

00377



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la toxicidad de lixiviados de recorte
de perforación sobre el ciliado edafícola
Colpoda cucullus

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL - RESTAURACIÓN ECOLÓGICA)

PRESENTA
LOURDES PATRICIA CASTRO ORTIZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

MÉXICO, D. F.

ABRIL 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EST A TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN**

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

NOMBRE: Lourdes Patricia Castro Ortiz
FECHA: 13-04-04
FIRMA: [Firma manuscrita]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de noviembre de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Ambiental) del alumno(a) **Castro Ortiz Lourdes Patricia**, con número de cuenta 91335094, con la tesis titulada: "Evaluación de la toxicidad de lixiviados de recortes de perforación sobre el ciliado edafícola *Colpoda cucullus*", bajo la dirección del(a) **Dr. Víctor Manuel Luna Pabello**.

Presidente: Dra. María Antonieta Aladro Lubel
Vocal: Dr. Pedro Ramírez García
Secretario: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello
Suplente: Dr. Javier Alcocer Durand
Suplente: M. en C. Elizabeth Ramirez Flores

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 31 de marzo de 2004.

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Apoyos recibidos

Beca para la realización de los estudios de maestría otorgada por el Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT durante el periodo Septiembre 2001 – Junio 2003.

Beca otorgada por la Fundación Pacard, a través del Instituto de Ecología de la UNAM durante el proceso de redacción y corrección de la versión final de la tesis, durante el periodo de Agosto a Noviembre del 2003.

Se agradece el apoyo brindado por el proyecto FIES 97 – 03 – I “Desarrollo de un aprueba de biodegradabilidad aerobia rápida para inhibidores de hidratación de arcillas” y del PAIP 6190 – 14 del año 2002 – 2003, a través de la Facultad de Química de la UNAM.

Comité tutorial

Dra. Ma. Antonieta Aladro Lubel (miembro de comité tutorial)

Dr. Javier Alcocer Durand (miembro de comité tutorial)

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello (Tutor principal)

RECONOCIMIENTOS

La presente tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Microbiología Experimental del Departamento de Biología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se hace patente el reconocimiento a la profesora Rosa María Picaso Hernández del Colegio de Postgraduados, por el valioso apoyo brindado durante el procesamiento de las muestras de ciliados para la obtención de micrografías electrónicas de barrido de los organismos cultivados.

DEDICATORIA

Con cariño a mis padres Sr. Nicolás Castro Gaytan y la Sra. Concepción Ortiz León porque siempre han estado conmigo en todos los momentos de mi vida, brindándome su apoyo incondicional y animándome siempre a mirar hacia adelante sin importar el obstáculo.

A mis hermanos Alejandro, Pedro y Francisco que siempre han estado a mi lado apoyándome, dándome ánimos para seguir adelante y lograr las metas que me he propuesto, además de compartir conmigo los momentos más felices de sus vidas haciéndome participe siempre de todos sus momentos malos o buenos.

Con especial cariño dedico este trabajo a mis sobrinos David, Estefani, Brayan y Angi esperando que algún día este trabajo sea un aliciente para cada uno de ustedes en su vida futura. Gracias por una luz en mi vida.

A mis queridos y grandes amigos Gaby, Almita (cosa), Lety, Raúl, Iván, David, Merle (aunque estemos lejos siempre me acuerdo de ti) y todos aquellos que han compartido conmigo momentos de alegrías y tristezas, además de brindarme su apoyo, tanto académico como personal, durante esta y otras etapas de mi vida.

GRACIAS A TODOS POR ESTAR EN LOS MOMENTOS EXACTOS

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme concluir otra etapa de mi vida con las personas que más quiero, además de brindarme la oportunidad de conocer a otras, que han dado una visión más amplia del tiempo que me presto para convivir con todos ellos.

Un especial agradecimiento al Dr. Víctor M. Luna-Pabello, por permitirme integrarme a uno de sus grupos de trabajo, además de todo el apoyo brindado durante los estudios de maestría y durante la escritura del trabajo de tesis, gracias Dr. Luna-Pabello por toda la ayuda que me ha brindado en estos dos años de convivencia.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Experimental (Maestra Leo, Rosalba, Carmen, Laura, Benjamín, René, Adriana y todos los que convivieron conmigo durante estos dos años) ya que desde que llegue me han brindado su comprensión y ayuda para la realización del trabajo experimental, y por su puesto por permitirme ser su compañera y amiga de trabajo.

A la maestra Rosa María Ramírez Gama y a la maestra Lupita, que siempre apoyaron mi trabajo en el laboratorio además de brindarme su ayuda cuando la necesite.

Por su puesto a la Dra. M. Antonieta Aladro Lubel y al Dr. Javier Alcocer Durand, por su valiosa colaboración durante el desarrollo de este trabajo así como en sus acertadas correcciones al mismo.

Al Dr. Pedro Ramírez García y la Maestra Elizabeth Ramírez Flores por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Contenido

Lista de tablas	vii
Lista de figuras	vii
Resumen	ix
Abstract	x
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Justificación	5
4 Objetivos	6
4.1 Objetivo general	6
4.2 Objetivos particulares	6
5. Marco teórico	7
5.1 El suelo y sus características	7
5.2 Formación del suelo	8
5.3 Contaminación generada por la industria petrolera	10
5.4 Generalidades sobre protozoos edáficos	15
5.5 Aspectos relevantes sobre ciliados edáficos	20
5.6 Características de los bioindicadores de los bioindicadores de contaminación	22
5.7 El uso de los ciliados como bioindicadores	24
5.8 Pruebas de toxicidad	25
5.9 Relaciones dosis respuesta	29
6. Estrategia general de trabajo	31
7 Etapa experimental uno	33
7.1. Materiales y Métodos	34
7.1.1 IHA – K y Recortes de perforación	34
7.1.2 Muestreo de suelo	34
7.1.3 Extracción de ciliados	39
7.2 Resultados	41
7.2.1 Caracterización física, química del suelo de Tabasco	43
7.2.2 Análisis ciliatológico	44

8. Segunda etapa experimental	50
8.1 Metodología experimental	50
8.1.2 Pruebas de tolerancia y toxicidad	50
8.2 Pruebas para <i>C. cucullus</i> empleando un tóxico de referencia	52
8.3 Recuperación del IHA	53
8.4 Resultados y discusión.....	55
8.4.1 Supervivencia de la comunidad de ciliados expuesta a recorte de perforación	55
8.4.2 Tóxico de referencia	59
8.4.3 Pruebas de supervivencia de <i>C. cucullus</i> con LRP e IHA – K	60
9. Conclusiones	67
10. Recomendaciones	68
11. Literatura citada	69
Anexos	75
Anexo 1. Compilación de imágenes de protozoos encontrados en muestras del suelo natural de Cunduacán, Tabasco.....	75
Anexo 2. Análisis probit para el tóxico de referencia	81
Anexo 3. Resultados experimentales obtenidos empleando <i>Colpoda cucullus</i>	84
Anexo 4. Resultados experimentales obtenidos de las pruebas de recuperación del IHA – K	86
Anexo 5. Información útil para la información de una propuesta de Norma Mexicana para la evaluación de toxicidad aguda de suelos empleando el ciliado edafícola <i>Colpoda cucullus</i>	87

Lista de Tablas

Tabla 7.1 Condiciones de mantenimiento de los colpódidos en el laboratorio	40
Tabla 7.2 Datos obtenidos de la caracterización de la muestra compuesta de suelo de Cunduacán, Tabasco	44
Tabla 7.3 Géneros de ciliados encontrados en la muestra	44

Lista de figuras

Figura 5.1 Esquema de circulación del fluido de perforación en un pozo.....	12
Figura 5.2 Marco conceptual mostrando la integración entre los posibles tóxicos y algunos de los parámetros estudiados en la valoración de tratamiento de aguas residuales	18
Figura 5.3. Esquema de un ciliado perteneciente a los colpódidos (tomado de Aladro – Lubel <i>et al.</i> , 1990).....	22
Figura 5.4. Interacciones entre la fracción biodisponible de los contaminantes tóxicos, la concentración en los sitios blancos y los efectos causados en el organismo	28
Figura 6.1 Diagrama de flujo de la estrategia general de trabajo	32
Figura 7.1 Ubicación del municipio de Cunduacán, Tabasco	36
Figura 7.2 Vegetación predominante en el municipio de Cunduacán, Tabasco	37
Figura 7.3 Representación de la forma del muestreo del suelo de Tabasco	38
Figura 7.4 Imagen del muestreo <i>in situ</i> del municipio de Cunduacán, Tabasco	38
Figura 7.5 Fotografía que muestra la disposición de las cajas con suelo para la obtención de los ciliados	40
Figura 7.6 Microfotografía de amiba testada encontrada en el suelo de CU (20X campo claro)	42
Figura 7.7 Microfotografía de <i>Colpoda steinii</i> encontrada en el suelo de CU (20X campo claro)	42
Figura 7.8 Microfotografía de colpódidos encontrados en el suelo de CU impregnación Argéntica de Klein A) 40 X y B) 20X	42
Figura 7.9 Microfotografía del colpódido cultivado, impregnación argéntica de Klein (Campo claro 100X)	45
Figura 7.10 Secuencia de reproducción asexual del ciliado cultivado en el laboratorio	46
Figura 7.11 Curva de crecimiento del ciliado <i>Colpoda cucullus</i> . cultivado en el laboratorio	47

Figura 7.12 A) Esquema de <i>Colpoda cucullus</i> en estado trófico y B) Quiste del mismo organismo en división, mostrando los característicos 4 tomitos	48
Figura 7.13 Micrografía electrónica de barrido de <i>Colpoda cucullus</i> cultivado en el laboratorio	49
Figura 8.1 Esquema de las diluciones del IHA realizadas	51
Figura 8.2 Ejemplo disposición de las cajas conteniendo al ciliado <i>C. cucullus</i> . al ser expuesto a diferentes concentraciones de contaminantes evaluados	52
Figura 8.3 Esquema del dispositivo empleado para las pruebas de recuperación del IHA	53
Figura 8.4 Grafica de recuperación, en términos de DQO total del lixiviado de IHA al contaminar una muestra de suelo	54
Figura 8.5 Grafica de recuperación, en términos de DQO soluble del lixiviado de IHA al contaminar una muestra de suelo	54
Figura 8.6 Grupos de organismos y número en que fueron encontrados en la caja con suelo en proporción 1:1	55
Figura 8.7 Grupos de organismos y número en que fueron encontrados en la caja con suelo en proporción 1:2	56
Figura 8.8 Grupos de organismos y número en que fueron encontrados en la caja con suelo en proporción 1:3	57
Figura 8.9 Grupos de organismos y número en que fueron encontrados en la caja con Recorte de perforación	58
Figura 8.10 Gráfica e la que se observa la desaparición de algunos grupos de organismos conforme aumenta le recorte de perforación en el suelo	59
Figura 8.11 Grafica obtenida del análisis probit para el tóxico de referencia	60
Figura 8.12 Respuesta de <i>Colpoda cucullus</i> al ser expuesto al LRP	61
Figura 8.13 Exposición de <i>C. cucullus</i> al IHA [100%]	62
Figura 8.14 Exposición de <i>C. cucullus</i> al IHA [50%]	62
Figura 8.15 Exposición de <i>C. cucullus</i> al IHA [25%]	63
Figura 8.16 Exposición de <i>C. cucullus</i> al IHA [12.5%].....	63
Figura 8.17 Gráfica en la que se observa la disminución del número de <i>C. cucullus</i> al ser expuesto al IHA [6.5%]	64

