediante una modificación de la técnica de Walkey-Black, de acuerdo a Nelson y Somer (Carter, 1993). Debido a la gran cantidad de materia orgánica presente en el suelo se utilizaron 0.125 g de muestra. Las determinaciones se hicieron por duplicado y se corrió un testigo sin digestión. El carbono orgánico se obtuvo por cálculo a partir del contenido de la materia orgánica.

El porcentaje de humedad de las muestras de suelo, se realizó por gravimetría a peso constante en una estufa a 150 °C.

El pH se determinó según la técnica de Jackson (1982), con una proporción de agua:suelo de 1:10 (Aguilera, 1989; Allison, *et al.* 1985). El pH se midió con un potenciómetro Conductronic digital pH 20.

Se revisó la apariencia de las muestras basándose en su color, olor y consistencia del material geológico.

Se cuantificó la cantidad de nitrógeno amoniacal en las muestras que se tenían en mayor cantidad. Se utilizó la técnica de Jackson (Carter, 1993) y se realizó en un aparato BUCHI 323.

La textura se determinó por el método de densidades (Manual Serie 9, de la Universidad de Chapingo, 1966).

4. Caracterización Microbiológica

La cuantificación de los grupos tróficos anaerobios por la técnica del número más probable (NMP), así como la preparación de los medios de cultivo, transferencia de sustratos e inoculación se hicieron de acuerdo a las técnicas descritas por Hungate (1969) y Balch *et al.* (1979). Los grupos tróficos descritos fueron: bacterias fermentativas (F), sulfatorreductoras (SR), metanógenas acetoclásticas (A), metanógenas hidrogenófilas (H), acetógenas sintróficas productoras obligadas de hidrógeno a partir de ácido propiónico (ASP) y acetógenas sintróficas productoras obligadas de hidrógeno a partir de ácido butírico (ASB).

La proporción de CH₄ y CO₂ en el biogás, para la cuantificación indirecta de los grupos tróficos, se determinó en un cromatógrafo de gases (Fisher Gas Partioner modelo 1700) con detector de conductividad térmica, con doble columna (Porapak Q y Malla molecular 5A), helio como gas acarreador a un flujo de 25 ml/min. El volumen de muestra de biogás inyectado al cromatógrafo fue de 0.5 ml.

La cuantificación de bacterias heterótrofas aerobias, se realizó en dos medios de cultivo. En el primero se utilizó un medio preparado a partir de extracto de suelo (Carter, 1993), adicionando fuentes de nitrógeno y fosfatos (MES). El medio se esterilizó en autoclave a 125 °C y 1.05 kg/cm² de presión, enseguida se vació a cajas Petri estériles y se dejó solidificar. La inoculación y conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) se llevó a cabo de acuerdo a Carter (1993). Las cajas se incubaron en estufa a 25 °C, durante 48 horas. El otro medio para cuantificación de bacterias heterotróficas aerobias contenía peptona, extracto de levadura y glucosa (PYG) según formulación de Merck (No. de catálogo 1.05463). La incubación, inoculación y conteo se realizaron igual que para el caso anterior.

El conteo directo de microorganismos totales por medio de epifluorescencia, se realizó según APHA (1990) con apoyo del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.

Durante el tiempo que llevó el presente trabajo, las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C, en frascos de cristal con tapa de rosca y cubierta de teflón.

5. Enriquecimiento de cultivos degradadores de tolueno

Se cultivaron bacterias degradadoras de tolueno por medio de la técnica de enriquecimiento. Esta técnica consistió en colocar un gramo de suelo en 100 ml de medio mineral líquido (Robinson *et al.* 1989) con 100% de extracto de suelo y 50 µl de tolueno. Posteriormente, cuando se observó crecimiento se hicieron transferencias de 5 ml del sobrenadante a medio nuevo con concentraciones decrecientes de extracto de suelo y crecientes de tolueno. Estas operaciones se repitieron hasta llegar a 10% de extracto de suelo y 300 µl de tolueno. En la Figura 5.3 se muestra esquemáticamente el proceso de aclimatación y enriquecimiento. Los cultivos se incubaron en agitación a 26°C.

La cuantificación de bacterias degradadoras de tolueno, se realizó en medio mínimo sólido con 10% de extracto de suelo y 75 µl de tolueno. Las diluciones y la inoculación se realizaron igual que para los conteos en placa.

6. Cinéticas de degradación de tolueno a nivel de microcosmos

Las cinéticas de biodegradación de tolueno se realizaron en botellas serológicas de 160 ml. Cada botella se lavó previamente con acetona, hexano y metanol para quitar residuos de detergente y otros compuestos orgánicos. Después del lavado, se permitió la total evaporación de los solventes durante toda la noche en una estufa a 160°C.

A cada botella ya preparada se le agregaron 25 ml de medio mineral (Robinson *et al.* 1989) con 10% de extracto de suelo y se esterilizaron con calor húmedo. Cada botella se inoculó con 0.25 ml de cultivo y se agregaron 75µl de tolueno. Las botellas se incubaron a 26°C con agitación constante a 160 rpm durante el tiempo que duró cada prueba entre 10 y 15 días.

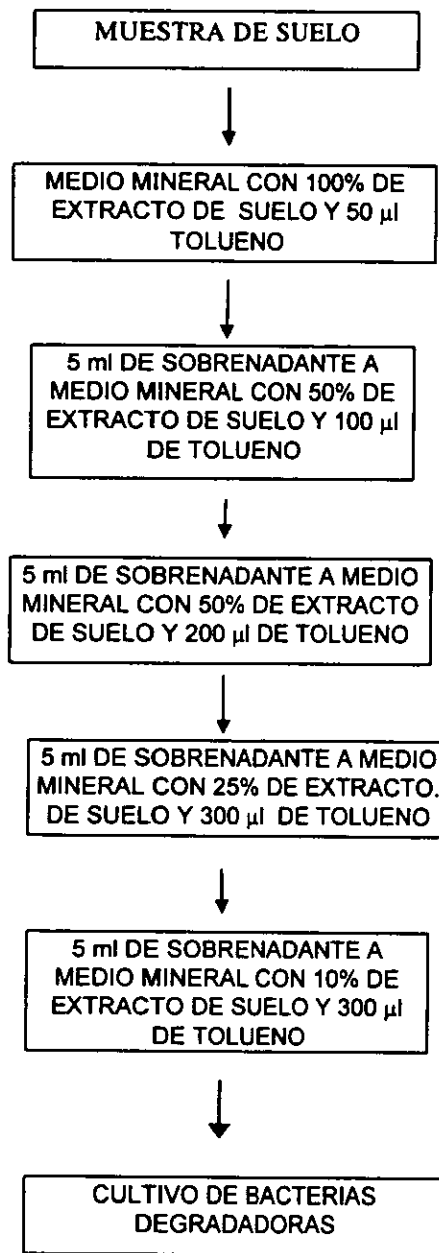


Figura 5.3. Procedimiento para la aclimatación y enriquecimiento de bacterias degradadoras de tolueno

La cantidad de tolueno agregada fue proporcional a la utilizada en la técnica de enriquecimiento de los cultivos. Se tomaron muestras aproximadamente cada 24 horas, sacrificando una botella cada vez.

La concentración residual de tolueno se determinó por cromatografía de gases con detector de ionización de flama mediante la técnica de “headspace”. Se utilizó un equipo marca VARIAN modelo 3350 con una columna capilar DB-1 de 60 m de longitud. Las condiciones fueron temperatura de inyector 250 °C, temperatura inicial de columna 40 °C, temperatura del detector 300 °C; se utilizó Helio como gas acarreador a un flujo de 1.3 ml/seg. Se adicionó una solución de cicloctano en metanol como estándar interno para la cuantificación. Las botellas se dejaron a baño maría con aceite mineral a 60 °C durante 1 hora para permitir el equilibrio de fases dentro de cada microcosmos y proceder a la cuantificación del tolueno en el “headspace”.

Se preparó una curva de calibración de tolueno en medio líquido, respetando los mismos volúmenes establecidos, para ello se agregaron diferentes volúmenes de una solución stock de tolueno en metanol. Los resultados obtenidos para la curva de calibración se muestran en la Tabla V.2.

Tabla V.2. Resultados obtenidos en el cromatógrafo para obtener la curva patrón

ppm	ml DE SOLUCIÓN STOCK AGREGADOS	AREA DE RESPUESTA
3000	1.43	241.9
2500	1.19	202.970
2000	0.954	153.838
1500	0.7156	116.4164
1000	0.477	80.0676
500	0.2385	46.4218
300	0.143	37.6502
100	0.0477	36.5983
40	0.02	33.9407
10	0.004	8.485

La solución stock de tolueno se preparó colocando en un matraz aforado de 25 ml metanol puro hasta 3/4 del volumen total del matraz y se aforó lo restante con tolueno. Los cálculos para sacar la concentración de la solución stock se realizaron tomando en cuenta el peso molecular de las soluciones y la diferencia de peso.

Después de cuantificar el tolueno residual de cada botella se tomaron muestras para medir pH y absorbancia, como medidas indirectas del crecimiento bacteriano y la actividad metabólica en los microcosmos.

7. Identificación de cepas degradadoras de tolueno

Después de realizar las cinéticas de degradación se procedió a la identificación de las cepas bacterianas que intervinieron en la degradación del tolueno. Esto se realizó sembrando primeramente en medio mínimo sólido con tolueno como único sustrato. Posteriormente, se picó una sola colonia de aquellas que, a simple vista, tenían una morfología diferente y se resuspendió cada una de éstas en 1 ml de solución salina estéril. Se tomó 0.1 ml de cada dilución y se sembró por separado a las mismas condiciones anteriores nuevamente en medio sólido con tolueno. Así se hizo sucesivamente hasta obtener crecimientos morfológicamente homogéneos en cada caso. Para asegurarse de que las cepas estaban puras se repitió la operación, pero sembrando ahora en cajas Petri con medio PYG. En los casos en los cuales se tuvo un crecimiento distinto en las cajas Petri se pincharon las colonias diferentes, se resuspendieron en 1 ml de solución salina y se sembraron igual que las otras bacterias en el medio mínimo sólido con un volumen menor de tolueno, 45 μ l. Una vez que se obtuvieron los cultivos puros, se les realizó tinción de Gram con los reactivos específicos de Sigma de México, para dicha técnica (No. de catálogo 541).

Posteriormente, la identificación se realizó con la técnica API 20 E para bacterias Gram negativas. Aquí se siguieron las instrucciones indicadas por la propia técnica (No. de catálogo 20 120).

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

1. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL MATERIAL GEOLÓGICO

A. Contenido de Sólidos

Se determinó la concentración de sólidos totales, volátiles y fijos en cada una de las muestras de suelo. El contenido de sólidos totales es la suma de la materia orgánica e inorgánica y está en función de la humedad. Los sólidos volátiles son una medida indirecta de la proporción de la biomasa y de la materia orgánica, mientras que los sólidos fijos representan el contenido de materia inorgánica. En la Tabla VI.1 se resumen los resultados obtenidos.

El contenido de sólidos totales fue bajo en la mayor parte de las muestras, esto se debe al alto contenido de humedad, por estar en la zona saturada del subsuelo del canal. En otros estudios realizados con suelos subyacentes a canales de aguas residuales en la subcuenca de Chalco (Cabrera y Rodríguez, 1995), se encontró una situación similar.

