

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

“ESTUDIO DE LA BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE HIDROCARBUROS EN UN SUELO CONFORMADO ARTIFICIALMENTE”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

BIÓL. MIRIAM PIÑA COBOS

DIRECTOR DE TESIS: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

MÉXICO, D.F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ENERO, 2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: PIÑA COBOS
MIRIAM
FECHA: 12 ENERO DE 2004
FIRMA: MIRIAM PIÑA

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OFICIO FCIE/DEP/0393/03
ASUNTO: Asignación de Jurado

DR. VICTOR MANUEL LUNA PABELLO
P R E S E N T E.

Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado como Director(a) de la Tesis del(a) alumno(a) **BIOL. MIRIAM PIÑA COBOS**, quien desarrolló el trabajo de Tesis titulado "Estudio de la Biodegradación Aerobia de Hidrocarburos en un suelo conformado artificialmente".

Así mismo comunico que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas en su sesión celebrada el 19 de mayo del año en curso, ha designado a los siguientes sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de MAESTRO(A) EN CIENCIAS (Biología).

CARGO	GRADO,	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	DR.	TEOFILO HERRERA SUÁREZ
VOCAL	DR.	VICTOR MANUEL LUNA PABELLO
SECRETARIO	DR.	JORGE ENRIQUE GAMA CASTRO
SUPLENTE	M. EN C.	JORGE MANUEL ROMERO JARERO
SUPLENTE	M. EN C.	MARIA DE LOURDES FLORES DELGADILLO

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., 28 de mayo de 2003

JEFE DE LA DIVISION

DRA. DENI CLAUDIA RODRIGUEZ VARGAS

DCRV/ASR/mnm



DEDICATORIA

Al que vive por siempre, porque su diestra me ha sostenido.

A ti Alytzel Berenice, motorcito que impulsa mi vida, por tu cariño, paciencia; por ser la luz y alegría de mi existencia.

A mis padres Hipólito Piña Juárez y Margarita Cobos Ramos, por su valioso apoyo y por el espíritu de lucha que me transmitieron.

Familiares y amigos que creyeron en mí, los llevó en mi corazón.

*Ha quienes han elevado una oración por mí,
los hago partícipes de este logro.*

**Sendas Dios hará donde
piensas que no hay, él obra
en maneras que no podemos entender,
él te guiara, amor y fuerza te dará
y un camino hará donde no lo hay.
ÉL HARÁ ALGO NUEVO HOY.**

anónimo

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se llevó a cabo en los Laboratorios del Programa de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental y el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM.

Asimismo, para la realización de la presente tesis, se contó con el apoyo de:

Proyecto FIES-IMP 96F-VI-48 "Desarrollo para facilitar la biodisponibilidad de compuestos recalcitrantes derivados del petróleo para su aplicación en sitios contaminados", por el financiamiento que permitió llevar a cabo esta investigación y el apoyo económico en forma de beca parcial para realizar los estudios de maestría.

Proyecto FIES 97-03-I "Desarrollo de un método de biodegradabilidad aerobia rápida para inhibidores de arcillas empleados en los fluidos de perforación de pozos petroleros", por el financiamiento para la realización del análisis molecular.

Proyecto PAIP- 6190-14 asignado al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, por parte de la Facultad de Química.

Laboratorios de Microbiología y Contaminación Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, Laboratorio de Microbiología General del Instituto Politécnico Nacional y Laboratorio de Edafología del Instituto de Geología, UNAM por permitirme el uso de sus instalaciones.

AGRADECIMIENTOS

Expreso un sincero agradecimiento a los miembros del jurado, por el valioso tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, y por las sugerencias que lograron enriquecerlo.

Al Dr. Victor Manuel Luna Pabello por haber dirigido este trabajo, por su confianza, perseverancia y apoyo siempre oportuno.

Al M. en C. Jorge M. Romero Jarero, quien siempre me brindó su apoyo, confianza y sincera amistad y me permitió el uso de sus instalaciones y equipos necesarios, para la realización de una parte muy importante de este trabajo de investigación.

Al Dr. Jorge E. Gama Castro por su ayuda siempre incondicional y sus comentarios siempre acertados.

Al Dr. Gilberto Díaz González, por su apoyo para el análisis cromatográfico de las muestras de suelo.

Al M. en C. Javier Zavala por su apoyo para el análisis molecular de las muestras.

Al M. en C. Juan Manuel Arce Ortega por sus comentarios y apoyo implícito e incondicional en la realización de este trabajo.

A la pas. de M. en C. Rosaura Páez Bistrain por su ayuda y disposición en el análisis estadístico, pero ante todo por su apreciada amistad

INDICE**ABREVIATURAS****RESUMEN**

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 Aspectos relevantes sobre el suelo	2
2.1.1 Definición	2
2.1.2 Formación	2
2.1.3 Propiedades físicas y químicas del suelo	4
2.1.4 Microbiología del suelo	9
2.1.4.1 Fisiología microbiana	10
2.2 Contaminantes orgánicos del suelo	11
2.2.1 Procesos de transporte de contaminantes	12
2.3 El proceso de biodegradación de hidrocarburos en el suelo	13
2.3.1 Biodegradación de hidrocarburos	14
2.3.2 Factores ambientales involucrados en la biodegradación de hidrocarburos	16
2.3.3 Participación de microorganismos en la limpieza de suelos	18
2.3.4 Microorganismos degradadores de hidrocarburos	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos particulares	
4. ESTRATEGIA DE TRABAJO	22
5. ETAPA 1. CARACTERIZACIÓN Y BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS EN UN SUELO ANTRÓPICO	
5.1 MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1.1 Obtención de la muestra	25
5.1.2 Procedimiento para la caracterización edáfica de la muestra de suelo	25
5.1.3 Procedimiento para la determinación de hidrocarburos en la muestra de suelo	26
5.1.4 Aislamiento de microorganismos en la muestra de suelo	26
5.1.5 Ensayo de degradación de hidrocarburos alifáticos empleando las cepas aisladas	27

5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.2.1 Características edáficas del suelo natural contaminado	28
5.2.2 Hidrocarburos alifáticos y policíclicos aromáticos presentes en el suelo natural contaminado	30
5.2.3 Degradación de hidrocarburos alifáticos con las cepas aisladas	34
5.2.4 Conclusiones parciales	36
6. ETAPA 2. CARACTERIZACIÓN Y BIODEGRADACIÓN DE HPA EN UN SUELO CONFORMADO ARTIFICIALMENTE	
6.1 MATERIALES Y MÉTODOS	
6.1.1 Conformación del suelo artificial	37
6.1.2 Preparación del inóculo para los ensayos	37
6.1.3 Ensayos de biodegradación de HPA sin adición de nutrientes	37
6.1.4 Biodegradación de HPA con adición de nutrientes (bioestimulación) y cambio de pH	39
6.1.5 Procesamiento de datos cromatográficos	41
6.1.6 Cuenta de bacterias totales y heterótrofas	41
6.1.7 Aislamiento y análisis molecular de bacterias degradadoras de criseno y antraceno	41
6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.2.1 Ensayos de biodegradación de HPA sin adición de nutrientes	45
6.2.2 Ensayos de biodegradación de HPA con adición de nutrientes y cambio de pH	49
6.2.3 Análisis estadístico de los datos cromatográficos	54
6.2.4 Cuenta de bacterias totales y heterótrofas	55
6.2.5 Análisis molecular aplicado a los microorganismos aislados	56
6.2.6 Conclusiones parciales	58
7. CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES	60
8. ANEXOS	60
ANEXO A. TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACIÓN EDAFOLÓGICA DEL SUELO MUESTREADO	60
ANEXO B. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS EN SUELOS	65
ANEXO C. RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	69
ANEXO D. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS.	74
ANEXO E. ANÁLISIS MOLECULAR	88
9. REFERENCIAS	92

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
C:P	Relación de nutrimentos carbono-fósforo
C:N:P	Relación de nutrimentos carbono-nitrógeno-fósforo
DMSO	Dimetil sulfóxido
HPA	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
LFNAL	Líquidos de la fase no acuosa ligera
LFNAD	Fase líquida no acuosa densa
MCRA	Máxima capacidad de retención de agua
N	Nitrógeno
P	Fósforo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PH	Potencial de iones hidrógeno
ppm	Partes por millón
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mL
USDA-SCS	Sistema del Departamento de Agricultura de Estados Unidos y Sistema Unificado de Clasificación de Suelos

RESUMEN

Desde el punto de vista ambiental, los hidrocarburos tienen gran importancia debido a sus propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas. De manera particular, los hidrocarburos policíclicos aromáticos, como el criseno y el antraceno, son considerados recalcitrantes al tratamiento biológico. En este sentido, el presente trabajo se enfocó a evaluar la factibilidad de biodegradar dichos compuestos mediante la adición de nutrimentos y cambios de pH en un suelo conformado artificialmente. Para ello, la experimentación se llevó a cabo en dos etapas: Etapa 1, caracterización y biodegradación de hidrocarburos en un suelo antrópico y etapa 2, caracterización y biodegradación de HPA en un suelo conformado artificialmente. Para la etapa 1, se realizó el estudio de un suelo natural contaminado, el cual fue caracterizado edáficamente. Asimismo, se le determinó la concentración de hidrocarburos presentes y el nivel de biodegradación al que se puede llegar bajo condiciones de operación controladas, empleando microorganismos autóctonos; la identificación de los microorganismos involucrados en los procesos de biodegradación se realizó mediante pruebas bioquímicas. De acuerdo con los resultados obtenidos, la caracterización edáfica indica que el suelo natural analizado es de tipo textural areno francoso, por lo cual el suelo artificial empleado en la etapa 2 fue conformado de acuerdo a esas características. El análisis cromatográfico de dicho suelo, reveló una concentración total de 1827.95 ppm de hidrocarburos alifáticos y de 327.14 ppm de hidrocarburos aromáticos. Asimismo, se detectó una concentración de 3.86 ppm y 3.53 ppm de antraceno y criseno, respectivamente. Desde el punto de vista microbiológico, las cepas de *Bacillus sphaericus* y *Pseudomonas fluorescens* aisladas de este suelo, biodegradaron en un período de 14 días, más del 80% de los hidrocarburos alifáticos presentes.

En la etapa 2, se conformó un suelo artificial areno francoso al cual se le adicionó una solución conteniendo 500 ppm de antraceno y 500 ppm de criseno. Como compuesto de referencia o control, se empleó el dibenzo (a,h) antraceno, a una concentración de 50 ppm, debido a que es un compuesto extremadamente recalcitrante. Los matraces de prueba y testigo, fueron inoculados con microorganismos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales domésticas. Los experimentos se realizaron guardando las proporciones de carbono(C):nitrógeno:(N):fósforo(P) 100:0:1 y 100:10:1, respectivamente. De igual manera, se evaluó la biodegradación a pH de 6.5, 4.2 y 9.2 unidades. Los matraces se mantuvieron protegidos de la luz, a una temperatura de 24°C y sin agitación. Se obtuvieron muestras periódicas, analizando el contenido remanente de los compuestos de interés. Los resultados indican que, empleando una proporción C:N:P 100:10:1 y un pH cercano a la neutralidad (6.5) es posible reducir el tiempo de degradación de antraceno y criseno, ya que el antraceno y criseno sin adición de nutrimentos, mostraron un porcentaje de remoción de 16.31% y 28.8% respectivamente, en un período de 32 días; mientras que, en el mismo tiempo con adición de nutrimentos en las condiciones arriba mencionadas, el porcentaje de remoción aumentó a 52.82 % y 38.07%, respectivamente. De acuerdo al análisis estadístico, existe diferencia significativa tanto para el criseno como para el antraceno, entre los tratamientos, para los días 4, 8, 16 y 32; sin embargo, es importante mencionar, que la diferencia no se presentó igual, siendo menor para el criseno, lo cual se atribuye, a que es un compuesto de 4 anillos más difícil de degradar. La identificación preliminar realizada a la fecha, mediante análisis molecular, indica que los microorganismos involucrados en el proceso de biodegradación, son filogenéticamente cercanos a los géneros *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Ochrobactrum*, *Serratia* y, en menor grado, a *Bordetella*. Dichos géneros han sido reportados previamente como microorganismos biodegradadores de hidrocarburos.

1. INTRODUCCIÓN

El ecosistema suelo es de suma importancia, y la introducción de componentes ajenos al mismo, modifica su dinámica, por lo cual, es importante señalar que gran parte de la dificultad para resolver problemas de contaminación de suelo, estriba en el conocimiento inadecuado de sus características.

Por otra parte, el transporte de contaminantes orgánicos a través del suelo, puede originar la contaminación de los mantos freáticos, deteriorando la calidad del agua en ellos contenida, la cual en la mayoría de los casos, es fuente de abastecimiento para las poblaciones aledañas (Saval, 1997)

De manera particular, en años recientes, se ha dado una importancia primordial a la contaminación por hidrocarburos en el suelo, subsuelo y agua, ya que debido a las actividades de exploración, extracción, distribución y almacenamiento de hidrocarburos, se han originado significativos impactos negativos al ambiente, lo cual ha acarreado graves consecuencias, como son alteraciones de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los sitios afectados (Marín, 1996). Los compuestos del petróleo con efectos más nocivos para el hombre, son los hidrocarburos policíclicos aromáticos, algunos de los cuales, tienen propiedades tóxicas, mutagénicas o cancerígenas (Masserotes y Montova, 1995; Cerniglia, 1993) y se ha reportado su acumulación en sedimentos, suelo, plantas, peces e invertebrados (Overton, 1994).

En la última década, en México, las autoridades encargadas de la protección ambiental y sobre todo los centros de investigación, han considerado la importancia que tiene la conservación, en general del ambiente, así como el manejo de los recursos naturales, destacando la necesidad de eliminar contaminantes de los suelos y acuíferos, lo cual ha favorecido el desarrollo de tecnologías de limpieza y recuperación de los mismos (Iturbide y Navarro, 1997).

El proceso de biodegradación, que se basa en la utilización de microorganismos del suelo, para transformar o degradar los compuestos orgánicos, ha experimentado un gran desarrollo en años recientes, sin embargo, aún persevera la necesidad de desarrollar metodologías, que permitan evaluar la capacidad biodegradadora de los microorganismos presentes en el suelo, con la finalidad de establecer posibles soluciones a los problemas de contaminación de los mismos, y en especial los que se presentan en México.

En este contexto, el presente trabajo, se enfoca al diseño de un suelo conformado artificialmente, en el que las variables que intervengan sean controladas, y que sirva como modelo, para entender el proceso de biodegradación biológica que ocurre en un suelo contaminado con hidrocarburos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ASPECTOS RELEVANTES SOBRE EL SUELO

2.1.1 DEFINICIÓN

Suelo es una palabra común en el idioma castellano, con una etimología variada y significados diferentes, que forma parte de un ecosistema que constituye uno de los factores más importantes en el equilibrio global de la biósfera. Al respecto, Buol y cols. (1981) mencionan que, "los expertos en génesis y clasificación de suelos lo han considerado y estudiado como una especie anatómica; los físicos y químicos como un transformador de energía, los geólogos como la unidad epidérmica de un cuerpo geológico, por el cual deben pasar todos los materiales en el ciclo de la erosión, de la roca a los sedimentos depositados en los océanos; los ecólogos consideran al suelo como parte del ambiente, para los agrónomos, es una máquina productora base de la agricultura y ganadería". Sin embargo, para tener una definición adecuada a los fines ambientales, es necesario considerar al suelo como un cuerpo tridimensional que conforma el hábitat de miles de especies microbianas y plantas superiores, y que por lo tanto, desempeña un papel trascendental en los ciclos biogeoquímicos de los diferentes elementos (Aguilera y Martínez, 1996; Foth, 1996).

El suelo está formado por 5 componentes principales: materia mineral, agua, aire, materia orgánica y organismos vivos. La cantidad de estos constituyentes no es la misma en todos los suelos, sino que varía con la localidad. La cantidad de materia orgánica y mineral, que forman parte de la porción inanimada, es relativamente estable en un determinado lugar; sin embargo, la proporción de aire y agua varía. El aire y el agua juntos representan aproximadamente la mitad del volumen en la mayoría de los suelos, al cual se le llama espacio poroso; mientras que la fracción mineral, que en muchos casos contribuye con poco menos de la mitad del volumen, se origina de la desintegración y descomposición de las rocas, transformándose con el transcurso del tiempo (Foth, 1996).

2.1.2 FORMACIÓN

El principal proceso formador del suelo lo constituye la intemperización. El tipo de roca sobre la que actúa, junto con otros factores físicos, químicos y biológicos, determina la diversidad en cuanto a suelos se refiere. Los suelos se desarrollan como resultado de la interacción de cinco factores: roca basal, clima, organismos, topografía y tiempo.

1. La roca madre, es la forma de material no intemperizado o material geológico no consolidado, provee el esqueleto físico y químico inicial, para la formación del suelo.
2. La exposición del material parental, conduce al establecimiento de plantas y comunidades biológicas, que afectan la formación del suelo, principalmente a través del proceso de formación de materia orgánica.

3. El clima actúa como fuerza directriz, al promover los cambios tanto en suelos como en ecosistemas.

4. La edad de la región se toma a partir de la edad de la roca o material de origen. El tiempo que la roca madre está sujeta a los procesos de intemperización del clima y la actividad biológica, influye fuertemente en el tipo de suelo, por lo tanto, se puede establecer que mientras más joven es un suelo, mayor será su similitud al material que le dio origen.

5. El relieve o topografía determina la distribución de la humedad y los patrones de erosión y eluviación. Las diferencias de nivel de un terreno, afectan la distribución, retención y drenaje del agua superficial, influyendo consecuentemente, en el intemperismo del suelo.

De los factores mencionados, sólo el tiempo puede considerarse como una variable independiente; los otros cuatro, dependen en menor o mayor grado uno de otro o de algún factor adicional como la adición del suelo, la pérdida de materiales, la transferencia y transformaciones para crear cierto número de procesos específicos, que conducen a la diferenciación de horizontes (sucesión de capas con diferentes características y tonalidades) y a la propia formación del suelo (Foth, 1996; Aguilera y Martínez, 1996).

El suelo es la capa exterior de la corteza terrestre no consolidada, que mediante la acción de los agentes atmosféricos y la incorporación de sustancias orgánicas, se ha hecho apta para el crecimiento de las plantas; en teoría se ha considerado, que el suelo es renovable, pero en la práctica su restauración es difícil, de allí la importancia que tiene su cuidado como recurso natural (Palacios y Gama, 1997).

En términos generales, los estratos que se pueden observar y definir, de modo sencillo, en el perfil de la corteza terrestre son:

1. Suelo, capa de tierra apta para el cultivo, sobre la cual se fijan vegetales pequeños y donde se encuentra la mayor parte de microorganismos, puede presentar diversos grosores.
2. Subsuelo, formado por grandes fragmentos de roca en proceso de desintegración cuyo espesor varía de un lugar a otro y que, al cabo del tiempo, pasará a formar parte del suelo como consecuencia de su total alteración.
3. Roca madre, constituida por diversos conjuntos de material sólido en los que sobreyacen tanto el suelo como el subsuelo. La roca de esta capa, a determinada profundidad, se fragmenta como resultado de fenómenos físicos y biológicos enriqueciendo las capas superiores (Aguilar y cols., 1987).

Más específicamente, a continuación se presenta una descripción de los horizontes de un perfil de suelo:

El horizonte O, si está presente, es una capa de materia orgánica, parcialmente descompuesta.

El horizonte A, es un horizonte mineral caracterizado por una acumulación máxima de falsa materia orgánica en o cerca de la superficie del suelo. Tiene un color más oscuro distintivo de los horizontes inferiores.

El horizonte E, cuya característica principal es la pérdida de silicatos de arcilla, hierro o aluminio, se encuentra típicamente entre los horizontes A y B.

El horizonte B es la zona de intemperismo más activa, esto debido al aumento de arcillas, y tiene una estructura del suelo bien definida. El suelo formado en materiales geológicos recientes, típicamente está ausente en un horizonte B o es observable solamente por un color más rojo comparado al horizonte C.

El horizonte C, es material no consolidado, que ha experimentado poco o ningún intemperismo.

El horizonte R, es la roca sólida.

2.1.3 PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SUELO

Las variaciones de **temperatura del suelo**, son la manifestación de la energía solar, de la cual una parte es absorbida y convertida a calor, mientras que el resto es reflejada a la atmósfera. El efecto de la temperatura se observa en las reacciones fisiológicas de las células, pero también sobre las características fisicoquímicas como: el volumen del suelo, la presión, los potenciales de óxido-reducción, la difusión, la tensión superficial, etc. Los organismos del suelo pueden crecer desde -12 °C hasta 100 °C. En este contexto, acorde con la temperatura en la que mejor se desarrollan, han sido catalogadas como: psicrófilas (-5 a 25 °C), mesófilas (15 a 45 °C), termófilas (40 a 70 °C) o hipertermófilas (80 a 100 °C) (Paul y Clark, 1996).

El contenido de humedad puede tener influencia sobre la temperatura, ya que se ha observado, que los suelos con alta humedad se calientan más lentamente, debido a la cantidad, considerablemente mayor de calor requerida para elevar la temperatura (Foth, 1996). La humedad del suelo comprende todas las formas de agua que entran al sistema del suelo. El agua de la superficie migra hacia abajo por la fuerza de gravedad, y los espacios porosos pueden llenarse con la solución del suelo o del aire, de acuerdo con la cantidad de humedad. Algunas capas de agua se absorben fuertemente a las partículas del suelo, debido a las fuerzas adhesivas, y conforman el agua de adhesión, la cual se mueve muy poco. Más allá de la fuerte atracción de las partículas del suelo, las moléculas del agua también se mantienen como una película de agua de cohesión.

Estas últimas comparadas con las moléculas de adhesión, están en mayor movimiento, tienen un mayor nivel energético y se mueven más fácilmente. El movimiento del agua ocurre cuando hay diferencias de potencial entre diferentes puntos del sistema y tiende a moverse de alto a bajo potencial (Foth, 1996).

El color del suelo es influenciado por la cantidad y tipo de materia orgánica, la condición de drenaje y la aireación. La materia orgánica, en estado avanzado de descomposición imparte a los suelos un color gris, gris oscuro o pardo oscuro, a menos que algún otro constituyente, como el óxido de hierro o una acumulación de sales modifique el color. Los colores gris claro y blanco se originan por la falta de alteración de materiales "maternos" de color gris o blanco, depósitos de carbonatos de calcio, presencia de sales, o como resultado de la remoción de hierro, dejando cantidades significativas de minerales claros (Foth, 1996; Aguilera y Martínez, 1996).

Si los suelos están mal drenados, hay una mayor acumulación de materia orgánica en las capas superficiales, dándoles a éstos una coloración muy oscura. Cuando las capas inferiores contienen poca materia orgánica, presentan un color gris claro, indicando una condición de drenaje deficiente. Si el drenaje es intermedio, el color gris del subsuelo es interrumpido por moteados amarillos, pero cuando permite la aireación y las condiciones de humedad son favorables para la actividad química, el hierro de los minerales del suelo se oxida e hidrata formando compuestos amarillos y rojos. Los horizontes que están secos una parte del año y otra parte húmedos, tienden a presentar una mezcla de dos o más colores y se usa la palabra moteado para describir esta condición (Aguilera y Martínez, 1996; Foth, 1996).

En la mayoría de los suelos las partículas no existen como entidades individuales sino que están agrupadas en agregados de formas y tamaños característicos, a esto se le conoce como **estructura del suelo** que determina, la aireación, disponibilidad de nutrimentos, acción de los microorganismos, permeabilidad y, por lo tanto, la capacidad de infiltración y de movimiento del agua (Foth, 1996). La formación de agregados, es el resultado de la acción cementante de la materia coloidal del suelo, (arcillas, minerales, óxidos coloidales de fierro y, manganeso y materia orgánica coloidal). Por su parte, la actividad biológica, está involucrada en la estabilización y degradación de la estructura del suelo. Así, un suelo bien estructurado favorece la actividad biológica y esta última a su vez, ayuda a mantener condiciones estructurales favorables (Ladd y cols., 1996).

Los grupos de partículas que conforman al suelo se denominan separados y son divididos con base en el tamaño, sin tomar en cuenta su composición química, color y peso. El tamaño relativo de las partículas se expresa con el término **textura** y se refiere a la finura del suelo, que depende de la proporción relativa de arena, limo y arcilla. De hecho, para nombrar las distintas texturas, se usan las palabras, arena, limo, arcilla y franco, este último, contiene una mezcla de las 3 partículas mencionadas, en tales proporciones que exhibe las propiedades de las 3 fracciones de modo equilibrado.

Las partículas de arena, son relativamente grandes y cuando están presentes en una proporción no reducida, aumentan el tamaño de los espacios entre las partículas, facilitando con ello el movimiento del agua y del aire (Foth, 1996).

El limo tiene un área superficial mayor, una velocidad de intemperización más rápida y una liberación de nutrimentos solubles más rápido que las arenas, y tienen poca tendencia a reunirse o adherirse a otras partículas.

La arcilla, es una partícula capaz de conferir sus propiedades a una mezcla de separados, debido a que presenta un área superficial por gramo, mil veces mayor a la del limo y casi un millón de veces mayor a la de la arena muy gruesa. Dado que una gran cantidad de agua es retenida como una película en la superficie de las partículas de arcilla, la cantidad de ésta en el suelo influye grandemente en su capacidad total de retención de agua y algunos nutrimentos disponibles, actuando como un almacén de los mismos (Foth, 1996).

Los suelos de textura gruesa, con 20% o más de materia orgánica, y suelos de textura fina con 30% o más de materia orgánica en peso, tienen propiedades dominadas por la fracción orgánica en vez de la fracción mineral. Si tales suelos tienen más de 30 cm de espesor se les denomina suelos orgánicos (Aguilera y Martínez, 1996; Reyes, 1996).

La densidad aparente es la medida en peso por unidad de volumen. Está relacionada con el peso específico de las partículas minerales y las partículas orgánicas, así como con la porosidad, por lo que puede variar con la condición estructural del suelo, y depende en gran parte de su contenido de agua al contraerse e hincharse conforme se seca o se moja. Dentro de estudios de fertilidad, este factor sobresale, debido a las labores continuas con implementos pesados que inducen compactación, reduciendo la infiltración del agua y la penetración de las raíces (Aguilera y Martínez, 1996; Reyes, 1996).

La mayoría de suelos minerales, presentan una densidad aparente que varía de 0.4 a 2.0 Mg/m³; la de los suelos arcillosos granulados superficiales está en el intervalo de 1.0 a 1.3 Mg/m³; para los suelos superficiales de textura gruesa es de ordinario entre 1.3 y 1.8 Mg/m³. En los suelos superficiales de textura fina, el mayor desarrollo de su estructura implica que tengan una menor densidad aparente con relación a suelos más arenosos. La densidad aparente de los suelos orgánicos es muy baja con relación a la de los suelos minerales.

Existe una variación considerable en esa densidad, dependiendo de la materia orgánica y del contenido de humedad en el momento del muestreo. Los valores comunes están en el intervalo de 0.1 a 0.6 Mg/m³ (Aguilera y Martínez, 1996; Foth, 1996).

La densidad de partícula o densidad real, sólo considera a las partículas sólidas y se considera como una función aditiva de las densidades de los constituyentes del suelo. En consecuencia, la densidad de las partículas es constante y no varía con la cantidad de espacio que haya entre las partículas. Por tanto, un suelo poroso, tendrá una densidad aparente menor, que un suelo compacto, aunque la densidad absoluta de las partículas individuales de los dos suelos pudiera ser la misma (Foth, 1996; Ladd y cols., 1996).

Las cifras de densidad media de las partículas para la mayoría de los suelos corrientes varía entre 2.6 y 2.75 Mg/m³. Este valor cambia, cuando hay diferencias notables en el contenido de materia orgánica o en la composición mineralógica; ya que aparte de ciertos minerales pesados como la magnetita, que rara vez aparece en cantidades apreciables, la densidad de los componentes inorgánicos, está comprendida dentro de una serie bastante reducida (Foth, 1996; Ladd y cols., 1996).