Resumen

El detrimento en la calidad de los recursos naturales agua, aire y suelo hace necesario que se realicen diferentes trabajos para recuperar su calidad y con ello su uso real y potencial como recursos naturales imprescindibles para el hombre. El suelo es un ambiente natural que presenta graves problemas de contaminación, por ser el principal cuerpo receptor, después de las corrientes naturales de agua. A manera de ejemplo, pueden mencionarse las actividades de exploración, explotación, procesamiento, traslado y almacenamiento de productos de la industria petrolera. Dichas actividades generan problemas graves, no sólo por la pérdida de suelos fértiles, si no también por contaminar, vía lixiviación, los mantos freáticos. Es por este motivo que, en este trabajo, se planteó el posible uso de ciliados edafícolas, como bioindicadores de la presencia o ausencia de contaminantes procedentes de actividades petroleras. La idea principal consistió en encontrar un ciliado edafícola que permitiera evaluar de manera relativamente rápida y económica, con base en sus bondades y como organismo potencial de prueba para ensayos toxicológicos, el nivel de contaminación prevaleciente en una determinada muestra de suelo. Lo anterior permitiría contar con información útil para inferir posibles efectos adversos producidos por la eventual exposición de seres humanos u otros seres vivos, a un contaminante específico depositado en el suelo. Por lo anterior, se determinó obtener y procesar una muestra de suelo natural procedente de un área petrolera no afectada, con objeto de seleccionar de entre la comunidad de ciliados autóctona, un ciliado edafícola como organismo de prueba, resultando *Colpoda cucullus* el más idóneo. Los contaminantes valorados en este trabajo fueron los recortes de perforación de un pozo petrolero, así como el inhibidor de hidratación de arcillas K (IHA-K) que se utilizan en la conformación de los fluidos empleados en la perforación de dicho pozo. Los resultados obtenidos de las pruebas de contacto directo entre el recorte de perforación, obtenido en campo, con la comunidad de ciliados y con *Colpoda cucullus*, evidenciaron un efecto nocivo con el recorte sin dilución, observándose la muerte de vorticelas, amibas y algunos flagelados. Del análisis de las características que hacen de los ciliados organismos de uso potencial para pruebas de toxicidad, *Colpoda cucullus* resultó ser el más idóneo, debido a que ofrece como ventajas adicionales, ser una de las especies más ampliamente estudiadas, fácil de cultivar y con capacidad de formar quistes relativamente sencillos de manipular. De manera particular, las pruebas realizadas con el IHA-K, resultaron letales para el ciliado *Colpoda cucullus* a las concentraciones de 100, 50, 25 y 12.5%, correspondiendo la CL₅₀ a la concentración de 6.5%, después de 1 h de exposición.

Abstract

The environmental quality reduction require corrective actions. Particularly, soil have a high pollution level due to deposit of wastewater and solid residues. An example of this problematic is the exploration, exploitation, processing, translating and storage of petroleum products. These kinds of activities are the principal cause of soil areas and ground water pollution in the south west of Mexico. The present work was focused in through ciliates of soil as bioindicators of the petroleum activities effects. Ciliates are microorganisms which natural characteristics permit it use in soil toxicity test. Indigenous ciliates were isolated and cultivated for identification. This kind of evaluation have as advantages its low cost and easy application. Information obtained can be use in order to prevent the eventual human beings, plants or animal exposition to specific pollutant present in soil. For this work were selected the mud drilling oil well (MDOW) and the K- shale hydration inhibitors (K-SHI). The experiments were carried out using a sample of unpolluted representative natural area of soil. According with the results, ciliates community was damage by the direct exposition to the MDOW, vorticellas, amoebas and flagellates were died. However, other ciliates as *Colpoda cucullus* survived. This capacity together its easy culture and presence of cist resistance form were the main arguments for select to *C. cucullus* for the toxicity essays with K-SHI. Results shown that 100, 50, 25 y 12.5% of K-SHI were lethal for *C. cucullus* while 6.5% correspond to LC_{50} after 1 hour of exposition.

1. INTRODUCCIÓN

En el ámbito mundial la contaminación generada por las diferentes actividades antropogénicas provoca detrimento en la calidad del aire, agua y suelos cuya recuperación es difícil, no sólo por el tipo de contaminantes que contienen, si no también por las elevadas concentraciones en las que se encuentran (Luna – Pabello *et al.*, 1994), motivo por el cual en los capítulos 2, 3 y 4 se menciona la justificación, objetivos y antecedentes del porque la importancia de la realización de este tipo de trabajos. El suelo es un recurso natural a la fecha muy contaminado, cuyas características físicas y químicas facilitan la migración de los contaminantes hacia el subsuelo y mantos freáticos por este motivo es necesario conocer el grado de contaminación prevaleciente, el nivel de atenuación natural y las necesidades de saneamiento más urgentes (Maya, 2000; Guzmán, 2001). Por lo anterior en los capítulos 5.1 y 5.2 de este trabajo, se presenta información sobre las características del suelo y su importancia. En particular, la problemática de los suelos contaminados con materias primas, subproductos o desechos de la industria petrolera ha sido abordada de manera insuficiente (Saval, 1995; Boopathy, 2000). Si bien existen, en el ámbito mundial, diversas tecnologías útiles para la eliminación y/o minimización de los contaminantes presentes en el suelo, lo cual se aborda en el capítulo 5.3, en México su aplicación actual puede considerarse incipiente (Saval, 1997; Pineda, 2003). La recuperación de los suelos puede llevarse a cabo por uso independiente o combinado de métodos físicos, químicos y biológicos (Morgan y Watkinson, 1989; Castro y Luna - Pabello, 2003). Sin embargo, la valoración de los resultados obtenidos se basa en la medición de la concentración remanente del contaminante problema, quedando limitado tanto por el nivel de sensibilidad de la técnica empleada, como por el personal y equipo asociado a la misma. En este trabajo se presenta como una alternativa potencial, para la valoración de suelos contaminados, el uso de ciliados edafícolas. Estos microorganismos por sus características intrínsecas podrían servir de indicadores biológicos (bioindicadores) de contaminación para la detección de un problema específico, aplicando procedimientos basados en pruebas de toxicidad, lo cual se describe en la sección 5.9. Los bioindicadores son herramientas biológicas con las cuales es posible extraer información de un ecosistema para el mejor manejo de los sitios

contaminados. Sus actividades pueden ser llevadas a diferentes niveles de integración biológica, ya que responden de manera individual o por grupo (población o comunidad) ante un producto químico o un tóxico determinado; y la medición de las variables bioquímicas o fisiológicas de los individuos o de sus productos de excreción, proveen información del daño a la exposición de contaminantes (Van Straalen y Krovolutsky, 1996). Siendo los indicadores de contaminación una herramienta útil para la medición de algunos tipos de contaminación este trabajo se enfocó en la búsqueda de un ciliado edafícola que pudiera ser usado como bioindicador de contaminación de suelos eventualmente receptores de recortes de perforación (RP) de pozos petroleros que contienen inhibidores de hidratación de arcillas (IHA). Como se puede observar en el capítulo 7 de este trabajo, es factible utilizar un ciliado edafícola como bioindicador.

Asimismo, la necesidad e importancia de efectuar este tipo de trabajos radica en poder contar con una alternativa complementaria que permita valorar la efectividad de los procesos de limpieza llevados a cabo en suelos contaminados con productos procedentes de la industria petrolera.

2 ANTECEDENTES

La contaminación del suelo por derivados de la industria petrolera no ha sido suficientemente estudiada; encontrándose vacíos como en el caso de microorganismos indicadores de la calidad del suelo. Por calidad del suelo se entiende el nivel en el cual el suelo puede promover la actividad biológica (animal, vegetal y microbiana), la contribución al flujo del agua, aire y al amortiguamiento de los efectos que se puedan presentar por la disposición de desechos o contaminantes. Es por estas razones que la biota edáfica capaz de ser considerada como posible bioindicador se encuentra constituida por organismos de diferentes tamaños que van desde unos micrómetros (como los protozoos) hasta varios centímetros de longitud (como son los oligoquetos) (Vázquez *et al.*, 2002).

La importancia del suelo es indiscutible como base para el desarrollo de las plantas además de ser intermediario en los ciclos biogeoquímicos, procesos fundamentales para el mantenimiento de los ecosistemas terrestres. De los microorganismos que es posible encontrar en el suelo los protozoos juegan un papel muy importante, como depredadores en la cadena alimentaria. Asimismo, su potencial como bioindicadores radica en su corto ciclo de vida, sensibilidad a los contaminantes, rápida respuesta a las perturbaciones y su presencia en hábitats extremos. Adicionalmente todos los protozoos que se encuentran en el suelo, al igual que las bacterias y actinomicetos, presentan adaptaciones al medio en el cual se encuentran. Algunas de estas adaptaciones son, por ejemplo capacidad y velocidad de enquistamiento – exquistamiento, un menor tamaño, ausencia de ornamentación y en algunos casos aplanados dorsoventralmente. Todas estas características favorecen su movimiento a través de las partículas del suelo.

De entre los protozoos, los ciliados son los más empleados como indicadores en suelos muy contaminados. De estos microorganismos, los pertenecientes a la familia *Colpodiidae* son considerados verdaderamente edáficos. Su potencialidad como bioindicadores de las condiciones del suelo es alta debido a que forman tres tipos de quistes: el de resistencia cuando las condiciones son adversas, el de reproducción y uno inestable que se presenta cuando las condiciones cambian drásticamente (García, 2001).

En lo que se refiere a la contaminación generada por la industria petrolera en México, se sabe que el sureste mexicano presenta un gran número de sitios con diferentes niveles de impacto ambiental, como resultado de más de cincuenta años de actividades petroleras. Algunos de los sitios contaminados más problemáticos del sureste mexicano se encuentran en los estados de Veracruz, Tabasco, Chiapas y Campeche. De manera particular es, Tabasco el estado que presenta los problemas más graves de contaminación de suelos por petróleo. A la fecha no se ha determinado con exactitud la extensión del terreno contaminado. Sin embargo, se sabe que las principales fuentes de contaminación que se presentan son: 1) lodos de perforación de tipo inversa y recortes, 2) suelos contaminados por derrames de tuberías corroídas, 3) "tiraderos" de desechos semisólidos y 4) sitios contaminados por descargas de petroquímicas y refinerías (Randy *et al.*, 1999). La escasa investigación realizada sobre la microbiología de suelos contaminados con hidrocarburos en territorio nacional, con sus particulares características edáficas, climáticas y tipo de contaminantes, hace interesante el realizar estudios que contribuyan a conocer el estado actual de los suelos cercanos a zonas de explotación petrolera a efecto de llevar a cabo la recuperación de sitios contaminados.

3 JUSTIFICACIÓN

La contaminación presente en los hábitats naturales hace necesario que se tomen en cuenta alternativas de limpieza, esto con la finalidad no sólo de mantener la salud humana, sino también de las comunidades naturales que en ellos se encuentran. Debido a que la industria petrolera es una de las mayores generadoras de contaminación de suelos es imprescindible la restauración y/o biorrestauración de los mismos. Con objeto de que el suelo sea capaz de recuperar su función natural. Es importante resaltar que después de realizar la limpieza de algún sitio contaminado es altamente deseable contar con una metodología rápida que permita determinar la eficacia de la limpieza llevada a cabo. En este contexto, es que se pretende utilizar a los protozoos, específicamente a los ciliados edafícolas, como indicadores de contaminación de suelos provocada por el depósito de compuestos derivados de las actividades asociadas con la industria del petróleo como es el caso de los recortes de perforación de pozos petroleros, los cuales contienen inhibidores de hidratación de arcillas (IHA). Por lo anterior, este trabajo tiene como finalidad contribuir al establecimiento de las bases para el desarrollo de una metodología, basada en el uso de un ciliado edafícola autóctono como bioindicador.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Determinar la factibilidad de emplear la comunidad o una especie de ciliado edafícola como indicadora de contaminación por recortes de perforación de pozos de petróleo que contienen IHA

4.2 Objetivos particulares

- Determinar la respuesta de la comunidad de ciliados edafícolas, en suelos aledaños a pozos de petróleo, al ser expuestos a recortes de perforación que contienen IHA.
- Evaluar la toxicidad de un IHA sobre un ciliado edafícola autóctono de suelos potencialmente receptores de recortes de perforación

5 MARCO TEÓRICO

5.1 El suelo y sus características

El suelo es el material no consolidado, de la corteza terrestre, que sustenta la vida. Puede definirse como el material que sirve de soporte al crecimiento de las plantas. Contiene materia orgánica y mineral en diversas proporciones y se extiende desde la superficie hasta el límite inferior alcanzado por las raíces. Se origina por la interacción de procesos complejos que incluyen la meteorización física y química de la roca madre, la cual suministra el sustrato mineral, la destrucción e incorporación de materia orgánica principalmente en forma de restos de plantas en descomposición, por los microorganismos del suelo, y el movimiento de materiales suspendidos o disueltos en agua de difusión o percolación (Jakson y Raw, 1974). Sus características físicas y químicas son determinantes en la migración de los contaminantes hacia el subsuelo y mantos freáticos. Así, el suelo esta formado por cinco componentes principales que son: materia mineral, aire, agua, materia orgánica, y organismos vivos. La cantidad de estos componentes varia de acuerdo a la localidad y al tipo de suelo; el agua y el suelo juntos representan aproximadamente la mitad del volumen de este, dicho volumen es el denominado espacio poroso. De tal manera que el suelo es el medio de soporte en el cual se desarrollan las plantas y otras formas de vida, por lo cual las características del mismo ejercen gran influencia sobre la ecología vegetal, edáfica, animal y en el hombre (Aguilera, 1989).