TABLA VI.1 CONTENIDO DE SÓLIDOS

PROFUNDIDAD (m)	PROFUNDIDAD (m)	SOLIDOS TOTALES (mg/g)	SÓLIDOS VOLÁTILES		SÓLIDOS FIJOS	
			(mg/g)	%	(mg/g)	%
A	1.49	651.9	74.81	11.48	577.09	88.52
B	1.93	646.9	45.38	7.01	601.52	92.98
C	2.10	472.0	93.75	19.86	378.25	80.14
D	2.46	745.0	64.4	8.64	680.60	91.35
E	2.73	409.5	83.23	20.32	326.27	79.67
F	3.18	427.5	87.73	20.52	339.77	79.48
G	3.45	468.6	80.75	17.23	387.85	82.77
H	3.47	505.7	98.66	19.5	407.04	80.49
I	3.63	273.6	148.35	54.32	124.75	45.77
J	4.04	260.8	47.85	18.35	212.95	81.65
K	4.35	657.5	36.33	5.52	621.17	94.47
L	4.50	542.7	47.21	8.7	495.49	91.3
M	4.67	481.2	43.38	9.02	437.82	90.98
N	5.0	664.4	24.4	3.67	640.0	96.33
O	5.45	476.9	29.3	6.15	447.6	93.85
P	5.49	448.5	31.0	6.91	417.5	93.08

Las muestras que se obtuvieron entre 2 y 4 m de profundidad identificadas como: C, E, F, G, H, I y J presentaron un mayor contenido de sólidos volátiles, dentro del intervalo de 19.5 a 54.32 %. En este caso particular se podría decir que la influencia del canal llegó a 4.04 m de profundidad. El porcentaje de sólidos volátiles para las muestras por debajo de 4 m se encontró en un intervalo entre de 3.67 a 9.02 %, con un promedio de 6.66 %.

El intervalo de sólidos volátiles fue alto en los primeros 4 m, esto sugiere un gran contenido de materia orgánica, que es aporte del agua residual. A la profundidad de 3.23 a 3.68 m el contenido de sólidos volátiles fue más alto, lo que concuerda con los estudios realizados por Cabrera y Rodríguez (1995).

B. Humedad

A excepción de las muestras A, B, D, K y L, todas las muestras se encontraron con un porcentaje de humedad superior al 50%, óptimo para favorecer la sobrevivencia de los organismos del suelo que, según Foth *et al.* (1980), es de 50 a 70%.

Los altos porcentajes de humedad, estarían indicando una infiltración del agua del canal hacia el subsuelo. Los porcentajes de humedad, así como el contenido de carbono orgánico se presentan en la Tabla VI.2.

TABLA VI.2. OTRAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL SUELO

MUESTRA	% HUMEDAD	% CARBONO ORGÁNICO
A	34.81	3.26
B	35.31	1.04
C	52.8	5.90
D	25.5	5.0
E	59.05	4.27
F	57.25	5.54
G	53.14	3.69
H	49.43	8.60
I	72.64	8.36
J	73.92	7.66
K	34.25	1.94
L	45.73	2.82
M	51.88	1.54
N	33.6	0.50
O	52.31	1.58
P	55.15	5.30

C. pH

El grado de acidez o alcalinidad en los suelos, como ya se mencionó, es de gran importancia ya que influye en gran medida sobre la actividad y abundancia relativa de los microorganismos presentes (Foth *et al.* 1980).

Los valores de pH obtenidos hacia la profundidad, se encontraron en un amplio intervalo de 3.9 a 8.7, sin seguir un patrón definido. Las muestras en el intervalo de pH de 6 a 8 podrían favorecer preferentemente el desarrollo de bacterias (Figura 6.1).

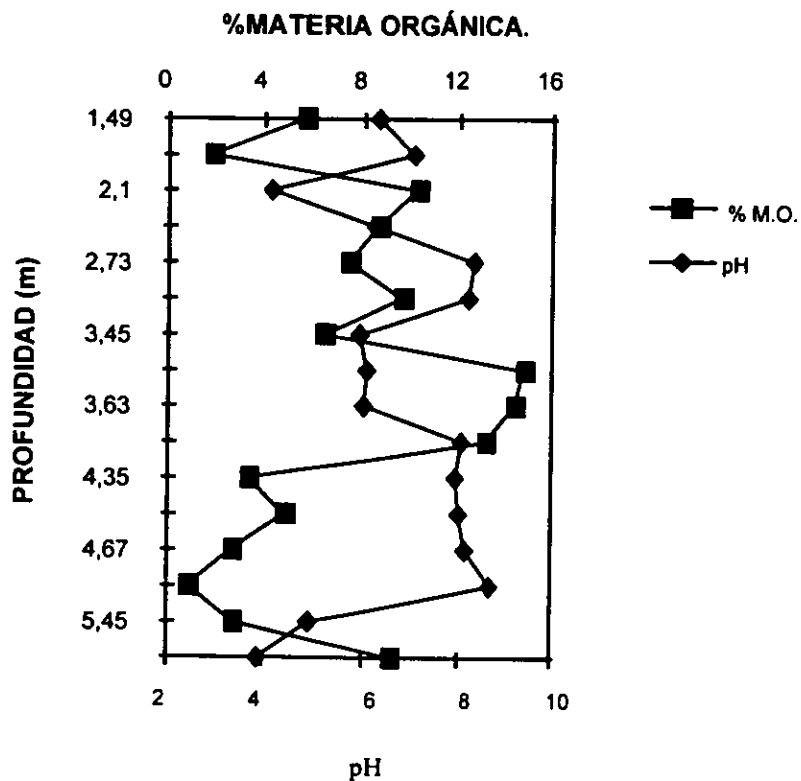


Figura 6.1. Perfil de materia orgánica y pH.

Las muestras provenientes de una profundidad entre 2.5 y 3.2 m, así como entre 4.5 y 5.0 m, caen dentro del pH característico de algunos suelos graníticos (Karsten y Ekendal, 1990) el cual es alrededor de 8.0, esto sugeriría que son suelos de arenosos a porosos. Lo anterior se confirmó con los análisis de textura de las muestras M y N, con los cuales se demostró que estos suelos son limo-arenosos.

Los valores típicos de pH en suelos de la zona vadosa de regiones semiáridas, son 7.4 a 7.9 según Frederickson (1994), en cambio las muestras analizadas en el presente trabajo tienen un pH muy variable, por lo que probablemente sea consecuencia de alguna actividad biológica promovida por los contaminantes presentes, incluyendo la materia orgánica del suelo.

El pH es determinante para la distribución de los microorganismos presentes en el suelo, de tal modo que, aunque el suelo tenga un contenido de humedad alto si el pH es muy ácido o muy

alcalino, los microorganismos pueden migrar a sitios más favorables para ellos con ayuda del agua que se infiltra en el subsuelo.

D. Materia Orgánica

La materia orgánica de los suelos se forma y acumula en ellos por incorporación de residuos de origen vegetal y animal, así como de cadáveres microbianos y productos de descomposición tanto de macro como de microfauna (Aguilera, 1989). En los análisis realizados se pudo observar que, entre 1.49 y 4.0 m de profundidad, las muestras contenían un porcentaje alto de materia orgánica superior al 6 %. Sin embargo, también podría estar jugando un papel importante el tipo de suelo, ya que aquel al ser arcilloso tiene un mayor contenido de materia orgánica. El tiempo en el cual se formaron las capas del suelo estudiadas y las condiciones ambientales que predominaban en dicha época, también está jugando un papel importante.

Se ha observado que tiende a haber una correlación entre el contenido de arcilla del suelo y el contenido de materia orgánica (Foth *et al.* 1980),. Mientras mayor es el suministro de agua combinado con nutrimentos, se favorece un mayor depósito de materia orgánica exógena en los suelos de textura más fina.

Estudios realizados en suelos subyacentes a canales de aguas residuales como El Gran Canal (García, 1999) y Río de los Remedios (Maya, 1999), mostraron un contenido de materia orgánica promedio de 12.7% para el primer sitio y un 10.9% para el segundo sitio, hasta una profundidad de 6.37 m, valores que son más altos comparado con las muestras del canal de Chalco.

E. Nitrógeno amoniacal

El contenido de nitrógeno amoniacal en las muestras de suelo varió entre 1 y 284 mg/kg. La muestra O a 5.45 m de profundidad, fue la única que tuvo la concentración de nitrógeno

amoniaco más cercana al contenido de un suelo típico el cual es de 300 mg/kg (Aguilera, 1989). La gran mayoría tuvieron un bajo contenido de nitrógeno amoniacal, como se observa en la Tabla VI.3.

TABLA VI.3 . CONTENIDO DE NITROGENO AMONIAAL

PROFUNDIDAD (m)	N-NH ₄ ⁺ (mg/kg)
A	1
B	145
E	2
F	8
I	7
J	81
M	35
N	168
O	284

F. Textura

La textura es una característica física muy importante del suelo, ya que de ésta van a depender las condiciones microambientales del suelo. Por ejemplo, la retención de agua disponible para la actividad biológica, la facilidad para la circulación del agua, capacidad para almacenar nutrimentos, filtración de sustancias, absorción y adsorción de componentes químicos y biológicos, de los cuales van a depender los microorganismos del suelo para su sobrevivencia.

Se determinó la textura de dos muestras, para la muestra M a 4.67 m de profundidad se obtuvo una composición de 48% de limo y 52% arena (Figura 6.2) y la muestra N a 5.0 m de profundidad, contenía 63% de limo y 37% de arena (Figura 6.3). Las características de la muestra M hacen que el suelo posea macroporosidad media, permeabilidad media,

almacenamiento de nutrimentos bajo y capacidad de retención de agua disponible baja. Estas condiciones físicas, desfavorables para los microorganismos, se reflejan en una humedad media, en un porcentaje de materia orgánica bajo, así como de sólidos volátiles. Para la muestra N el predominio de las partículas de limo le confiere inestabilidad estructural, apelmazamiento, susceptibilidad a formar costra superficial, deficiencia en el movimiento de agua, fertilidad física deficiente, velocidad de infiltración baja, erodabilidad alta y almacenamiento de nutrimentos medio. Estas características físicas son, también, desfavorables para las bacterias del suelo.

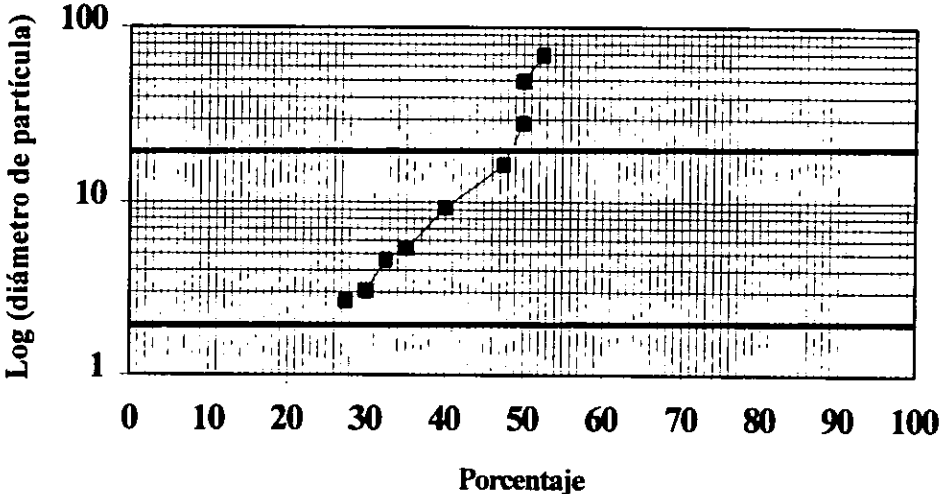


Figura 6.2. Determinación de textura para la muestra M a 4.67 m de profundidad

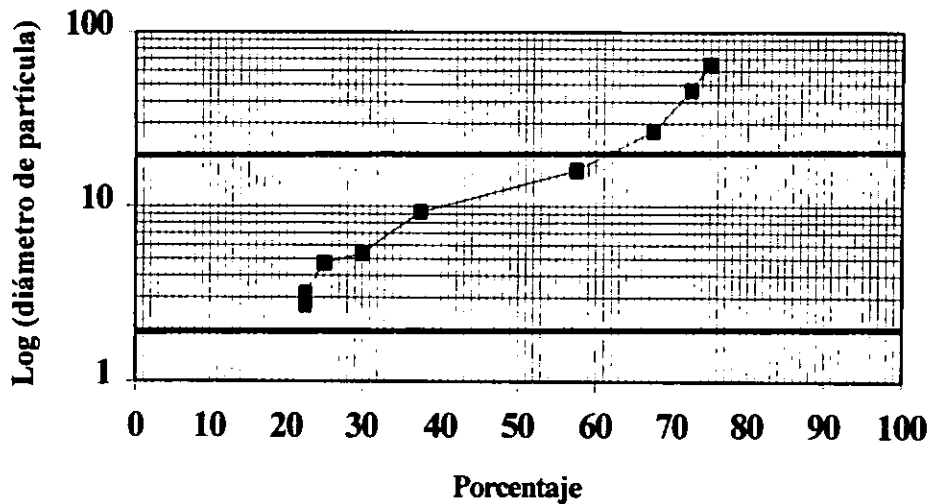


Figura 6.3. Determinación de textura para la muestra N a 5.0 m de profundidad

2. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA

Como ya se mencionó anteriormente, los organismos del suelo tienen gran importancia por su función atenuadora y el papel que dichos seres vivos pueden jugar es inherente al suelo. Las bacterias son los organismos más abundantes en número y clases (Foth *et al.* 1980) y su capacidad para asimilar una gran variedad de compuestos es muy grande, debido a su versatilidad bioquímica. Por ejemplo, las bacterias del género *Pseudomonas* sp. metabolizan una amplia diversidad de compuestos químicos, *Nitrobacter* sp. solamente es capaz de obtener energía de la oxidación de nitritos a nitratos. *Thiobacillus ferrooxidans* obtiene energía de la oxidación de compuestos sulfurosos reducidos y de iones hierro, en un pH óptimo de 2. *Clostridium* sp. es capaz de crecer en ausencia de oxígeno y puede obtener nitrógeno por la reducción de nitrógeno atmosférico (Wood, 1989).