La porosidad del suelo, es el porcentaje de su volumen total ocupado por poros o intersticios, los cuales pueden estar llenos de agua si el material está saturado, o por aire si el material es no saturado. Los poros grandes sirven para la aireación, los poros medianos para permitir el paso del agua, y los poros pequeños para el almacenamiento de agua disponible.

El tamaño de los espacios porosos es tan importante como la cantidad total de poros, y tanto el peso como el espacio poroso, varían de horizonte a horizonte y ambos se ven afectados por su textura y estructura. Los intervalos de porosidad varían entre 0 y 60% para los depósitos sedimentarios. El espacio poroso aumenta con la adición de materia orgánica y, generalmente, disminuye desde la superficie hacia la profundidad, especialmente si existen zonas de compactación (Aguilera y Martínez, 1996).

El pH del suelo es producido por un grupo de condiciones químicas específicas, bajo las cuales se puede registrar la acidez, neutralidad y alcalinidad. La escala de pH que toleran las bacterias del suelo se encuentra en un intervalo de 4 a 9.

La acidez del suelo, es común en las regiones en donde la precipitación es alta, lo suficiente para lixiviar apreciables cantidades de bases intercambiables de los niveles superficiales de los suelos, en tanto que la alcalinidad se presenta cuando existe un alto grado de saturación de bases. La presencia de sales, especialmente de calcio, magnesio y sodio, en forma de carbonatos, favorece la presencia de iones oxhidrilo (OH⁻) sobre los iones hidrógeno en la solución del suelo. Lo anterior es característico de las regiones áridas y semiáridas (Aguilera y Martínez, 1996). Por otro lado, los principales factores que controlan el pH son la materia orgánica, así como el tipo y la cantidad de cationes; estos factores tienden a estar correlacionados con la precipitación pluvial y sus efectos principales son biológicos. En consecuencia, cantidades grandes de materia orgánica inducen acidez, excepto cuando está balanceada por una concentración elevada de cationes básicos (Foth, 1996).

La materia orgánica de los suelos, se forma y acumula en ellos por incorporaciones de residuos vegetales a nivel rizósfera, y por la caída de hojas, frutos, así como por los cadáveres de animales sometidos a descomposición microbiana (Aguilera y Martínez, 1996). Además, este parámetro es directamente responsable, de la adsorción de los contaminantes en el suelo, así como del contenido y tipo de arcillas. El cambio de alguna de estas propiedades, puede influir en la interacción del contaminante con el suelo y alterar su disponibilidad y degradación por parte de los microorganismos nativos.

La materia orgánica se fermenta por la acción de los microorganismos, formándose quelatos, ácidos fúlvicos, huminas, aminoácidos, bases púricas y pirimídicas, proteínas, azúcares, grasas y ceras. Aporta al suelo macronutrientes como N^{3+} , P^{3+} , S^{6+} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , y Mg^{2+} ; y micronutrientes como Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , B^{3+} , y Mn^{2+} , e incrementa la capacidad de intercambio catiónico total. Por lo general, la materia orgánica constituye del 1 al 15 % del total, y se relaciona con la vegetación nativa, (Aguilera y Martínez, 1996)

Los suelos orgánicos se caracterizan por presentar un 30% de materia orgánica y las turberas hasta un 90%. El conocer las relaciones C:N ayuda a descubrir como es la fertilidad de los suelos y los balances de oxidación y nitrificación (Aguilera y Martínez, 1996).

Composición química: En la corteza terrestre se encuentra una gran cantidad de elementos químicos. Aproximadamente el 98% de la corteza terrestre, está formado por ocho elementos químicos que se presentan en un porcentaje superior al 1% en peso: oxígeno 46.6%, silicio 27.7%, aluminio 8.1%, hierro 5.0%, calcio 3.6%, sodio 2.8%, potasio 2.6%, magnesio 2.1%; in embargo, a esta lista deben agregarse otros elementos que tienen gran importancia en la evolución de los suelos y en el crecimiento de las plantas, pero que se encuentran en cantidades muy pequeñas: hidrógeno 0.87%, cloro 0.19%, fósforo 0.11%, magnesio 0.09%, carbono 0.08%, azufre 0.06% y nitrógeno 0.03% (Alexander, 1994; Foth, 1996).

Los nutrientes se vuelven disponibles a través de la intemperización de los minerales y la descomposición de la materia orgánica, con excepción del nitrógeno que se incorpora al suelo por medio de la acción de bacterias correspondientes al ciclo del nitrógeno, por medio de bacterias simbióticas y por la acumulación de materia orgánica de origen vegetal y animal. Los nutrientes son absorbidos de la solución del suelo o de las superficies de los coloides como cationes y aniones (Aguilera y Martínez, 1996; Foth, 1996).

Por lo anteriormente expuesto, se hace evidente, que la remediación de suelos contaminados requiera de una completa caracterización y evaluación del contaminante, su movilidad y el mecanismo potencial de remoción. Así es de esperar, que un suelo contaminado por derrames de petróleo, cambiará su composición con el tiempo, dependiendo de varios factores como: su volatilidad, solubilidad y una serie de transformaciones bióticas y abióticas de los componentes, de acuerdo a sus características y a la interacción suelo-agua-gas (Bower, 1994).

2.1.4 MICROBIOLOGÍA DEL SUELO

El suelo presenta una gran variedad de poblaciones, pero la más numerosa y variable es la población bacteriana (se estiman poblaciones viables desde un millón o menos, hasta varios miles de millones por gramo de suelo). Las bacterias, son microorganismos unicelulares y una de las formas más simples y pequeñas. Su habilidad para incrementar rápidamente su número es extremadamente importante en los suelos, ya que las bacterias pueden ajustar sus actividades rápidamente en respuesta a los cambios en el ambiente (Tan, 1994). Las bacterias pueden ser nativas (autóctonas) y alóctonas. Las bacterias nativas pueden presentarse en estados resistentes y perduran por largos períodos sin tener actividad metabólica, pero en determinado momento, proliferan y participan en procesos fisiológicos y bioquímicos. Las bacterias alóctonas, por el contrario, no participan de manera significativa en las actividades de la comunidad, entran con la precipitación, en tejidos enfermos, estiércol o aguas negras; y pueden permanecer por algún tiempo como formas inactivas, e incluso crecen por períodos cortos, pero sin contribuir en las transformaciones (Alexander, 1994); sin embargo, su introducción en un ambiente natural, con el propósito de incrementar o extender la biodegradación de contaminantes, puede resultar en un método eficiente para la biorremediación in situ (Masserot y Montova, 1995).

El factor principal que limita el crecimiento bacteriano en el suelo, es la escasez de alimento o la carencia de una fuente de energía apropiada y disponible. La naturaleza de un material energético añadido influye en el aumento de la actividad, e igualmente en la especificidad de la comunidad bacteriana que responde. Los suelos con elevado contenido de materia orgánica, tienden a contener organismos con mayores exigencias, mientras que la fracción asociada a las raíces de las plantas, posee un nivel más elevado de organismos con menores exigencias (Wild, 1993; Paul y Clark, 1996; Tate, 2000).

En cuanto a la variabilidad en el número de bacterias edáficas, se sabe que no están uniformemente distribuidas a lo largo del perfil o largo de un horizonte. Cuando se hacen pruebas cada 24 horas e incluso cada 2 horas, el número de bacterias que se detectan cambia drásticamente. Al intentar relacionar estos cambios con los factores ambientales, se ha comprobado que pueden producirse dichos cambios de abundancia incluso, cuando los parámetros permanecen constantes. Lo que sí se ha observado (con muy pocas excepciones) es que su distribución en el suelo simula la distribución de materia orgánica, y en los casos en que la distribución típica del perfil está desordenada, es decir, en donde el máximo bacteriano no se da a la misma profundidad del perfil que el máximo valor para la materia orgánica, la disconformidad puede deberse a condiciones de aridez o acidez en la superficie del suelo que impiden un desarrollo bacteriano abundante (Wild, 1993).

2.1.4.1 FISIOLOGÍA MICROBIANA

La capacidad de los microorganismos para utilizar los nutrientes de sus alrededores, les confiere la habilidad para permanecer en un hábitat. Los nutrientes tienen tres funciones principales: proveer los materiales que se requieren para la síntesis protoplasmática (anabolismo), abastecer de la energía necesaria para el crecimiento celular (catabolismo), y servir como aceptores de electrones liberados en la reacción que proporciona energía a los microorganismos; las diferencias de nutrición se relacionan principalmente con las moléculas que contienen carbono y nitrógeno. Para obtener el crecimiento microbiano máximo debe explotarse la capacidad metabólica de dichos microorganismos, principalmente en relación con la fuente de energía y la eliminación o neutralización de productos que se acumulan en el medio (Parés, 1997; Ladd y cols., 1996).

La composición elemental difiere de un microorganismo a otro, pero como valores medios se obtienen: 50% de carbono, 20% de oxígeno, 14% de nitrógeno, 8% de hidrógeno, 3% de fósforo, 2% de potasio, 1% de azufre y 0.05% de calcio y magnesio, 0.2% de hierro y 0.3 % en elementos traza que comprenden manganeso, cobalto, cobre, zinc y molibdeno (Parés, 1997).

Es importante tomar en cuenta que, para una cepa determinada, un medio de cultivo definido y unas condiciones de desarrollo constantes, se encuentra la misma composición, en cambio puede variar de un microorganismo a otro. El número y la actividad de los microorganismos están controlados, parcialmente, por la cantidad de energía que pueda liberarse en la descomposición de materia orgánica. Aunque la generación de energía es un proceso vital básico, los microorganismos del suelo, presentan una amplia capacidad de adaptación que refleja distintas condiciones ecológicas que pueden presentarse en un suelo. Se utilizan tres mecanismos metabólicos para la liberación de la energía contenida en los substratos orgánicos, pudiendo algunos tener acceso a más de uno en función de las condiciones en que se desarrollan (Alexander, 1994).

Respiración aerobia: Es el proceso utilizado por los microorganismos aerobios estrictos y anaerobios facultativos en presencia de oxígeno; comprende una serie de reacciones de oxidación, en las que los electrones son conducidos por una cadena de transportadores, los citocromos, hasta llegar al oxígeno como aceptor terminal de electrones. El metabolismo básico de bacterias aerobias, da como resultado la formación de bióxido de carbono, agua y enlaces fosforados ricos en energía, como el adenosindifosfato (ADP) que se transforma a adenosintrifosfato (ATP), el cual se emplea en diversas reacciones metabólicas (Parés, 1997; Tan, 1994).

Respiración anaerobia: Es el proceso en el que el oxígeno no está disponible y algunos microorganismos son capaces de utilizar otros aceptores inorgánicos como el CO₂, los sulfatos y los nitratos, generando metano, sulfuros y nitrógeno molecular (Tan, 1994). Las etapas iniciales de la respiración aerobia y anaerobia son iguales, y sólo se diferencian en el aceptor de electrones terminal.

La cantidad de ATP generado depende de la diferencia entre el potencial redox del sustrato inorgánico que se oxida y del aceptor de electrones; por lo que la respiración anaerobia es menos eficaz en términos de producción de energía (Wild, 1993; Parés, 1997; Brock y Madigan, 1993).

Fermentación: Es el proceso en el que se utilizan sustratos fosforilados como aceptores de electrones, independientemente del oxígeno, es decir, no se requiere de un aceptor de electrones terminal inorgánico, sino que un sustrato orgánico actúa en ambos sentidos, como donante y como aceptor; lo emplean las bacterias anaerobias estrictas, anaerobias facultativas y las levaduras. Por ejemplo, los fermentadores llamados también acetógenos, producen azúcares, aminoácidos, péptidos y alcoholes, los cuales pueden ser usados por las bacterias metanogénicas y reductoras de sulfatos. (Wild, 1993)

2.2 CONTAMINANTES ORGÁNICOS DEL SUELO

La contaminación del suelo, puede definirse como el incremento de la concentración de un agente (biótico o abiótico) introducido o natural, que dificulta o anula la capacidad del suelo para degradarlo e incorporarlo a la vía de los ciclos biogeoquímicos.

Se han identificado más de 1600 compuestos orgánicos, siendo de interés aquellos que contaminan el subsuelo y que a menudo, se asocian con combustibles fósiles. Los productos refinados del petróleo, son generalmente mezclas complejas, con una variedad de compuestos orgánicos con fracciones minoritarias de aditivos orgánicos que se encuentran dentro de diferentes clases químicas. Por ejemplo, la gasolina, el keroseno, el diesel y los aceites de desecho que tienen diferentes características físicas y químicas, y por lo tanto, se comportan de diferente forma en el ambiente (Suthersan, 1997).

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos que contienen sólo carbono e hidrógeno y son muy insolubles en agua. Los de bajo peso molecular son gases, mientras que los de alto peso molecular son líquidos o sólidos a temperatura ambiente. Con base en su estructura se pueden dividir en dos clases primarias: alifáticos y aromáticos. Los primeros se dividen en alcanos, alquenos, alquinos y otros análogos cíclicos. Los compuestos aromáticos tienen una configuración en forma de anillo y tienden a sufrir una sustitución heterocíclica.

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos, son moléculas orgánicas no polares, constituidas por dos o más anillos aromáticos (químicamente muy estables), y son generados por la combustión incompleta de hidrocarburos saturados bajo condiciones deficientes de oxígeno (Chávez, 1997). En áreas urbanas o industriales, las fuentes antropogénicas tales como quema de madera y aceites fósiles, la producción de carbón, incineración comercial e industrial, son las principales fuentes de generación de HPA. Asimismo los HPA, son frecuentemente encontrados en lugares con actividad volcánica, producto de una combustión incompleta, en combustibles sólidos, efluentes industriales, preservadores de madera, plaguicidas, herbicidas, colorantes y productos farmacéuticos (Lesage y Jackson 1993; Moorman, 1996).

Un compuesto tan sencillo como el metano, por medio de la pirosíntesis, puede actuar como precursor de los compuestos aromáticos policíclicos. Este fenómeno se da cuando la temperatura excede los 500°C y las ligaduras C-H y C-C son rotas, formando radicales libres, los cuales sufren una deshidrogenación y se combinan químicamente con estructuras aromáticas cíclicas, resistentes a la degradación (Lesage y Jackson, 1993).

2.2.1 PROCESOS DE TRANSPORTE DE CONTAMINANTES

Los procesos que afectan el comportamiento y partición de los contaminantes en el suelo son: los procesos hidrodinámicos, los abióticos y los bióticos. Los primeros afectan el transporte por el impacto del flujo del agua en el suelo. Los procesos abióticos, afectan el transporte al causar interacciones entre el contaminante y el material de suelo estacionario (adsorción, volatilización e intercambio iónico), o por afectación a la forma del contaminante (hidrólisis, reacciones redox). Los procesos bióticos pueden afectar el transporte por degradación del contaminante (orgánico), o por inmovilización del contaminante disuelto (disolución de metales pesados), o en la utilización del contaminante en los procesos metabólicos (Suthersan, 1997)

Los contaminantes orgánicos son transportados en el suelo en cuatro fases distintas: 1) como producto libre o LFNAL (líquidos de la fase no acuosa), 2) como fase adsorbida, 3) como fase disuelta, y 4) como fase vapor. La distribución del contaminante dentro de las diferentes fases, como resultado de la dinámica de transporte, es finalmente una función de sus propiedades físicoquímicas en las que se incluyen, la densidad, solubilidad, viscosidad, además de las características del medio que las rodea como son el tipo de suelo, su permeabilidad, el tamaño de las partículas, su contenido de humedad y de materia orgánica, así como la profundidad del manto freático. Los factores climatológicos como la temperatura y las precipitaciones pluviales, también tienen una gran influencia. Todas las variables en su conjunto, definen la distribución y el tamaño de la pluma de contaminación en una zona específica (Pichtel, 2000).

Los LFNAL son inmiscibles o escasamente solubles en agua. Cuando se derraman, inician su migración a través de la zona no saturada (vadosa) como una fase separada (aire, agua y LFNAL). Si no hay una unidad edáfica impermeable que detenga su transporte, pueden continuar su migración desplazando aire bajo la influencia de las fuerzas de gravedad y capilaridad. En su trayectoria, los LFNAL cubren la matriz sólida, algunos se disuelven en la humedad del suelo, algunos se volatilizan y algunos comienzan a ser atrapados en los espacios porosos, en respuesta a las fuerzas de capilaridad. Estos procesos influyen por tanto, en la velocidad de desplazamiento de los compuestos, originando el fenómeno de retardación.

Por otra parte, cuando el volumen del derrame excede la capacidad de retención de la zona no saturada, los LFNAL alcanzarán la franja capilar, quedando dos fases inmiscibles. En esta zona, los LFNAL deben desplazar el agua de los poros para continuar su migración. Así, la densidad de los LFNAL juega un papel muy importante en su movimiento subsecuente.

En la zona no saturada, los contaminantes orgánicos se presentan como fase vapor, ocurriendo la liberación del contaminante a altas presiones de vapor. La formación de la fase de vapor es una función de la volatilización de los LFNAL del suelo cubierto, y de la fase disuelta en los compartimientos del agua subterránea. El comportamiento de la fase de vapor, es el resultado de las interacciones con y entre estos comportamientos (Suthersan, 1997).

En México, el incremento de las necesidades energéticas e industriales, conlleva al desarrollo de actividades en las que de alguna forma se ve involucrado el empleo y almacenamiento de combustibles. Los problemas de contaminación sobre los recursos naturales (agua, aire, suelo, flora y fauna) se han incrementado, representando un riesgo para la salud pública. En materia de contaminación del suelo, actualmente se tiene más conciencia; sin embargo, los problemas de contaminación del mismo se remontan al pasado y muchos de ellos continúan repercutiendo en los ecosistemas.

Las redes de ductos de distribución, están siempre sujetas a riesgos de accidentes de diversa índole como: derrames, explosiones, incendios y fugas de gases. Las tuberías, ductos y tanques de almacenamiento de combustibles generalmente no se revisan con la frecuencia requerida. Otros derrames de hidrocarburos que ocurren accidentalmente se refieren a volcaduras de pipas, y como parte de las actividades de transporte. A todo ello se añaden las tomas clandestinas que son muy comunes y poco denunciadas (Saval, 1997)

Tabasco, Poza Rica en Veracruz y el estado de México, son sitios contaminados por hidrocarburos, lo que permite apreciar la cantidad de trabajo e investigación que hay que realizar en los suelos del país, para recuperarlos, ya sea para fines recreativos, de construcción tanto habitacional como industrial, o para el desarrollo de la agricultura.

2.3 EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS EN EL SUELO

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

La biodegradación, es considerada el principal proceso, en el que los compuestos orgánicos son transformados a productos inorgánicos como bióxido de carbono, agua, y sales minerales. En ecosistemas naturales, la biodegradación de los compuestos orgánicos se presenta como una opción viable para el tratamiento de suelos contaminados con compuestos químicos orgánicos.

La biodegradación natural sobre los compuestos orgánicos, tanto en sistemas acuáticos como terrestres, tiene gran importancia en el funcionamiento de la biósfera. La participación de los microorganismos nativos presentes en el subsuelo, en los ciclos biogeoquímicos, por su gran versatilidad fisiológica, resulta ser la mejor opción de depuración pudiendo llevar a cabo, la biodegradación en ambientes aerobios y anaerobios (Ladd, 1996; Baker y Herson, 1994).

La descomposición microbiana del petróleo y sus productos, es de considerable importancia económica y ambiental. Dado que es una fuente rica de materia orgánica, y la mayoría de los hidrocarburos que contiene son fácilmente atacados por una amplia variedad de microorganismos. Por lo tanto, no es de sorprender que cuando el petróleo queda en contacto con el aire y la humedad sea sometido al ataque de los microorganismos, de hecho, la mayoría de suelos contienen un número de 10^6 UFC por gramo de suelo de microorganismos nativos capaces de degradar hidrocarburos (Michael, 1994). Dicho proceso depende de los procesos biológicos naturales que detienen o reducen la diseminación de los derrames. Por este motivo, se requiere la caracterización extensiva del sitio, a efecto de evaluar hasta que punto, los microorganismos son capaces de contrarrestar la contaminación.

2.3.1 BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

Los hidrocarburos se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente oceánico, atmosférico y terrestre, pero su presencia puede o no, tener origen en el petróleo; Debido a esto, es difícil determinar el origen de los hidrocarburos presentes en una muestra ambiental basada únicamente en su composición. Tal dificultad refleja las muy variadas fuentes y flujos de hidrocarburos, lo cual determina la magnitud y el intervalo de entrada de estas sustancias, a un sector particular del ambiente (Botello, 1996).

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

En el suelo los hidrocarburos están sujetos a una rápida infiltración vertical y, a menos que esto se prevenga por un clima frío o por saturación de agua, la evaporación y la fotodegradación de hidrocarburos en el suelo es muy baja, llegando a ser sólo del 1 al 2% del derrame (Wang y Bartha, 1994). Antes de que ocurra un derrame de petróleo en el suelo, el aire y agua están contenidos en los espacios intersticiales de las diferentes zonas del suelo, en una relación directamente proporcional a la profundidad (la saturación se incrementa, conforme aumenta la profundidad). Sin embargo, después de que ocurre un derrame, los hidrocarburos del petróleo compiten con el agua y el aire por los espacios porosos. El vapor de los hidrocarburos puede rápidamente desplazar al aire, mientras que el volumen de los hidrocarburos líquidos, compite con el agua por los espacios intersticiales disponibles. Los hidrocarburos derramados, se mueven hacia abajo debido a la fuerza de gravedad; aunque puede ocurrir una migración horizontal debido a la fuerza de capilaridad entre el líquido derramado y las partículas del suelo (Alexander, 1994).

La utilización de los hidrocarburos alifáticos saturados, por parte de los microorganismos, es un proceso más bien aerobio, ya que el paso inicial para la oxidación de este tipo de hidrocarburos implica oxígeno molecular como uno de los reactantes. Durante el proceso, uno de los átomos de la molécula de oxígeno, se incorpora al hidrocarburo, de modo que sin oxígeno, los hidrocarburos prácticamente no son afectados por los microorganismos (Parés, 1997)

Algunos hidrocarburos aromáticos pueden ser empleados como donadores electrónicos por microorganismos aeróbios, de ellos, el género *Pseudomonas* ha sido el más estudiado. La degradación de compuestos por dicho género, inicia con el ataque de enzimas específicas como la dioxigenasa (por ejemplo, en la degradación del 2 y 4 nitrotolueno) encargada de la desintegración de las moléculas (Haigler y Spain, 1993). Así, la biotransformación de muchos contaminantes orgánicos, es facilitada por enzimas que actúan durante las funciones metabólicas normales de los microorganismos.

Las ventajas de dicha biotransformación incluyen, la completa mineralización de los contaminantes a productos inocuos, y el hecho de que las reacciones enzimáticas mediadas por microorganismos, son mucho más rápidas que las que se llevan a cabo en ausencia de ellos (Bouwer, 1992).

Por otro lado, se ha demostrado que el metabolismo de estos compuestos tiene como estado inicial la formación de dos moléculas: protocatecuato y catecol, como productos del catabolismo oxidativo. Estas dos moléculas a su vez, pueden ser transformadas en compuestos que entran al ciclo del ácido cítrico: succinato, acetil-CoA, piruvato. En varios pasos de la degradación de estos hidrocarburos, por lo general, se requieren oxigenasas (Atlas y Cerniglia, 1995).

2.3.2 FACTORES AMBIENTALES INVOLUCRADOS EN LA BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

Temperatura

Este factor influye sobre la actividad de los microorganismos, siendo el intervalo entre 24 y 35 °C, el considerado como óptimo. Asimismo, contribuye al aumento de la velocidad de biodegradación dentro de cierto intervalo, es decir, las reacciones bioquímicas incrementan su velocidad con el aumento de la temperatura.

Humedad del suelo

Para sistemas aerobios, se considera un valor óptimo entre 48 y 68%, esta característica promueve una disolución adecuada del contaminante. Sin embargo, la humedad excesiva del suelo (mayor al 70%) disminuye la permeabilidad y porosidad del mismo, lo que su vez reduce de manera significativa, la actividad microbiana, lo cual se traduce en una reducción de la velocidad de biodegradación (Ladd y cols., 1996).

Concentración de oxígeno disponible

La oxigenación es el paso inicial del catabolismo de los HPA, empleando el complejo enzimático citocromo P-450, que requiere oxígeno (Atlas y Cerniglia, 1995). El oxígeno actúa como el aceptor terminal de electrones y es necesario para estimular la actividad de los microorganismos degradadores. En algunos casos, donde la concentración de oxígeno es insuficiente, para mantener la respiración aerobia, el nitrato (NO_3), sulfato (SO_4), hierro (Fe^{3+}) y manganeso (Mn^{2+}), pueden actuar como aceptores de electrones, si los microorganismos cuentan con los sistemas enzimáticos necesarios (Fan y Tafuri, 1994). En presencia de suficiente cantidad de oxígeno, los procesos de oxidación prevalecen sobre las reacciones de reducción. Tales condiciones se encuentran en suelos bien drenados o bien aireados.

La concentración de oxígeno puede ser disminuida en la fase gaseosa por factores como, bajas temperaturas y bajo contenido de humedad del suelo, por supuesto, esta deficiencia afecta a toda la actividad microbiana. (Tan, 1994)

Acidez y alcalinidad (PH)

El valor de pH del suelo se relaciona con la capacidad de intercambio iónico del mismo. El pH afecta el comportamiento de las funciones celulares, transporte en la membrana celular y el equilibrio de las reacciones catalizadas de los microorganismos.

El crecimiento bacteriano se lleva a cabo en condiciones neutras a ligeramente alcalinas que, además, son óptimas para la biodegradación rápida. Así, el intervalo óptimo considerado es de 6.5 a 8.0. El valor óptimo dentro de estos márgenes se encuentra muy cercano al punto neutro hacia el lado alcalino; sin embargo, existen bacterias que crecen en condiciones altamente ácidas o alcalinas, como las acidófilas que crecen en un intervalo de pH de 1 a 6, y las extremo acidófilas que crecen realmente en valores de pH de 1 a 3, por ejemplo, algunas especies de *Thiobacillus*, *Thermoplasma* y *Sulfolobus*.

Por otro lado, algunos alcalófilos moderados son *Nitrosomonas spp* que crecen en un intervalo de 7.3 a 9.6, y algunas bacterias son extremo alcalófilas capaces de crecer a un pH de 13 (Paul y Clark, 1996).

Densidad del hidrocarburo

Del valor de este parámetro, depende la penetración y solubilidad en el medio acuoso y es además, determinante en la migración del contaminante. Para que la actividad microbiana se realice, el contaminante debe solubilizarse en el suelo mediante el uso de solventes no tóxicos para los microorganismos (Aguilera y Martínez, 1996).

Concentración de nutrimentos esenciales

Los requerimientos nutritivos de un organismo, están determinados por la composición química de la célula, así como por factores del medio ambiente, variando ampliamente en sus características genéticas y, consecuentemente, en sus propiedades fisiológicas y su capacidad para utilizar y transformar a los diferentes compuestos químicos (Parés, 1997).

De los nutrimentos requeridos para el crecimiento de los microorganismos están el nitrógeno y el fósforo, los que probablemente llegan a estar presentes de manera deficiente en el suelo contaminado, por lo que normalmente deben agregarse al sistema de biorremediación en una forma disponible (por ejemplo amonio como fuente de nitrógeno, y fosfatos como fuente de fósforo).

El nitrógeno, existe en el suelo en formas orgánicas e inorgánicas y está presente en varios estados de oxidación (de -3 a +6). El contenido de nitrógeno total en el suelo varía considerablemente de 0.05% en suelos desérticos, hasta 0.3% en suelos de regiones húmedas o semihúmedas. El nitrógeno, es la clave para la construcción de aminoácidos, proteínas, nucleótidos y vitaminas. También se ha reportado que el sulfato de amonio proporciona un mayor crecimiento de la microbiota responsable de la degradación, que el nitrato de amonio (Tate, 2000).