El suelo es un sistema biogeoquímico abierto, multicomponente, donde las tres fases de la materia (sólida, líquida y gaseosa) coexisten en equilibrio dinámico. Por ser un sistema abierto, intercambia materia y energía con el medio circundante, experimentando transformaciones químicas y biológicas. Desempeña diversas funciones entre las que se destaca su papel como medio filtrante durante la recarga de acuíferos así como de protección de los mismos, también están integrados al escenario donde ocurren los ciclos biogeoquímicos, hidrológicos y de la cadena alimentaria, además de ser el espacio donde se realizan las diferentes actividades antropogénicas como las agrícolas, ganaderas, áreas verdes de generación de oxígeno, hábitat biológico, entre otras. Como productor de

alimentos el suelo es la base para la vida del hombre y los animales, permitiendo la implantación de las raíces de las plantas proporcionándoles agua y elementos nutritivos (Saval, 1995).

5.2 Formación del suelo

El suelo se forma por procesos de descomposición, migración y acumulación del material parental de origen, también llamados procesos de intemperización, que forman los diferentes horizontes del suelo. El intemperismo puede ser físico, debido a factores como viento, percolación de agua, temperatura, etc. o químico, dado por la composición y materiales que lo forman. El suelo está constituido por múltiples elementos, siendo los más abundantes, en orden decreciente: Oxígeno > sílice > aluminio > fierro > carbono > calcio > potasio > sodio > magnesio > titanio etc. todos conocidos como macroelementos del suelo. Químicamente el suelo está conformado por una fase sólida, que frecuentemente representa el 50% de su volumen total y una fase libre (volumen poroso) que constituye el porcentaje restante formado por los gases y líquidos del suelo. Dentro de la fase sólida del 40 al 95% está constituida por materia inorgánica y del 5 al 60% por materia orgánica (Galván, 2000).

La materia inorgánica se presenta principalmente en forma de compuestos de estructura cristalina llamados minerales, que determinan las propiedades de la mayoría de los suelos y su total adaptabilidad como medios de crecimiento para las plantas. En cuanto a la materia orgánica esta se encuentra formada por una gran cantidad de microorganismos vivos, plantas y residuos de origen animal; siendo químicamente la fracción más activa del suelo. Los procesos químicos más importantes que afectan el comportamiento y la disponibilidad de especies químicas en el suelo están estrechamente relacionados con las concentraciones de los elementos existentes en la fase líquida y la fase sólida. Estos procesos controlan las concentraciones de elementos, iones y complejos en la solución del suelo ejerciendo influencia en fenómenos tales como comportamiento dinámico del suelo contaminado, lo que resalta la importancia de su estudio. De manera adicional en el suelo

ocurren una parte importante de las principales transformaciones asociadas a los ciclos biogeoquímicos, las cuales son facilitadas por los organismos que ahí se encuentran (Coûteaux y Darbyshire, 1998).

Algunos de los factores abióticos que deben ser tomados en cuenta para el buen desarrollo de los microorganismos en el suelo son (Pepper *et al.*, 1996):

- Luz. Los suelos son impermeables a la luz, esto es, la luz del sol no penetra más allá de unos pocos centímetros de la superficie; por lo que los organismos fototrópicos se encuentran limitados a esos pocos centímetros del mismo. En la superficie del suelo, casi siempre, algunos parámetros físicos como la temperatura y la humedad fluctúan significativamente alrededor del día y también estacionalmente. Algunos organismos fototrópicos incluyendo algas, tienen la habilidad de cambiar a un modo de respiración y nutrición heterotrófico en ausencia de luz. Normalmente estos organismos no son competitivos con respecto de los organismos heterótrofos en cuanto a sustratos orgánicos se refiere.
- Humedad del suelo. Típicamente, el contenido de humedad del suelo varía considerablemente en los mismos, y los organismos del suelo pueden adaptarse a dichos intervalos de humedad. La aireación del suelo depende en gran medida del contenido de humedad, los suelos húmedos tienden a ser aerobios. Pero como el suelo es un ambiente heterogéneo, los espacios saturados pueden contener ciertas zonas aeróbicas mientras que los suelos secos pueden contener micro sitios anaerobios propios de centros secundarios agregados. Existen bacterias menos tolerantes a suelos con baja humedad y también los hay más flexibles con respecto al contenido de oxígeno en los mismos.
- Temperatura del suelo. La temperatura del suelo oscila de manera significativa, particularmente en la superficie del mismo. Diversas poblaciones del suelo son resistentes a las fluctuaciones de temperatura, pudiendo ser catalogadas como psicrófilas, mesófilas o termófilas. El factor temperatura generalmente determina la

mayor o menor actividad microbiana, en función de las características metabólicas del grupo de microorganismos prevaeciente.

- pH. En suelos no perturbados generalmente se tiene un pH estable con valores en un intervalo de 6 – 8 unidades una amplia gama de microorganismos encuentran su pH óptimo dentro de este intervalo.

5.3 Contaminación generada por la industria petrolera

Los hidrocarburos con los que México cuenta constituyen un elemento fundamental, presente y futuro para que el país logre un desarrollo económico y social cualitativo, por lo que estos recursos energéticos son imprescindibles e irrenunciables.

La industria petrolera contribuye de manera importante a la economía de México, razón por la cual las actividades de exploración, explotación, refinación, transporte y consumo de productos del petróleo se ven incrementadas cada día. Sin embargo, las malas prácticas en el manejo de los hidrocarburos y los accidentes durante el transporte de combustibles y otros productos procesados, así como la toma clandestina de combustibles, han traído como consecuencia problemas ambientales en los que se ha hecho evidente la contaminación de grandes extensiones de suelo superficial y la afectación de cuerpos de agua tanto superficiales como subterráneos (Saval, 1997).

La problemática ambiental local, regional y global debida a la utilización de los hidrocarburos, hace indispensable el realizar investigación y desarrollo tecnológico tendiente a mantener una alta disponibilidad de los hidrocarburos de manera competitiva y ambientalmente aceptable con respecto a otras fuentes de energía (Saval, 1997).

La contaminación de los suelos y acuíferos ocasionada por la industria petrolera se presenta durante las actividades de: extracción, refinación, petroquímica, transporte, distribución, almacenamiento y comercialización. A pesar del nivel de contaminación prevaeciente y la disponibilidad de tecnologías de biorrestauración, ya probadas en

México el problema de suelos contaminados con hidrocarburos esta muy lejos de ser resuelto (Luna – Pabello *et al.*, 1997). En lo que se refiere a las actividades de extracción se observan derrames y explosiones de hidrocarburos, acumulación de residuos de perforación, entre lo que se encuentran incluidos los **inhibidores de hidratación de arcillas (IHA)** y lodos aceitosos. Siendo los primeros los que han demostrado ser menos agresivos al ambiente (Luna – Pabello *et al.*, 2001). Algunos de los problemas de contaminación que ha sido producto de las descargas de residuos se encuentran en zonas pantanosas, donde el nivel freático sube de manera sorprendente en temporada de lluvias (Saval, 1998).

El método de perforación de pozos petroleros, en la actualidad, está constituido por una barrena, tubería, rotación así como un fluido que entra por el interior de la tubería y que sale por las toveras de la barrena, regresando a la superficie por el espacio anular que existe entre la tubería y la pared del agujero, acarreado los recortes que la barrena va recolectando. En la superficie dichos recortes son separados mediante un sistema de cribado y de equipo especial. El fluido se acondiciona y regresa al interior del pozo para continuar con el acarreo de recortes, lubricación de la barrena, estabilidad del agujero, etc. Actualmente los recortes son depositados en un contenedor metálico para posteriormente ser enviados a un confinamiento controlado de residuos peligrosos. A continuación se muestra los pasos y el esquema (Figura 5.1), de la forma en que circula el fluido de perforación durante esta actividad. La mayor parte del lodo que se utiliza en una operación de perforación se recircula en forma continua, siguiendo de manera general los siguientes pasos:

1. El lodo se mezcla y se guarda en la fosa de lodos.
2. Una bomba lo extrae de la fosa de lodos y lo envía a través de la tubería de perforación directo al hueco.
3. El lodo emerge de la tubería de perforación en la base del hueco donde la barrena de perforación está triturando la formación de roca.
4. El lodo comienza a ser desplazado de regreso a la superficie, arrastrando consigo los fragmentos de roca, llamados recortes, que se han desprendido de la formación rocosa por acción de la barrena.

5. El lodo sube por el espacio anular existente entre el espacio entre la tubería de perforación y las paredes del hueco. El diámetro típico de una tubería de perforación es de cerca de 10 cm. Sin embargo en el fondo de un pozo profundo, el hoyo puede tener 20 cm de diámetro.

6. Ya en la superficie, el lodo viaja a través de la línea de retorno del lodo la cual consiste de una tubería que conduce, el lodo a la zaranda vibratoria que permite la separación de las partículas de mayor tamaño. Las zarandas vibratorias consisten de una serie de cribas vibradoras metálicas que se usan para separar el lodo de los recortes. El lodo gotea a través de las cribas y regresa a la fosa o pileta de lodos para ser reutilizada.

7. Los recortes de roca se deslizan por la corredera de recortes para que se disponga de ellos. En función de su composición y posible efecto al ambiente, pueden ser lavados antes de ser depositado en sitios aledaños. Algunos de los recortes se toman para ser examinados por los geólogos en busca de información sobre lo que está sucediendo en la profundidad del pozo.

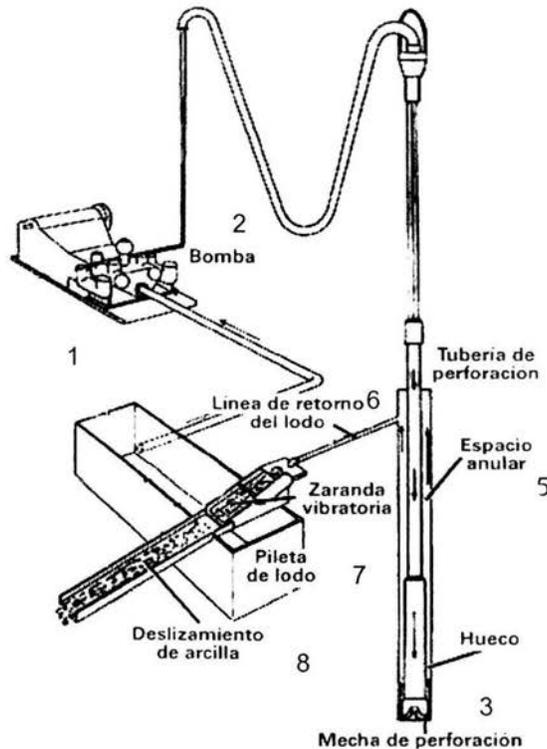


Figura 5.1. Esquema de circulación del fluido de perforación en un pozo

Los fluidos de perforación ayudan a suavizar la roca permitiendo la penetración de la barrena. A medida que los pozos se hacen más profundos estos cobran mayor importancia por la función que desempeñan. En este sentido, es importante el control de su calidad y el uso eficiente de los mismos. Sin embargo, como producto de la perforación, se generan recortes de perforación con remanentes del fluido los cuales deben ser depositados adecuadamente. Usualmente dichos recortes son depositados en sitios aledaños que van desde fosas impermeabilizadas hasta suelos sin impermeabilizar. Cabe señalar que si bien el daño ambiental en el sitio del pozo es relativamente pequeño, debido a que el equipo de perforación se encuentra cercado, el impacto ambiental en los terrenos adyacentes a la perforación resulta importante.