Por el enfoque del trabajo realizado se cuantificaron únicamente las bacterias heterótrofas, en dos medios de cultivo, uno conteniendo fuentes complejas fácilmente degradables (PYG) y el otro un medio mineral con extracto de suelo (MES), que proporciona microelementos y materia orgánica soluble típica del suelo. En la Figura 6.4 se puede observar que el número de bacterias heterótrofas cuantificadas en el medio con extracto de suelo fue mayor que el de las bacterias que crecieron en medio PYG. Asimismo, se cuantificaron un mayor número de bacterias con el medio PYG en la capa de suelo superficial, probablemente porque las capas más profundas reciben un menor aporte de sustratos de fácil degradación.

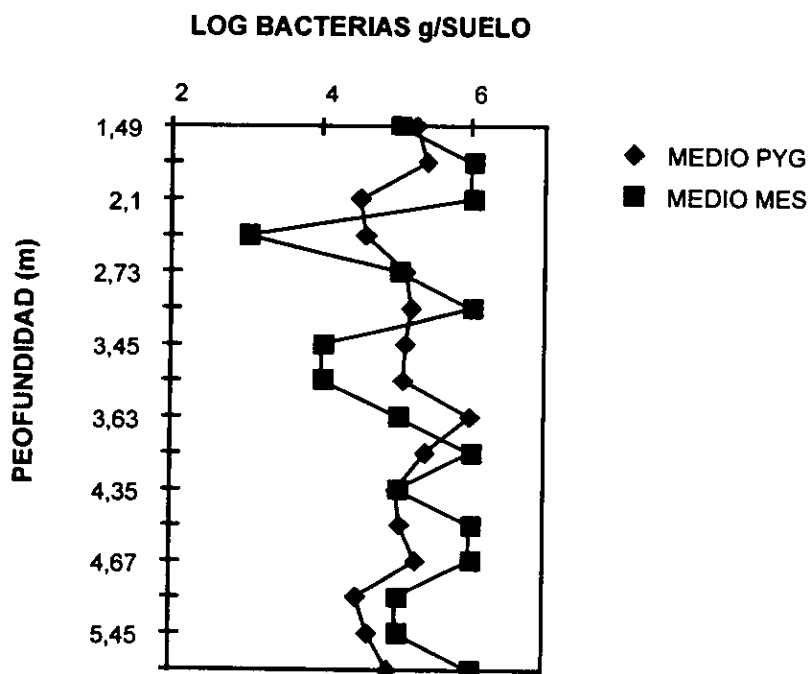


Figura 6.4. Perfil de distribución de bacterias heterótrofas.

Generalmente, en las capas superficiales de suelo el contenido de materia orgánica es mayor que en las capas profundas, por lo que las bacterias heterótrofas al necesitar compuestos orgánicos preformados, encuentran en estas capas las condiciones nutricionales adecuadas para su desarrollo, además del aporte de materia orgánica proveniente de las aguas del canal.

Aunque algunas muestras más profundas presentaron alto contenido de materia orgánica, ésta muchas veces puede no estar disponible para los microorganismos, ya que pasa a formar parte de la estructura del suelo. Así, entre más pequeñas son las partículas que están constituyendo el suelo su capacidad para retener materia orgánica aumenta (Aguilera, 1989).

A las profundidades de 2.10 m y 5.45 m se encontró un menor número de bacterias heterótrofas, cuantificadas con el medio PYG, ésto puede estar relacionado con el pH que resultó demasiado ácido a esas profundidades, así como a 4.35, 4.50 y 5.0 m de profundidad donde fue alcalino, alrededor de 8 o superior a este valor. Además, en estas últimas profundidades, otros factores parecen ser limitantes para la población de bacterias heterótrofas, como por ejemplo el bajo contenido de materia orgánica y de agua en el suelo. Se podría enfatizar que en estas profundidades los microorganismos son afectados por las condiciones de pH existentes en este tipo de suelo.

En las profundidades de 2.10 y 2.46 m, el contenido de materia orgánica fue alto así como el porcentaje de humedad, por lo que se esperaría que hubiese un mayor número de bacterias heterótrofas que las que se encontraron. Sin embargo, tal vez el suelo arcilloso no está dejando disponible la materia orgánica para los organismos, además de que la acidez del suelo, no favorece su sobrevivencia. Comparando los dos medios de cultivo se puede observar que existe una relación cuantitativa entre ellos. El hecho de haber encontrado un mayor número de bacterias con el medio MES, tal vez esté relacionado con los factores de crecimiento que muchas de ellas obtienen del suelo y que le son indispensables. En la Figura 6.4. se pueden comparar los perfiles obtenidos con los dos medios.

En la muestra O a 5.45 m de profundidad el contenido de materia orgánica bajo y el pH ácido, parecen ser los factores limitantes para el desarrollo de los microorganismos.

El contenido de nitrógeno amoniacal más alto correspondió a las profundidades de 5.0 y 5.45 m, sin embargo, el número de bacterias heterótrofas es bajo. Una explicación para la profundidad de 5.45 m, es que existen bacterias que son incapaces de crecer en medios

convencionales (Salle, 1975) porque son muy específicas. Dicha teoría podría estar apoyada por el alto porcentaje de sólidos volátiles encontrados a esa profundidad el cual fue de 55.56 %. Si existe un alto contenido de nitrógeno amoniacal en el suelo, se esperaría que el contenido de bacterias fuera también alto. Se podría pensar también que un pH demasiado alcalino como el que presenta la muestra N a 5.0 m de profundidad, podría ser un habitat poco favorable para este tipo de bacterias, aunado al bajo contenido de materia orgánica.

Las profundidades que presentaron el mayor número de bacterias heterótrofas, fueron las de 1.49 a 1.93 m; de 2.73 a 4.04 m; 4.67 y 5.49 m. También se observó que estos suelos presentaron un menor contenido de nitrógeno amoniacal, con excepción de la profundidad de 1.93 m. Lo anterior hace suponer una actividad de bacterias desnitrificantes y que, por ello, el nitrógeno contenido en estas muestras esté en forma de nitritos y de nitratos, sin embargo, eso no se pudo comprobar.

Las bacterias heterótrofas se encontraron en mayor número en las muestras A y B a profundidades de 1.49 y 1.93 m, respectivamente, las cuales corresponden a las capas de suelo más externas. Esto puede ser a causa de la filtración de agua residual del canal, la cual le estaría proporcionando a éste, materia orgánica óptima para el desarrollo de bacterias heterótrofas. Sin embargo, el contenido bajo de humedad en estas dos muestras puede ser causa de una filtración alta de agua la cual, a su vez, estaría también restringiendo la acumulación de materia orgánica. Con esto se podría deducir que el suelo de las muestras A y B, está constituido de una textura más gruesa que la de una arcilla.

Debido a la baja cantidad de materia orgánica en las capas más externas, el número alto de bacterias heterótrofas así como el bajo contenido de NH_4^+ , se puede pensar que es debido a que el canal de agua residual está proporcionando a los microorganismos carbohidratos de fácil degradación a través del agua que se está filtrando al subsuelo. Por ser estos carbohidratos más fácilmente asimilables para las bacterias, estas toman su fuente de energía del mismo y utilizan sólo los compuestos nitrogenados con fines plásticos, con lo cual disminuiría la producción de amoníaco y nitratos. Dado esto, sólo se llegaría a una concentración alta de amoníaco cuando

las bacterias no dispusieran de un carbohidrato de asimilación rápida (Salle, 1975). Así, la alta población bacteriana heterótrofa en las muestras de suelo más superficiales, puede explicarse por la materia orgánica que le está proporcionando el agua residual al suelo subyacente y que es fácilmente asimilable para las bacterias heterótrofas.

El crecimiento en medio mineral con extracto de suelo (MES), mostró un mayor número de bacterias heterótrofas. Una explicación es que algunas bacterias pueden necesitar factores de crecimiento que podrían sólo encontrar en el suelo (Paul y Clark, 1989). Aunque las bacterias heterótrofas cuantificadas con este medio, se encontraron en mayor número que las heterótrofas detectadas con el medio PYG, otra posibilidad sería que algunas de éstas sean quimiorganotróficas, es decir, que son heterótrofas facultativas (Paul y Clark, 1989), capaces de crecer a partir de la materia orgánica del suelo.

El número de bacterias heterótrofas evaluadas con el medio MES, no presentó una relación con la profundidad del suelo, más bien el contenido de dichos organismos fue variable en distintas profundidades. Tal vez los factores abióticos, así como los microambientes, son los factores más importantes que influyeron para la distribución de los organismos. Se ha visto que el contenido de microorganismos en el suelo varía, considerablemente, hasta de un centímetro a otro por la influencia de los microambientes que se pueden formar en el suelo (Foth *et al.* 1980).

Las bacterias, en su mayoría, se ven afectadas severamente por el pH ácido ya que este afecta su metabolismo, las más afectadas son las autótrofas (Foth *et al.* 1980). A las profundidades de 2.10 a 2.73, 3.45 a 3.63 y 5.45 m, en las cuales se presenta un pH ácido, se puede observar también que éstas presentan un menor número de bacterias heterótrofas. Sin embargo los suelos que presentaron mayor contenido de bacterias heterótrofas, tienen un pH neutro como el de la muestra B, o bien ligeramente alcalino, cercano a 8, como las muestras F, J, L y M. Para la muestra A, el bajo contenido de nitrógeno en forma amoniacal es el factor limitante para el crecimiento de los organismos, ya que el pH en este sitio se encontró cercano a la neutralidad. El bajo contenido de amoníaco puede deberse, como ya se mencionó anteriormente, a que las

bacterias autótrofas nitrificantes pueden utilizar rutas metabólicas más fáciles que bajan la producción de amoníaco en el suelo, lo que traería como consecuencia que la población de bacterias heterótrofas también bajara. El suelo N a 5.0 m de profundidad, a pesar de que presenta un alto contenido de nitrógeno, el número de organismos se ve inhibido debido a su pH elevadamente alcalino. En el caso del suelo P, las bacterias allí presentes podrían ser quimiorganotróficas, ya que estas presentan una mayor tolerancia a los valores de pH (Foth *et al.* 1980), además de que el contenido de materia orgánica así como el de nitrógeno amoniacal son muy altos.

En el presente trabajo, el número de bacterias cuantificadas tanto con medio MES como con medio PYG fue más alto en las capas superficiales de suelo que en las profundas. Debido a estos resultados, se puede decir que el ambiente predominante en el suelo es aerobio, ya que la abundancia de microorganismos va disminuyendo, en general, a medida que se profundiza (Salle, 1975), o bien, las bacterias son anaerobias facultativas.