Por su parte, el fósforo existe en el suelo como compuesto orgánico e inorgánico. Algunos de los compuestos en la fracción orgánica del suelo, considerados fuentes potenciales de fósforo son los fosfolípidos y los ácidos nucleicos. La concentración de iones fosfato en el suelo es muy pequeña y se estima en 1mg/L o menos (Tan, 1994). Específicamente, la adición de fosfatos contribuye a la formación de ATP para llevar a cabo las funciones metabólicas y en la conformación de ácidos nucleicos y coenzimas, así como otros compuestos necesarios para el desarrollo de los microorganismos. (Bewley, 1996; Michael, 1994; Tate, 2000).

De igual forma, se han reportado relaciones experimentales que señalan que es necesario adicionar 150 mg de nitrógeno y 30 mg de fósforo para convertir 1 g de hidrocarburo en material celular; sin embargo, la relación C:N que se adicione, dependerá de algunas razones como:

- (1) El grado de recalcitrancia del contaminante, el cual puede variar sustancialmente para compuestos del petróleo. Tales residuos pueden ser mineralizados a bióxido de carbono y agua o incorporados a la biomasa celular.
- (2) La disponibilidad de carbono orgánico en el suelo puede variar, no exactamente el que es parte del contaminante, sino el que puede presentarse como materia orgánica.
- (3) Asimismo, se debe considerar que durante la degradación del hidrocarburo, aproximadamente se convierte la mitad en material celular y el resto se oxida para obtener energía (Bewley, 1996; Michael, 1994).

Otros factores son: el contacto adecuado ("bioaccesibilidad"); presencia de microorganismos, ya sea autóctonos o alóctonos aclimatizados expresando suficiente actividad metabólica, y la adición de micronutrientes (trazas de metales, azufre, hierro, potasio, calcio, magnesio y manganeso), aunque en este caso es difícil predecir la cantidad, debido a la influencia de otros factores sobre el proceso de degradación (Rogers y cols., 1993; Fletcher, 1994)

2.3.3 PARTICIPACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN LA LIMPIEZA DE SUELOS

El suelo es un sistema complejo, heterogéneo y cambiante, de modo que los microorganismos que pudieran tener algún predominio, deben contar con la capacidad de adaptación a las condiciones dadas. Sobre esto, se considera que algunos microorganismos, desarrollaron la capacidad de degradar ciertos compuestos específicos, pudiendo utilizarlos como fuente de carbono bajo condiciones óptimas de crecimiento (Zehnder, 1995; Tan, 1994).

Un contaminante orgánico se distribuye entre las 4 fases del suelo, dependiendo principalmente de su solubilidad y volatilidad, por lo que la interacción del contaminante con las fases del suelo, puede hacer a un compuesto orgánico más o menos susceptible al tratamiento biológico.

Los microorganismos normalmente producen una capa superficial viscosa, constituida por polímeros de polisacáridos, que les permite incrementar sus propiedades adhesivas a las partículas, además, por lo general están restringidos a ambientes húmedos debido a que requieren agua para vivir, siendo influenciados por la interfase sólido-líquido.

Dentro de los mecanismos de adaptación, se resalta el papel que desempeñan las entidades extracromosomales de ADN, especialmente de los llamados plásmidos. Dichas unidades pueden contener genes responsables para la síntesis de enzimas específicamente inactivadoras de nuevos antibióticos en microorganismos, cambios de resistencia de bacterias hacia ellas mismas, o para degradar sustancias xenobióticas (Zehnder, 1995).

El control de la formación y actividad enzimática, es sin duda, uno de los principales medios de adaptación en microorganismos y especialmente en bacterias, representando una respuesta de los microorganismos a condiciones de medios multisustratos como el suelo, el cual facilita el uso del sustrato más favorable para el mayor crecimiento y síntesis celular.

Para sistemas naturales como el suelo, composta y lodos biológicos, colonizados por una comunidad microbiana heterogénea, es característico que la fuente de carbono y energía controlen el crecimiento microbiano y que los sustratos disponibles puedan ser usados por una sucesión de poblaciones microbianas y comunidades (Wild, 1993).

El proceso de biodegradación se basa en la coalición de las partículas contaminantes con las enzimas responsables de su degradación en el interior de la bacteria, lo que dependerá del tipo de enlaces entre el contaminante y la enzima, así como la conformación y localización de los núcleos activos de la misma. Una vez que el contaminante ha penetrado la membrana del microorganismo, este último puede usar varios mecanismos tanto para mineralizar como para cometabolizar los contaminantes orgánicos. El hecho de que un compuesto pueda o no ser utilizado como nutrimento, está determinado principalmente por dos factores, el primero, es la capacidad del compuesto de ingresar al interior del microorganismo, lo que significa atravesar la membrana plasmática y, el segundo, es si el microorganismo es capaz de sintetizar las enzimas que se necesitan para su metabolismo (Parés, 1997). La rapidez con la que los microorganismos degraden los contaminantes, está influenciada por el contaminante y su concentración, el suministro de oxígeno y humedad, temperatura, nutrimentos y cometabolismo (Tate, 2000).

Por otro lado, pese a que las bacterias se adaptan fácilmente a cualquier hábitat, se presenta competencia con la microbiota autóctona, por lo que se requiere de muchas inoculaciones. Por lo anterior, se sugiere la estimulación o enriquecimiento de la población microbiana autóctona, en lugar de aplicar microorganismos alóctonos que probablemente mueran por la competencia; la razón principal es que los microorganismos autóctonos responsables de la biodegradación de contaminantes, son consorcios con características propias dependiendo de las condiciones microambientales del lugar donde se encuentran (Saval, 1997).

2.3.4 MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS

La utilización de hidrocarburos por los microorganismos es ampliamente distribuida en los ambientes marinos y en suelos donde existen derrames de petróleo (Atlas, 1994). Los compuestos orgánicos contaminantes pueden ser degradados por los microorganismos del suelo, que los utilizan como fuente de carbono y energía (Folsom y Chapman, 1991).

En general, el nivel de población de los microorganismos que utilizan hidrocarburos y sus proporciones con respecto a otras comunidades microbianas, parece ser un índice sensible de la exposición de los hidrocarburos en el ambiente. En un ecosistema contaminado por petróleo, la comunidad microbiana puede constituir hasta 100% de los microorganismos viables (Ladd y cols., 1996).

La habilidad para degradar hidrocarburos como el petróleo no está restringida a pocos géneros microbianos; los principales responsables de la descomposición del petróleo y sus productos, son bacterias y hongos; se ha demostrado que ciertos mohos, levaduras, algunas cianobacterias y algas verdes tienen esta habilidad (Wise y Trantolo, 1994).

Las poblaciones bacterianas responden favorablemente a la adición, en el suelo, de parafinas y otros hidrocarburos alifáticos derivados del petróleo, provocando que estos sustratos vertidos en el suelo lleguen a desaparecer (Alexander, 1990). De manera particular, los géneros de bacterias más importantes que utilizan hidrocarburos son: *Staphylococcus*, *Acinetobacter* (Marín y cols., 1996), *Alcaligenes*, *Serratia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* (Folsom y Chapman, 1991; Haigler y Spain, 1993; Dott, 1992), *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Brevibacterium*, *Flavobacterium*, *Candida*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces* (Wise y Trantolo, 1994), *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Aeromonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Streptomyces* y *Xanthomonas* (Atlas y Cerniglia, 1995). En los últimos años se han estado comercializando en México productos bacterianos o tecnologías de los cuales, se desconocen sus alcances y limitaciones. Los productos se venden como polvos mágicos capaces de destruir todo tipo de contaminantes y van acompañados de aditivos cuya formulación está patentada. En el caso de los aditivos, éstos contienen nutrimentos y tensoactivos, pero estos últimos, aunque sean biodegradables, al aplicarse "in situ" ayudan a la dispersión de los contaminantes más que a su degradación (Saval, 1997).

Por lo anteriormente mencionado, se plantearon para la presente tesis los siguientes:

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la factibilidad de biodegradar de manera aerobia los HPA contenidos en un suelo conformado artificialmente, según las características de un suelo antrópico contaminado típico de zona petrolera.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar de manera edáfica el suelo antrópico seleccionado para la realización del estudio.
2. Enriquecer cultivos bacterianos autóctonos y valorar su actividad degradadora de hidrocarburos alifáticos.
3. Seleccionar dos HPA para evaluar su biodegradación aerobia, bajo condiciones controladas en un suelo conformado artificialmente, tomando como base la composición edáfica del suelo antrópico previamente caracterizado. Para lograr lo anterior, el suelo conformado fue contaminado con concentraciones conocidas de criseno, antraceno y dibenzo (a, h) antraceno, induciendo, de esta manera, la biodegradación de dichos hidrocarburos.
4. Aislar a las principales bacterias heterótrofas, degradadoras de criseno y antraceno y caracterizarlas genotípicamente, mediante análisis molecular.

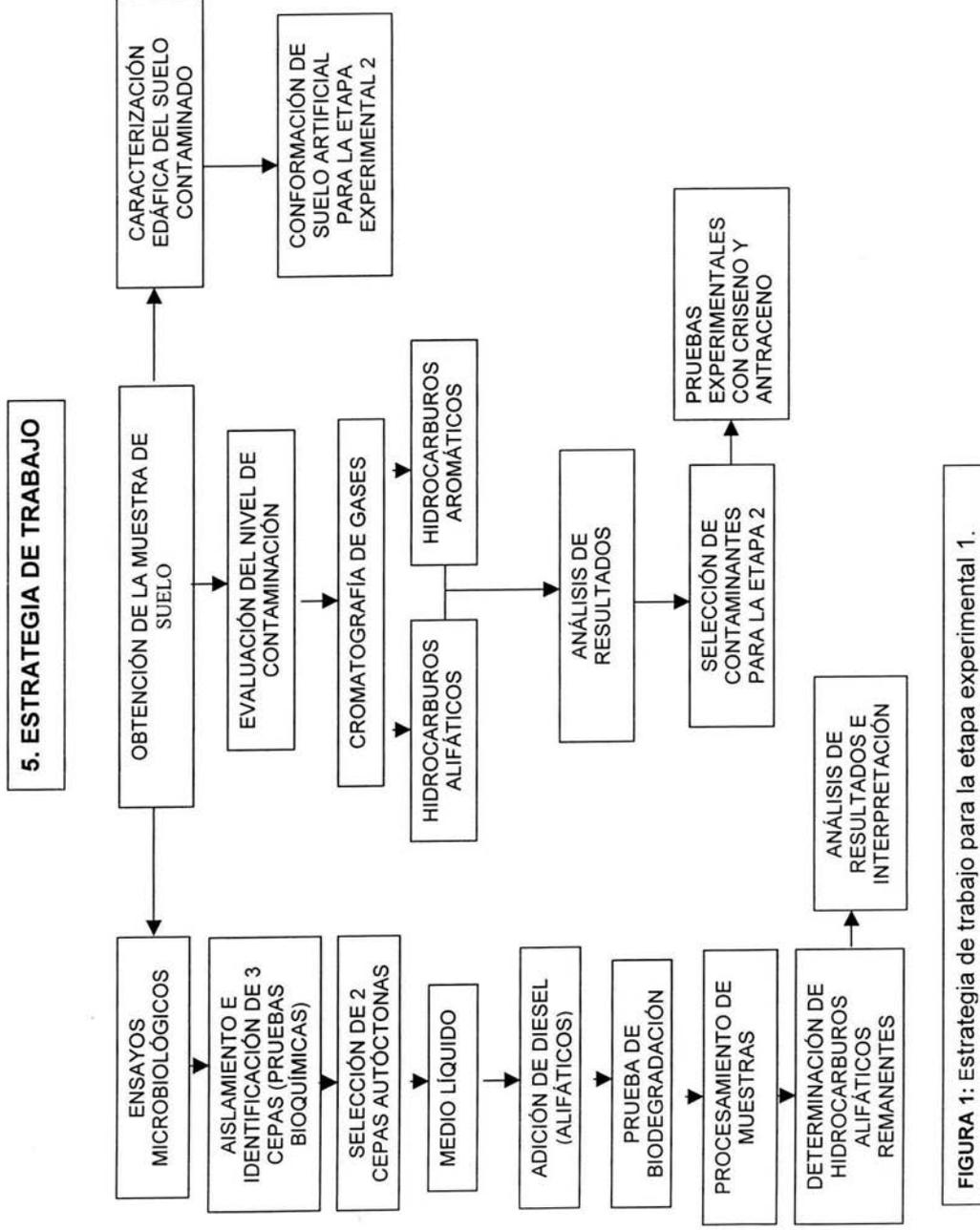


FIGURA 1: Estrategia de trabajo para la etapa experimental 1.

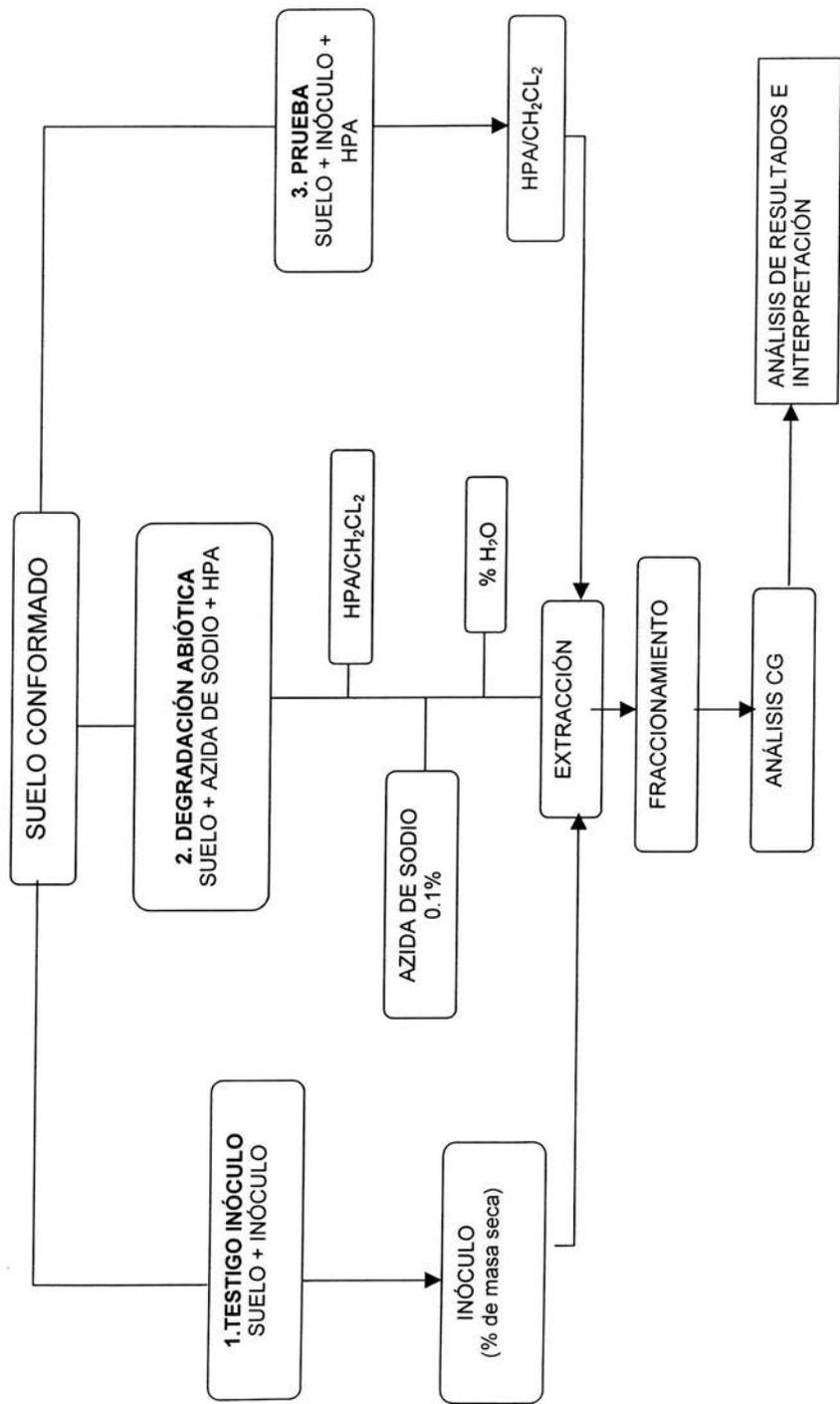


FIGURA 2: Secuencia de actividades para valorar la degradación abiótica de antraceno y criseno en el suelo conformado artificialmente.

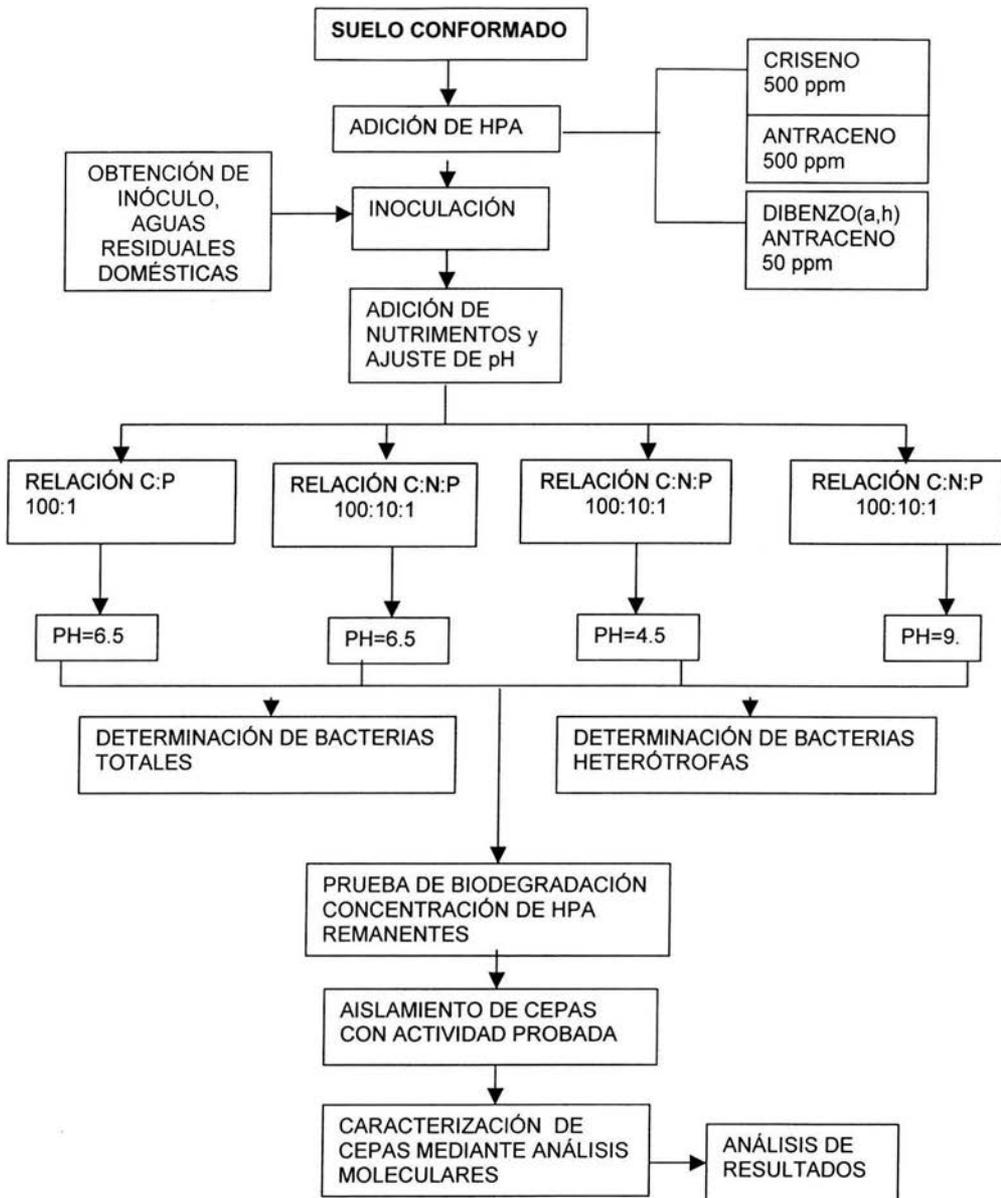


FIGURA 3: Secuencia de actividades realizadas durante la etapa experimental 2.

5. ETAPA 1. CARACTERIZACIÓN Y BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS EN UN SUELO ANTRÓPICO

5.1 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

El muestreo del suelo fue realizado según la USDA-SCS (1986), eligiendo varios puntos al azar y conformando una muestra compuesta; dicho muestreo fue realizado por el Instituto Mexicano del Petróleo y la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Una vez que la muestra estuvo en el laboratorio, se procedió a su homogeneización y se mantuvo en refrigeración a 4 °C. Para la determinación de parámetros físicos y químicos, se secaron dos kilogramos de suelo a temperatura ambiente (Ruiz y cols., 1997; Chávez, 1997).

5.1.2 PROCEDIMIENTO PARA LA CARACTERIZACIÓN EDÁFICA DE LA MUESTRA DE SUELO

Se determinaron las características físicas y químicas del suelo indicadas en la tabla 1.

TABLA 1. Técnicas empleadas para la caracterización edáfica del suelo

Parámetro	Técnica empleada
pH	Potenciómetro (Reyes Jaramillo, 1996)
Color	Código de Munsell (1996)
Densidad aparente	Método de la probeta
Densidad real	Picnómetro (Reyes Jaramillo, 1996)
Espacio poroso	Por cálculo a partir de densidad real y aparente
Nitrógeno total	Kjeldahl (Jackson, 1982)
Fósforo como fosfatos	Bray-I (1945) (Reyes Jaramillo, 1996)
Textura	Hidrómetro de Bouyoucos (Reyes Jaramillo, 1996)
Materia orgánica	Walkley y Black (1934) (Reyes Jaramillo, 1996)

Nota: La descripción y fundamento de las técnicas se encuentra en el anexo A.

5.1.3 PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS EN EL SUELO

Para la caracterización de los hidrocarburos tanto alifáticos como aromáticos de la muestra, se empleó la técnica UNEP/IOC/IAEA (1992) "Determination of petroleum hydrocarbons in sediments, Reference Method No. 20. United Nations Environment Programme".

El suelo húmedo se seco a temperatura de 40 a 50 °C, se maceró en un mortero de porcelana y se tamizó a través de una malla de 200 mm. Se tomó una submuestra del suelo tamizado de 5 g, con base peso seco, para realizar la extracción. La descripción detallada del procedimiento se muestra en el anexo B.

En la muestra de suelo antrópico, se llevó a cabo el aislamiento de cultivos bacterianos, identificación y selección de cepas autóctonas a fin de evaluar su actividad degradadora de hidrocarburos alifáticos, los cultivos fueron identificados hasta nivel de género mediante patrones culturales de crecimiento y pruebas bioquímicas de diagnóstico.

5.1.4 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN EL SUELO

El procedimiento consistió en adicionar (en condiciones estériles) a un matraz con 100 mL de caldo Casoy, 1 g de suelo contaminado con hidrocarburos, agitando en un vortex por 60 segundos. Por otro lado, se prepararon tubos con un medio mínimo de nitrógeno ajustado a pH 7, los cuales se esterilizaron a 15 Psi por 15 minutos, y se colocaron en posición inclinada, a fin de tener mayor área de contacto, sobre este medio se adicionó 1 mL de petróleo diáfano y se inocularon 0.1 mL del matraz preparado inicialmente (Fletcher, 1994).

Los tubos se mantuvieron a 24.5 °C durante 72 horas, al cabo de las cuales se tomó una muestra con una asa microbiológica, sembrando mediante estría cruzada en medio tripticosa soya agar e incubando a 24.5 °C durante 7 días.

Posteriormente se realizaron resiembras con el objeto de obtener colonias puras. Una vez obtenidas las cepas, éstas fueron conservadas en un medio con nitrógeno y 0.2 mL de petróleo diáfano.

5.1.5 ENSAYO DE DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS EMPLEANDO LAS CEPAS AISLADAS

Para las pruebas de degradación se utilizó medio mineral con 5% de diesel, con 0.1 mL de la suspensión bacteriana a probar, incubada previamente durante 24 horas. Como testigo, se empleó un matraz con el medio de degradación sin inocular, éste representa el control de medio para evitar que la emulsión diera un falso positivo. Los matraces se incubaron a 25 °C, en agitación constante con revisión a las 48, 96 y 120 horas. Esta revisión consistió en sacar los matraces para dejarlos en reposo por 5 minutos y poder observar turbidez en los medios.

Una vez transcurridos 14 días de incubación, se tomó una muestra para proceder a la extracción y análisis cromatográfico, a fin de verificar la reducción en los niveles de hidrocarburos alifáticos. Un volumen de 100 µL, se pasó por una pipeta Pasteur empacada con fibra de vidrio, 0.4 g de sílica y 0.4 g de alúmina (previa deactivación), la muestra fue eluida con 2.5 mL de hexano (fracción 1) y 2.5 mL de una mezcla de hexano-diclorometano 9:1 y 2.5 mL de una mezcla 5:5 (fracción 2), las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía de gases y los resultados comparados con el control de prueba. Para ello se empleó la técnica propuesta por la UNEP/IOC/IAEA (1992), sólo que se hicieron modificaciones de acuerdo al tamaño de la columna.

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

5.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.2.1 CARACTERÍSTICAS EDÁFICAS DEL SUELO NATURAL CONTAMINADO

La muestra de suelo presentó un color oscuro (pardo-negruzco), debido a la adición de compuestos orgánicos. Este mismo hecho repercutió en el pH, el cual fue ácido (4.2), lo anterior en su conjunto da origen a un horizonte bajo en fertilidad conocido como horizonte dístrico.

De acuerdo con el análisis granulométrico, resultó predominante la fracción arenosa (81.84%), seguida por la arcilla (15.16%) y limo (3%), valores que de acuerdo a la Sociedad Internacional de la Ciencia del Suelo, corresponden a un tipo textural franco-arenoso. Este tipo de suelos, de acuerdo con la FAO-UNESCO, pueden ser clasificados como arenosoles. Los resultados de la caracterización edafológica del suelo contaminado se muestran en la tabla 2.

TABLA 2: Relación de parámetros fisicoquímicos de una muestra de suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo.

PARÁMETRO	SUELO CONTAMINADO
1. Color seco	3/2 7.5 YR café oscuro
2. Color húmedo	negro
3. Valor de pH	4.2
4. Densidad aparente (g/mL)	1.52
5. Densidad real (g/mL)	1.06
6. Espacio poroso (%)	62.92
Sólidos (%)	37.08
Arena (%)	81.84
Arcilla (%)	15.16
Limo (%)	3.00
7. Materia orgánica (%)	14.39
8. Carbono (%)	9.06
9. Nitrógeno (%)	0.060
10. Fósforo (mg/L)	0.48

La clase textural arena, indica que son suelos muy permeables al aire, al agua y a las raíces; sin embargo, se ven limitados por su bajo poder de retención de agua y por su deficiente capacidad de almacenamiento (López, 1987). Lo anterior es corroborado por el valor de porosidad obtenido (62.92%) reportado para arenas de granos individuales, la cual se considera como una porosidad insatisfactoria en cuanto a la eficacia en la retención de agua, sales y gases (Foth, 1996).

Por otra parte, según la clasificación que presenta Aguilera (1996), los altos contenidos de material orgánico (14.4%) no son típicos para estos suelos y su origen puede ser explicado como resultado de adiciones a través de escurrimientos, desbordamientos, o inundaciones estacionales. Además, la geoforma favorece que dichas adiciones tiendan a acumularse, y debido a las condiciones del clima, a mineralizarse rápidamente. Según estudios realizados por Zavala (1993), propiedades como la textura, no son afectadas por derrames de hidrocarburos, ya que ésta es consecuencia del material de depósito aluvial que aportan los ríos, y las propiedades físicas del suelo más afectadas son: la estructura del suelo (debido a la ruptura de los agregados); el potencial hídrico y el aumento en la retención de agua en la capa superficial (Semarnap, 1996).

En cuanto al contenido de carbono orgánico total, éste resultó ser alto (Foth, 1996), esto se debe principalmente a procesos de oxidación y en menor proporción a la modificación de la estructura del suelo por la ruptura de agregados (Elías y Martínez, 1991).