El grado de impacto ambiental que los fluidos de perforación tienen en el ambiente depende de su composición y de la clase de lodo que forman así como de las condiciones ambientales predominantes. Mar adentro, en general, los fluidos a base agua son los que provocan un menor daño en comparación con los fluidos a partir de petróleo o diesel. En contraste, las descargas de desechos de perforación en tierra tienen diferentes tipos de impacto y el contenido de sal en los fluidos puede presentar mayores problemas que el contenido de hidrocarburos. De tal manera que el impacto ambiental de los recortes contaminados con fluidos a partir de petróleo o diesel ha resultado en diferentes restricciones para su uso en diversas partes del mundo. La situación anterior ha conducido al desarrollo de fluidos de perforación con base sintéticas menos dañinas los cuales además de su buen desempeño resultan menos tóxicos y, en la mayoría de los casos, más biodegradables (Luna – Pabello *et al.*, 2001).

Los fluidos de perforación se pueden clasificar en tres grupos: catiónicos, anfóteros y no iónicos con las siguientes características.

Catiónicos. Se encuentran ampliamente disponibles en el mercado, actúan por intercambio catiónico con las arcillas, presentan un mayor grado de inhibición que otros sistemas. Otras características que presentan este tipo de fluidos son:

- Baja toxicidad y alta biodegradabilidad
- Estabilidad tanto térmica como en el intervalo de pH de los fluidos
- Reducen la hidratación de las arcillas, lo que previene la dispersión y disgregación del pozo
- Aumentan la salinidad del sitio en donde son descargados por lo que su uso de acuerdo con algunas regulaciones agrícolas no se recomienda. Asimismo, pueden ocasionar un impacto negativo en los organismos marinos.

Anfóteros. Estos actúan por un mecanismo similar al de los materiales catiónicos, sin embargo sus características catiónicas son menores, en especial a altos valores de pH. Adicionalmente, presentan las siguientes características:

- Se pueden utilizar en condiciones de elevadas temperaturas
- Tienen un menor costo, tanto en material como de volúmenes de consumo
- No son tóxicos

No iónicos. Incrementan la eficacia de la perforación ayudando a estabilizar las arcillas a través de complejos estables. De manera particular presentan las siguientes ventajas:

- La mayoría se consideran rápidamente biodegradables
- Se emplean en relativamente bajas concentraciones, que van del 3 al 10% en volumen (Ambríz, 2001).

Sin embargo la contaminación generada por este tipo de productos ha creado la necesidad de regular el uso de los fluidos de perforación. Dicha regulación varía de acuerdo a la ubicación geográfica y los reglamentos locales del sitio de perforación. Por otro lado se realizan pruebas adicionales para recoger datos sobre su biodegradación y bioacumulación. Una de estas pruebas practicadas es la de toxicidad, la cual es utilizada para pronosticar el impacto de un contaminante en el ambiente. Los resultados de estos experimentos permiten estimar la cantidad de material que se puede desechar sin que se tengan efectos directamente tóxicos en el ambiente. El tipo exacto de prueba dependerá

de la legislación local, así como del destino probable del contaminante (Zamudio *et al.*, 1998).

5.4 Generalidades sobre protozoos edafícolas

Muchos representantes de la macro y microbiota pasan parte o toda su vida bajo tierra. La microbiota se encuentra constituida por bacterias, actinomicetos, protozoos, nemátodos y oligoquetos entre otros. En cuanto a la macrobiota, esta se encuentra constituida por insectos así como por una variedad de mamíferos, reptiles y anfibios, los que de manera conjunta participan en el ciclo natural de la materia orgánica (Tan, 1994). Entre los organismo más abundantes se encuentran los protozoos, cuyo tamaño va de unos cuantos micrómetros hasta uno o más milímetros. Los protozoos son cosmopolitas, ya que se encuentran en diferentes regiones que van desde las ecuatoriales, subtropicales, templadas, así como las árticas y antárticas. En todos los suelos agrícolas examinados a la fecha se han presentado protozoos. Su diversidad y abundancia oscila según la calidad que se tenga. Los ciliados son colonizadores sucesionales de muchos nichos ecológicos en la biosfera.

La mayoría de los protozoos depende de la materia orgánica preformada por lo que son catalogados como saprobios (Martín, 1980).

Asimismo, los protozoos han logrado explotar una gran diversidad de ambientes restringiéndose a las películas de agua, a los poros llenos del mismo elemento y a los pequeños poros que pueden contener bacterias (Regih *et al.*, 2002). Muchas especies presentan diversos grados de asociación con otros organismos que pueden ser desde otros protozoos hasta vertebrados (Martínez y Gutiérrez, 1985). La aparición y distribución de los protozoos es determinada por factores bióticos y abióticos, entre los factores bióticos se encuentran incluidas las reservas alimentarias, competición así como las interrelaciones depredador presa, entre otros. Dentro de los factores abióticos se incluyen factores químicos como son la humedad, concentración de iones, pH, concentración de

gases disueltos y factores físicos como la luz, temperatura, movimientos del agua, entre otros, encontrándose que los ciliados son tolerantes a un gran intervalo de factores ambientales, incluyendo tanto factores físicos como químicos. Lo anterior aunado a algunas de sus estrategias de sobrevivencia, como el enquistamiento en condiciones adversas, les ha ayudado a colonizar y explotar una gran variedad de hábitats. Algunas de las características edáficas que se pueden asociar a cierto tipo de especies de ciliados y comunidades son: tipo de suelo, régimen de humedad del mismo y distribución de poros. Estas características pueden determinar la naturaleza de la microbiota componente del suelo (bacterias, hongos, actinomicetos) que proveen las presas para la comunidad de protozoos heterótrofos (Darbyshire, 1994).

Es importante señalar que los estudios sobre protozoos edafícolas se han venido realizando desde hace mucho tiempo, pero la mayoría de estos han sido desarrollados en países europeos. En México son pocos los estudios que se han realizado sobre protozoos edafícolas Arévalo (1967), Basurto (1970) y García (2001) algunos de éstos se han enfocado al estudio de las amibas de vida libre (Rodríguez *et al.*, 1997), por lo que deben encaminarse más esfuerzos en esta línea. Los primeros estudios relacionados con los protozoos edafícolas, que se realizaron, fueron llevados a cabo por Russell y Hutchinson (1909), quienes llegaron a concluir que los protozoos edafícolas corresponden a formas quísticas y en cuanto aumenta el contenido de humedad, en el suelo, estas pasan a ser formas tróficas. De manera complementaria estos investigadores demostraron que las poblaciones bacterianas son reguladas por los protozoos. De igual forma comprobaron que los protozoos estimulan la fijación de nitrógeno por *Azotobacter*, incrementando la amonificación, la descomposición y la producción de CO₂ entre las bacterias del suelo. Russell al seguir sus investigaciones pudo determinar que *Colpoda cucullus* es una forma común, de protozoo ciliado, en el suelo (Arévalo, 1967). Lo cual hace interesante a esta especie para estudios asociados con la afectación en calidad del suelo por introducción de contaminantes.

Si bien existen abundantes estudios relacionados con la importancia de los protozoos en la depuración de contaminantes orgánicos e inorgánicos así como de sus uso como

bioindicadores de calidad y/ o concentración de contaminantes en aguas (Luna – Pabello , 1993; Luna – Pabello *et al.*, 1997; Luna – Pabello *et al.*, 1996; Nicolau *et al.*, 2001; Madoni, 2000; Nicolau y Rajaram, 1999; Parry – Laybourn *et al.*, 1999; Pérez – Uz *et al.*, 1998; Al – Shahwani y Horan, 1991; Salvado y García 1995; Holoubar y Grudke, 2000), siguen siendo pocos los trabajos de investigación realizados en suelos.

Las investigaciones derivadas del estudio de los protozoos dulceacuícolas, han revelando que estos microorganismos son de gran ayuda para la evaluación de los riesgos ambientales derivados por diferentes productos tóxicos, a pesar de no haberse realizado investigaciones de igual magnitud sobre protozoos edafícolas es posible inferir que también es posible su empleo para los mismos fines, obteniendo así una herramienta útil para enfrentar problemas de contaminación edáfica (Vasudevan y Rajaram, 2001).

Por otro lado, la importancia de los protozoos edafícolas radica en que intervienen en muchas de las transformaciones de los más grandes ciclos biogeoquímicos de la biosfera, jugando un papel clave en los ciclos del nitrógeno, carbono, y fósforo. Lo anterior debido a la regulación de la velocidad de descomposición y a las rutas metabólicas específicas que siguen. No se conocen de manera precisa la riqueza de especies de protozoos edafícolas, Corliss, 1991 (en Coûteaux y Darbyshire, 1998) estimó el número de especies de protozoos en 4000, y aunque no se conoce el número total exacto, se han determinado en biotopos terrestres 400 especies de ciliados, 200 especies de amibas testadas y 60 especies de amibas desnudas. La incertidumbre entre el número de especies es el reflejo del limitado conocimiento entre la distribución de los protozoos en el suelo, la biodiversidad y el nivel de organización llegando a ser considerado un índice biológico que refleja la estabilidad de los ecosistemas en los suelos naturales y perturbados (Coûteaux y Darbyshire, 1998). Es por esto que se resalta la importancia de los protozoos edafícolas como indicadores de calidad ambiental, debido a que los protozoos son la base de la alimentación heterotrófica de los eucariontes. Además constituyen un componente esencial en ecosistemas marinos, dulceacuícolas y terrestres, de tal manera que los estudios de dinámica y estructura de las comunidades provee de un método de medición y monitoreo de cambios bióticos y abióticos en el ambiente.

En la figura 5.2 se presenta un esquema en el que se resume el papel de los protozoos en las pruebas de toxicidad el cual no obstante de haber sido generado para valorar el tratamiento de aguas residuales, también resulta útil para visualizar los diferentes factores que deben ser tomados en cuenta para la realización de dichas pruebas. En la figura también se presentan los posibles resultados de reproducción, viabilidad, locomoción, además de los niveles de organización a la cual se pueden llevar a cabo dichos experimentos.

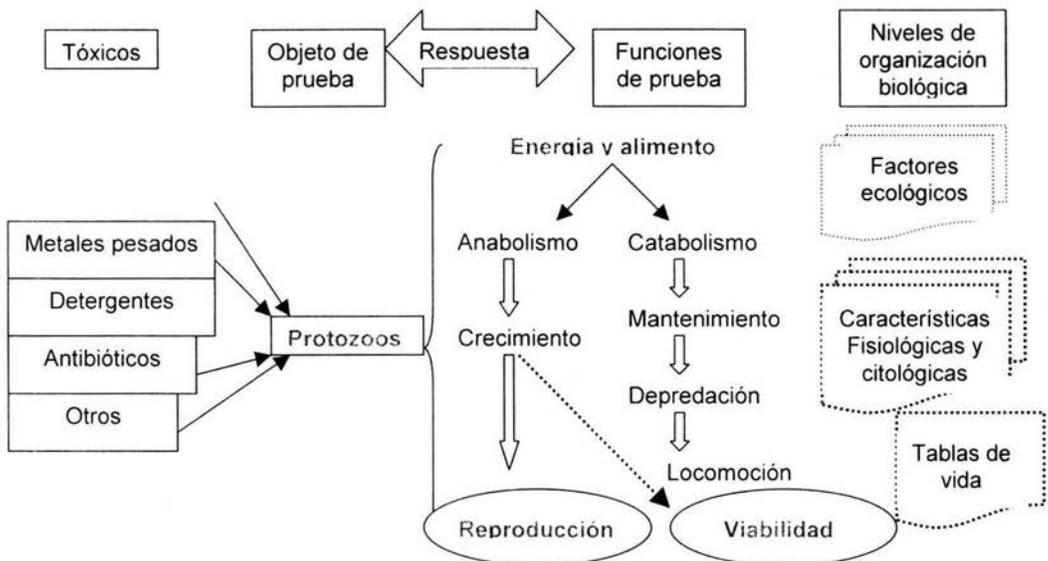


Figura 5.2. Marco conceptual mostrando la integración entre los posibles tóxicos y algunos de los parámetros estudiados en la valoración del tratamiento de aguas residuales usando protozoos (Tomado de Nicolau *et al.*, 2001).