La cuantificación de bacterias anaerobias, por la técnica del NMP, mostró una menor proporción en comparación con las aerobias. Sin embargo, el número de bacterias anaerobias estrictas, como las metanógenas a partir de H_2 y CO_2 , fue muy alto aunque no alcanzó la magnitud de las aerobias. Las bacterias hidrogenófilas que producen metano a partir de H_2 y CO_2 están en mayor proporción que las que lo producen a partir de acetato (Figura 6.5).

Los grupos bacterianos más representados en todas las profundidades fueron los pertenecientes a las bacterias fermentativas y metanógenas a partir de H_2 y CO_2 (Figura 6.6). Las bacterias OP (degradadoras del propiónico) y OB (degradadoras del butírico) fueron los grupos que se encontraron en menor proporción (Figura 6.7). Las degradadoras del acetato (A) y las formadoras de ácido sulfídrico(S) se encontraron en proporciones pequeñas, sólo encontrándose en mayor proporción en la capa de suelo más superficial. La distribución de las bacterias sulfatorreductoras se puede observar en la Figura 6.6 y la de las acetoclásticas en la Figura 6.5.

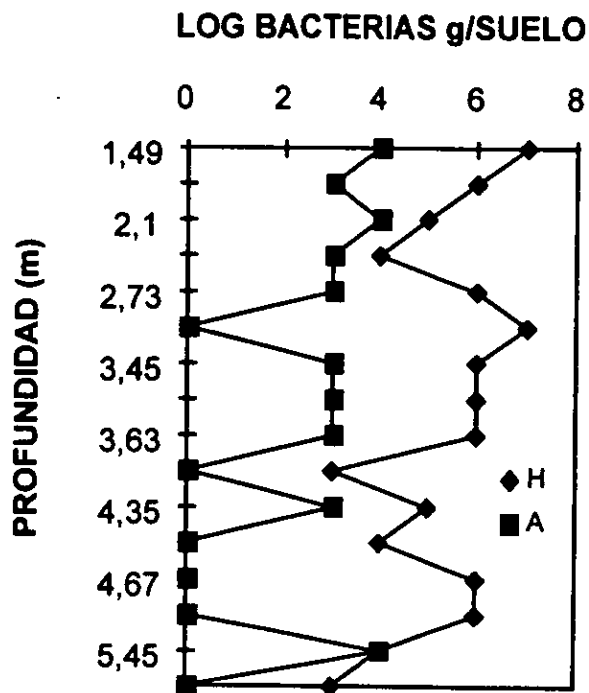


Figura 6.5. Perfil de distribución de bacterias hidrogenófilas (H) y acetoclásticas (A).

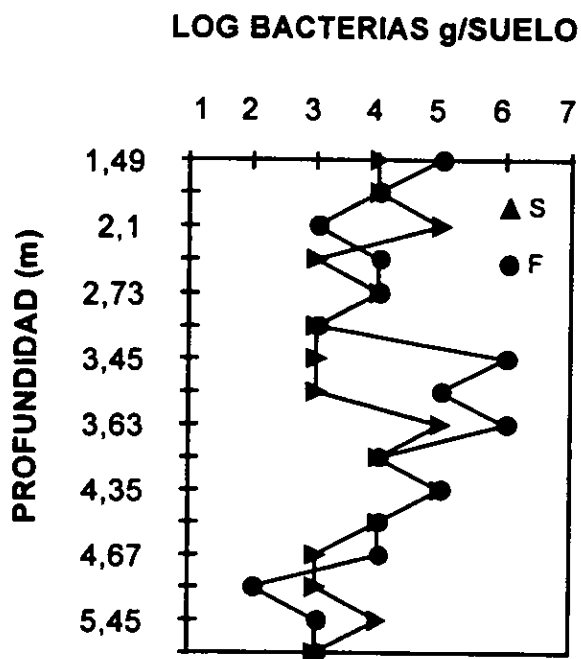


Figura 6.6. Perfil de distribución de bacterias sulfatorreductoras (S) y fermentativas (F).

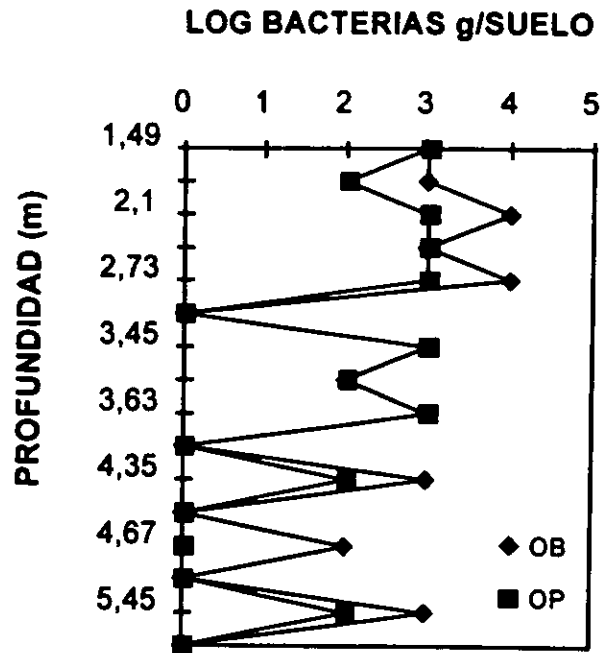


Figura 6.7. Perfil de distribución de bacterias utilizadoras de ácido butírico (OB) y propiónico (OP).

La muestra A de la profundidad 1.49 m, presentó en mayor proporción los seis grupos tróficos anaerobios, aunque en un número mayor se presentaron las bacterias fermentativas y las metanógenas. La gran cantidad de bacterias hidrogenófilas presentes en este suelo, estaría indicando que el ambiente predominante es anaerobio, ya que dichos organismos son anaerobios estrictos. Esto pudiera ser debido al ambiente saturado que le está proporcionando el canal de aguas residuales, lo cual no permite el libre paso del oxígeno.

El canal de agua residual que pasa por encima del suelo, puede tener una función de barrera física entre el suelo y la atmósfera, impidiendo el intercambio de oxígeno y, por lo tanto, favoreciendo que las condiciones anaerobias sean predominantes. Tal vez este fenómeno también esté provocando la disminución del contenido de NH_4^+ en las capas más superficiales de suelo, ya que las bacterias amonificantes se encontrarían muy reducidas en su población.

El papel de las bacterias fermentativas es romper moléculas orgánicas grandes o complejas como carbohidratos, lípidos y grasas, por lo que es lógico haber encontrado éstas en mayor

proporción en todas las muestras analizadas, ya que éstas estarían degradando la materia orgánica presente, de la cual una gran parte puede provenir de las aguas del canal. Se pudo observar que el patrón de crecimiento para las bacterias fermentativas fue similar al de las heterótrofas aerobias. Esto podría ser una prueba de que muchas de estas bacterias son facultativas. Los factores limitantes para este tipo de bacterias son el contenido de humedad bajo, el pH ácido o alcalino y el bajo contenido de materia orgánica.

En todas las muestras, excepto a la profundidad de 4.04 a 4.50 m, se encontraron en mayor número las bacterias formadoras de metano a partir de H_2 y CO_2 . Lo anterior se puede explicar por el alto número de bacterias fermentativas, las cuales están liberando hidrógeno y CO_2 a su entorno y, con ello, estarían proporcionando a las bacterias metanógenas los substratos adecuados para la producción de metano.

El alto número de bacterias sulfatorreductoras en el suelo, sugiere la presencia de sulfatos. Esto se explica porque en los análisis de agua residual del canal se encontraron hasta 270 mg/L de sulfatos.

A la profundidad de 4.04 a 4.50 m se presentó una población baja de bacterias hidrogenófilas, esto podría ser indicativo de un microambiente aerobio por alguna causa, ya que este tipo de bacterias, como ya se mencionó anteriormente, son anaerobias estrictas. También puede deberse a un bajo contenido de nutrientes.

Según lo indicado anteriormente, en muchas de las muestras se encontró un pH óptimo para la degradación anaerobia de la materia orgánica. No obstante, se sabe que de manera individual las bacterias acidógenas necesitan un pH entre 5.0 y 6.5 para poder desarrollarse, mientras que las bacterias metanógenas, que son más exigentes, requieren un valor mayor a 6.5 para favorecer su desarrollo (Villa, 1996). Tal vez debido a estos valores de pH, aunado a las condiciones predominantes en las distintas profundidades es que se encontró un mayor número de bacterias anaerobias estrictas como son las metanógenas.

El conteo directo de microorganismos por la técnica de anaranjado de acridina, mostró que el número de bacterias, en todas las profundidades, fue mayor al obtenido por los métodos de conteo en placa y NMP. Lo anterior se debe a que existen organismos no cultivables o incapaces de crecer en medios convencionales (Salle, 1975). Se observó también con esta técnica, que a la profundidad de 1.49 m existían fragmentos de microalgas lo que indicaría una filtración de materia orgánica desde el canal de agua residual. Asimismo, a la profundidad de 5.49 m también se observaron muchos filamentos que podrían pertenecer a hongos microscópicos, esta aseveración puede apoyarse en el hecho de del pH ácido de dicho suelo, el cual favorece al crecimiento de los hongos.

La gran mayoría de los microorganismos observados al microscopio se tiñeron de color verde, lo que indicaría que estos se encontraron metabólicamente inactivos (Byrd y Colwell, 1992). Sólo una minoría y no en todas las profundidades, se tiñó de color anaranjado, lo que estaría indicando bacterias metabólicamente activas. Sin embargo, el color de la tinción depende, entre otras cosas del pH. El suelo más superficial (1.49 m) fue el único en donde se observaron bacterias en bipartición. Tal vez se debe a que ésta es la más superficial y, por lo tanto, la que está más en contacto con la materia orgánica que le llega del canal de agua residual, el que su pH esté casi en la neutralidad y por tener una temperatura mesófila, proporcione un habitat óptimo para el desarrollo y reproducción de los microorganismos.

Según las definiciones de Paul y Clark (1989) para organismos autóctonos y zimogeneos, se podría decir que la mayoría de los organismos que habitan a grandes profundidades son autóctonos, ya que su número va disminuyendo conforme avanza la profundidad. Esto nos permite asumir que crecen lentamente en los suelos que no contienen substratos fácilmente oxidables, ya que sólo se estaría hablando de organismos zimogeneos a aquellos que crecen en los suelos más superficiales, como son las muestras A, B y C; o en los que pueden recibir agua por pequeñas filtraciones por fracturas.

En los suelos superficiales se habla de organismos zimogeneos debido a que fueron las que presentaron la mayor población en la que muchos de ellos mostraron una gran actividad como

los de la muestra A. Esto puede ser lógico si se considera que el canal de agua residual les proporciona un habitat adecuado para vivir.

3. ENRIQUECIMIENTO DE CULTIVOS DEGRADADORES DE TOLUENO

Aclimatar a los organismos capaces de utilizar tolueno como fuente de carbono y energía, tomó 5 meses de trabajo, en donde los microorganismos se sometieron a concentraciones crecientes de tolueno, empezando con 50 μ l de tolueno y terminando con 300 μ l. Lo anterior se hizo porque cuando se intentó cuantificar al principio las bacterias degradadoras de tolueno, el crecimiento fue casi nulo, por lo que se optó por hacer una aclimatación.

Después de los 5 meses de aclimatación se obtuvieron crecimientos de hasta 7.6×10^6 ufc/ml de cultivo para las muestras provenientes de profundidades de 4.04 m y 5.45 m. El perfil del crecimiento obtenido, después de la aclimatación de las bacterias, se muestra en la Figura 6.8.

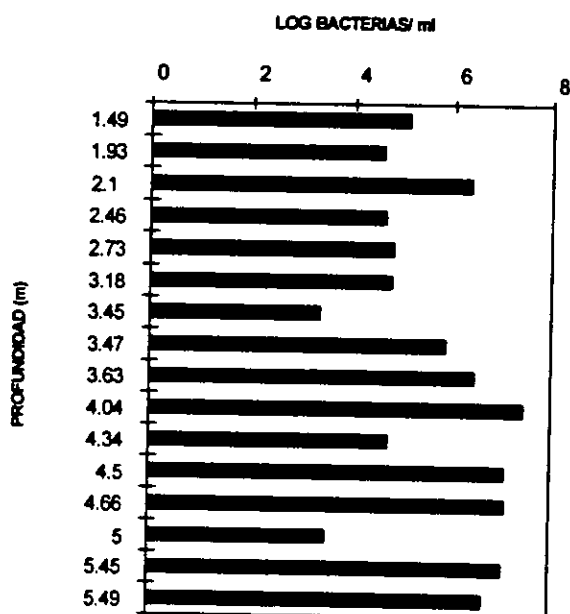


Figura 6.8. Cuantificación de bacterias degradadoras de tolueno en los cultivos de enriquecimiento.