En lo que respecta a los valores de densidad real y aparente de un suelo, éstos dependen de su composición. Así, en la mayoría de suelos minerales, el valor de la densidad real no sobrepasa los 2.65 Mg/m^3 ; mientras que en los suelos con grandes cantidades de minerales pesados como magnetita, epidota, zircón, turmalina y hoblenda puede sobrepasar a dicho valor. La materia orgánica, así como algunos vidrios volcánicos, repercuten en los valores de densidad, originando valores que varían de 1.2 a 1.5 Mg/m^3 (Foth, 1996). El valor de densidad real determinado para el suelo estudiado (1.06 Mg/m^3) se encuentra ligeramente por debajo de este intervalo, debido a la adición de hidrocarburos, ya que éstos provocan una disminución en la densidad de las partículas del suelo (Zavala, 1993). La densidad aparente tiene mucho que ver con la estructura que presenta el suelo, pues toma en cuenta el espacio poroso presente en el sistema. La densidad de la muestra se encuentra dentro del intervalo reportado para este tipo de suelos que es de 1.4 a 1.6 Mg/m^3 (Porta y cols., 1994).

En cuanto al nitrógeno, el valor se encuentra dentro del intervalo clasificado como bajo, acorde con los valores reportados de 0.05% como límite inferior para este tipo de suelos (Bohn y cols., 1993; Fassbender y Bornemisza, 1987). En cuanto al fósforo, el resultado de 0.48% concuerda con el dato reportado inferior a 1 mg/L ya que la concentración de iones fosfato en suelos es muy pequeña (Tan, 1994).

Un efecto indirecto de la presencia de hidrocarburos en el suelo es la disminución de la disponibilidad de ciertos nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, debido a la acidificación del suelo; en este sentido, la máxima disponibilidad del nitrógeno se encuentra entre un pH de 6 a 8, debido a que éste es el intervalo más favorable en el desarrollo de los microorganismos que mineralizan el nitrógeno de la materia orgánica y para aquellos que fijan el nitrógeno simbióticamente.

Por otra parte, la máxima disponibilidad del fósforo está en el intervalo de pH de 7.5 a 6.5; un pH por debajo de 6.5, es asociado con un incremento de hierro y aluminio en solución y la formación de fosfatos de hierro y aluminio relativamente insolubles (Foth, 1996).

5.2.2 HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS Y POLICÍCLICOS AROMÁTICOS PRESENTES EN EL SUELO NATURAL CONTAMINADO

El análisis cromatográfico de la muestra de suelo contaminado, reveló la ausencia de hidrocarburos de bajo peso molecular, tanto alifáticos como aromáticos, debido a que se encuentran en niveles por debajo del límite de detección del equipo (menos de 0.01 $\mu\text{g/g}$). Esta ausencia es atribuible a que son compuestos que se pierden con facilidad por procesos de evaporación u oxidación fotoquímica, principalmente en regiones tropicales con temperaturas elevadas y largos fotoperíodos (Botello y cols., 1996).

TABLA 3: Niveles de hidrocarburos alifáticos detectados en la muestra de suelo contaminado mediante cromatografía de gases. Valores en $\mu\text{g/g}$ en peso seco (ppm)

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (PPM)	COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (PPM)
C10	ND	C23	281.01
C11	ND	C24	373.09
C12	ND	C25	474.82
C13	ND	C26	9.32
C14	4.65	C27	N.D
C15	4.53	C28	N.D
C16	19.69	C29	N.D
C17	32.16	C30	12.25
C18	79.29	C31	N.D
C19	133.43	C32	10.55
C20	126.8	C33	N.D
C21	103.57	C34	27.52
C22	135.27		Suma total= 1827.95

ND= menor de 0.01 $\mu\text{g/g}$

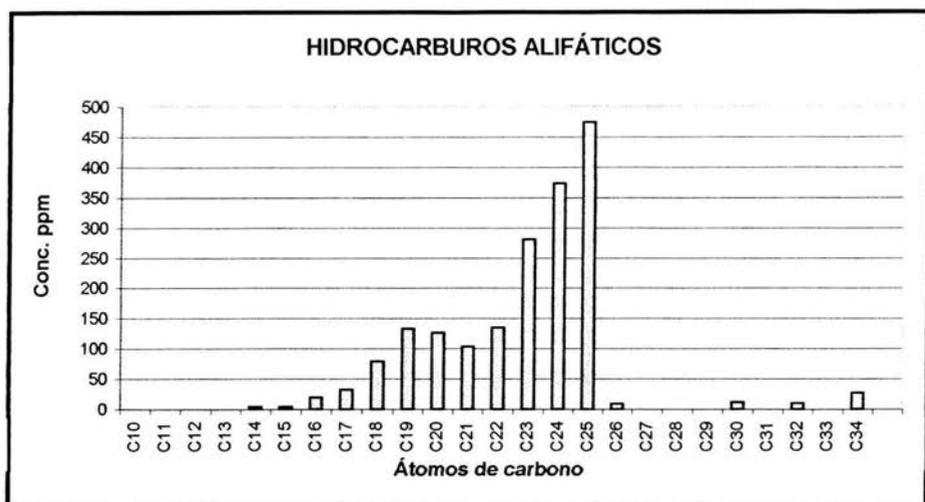


FIGURA 1: Abundancia de hidrocarburos alifáticos detectados en el suelo antrópico.

El análisis cromatográfico del suelo permitió detectar hidrocarburos alifáticos a partir de compuestos con 14 carbonos hasta de 34 carbonos, por comparación del cromatograma de la muestra con un estándar. Las concentraciones de hidrocarburos alifáticos detectadas en la muestra analizada, varían de 4.53 a 478.82 $\mu\text{g}/\text{gramo}$ de peso seco.

De los hidrocarburos registrados, los de 23, 24 y 25 carbonos son los que sobresalen por su alta concentración, con 281.01, 373.09, y 474.82 $\mu\text{g}/\text{g}$, respectivamente; mientras que, la menor concentración se registro para los compuestos de 14 y 15 carbonos con 4.65 y 4.53 $\mu\text{g}/\text{g}$, respectivamente. La concentración total de hidrocarburos alifáticos registrada fue de 1827.95 ppm. Todos los valores corresponden a la muestra de suelo sin diluir, es decir, al 100%. Las concentraciones más altas corresponden a los hidrocarburos de mayor peso molecular (carbonos 18- al 25, Tabla 3).

TABLA 4: Concentración de hidrocarburos policíclicos aromáticos detectados en la muestra de suelo contaminado mediante cromatografía de gases. Valores en $\mu\text{g/g}$ en peso seco (ppm)

NOMBRE DEL COMPUESTO	NÚMERO DE ANILLOS	CONCENTRACIÓN
naftaleno	2	ND
acenaftileno	2	ND
acenafteno	2	ND
fluoreno	2	ND
fenantreno	3	4.4
antraceno	3	3.86
fluoranteno	3	9.1
pireno	4	9.7
Benzo(a)antraceno	4	5.85
criseno	4	3.53
Benzo(b)fluoranteno	4	18.68
Benzo(k)fluoranteno	4	14.44
benzo(a)pireno	5	25.98
Benzo(g,h,i)perileno	5	83.77
Dibenzo(a,h)antraceno	5	46.8
Indeno(1,2,3cd)pireno	5	104.88

En lo que respecta a los hidrocarburos aromáticos detectados en la muestra de suelo, la concentración total fue de 327.14 ppm. La menor concentración registrada corresponde al criseno (3.53 $\mu\text{g/g}$), uno de los cinco compuestos de 4 anillos detectados en la muestra analizada.

Por otro lado, sobresalen por su concentración los compuestos aromáticos de 4 y 5 anillos, siendo el indeno (1,2,3cd) pireno (representa el 32% de la concentración total de HPA), el benzo (g,h,i) perileno y el dibenzo (a,h) antraceno, los que en orden decreciente registraron las concentraciones más altas.

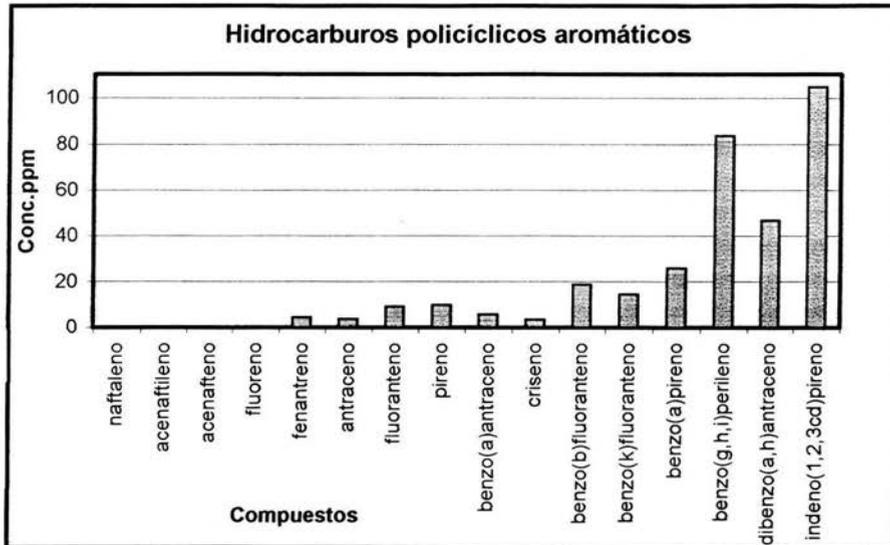


FIGURA 2: Abundancia de hidrocarburos aromáticos detectados en la muestra de suelo analizada.

La presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos de alto peso molecular indica que el suelo bajo estudio, no puede ser considerado como un suelo que tenga una concentración al 100% de contaminantes petrogénicos, derivados de las actividades petroleras o de posibles derrames recientes, sino que más bien, se trata de un suelo en el cual, el origen de estos contaminantes es debido a la combustión incompleta de los hidrocarburos fósiles (pirrólisis), derivadas de las actividades petroleras e industriales. Aunado a ésto, se observó que las concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos tienden a incrementarse hacia los compuestos de mayor peso molecular, como pireno, benzo (k) fluoranteno, benzo (b) fluoranteno, benzo (a) pireno, dibenzo (a,h) antraceno, benzo (g,h,i) perileno, indeno (1,2,3cd) pireno, lo cual es típico de una contaminación crónica de derivados del petróleo (Díaz-González y cols., 1995; Heitzer y Saylor, 1993).

Cabe señalar que las concentraciones detectadas de fenantreno, fluoranteno, benzo (k) fluoranteno, benzo (a) pireno, dibenzo (a,h) antraceno, benzo (g,h,i) perileno, se encuentran muy por arriba de los límites máximos permisibles (LMP) determinados por Kalf y cols. (1997), del Instituto Nacional de Salud Pública y del Ambiente de los Estados Unidos de América; mientras que el naftaleno, antraceno y criseno se encontraron en concentraciones por debajo de los límites máximos permisibles determinados por la misma institución.

Por otro lado, en la muestra de hidrocarburos alifáticos, se corroboró el origen de la contaminación, ya que sigue un comportamiento similar a los aceites pesados, originados durante la refinación petrolera (Wise y Trantolo, 1996). También se puede atribuir esta respuesta al hecho de que el suelo probado ya ha estado sometido a un proceso de intemperización y, posiblemente, a un ataque bacteriano que lo han hecho menos tóxico. Sin embargo, existe también la posibilidad de considerar que los hidrocarburos pueden haberse encontrado fuertemente adsorbidos en el suelo y que también pudieran tener una muy baja solubilidad en agua (García, 1994; Lesage y Jackson, 1993).

5.2.3 DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS ALIFÁTICOS CON LAS CEPAS AISLADAS

Hasta este momento, sólo se sabía que los microorganismos podían vivir en un medio con hidrocarburos, pero se desconocía si realmente los degradaban, por lo que se decidió, en un inicio, emplear un contaminante con una elevada concentración de hidrocarburos alifáticos que, como se mencionó anteriormente, son más fáciles de degradar (Parés, 1996; Michael, 1994)

Desde el punto de vista microbiológico se lograron aislar mediante la técnica reportada por Fletcher (1994), tres especies reportadas en la literatura como degradadores de hidrocarburos: *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus sphaericus* (Dott, 1992; Bouchez y cols., 1995; Wang y Bartha, 1994) y *Serratia marcescens* (Dott, 1992; Parés, 1997)

Para estas tres especies, se realizaron pruebas de degradación de hidrocarburos alifáticos, utilizando al diesel como contaminante. El hecho de utilizar éste y no otro contaminante se decidió tomando en cuenta que se desconocía si las cepas tenían o no actividad degradadora.

Como resultado se obtuvo, que a las 48 horas de incubación no se observó turbidez en el medio; a las 96 y 120 horas se observó turbidez en los medios inoculados, además de un aspecto lechoso en la capa de diesel, se procedió a hacer una tinción de Gram y al microscopio se observaron las características correspondientes a cada cepa inoculada.

Este procedimiento se continuó durante 8 días más, al término de este período se pudo observar una mayor turbidez y ese aspecto lechoso en todo el medio, por lo que se deduce que la concentración celular era mayor. En el control no se observó turbidez en ningún momento.

Posteriormente, se obtuvo la concentración tanto del control como de las muestras inoculadas con las cepas, y los resultados se pueden apreciar en la figura 3, donde el mayor valor obtenido corresponde al compuesto con 14 carbonos (1805.97 ppm).

Para el caso de los compuestos con 10, 11, 19, 25 y 26 carbonos, se obtuvo una biodegradación total por parte de las dos cepas empleadas; para el caso de *Pseudomonas fluorescens*, ésta biodegradación además se observó para los compuestos con 12, 22, 23 y 24 carbonos, lo cual coincide con los datos registrados para este género, que está ampliamente reportado como degradador de hidrocarburos (Dott, 1992; Bouchez y cols., 1995; Wang y Bartha, 1994; Haigler y Spain, 1993).

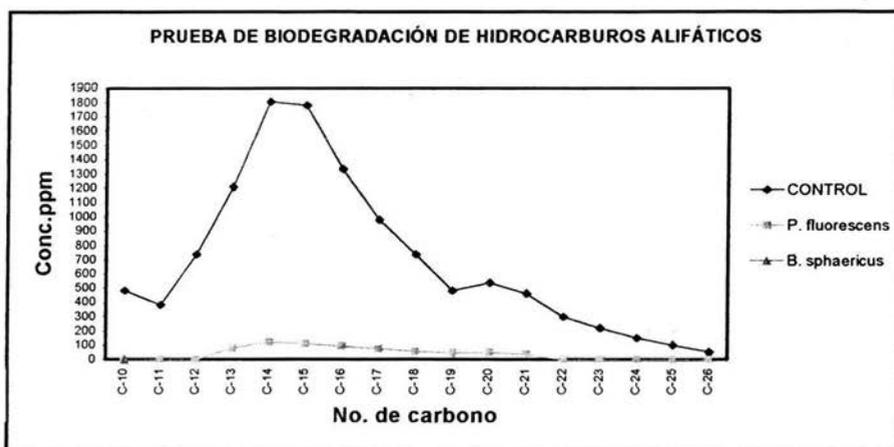


FIGURA 3: Biodegradación bacteriana de las cepas *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus sphaericus* comparado con el control de prueba, concentración del contaminante remanente (ppm) utilizando un volumen de 500 μ L y 1 mL de inóculo de la cepa correspondiente.

Como se puede observar en los resultados anteriores, utilizando un volumen de 500 μ L y 1 mL de inóculo de cada cepa seleccionada, se obtuvo una reducción del contaminante de 94.31% y del 83.86 % para las cepas *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus sphaericus*, respectivamente. Para ambas cepas se pudo observar una reducción del contaminante mayor al 80%, lo cual implica que ambas cepas podrían ser útiles en un proceso de degradación; en los resultados presentados, es evidente que hubo una degradación del contaminante por parte de los microorganismos, ya que la concentración en las muestras inoculadas fue mucho menor comparada con el control de prueba, esto se puede observar principalmente para las especies de *Bacillus sphaericus* y *Pseudomonas fluorescens*.

Para el caso de *Serratia marcescens* se observó turbidez en el medio y aspecto lechoso a los 7 días de incubación, pero no se analizaron las fracciones obtenidas en la extracción; sin embargo, se espera también una reducción en la concentración del contaminante, ya que esta especie está reportada en la literatura como un microorganismo relacionado con la biodegradación de hidrocarburos.

5.2.4 CONCLUSIONES PARCIALES

- La caracterización edáfica del suelo antrópico, indica que es de tipo textural areno francoso, con un alto contenido de materia orgánica y humedad. Presentó un pH ácido y un bajo contenido de nitrógeno y fósforo, esto último como consecuencia de la adición de hidrocarburos en el suelo.
- El análisis cromatográfico del suelo antrópico, reveló una concentración total de 1827.95 ppm de hidrocarburos alifáticos y de 327.14 ppm de hidrocarburos aromáticos, prevaleciendo los hidrocarburos aromáticos de 4 y 5 anillos. La presencia de este tipo de hidrocarburos indica que son suelos intemperizados, dado que se trata de compuestos recalcitrantes de alto peso molecular. Asimismo, se detectó una concentración de 3.86 ppm y 3.53 ppm de antraceno y criseno, respectivamente.
- Desde el punto de vista microbiológico, las cepas de *Bacillus sphaericus* y *Pseudomonas fluorescens* aisladas de este suelo, biodegradaron, en un período de 14 días, más del 80% de los hidrocarburos alifáticos presentes.

6. ETAPA 2. CARACTERIZACIÓN Y BIODEGRADACIÓN DE HPA EN UN SUELO CONFORMADO ARTIFICIALMENTE

6.1 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.1 CONFORMACIÓN DEL SUELO ARTIFICIAL

A partir de los datos de la clase textural del suelo antrópico contaminado, se conformó un suelo artificial. Una vez que se obtuvieron los respectivos porcentajes de arena, limo y arcilla para dicha conformación, se mezclaron arena con arcilla del tipo caolinita y limo de cuarzo; los dos primeros fueron obtenidos comercialmente y el tercero fue proporcionado por el Laboratorio de Física de suelos del Instituto de Geología de la UNAM. De la manera arriba descrita, se obtuvo la fracción mineral del suelo, la cual fue enriquecida con el mismo porcentaje de materia orgánica que el determinado para el suelo contaminado. La materia orgánica (14%), se adicionó en forma de humus activo obtenido comercialmente.

6.1.2 PREPARACIÓN DEL INÓCULO PARA LOS ENSAYOS

Con respecto al inóculo incorporado al suelo bajo estudio, éste procede del lodo de una planta de tratamiento aerobio de aguas residuales domésticas, al que se le determinó la cantidad de agua inicial. Para ello, se tomó una muestra de lodo de aproximadamente 100 mL y se depositó en un recipiente a peso constante, determinando por diferencia de peso, la cantidad de agua que contiene. Así, al momento de agregar el lodo (inóculo microbiano), también se está incorporando humedad al suelo lo cual debe tomarse en cuenta para el cálculo de la humedad relativa deseada para los matraces 1 y 3.

De manera similar, al agregar la solución de azida de sodio al suelo del matraz 2, se agregó agua, la cual fue considerada para el cálculo del valor deseado. En este sentido la concentración final deseada fue de 0.1 gramos de azida de sodio por gramo de suelo seco. El inóculo se adicionó para lograr la bioestimulación incrementando así la posibilidad de biodegradar los HPA.

6.1.3 ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN DE HPA SIN ADICIÓN DE NUTRIMENTOS

Para determinar la factibilidad de eliminar los HPA del suelo mediante el empleo de microorganismos, es necesario considerar algunos fenómenos que se pueden presentar durante la fase experimental, tales como fotocatalisis, evaporación, desorción térmica, e incluso (dada la naturaleza de los HPA) una adsorción de los contaminantes en el suelo. Por lo anterior, y con el fin de corroborar que la degradación que se observe, sea únicamente atribuible a los microorganismos, se planteó el diseño experimental indicado en la tabla 5.

TABLA 5: Diseño experimental de la biodegradación de HPA en un suelo conformado artificialmente

MATRAZ	CONTENIDO DE SUELO (g)	ANTRACENO (mg)	CRISENO (mg)	DIBENZO (a,h) antraceno (mg)	SOLVENTE (mL)	AGUA (mL)	LODOS (g)	AZIDA DE SODIO (g)
1	250	0	0	0	0	0	21.61	0
2	250	125	125	12.5	250	21.32	0	0.25
3	250	125	125	12.5	250	0	21.61	0

El matraz 1, sirvió como testigo de la biodegradación y, el matraz 2 para inhibir la actividad microbiana al adicionar azida de sodio (NaN_3 al 0.1%) y detectar la degradación abiótica que se pueda presentar (Ruiz y cols., 1997) y en el matraz 3, se observó, la degradación microbiana de los HPA.

En los matraces 2 y 3, el suelo fue contaminado con las siguientes concentraciones de HPA: 500 mg de criseneno, 500 mg de antraceno y 50 mg dibenzo(a,h)antraceno por kilogramo de suelo seco. Para lograr lo anterior, se preparó una solución de los tres HPA en concentración igual a la que tendrán en el suelo, utilizando como disolvente 250 mL de diclorometano (CH_2Cl_2).

Esta solución, se mezcló en un vaso de precipitados de 2L con la cantidad de suelo necesaria, que correspondió a 250 g de suelo seco, manteniendo en agitación y evaporando durante 72 horas en la campana de seguridad. Posteriormente, se agregó el inóculo o la azida de sodio según correspondió. Una vez realizado lo anterior, se cubrió la parte exterior del vaso con papel aluminio con el propósito de evitar la fotodegradación. La temperatura se mantuvo constante a 20 °C.

Para determinar la concentración remanente de los HPA en los matraces 1, 2 y 3, se tomaron muestras de aproximadamente 10 g de suelo de cada uno de los recipientes que contenían el suelo experimental, los días 0, 4, 8, 16, 32, 64, 90 y 132.

Un parámetro de suma importancia en los estudios de biodegradación, que se debe conocer y controlar a lo largo del experimento, es el porcentaje de humedad que contiene el suelo. Por tal motivo, antes de inocular y/o contaminar el suelo, debe tomarse una muestra aproximadamente de 5 g de suelo con la que se va a trabajar. Esa muestra se coloca en el horno a una temperatura de 105 °C durante el tiempo suficiente para que se evapore el agua que contiene.

Una vez realizado lo anterior, se pesa y por diferencia de pesos entre el inicial y el final, se determina la cantidad de agua que estaba presente. Este tipo de análisis debe hacerse en muestras representativas y por triplicado, a efecto de contar con resultados confiables.

El suelo antrópico bajo estudio, tiene un valor de máxima capacidad de retención de agua (MCRA) de 0.373 g de agua por gramo de suelo seco, y para que se lleve a cabo un proceso de biodegradación en el suelo, éste debe contar con aproximadamente un 50 a 80% como valor máximo, respecto a la MCRA (Michael, 1994; Kastner y Mahro, 1996), por lo que se determinó, que para el experimento de biodegradación en el suelo conformado, dicho valor fuera de 0.2238 gramos/agua por gramo de suelo seco. De tal modo, se agregó agua hasta llegar al valor establecido, el cual permaneció constante a lo largo del experimento. Al existir fenómenos naturales de evaporación, la cantidad de agua en el suelo disminuye, por lo que periódicamente se debe de añadir la cantidad necesaria para compensar la cantidad de agua evaporada y mantener así la humedad relativamente constante. La forma de mantener la humedad del suelo a lo largo del experimento, fue a partir del control constante del peso del recipiente, lo cual a su vez, se logra a través de la adición de agua cuando así se requiera. No obstante, no es posible garantizar completamente que el agua adicionada logre distribuirse homogéneamente en todo el suelo, lo que puede llegar a ocasionar una fuente de variación en el experimento. Una forma de minimizar este efecto indeseable, es mediante la adición cuidadosa y por goteo, del volumen de agua requerido para el control de la humedad.

6.1.4 BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS CON ADICIÓN DE NUTRIMENTOS (BIOESTIMULACIÓN) Y CAMBIO DE pH

En el estudio de la biodegradación de HPA bajo condiciones controladas, se manipularon parámetros como adición de nutrientes, específicamente la relación carbono:nitrógeno:fósforo (C:N:P), con el propósito de favorecer las condiciones de degradación de los microorganismos (Chávez y cols., 1997; Elliot, 1996). El valor de pH fue otro parámetro que se manejó con el fin de observar las variaciones que se pueden presentar para la biodegradación. Paralelamente se llevó a cabo el aislamiento de microorganismos.

La etapa experimental 2, se realizó en cuatro vasos de precipitado de 500 mL conteniendo 75 g de suelo seco, inicialmente sin contaminar. Se adicionó la cantidad necesaria de antraceno, criseno y dibenzo(a,h)antraceno, disuelta en 75 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) para lograr concentraciones de: 500, 500 y 50 ppm respectivamente. De igual manera, se adicionaron 22 g $\text{H}_2\text{O/g}$ de suelo seco y 12 g de inóculo en todos los matraces.

En cuanto a la adición de los nutrientes, se determinó emplear una relación molar entre carbono, nitrógeno y fósforo de 100:10:01, respectivamente. Con base en esa proporción, se determina la cantidad de fósforo o nitrógeno necesarios para llegar a la relación óptima definida. Por ello, antes de agregar los nutrientes, se debe tomar en cuenta la cantidad que existe de ellos en el suelo a emplear.

De manera general, en el matraz 4, a diferencia de los matraces 5, 6 y 7, no se adicionó nitrógeno, con el propósito de observar, cuál es el efecto del fósforo en comparación con el nitrógeno, al compararlo con el matraz 5, como fósforo se adicionó una solución amortiguadora de fosfato de sodio dibásico (PO_4 , 109.87 mg) y como nitrógeno se adicionó nitrato de amonio (NH_4NO_3 , 778.28 mg). Los matraces 6 y 7, se prepararon para observar las variaciones que se producen por un cambio de pH (el valor de pH se alcanza adicionando ácido clorhídrico (HCl 4.4 N, 6 mL) o hidróxido de sodio (NaOH, 0.6 g), respectivamente.

TABLA 6: Características experimentales de los matraces con suelo conformado artificialmente.

	Matraz 4	Matraz 5	Matraz 6	Matraz 7
Suelo seco (g)	75	75	75	75
CH_2Cl_2 mL	75	75	75	75
Antraceno (mg)	37.5	37.5	37.5	37.5
Criseno (mg)	37.5	37.5	37.5	37.5
Dibenzo(a,h) antraceno (mg)	37.5	3.75	37.5	3.75
Suelo (g)	82.38	82.38	82.38	82.38
Adición de H ₂ O	12.00	11.80	12.02	11.70
g H ₂ O/g suelo seco	21.99	21.99	21.99	21.99
Relación C:N:P	100:01:01	100:10:01	100:10:01	100:10:01
NH_4NO_3 (mg)		778.28	778.28	778.28
PO_4 (mg)	109.87	109.87	109.87	109.87
pH	6.5	6.5	4.5	9.2
HCL 4.4 N (ml)			6	
NaOH (g)				0.6
Inóculo (g)	12.00	12.00	12.00	12.00

Para la toma de muestras en el ensayo de biodegradación inducida, se llevó a cabo el mismo procedimiento, pero en este caso, las muestras fueron de aproximadamente 5 g y los días de muestreo fueron 0, 5, 8, 16 y 32.

6.1.5 PROCESAMIENTO DE LOS DATOS

El análisis estadístico de los datos experimentales, se realizó mediante el análisis de varianza y se empleó la prueba múltiple de medias Tukey con un $\alpha=0.05$ (Programa Statistica para Windows). Las pruebas se realizaron, entre cada uno de los días por tratamiento y, entre cada uno de los tratamientos para antraceno y criseno.

6.1.6 CUENTA DE BACTERIAS TOTALES Y HETERÓTROFAS

La cuenta de bacterias totales, se llevó a cabo en agar nutritivo que contiene peptona de gelatina y extracto de carne de res, la siembra se hizo por extensión superficial y las cajas se incubaron a 26 °C durante 24 horas (Michael, 1994).