Actualmente los ciliados edafícolas han empezado a ser utilizados en los bioensayos, (Dive *et al.*, 1998). De entre los ciliados edafícolas que han sido utilizado para la realización de pruebas de toxicidad, se encuentra el ciliado *Colpoda steinii* que surge por la necesidad de encontrar un bioensayo rápido y sensible, en lo referente a contaminación del suelo, y al uso de organismos indígenas y ecológicamente relevante (Campbell *et al.*, 1997), el estudio concluye que los ciliados edafícolas pueden ser usados para comparar la

toxicidad, de la contaminación generada por metales pesados en el suelo y para examinar los factores que afectan la biodisponibilidad de las soluciones que contienen metales pesados en el mismo.

Por otro lado los microorganismos del suelo pueden ser expuestos a un extenso intervalo de tratamientos, incluyendo desecación, erosión, cultivo intenso, deforestación y depósito de algunos ácidos como el nítrico o contaminación con metales pesados, cabe señalar que la diversidad de los ciliados juega un papel determinante en la recuperación en este tipo de perturbaciones (Coûteaux y Darbyshire, 1998).

Algunas de las características que presentan los protozoos y que permiten que éstos puedan ser usados como bioindicadores de la calidad de suelos contaminados son:

- Los protozoos son un componente esencial del ecosistema suelo.
- Presentan un rápido crecimiento y una delicada membrana externa por lo que pueden reaccionar más rápidamente a los cambios ambientales que otros organismos eucariontes pudiendo servir como un sistema de advertencia, además de ser una excelente herramienta de bioensayo.
- El genoma eucarionte de los protozoos es similar al de los metazoos. Por lo que las reacciones a cambios ambientales pueden ser relacionadas a organismos más grandes.
- Los protozoos habitan y son particularmente abundantes en los ecosistemas del suelo, así como en condiciones ambientales extremas.

Las desventajas que presentan para poder ser utilizados como bioindicadores son:

- Existe un gran número de especies, muchas de las cuales aún no han sido completamente descritas, pudiéndose encontrar más de 1000 por metro cuadrado de suelo forestal, por lo cual es necesaria la participación de muchos especialistas para su identificación.
- La enumeración o cuenta puede ser difícil y por lo tanto requiere de mucho tiempo.

- Muchos de los organismos del suelo son inconspicuos, por lo que se necesita técnicas especializadas para poderlos visualizar (Foissner, 1999).

Por las características antes mencionadas, los protozoos, pudieran ser microorganismos potencialmente útiles como indicadores del grado de contaminación que se presente en los suelos y que son causados por las diferentes actividades antropogénicas, tales como las asociadas con la explotación de petróleo.

5.5 Aspectos relevantes sobre ciliados edafícolas

Los ciliados son microorganismos de estructura compleja, y de entre los protozoos son de los más grandes llegando a medir hasta los 2 mm de longitud. El nombre de ciliados se les da por las cortas y numerosas estructuras llamados cilios que se presentan por lo menos en alguna etapa de su ciclo de vida. Cada cilio surge de una estructura llamada cinetosoma, las hileras de cinetosomas reciben el nombre de cinetias que coordinan la locomoción. Cada célula ciliada presenta un citostoma (boca), conectado a una citofaringe al final del cual se encuentran las vacuolas digestivas que es en donde la célula digiere y absorbe el contenido alimentario, para finalmente descargar los residuos por el citoprocto. Los ciliados edafícolas de vida libre se alimentan de sustancias orgánicas disueltas, mientras que otros se alimentan principalmente de bacterias, algunos otros se alimentan adicionalmente de levaduras, otros protozoos y de pequeños metazoos como rotíferos (Sleigh, 1989).

La característica principal de los ciliados es la presencia de dos tipos de núcleos: uno grande poliploide, el macronúcleo, responsable de la síntesis de proteínas. Uno más pequeño diploide, el micronúcleo, este es el que participa en la reproducción dividiéndose mitóticamente, dentro de la envoltura nuclear, experimentando meiosis durante el proceso de conjugación y autogamia (Sleigh, 1989).

De los ciliados, los pertenecientes a la clase Colpodea presentan una ciliatura oral más organizada, son formas de vida libre típicamente encontrados en suelos, pudiendo ser formas exclusivamente edafícolas y frecuentemente formas quísticas. *Colpoda* es un género común, se alimenta primordialmente de bacterias, sin embargo algunas especies se alimentan adicionalmente de levaduras y otros protozoos así como de pequeños metazoos y rotíferos. Además los colpódidos presentan una amplia tolerancia a la condiciones abióticas extremas, rápido enquistamiento/ exquistamiento, así como una rápida multiplicación (a menudo dentro del quiste) cuando el ambiente les es favorable. Los ciliados son los primeros colonizadores de los suelos; considerándose especies de selección r, seguido por las especies intermedias de selección K, manteniendo grandes poblaciones en comparación con las especies sucesionales (Bamforth, 2001).

Ecológicamente muchas de las especies de colpódidos pueden encontrarse en suelos y musgo, muy pocos en hábitats semiterrestres como en charcos, algunas especies se encuentran, frecuentemente, en infusiones de plantas (*C. steinii*, *C. maupasi*, *C. inflata*, *C. cucullus*). Los colpódidos son importantes en varios procesos físicos y biológicos del suelo, por ejemplo *Colpoda* puede incrementar el espacio poroso en el suelo en un 8%, secreta sustancias que son funguicidas e incrementa la capacidad de fijación de nitrógeno de *Azotobacter*, así como el incremento de las plántulas de algodón. Las especies de *Colpoda* se alimentan primordialmente de bacterias y ocasionalmente de cianobacterias, hongos y algas verdes. Algunos colpódidos como *C. steinii* y *C. cucullus* pueden ingerir partículas que van de un tamaño de 0.3 a 1.1 μm (Foissner, 1993).

En la figura 5.3 se muestra el esquema de un ciliado típico, con algunas de las estructuras más características.

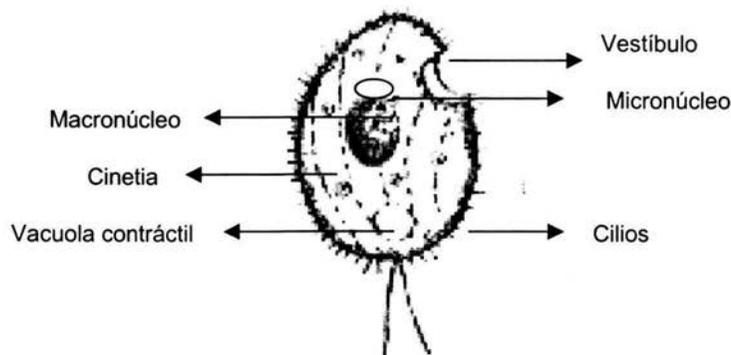


Figura 5.3. Esquema de un ciliado perteneciente a los colpódidos, tomado de Aladro – Lubel *et al.*, 1990).

5.6 Características de los bioindicadores de contaminación

En los sistemas de depuración, por ejemplo de lodos activados, se encuentra una gran cantidad de microorganismos vivos (biocenosis) éstos están representados por un diverso número de microorganismos de diferentes grupos taxonómicos que constituyen comunidades biológicas interrelacionadas entre sí y con el ambiente que los rodea (biotopo). La estructura del ecosistema está dada por un conjunto de factores tanto bióticos (como son todos los microorganismos presentes en el medio), como factores abióticos que son aquellas características fisicoquímicas prevalecientes en el biotopo como el pH, temperatura, salinidad, concentración de nutrientes, entre otros. En este tipo de sistemas se utilizan organismos bioindicadores de la calidad de los efluentes obtenidos después del tratamiento. Lo anterior podría también ser aplicable en la evaluación de la calidad del suelo, sobre todo si este ha sufrido un proceso de contaminación.

De tal manera que un bioindicador es una herramienta biológica, con la que se puede extraer cierta información de un ecosistema, y con el uso de esta información se pueden

tomar decisiones sobre el manejo de los sitios contaminados. Las actividades de un bioindicador pueden ser llevadas hasta diferentes niveles de integración biológica por lo que la medición de las variables bioquímicas y fisiológicas de los individuos o de sus productos de excreción provean información del daño a la exposición, a algún contaminante. Además los bioindicadores son medidas múltiples de la salud: (a) de un organismo o (b) de diversos niveles de organización biológica en múltiples escalas de tiempo de respuesta. Los bioindicadores pueden tener un intervalo de respuesta desde el nivel de biomoléculas al poblacional y de comunidad, éstos generalmente son usados para evaluar los efectos de estrés ambiental sobre la salud de los organismos dentro del proceso de evaluación de riesgo ecológico. De tal manera que un bioindicador se refiere a las actividades de un organismo o un nivel más elevado (comunidades, poblaciones, ecosistemas), ante un determinado producto químico o un tóxico (Van Straalen y Krovoluttsky, 1996).

El uso de bioensayos como sistemas de prueba ecotoxicológico, al ser generalmente de corta duración, y con un protocolo definido, permite medir la actividad de un compuesto químico, mediante la observación de efectos adversos, sobre las especies de prueba. Dichas observaciones pueden ser reportadas en el tiempo, lo cual constituye un biomonitoreo de duración variable. Los organismos que habitan en el suelo al estar en contacto directo con el mismo, reflejan la calidad fisicoquímica y biológica en que se encuentra el suelo. Por lo anterior, una posible ruta para evaluar la bioestabilidad de los contaminantes en el suelo, es medir la concentración en el interior de los organismos (bioacumulación) o bien, evaluar su sobrevivencia en ese ambiente. El efecto de bioacumulación se puede aprovechar generalmente usándolo para el caso de los contaminantes que son retenidos por los organismos en proporción a la concentración que de estos se encuentre en el ambiente, lo que ha sido aplicado en el caso de los metales pesados. Así, se puede estimar las concentraciones letales en el cuerpo (CLC) (LBCs, por las siglas en inglés de lethal body concentrations), por medio de experimentos en los cuales se incrementa la mortalidad a través de un tiempo de exposición, que es observado midiendo la concentración de los metales en el cuerpo del organismo.

En este sentido un buen sistema bioindicador debe basarse en métodos de reconocimiento y combinación desarrollados en el laboratorio para después ser validados en el campo. (Van Straalen y Krovoluttsky, 1996).

Los bioindicadores pueden ser utilizados en programas de biomonitoreo para:

- Advertir señales tempranas de algún problema ambiental
- Identificar causas y efectos entre agentes estresantes y sus respuestas biológicas
- Evaluar las respuestas integradas de los organismos al estrés ambiental y
- Evaluar la efectividad de las acciones remediales sobre la salud del ecosistema (Garza *et al.*, 2002).