En las profundidades de 2.10, 3.47 a 4.04 y 5.45 a 5.49 m, se obtuvo el mayor crecimiento de bacterias degradadoras de tolueno. En estas mismas muestras se había observado un gran contenido de humedad, de sólidos volátiles y de materia orgánica. Estas condiciones predominantes en su habitat pudieron ser favorables para que las bacterias fueran capaces de metabolizar el tolueno

4. PRUEBAS DE BIODEGRADACIÓN DE TOLUENO EN MICROCOSMOS

Después de haber obtenido cultivos enriquecidos con capacidad para desarrollarse en medios con tolueno como única fuente de carbono, se seleccionaron los cultivos provenientes de las muestras identificadas como A, I, K, y L para realizar las pruebas de biodegradación, ya que estos presentaron una mayor turbiedad, la cual se asoció con un mayor crecimiento.

El cultivo proveniente de la muestra A, la más superficial a 1.49 m de profundidad, mostró la mayor actividad de todos los cultivos. En este caso se partió de una concentración de tolueno de 2600 ppm la cual en 16 días, alcanzó una eliminación del 86.5% (Figura 6.9.).

Con el cultivo de la muestra I, proveniente de una profundidad de 3.59 a 3.67 m, mostró un porcentaje de eliminación de tolueno de 70.28% en diez días (Figura 6.10). Cabe mencionar que en las muestras originales I y K se encontró un alto contenido de materia orgánica y, en el caso del cultivo enriquecido de la muestra I, también una gran cantidad de bacterias degradadoras de tolueno.

En el caso del cultivo de la muestra K (4.34-4.36 m) se alcanzó una eliminación de tolueno del 88.25 %, también en diez días, aunque, aparentemente, este cultivo fue más activo pues el porcentaje de eliminación referido se alcanzó en un menor tiempo (Figura 6.11).

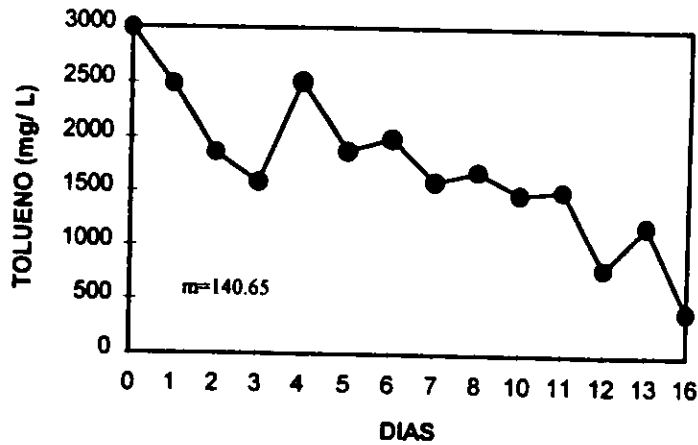


Figura 6.9. Biodegradación de tolueno a partir de un cultivo proveniente de la muestra A.
 Profundidad 1.44-1.52 m. Eliminación de tolueno 86.5%.
 Concentración de tolueno en el testigo de fuga 3186 mg/L al final del experimento.

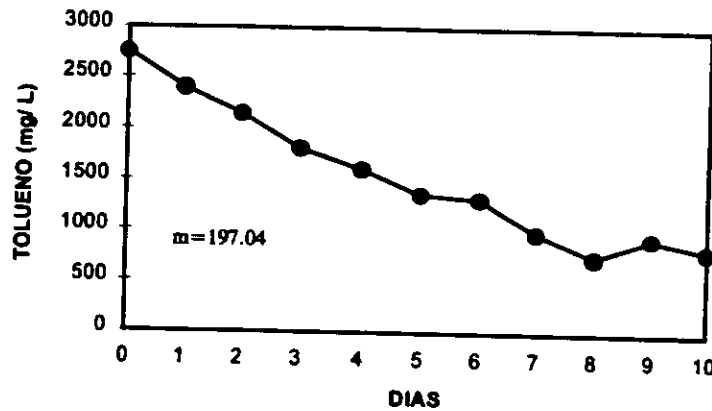


Figura 6.10. Biodegradación de tolueno a partir de un cultivo proveniente de la muestra I.
 Profundidad 3.59-3.67 m. Eliminación de tolueno 70.28%.
 Concentración de tolueno en el testigo de fuga 2784 mg/L al final del experimento.

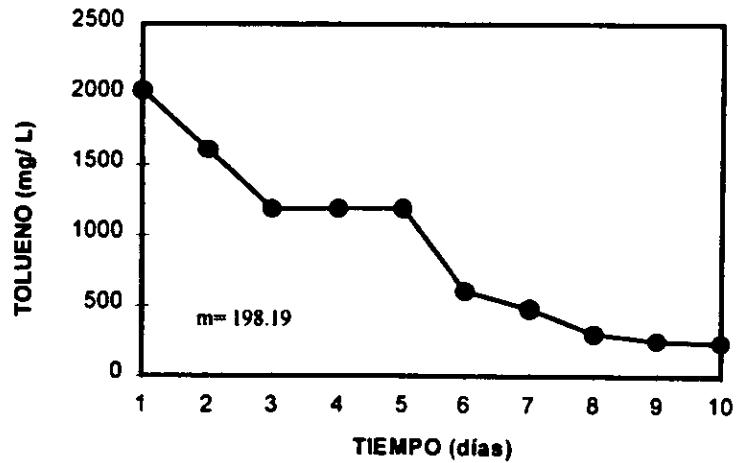


Figura 6.11. Biodegradación de tolueno a partir de un cultivo proveniente de la muestra K.
Profundidad 4.34-4.36 m. Eliminación de tolueno 88.25%.
Concentración de tolueno en el testigo de fuga 1956 mg/L al final del experimento.

La muestra L mostró una menor actividad en comparación con los otros 3 cultivos. Tal vez la capacidad de degradación de este cultivo disminuyó por el rápido consumo de oxígeno en la etapa inicial del experimento por lo que, al agotarse éste, el sistema ya no funcionó bien. La eliminación de tolueno fue muy lenta, alcanzando un 72% al final de 20 días. Esto se puede observar en la Figura 6.12.

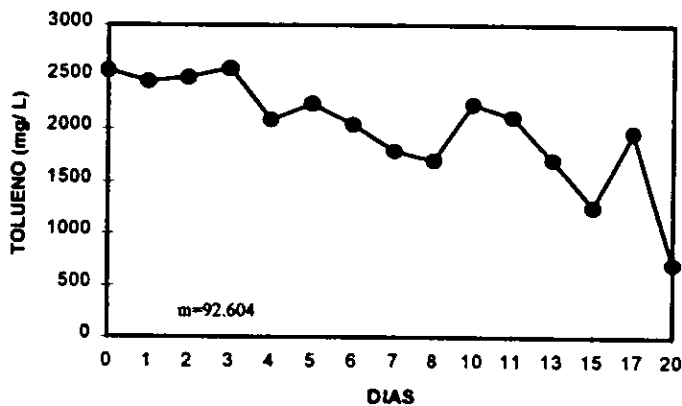


Figura 6.12. Biodegradación de tolueno a partir de un cultivo proveniente de la muestra L.
Profundidad 4.48-4.52 m. Eliminación de tolueno 72.69%.
Concentración de tolueno en el testigo de fuga 3125 mg/L al final del experimento.

En todos los cultivos se pudo observar una pérdida gradual del tolueno. Sin embargo, este no se consumió en su totalidad, ya que el máximo de eliminación alcanzado en los microcosmos fue del 88.25%. El hecho de que no se consumiera totalmente el tolueno pudo haber sido a una limitación de oxígeno en el sistema, ya que, en todo el tiempo de incubación, a las muestras no se les suministro oxígeno extra. El único oxígeno disponible para los microorganismos fue el que se quedó en el interior de las botellas antes de sellarlas al inicio de cada experimento. Esto tiene fundamento, ya que para que la degradación del tolueno se lleve a cabo, primero se tiene que abrir el anillo aromático y esto solo se puede hacer en presencia de oxígeno. La degradación se podría realizar en condiciones anaerobias siempre y cuando hubiesen otros aceptores de electrones (Alexander 1994 a), sin embargo, la degradación anaerobia no fue interés de este trabajo.

Otro que apoya que la limitante en el sistema fue el oxígeno, son los trabajos realizados con biodegradación de BTEXs con los cuales se llega a un 100% de eliminación de los contaminantes debido a que, en este caso, se estuvo inyectando oxígeno puro durante los experimentos (Alvarez y Vogel, 1991). Una limitación de oxígeno no permite que las bacterias sigan su crecimiento y por lo tanto la degradación ya no se lleva a cabo. Esto se ha observado en varios casos en donde se limita el oxígeno, y otros nutrimentos esenciales para el crecimiento se agotan.

La variación de la concentración inicial de tolueno en las distintas muestras, fue una consecuencia de la volatilización del tolueno durante la preparación de los microcosmos. Sin embargo, una vez dentro de las botellas no se presentó fuga de éste, ya que los testigos de fuga presentaron una concentración tolueno casi idéntica a la concentración inicial de cada experimento.

Considerando la cantidad inicial de inóculo agregado a los microcosmos, que fue de 0.25 ml, fue menor que en otros estudios donde se ha utilizado un mayor volumen (10 ml y 5 ml de inóculo en 50 ml de medio mineral), por lo tanto en esos casos la degradación ha sido más rápida (Ridgway *et al.* 1990; Alvarez y Vogel 1991).

Con la intención de conocer más respecto a los cambios que se dieron en los microcosmos durante las pruebas de biodegradación, se llevaron registros de la absorbancia como una medida indirecta del crecimiento bacteriano, además de la variación del pH como una respuesta de la actividad metabólica.

En las gráficas de variación de absorbancia, Figuras 6.13, 6.14 y 6.15, correspondientes a los cultivos provenientes de las muestras A, K y L, respectivamente, se pudo observar una lectura máxima de absorbancia de 0.09. Las variaciones en las lecturas son consecuencia de las dos fases que se forman en los microcosmos, una fue la del medio líquido y otra, las bacterias que se depositan en la superficie por efecto del tolueno residual que tiende a mantenerse en la superficie y en las paredes.

En las tres figuras se puede apreciar el incremento en la absorbancia hacia el final de las pruebas, que coincide con el menor efecto de la insolubilidad del tolueno debido a que hay una menor concentración de este y, por tanto, las muestras son más homogéneas.

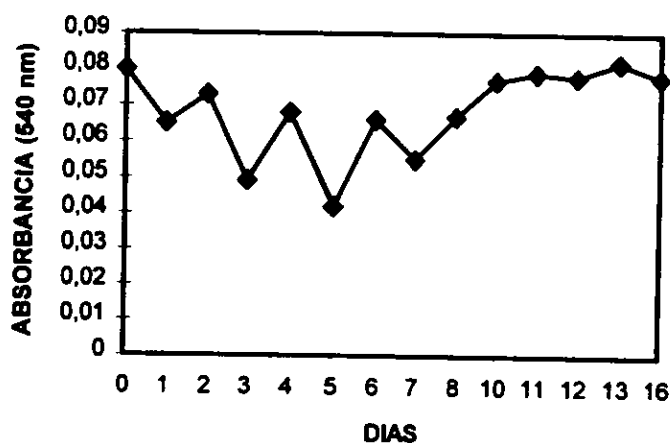


Figura 6.13. Variación de la absorbancia a 540 nm durante la biodegradación de tolueno a partir del cultivo enriquecido de la muestra A proveniente de 1.44-1.52 m.