En el caso de la cuenta de bacterias heterótrofas, se realizó mediante la técnica tradicional de cuenta en placa, empleando como medio de crecimiento el Agar para métodos estándar (Bioxon cat.134-1), que contiene: peptona de caseína (5.0 g/L), extracto de levadura (2.5 g/L), D(+) Glucosa (1.0 g/L) y agar-agar (14 g/L). Las muestras se incubaron a 26 °C por un período de 72 horas (Michael, 1994).

La cuenta de bacterias y la caracterización de los microorganismos se realizó en las muestras del día 32.

6.1.7 AISLAMIENTO Y ANÁLISIS MOLECULAR DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE CRISENO Y ANTRACENO

Para las muestras de suelo conformado artificialmente, primero se evaluó la actividad degradadora de hidrocarburos alifáticos y aromáticos y, posteriormente, se llevó a cabo el aislamiento de cultivos bacterianos.

La disminución de criseno y antraceno, durante los diferentes tratamientos realizados en el suelo, se atribuye a la acción bacteriana; sin embargo, con el fin de aportar suficientes evidencias, que permitan comprobar que la remoción de los HPA es efectivamente de tipo microbiana, se procedió a determinar la cantidad de bacterias presentes. Asimismo, se realizó el aislamiento de las bacterias degradadoras, empleando como base la técnica propuesta por Fletcher (1994). Las modificaciones introducidas a esta técnica se describen a continuación:

AISLAMIENTO

En un tubo de ensaye se preparó una fase sólida, constituida por fosfatos y nitratos y, una fase líquida de hidrocarburo sobrenadante sobre la fase sólida. De este modo, los microorganismos toman los nutrimentos necesarios de la fase sólida y la fuente de carbono la proporciona el hidrocarburo. Se utilizó como hidrocarburo una solución de criseno y antraceno, 500 ppm disueltas en dimetil sulfóxido (DMSO).

El inóculo adicionado a la muestra se obtuvo de la dilución de un gramo de lodo contaminado en 100 mL de caldo Casoy, del cual se tomaron 0.2 mL que se colocaron sobre el hidrocarburo sobrenadante.

Para las muestras de suelo conformado artificialmente, al medio de nitrógeno se le adicionaron 30 μ L de una solución de criseno y antraceno con una concentración de 500 ppm, y los tubos se mantuvieron a 24.5 °C durante 7 días, al cabo de los cuales se tomó una muestra con una asa microbiológica, sembrando mediante estría cruzada en cajas Petri con medio tripticosa soya agar e incubando a 35 °C durante 72 horas. Las colonias puras se obtuvieron mediante resiembras, y fueron conservadas en medio de nitrógeno y 0.2 mL de una solución de criseno y antraceno a 500 ppm.

ANÁLISIS MOLECULAR

La caracterización molecular basada en el análisis de la secuencia del gen ADNr 16s se realizó a partir de cultivos en cajas Petri, extrayendo el ADN total microbiano, de cada uno de los microorganismos, para ello, se utilizó el método adaptado y modificado de Cullen y Hirsch (1998), que incluyó una precipitación fenol-cloroformo antes de la deshidratación con isopropanol. La cuantificación del ADN se realizó mediante espectrofotometría.

El fragmento del gen ADNr 16s se amplificó a partir del ADN total obtenido, mediante la técnica de PCR (PCR System 9700, Applied Biosystems); para la reacción se utilizaron oligonucleótidos 8 FPL y 1492 RPL, previamente reportados (Relman, 1993). La purificación se llevó a cabo con el Kit QuiAquick® PCR purification (Qiagen Inc.), de acuerdo a las indicaciones del proveedor. El producto generado de 1500 pb fue secuenciado desde el extremo 5', en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM con un secuenciador automático ABI PRISM (310 Genetic Analyzer PE Applied Biosystems), utilizando como iniciador el oligonucleótido 8FPL. Las secuencias obtenidas se presentan en el anexo E.

Las secuencias del gen ADNr 16s de las cepas aisladas, se compararon individualmente, con las secuencias existentes en las bases de datos, mediante un análisis BLAST con el programa BLASTN (Altschul y cols., 1997) versión 2.2.3 del GenBank. Las secuencias resultantes de dicho análisis, junto con secuencias existentes en el GenBank, se alinearon de forma múltiple usando el programa CLUSTAL_X (Thompson y cols., 1997) versión 1.81, permitiendo establecer la filogenia de las bacterias aisladas.

La descripción detallada de las secuencias empleadas se presenta a continuación:

Secuencias incorporadas en el alineamiento realizado junto con la secuencia de las cepas aisladas.

1. Beta proteobacterium PII_GH1.2.A7 (GenBank: AY162060.1) (Zengler y cols., 2002)
2. Uncultured bacterium clone Phe95 (GenBank: AF534218.1) (Padmanabhan y cols. Sin Publicar)
3. *Achromobacter xylosoxidans*. (GenBank: AJ491846.1) (Riccardi y cols. Sin Publicar)
4. *Bordetella* sp. (GenBank: AB015607.1) (Hanada y cols., 1998)
5. *Ochrobactrum* sp. (GenBank: AF229879.1) (Song y cols., 2000)
6. *Ochrobactrum* sp. LMG 20570 (GenBank: AY040351.1) (Goris y cols. Sin publicar)
7. *Ochrobactrum grignonense*. (GenBank: AJ242581.1) (Lebuhn y cols., 2000)
8. *Ochrobactrum* sp. LMG 20564 (GenBank: AF452128.1) (Goris y cols. Sin publicar)
9. *Ochrobactrum anthropi*. (GenBank: AJ276036.1) (Peltroche-Llacsahuang y cols., 2000)
10. *Ochrobactrum* sp. (GenBank: AJ249458.1) (Babic y cols., 2000)
11. uncultured *Alcaligenes* sp. (GenBank: AJ306836.1) (Nunes y cols. Sin Publicar)
12. *Achromobacter xylosoxidans subsp. xylosoxidans*. (GenBank: AF411021.1) (Liu y cols., 2002)
13. *Alcaligenes* sp. VKM B-2263 (GenBank: AF430122) (González y cols. Sin Publicar)
14. *Alcaligenes* sp. PNCB 1 (GenBank: AY090020.1) (Shen y cols. Sin publicar)
15. *Alcaligenes* sp. (GenBank: AJ002802.1) (Hoffmann y cols., 1998)

16. *Achromobacter* sp. LMG 6003 (GenBank: AY170847.1) (Coenye y cols. Sin Publicar)
17. Beta proteobacterium PI_GH1.1.B4 (GenBank: AY162039.1) (Zengler y cols., 2002)
18. *Serratia marcescens*. (GenBank: AY043387.1) (Coenye y cols., 2002)
19. Uncultured gamma proteobacterium clone CLs91 (GenBank: AF529356.1) (Carroll y Zinder. Sin publicar)
20. Uncultured gamma proteobacterium clone CLi53 (GenBank: AF529337.1) (Carroll y Zinder. Sin publicar)
21. *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis*. (GenBank: AB061685.1) (Ajithkumar y cols. Sin Publicar)

Finalmente, por medio de la paquetería computacional PHYLIP Versión 3.2 (Felsenstein, 1989) se hizo la construcción del árbol filogenético, usando el método de distancia. Para obtener el árbol de distancia de las cepas aisladas, se utilizó el modelo de Felsenstein (1984), con 100 remuestreos y se obtuvo un árbol consenso, empleando el programa Neighbor (neighbor joining), implementado en el programa PHYLIP.

6.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.2.1 ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN DE HPA SIN ADICIÓN DE NUTRIMENTOS

La toma de muestras para el análisis cromatográfico del suelo con inóculo, se realizó conforme a lo programado, la extracción se llevó a cabo en todas las muestras pero el análisis cromatográfico se hizo sólo en las muestras de los días 0, 16 y 90, y en ninguna de ellas, se encontraron HPA, esta prueba constituyó el control.

Por otra parte, considerando que el matraz 2, inició con una concentración de 500 ppm y su función es servir de referencia para observar la posible remoción de los HPA por factores abióticos, entre los que se encuentra el proceso de extracción, se procedió a realizar periódicamente el análisis cromatográfico del suelo con HPA y azida de sodio. La extracción se realizó por duplicado y los resultados se muestran en la figura 4 y tabla 7.

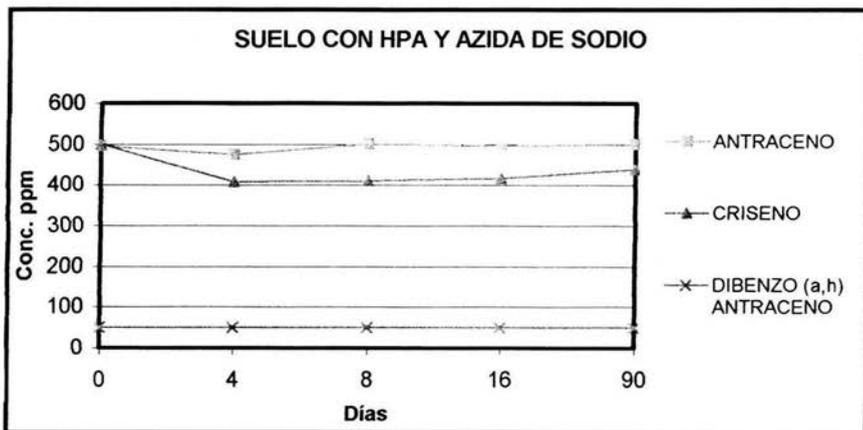


FIGURA 4: Concentración promedio de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el suelo con azida de sodio.

Los valores obtenidos fueron corregidos por un factor, que está determinado por la proporción del criseno o antraceno con el estándar interno y por la eficiencia de extracción, los datos mostrados son el promedio de 2 muestras.

TABLA 7: Concentración promedio de HPA (ppm) en muestras de suelo con HPA y azida de sodio.

DÍA	ANTRACENO (ppm)	CRISENO (ppm)	DIBENZO (a,h) ANTRACENO (ppm)
0	495.51	499.06	50
4	474.06	408.16	50
8	500.40	410.30	50
16	496.00	417.45	50
90	500.44	438.54	50

Lo primero que se observa, es el comportamiento en el que las muestras del suelo con azida de sodio, correspondientes al día cero tienen valores inferiores a 500 ppm para criseno y antraceno, aumentando para el día 8 y 90, lo que probablemente se debe a la proporción de arcilla que hizo menos disponibles a los HPA (Lahlou y cols., 2000). En este suelo, no se registra actividad microbiológica por la adición de azida de sodio, por lo que las variaciones que se presentan se deben a procesos abióticos. Por otro lado, se sabe que los HPA no se volatilizan fácilmente (Klein y Dott, 1992) y que, por el contrario, se absorben fuertemente.

En consecuencia, se considera que la concentración en el suelo de cada uno de los HPA deberá permanecer sin cambios. De modo que, los cambios que se presentan en los resultados del análisis se deben a factores fisicoquímicos, que se conjugan. En la muestra del día 0 del tratamiento 2, de la cual se conoce indudablemente la concentración de los HPA en el suelo, se observa que el análisis cromatográfico presenta resultados ligeramente diferentes, lo cual se debe a que durante el proceso de extracción queda un remanente en el suelo; sin embargo, debido a la adsorción que se establece entre los HPA y el suelo, generalmente está permanece constante; aunque en este caso, se observó en muestras posteriores al día 0 que la eficiencia de extracción fue variable debido, principalmente, a que aún cuando a nivel macroscópico se mantuvieron las condiciones de humedad en el suelo, a nivel microscópico, fue necesario cierto tiempo para llegar al equilibrio y, por la misma razón, la eficiencia varió en forma impredecible.

Finalmente, también se observó que la remoción de los HPA después de 90 días fue prácticamente nula para el antraceno (Tabla 7). Para el criseno, se muestra una retención de 19%, que permanece constante, hasta los 90 días. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que la disminución que existe en los primeros días, es producto de los cambios fisicoquímicos de interacción entre el suelo y los HPA antes de llegar a un equilibrio. Por ello durante los primeros días, la adsorción de los HPA por los componentes del suelo fue muy fuerte, y aún con la extracción no se pudieron desorber en su totalidad.

En el suelo conformado artificialmente, al observar la biodegradación de HPA, se encontró como resultado de la prueba de Tukey, en el matraz 2, sólo una diferencia significativa en la concentración de antraceno a través del tiempo (tabla D.2), para el criseno hay diferencia significativa a través del tiempo sobre todo en los días 0 y 32, ya que se está registrando la aparente degradación por factores abióticos, en este caso, es muy probable que se estén presentando procesos de adsorción; sin embargo, esto se registró a lo largo del experimento de manera similar, y podría atribuirse a errores experimentales (tabla D.1 a tabla D.4).

Por otra parte, con relación al análisis cromatográfico del suelo con HPA y adición de inóculo, se observó variación en la concentración de criseno en el día 0 y día 16; sin embargo, puede atribuirse dicha remoción, a la acción de los microorganismos (tabla 8) Para corroborar lo anterior, se llevó a cabo la cuenta en placa de las unidades formadoras de colonias (ufc/mL) siguiendo el procedimiento señalado anteriormente.

Los resultados indican que es posible la biodegradación de criseno, catalogado como un compuesto recalcitrante, a pesar de que el tiempo para degradarlo es relativamente largo (Michael, 1994). La concentración de criseno, disminuyó después de 132 días, pasando de una concentración inicial de 501.11 ppm a 261.40 ppm, lo cual implica un 47% de remoción (Tabla 8 y figura 5). Asimismo, los microorganismos pudieron metabolizar al antraceno llegando prácticamente a la remoción total del hidrocarburo (96.87 %); logrando una concentración final de 15.45 ppm, y como se observa, de manera un poco más lenta metabolizan al criseno, recordando que para este último caso, en el experimento 2, hubo una retención del contaminante del 19% que permaneció constante hasta los 90 días, y que además es un compuesto de 4 anillos, más difícil de degradar (Bouchez, 1995)

TABLA 8: Concentración promedio de HPA (ppm), en muestras de suelo con HPA e inóculo.

DÍA	ANTRACENO (ppm)	% de remoción	CRISENO (ppm)	% de remoción	DIBENZO (a,h) ANTRACENO (ppm)	% de remoción
0	497.84	0.00	501.11	-1.71	50	0
4	496.66	0.44	485.39	6.04	50	0
8	474.53	8.12	367.02	26.92	50	0
16	494.11	11.84	372.85	25.17	50	0
32	430.10	16.31	349.48	28.8	50	0
64	258.50	54.88	322.85	30.12	50	0
90	97.35	81.00	272.43	47.53	50	0
132	15.45	96.87	261.40	47.68	50	0

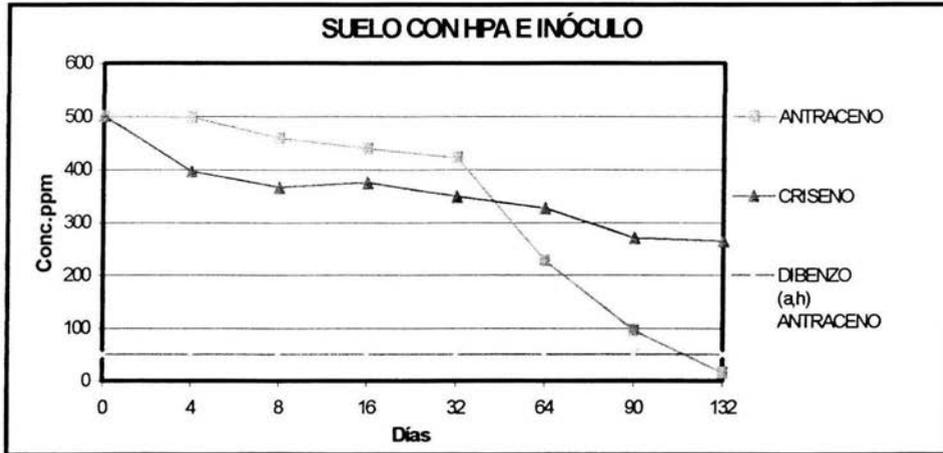


FIGURA 5: Concentración promedio de contaminantes obtenidos en los análisis cromatográficos del suelo con HPA e inóculo, donde se observa la remoción de HPA por microorganismos.

En cuanto a la concentración de antraceno, en el matraz 3, conteniendo suelo con HPA e inóculo, se esperaba encontrar una diferencia significativa por la presencia del inóculo, lo cual es corroborado por el valor de $P=0.000000$, es decir, a partir de este resultado se consideró factible lograr una reducción en la concentración de ambos contaminantes (tabla D.5 a tabla D.8).

6.2.2 ENSAYOS DE BIODEGRADACIÓN DE HPA CON ADICIÓN DE NUTRIMENTOS Y CAMBIO DE pH

Una vez probada la factibilidad de biodegradación de un compuesto recalcitrante como el criseno, se procedió a realizar un ensayo, con el propósito de analizar algunos de los factores que pudieran influir de manera positiva, en la velocidad de degradación. Así, se prepararon 4 matraces (4 a 7) similares al matraz 3. Se usó el mismo tipo de suelo, contaminado por igual con 500 ppm de antraceno, 500 ppm de criseno y 50 ppm de dibenzo(a,h)antraceno, al cual se le adicionaron nutrientes: nitrógeno como nitrato de amonio o fósforo como fosfatos. Estas adiciones junto con las del ácido clorhídrico o hidróxido de sodio modificaron el valor de pH. Los tratamientos se llevaron a cabo de acuerdo con las condiciones indicadas a continuación.

TABLA 9: Condiciones experimentales establecidas para la evaluación en suelo de la biodegradación de HPA.

Tipo de suelo/condiciones experimentales	Unidades de pH	Relación de nutrientes
Matraz 4	6.5	Carbono:Fósforo 100:1
Matraz 5	6.5	Carbono:Nitrógeno:Fósforo 100:10:1
Matraz 6	4.2	Carbono:Nitrógeno:Fósforo 100:10:1
Matraz 7	9.2	Carbono:Nitrógeno:Fósforo 100:10:1

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE FOSFATOS CON UNA RELACIÓN DE NUTRIMENTOS C:P 100:1

Se puede observar el efecto en la biodegradación de antraceno y criseno con la adición de fosfatos. La tabla 10 muestra los resultados obtenidos.

TABLA 10: Valores obtenidos en ppm, de los contaminantes procedentes del suelo, con una relación carbono:fósforo de 100:1 y un valor de pH de 6.5

DÍA	ANTRACENO	CRISENO	DIBENZO(a,h) ANTRACENO	% remoción antraceno	% remoción criseno
0	499.24	492.05	50	0.14	0.19
5	459.11	484.10	50	8.19	3.02
8	311.19	431.51	50	37.61	13.77
16	321.21	413.17	50	35.70	17.35
32	276.13	402.11	50	44.62	19.57

En el matraz 4, se observa, de acuerdo al análisis estadístico, que hay una diferencia significativa con $P < 0.05$ en la concentración tanto para criseno como para antraceno (tabla D.9 a tabla D.12), lo cual se atribuye principalmente al valor de pH, ya que pese a que no contiene el nutriente nitrógeno, el cual es un elemento muy importante en los procesos de degradación biótica, se logró la remoción de los contaminantes (tabla 10).

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE NITRÓGENO Y FÓSFORO CON UNA RELACIÓN C:N:P 100:10:1

En el matraz 5, se adicionó una solución de nitrato de amonio y de fosfato de sodio para mantener en el suelo la relación C:N:P de 100:10:1. Los resultados se muestran en la tabla 11.

TABLA 11: Valores obtenidos en ppm, de los contaminantes procedentes de suelo con una relación carbono:nitrógeno:fósforo de 100:10:1 y un valor de pH de 6.5

DÍA	ANTRACENO	CRISENO	DIBENZO(a,h) ANTRACENO	% remoción antraceno	% remoción criseno
0	500.26	500.56	50	-0.06	-1.71
5	497.68	495.25	50	0.44	0.84
8	447.39	493.68	50	10.54	1.22
16	253.14	312.85	50	49.38	37.41
32	235.50	309.87	50	52.82	38.07
32	Matraz 3 sin nutrientes			16.31	-0.96
32	Matraz 4 con fosfatos a pH=6.5			44.62	19.57

En el matraz 5, en lo referente a los resultados estadísticos, se observa que la concentración de antraceno y criseno, muestran una diferencia significativa con $P < 0.05$ para ambos contaminantes, lo cual se había previsto, ya que de acuerdo a las referencias bibliográficas el pH de 6.5 y la relación carbono:nitrógeno:fósforo de 100:10:01, son los más adecuados para lograr una excelente reducción de los contaminantes (tabla D.13 a tabla D.16) (Bewley, 1996).

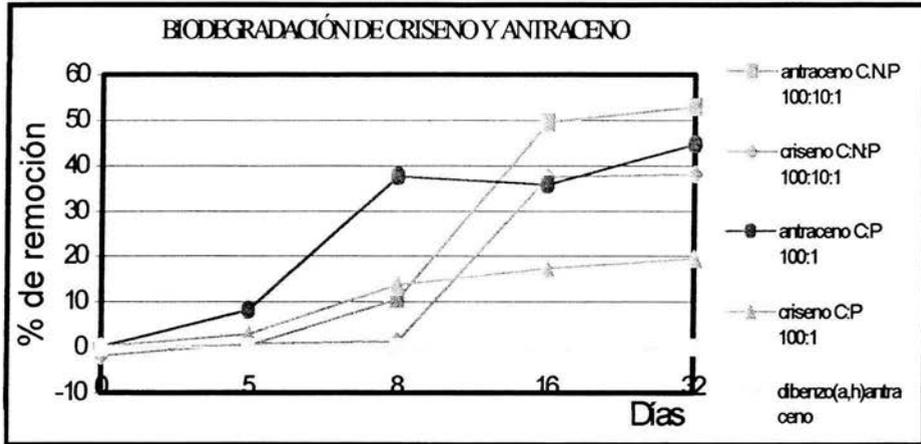


FIGURA 6: Biodegradación de criseño y antraceno pH 6.5 y relación C:N:P 100:10:1 y C:P 100:1

Los resultados obtenidos en los suelos donde se adicionaron fósforo, y nitrógeno con fósforo (matraces 4 y 5), indican que con la adición de estos nutrientes al suelo, dentro de los intervalos empleados, es posible reducir el tiempo de degradación del criseño. Sin embargo, la mayor remoción de criseño se logró con la relación C:N:P de 100:10:1 que según otros estudios, es en la que se observan mejores resultados (Bewley, 1996). Es importante hacer notar que la diferencia de adicionar ambos nutrientes, nitrógeno y fósforo, con adicionar sólo fósforo se refleja en una mayor eliminación, tanto de antraceno como de criseño cuando se agregan ambos nutrientes. Estos efectos favorables se deben principalmente a que, al estar los nutrientes en una mayor concentración y disponibilidad que en el matraz 3, los microorganismos encuentran mejores condiciones para llevar a cabo sus funciones metabólicas (Levin y Gealt, 1997).

EFFECTO DE CAMBIO DE pH EN EL SUELO MANTENIENDO LA RELACIÓN C:N:P 100:10:1

TABLA 12: Valores obtenidos en ppm, de los contaminantes procedentes del suelo, con una relación carbono:nitrógeno:fósforo de 100:10:1 y un valor de pH de 4.2 obtenido adicionando HCL al suelo.

DÍA	ANTRACENO	CRISENO	DIBENZO(a,h) ANTRACENO	% remoción antraceno	% remoción criseno
0	495.32	499.14	50	0.96	0.09
5	500.22	500.19	50	-2.23	-0.16
8	486.26	440.22	50	2.77	11.94
16	464.25	462.58	50	7.19	7.52
16	matraz 3 sin nutrientes a pH=6.5			1.2	1.3
16	matraz 4 con fosfatos pH=6.5			35.70	17.35
16	matraz 5 con nitrato de amonio y fosfatos pH=6.5			49.38	37.41

En el análisis estadístico, las concentraciones de antraceno y criseno en el matraz 6, muestran un comportamiento similar; en ambos contaminantes existe diferencia altamente significativa, con un valor de $P < 0.01$; sin embargo, el valor máximo de remoción para el día 16 fue de 7.19 para el antraceno y de 7.52 para el criseno, lo cual puede deberse en parte al pH que se manejó que de alguna manera inhibió la actividad microbiana pese a que está dentro del intervalo en el que crecen las bacterias, aunque como se puede observar, muy cerca del límite inferior (tabla D.17 a tabla D.20).

EFFECTO DE CAMBIO DE pH EN SUELO MANTENIENDO LA RELACIÓN C:N:P 100:10:1

TABLA 13: Valores obtenidos en ppm, de los contaminantes procedentes del suelo, con una relación carbono:nitrógeno:fósforo de 100:10:1 y un valor de pH=9.2 obtenido adicionando NaOH al suelo.

DÍA	ANTRACENO	CRISENO	DIBENZO(a,h) ANTRACENO	% remoción antraceno	% remoción criseno
0	497.68	500.49	50	0.40	-0.52
5	490.41	498.73	50	1.98	0.18
8	500.09	497.71	50	-1.67	0.50
8	Matraz 3 sin nutrientes a pH=6.5			-1.16	-0.48
8	Matraz 4 con fosfatos a pH=6.5			37.61	13.77
8	Matraz 5 con nitrato de amonio y fosfatos a pH=6.5			10.54	1.22
8	Matraz 6 con nitrato de amonio y fosfatos a pH=4.2			2.77	11.94

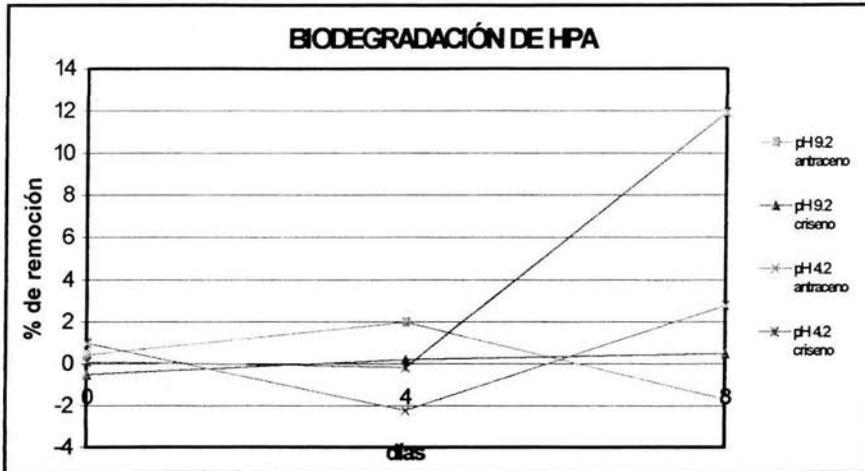


FIGURA 7: Porcentaje de remoción de antraceno y criseno en condiciones básicas y ácidas.

En la gráfica anterior, se observa que, para el matraz 7, aún cuando sólo se cuenta con tres puntos analizados, es clara la inhibición de la degradación (principalmente cuando se maneja un pH de 9.2), en comparación con los resultados obtenidos para los matraces 4 y 5, donde a los 8 días se observa remoción de los contaminantes. En el suelo con pH ácido, se observa una menor inhibición, en este caso es posible suponer que la degradación se llevó a cabo por medio de hongos, tal como se reporta en los trabajos realizados por Hammel y cols. (1992), o por un consorcio microbiano diferente al que se presenta en el suelo con pH de 6.5, lo cual se constató mediante los respectivos análisis microbiológicos; sin embargo, no fue posible lograr la identificación de ellos.

En cuanto a las concentraciones de antraceno y criseno, en el matraz 7, acorde con el análisis estadístico, se puede decir, que el pH de 9.2 no fomenta la actividad microbiana para la degradación de los contaminantes, ya que por lo que se observa en el valor de p para ambos contaminantes, hay diferencia significativa con $P < 0.05$ pero en menor grado a los tratamientos anteriores y ello se atribuye en gran parte al pH como ya se había mencionado anteriormente (tabla D.21 a tabla D.24).

En los tratamientos de degradación de antraceno y criseno en el suelo contaminado artificialmente con HPA y adicionado con fosfato de sodio y nitrato de amonio, podría corroborarse que, de acuerdo con la función de cada uno de estos macroelementos, P y N en la célula, los organismos obtienen cantidades muy diferentes de ATP.