5.7 El uso de ciliados como bioindicadores

Algunos organismos del suelo pueden ser usados como bioindicadores de contaminación, valorando la toxicidad y riesgo de los suelos contaminados o evaluando la eficacia de los procesos de biorremediación, esto es por medio de la valoración de la toxicidad y riesgo del producto final (Haimi, 2000). Esto podría realizarse con el uso de ciliados edafícolas, presentes en sitios contaminados, si fueran asociados con concentraciones específicas de algún contaminante en particular, por ejemplo los metales pesados. Algunas de las características de los ciliados edafícolas que los hacen organismos ideales en las pruebas de toxicidad, además de los ya mencionados en el capítulo 5.4, son que estos organismos son ubicuos en los ecosistemas terrestres siendo sensitivos al estrés antropogénico. Asimismo pueden servir como bioindicadores de las condiciones del suelo y juegan uno de los más grandes papeles en la biotransformación de diversos compuestos. Adicionalmente muchos ciliados forman estados de resistencia, generalmente quistes, que mantienen en latencia al organismo durante las condiciones adversas, como por ejemplo la sequía, exquistándose y explotando rápidamente las condiciones aceptables. La habilidad de los organismos para crecer rápidamente, así como la habilidad para formar estados resistentes pueden ser explotados para los propósitos toxicológicos (Pratt *et al.*, 1997).

Aunado a esto, algunos estudios de latencia pueden adicionar información, que realce el uso de los ciliados en la evaluación de las condiciones del suelo (Bamfoth, 2001). Esto puede ser evaluado por medio de las pruebas de toxicidad, que son usadas para la estimación del grado de contaminación de alguna sustancia o mezcla de sustancias utilizando algún microorganismo relevante ecológicamente y observando sus respuestas fisiológicas en presencia de contaminantes.

5.8 Pruebas de toxicidad

Las pruebas de toxicidad son un procedimiento en el cual la respuesta de los organismos es causada para detectar o medir la presencia y el efecto de una o más sustancias residuales, factores medioambientales o una combinación de estos. De modo que la toxicidad se refiere a los efectos adversos que en un organismo causan, los contaminantes. La toxicidad es resultante de la concentración y del tiempo de exposición modificado por variables abióticas como temperatura, pH, formas químicas y disponibilidad de las mismas. Por lo tanto, una prueba de toxicidad es un procedimiento en el que se miden las respuestas biológicas de los organismos, y se utilizan para detectar y medir la presencia de una o más sustancias, residuos o factores ambientales actuando aisladamente o en combinación. Las pruebas de toxicidad se clasifican de acuerdo a su duración en pruebas de corto, mediano o largo plazo. Por el método de adición de las soluciones de prueba, pueden ser oral por adsorción o por alguna otra vía. Las pruebas de toxicidad pueden ser útiles para el monitoreo de la calidad de un efluente de un determinado compuesto o mezcla de ellos o de suelos contaminados. También puede aplicarse para evaluar la toxicidad relativa, sensibilidad relativa, pruebas de olor, velocidad de crecimiento, etc. Las pruebas de toxicidad de corto plazo son las principalmente usadas para monitoreos de rutina (APHA, 1998).

Para que un organismo pueda ser seleccionado como un organismo de prueba será necesario tomar en cuenta ciertas características como son:

- El conocimiento de la biología del organismo de prueba, principalmente en lo referente a sus condiciones ambientales de sobrevivencia y hábitos alimentarios.
- Sensibilidad a los factores bajo consideración.
- Su distribución geográfica.
- Disponibilidad, teniendo en cuenta un tamaño práctico.
- Importancia económica, ecológica o recreativa.
- La relevancia del propósito del estudio.
- Los requerimientos abióticos así como cuando estos pueden ser aprovechados y como las condiciones normalmente encontradas en el sitio de estudio afectan al organismo.
- La disponibilidad de los métodos de cultivo para mantener al organismo en el laboratorio y conocer sus requerimientos tanto fisiológicos como nutricionales, y en general las condiciones físicas de alimentación.

Para la evaluación de ambientes contaminados, si bien es posible emplear organismos procedentes de cepas de colección es altamente recomendable llevar a cabo la recolecta de poblaciones de organismos indígenas, es decir, organismos que sean autóctonos del suelo o agua, que se pretende evaluar, esto es particularmente importante para los organismos de significancia ecológica, comercial o recreativa. Para realizar estudios de toxicidad es importante recolectar a los organismos de prueba en sitios que se encuentren libres de contaminación. La elección del organismo de prueba depende de algunos factores incluyendo, el presupuesto, tiempo y la presencia del organismo en el ambiente (APHA, 1998). Así, las pruebas más simples son llevadas a cabo con organismos unicelulares o plantas y pueden durar sólo unas pocas horas o días, tiempo durante el cual se registra la respuesta observada.

Las pruebas de toxicidad son usadas para una variedad de propósitos que incluyen determinar:

- Condiciones ambientales para la vida acuática o terrestre.

- Factores ambientales favorables o desfavorables como son oxígeno disuelto (OD), pH, temperatura, salinidad, turbiedad, contenido de materia orgánica, metales, etc.
- Sensibilidad relativa de los organismos a los efluentes tóxicos y suelos contaminados.
- Toxicidad aguda de las aguas o suelos a las especies de prueba.

El efecto más distintivo observado en las pruebas de toxicidad es la muerte, por lo que las investigaciones frecuentes son hechas para determinar la concentración letal media (CL₅₀) hasta la muerte que es el punto final del experimento.

Una rama del conocimiento relacionada con la toxicología es la llamada ecotoxicología, esta es considerada una ciencia ambiental interdisciplinaria que involucra tanto a la toxicología como a la ecología aplicada y la química ambiental. Enfocándose a las relaciones entre la química ambiental y la biota, evaluando los efectos adversos a los diferentes niveles de la organización biológica. Los efectos tóxicos de los compuestos antropogénicos en la biota y los ecosistemas son considerados en relación a los compuestos químicos y su destino en el ambiente, por lo que la biodisponibilidad de dichos compuestos es dependiente de los procesos biogeoquímicos y fisiológicos. Es por esto que la investigación ecotoxicológica, de ambientes contaminados requiere un acercamiento interdisciplinario en el que se consideren procesos físicos, químicos, biomoleculares, toxicológicos, fisiológicos y ecológicos. Como una perspectiva más se tiene el aprovechamiento que se basa en la investigación del efecto toxicológico potencial de un contaminante, en ensayos de laboratorio y que pueden ser usados para extrapolación al campo. En este sentido los bioensayos juegan un importante papel en este proceso.

En las investigaciones ecotoxicológicas, los efectos celulares y bioquímicos, incluyendo mecanismos de estudio de la acción tóxica, son igualmente importantes en los estudios de organismos de laboratorio, porque la interacción primaria entre los compuestos químicos y la biota ocurre en la superficie o dentro de la célula. Así, una investigación ecotoxicológica

incluye, efectos bioquímicos y celulares dentro de la acción del tóxico empleado (Fent, 2003)

En la Figura 5.4, se presentan las relaciones y efectos entre la biodisponibilidad de contaminantes y la toxicidad en los organismos expuestos a contaminantes.

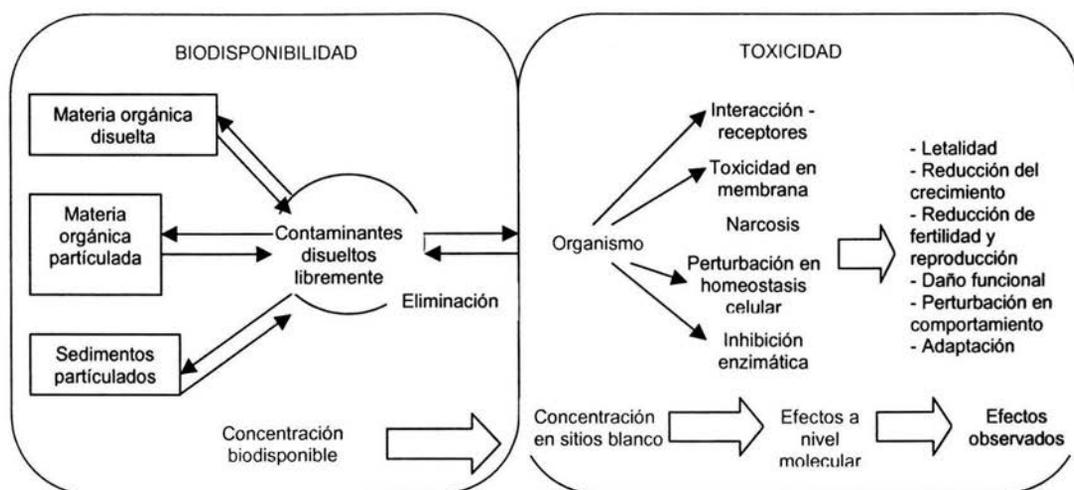


Figura 5.4. Interacciones entre la fracción biodisponible de los contaminantes tóxicos, la concentración en los sitios blancos y los efectos tóxicos causados en el organismo de prueba (Tomado de Fent, 2003).

Considerando que la respuesta que presentan los microorganismos utilizados como indicadores se relaciona directamente con la dosis del contaminante usado, y que este aspecto es relevante para el presente estudio, se destacan en detalle en la siguiente sección.

5.9 Relaciones dosis respuesta

La mayor parte de la información cuantitativa relacionada con la toxicidad de sustancias se obtiene de experimentos realizados y mediante la administración de dosis de las sustancias, de prueba, a los organismos seleccionados. En vista de las consideraciones prácticas como el costo y el tiempo, la mayoría de los experimentos involucran el desarrollo de episodios de toxicidad aguda en lugar de crónica. La dosis de la sustancia administrada en ensayos toxicológicos, se expresa, habitualmente en miligramos por unidad de peso del organismo sobre el que se realizará el ensayo; normalmente, la toxicidad de una sustancia aumenta al aumentar la dosis, aunque se conocen algunas excepciones (Baird, 2001).

Los individuos difieren significativamente en su susceptibilidad a un compuesto determinado, algunos responden a dosis muy bajas mientras que otros necesitan dosis mucho más altas antes de que reaccionen. Es por esta razón que se han creado las relaciones dosis–respuesta para sustancias tóxicas, incluyendo los agentes ambientales. La mayoría de las veces el efecto respuesta, en los ensayos con organismos, que se utiliza para construir las curvas dosis–respuesta, es la muerte. La dosis que prueba ser letal para el 50% de la población de organismos ensayados es la denominada concentración letal media (CL_{50}) de la sustancia; cuando menor sea el valor de la CL_{50} , más tóxico es el compuesto químico que se examina, ya que se requiere menos cantidad para afectar al organismo. Mientras que para un compuesto químico mucho menos tóxico será necesario una cantidad mayor para causar algún daño al organismo de prueba.

En ocasiones se dan referencias sobre la dosis letal oral media (DLO_{50}), que corresponde a la dosis letal oral, cuando el compuesto químico ha sido administrado oralmente a los organismos ensayados, en lugar de su administración a través de la piel o por otros medios. El intervalo de los valores tanto para la CL_{50} y DLO_{50} para la toxicidad aguda de muchos compuestos químicos y biológicos es enorme y se extiende en un intervalo de 10^0 – 10^{10} . A veces se utilizan términos tales como “moderadamente tóxico”, “ligeramente

tóxico" y "altamente tóxico", sin que exista acuerdo sobre las definiciones concretas de estos términos.

En las curvas de dosis–respuesta para algunas sustancias, existe una dosis por debajo de la cual no se aprecian efectos sobre los organismos de prueba, a este nivel se le denomina umbral, el valor más alto de la dosis para la que no se aprecian efectos, se encuentra un poco por debajo del umbral, y se le denomina nivel de efectos no observables (NOEL) (Baird, 2001).

6 Estrategia general de trabajo

Para el desarrollo de este trabajo se llevo a cabo la revisión bibliográfica sobre cuatro temas principales: 1) Ciliados edáficos, procedimientos para su obtención y manejo, 2) Fundamentos de las pruebas de toxicidad para su aplicación en suelos contaminados, 3) Generalidades de suelos y la problemática de su contaminación y 4) Inhibidores de hidratación de arcillas de recortes de perforación, generados durante la perforación de pozos petroleros.