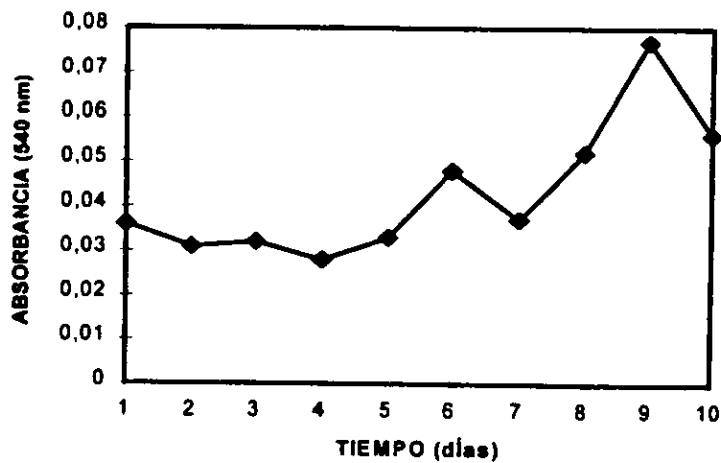


Figura 6.14. Variación de la absorbancia a 540 nm durante la biodegradación de tolueno a partir del cultivo enriquecido de la muestra K proveniente de 4.34-4.36 m.

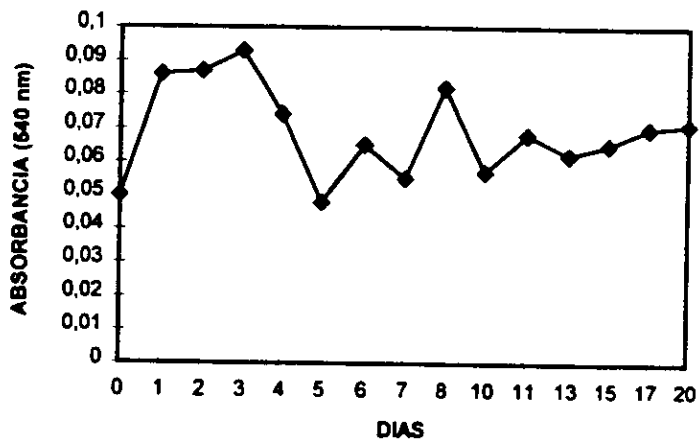


Figura 6.15. Variación de la absorbancia a 540 nm durante la biodegradación de tolueno a partir del cultivo enriquecido de la muestra L proveniente de 4.48-4.52 m.

El pH durante las pruebas de biodegradación mostró un valor inicial de 7.2 y conforme, pasó el tiempo, descendió hasta valores cercanos a 6, como se observa en las Figuras 6.16, 6.17 y 6.18. Este comportamiento se repitió en las pruebas para los cultivos de las muestras A, K y

L, respectivamente. La acidificación del medio se puede explicar de dos formas, una es que, debido a la falta de oxígeno, la degradación al final no llegó hasta la completa mineralización del tolueno, con la subsecuente acumulación de ácidos tricarbónicos, los cuales son un paso intermedio antes de llegar hasta fosforilación oxidativa. Otra explicación podría relacionarse con la acumulación de ácido carbónico, el cual se forma al interaccionar el agua con el dióxido de carbono, que se genera como biogás por los microorganismos en las fases iniciales de la biodegradación. Esta acumulación de ácido carbónico en el sistema también pudo acidificar el medio.

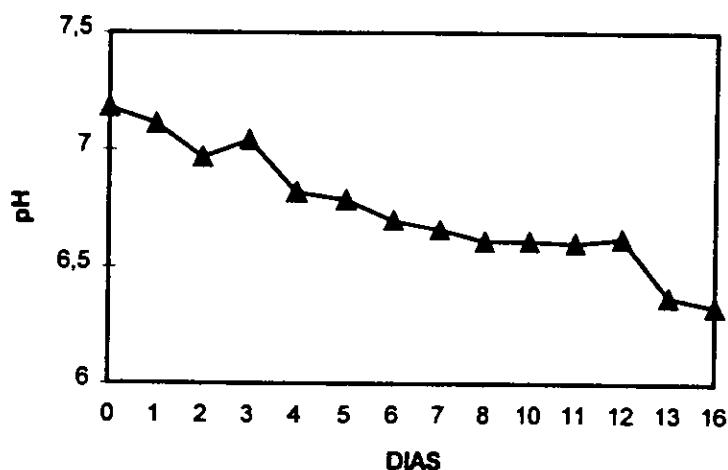


Figura 6.16. Variación del pH durante la biodegradación de tolueno a partir del cultivo enriquecido de la muestra A (profundidad 1.44-1.52 m)

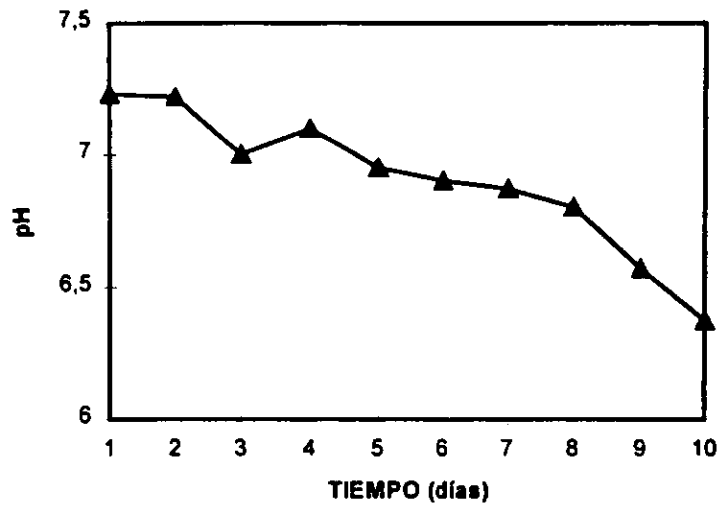


Figura 6.17. Variación del pH durante la biodegradación de tolueno a partir del cultivo enriquecido de la muestra K (profundidad 4.34-4.36 m)

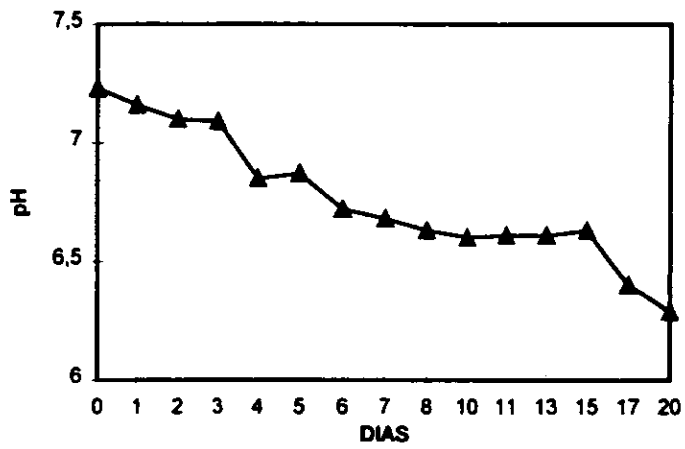


Figura 6.18. Variación del pH durante la biodegradación de tolueno a partir del cultivo enriquecido de la muestra L (profundidad 4.48-4.52 m)

5. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE TOLUENO

Una vez terminadas las pruebas de biodegradación de tolueno, se procedió a la identificación de las especies bacterianas involucradas. En la Tabla VI.4. se presentan los resultados obtenidos.

Como se puede observar, las especies aisladas de los cultivos bacterianos, pertenecieron al género de las *Pseudomonas*, en algunos casos fue posible conocer la especie aunque con un alto porcentaje de incertidumbre. Las pruebas realizadas con los cultivos de las profundidades a 3.63 m y 4.35 m mostraron las mismas especies de bacterias. Podría pensarse que tal vez estas especies de bacterias tengan una mayor capacidad para degradar tolueno que las otras, en donde la cinética de biodegradación tomó más tiempo.

Tabla V.I.4. Identificación de las cepas degradadoras de tolueno obtenidas por enriquecimiento

CEPA	MORFOLOGÍA	TINCIÓN GRAM	CRECIMIENTO EN PLACA	IDENTIFICACIÓN
MUESTRA A	Bacilo	Negativa	Puntiforme de color blanco	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MUESTRA A	Bacilo	Negativa	Puntiforme de color blanco	<i>Pseudomonas sp.</i>
MUESTRA I	Bacilo	Negativa	Amiboide de color amarillo	<i>Pseudomonas cepacia</i>
MUESTRA I	Bacilo puntiagudo	Negativa	Circular de color amarillo	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>
MUESTRA K	Bacilo	Negativa	Puntiforme de color amarillo	<i>Pseudomonas cepacia</i>
MUESTRA K	Bacilo puntiagudo	Negativa	Circular de color amarillo	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>
MUESTRA K	Bacilo	Negativa	Puntiforme color transparente	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
MUESTRA L	Bacilo	Negativa	Puntiforme de color amarillo	<i>Pseudomonas cepacia</i>
MUESTRA L	Bacilo	Negativa	Puntiforme de color blanco	<i>Pseudomonas sp.</i>

CONCLUSIONES

- La influencia del canal sobre el suelo y subsuelo parece alcanzar los 4 m de profundidad.
- Se observó una importante heterogeneidad en las características fisicoquímicas del material geológico.
- El alto porcentaje de humedad del material geológico ayudó a la sobrevivencia de la microflora presente.
- La distribución de bacterias fue uniforme, lo cual no mostró relación con el pH y el contenido de materia orgánica.
- La mayor parte de la población microbiana autóctona no mostró actividad metabólica.
- A través de la técnica de enriquecimiento se logró el desarrollo de bacterias degradadoras de tolueno, lo cual pudo comprobarse con las cinéticas de biodegradación.
- Se obtuvieron altos porcentajes de biodegradación de tolueno para los cultivos enriquecidos provenientes de 4 profundidades diferentes.
- Las cepas degradadoras identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. fluorescens/putida*, *P. pseudomallei* y *Pseudomonas sp.* se encontraron asociadas en consorcios microbianos.
- El subsuelo del canal en estudio no tiene capacidad de atenuación natural sobre los contaminantes que migran desde la superficie, a menos que se promueva una mayor actividad degradadora.

RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS

- Una vez comprobada la capacidad degradadora de las bacterias, probar la efectividad de las cepas para degradar otros tipos de contaminantes, ya que muchos de estos tienen una estructura química similar y la variedad de contaminantes, así como los sitios contaminados es muy amplia.
- Se podría profundizar la investigación para conocer el potencial de las especies bacterianas aisladas e identificadas en los consorcios para degradar diferentes hidrocarburos monoaromáticos.
- Investigar la existencia de asociaciones mutualistas entre las especies identificadas en los consorcios bacterianos.
- Investigar los métodos adecuados de preservación para las cepas degradadoras aisladas, para cuando se produzcan a gran escala éstas no pierdan su capacidad degradadora hasta el momento de su utilización.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar A., 1995. *Retos y oportunidades de la ciencia del suelo en el siglo XXI*. Tierra (México) 13 (1): 3-16.
- Aguilera N., 1989. *Tratado de edafología de México: Tomo I*. Facultad de Ciencias, UNAM, 221 p.
- Alexander M., 1994 a. *Introducción a la microbiología del suelo*. AGT Editor, México, 491 p.
- Alexander M., 1994 b. *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press, USA, 302 p.
- Allison L. E., Bernstein L., Bower C. A., Brown J. W., Fireman M., Hatcher J. T., Hayward H. E., Pearson G. A., Reeve R. C., Richards L. A. and Wilcox L. V., 1985. *Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos*. LIMUSA, México, 18 p.
- APHA-AWWA-WPFC, 1990. *Standard methods for examination of water and wastewater*. 16 th edition. American Public Health Asociation, Washington D.C. 1268 p.
- Athié M., 1987. *Calidad y cantidad del agua en México*. Fundación Universo Veintiuno, A.C. México: 152 p.
- Balch W. E., Fox G. E., Magrum L. J. and Wolfe R. S., 1979. *Methanogens: reevaluations of a unique biological group*. Microbiol. Rev. 43. 260-296 p.