Estas diferencias importantes, se reflejan en la producción de células, ya que el rendimiento de las células es directamente proporcional a la cantidad producida de ATP (Baker y Herson, 1994), para lo cual es necesario que el fósforo esté presente y disponible en el suelo.

Esto implica que al aumentar la cantidad de fósforo en el suelo y dado que el proceso de biodegradación es aerobio, se favorece la formación de ATP por lo que se dispara el crecimiento de microorganismos, a diferencia de lo ocurrido en el matraz 3, donde los microorganismos se reproducen más lentamente que en los matraces 4 y 5.

El crecimiento de microorganismos que se observa en el matraz 4, si bien permite degradar en un tiempo más corto a los hidrocarburos, también conlleva a que la remoción se reduzca después del día 8 quedando un remanente de antraceno mayor al que se tenía en el suelo sin adición de nutrimentos, donde fue degradado casi en su totalidad.

En cuanto al criseno, sucede algo similar, aunque en este caso, al compararlo con el matraz 3, que contiene HPA e inóculo, se observa que el máximo porcentaje de remoción se alcanza en menos de la mitad del tiempo. La presencia del nitrógeno adicional en el desarrollo celular, si bien no contribuye de igual manera que el fósforo en la generación de energía, es de suma importancia para la producción de aminoácidos y ácidos nucleicos (Brock y Madigan, 1993).

En cuanto a los diferentes efectos que se observan en el suelo con la relación C:N:P de 100:10:1 y la relación C:P 100:1, la remoción de criseno es mayor en la primera. Sin embargo, en ambos casos la degradación de antraceno se detiene, aunque es evidente que el porcentaje de remoción con respecto al criseno es mayor. Lo anterior se puede atribuir a que cuando no se agregan nutrimentos al suelo, los microorganismos requieren de más tiempo para adaptarse y empezar a metabolizar estas únicas fuentes de carbono. No obstante, aún cuando se supone que los microorganismos siguen rutas metabólicas similares, al degradar un compuesto con más anillos, probablemente, se llegan a formar metabolitos que inhiben la degradación (Rodríguez, 1998).

Los resultados de la Prueba de Tukey entre los distintos tratamientos con respecto al tiempo, revelaron lo siguiente: respecto al antraceno, para el día 0, no hay diferencia significativa entre los tratamientos, por lo que no se aplicó la prueba de Tukey. Este resultado es muy importante porque indica que todos los tratamientos iniciaron con una concentración de contaminante similar (tabla D.25).

Para el día 4, los tratamientos 2, 4, 5 y 6 forman un grupo, ya que no difieren entre sí, pero sí difieren con respecto a los tratamientos 1 y 3 (tabla D.26 y tabla D.27). Para el día 8, la concentración, no difiere para los tratamientos 1 y 6; sin embargo, se observa diferencia significativa con los tratamientos 2, 3, 4 y 5 (tabla D.28 y tabla D.29). En el día 16, no difieren los tratamientos 1 y 2, pero sí con los tratamientos 3, 4 y 5 que también difieren entre sí (tabla D.30 y tabla D.31). En el día 32, difieren los tratamientos 1, 2, 3 y 4 (tabla D.32 y tabla D.33).

En lo que se refiere al criseno, en el día 0 se observa diferencia significativa con $P < 0.05$ entre los distintos tratamientos, con un valor de $P = 0.0444$ (tabla D.34 y tabla D.35). En el día 4, se observa un grupo con los tratamientos 2, 3, 4 y, otro entre los tratamientos 5 y 6, ambos grupos difieren con respecto al tratamiento 1 (tabla D.36 y tabla D.37). En el día 8, se forma un grupo entre los tratamientos 4 y 6, y otro entre los tratamientos 3 y 5, mientras que los tratamientos 1 y 2 difieren significativamente de ambos grupos (tabla D.38 y tabla D.39). Para el día 16, los tratamientos 1 y 3 forman un grupo que difiere significativamente con los tratamientos 2, 4 y 5 (tabla D.40 y tabla D.41). Para el día 32, pese a que los tratamientos 1, 2, 3 y 4 difieren significativamente entre sí (tabla D.42 y tabla D.43), se observa que la concentración de criseno disminuyó únicamente hasta 309.87 ppm.

6.2.4 CUENTA DE BACTERIAS TOTALES Y HETERÓTROFAS

TABLA 14: Cuenta de bacterias totales y bacterias heterótrofas en los distintos matraces.

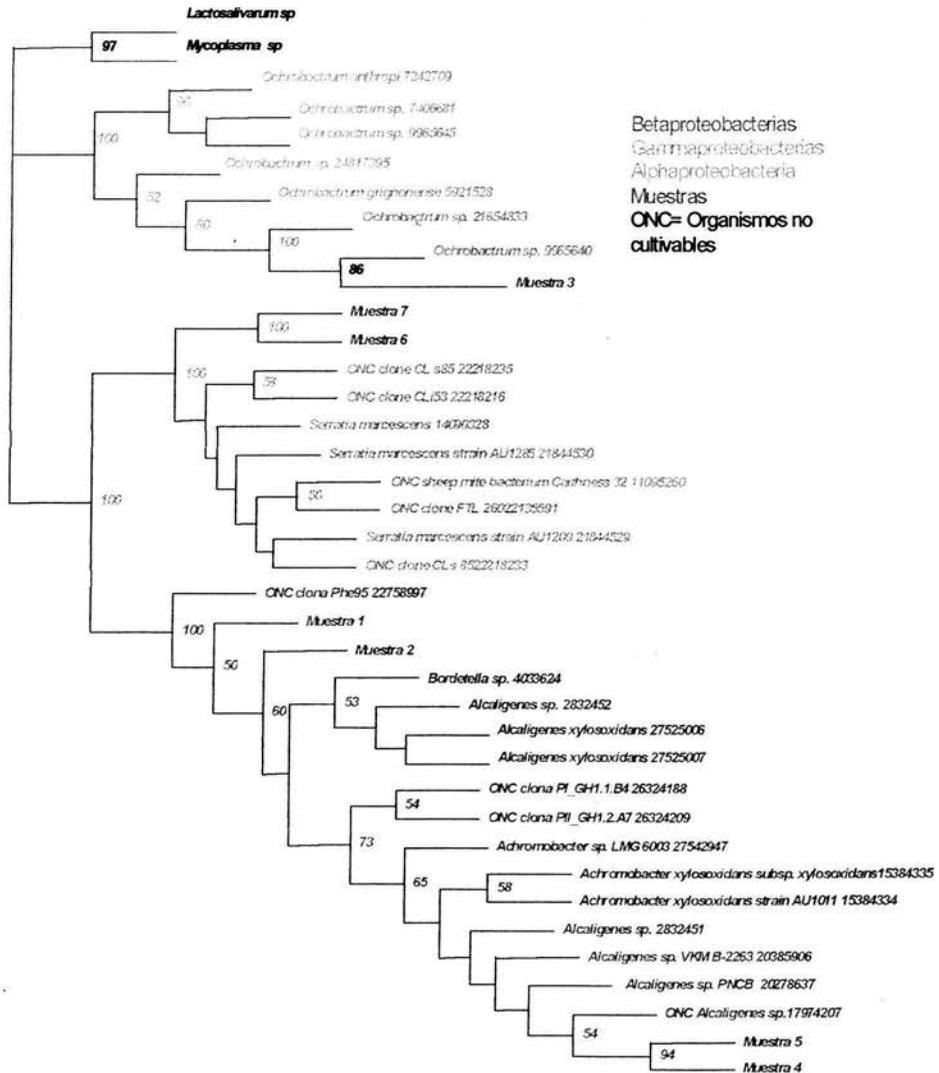
MATRAZ	TOTALES	HETERÓTROFAS
3	2.4E+06	2.2E+04
4 (pH 6.5)	4.8E+08	2.4E+05
5 (pH 6.5)	3.9E+09	4.0E+06
6 (pH 4.2)	1.5E+06	1.0E+04
7 (pH 9.2)	3.0E+04	9.0E+02

En la tabla 14, se presentan los resultados obtenidos para la cuenta de microorganismos en los experimentos realizados con el suelo conformado. Estos resultados indican que cuando se adicionan nutrientes, se incrementan las bacterias heterótrofas, dicho incremento es debido, probablemente, a la estimulación de las bacterias que pudieron estar en un período de letargo beneficiado por el pH en el que el desarrollo de los microorganismos es uno de los adecuados.

6.2.5 RESULTADOS DEL ANÁLISIS MOLECULAR APLICADO A LAS BACTERIAS AISLADAS

El análisis BLAST (con el programa BLASTN), mostró que las secuencias se agrupaban en proteobacterias y con los grupos α , β , y γ . La similitud está principalmente en los primeros 600 nucleótidos. Con base en los resultados del análisis BLAST y de análisis filogenéticos de las especies emparentadas, se realizaron alineamientos múltiples mediante el programa CLUSTAL_X (Thompson y cols., 1997) versión 1.81.

En el árbol filogenético (figura 8), se pueden apreciar, los géneros con los que se relacionan los microorganismos de las muestras analizadas, correspondientes a cada uno de los matraces. De tal modo, las muestras testigo (1), suelo con HPA y azida de sodio (2), suelo con relación C:P 100:1 (4) y suelo con relación C:N:P 100:10:1 (5) se relacionan con las betaproteobacterias, más específicamente con los géneros *Alcaligenes sp.* y *Achromobacter sp.* En este caso, para el primer género se ha reportado la presencia de un gen con actividad oxidoreductasa de compuestos aromáticos (Sanae y cols., 1999; Shen y cols., 2002), y para el segundo género mencionado, se ha demostrado su capacidad para degradar hidrocarburos policíclicos aromáticos en un sitio contaminado (Papacchini, 2002); de igual manera, en la muestra 2, los microorganismos se relacionan (aunque no tan estrechamente) con el género *Bordetella sp.*, el cual ha sido aislado y demostrada su capacidad degradadora de tricloroetileno en sitios contaminados con dicho compuesto (Hanada y cols., 1998). Los microorganismos en la muestra 3 (suelo con HPA e inóculo), se relacionan con organismos del grupo alfaproteobacteria, en especial con diversas especies del género *Ochrobactrum sp.*, Finalmente, los microorganismos de las muestras 6 y 7 (suelo a pH 4.5 y 9.2), son gammaproteobacterias y están relacionadas con organismos no cultivables, siendo el pariente más cercano identificado el género *Serratia sp.*, aislados en algunos casos de tanques de tratamiento de aguas residuales (Ajithkumar y cols., 2003), y en otras ocasiones con sitios contaminados con hidrocarburos (Dott, 1992).



_10

FIGURA 8: Árbol filogenético de los microorganismos identificados. Realizado con Neighbor Joining, con 100 remuestreos y usando el índice de Felsenstein 84. Al lado de cada secuencia se muestra el número de acceso a GenBank, se indica el valor estadístico sólo cuando es superior a 50%.

6.2.6 CONCLUSIONES PARCIALES

- En la biodegradación de criseno, antraceno y dibenzo(a,h)antraceno, en el suelo conformado, se encontró que, con una proporción C:N:P 100:10:1 y un pH cercano a la neutralidad (6.5) es posible reducir el tiempo de degradación del antraceno y el criseno, ya que el antraceno y criseno sin adición de nutrimentos, mostraron un nivel de remoción de 16.31% y 28.8%, respectivamente, en un período de 32 días; mientras que, en el mismo tiempo con adición de nutrimentos en las condiciones arriba mencionadas, el nivel de remoción aumento a 52.82 % y 38.07%, respectivamente.
- La identificación preliminar, mediante el análisis molecular, indica que los microorganismos involucrados en el proceso de biodegradación son filogenéticamente cercanos a los géneros *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Ochrobactrum*, *Serratia* y, en menor grado, a *Bordetella*. Dichos géneros han sido reportados previamente como microorganismos biodegradadores de hidrocarburos.
- La presencia de bacterias degradadoras de criseno y antraceno, es un indicio del proceso de adaptación de las mismas como medio de supervivencia y de la manifestación de la posibilidad de desarrollar un proceso de biodegradación en este tipo de suelo con las características mencionadas.
- La población presente fue capaz de mostrar actividad degradadora de hidrocarburos, bajo las condiciones de estudio, obteniendo altos porcentajes de biodegradación, pese a los tiempos relativamente cortos que se manejaron.
- Se corroboró que adicionando macronutrimentos como el nitrógeno y el fósforo y manteniendo un valor de pH cercano a la neutralidad y un inóculo activo, es posible biodegradar el 50% de los HPA que contaminen a un suelo, especialmente el antraceno, en tiempos relativamente cortos (30 días aproximadamente).
- De acuerdo al análisis estadístico, existe diferencia significativa, tanto para criseno como para antraceno entre los tratamientos, para los días 4, 8, 16, y 32; sin embargo, es importante mencionar, que la diferencia no se presentó igual, siendo menor para el criseno, lo cual se atribuye, a que es un compuesto de 4 anillos más difícil de degradar.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

- Se comprobó que el proceso de biodegradación de los hidrocarburos policíclicos antraceno y criseno, es factible de llevarse a cabo en el suelo conformado artificialmente; sin embargo, es necesario llevar a cabo otros estudios complementarios para mejorar la evaluación y la aplicación del proceso.
- Se recomienda efectuar estudios que ayuden a comprender el papel que desempeñan los microorganismos en un medio tan complejo como es el suelo, y poder determinar las condiciones bajo las cuales se pueden obtener mejores resultados en tiempos cortos. Entre dichas condiciones están la movilidad de los contaminantes, disponibilidad de los nutrimentos adicionados y aclimatación de las bacterias inoculadas.

8. ANEXOS

ANEXO A

TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACIÓN EDAFOLÓGICA DEL SUELO MUESTREADO

BREVE DESCRIPCIÓN Y FUNDAMENTO

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

Indica la acidez o la alcalinidad de soluciones acuosas, y es el resultado de las propiedades de disociación de los solutos. Se basa en la medición del logaritmo negativo de la concentración de iones H^+ presentes en la solución del suelo.

Para la determinación del pH, se colocaron 10 g de suelo dentro de un vaso de precipitados, al que se adicionaron 25 mL de una solución de cloruro de calcio 0.01 M y se homogeneizó por dos horas. Posteriormente se realizó la medición utilizando un electrodo sensitivo a los iones Hidrógeno (potenciómetro WTW).

Determinación del color del suelo (Código Munsell, 1996)

Se obtiene por comparación del suelo en estado seco y húmedo con las tablas del color Munsell, las cuales permiten unificar la denominación del color, ya que consisten en diferentes cuadros coloreados (243), distribuidos en tarjetas desmontables; dicho arreglo está hecho en base a las tres variables que se combinan para dar color: matiz, brillo e intensidad.

Determinación del tamaño de las partículas y textura (Método de Bouyoucos, 1974, Reyes, 1996)

Es la comparación porcentual de los separados; arenas, limos y arcillas. Consta de la dispersión del suelo a partir de un agente dispersante y el fraccionamiento por sedimentación de los diferentes tipos de material.

El método del hidrómetro, fue calibrado en 1926 por Bouyoucos, quien determinó que, en condiciones normales, después de 40 segundos todas las partículas mayores de 0.5 mm de diámetro se sedimentaran, de tal manera que no tendrán ninguna influencia sobre el hidrómetro. Las lecturas que se hacen una hora después de iniciada la sedimentación corresponden a partículas mayores de 5 micras, y luego de dos horas se sedimentan las partículas mayores de 2 micras y sólo quedan en suspensión las arcillas y partículas con un diámetro inferior a 2 micras.

El procedimiento se lleva a cabo pesando 55 g de suelo previamente secado al aire y tamizado, el cual se puso en un vaso de Berzelius al que se agregaron inicialmente 20 mL de una solución de peróxido de hidrógeno al 30% y se colocó a

baño María sin exceder los 60 °C y se siguió agregando peróxido de hidrógeno durante los siguientes 20 días hasta la completa destrucción de la materia orgánica indicada por la desaparición de las burbujas. Se dejó secar el suelo y se pesaron 50 g que se colocaron en un batidor eléctrico, al que se agregaron 10 mL de hexametáfosfato de sodio y 10 mL de oxalato de sodio, se adicionó agua destilada y se agitó durante 15 minutos para posteriormente pasarlo a una probeta de 1000 mL y se aforó con agua destilada. Se agitó 60 segundos con el agitador manual para homogeneizarla. Se dejó reposar durante 40 segundos y tomó la primera lectura con el hidrómetro. Se dejó reposar dos horas y se hizo la segunda lectura. Cada vez que se hizo una lectura, se tomó nota de la temperatura.

El porcentaje de partículas se calcula siguiendo las siguientes fórmulas:

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

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

$$\% \text{ arcillas} = \frac{\text{segunda lectura (120)} \times 100}{\text{g de suelo}}$$

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

Cálculo de porcentaje de humedad

Se conceptualiza como la proporción de masa de agua presente en una muestra. Se colocaron 10 g de suelo en crisoles a peso constante, esto se hizo colocando los crisoles en la estufa a 105 °C por 24 horas y se dejaron enfriar en un desecador. Posteriormente se les adiciono el suelo y se colocaron en la estufa a 105 °C por 24 horas, se dejaron enfriar en el desecador para pesarse nuevamente en una balanza analítica.

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

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

En donde:

W_i = peso inicial de la muestra de suelo

W_f = peso final del suelo

Determinación de la densidad real (Reyes Jaramillo, 1996)

Se define como la densidad de las partículas sólidas colectivamente y se expresa como la relación de la masa total de las partículas sólidas de su volumen total.

Para llevar a cabo esta determinación, se lavaron y secaron los picnómetros a 105 °C/1h. Se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron, anotando fracciones de diezmilésima de gramo. Posteriormente se pesaron 5 g de suelo seco y tamizado por malla de 2 mm de abertura. Se llenó con agua destilada hervida y fría un tercio del volumen del picnómetro, desalojando el aire que se pudiera formar de la suspensión agua-suelo. Se dejó reposar 30 minutos y se procedió a llenar con agua a su totalidad, incluyendo el capilar del tapón, teniéndose especial cuidado de no derramar nada. A continuación, se pesó nuevamente el picnómetro, con lo cual se obtuvo el peso del agua más el peso del suelo; contando con estos datos, se desechó el contenido del picnómetro y se enjuagó para llenarlo con agua hasta que esta última subió por el capilar y se pesó nuevamente.

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

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

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

Determinación del espacio poroso (Reyes Jaramillo, 1996)

El espacio poroso es, el espacio vacío entre las partículas del suelo. Para obtener el porcentaje de porosidad se determinaron primero los valores de densidad aparente (DA) y de la densidad real o de las partículas (DP) del suelo, sustituyendo los valores en la siguiente relación:

$$\text{Espacio poroso} = 100 - (DA/DP) \times 100$$

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

La materia orgánica, es el conjunto de residuos orgánicos de vegetales, animales, microorganismos vivos y muertos, así como contaminantes orgánicos. Este parámetro se midió de manera indirecta a partir de la determinación de carbono orgánico total, siguiendo la metodología propuesta por Walkley y Black, la cual comprendió la combustión de la materia orgánica de la muestra de 0.1 g de suelo (seco y tamizado a 0.5 mm) con una solución de dicromato de potasio y ácido sulfúrico concentrado, los cuales al entrar en contacto, producen una temperatura

de 125 °C. Se dejó reposar por espacio de 30 minutos al cabo de los cuales se agregaron 250 mL de agua y 10 mL de ácido fosfórico. El dicromato que queda después de la oxidación se tituló con sulfato ferroso y en lugar de usar un indicador (difenilamina) como lo proponen Walkley y Black (1934) se hicieron mediciones potenciométricas.

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

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

En donde:

M = solución molar de sulfato ferroso

V1 = mL de solución molar de sulfato ferroso requeridos para el blanco

V2 = mL de solución molar de sulfato ferroso requeridos para la muestra

S = peso de la muestra en gramos

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

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

Determinación de fósforo disponible (Bray- I, Jackson, 1976)

Este método ha sido ampliamente usado como un índice de fósforo disponible en los suelos. La mezcla de HCL y NH₄F tiene como finalidad remover las formas de fósforo fácilmente solubles en medio ácido, en gran parte de los fosfatos de calcio y una proporción de los fosfatos de aluminio y de hierro. El NH₄ F disuelve los fosfatos de aluminio y hierro al formar un ion complejo con estos iones metálicos en solución ácida. Este método ha sido más exitoso en los suelos ácidos.

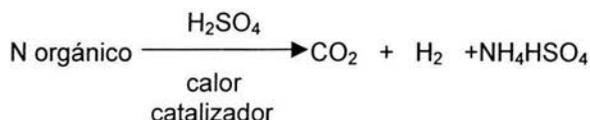
Se peso 1.0 g de suelo secado al aire y tamizado con una malla de 2 mm y se colocaron en una botella de extracción, en donde se añadieron 20 mL de una solución extractora (mezcla de HCl 0.025 N y NH₄F 0.03 N) y se agitó vigorosamente por 5 minutos. Después de agitar, se filtró utilizando papel filtro Whatman No.2. Se transfirieron 2 mL del extracto a un tubo al que se añadieron 8 mL de una solución de sulfuro-molibdato y ácido ascórbico-L, mezclando perfectamente. Después de 10 minutos se midió la intensidad del color (%T) a 882nm.

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

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

Determinación de nitrógeno total (Jackson, 1976)

Nitrógeno en forma orgánica e inorgánica (nitratos, nitritos, amonio intercambiable y amonio fijo). El procedimiento Kjeldahl es el más usado en la determinación de nitrógeno en suelos. Existen de él versiones macro, semi-micro y micro adaptadas a varias circunstancias y condiciones, pero todas ellas constan de dos pasos bien definidos: la digestión de la muestra y la evaluación del amonio. La relación generalizada del procedimiento Kjeldahl se representa en la siguiente ecuación:



Para llevar a cabo esta determinación, se pesó 1.0 g de suelo previamente tamizado a través de malla 60 y se colocó en un frasco micro-Kjeldahl seco, al que se adicionaron 1.1 g de mezcla de catalizadores K_2SO_4 , 3 mL de H_2SO_4 , para después colocarse en la unidad digestora a temperatura media alta hasta que el digestado se tornó claro. A partir de este momento se dejó ebulir la muestra por una hora. Una vez que se completó esta etapa, se agregaron 20 mL de agua al frasco, para poner en suspensión el digestado. Se dejaron decantar las partículas de sílice. El contenido líquido se transfirió a la cámara de destilación del aparato de destilación por arrastre de vapor. Se colocaron 10 mL de NaOH 10 N en el fondo de la cámara de destilación. Se destiló hasta coleccionar 75 mL de destilado.

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

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

En donde:

V_m = Volumen de H_2SO_4 empleado en titular la muestra

V_B = Volumen de H_2SO_4 empleado en titular el blanco

N = Normalidad exacta de ácido sulfúrico

14 = Peso equivalente del nitrógeno

P = Peso de la muestra expresado en gramos

100 = Factor para convertir a porcentaje

ANEXO B DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS EN SUELOS

**TÉCNICA UNEP/IOC/IAEA (1992) DETERMINATION OF PETROLEUM
HYDROCARBONS IN SEDIMENTS REFERENCE METHOD 20. UNITED NATIONS
ENVIRONMENT PROGRAMME**

Extracción Soxhlet

La extracción de la muestra se realizó mediante un procedimiento para extraer compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles de sólidos tales como suelos, dicha extracción maximiza el contacto entre la matriz de la muestra y el solvente extractante (método 3540 de la U.S. EPA, métodos para la evaluación de residuos sólidos).

Se colocaron 5 g del suelo contaminado, en un tubo de celulosa para extracción. El tubo se introdujo en un extractor soxhlet, que es conectado a un matraz de bola con 250 ml de una mezcla hexano:diclorometano (50:50) y un refrigerante. Una vez montado el extractor, se colocó en un calentador. La extracción permaneció durante 8 horas con ciclos de sifón de 10 minutos. Posteriormente, el extracto se concentró hasta un volumen de 5 mL.

Separación en columnas

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

Nota: la sílice y la alúmina se activan a 200 °C durante 4 horas y se deactivan al 5% en peso/peso con agua tridestilada.

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

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

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

Las muestras fueron comparadas con una mezcla de estándares para hidrocarburos alifáticos, cuya especificación se da a continuación:

TPH-6M

"diesel range organics mixture No. 2"

1000 µg/mL en cloruro de metileno

lote 214-25A. CHEM SERVICE

La mezcla de estándares para hidrocarburos aromáticos fue:

PPH-10M

PAH mezcla 610/525/550

100 µg/mL en metanol

lote 199-85A. CHEM SERVICE

Los reactivos que se emplearon fueron grado CLAR (HPLC siglas en inglés) de Merck y gas acarreador de alta pureza marca LINDE.

TABLA B.1. Muestra el programa de temperaturas para la determinación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos.

Programa de temperatura	Hidrocarburos alifáticos	Hidrocarburos aromáticos
Temperatura 1	70°C	90 °C
Tiempo	0.5 min	0.5 min
Incrementos	11°C /min	8 °C /min
Temperatura 2	180°C	180 °C
Tiempo	0 min	0 min
Incrementos	10°C /min	5 °C /min
Temperatura 3	245°C	245 °C
Tiempo	0 min	0 min
Incrementos	9°C /min	2 °C /min
Temperatura final	300°C	300 °C
Tiempo	15 min	6 min
Tiempo total de corrida	59.7 min	58.3 min

Mediante el uso de cromatografía de gases, se determinaron los niveles de hidrocarburos aromáticos y alifáticos presentes tanto en el suelo contaminado, como en el testigo (suelo artificial sin contaminante), previa calibración del equipo con un estándar comercial.

Fue posible detectar los 16 compuestos poliaromáticos, con las condiciones cromatográficas descritas anteriormente.

TABLA B.2. Mezcla de estándares de 16 hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) a una concentración de 40 ppm

Nombre del compuesto	Tiempo de retención	Concentración (ppm)	% HPA recuperado
naftaleno	8.60	40.21	100.5
acenaftileno	13.43	40.10	100.4
acenafteno	14.06	39.93	99.8
fluoreno	15.90	40.41	101
fenantreno	19.76	40.38	101.2
antraceno	19.96	40.63	101.6
fluoranteno	25.26	40.73	101.8
pireno	26.38	40.81	102
benzo(a)antraceno	33.90	41.15	102.8
criseno	34.20	41.10	102.8
benzo(b)fluoranteno	42.43	40.82	102.1
benzo(k)fluoranteno	42.66	41.02	102.6
benzo(a)pireno	45.01	41.11	102.8
benzo(ghi)perileno	54.45	34.23	85.6
dibenzo(ah)antraceno	54.56	39.62	99.1
indeno(1,2cd)pireno	56.70	40.77	101.9

TABLA B.3. Mezcla de estándares de 16 hidrocarburos alifáticos (40 ppm).

Nombre del compuesto	Tiempo de retención	Concentración (ppm)	Hidrocarburos alifáticos recuperados (%)
C-10	8.26	40.91	102.3
C-11	10.63	39.97	99.9
C-12	13.11	40.0	100
C-13	15.58	40.12	100.3
C-14	17.95	40.16	100.4
C-15	20.23	40.11	100.3
C-16	22.38	40.24	100.6
C-17	24.45	40.74	101.9
C-18	26.40	41.33	103.3
C-19	28.28	41.87	104.7
C-20	30.06	42.91	107.3
C-21	31.70	42.35	105.9
C-22	33.18	42.49	106.2
C-23	34.51	43.80	109.5
C-24	35.83	42.10	105.3
C-25	37.15	39.58	98.95

ANEXO C

RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

El cromatógrafo de gases se calibra con un estándar de los HPA. Para realizar el análisis cuantitativo de forma confiable se requiere trabajar las muestras dentro de un intervalo comprendido entre 1 y 100 ppm. Es por esa razón que las muestras tienen que ser diluidas para que la concentración quede dentro de dicho intervalo. Lo más adecuado es que todos los datos se obtengan en idénticas condiciones. No obstante, se ha observado que una muestra con una concentración de 20 ppm del estándar de HPA, que se inyecta en dos ocasiones, al principio y al final de la secuencia de análisis, genera respuestas diferentes. Este tipo de respuesta se debe a que el análisis se realiza en forma continua, con una duración de 40 horas, aproximadamente, por lo que es muy probable que las condiciones de respuesta del detector de masas varíen a lo largo del tiempo.