Con esta información se elaboró el marco teórico de referencia que permitiera orientar la experimentación, la cual se dividió en dos partes: 1) Etapa de experimentación previa y 2) Etapa de experimentación formal. Es importante señalar que la etapa 1 esta conceptualizada como una experimentación exploratoria que permitiera "afinar" o definir con mayor precisión las actividades a realizar en la segunda etapa experimental.

La secuencia de las principales actividades realizadas durante las etapas experimentales 1 y 2 se muestran en la figura 6.1. Ambas etapas experimentales se describen en las siguientes secciones.

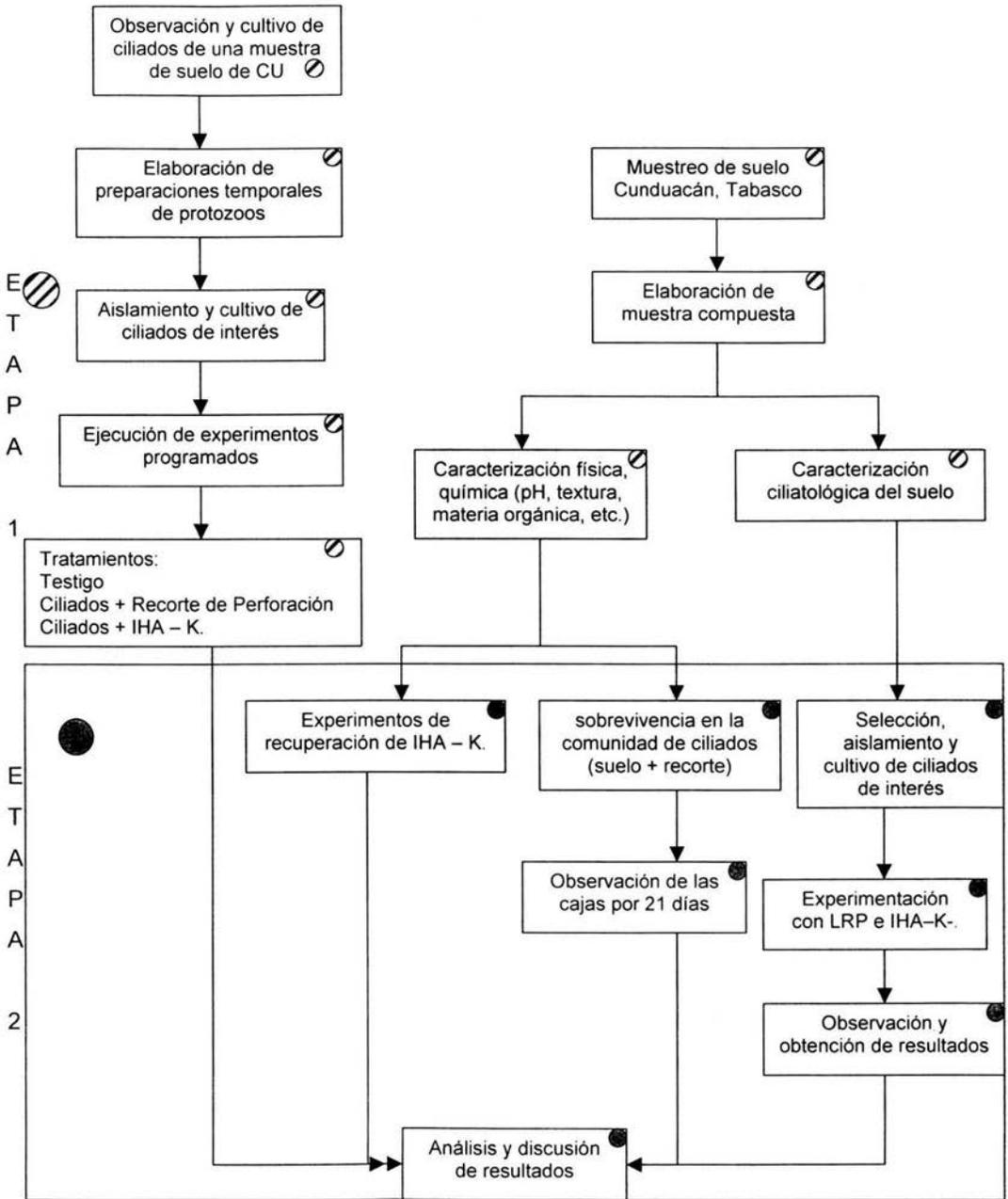


Figura 6.1 Diagrama de flujo de la estrategia general de trabajo seguida.

7. Etapa experimental uno

Esta primera parte de la experimentación consistió inicialmente en trabajar con una muestra de suelo procedente de un jardín de Ciudad Universitaria (CU) a efecto de practicar las técnicas para la obtención de los ciliados edafícolas tal y como se describe en el inciso 7.2 y acorde a lo reportado en la literatura por Aleff *et al.*, (1998). Para la observación de ciliados edafícolas se siguió la metodología obtenida por Bamforth (Aleff *et al.*, 1998) con esta metodología y con el suelo empleado se logró el aislamiento de algunos ciliados edafícolas, algunos de los cuales pudieron ser identificados hasta el nivel de género: *Colpoda*, *Vorticella* y *Amoeba*. Para realizar el aislamiento fue necesario aplicar la técnica de micropipeteo trasladando de manera selectiva a una suspensión de agua con yema de huevo cocido a los ciliados de interés. Una vez que se logró el aislamiento y aumento poblacional de los ciliados de interés se procedió a ejecutar las primeras tinciones empleando colorantes vitales como el verde de metilo, y la impregnación argéntica de Klein con la finalidad de observar las estructuras necesarias para lograr la correcta identificación de los ciliados cultivados. El registro de los ciliados encontrados se llevó a cabo mediante la técnica de campo claro, con el uso de microscopios fotónicos marca Iroscope con cámara fotográfica y de videograbación, haciendo las observaciones en vivo. Los experimentos realizados incluyeron la exposición de los ciliados a lixiviado de recorte de perforación y con diluciones del IHA-K. Llevándose a cabo el registro de la respuesta observada bajo las condiciones experimentales de prueba.

A efecto de obtener una muestra de suelo testigo de la zona potencialmente receptora de los recortes de perforación conteniendo IHA-K se llevó a cabo un muestreo en un suelo no impactado, aledaño a pozos petroleros el cual correspondió a un predio del municipio de Cunduacán, en el estado de Tabasco. La metodología empleada para el muestreo, análisis edáfico y recuperación de ciliados se describe más adelante.

7.1 Materiales y Métodos

7.1.1 IHA–K y Recortes de perforación

El inhibidor de hidratación de arcillas usado para la realización de la fase de experimentación es el denominado K, cuyas características se encuentran establecidas en trabajos previos (Ambríz, 2001; Salamanca, 2003). Las características que presenta el IHA y relevantes para este estudio son: es un líquido de color azul soluble en agua, facilitando su degradación por bacterias, con una gravedad específica de 1.1, siendo un IHA de tipo catiónico con un pH de 6.5 unidades, carbono orgánico total de 25 g/L, conteniendo un 55% de carbono y 20% de nitrógeno. Mientras que algunas de las características que pudieron ser establecidas para los recortes de perforación fueron que presentaban una humedad de 35% y 65% de sólidos totales.

7.1.2 Muestreo de suelo

Ubicación del sitio de estudio

El estado de Tabasco se encuentra localizado a 18°39' al norte, 17°15' al sur de latitud norte; a 91°00' al este y a los 94°07' de longitud oeste. Representa el 1.3% de la superficie del país, colinda al norte con el golfo de México y Campeche, al este con Campeche y la república de Guatemala; al sur con Chiapas y al oeste con Veracruz – Ilave. Tabasco presenta un clima que va del cálido húmedo con lluvias todo el año (Af) a cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (Am). Presenta una temperatura promedio que va de 25.9 a 27.2°C, siendo la temperatura del mes más frío de 23°C y la del mes más caluroso de 29°C.

Tabasco presenta una precipitación total anual que va de 1595.6 a 3467.7 mm, con una precipitación en el año más seco de 1033.4 mm y en el mes más lluvioso de 4363.5 mm. La vegetación que se encuentra es pastizal en un 30.62% de la superficie del estado, selva en un 16.19% de la superficie estatal, manglar en 2.75%, tular – popal en un 23.58% mientras que para la agricultura se usan 25.82% de la superficie estatal (INEGI, 2001).

El sitio problema se encuentra ubicado en el municipio de Cunduacán, Tabasco, que se encuentra ubicado 18°15' al norte, 17°57' latitud norte; 93°01' al este, 93°24' de longitud oeste, este municipio representa el 2.4% de la superficie del estado. El municipio de Cunduacán colinda al norte con los municipios de Comalcalco y Jalapa de Méndez; al este con los municipios de Jalapa de Méndez, Nacajuca y Centro; al sur con el estado de Chiapas y los municipios de Cárdenas y Comalcalco (Figura 7.1.). Presenta un clima cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (Am). La temperatura promedio que va de 26.8 a 27°C, siendo la temperatura del mes más frío de 25.5°C y la del mes más caliente de 27.6°C. La precipitación total anual va de 2019.4 a 2242.9 mm, siendo la precipitación del año más seco de 1180.9 mm, mientras que en el año más húmedo la precipitación es de 2836.6 mm. La vegetación que se encuentra en este municipio es pastizal en un 58.90% de la superficie municipal, selva 1.08% del municipio, popal – tular 5.66% y un 34.03% de la superficie municipal que es utilizada para el cultivo (INEGI 2000; Figura 7.2).

A continuación se muestra el mapa con la ubicación del estado de Tabasco y el municipio de Cunduacán (Figura 7.1)

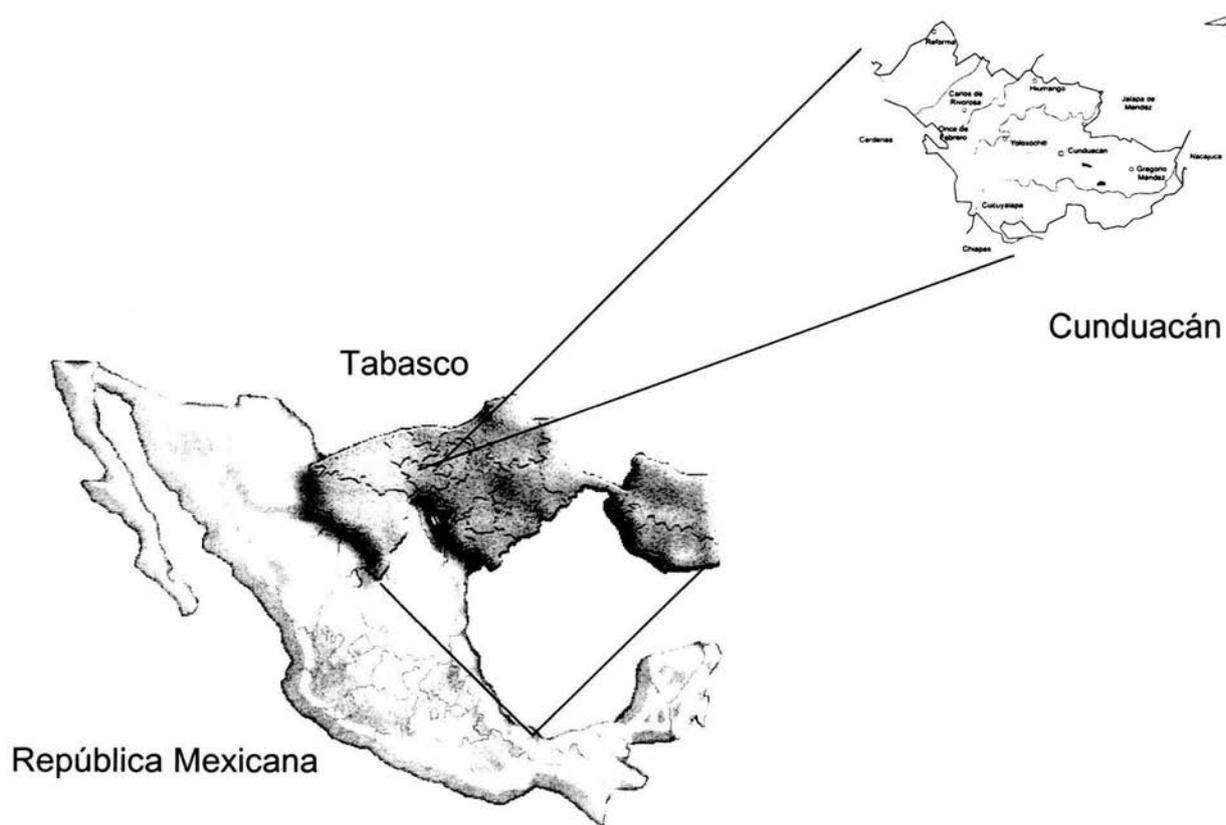


Figura 7.1. Ubicación del municipio de Cunduacán, Tabasco (Tomado de <http://www.siem.gob>)

En la figura 7.2, se muestra la vegetación que actualmente es la predominante en el municipio de Cunduacán, Tabasco (pastizal en su mayor parte), siendo la que se encontró al momento de la realización del muestreo en el suelo no impactado, receptor potencial de recortes de perforación conteniendo IHA.