- Bauer E. J. y Capone D. G., 1988. *Appl. Environ. Microbiol.* 54. 1649-1655.
- Bellia S., Cusimano G., González M. T., Rodríguez C. R. y Gunta G., 1992. *El valle de México. Consideraciones preliminares sobre los riesgos geológicos y análisis hidrológicos de la Cuenca de Chalco.* Instituto Italo-Latinoamericano, Roma, Serie Scienza. 3: 39-59 p.
- Brockman F. J., Kieft T. L., Fredrickson J. K., Bjornstad B. N., Li S. W., Spangenburg. and Long P. E., 1992. *Microbiology of Vadose Zone Paleosols in South-Central Washington State.* Microbiology Ecology. 23. 279-301.
- Burlge R., Hooper S. y Saylor G., 1989. *The TOL (pWVO) catabolic plasmid.* Appl. Environ. Microbiol. June 55 (6): 1323-1328.
- Byrd J. J. y Colwell R. R., 1992. *Microscopy applications for analysis of environmental samples.* In Microbial Ecology Principles, Methods and Applications. McGraw-Hill. 95-99 p.
- Cabrera Y. y Rodríguez L., 1995. *Detergentes aniónicos, materia orgánica y bacterias indicadoras en canales de la Subcuenca de Chalco, México.* Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana, México.
- Cano-Santana Z. y Meave J., 1996. *Sucesión primaria en derrames volcánicos: el caso del Xitle.* Ciencias, México, No. 41 (Enero-Marzo): 58-68.
- Carter M. R., 1993. *Soil sampling and Methods of Analysis.* Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers, USA. 823 p.
- Chávez, R., 1993. *La contaminación de las aguas subterráneas.* Ingeniería Civil, México, 289 (Mayo): 12-22.

- Colwell F. S., 1989. *Microbiological comparison of surface and unsaturated subsurface soil from a semiarid high desert*. Appl. Environ. Microbiol. 55 (9). 2420-2423.
- Consejo Asesor en Epidemiología., 1990. *Información prioritaria en salud*. Secretaría de Salud, México:121.
- DDF., 1975. El Clima. En Memoria de las Obras del Sistema de Drenaje Profundo del Distrito Federal. Tomo I. Talleres Gráficos de la Nación. México: 45-50.
- DDF y El Colegio de México., 1987. *Atlas de la Ciudad de México*.
- DDF., 1988. *El sistema de drenaje profundo de la Ciudad de México*. Secretaría General de Obras. Dirección General de Construcción y Operación Hidráulica. México.
- Ezcurra E., 1990. *De las chinampas a la Megalópolis*. El medio ambiente en la Cuenca de México. Fondo de Cultura Económica. México. 52-65.
- Ezcurra E., 1992. *Crecimiento y colapso en la Cuenca de México*. Ciencias. 13-25.
- Feenstra S. and Cherry J. A., 1988. *Subsurface contamination by dense non-aqueous phase liquid (DNAPL) chemicals*. International Grounwater Symposium. International Asociation of Hydrogeologists. Nova Scotia, Canada: 15.
- Foth H. D., Turk L. M. y Millard C. E., 1980. *Fundamentos de la ciencia del suelo*. Cia. Editorial Continental. S.A. México. 121-166 p.

- Fredrickson J. K., Brockman F. J., Bjornstad B. N., Long P. E., Li S. W., McKinley J. P. and Wright J. V., 1994. *Microbiological characteristics of Pristine and contaminated deep Vadose sediments from arid region*. Geomicrobiology Journal.
- García A.D., 1999. *Caracterización fisicoquímica y microbiológica en el Gran Canal de Desagüe, Estado de México*. Tesis en preparación. Instituto de Ingeniería, UNAM.
- García E., 1981. *Modificaciones del sistema de clasificación climática de Köpen*. Instituto de Geografía, UNAM.
- Guerra L. M. y Mora R. J., 1989. *Agua e Hidrología de la Cuenca del Valle de México. Antecedentes, Diagnóstico, Perspectivas y Alternativas*. Friedrich Ebert Stiftung. México: 72-78.
- Harvey R. W., George L. H., Smith R. L. and Le Blanc D. R., 1989. *Transport of microspheres and indigenous bacteria through a sandy aquifer: results of natural and forced gradient tracer experiments*. Environ. Sci. Technol. 23 (1): 51-56.
- Harvey R. W. and Garabedian S. P., 1991. *Use of colloid filtration theory in modeling movement of bacteria through a contaminated sandy aquifer*. Environ. Sci. Technol. 25 (1): 176-185.
- Hungate R. E., 1969. *A roll tube for cultivation for strict anaerobes*. Methods in Microbiology, J. R. Norris and D. W. Ribbons Editorias. Academic Press New York, 3b. 117-132.
- INEGI., 1990. *XI Censo general de población y vivienda*. Estado de México. Resultados Definitivos.
- Jackson M. L., 1982. *Análisis químicos de suelos*. OMEGA, España. 67-72 p.

- Jespersen G., Jerger M. and Exner D., 1993. *Bioremediation Tackles Hazwaste*. Chemical Engineering. June. 116-122 p.
- Kieft T. L., Amy P. S., Brockman F. J., Fredrickson J. K., Bjornstad B. N. and Rosacker L. L., 1993. *Microbial abundance and activities in relation to water potential in the Vadose zone of arid and semiarid sites*. Microbial Ecology. June. 59-78.
- Lazcano, A. 1989. *El origen de la vida*. Editorial Siglo XXI, México. 67 p.
- Lee, C. C., Huffman G. L. and Nalesnik R. P. 1991. *Medical waste management*. Environ. Sci. Technol. 25 (3): 360-363 p.
- Lehninger A. L., 1983. *Bioquímica*. OMEGA, España. 1117 p.
- Lewis D. L., Kollig H. P. and Hodson R. E., 1986. *Appl. Environ. Microbiol.* 51. 598-603.
- Manual 9. *Para el estudio de suelos*. Universidad de Chapingo. 1966.
- Maya C. L., 1999. *Caracterización fisicoquímica y microbiológica de muestras de subsuelo del Río de los Remedios, México*. Tesis en Preparación, Instituto de Ingeniería, UNAM.
- Mazari M., 1992. *Potential groundwater contamination by organic compounds in the México City Metropolitan area*. Tesis de Doctorado en Ciencias Ambientales e Ingeniería. Universidad de California, USA.

- Mazari H. M., Saval B. S., Iturbe R. y Noyola R. A., 1994. *Caracterización de sitios de canal en la zona industrial de la Subcuenca de Chalco*. Memorias del X Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. SMISAAC. 8.
- Melo G. C. y Oropeza O. O., 1987. *Vegetación*, En Atlas de la Ciudad de México. Departamento del Distrito Federal y el Colegio de México. Departamento de publicaciones de El Colegio de México. México. 33-35 p.
- Murillo R., 1990. *Sobreexplotación del acuífero de la cuenca del valle de México y su relación con la ingeniería de cimentaciones a cinco años del sismo*. Sociedad Mexicana de Mecánica de Suelos, A. C. México: 109-118.
- Ortega G. A., Cherry J. A. and Rudolph L. D., 1993. *Large-Scale aquitard consolidation near Mexico City*. Ground Water. 31 (5): 1540-1546.
- Palacios-Mayorga S. y Gama-Castro J., 1994. Genesis, dinámica y degradación. In Cruz-Reyna S. (compilador) *Ciencias de la Tierra Hoy*. Univ. Nal. Autón. de México, Fondo de Cultura Económica. X. 178-200 p.
- Paul E. A. and Clark F.E., 1989. *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, USA. 275 p.
- Pedersen K. and Ekendahl S., 1990. *Distribution and activity of bacteria in deep granitic groundwaters of south eastern Sweden*. Microbiological Ecology 20: 37-52 p.
- Ridgway. H. F., Safarik. J., Phipps.D., Carl. P. y Clark. D. 1990. *Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer*. *Appl. Env. Microb.* 3565-3575 pp.
- Robinson K. G., Farmer W. S. and Novak J. T., 1989. *Availability of sorbed toluene in soils for biodegradation by acclimated bacteria*. Water Review. 24 (3): 345-350.

- Rodríguez C. R., 1987. *Consideraciones preliminares, basadas en resultados Geoeléctricos, sobre interfase agua mineralizada agua dulce en el área de Santa Catarina Yecahuitzotl DF, México.* Geofísica Internacional. 26 (4): 573-583.
- Rodríguez C. R. y González M. T., 1989. *Comportamiento hidrodinámico del sistema acuífero de la subcuenca de Chalco, México.* Geofísica Internacional. Instituto de Geofísica UNAM. 28 (2): 207-217.
- Rzedowski J. y Rzedowsky C. G., 1979. *Flora Fenerogámica del Valle de México.* Vol I. CECSA, México: 1-60.
- Salle, A. J., 1975. *Bacteriología.* Gustavo Gili Ediciones, España. 679-719.
- Saval S., 1995. *Remediación y restauración.* En PEMEX Ambiente y Energía, Los retos del futuro, México, Instituto de Investigaciones Jurídicas UNAM-Petróleos Mexicanos.
- Saval S., 1996. Apuntes del curso: *Biorremediación de suelos y acuíferos contaminados con hidrocarburos.* PUMA, UNAM.
- Saval S. y Mazari M., 1996. *Memorias del V Congreso Latinoamericano de Geoquímica Orgánica.* Cancún, México. 338-340.
- Schwarzenbach R. P., Ginger W., Hoehn E. and Schneider K. K., 1983. *Behavior of organic compounds during infiltration of river water to groundwater, field studies.* Environ. Sci. Technol. 17 (8): 472-479.
- Schwarzenbach R. P., Ginger W., Schaffner C. and Wanner O., 1985. *Groundwater contamination by volatile halogenated alkanes: abiotic formation of volatile sulfide compounds under anaerobic conditions.* Environ. Sci. Technol. 19 (4): 322-327 p.

- Sistema Bancos de Comercio., 1976. *La economía del Estado de México*. Colección de Estudios Económicos Regionales. Investigación II del Sistema Bancos de Comercio, México. 41-46.
- Stainer R. Y., Doudoroff M. and Adelberg E. A., 1970. *The microbial world*. Prentice-Hall, Inc, USA. 873 p.
- Stevens T. O., McKinley J. P. and Fredrickson J. K., 1993. *Bacteria associated with deep alkaline, anaerobic groundwaters in Southeast Washington*. Microbial Ecology. 35-50.
- TEOREMA., 1995. Residuos sólidos municipales: *Dimensiones de la basura en México*. Junio. 26-27.
- Valverde C. y Aguilar A. G., 1987. *Localización geográfica de la Ciudad de México*. Atlas de la Ciudad de México. Departamento del Distrito Federal y El Colegio de México. Departamento de Publicaciones de El Colegio de México. México. 9-38.
- Villa P. F., 1996. *Degradación anaerobia de materia orgánica en altas concentraciones de sales*. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Vogel T. M., Criddle C. S. and McCarty P. L., 1987. *Transformations of halogenated aliphatic compounds*. Environ. Sci. Technol. 21 (8): 722-736.
- Wood R., 1989. *Soil Biology*. Hall, Inc, USA. 470 p.
- Wiggins B. A. and Alexander M. 1988. *Appl. Environ. Microbiol.* 54. 2803-2807.