TABLA C.1. Curva de calibración para antraceno, muestra la concentración real y la concentración registrada por el cromatógrafo

Concentración real ppm	Respuesta cromatógrafo antraceno
0.7	1.09
65.9	20.8
19.3	20.8
63.9	41.6
91.8	109.28

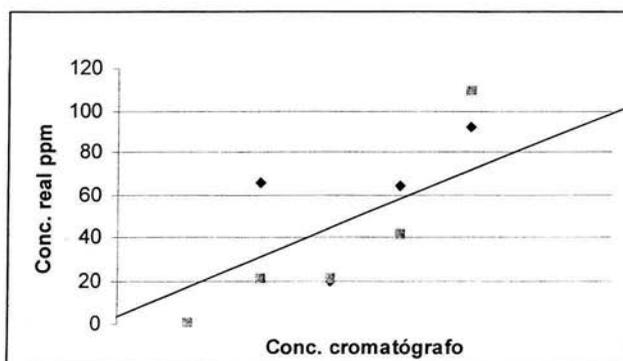


FIGURA C.1: Muestra la curva de calibración del antraceno

TABLA C.2. Curva de calibración para criseno, muestra la concentración real y la concentración registrada por el cromatógrafo.

Concentración real ppm	Respuesta cromatógrafo criseno
1	1.08
56.1	19.95
15.5	19.95
51.9	39.7
98.2	107.92

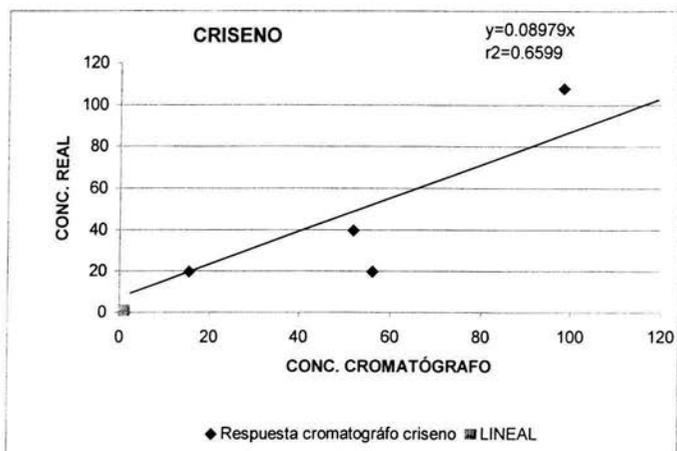


FIGURA C.2. Muestra la curva de calibración del criseno.

TABLA C.3. Curva de calibración para dibenzo(a,h)antraceno.

Concentración real ppm	Respuesta cromatógrafo db(a,h)ant
0.2	0.51
29.9	10.78
7.3	10.78
25.3	21.55
46.2	67.76

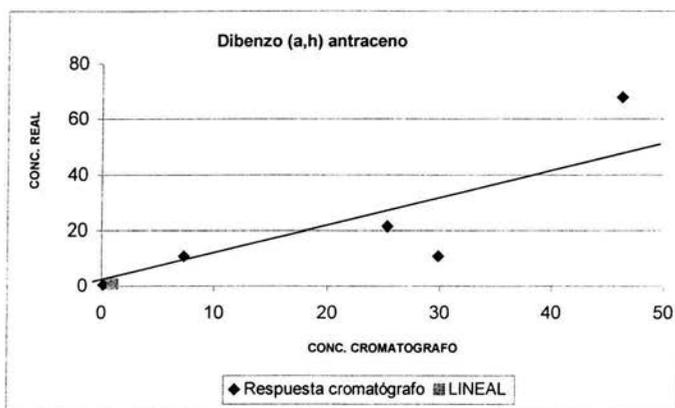


FIGURA C.3. Muestra la curva de calibración del dibenzo (a,h)antraceno.

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL SUELO CON HPA Y AZIDA DE SODIO

Los extractos se obtuvieron por duplicado para los ensayos correspondientes a los días 0, 4, 8, 16 y 32. Después de ser fraccionados se diluyen 1:10, se hace una reacción con TMS y se analizan en el cromatógrafo de gases. Una vez obtenidos los resultados del análisis cromatográfico en los extractos del suelo con HPA y azida de sodio (concentración en ppm), se calculó la concentración de los HPA corrigiendo por el factor de dilución y por la cantidad de suelo seco en la muestra.

Como ya se mencionó, este ensayo fue planteado para observar la remoción de factores abióticos, ya que al agregar la azida de sodio se inhibe la actividad microbológica, también se sabe que los HPA son compuestos que difícilmente se evaporan.

De acuerdo con lo anterior, la concentración de HPA en el matraz 2 debe permanecer sin variaciones, para antraceno y criseno: 500 ppm. Sin embargo, al observar los resultados en la tabla anterior, las concentraciones de HPA permanecen por debajo de los valores mencionados e incluso en el día cero, se observan variaciones, lo anterior se debe principalmente a la eficiencia del proceso de extracción y la adsorción entre los HPA con el suelo.

El cálculo de la eficiencia de extracción se hace dividiendo los valores encontrados de antraceno y criseno entre 500 y los de dibenzo (a,h) antraceno entre 50. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

TABLA C.4. Eficiencia de extracción de HPA en el suelo con azida de sodio

DÍA	ANTRACENO	CRISENO	DIBENZO(a,h) ANTRACENO
0	0.294	0.335	0.164
4	0.615	0.600	0.360
8	0.157	0.144	0.086
16	0.329	0.308	0.181
90	0.684	0.647	0.362

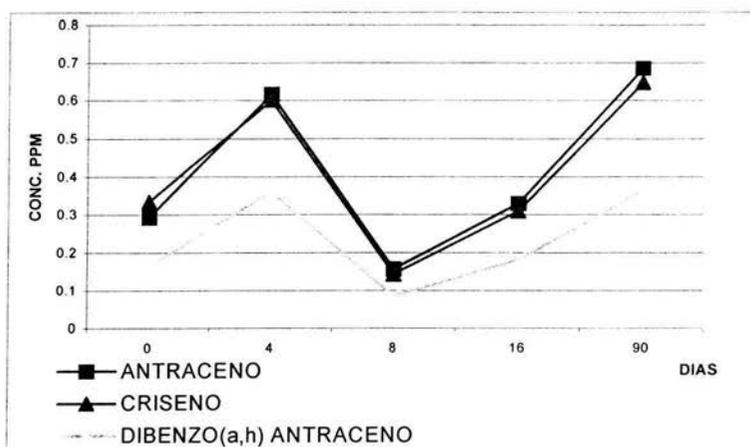


FIGURA C.4. Muestra la eficiencia de extracción de los HPA analizados

Nota: Los resultados mostrados son promedio de 2 muestras

En la gráfica anterior, se puede observar que la eficiencia de extracción es diferente para cada uno de los días de muestreo, y durante la extracción se da una selectividad del disolvente empleado para cada uno de los HPA. Del mismo modo se encontró una relación entre la eficiencia de extracción del dibenzo (a,h) antraceno con la del antraceno y criseno. De esta forma se determinó que si la eficiencia de extracción del dibenzo (a,h) antraceno aumenta, existe un aumento en forma proporcional para el criseno y antraceno; en este caso, dado que el primero es un compuesto difícil de degradar, se puede emplear como estándar interno.

Nota: el factor esta determinado por la proporción de criseno y antraceno con el estándar interno y por la eficiencia de extracción

ANEXO D ESTADÍSTICA APLICADA A LOS RESULTADOS: ANOVA Y PRUEBA DE TUKEY

H_0 = No existe diferencia significativa en la concentración del contaminante a través del tiempo

H_a = Sí existe diferencia significativa en la concentración del contaminante a través del tiempo. Se consideró que hay diferencia significativa cuando $P < 0.05$

TABLA D.1. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar el efecto del tratamiento en el matraz 2), sobre la concentración de antraceno con respecto al tiempo (suelo con HPA y azida de sodio).

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFFECTO	968.00	4	242.00	22.33	0.002178
Error	54.18	5	10.33		

TABLA D.2. Como resultado de la prueba de Tukey, se observa que la concentración de antraceno no difiere para los días 0, 8, 16 y 32, aunque si difiere en el día 4.

TIEMPO (DÍAS)	CONC. ANTRACENO (PPM)	
0	495.51	a
4	474.05	b
8	500.40	a
16	496.00	a
32	500.44	a

TABLA D.3. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar el efecto del tratamiento en el matraz 2, sobre la concentración de criseno, con respecto al tiempo.

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFFECTO	11509.30	4	2877.32	253.30	0.000006
Error	56.80	5	11.35		

TABLA D.4. En lo que se refiere a la prueba de Tukey, se observa que la concentración de criseno en el matraz 2 difiere en los días 0, 4, 8, 16 y 32, sin embargo no difieren entre sí los días 4, 8 y 16, los cuales forman un solo grupo.

TIEMPO (DÍAS)	CONC. CRISENO (PPM)	
0	499.06	a
4	408.16	b
8	410.30	cb
16	417.45	db
32	438.54	e

En el matraz 2, se encontró sólo una diferencia significativa en la concentración de antraceno a través del tiempo (tabla D.2), para el crisenó hay diferencia significativa a través del tiempo sobre todo en los días 0 y 32, ya que se está registrando la aparente degradación por factores abióticos, en este caso, es muy probable que se estén presentando procesos de adsorción; sin embargo, esto se registró a lo largo del experimento de manera similar, y podría atribuirse a errores experimentales.

TABLA D.5. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar el efecto en el matraz 3, sobre la concentración de antraceno, con respecto al tiempo (suelo con HPA e inóculo).

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFFECTO	539928.6	7	77132.66	1094.26	0.000000
Error	56.39	8	70.49		

TABLA D.6. Como resultado de la prueba de Tukey, se observa que la concentración de antraceno, en el matraz 3, no difiere en los días 0, 4, 8 y 16 los cuales se agrupan en un mismo grupo, este grupo, difiere significativamente con los días 32, 64, 90 y 132, que a su vez difieren entre sí.

TIEMPO (DÍAS)	CONC. ANTRACENO (PPM)	
0	497.84	a
4	496.66	a
8	474.53	a
16	494.11	a
32	430.10	b
64	258.50	c
90	97.35	d
132	15.54	e

TABLA D.7. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar el efecto en el matraz 3, sobre la concentración de criseno, con respecto al tiempo.

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFFECTO	108774.1	7	15539.16	1391.20	0.000000
Error	89.4	8	11.17		

En este tratamiento se esperaba encontrar una diferencia significativa por la presencia del inóculo, lo cual es corroborado por el valor de $P= 0.000000$, que indica una diferencia altamente significativa, es decir a partir de este resultado se consideró factible lograr una reducción en la concentración de ambos contaminantes.

TABLA D.8. En lo que respecta a la prueba de Tukey, se observa que la concentración de criseno, para los días 0, 4, 8, 16, 32, 64, 90 y 132 difieren significativamente, sin embargo los días 8 y 16 no difieren entre sí.

TIEMPO (DÍAS)	CONC. CRISENO (PPM)	
0	501.11	a
4	485.39	b
8	367.02	c
16	372.85	dc
32	349.48	e
64	322.85	f
90	272.43	g
132	261.40	h

TABLA D.9. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar el efecto en el matraz 4, sobre la concentración de antraceno, con respecto al tiempo (relación carbono:fósforo de 100:1 y un valor de pH de 6.5).

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFFECTO	78472.77	4	19618.19	2657.97	0.000000
Error	36.90	5	7.38		

TABLA D.10. Como resultado de la prueba de Tukey, se observa que en la concentración de antraceno en el matraz 4, no difieren entre sí los días 8 y 16, pero sí difieren con los días 0, 4 y 32.

TIEMPO (DÍAS)	CONC. ANTRACENO (PPM)	
0	499.24	a
4	459.11	b
8	311.19	c
16	321.21	dc
32	276.13	e

TABLA D.11. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar el efecto en el matraz 4, sobre la concentración de criseno, con respecto al tiempo.

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFFECTO	13551.74	4	3387.93	495.53	0.000001
Error	34.18	5	6.83		

TABLA D.12. Como resultado de la prueba de Tukey, se observa que la concentración de criseno en el matraz 4, no difiere en los días 0 y 4, y 16 y 32, pero sí con respecto al día 8.

TIEMPO (DÍAS)	CONC. CRISENO (PPM)	
0	492.05	a
4	484.10	a
8	431.51	b
16	413.17	c
32	402.11	dc

En el matraz 4 se observó una diferencia significativa tanto para criseno como para antraceno, lo cual se atribuye principalmente al valor de pH, ya que pese a que no contiene el nutriente nitrógeno, el cual es un elemento muy importante en los procesos de degradación biótica se logró un porcentaje de remoción de los contaminantes

TABLA D.13. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar el efecto en el matraz 5, sobre la concentración de antraceno, con respecto al tiempo (relación carbono:nitrógeno:fósforo de 100:10:1 y un valor de pH de 6.5).

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFEECTO	139190.3	4	34797.57	9478.99	0.000000
Error	18.4	5	3.67		

TABLA D.14. En lo que respecta a la prueba de Tukey, se observa que la concentración de antraceno en el matraz 5, entre los días 0 y 4 no hay diferencia significativa, pero sí de estos con respecto a los días 8, 16 y 32.

TIEMPO (DÍAS)	CONC. ANTRACENO (PPM)	
0	500.26	a
4	497.68	a
8	447.39	b
16	253.14	c
32	235.50	d

TABLA D.15 Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar el efecto del tratamiento en el matraz 5, sobre la concentración de criseno, con respecto al tiempo.

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFEECTO	82321.59	4	20580.40	3018.53	0.000000
Error	34.09	5	6.82		

Se observa diferencia altamente significativa para ambos contaminantes, lo cual se había previsto, ya que de acuerdo a las referencias bibliográficas el pH de 6.5 y la relación C:N:P de 100:10:01 son los más adecuados para lograr una excelente reducción de los contaminantes(Bewley, 1996)

TABLA D.16. Como resultado de la prueba de Tukey, se observa que la concentración de criseno, en el matraz 5, los días 0, 4 y 8 forman un grupo ya que no difieren entre sí, por su parte, los días 16 y 32, forman otro grupo.

TIEMPO (DÍAS)	CONC. CRISENO (PPM)	
0	500.56	a
4	495.25	a
8	493.68	ba
16	312.85	c
32	309.87	dc

TABLA D.17. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar el efecto del tratamiento en el matraz 6, sobre la concentración de antraceno, con respecto al tiempo (relación carbono:nitrógeno:fósforo de 100:10:1 y un valor de pH de 4.2).

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFFECTO	1522.30	3	507.43	160.49	0.000127
Error	12.64	4	3.16		

TABLA D.18. En cuanto a la prueba de Tukey, se observa que la concentración de antraceno en el matraz 6, no difiere entre los días 0 y 4, pero sí para los días 8 y 16.

TIEMPO (DÍAS)	CONC. ANTRACENO (PPM)	
0	495.32	a
4	500.22	a
8	486.26	b
16	464.25	c

TABLA D.19. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar el efecto del tratamiento en el matraz 6, sobre la concentración de criseno, con respecto al tiempo.

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFFECTO	5161.05	3	1720.35	941.15	0.000004
Error	7.31	4	1.82		

De acuerdo al análisis estadístico, en ambos contaminantes existe diferencia altamente significativa, con un valor de $P < 0.01$, sin embargo, el valor máximo de remoción para el día 16 fue de 7.19 para el antraceno y de 7.52 para el criseno, lo cual puede deberse en parte al pH que se manejó que de alguna manera puede inhibir la actividad microbiana pese a que esta dentro del intervalo en el que crecen las bacterias, aunque como se puede observar, muy cerca del límite inferior.

TABLA D.20. Como resultado de la prueba de Tukey, se observa que la concentración de criseno en el matraz 6, muestra un comportamiento similar al antraceno.

TIEMPO (DÍAS)	CONC. CRISENO (PPM)	
0	499.14	a
4	500.19	a
8	440.22	b
16	462.58	c

TABLA D.21. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar el efecto del tratamiento en el matraz 7, sobre la concentración de antraceno, con respecto al tiempo (relación carbono:nitrógeno:fósforo de 100:10:1 y un valor de pH=9.2).

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFFECTO	101.46	2	50.73	20.82	0.017412
Error	7.30	3	2.43		

TABLA D.22. En lo que se refiere a la prueba de Tukey, se observa que la concentración de antraceno en el matraz 7, forma un grupo con los días 0 y 16, y ambos difieren con el día 4.

TIEMPO (DÍAS)	CONC. ANTRACENO (PPM)	
0	497.68	a
4	490.41	b
16	500.09	a

TABLA D.23. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar el efecto del tratamiento en el matraz 7, sobre la concentración de criseno, con respecto al tiempo.

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFEECTO	7.90	2	3.95	2.42	0.236321
Error	4.89	3	1.63		

Definitivamente se puede decir que el pH de 9.2, no fomenta la actividad microbiana para la degradación de los contaminantes, ya que por lo que se observa en el valor de *P* para ambos contaminantes, hay diferencia significativa para el antraceno, aunque en menor grado que los tratamientos anteriores y, se observa que, en el caso del criseno, no existe diferencia significativa y ello se atribuye en gran parte al pH como ya se había mencionado anteriormente.

TABLA D.24. En cuanto a la prueba de Tukey, se observa que la concentración de criseno en el matraz 7, para los días 0, 4 y 8 no difiere significativamente.

TIEMPO (DÍAS)	CONC. CRISENO (PPM)	
0	500.49	a
4	498.73	a
8	497.71	a

PRUEBA TUKEY ENTRE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS, CON RESPECTO AL TIEMPO PARA EL ANTRACENO

H_0 = No existe diferencia significativa en la concentración del contaminante entre los distintos tratamientos aplicados a un tiempo determinado.

H_a = Sí existe diferencia significativa en la concentración del contaminante entre los distintos tratamientos aplicados a un tiempo determinado.

Se consideró que existe diferencia significativa cuando $P < 0.05$

TABLA D.25. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas en la concentración de antraceno entre los distintos tratamientos a un tiempo determinado (Día 0).

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFEECTO	38.75	5	7.75	1.66	0.274688
Error	27.88	6	4.64		

Para el día 0, no hay diferencia significativa por lo que no se aplicó prueba de Tukey. Este resultado es muy importante porque indica que todos los tratamientos iniciaron con una concentración de contaminante similar.

TABLA D.26. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas en la concentración de antraceno entre los distintos tratamientos a un tiempo determinado (Día 4).

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFEECTO	2674.00	5	534.80	105.44	0.000009
Error	30.43	6	5.07		

TABLA D.27. Como resultado de la prueba de Tukey, se observa que en cuanto a la concentración de antraceno, en el día 4, los tratamientos 2, 4, 5 y 6 forman un grupo, ya que no difieren entre sí, pero sí difieren con respecto a los tratamientos 1 y 3.

TRATAMIENTO	CONC. ANTRACENO (PPM)	
1	474.05	a
2	496.05	b
3	459.11	c
4	497.68	db
5	500.22	eb
6	490.41	fb

TABLA D.28. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas en la concentración de antraceno entre los distintos tratamientos a un tiempo determinado (Día 8).

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFEECTO	52347.75	5	10469.55	1248.15	0.0000
Error	50.32	6			

TABLA D.29. Como resultado de la prueba de Tukey, se observa que en cuanto a la concentración de antraceno, en el día 8, no difiere para los tratamientos 1 y 6, sin embargo, se observa diferencia significativa con los tratamientos 2, 3, 4 y 5.

TRATAMIENTO	CONC.ANTRACENO (PPM)	
1	500.40	a
2	474.53	b
3	311.19	c
4	447.39	d
5	486.26	e
6	500.09	a

TABLA D.30. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas en la concentración de antraceno entre los distintos tratamientos a un tiempo determinado (Día 16).

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFEECTO	99621.45	4	24905.36	1483.53	0.000000
Error	83.94	5	16.79		

TABLA D.31. Como resultado de la prueba de Tukey, se observa que en cuanto a la concentración de antraceno, en el día 16, no difieren el tratamiento 1 y 2, pero sí con los tratamientos 3, 4 y 5 que también difieren entre sí.

TRATAMIENTO	CONC.ANTRACENO (PPM)	
1	496.00	a
2	494.11	a
3	321.21	b
4	253.14	c
5	464.25	d

TABLA D.32. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas en la concentración de antraceno entre los distintos tratamientos a un tiempo determinado (Día 32).

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFEECTO	167844.95	3	55948.31	2121.63	0.0000
Error	105.48	4	26.37		

A partir del día 4, para el caso del antraceno, se puede observar el efecto de los distintos tratamientos, ya que en los tiempos 3, 4 y 5 también hay diferencia significativa.

TABLA D.33. Con respecto a la prueba de Tukey, se observa que en cuanto a la concentración de antraceno, en el día 32, difiere en los tratamientos 1, 2, 3 y 4.

TRATAMIENTO	CONC. ANTRACENO (PPM)	
1	500.44	a
2	97.35	b
3	276.13	c
4	235.50	d

PRUEBA TUKEY ENTRE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS, CON RESPECTO AL TIEMPO PARA EL CRISENO

TABLA D.34. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas en la concentración de crisenó entre los distintos tratamientos a un tiempo determinado (Día 0). Se consideró que hay diferencia significativa cuando $P < 0.05$

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFFECTO	114.11	5	22.82	4.63	0.0444129
Error	29.53	6	4.92		

Para el caso del crisenó, en el día 0, se observa diferencia significativa entre los distintos tratamientos, con un valor de $P < 0.05$, lo cual, es importante dado que al día 0 no debe haber diferencia, o al menos ésta no debe ser significativa, puesto que es la concentración con la que inicia el experimento. **(pagina 55 texto victor)**

TABLA D.35. Como resultado de la prueba de Tukey, en cuanto a la concentración de crisenó, en el día 0, los tratamientos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 no difieren significativamente y los tratamientos 3, 4 y 5 forman otro grupo que no difieren entre sí.

TRATAMIENTO	CONC. CRISENO (PPM)	
1	499.06	a
2	501.11	a
3	492.05	ab
4	500.56	ac
5	500.49	abc
6	500.49	a

TABLA D.36. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas en la concentración de crisenó entre los distintos tratamientos a un tiempo determinado (Día 4).

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFFECTO	12374.49	5	2474.89	357.23	2.4533E-07
Error	41.56	6	6.92		

TABLA D.37. En lo que se refiere a la prueba de Tukey, en el día 4, se observa que en cuanto a la concentración de criseno, se forma un grupo con los tratamientos 2, 3, 4 y, otro entre los tratamientos 5 y 6, ambos grupos difieren con respecto al tratamiento 1.

TRATAMIENTO	CONC. CRISENO (PPM)	
1	408.16	a
2	485.39	b
3	484.10	cb
4	495.25	db
5	500.19	ed
6	498.73	fd

TABLA D.38. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas en la concentración de criseno entre los distintos tratamientos a un tiempo determinado (Día 8)

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFFECTO	24983.74	5	4996.74	695.81	3.3423E-08
Error	43.08	6	7.18		

TABLA D.39. Como resultado de la prueba de Tukey, se observa que en cuanto a la concentración de criseno, en el día 8, se forma un grupo entre los tratamientos 4 y 6, y otro entre los tratamientos 3 y 5, mientras que los tratamientos 1 y 2 difieren significativamente de ambos grupos.

TRATAMIENTO	CONC. CRISENO (PPM)	
1	410.30	a
2	367.02	b
3	431.51	c
4	493.68	d
5	440.22	ec
6	497.71	fd

TABLA D.40. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas en la concentración de criseno entre los distintos tratamientos a un tiempo determinado (Día 16).

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFFECTO	25274.71	4	6318.67	1099.08	1.5212E-07
Error	28.74	5	5.74		

TABLA D.41. Como resultado de la prueba de Tukey, se observa que en cuanto a la concentración de criseno para el día 16, los tratamientos 1 y 3 forman un grupo que difiere significativamente con los tratamientos 2, 4 y 5.

TRATAMIENTO	CONC. CRISENO (PPM)	
1	417.45	a
2	372.85	b
3	413.17	a
4	312.85	c
5	462.58	d

TABLA D.42. Análisis de varianza y Prueba de Tukey para determinar las diferencias significativas en la concentración de criseno entre los distintos tratamientos a un tiempo determinado (Día 32).

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	gl	CM	F	P
EFFECTO	19330.18	3	6443.39	1366.89	0.00000
Error	18.85	4	4.71		

TABLA D.43. Como resultado de la prueba de Tukey, se observa que en cuanto a la concentración de criseno para día 32, existe diferencia significativa entre los 4 tratamientos.

TRATAMIENTO	CONC. CRISENO (PPM)	
1	438.54	a
2	349.48	b
3	402.11	c
4	309.87	d

Para el criseno se observa diferencia altamente significativa entre los tratamientos, para los días 4, 8, 16 y 32, pese a ello es importante mencionar, que la diferencia no se presenta igual que para el antraceno sino que es menor, esto se atribuye a que el criseno es un compuesto de 4 anillos más difícil de degradar.

ANEXO E

ANÁLISIS MOLECULAR APLICADO A LAS BACTERIAS AISLADAS

Una vez que se logró el aislamiento de las cepas en el suelo conformado artificialmente y contaminado con HPA, se procedió a realizar el análisis molecular, a fin de valorar con que géneros son filogenéticamente cercanos los microorganismos involucrados en el proceso de biodegradación. Los resultados de las secuencias obtenidas se muestran a continuación.

TABLA E.1. Secuencias obtenidas en la identificación mediante análisis molecular.

MUESTRA	TAMAÑO (NTS)	ADENINAS (%)	CITOSINAS (%)	GUANINAS (%)	TIMINAS (%)	N (%)
1	1060	267(25)	223 (21)	230 (22)	192 (18)	148 (14)
2	968	247 (26)	220 (23)	296 (31)	178 (18)	27 (3)
3	993	239 (24)	214 (22)	303 (31)	195 (20)	42 (4)
4	970	243 (25)	224 (23)	278 (29)	181 (19)	44 (5)
5	969	245 (25)	216(22)	299 (31)	179 (18)	30 (3)
6	978	239 (24)	215 (22)	309 (32)	188 (19)	27 (3)
7	982	241 (25)	214 (22)	313 (32)	189 (19)	25 (3)

Secuencia 1: Correspondiente a la muestra 1, cepa aislada del suelo contaminado con HPA a un pH de 9.2 y una proporción C:N:P 100:10:1

SEQ SEQ1: 1060 bp;

Composición 267 A; 223 C; 230 G; 192 T; 148 Otras

Porcentaje: 25% A; 21% C; 22% G; 18% T; 14% otras

Peso Molecular (kDa): ssDNA: 327.79 dsDNA: 653.6

ORIGIN

```

1 CCNNAANNGA ACGCTAGCGG GATGCCTNAC ACATGCAAGT CGAACGNCCN GCCACGGGAC
61 TNGCNGTCTG ANGGCTGANT GGACGAACGG GGTNACGTAA NGTTTTNGNTA ACGTGCTCTA
121 GTCAGCGGGN GAGCATAACG TCACAACCTNN NAGTCGTGAT NCTNNTNCCG NNTACAACNA
181 CTANNNNGGGG NAAAGGCANG GGCANCGCAN GGACCTTGCN CTATTNGAGN GGCCGANGTN
241 GNCNTAGGCT AANTGGTGTG GTAACGGGCTC ACCAGNGCAT CGATCCGCTG GTGGTTTGAA
301 CAGGACGACA AACTCACNCT GGGACTGAGC ACACGGGGNA TACTGCTNCN NGGAGGCNAC
361 ACCNGNTGAA TTTNATGACA ATGTGGAGGA GAACCACTGG ATCCAGNGCA TNGCCAAAGT
421 GTCGCTTATG CAAGGGCCTT CATGNTNGCA AAGCACTTTT GGCAAAGANN GAAACTTACA
481 TGGGCTAATA CCCCCTGAAA CTGACGGTAG CCGTCTAGAA TAAGCACCGN TTAACCTNCGN
541 GCCAACAGCA CGCTGTAATA CCTATGGTGC AAGCGTNNAT NTCCAATTAC TNNAACCTAA
601 AGNGCTGCGC TTTGCANGCT CGGAAAGATG ATGTGAAATC CCANAGCTNA ACTTTCGAAC
661 TGCATTGTTA ACTACCGAGN TATTAGTGNG NNACACGGAG GTGGAATTCC GCTTGTAGCA
721 CCATAACTGC ACTACTTATG CGGAAGANCA CCGATAGCAA AAGCAATTCT ANTNNNATNA
781 CACTGACGCT CATGCACNAA NANNGTTGGN NGCAAACAGN ATTAATACC CTGGNANNCC
841 ACTCCCTAAN CNANGTNNNC TACCTGGTNG GGCCTTCGGA CCNTNANANC NCANNTANCC
901 CNGAGTNCNC NCCTGNGGAG TACNGTNNNG AGNNNAACT NNANGGANTT GACGNTACCC
961 CCCNNGCGTG NGNGATGNGG AATAATNAAT GNNNCNAAA AACNTACTNC CNTTAATNTN
1021 TGGANTNCNA AAAAATTNNA NTNTNNNAAA AAACCNAANC

```

Secuencia 2: Correspondiente a la muestra 2, cepa aislada del suelo contaminado con HPA con un pH de 6.5 y una proporción C:N:P 100:0:1

SEQ DNAMAN2: 968 bp;
 Composición 247 A; 220 C; 296 G; 178 T; 27 Otras
 Porcentaje: 26% A; 23% C; 31% G; 18% T; 3%Otras
 Peso Molecular (kDa): ssDNA: 300.73 dsDNA: 596.8
 ORIGIN
 1 CCNCGANTG AACGCTAACG GGATGCCTTA CACATGCAAG TCGAACGGCA GCACGGACTT
 61 CGGTCTGGTG GCGAGTGCCG AACGGGTGAG TAATGTATCG GAACGTGCCT AGTAGCGGGG
 121 GATAACTACG CGAAAGCGTA GCTAATACCG CATACGCCCT ACGGGGGAAA GCAGGGGATC
 181 GCAAGACCTT GCACTATTAG AGCGGCCGAT ATCGGATTAG CTAGTTGGTG GGTAACGGC
 241 TCACCAAGGC GACGATCCGT AGCTGGTTTG AGAGGACGAC CAGCCACT GGGACTGAGA
 301 CACGGCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TGGGGAAATTT TGGACAATGG GGGAAACCTT
 361 GATCCAGCCA TCCCAGCTGT GCGATGAAGG CCTTCGGGTT GTAAAGCACT TTTGGCAGGA
 421 AAGAAACGTC ATGGGCTAAT ACCCCGTGAA ACTGACGGTA CCTGCAGAAT AAGCACCGGC
 481 TAACTACGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG TAGGGTGCAA GCGTTAATCG GAATTAATGG
 541 GCGTAAAGCG TGCAGGCG GTTCGGAAAG AAAGATGTGA AATCCCAGAG CTTAACTTTG
 601 GAACTGCATT TTTAACTACC GAGCTAGAGT GTGTCAGAGG GAGGTGGAAT TCCGCGTGTA
 661 GCAGTGAAT GCGTAGATAT GCGGAGGAAC ACCGATGGCG AAGGCAGCCT CCTGGGATAA
 721 CACTGACGCT CATGCAGAA AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA
 781 CGCCCTAACG ATGTCACTAG CTGTNNGGGC CTTCGGCCNT GGTAGCCAN CTACCGGTGA
 841 NTTGACGCT GGGGTTNCGT CNCAGATAAA CTCAAGGANT GACGGGACCG CCAGCGGGGN
 901 TGATGNNGNN ANTCATGCAC NNAAACNTA CTACCTNANT GTNTGNATNC NAAAAATTGN
 961 AGGCTCCN

Secuencia 3: Correspondiente a la muestra 3, cepa aislada del suelo contaminado con HPA con un pH de 6.5 y una proporción C:N:P 100:10:1

SEQ DNAMAN4: 993 bp;
 Composición 239 A; 214 C; 303 G; 195 T; 42 Otras
 Porcentaje: 24% A; 22% C; 31% G; 20% T; 4%Otras
 Peso Molecular (kDa): ssDNA: 308.60 dsDNA: 612.2
 ORIGIN
 1 CCNCGAANG TAACGCTNNG ACGGNAAGCA TNNACACNNG CNAGCGGNGA CACGTGTGNT
 61 NCTCTNGGAG GCAGTGGCAG ACGGGTGAGT AACGCGTGGG AATCTACCTT TTGCTACGGA
 121 ACAACAGTTG GAAACGACTG CTAATACCGT ATGTGCCCTT CGGGGAAAG ATTTATNCGG
 181 CAAAGGATGA GCGCCGCTTG GATTAGCTAG TTGGTAGGGT AAAGGCCTAC CAAGGCGACG
 241 ATCCATAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC
 301 CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGGA CAATGGGCGC AAGCCTGATC CAGCCATGCC
 361 GCGTGAGTGA TGAAGGCCCT AGGGTTGTAA AGCTCTTTCA CCGGTGAAGA TAATGACGGT
 421 AACCAGGAAA GAAGCCCGG CTAACCTCGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GAAGGGGGT
 481 AGCGTTGTTT GGATTTACTG GGCCTAAAGC GCACGTAGGC GGACTTTTAA GTCAGGGGTG
 541 AAATCCCGGG GCTCAACCCC GGAAGTGCCT TTGACTGAGG AAGTCTTGG TATGGTAGAG
 601 GTGAGTGAA TTCCGAGTGT AGAGGTGAAA TTCGTAGATA TTCGGAGGAA CACCAGTGGC
 661 GAAGGCGGCT CACTGGACCA TTAAGTACGC TGAGGTGCGA AAGCGTGGGG AGCAAACAGG
 721 ATTAGATACC CTGGTAGTCC ACGCGTAAA CGATGAATGT TAGCCGTTGG GGAGTTTACT
 781 CTTCGGTGGC GCAGCTAACG CATTAAACAT TCCCCTGGGG AGTACGGTGC CAGANTAAAA
 841 CTCANGAAT TGACGGGGNC CCAACAGCGG NGGNCNTGGG GTTNATTGNA NCACGCCAA
 901 NCTTACAGCC TTGAATACNG TCCGGNCCAN ANATGNNNTT TANTTCGCTG NCCGNCCAG
 961 GGCTGCANGG TGCTCANTC NGTCNGAAN TTG

Secuencia 4: Correspondiente a la muestra 4, cepa aislada del suelo contaminado con HPA e inóculo microbiano, obtenido de una planta de tratamiento de aguas residuales

SEQ DNAMAN6: 970 bp;

Composición 243 A; 224 C; 278 G; 181 T; 44 Otras

Porcentaje: 25% A; 23% C; 29% G; 19% T; 5% Otras

Peso Molecular (kDa): ssDNA: 300.88 dsDNA: 598.1

ORIGIN

```

1 CGATATNTNG CTAACAGAGG ACACCTCNC ACATGCAAGT TCGAAANCAG AGAGTACCNC
61 ACTTCGGTCT GNTGCCAGT GCGCAACGGG TGAGTAATGT ATCGGAACGT GCCCAGTAGC
121 GGGGATAAC TACGCGAAAG CGTAGCTAAT ACCGCATACG CCCTACGGGG GAAAGCAGGG
181 GATCGCAAGA CCTTGCACTA TTGGAGCGGC CGATATCGGA TTAGCTAGTT GGTGGGGTAA
241 CGGCTCACCA AGGCGACGAT CCGTAGCTGG TTTGAGAGGA CGACCAGCCA CACTGGGACT
301 GAGACACGGC CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATTTTGGACA ATGGGGGAA
361 CCCTGATCCA GCCATCCCGC GTGTGCGATG AAGGCCTTCG GGTGTAAG CACTTTTGGC
421 AGGAAAGAAA CGTCGCGGGT TAATACCCCG CGGAACGTAC GGTACCTGCA GAATAAGCAC
481 CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGTAGGGT GCAAGCGTTA ATCGGAATTA
541 CTGGGCGTAA AGCGTGCACA GCGGTTTCG GAAAGAAAGA TGTGAAAATC CCAGAGCTTA
601 ACTTTGGAAC TGCATTTTA ACTACCGGC TAGAGTGTGT CAGAGGGAGG TGGAAATCCG
661 CGTGTAGCAG TGAATGCNTA NATATGCGGA GGAACACCGA TGGCNAAGC ANCTCCTGGG
721 ATAACNCTGA GCCTCATGCN CGAAAGCGTG GGGGAGCAA NAGGATTANA TNCCCTGGTA
781 GTCCNCGCC TAAACNATNN CANCTNCTG TTGGGGCCTT CGGGCCTTGN TNGCGCAANT
841 TAACCTGAA NTTGACNCC TGGGGGNTTC GGTNCCANAT AAANCNCAA GAATTNCCGG
901 GGACCCCNCA CCGGGGGTAA ATTGNATTAT TCNANCNACC CAAAACCTT CNCCCTTGA
961 TGTNGGNANC

```

Secuencia 5: Correspondiente a la muestra 5, cepa aislada del suelo contaminado con HPA con un pH de 6.5 y una proporción C:N:P 100:10:1

SEQ DNAMAN8: 969 bp;

Composición 245 A; 216 C; 299 G; 179 T; 30 Otras

Porcentaje: 25% A; 22% C; 31% G; 18% T; 3% Otras

Peso Molecular (kDa): ssDNA: 301.17 dsDNA: 597.4

ORIGIN

```

1 CGATGNACGC TAGACGGGAT GCCTTACACA TGCAAGTCGA ACGGCAGCAC GGACTTCGGT
61 CTGGTGGCGA GTGGCGAACG GGTGAGTAAT GTATCGGAAC GTGCCAGTA GCGGGGGATA
121 ACTACGCGAA AGCGTAGCTA ATACCGCATA CGCCCTACGG GGGAAAGCAG GGGATCGCAA
181 GACCTTGAC TATTGGAGCG GCCGATATCG GATTAGCTAG TTGGTGGGGT AACGGCTCAC
241 CAAGGCGACG ATCCGTAGCT GGTGAGAG GACGACCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG
301 GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATTTTGA CAATGGGGGA AACCTGATC
361 CAGCCATCCC GCGTGTGCGA TGAAGGCCTT CGGGTTGTAA AGCACTTTG GCAGGAAAGA
421 AACGTGCGCG GTTAATACCC CGCGGAACG ACGGTACCTG CAGAATAAGC ACCGGCTAAC
481 TACGTGCCAG CAGCCGCGT AATAGTAGG GTGCAAGCGT TAATCGGAAT TACTGGGCGT
541 AAAGCGTGCG CAGGCGGTTT GGAAAGAAAG ATGTGAAATC CCAGAGCTTA ACTTTGGAAC
601 TGCAATTTTA ACTACCGGGC TAGAGTGTGT CAGAGGGAGG TGGAAATCCG CGTGTAGCAG
661 TGAATGCGT AGATATGCGG AGGAACACCG ATGGCGAAGG CAGCCTCTG GGATAACACT
721 GACGCTCATG CAGGAAAGCG TGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCCACGCC
781 NTAACGATGT CACTAGCTGT NGGGCCTTN GCCTTGGTA GCGCANNTAC CCGTGANTTG
841 ACGCCTGGGG NNACNGTCGC AAAATAAANT CAANGANTGA CGGNCCCN CAANNGGGA
901 TGATGGGGAT NATCNTGCA CNCAAANCT TACTACCTTG NAGTNTGNAT NCTGAAAANT
961 TNGANNCC

```

Faltan páginas

N° 91

9. REFERENCIAS

- Aguilar S.A., Etchevers B.J.D y Castellanos R.J.Z. **1987**. Análisis químico para evaluar la fertilidad del suelo. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, Chapingo, México. pp 85-91
- Aguilera C.M y Martínez R.E. **1996**. Relaciones Agua-Suelo-Planta-Atmósfera. Universidad Autónoma de Chapingo; Chapingo, México. pp 66-163
- Ajithkumar B., Ajithkumar V.P., Iriye R. y Doi Y. **2003**. Spore-forming *Serratia marcescens* isolated from activated sludge. Sin Publicar.
- Alexander M. **1994**. Introducción a la microbiología del suelo. AGT. Editor, S.A. México. pp 219-238
- Altschul S.F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W y Lipman D. J. **1997**. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". Nucleic. Acids. Res., 25:3389-3402
- Atlas M.R y Cerniglia C.E. **1995**. Biodegradation of petroleum pollutants. Biosci. 45:(5):333-335
- Atlas R.M. **1994**. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. Microbiol. Rev., 45:180-209.
- Babic I., Fischer-Le Saux M., Giraud E. y Boemare N. **2000**. Occurrence of natural dioxenic associations between the symbiont *Photobacterium luminescens* and bacteria related to *Ochrobactrum spp.* in tropical entomopathogenic *Heterorhabditis spp.* (Nematoda, Rhabditida). Microbiol., 146 (3):709-718
- Baker K.H y Herson D. **1994**. Bioremediation. Mc Graw Hill. E.E.U.U.A
- Bouchez M. **1995**. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Pure Strain and Defined Strain Associations: Inhibition Phenomena and Cometabolism. Appl. Microbiol. Biotech., 43:156-164
- Bewley F.R.J. **1996**. Field Implementation of In Situ Bioremediation: Key Physicochemical and Biological Factors. En Stotzki G y Bollag J. J. Soil Biochem., 9: 473-541. E.E.U.U.A.
- Bollag J.M y Liu S.Y. **1990**. Biological Transformation Processes of Pesticides. En: H.H. Cheng (Ed). Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modeling. Soil Science Society of América, Madison, WI. 193 p
- Bohn H.L., Mcneal B.L y O'connor G.A. **1993**. Química de suelos. Edit. Limusa. México.

Bouwer E.J. **1992**. Bioremediation of Organic Contaminants in the Subsurface. Environ. Microbiol., :287-318.

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

Bower C.J. **1994**. Bioremediation of Hydrocarbon-Contaminated Soils Using Indigenous Microbes. University of Delaware. En: Wise D.L y Trantolo D.J. Remediation of hazardous waste contaminated soils. pp 317-343

Buol S.W., Hole F.D y McCracken R.J. **1981**. Génesis y clasificación de suelos. Edit. Trillas. México, D. F. 417 p.

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

Cerniglia C.E. **1993**. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Environ. Biotech., 4:331-338

Chávez G.B., Inchaustegui A.A. y Márquez F.C. **1997**. Estudios preliminares de degradación de compuestos de naturaleza hidrocarbonada. En: Tercer seminario internacional de expertos en el tratamiento de efluentes industriales y residuos. Instituto de Ingeniería, UNAM. México, D. F.

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

Coenye T y Vandamme P. Two novel Achromobacter species. Sin Publicar

Coenye T., Goris J., Spilker T., Vandamme P y LiPuma J.J. **2002**. Characterization of Unusual Bacteria Isolated from Respiratory Secretions of Cystic Fibrosis Patients and Description of Inquilinus limosus gen. nov., sp. Nov. J. Clin. Microbiol., 40 (6):2062-2069

Cullen D.W y Hirsch P. R. **1998**. Simple and rapid method for direct extraction fo microbial DNA from soil for PCR. Soil. Biol. Biochem., 30:983-993.

Díaz-González G., Cámara-Córdova J., Botello A.V y Ponce G. **1995**. Evaluación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en suelos hidromórficos de la reserva de la biosfera "Los pantanos de Centla" en Tabasco, México". Rev. Int. Contam. Ambient., 12(1):15-21.

Dott W. **1992**. Microbiological/ Higienical Evaluation of the Risk-potential of Aerobic and Facultatively Anaerobic Heterotrophic Bacteria in Biological Soil-cleanup

Processes. DECHEMA Working Group Environmental Biotechnology Soil. pp 37-40.

Elías-Murguía R.L y Valencia G.O. **1996**. Remediación de suelos afectados con hidrocarburos. Simposium Internacional de Geología Ambiental, Confinamiento de Residuos y Contaminación del Suelo y Subsuelo. Instituto Mexicano del Petróleo. México, D. F. p.7

Elías-Murguía R.L y Martínez V., **1991**. Suelos contaminados con hidrocarburos. pp 46-93. En F.J.F. Ruiz.(Ed.) Causas y consecuencias de la contaminación del suelo, mesa redonda. Depto de suelos, UACH, Chapingo.

Elliott L.F., Lynch J.M y Papendick R.I. **1996**. The Microbial Component of Soil Quality. En Stotzki G y Bollag J. Soil Biochem., 9:1-21. E.E.U.U.A

Fan C. y Tafuri N.A. **1994**. Engineering Application of Biooxidation Processes for Treating Petroleum-Contaminated Soils. EPA. Edison, Nueva Jersey. pp 373-403

Fassbender H.W y Bornemisza E. **1987**. Química de Suelos con Énfasis en Suelos de América Latina. Costa Rica. IICA.

Felsenstein J. **1989**. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). Cladistics 5:164-166.

Fletcher R.D. **1994**. Practical Considerations During Bioremediation. En: Wise D.L y Trantolo D.J (Eds). Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soils. pp 39-55. Marcel Dekker, Inc. E.E.U.U.A.

Foth D.H. **1996**. Fundamentals of Soils Science. John Wiley and Sons. E.E.U.U.A. 360 p

Folsom B.R y Chapman P.J. **1991**. Performance Characterization of a Model Bioreactor for the Biodegradation of Trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4. Appl. Environ. Microbiol., 57:1602-1608.

García F.S. **1994**. Caracterización de la actividad hidrocarbonoclástica por bacterias en el agua del Golfo de Tehuantepec. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F.

González J.M., Krausova V.I y Robb F.T. Bacterial Degradation of Dichloromethane in an Estuarine Environment. Sin Publicar

Carroll A.B y Zinder S.H. Microbial populations at a PCE-contaminated site. Sin publicar

Goris J., Dejonghe W., Vandamme P., De Clerck E., Geeraerts B., Top E.M., Verstraete W y De Vos P. Diversity of pJP4 and pEMT1 transconjugants from A- and B-horizon soil. Sin publicar

Haigler B.E y Spain J. **1993**. Biodegradation of 4-nitrotolueno by *Pseudomonas* sp. Strain 4Nt. Appl. Environ. Microbiol., 59:2239-2243

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

Hanada S., Shigematsu T., Shibuya K., Eguchi M., Hasegawa T., Suda Y., Kamagata Y., Kanagawa T. y Kurane R. **1998**. Phylogenetic Analysis of Trichloroethylene-degrading Strains newly Isolated from the polluted Soil with the contaminant. J. Ferment. Bioeng., 86:539-544

Heitzer A y Sayler S. G. **1993**. Monitoring The efficacy of bioremediation. En Tibbtech. Elsevier Sci. Publiser., 11:334-343. E.E.U.U.A.

Hoffmann A., Thimm T., Droge M., Moore E.R., Munch J.C. y Tebbe C.C. **1998**. Intergeneric transfer of conjugative y mobilizable plasmids harbored by *Escherichia coli* in the gut of the soil microarthropod *Folsomia candida* (Collembola). Appl. Environ. Microbiol., 64(7):2652-2659

Iturbe R y Navarro I. **1997**. Lineamientos para la evaluación y saneamiento de sitios contaminados por hidrocarburos en México. Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAP. Agencia de cooperación internacional del Japón y centro nacional de investigación y capacitación ambiental. México, D.F. p.9

Jackson D.J y Zenobia K. **1994**. Using Microbial Kinetics in the Bioremediation of Contaminated Soils. Kleinfelder, Inc. Sacramento, California. En: Wise D.L y Trantolo D.J. Remediation of hazardous waste contaminated soils. pp 681-689

Jackson M. L. **1982**. Análisis químico de suelos. 3ªed. Edit. Omega. España. pp 2-90.

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

Kelley I y Cerniglia, C. **1995**. Degradation of a Mixture of High-Molecular -Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Mycobacterium* Strain PYR-1. Journal of Soil Contamination. 41:77-91.

Klein J y Dott W. **1992**. Laboratory Methods for the Evaluation of Biological Soil Cleanup Processes. DECHEMA Working Group Environmental Biotechnology Soil.

Ladd J.N., Foster R.C., Nannipieri P y Oades J.M. **1996**. Soil Estructure and Biological Activity. En Stotzki G y Bollag J. J. Soil Biochem., 9:23-78. E.E.U.U.A

Lahlou M., Harms H., Springael D y Ortega-Calvo J.J. **2000**. Influence of Soil Components on the Transport of Polycyclic Hydrocarbon-degrading bacteria through saturated porous media. Environ. Sci. Tech., 34:3649-3656.

Lebuhn M., Achouak W., Schloter M., Berge O., Meier H., Barakat M., Hartmann A y Heulin T. **2000**. Taxonomic characterization of *Ochrobactrum sp.* isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici sp. nov.* and *Ochrobactrum grignonense sp.* Nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50 Pt 6, 2207-2223

Lesage S y Jackson E.R. **1993**. Groundwater contamination and analysis of hazardous waste sites. Edit. Marcel Dekker. E.E.U.U.A. pp.388-418.

Levin M y Gealt M. **1997**. Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. McGraw Hill. Madrid, España.

Liu L., Coenye T., Burns J.L., Whitby P.W., Stull T.L y LiPuma J.J. **2002**. Ribosomal DNA-directed PCR for identification of *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients. J. Clin. Microbiol. 40(4):1210-1213

Luna-Pabello V.M., Ambríz Rivas K.T., Jiménez Tovar B.J., Morales Martínez B.R y Piña Cobos M. **1997**. Técnicas de remediación de suelos bajo el enfoque de tecnologías disponibles, potencialidades y aplicaciones para ser practicadas en México. Informe final de Estancia "Escuelas Prácticas de Verano 1997". Fundación UNAM/Facultad de Química, UNAM/PEMEX-Refinación.

Marín C.S. **1996**. Vinculación de la geología en la contaminación por hidrocarburos. Simposium Internacional de Geología Ambiental, Confinamiento de Residuos y Contaminación de Suelo y Subsuelo. Instituto Mexicano del Petróleo. México, D.F.

Masserotes B y Montova T. **1995**. Contaminación por hidrocarburos en estaciones de servicio. Gerencia ambiental. 13:158-160

Menzie C.A., Potock B y Santodonato J. **1992**. Exposure to carcinogenic Polycyclic Hydrocarbons in the Environment. Environ. Sci. Tech., 26:1278-1284

Michael H.H. **1994**. Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils. J. soil contamination., 3(3):299-318

Moorman B.J. **1996**. Assesing Organic Chemical Contaminants in Soil. En: Methods for assesing Soil Quality, SSSA special Publication 49.

Nirmalakhandan N., Arulganendran V., Mohsin M., Sun B y Cadena F. **1994**. Toxicity of Mixtures of Organic Chemicals to Microorganisms. *Wat. Res.*, 28: 543-551

Nunes O.C., Nogales B., Oliveira R., Pieper D.H., Vital J y Reis M.A. Mineralization of the herbicide molinate by a bacterial consortium. Sin Publicar

Padmanabhan P., Padmanabhan S., DeRito C., Gray A., Gannon D Snape J., Tsai C.S., Park W., Jeon C y Madsen E. Uncultured bacterium clone Phe95 Respiration and DNA analysis of ¹³C-labeled substrates added to soil in the field. Sin Publicar

Palacios M.S y Gama C.J.E. **1997**. El suelo como unidad biológica. En: curso sobre biorremediación de suelos y acuíferos. PUMA e Instituto de Ingeniería. México, D.F.

Parés R. **1997**. Bioquímica de los microorganismos. Edit. Reverté. pp.376. Barcelona, España.

Paul E.A y Clark F.E. **1996**. Soil Microbiology and Biochemistry. 2ª edición. Academic Press. E.E.U.U.A. 340 p

Peltroche-Llacsahuanga H., Brandenburg V., Riehl J y Haase G. **2000**. Ochrobactrum anthropi peritonitis in a CAPD patient. *J. Infect.*, 40 (3):299-301

Pichtel J. **2000**. Fundamentals of site remediation; For Metal and Hydrocarbon Contaminated, Soils. Government Institutes.

Pierzynski M.G., Sims T.J y Vance F.G. **1994**. Soils and Environmental Quality. Lewis Publisher. E.E.U.U.A. pp 20-39 y 185-200

Porta C. J., López-Acevedo R.M y Roquero de Laburu C. **1994**. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. pp 225-244 y 275-316

PROFEPA. **1999**. Restauración de suelos contaminados Grupo de trabajo de restauración de suelos contaminados, página Web. México.

Programa BLASTN versión 2.2.3 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Riccardi C., Mansi A y Papacchini M. **2002**. Characterization of Bacterial Strains Able to degrade Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in a contaminated site. Sin Publicar.

Reyes Jaramillo I. **1996**. Fundamentos Teórico-Prácticos de Temas selectos de la Ciencia del suelo. Parte I. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. 257 p

Rodríguez A.R. **1998**. Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. La ciencia desde México. Fondo de cultura económica, México.

Shen X.H., Liu Z.P y Liu S.J. **2002** Isolation and Identification of Nitroaromatic Compound Degrading bacterium. Sin publicar.

Saval S. **1997**. La biorremediación como alternativa para la limpieza de sitios contaminados con hidrocarburos. Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAP. Agencia de Cooperación Internacional de Japón y Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental. México, D. F. p.18

Saval S. **1997**. Retos y oportunidades para la biorremediación de suelos y acuíferos en México. En: Tercer seminario internacional de expertos en el tratamiento de efluentes industriales y residuos. Instituto de Ingeniería, UNAM. México, D. F. pp 197-202

SEMARNAP. **1996**. Los suelos de Tabasco, Restauración, Conservación y Uso. Gobierno constitucional del Estado de Tabasco.

Song B., Palleroni N.J y Haggblom M.M. **2000**. Isolation and characterization of diverse halobenzoate-degrading denitrifying bacteria from soils and sediments. Appl. Environ. Microbiol., 66(8):3446-3453

Suthersan S.S. **1997**. Bioremediation Engineering, design concepts. Ediciones Publishers, London.

Tan K.H. **1994**. Environmental Soil Science. Marcel Dekker Inc. E.E.U.U.A. pp 303

Tate R.L. **2000**. Soil Microbiology. 2ª. Edición. John Wiley & Sons. E.E.U.U.A.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F y Higgins D.G. **1997**. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic. Acids. Res., 24:4876-4882.

Tiedje J.M. **1995**. Advances in Microbial Ecology and their Application to Bioremediation. I Reunión Internacional de Ecología microbiana. CINVESTAV-IPN. México, D. F. p.61

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

USDA-SCS. **1986**. Soil Survey Laboratory methods and procedures for collecting soil sample. Soil Conservation Service U.S. Department of agriculture Washington, E.E.U.U.A. 90 p.

Wagrowski D y Hites R. **1997**. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Accumulation in urban, Suburban, and Vegetation. Environ. Sci. Tech., 31:279-282.

Wang X y Bartha R. **1994**. Effects of Bioremediation on Toxicity, Mutagenesis, and Microbiota in Hydrocarbon-Polluted Soils. Rutgers University, New Brunswick, New Jersey. En: Wise D.L y Trantolo D.J. Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soils.

Wild L.D. **1993**. Soils and The Environment: an Introduction. Cambridge, University, Press

Wise D.L y Trantolo D.J. **1994**. Remediation of hazardous waste contaminated soils. De. Marcel Dekker, Inc. E.E.U.U.A.

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

Zehnder A.J.B. **1995**. Perspective and Limits in Biodegradation. In soil and Groundwater Pollution, Fundamentals, Risk assessment and Legislation. Edited By Zehnder A.J.B. Kluwewer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London. pp 31-35

Zengler K., Toledo G., Rappe M., Elkins J., Mathur E.J., Short J.M y Keller M. **2002**. cultivating the unculture. Proc. Natl. Acad. Sci., 99 (24):15681-15686. E.E.U.U.A