APÉNDICE I

Datos obtenidos para la determinación de textura

TIEMPO	SECCIÓN N		SECCIÓN M		TESTIGO	
	mm	T°	mm	T°	mm	T°
30 seg	30	20	21	20	0	20
1 min	29	20	20	20	0	20
3 min	27	20	20	20	0	20
9 min	23	20	19	20	0	20
30 min	15	20	16	20	0	20
90 min	12	21	14	21	0	21
120 min	10	21	13	21	0	21
270 min	9	22	12	22	0	22
360 min	9	22	11	22	0	22
480 min	9	22	10	22	0	22
720 min	8.5	20	10	20	0	20

APÉNDICE 2

Cuantificación de bacterias en las secciones de los nucleos

Cuantificación en las secciones de suelo de Bacterias heterótrofas en medio PYG y en medio MES

PROFUNDIDAD PROMEDIO (m)	HETEROTR. PYG (LOG)	HETEROTR.MES (LOG)
1,49	5,25	4.85
1,93	5,4	5.6
2,1	4,5	5.98
2,46	4,57	3.43
2,73	5,11	4.85
3,18	5,19	5.7
3,45	5,11	3.6
3,47	5,09	3.73
3,63	6	5.3
4,04	5,39	6.24
4,35	5	4.82
4,5	5,05	5.92
4,67	5,27	5.9
5	4,47	5.35
5,45	4,62	4.72
5,49	4,9	5.90

Cuantificación de bacterias por medio de la técnica de anaranjado de acridina

PROFUNDIDAD PROMEDIO (m)	ufc g/SUELO SECO	LOG
1,49	2.25 E6	6.35
1,93	7.77 E5	5.89
2,1	1.05 E6	6.02
2,46	5.96 E5	5.77
2,73	1.4 E6	6.14
3,18	1.6 E6	6.2
3,45	1.1 E6	6.04
3,47	4.2 E5	5.63
3,63	1.7 E6	6.23
4,04	2.0 E6	6.3
4,35	7.66 E5	5.88
4,5	1.03 E6	6.01
4,67	8.6 E5	5.93
5	2.58 E5	5.41
5,45	1.23 E6	6.09
5,49	9.75 E5	5.98

Bacterias anaerobias

PROFUNDIDAD PROMEDIO (m)	HIDROGENÓFILAS (LOG)	ACETOCLÁSTICAS (LOG)	UTILIZADORAS DEL ÁCIDO BUTÍRICO (LOG)	UTILIZADORAS DEL ÁCIDO PROPIÓNICO (LOG)
1,49	7	4	3	3
1,93	6	3	3	2
2,1	5	4	4	3
2,46	4	3	3	3
2,73	6	3	4	3
3,18	7	0	0	0
3,45	6	3	3	3
3,47	6	3	2	2
3,63	6	3	3	3
4,04	3	0	0	0
4,35	5	3	3	2
4,5	4	0	0	0
4,67	6	0	2	0
5	6	0	0	0
5,45	4	4	3	2
5,49	3	0	0	0

Bacterias anaerobias

PROFUNDIDAD PROMEDIO (m)	SULFATORREDUCTORAS (LOG)	FERMENTATIVAS (LOG)
1,49	4	5
1,93	4	4
2,1	5	3
2,46	3	4
2,73	4	4
3,18	3	3
3,45	3	6
3,47	3	5
3,63	5	6
4,04	4	4
4,35	5	5
4,5	4	4
4,67	3	4
5	3	2
5,45	4	3
5,49	3	3

APÉNDICE 3

Cinéticas de degradación de tolueno

Cultivos provenientes de la sección A (1.49 m de profundidad)

TIEMPO (días)	TOLUENO RESIDUAL mg/L	pH	ABSORBANCIA (540 nm)
0	2997	7,18	0,08
1	2482	7,11	0,065
2	1857	6,97	0,073
3	1587	7,04	0,049
4	2510	6,82	0,068
5	1872	6,79	0,042
6	1991	6,7	0,066
7	1597	6,66	0,055
8	1690	6,61	0,067
10	1482	6,61	0,077
11	1509	6,6	0,079
12	792	6,62	0,078
13	1201	6,37	0,082
16	405	6,33	0,078

Cultivos provenientes de la sección K (4.35 m de profundidad)

TIEMPO (días)	TOLUENO RESIDUAL mg/L	ABSORBANCIA (540 nm)	pH
1	2028	0,036	7,23
2	1606	0,031	7,22
3	1185	0,032	7
4	1190	0,028	7,1
5	1195	0,033	6,95
6	602	0,048	6,9
7	482	0,037	6,87
8	303	0,052	6,8
9	254	0,077	6,57
10	238	0,056	6,37

Cultivos provenientes de la sección L (4.5 m de profundidad)

TIEMPO (días)	TOLUENO RESIDUAL mg/L	ABSORBANCIA (540 nm)	pH
0	2564	0,05	7,23
1	2457	0,086	7,16
2	2500	0,087	7,1
3	2580	0,093	7,09
4	2088	0,074	6,85
5	2244	0,048	6,87
6	2040	0,065	6,72
7	1787	0,055	6,68
8	1699	0,082	6,63
10	2241	0,057	6,6
11	2117	0,068	6,61
13	1704	0,062	6,61
15	1258	0,065	6,63
17	1969	0,07	6,4
20	703	0,071	6,29

Cultivos provenientes de la sección I (3.63 m de profundidad)

TIEMPO (hrs)	TOLUENO RESIDUAL mg/L
0	2749
2	2186
6	2669
8	2593
16	2566
20	2512
24	1861
28	2016
31	2320
38	2038
56	2214
75	1805
109	1598
122	1355
137	1311
161	979
185	746
209	930
233	817

APÉNDICE 4

Identificación de bacterias degradadoras de tolueno

CEPA CAMI: *Pseudomonas cepacia* %id= 66.8 *

CEPA CAMI: *Pseudomonas cepacia* %id= 66.8 *

CEPA CBMI: *Pseudomonas fluoresces/putida* %id= 66.8 *

CEPA CAMN: *Pseudomonas aeruginosa* %id= 96.3

PRUEBAS	SUBSTRATOS	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADO CEPA CAMI	RESULTADO CEPA CBMI	RESULTADO CEPA CAMN
ONPG	ortonitrofenolgalactosido	β -galactosidasa	negativo	negativo	negativo
ADH	arginina	arginina dehidrolasa	negativo	negativo	negativo
LDC	lisina	lisina descarboxilasa	negativo	negativo	negativo
ODC	ornitina	ornitina descarboxilasa	negativo	negativo	negativo
CIT	citrato sódico	utilización del citrato	negativo	negativo	positivo
H ₂ S	tiosulfato sódico	producción de H ₂ S	negativo	negativo	negativo
URE	urea	ureasa	negativo	negativo	positivo
TDA	triptófano	triptófano desaminasa	negativo	negativo	negativo
IND	triptofano	producción del indol	negativo	negativo	negativo
VP	piruvato sódico	producción de acetoina	negativo	negativo	negativo
GEL	gelatina de Kohn	gelatinasa	positivo	negativo	positivo
GLU	glucosa	fermentación/oxidación (4)	positivo	positivo	positivo
MAN	manitol	fermentación/oxidación (4)	negativo	negativo	negativo
INO	inosito	fermentación/oxidación (4)	negativo	negativo	negativo
SOR	sorbitol	fermentación/oxidación (4)	negativo	negativo	negativo
RHA	ramnosa	fermentación/oxidación (4)	negativo	negativo	negativo
SAC	sacarosa	fermentación/oxidación (4)	negativo	negativo	negativo
MEL	melibiosa	fermentación/oxidación (4)	negativo	positivo	negativo
AMY	amigdalina	fermentación/oxidación (4)	negativo	negativo	negativo
ARA	arabinosa	fermentación/oxidación (4)	positivo	negativo	positivo
OX	sobre papel de filtro	citocromo oxidasa	positivo	positivo	positivo

(4) La fermentación empieza en la parte inferior de los tubos, la oxidación empieza en la cúpula. En este caso todo el tubo estaba amarillo a las 24 hrs, por lo que no se pudo saber si empezó en oxidación o fermentación.

* Esta es una buena identificación a nivel de género, sin embargo para el nivel de especie ésta es la más probable.

CEPA CAMH: *Pseudomonas cepacia* %id= 92.8

CEPA CBMH: *Pseudomonas fluoresces/putida*

%id= 66.8 *

CEPA CCMH: *Pseudomonas sp*

%id= 64.3 *

PRUEBAS	SUBSTRATOS	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADO CEPA CAMH	RESULTADO CEPA CBMH	RESULTADO CEPA CCMH
ONPG	ortonitrofenolgalactosido	β -galactosidasa	positivo	negativo	negativo
ADH	arginina	arginina dehidrolasa	negativo	negativo	negativo
LDC	lisina	lisina descarboxilasa	negativo	negativo	negativo
ODC	ornitina	ornitina descarboxilasa	negativo	negativo	negativo
CIT	citrato sódico	utilización del citrato	negativo	negativo	negativo
H ₂ S	tiosulfato sódico	producción de H ₂ S	negativo	negativo	negativo
URE	urea	ureasa	negativo	negativo	negativo
TDA	triptófano	triptófano desaminasa	negativo	negativo	negativo
IND	triptofano	producción del indol	negativo	negativo	negativo
VP	piruvato sódico	producción de acetoina	negativo	negativo	negativo
GEL	gelatina de Kohn	gelatinasa	positivo	negativo	positivo
GLU	glucosa	fermentación/oxidación (4)	positivo	positivo	positivo
MAN	manitol	fermentación/oxidación (4)	negativo	negativo	negativo
INO	inosito	fermentación/oxidación (4)	negativo	negativo	negativo
SOR	sorbitol	fermentación/oxidación (4)	negativo	negativo	negativo
RHA	ramnosa	fermentación/oxidación (4)	negativo	negativo	negativo
SAC	sacarosa	fermentación/oxidación (4)	negativo	negativo	positivo
MEL	melibiosa	fermentación/oxidación (4)	negativo	positivo	negativo
AMY	amigdalina	fermentación/oxidación (4)	negativo	negativo	positivo
ARA	arabinosa	fermentación/oxidación (4)	positivo	negativo	negativo
OX	sobre papel de filtro	citocromo oxidasa	positivo	positivo	positivo

(4) La fermentación empieza en la parte inferior de los tubos, la oxidación empieza en la cúpula. En este caso todo el tubo estaba amarillo a las 24 hrs, por lo que no se pudo saber si empezó en oxidación o fermentación.

* Esta es una buena identificación a nivel de género, sin embargo para el nivel de especie ésta es la más probable.

CEPA CDMH: *Pseudomonas cepacia*

%id= 92.8

CEPA CAME: *Pseudomonas cepacia*

%id= 90.4

CEPA CBME: *Pseudomonas sp*

%id= 66.8 *

PRUEBAS	SUBSTRATOS	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADO CEPA CDMH	RESULTADO CEPA CAME	RESULTADO CEPA CBME
ONPG	ortonitrofenolga- lactosido	β -galactosidasa	positivo	positivo	negativo
ADH	arginina	arginina dehidrolasa	negativo	negativo	negativo
LDC	lisina	lisina descarboxilasa	negativo	negativo	negativo
ODC	ornitina	ornitina descarboxilasa	negativo	negativo	negativo
CIT	citrato sódico	utilización del citrato	negativo	negativo	negativo
H ₂ S	tiosulfato sódico	producción de H ₂ S	negativo	negativo	negativo
URE	urea	ureasa	negativo	negativo	negativo
TDA	triptófano	triptófano desaminasa	positivo	negativo	negativo
IND	triptofano	producción del indol	negativo	negativo	negativo
VP	piruvato sódico	producción de acetoina	negativo	negativo	negativo
GEL	gelatina de Kohn	gelatinasa	positivo	negativo	negativo
GLU	glucosa	fermentación/oxidación (4)	positivo	positivo	positivo
MAN	manitol	fermentación/oxidación (4)	negativo	negativo	negativo
INO	inosito	fermentación/oxidación (4)	negativo	negativo	negativo
SOR	sorbitol	fermentación/oxidación (4)	negativo	negativo	negativo
RHA	ramnosa	fermentación/oxidación (4)	negativo	positivo	negativo
SAC	sacarosa	fermentación/oxidación (4)	positivo	positivo	negativo
MEL	melibiosa	fermentación/oxidación (4)	negativo	negativo	positivo
AMY	amigdalina	fermentación/oxidación (4)	negativo	positivo	negativo
ARA	arabinosa	fermentación/oxidación (4)	positivo	positivo	negativo
OX	sobre papel de filtro	citocromo oxidasa	positivo	positivo	positivo

(4) La fermentación empieza en la parte inferior de los tubos, la oxidación empieza en la cúpula. En este caso todo el tubo estaba amarillo a las 24 hrs, por lo que no se pudo saber si empezó en oxidación o fermentación.

* Esta es una buena identificación a nivel de género, sin embargo para el nivel de especie ésta es la más probable.