Figura 7.2. Vegetación predominante en el municipio de Cunduacán, Tabasco

Se llevó a cabo la selección del sitio de muestreo en el municipio de Cunduacán. El muestreo se realizó en un área de 5.0 por 1.20 metros. Cabe aclarar que el área establecida para el muestreo no fue más grande, ya que en la localidad la mayor parte del suelo se encuentra con cierto grado de perturbación por el empleo de fertilizantes así como la introducción de productos como arena, madera, entre otros materiales; para dar al suelo una mejor consistencia. En esta superficie se marcaron cinco puntos de muestreo en zig – zag, según se muestra en la figura 7.3 (Rodríguez y Rodríguez, 2002).

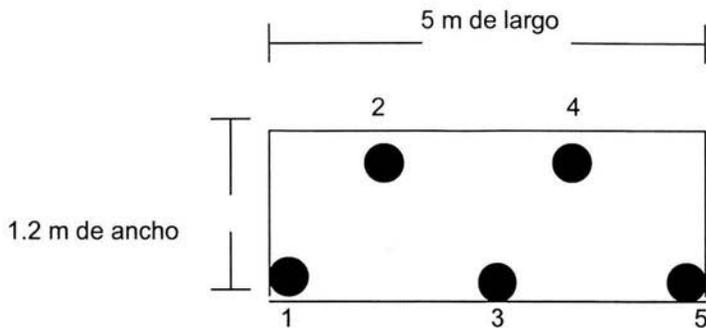


Figura 7.3. Representación de la distribución del muestreo de suelo en Tabasco

En cada punto se retiró la capa superficial de vegetación existente, tomando 1 Kg de muestra a 15 cm de profundidad, (figura 7.4.). La muestra se tomó a esta profundidad debido a que corresponde a la zona de la rizosfera, formada por el perfil A del suelo, en donde se encuentra la mayor actividad microbiana por ser el área en donde se deposita la mayor cantidad de materia orgánica. En esta área es donde usualmente se encuentran la mayor cantidad de ciliados. En el sitio se midió de manera inmediata la temperatura y el pH, de cada una de las muestras



Figura 7.4. Imagen del muestreo de suelo *in situ*. Municipio de Cunduacán, Tabasco.

Las muestras fueron debidamente etiquetadas y transportadas al laboratorio de Microbiología Experimental en donde se procedió a procesarlas para obtener una submuestra representativa. Lo anterior se logró mediante la molienda de las muestras por separado. Posteriormente estas fueron pasadas a través de una maya y tamizadas con un tamaño de poro de 2 mm. Las muestras así obtenidas fueron mezcladas hasta su homogeneización a efecto de obtener una muestra compuesta. A una submuestra, obtenida por cuarteo, se le midió pH, textura, porcentaje de humedad, densidad real y aparente, capacidad de campo, contenido de materia orgánica y espacio poroso (Rodríguez y Rodríguez, 2002). Estas características fueron seleccionadas debido a que inciden directamente sobre la presencia o no de los ciliados edafícolas.

7.1.3 EXTRACCIÓN DE CILIADOS

Para la obtención de los ciliados edafícolas se realizó lo indicado por Bamfort (Aleff *et al.*, 1998), la cual básicamente consiste en:

- Poner en una o varias cajas de Petri estériles (10 a 15 cm. de diámetro) una cama de suelo (Figura 7.5).
- Humedecer con agua destilada, sin llegar a la sobresaturación.
- Observar al microscopio óptico, a partir el segundo día, la presencia o no de ciliados en alícuotas de agua procedentes de cada una de las cajas de Petri. A partir del procedimiento descrito se permite el exquistamiento y proliferación de los ciliados presentes, lo anterior debido a que la caja de Petri funciona como un microhábitat cerrado, y por lo tanto se lleva a cabo una sucesión de comunidades



Figura 7.5. Fotografía que muestra la disposición de las cajas con suelo para la obtención de los ciliados.

Una vez que se obtuvieron los ciliados en los microhábitats cerrados, éstos fueron trasladados por micropipeteo a otras cajas de Petri con la finalidad de aislarlos y poder llevar a cabo la eventual identificación de los ciliados de interés que para este estudio resultaron ser los colpódidos. El medio de mantenimiento empleado para los colpódidos consistió en agua corriente, de la llave, en la cual se pone una suspensión de agua con yema de huevo cocido. Una vez inoculada con los colpódidos se mantuvieron en una incubadora a 28°C (Tabla 7.1). De esta manera se logró aislar al ciliado edáficoola *Colpoda cucullus* con el cual se llevaron a cabo los experimentos programados para la segunda etapa experimental. La manipulación de los ciliados se hizo con ayuda de un microscopio estereoscópico (marca Iroscope modelo N3 - 14 con aumentos de 0.7 a 4.5 X, con una lente accesoria de 2X).

Tabla 7.1 Condiciones de mantenimiento de los colpódidos en el laboratorio

Parámetro	Intervalo
Temperatura	28°C
Agua	Corriente (de la llave)
Alimentación	Suspensión de yema de huevo
Fotoperiodo	9 h luz por 15 oscuridad
Aireación	1 h diaria

7.2 Resultados

De la experimentación previa se obtuvieron los siguientes resultados:

Se determinó la presencia de protozoos en la muestra compuesta del suelo de Cunduacán, realizando observaciones durante 26 días, según la metodología descrita en la sección 7.2. Se encontraron 10 especies, de las cuales seis corresponden al grupo de los ciliados, tres al de las amibas y uno al de los flagelados. Una compilación de las imágenes tomadas se encuentran en el anexo 1 de este trabajo. Por otra parte también se realizó la caracterización física y química de la muestra compuesta de suelo la que se describe más adelante.

- Los primeros ciliados en aparecer en los microhábitats cerrados fueron los perteneciente a la clase Colpodea, los cuales constituyen uno de los grupos más ampliamente estudiados. Estos microorganismos son predominantemente edafícolas y presentan múltiples características para ser usados como bioindicadores de calidad del suelo (ver capítulo 5.8); lo cual motivo a que se trabajara con *Colpoda* durante la segunda etapa experimental.

En el caso de los colpódidos obtenidos del suelo de jardín de CU y expuestos a los lixiviados de recorte de perforación estos no presentaron ningún cambio. Después de una observación de más de 30 minutos no se observó ninguna afectación en su estructura o comportamiento. Sin embargo, al exponerlos directamente al IHA-K, los colpódidos murieron de manera inmediata. Lo anterior indica que si bien existe IHA-K en el recorte de perforación empleado, la concentración del mismo resulta insuficiente para ocasionar daños aparentes en los colpódidos. De igual forma, los resultados mostraron que en el suelo del jardín de CU es posible encontrar diferentes especies de colpódidos (figuras 7.7 a 7.8), además de otros protozoos (figura 7.6), esto se evidencia por el diferente número de cinetias que presentan los microorganismos lo que fue comprobado por medio de la impregnación argéntica de Klein.

En este tipo de observaciones y procesamiento de muestras se consigue lograr el objetivo planteado al inicio de esta fase, la cual consistía en llevar a cabo el correcto manejo de las muestras de suelo y procesamiento de muestras con ciliados para su posterior identificación. Lo anterior en conjunto resulta de gran utilidad para el buen desarrollo de las siguientes etapas experimentales.

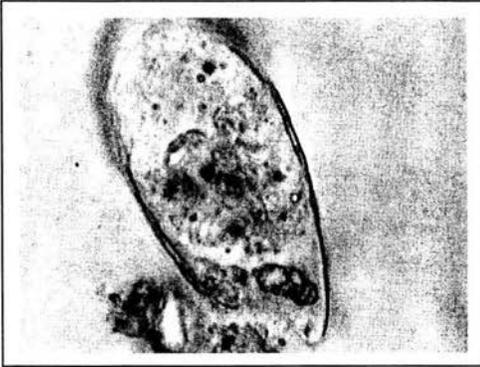


Figura 7.6. Microfotografía de una ameba testada encontrada en la muestra de suelo de CU (en vivo, 20X campo claro)

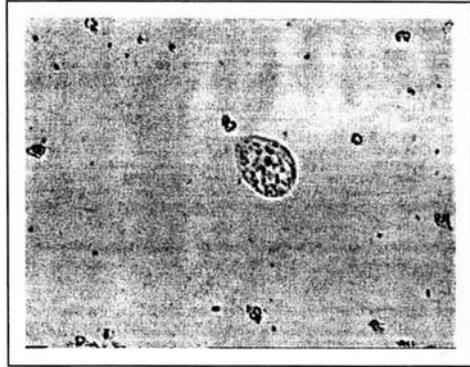


Figura 7.7. Microfotografía de *Colpoda steinii* encontrado en el suelo de CU (en vivo, campo claro 20X)

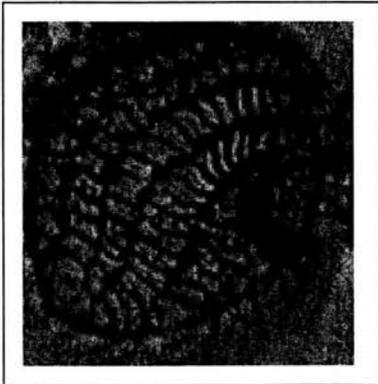


Figura 7.8. A. Microfotografía *Colpoda steinii* encontrado en la muestra de suelo de CU. Impregnación argéntica de Klein campo claro 40X

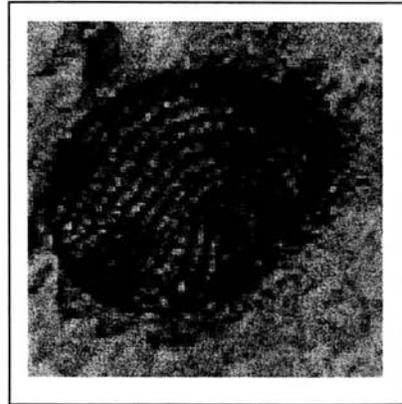


Figura 7.8. B. Microfotografía de *Colpoda inflata* encontrado en la muestra de suelo de CU. Impregnación argéntica de Klein campo claro 20X

7.2.1 Caracterización física y química del suelo de Tabasco

Una vez elaborada la muestra compuesta del suelo a analizar, se efectuó por duplicado su caracterización física, química y ciliatológica. De acuerdo con los resultados obtenidos el suelo presentó un pH cercano a la neutralidad, con un valor de 7.4, una temperatura (medida "in situ") de 30°C, una textura arcillo-arenosa que indica que posee arenas que tienden a aumentar el espacio poroso, entre las partículas del suelo, facilitando de esta manera el paso del aire y del agua. A su vez la presencia de las arcillas indican que este suelo presenta una gran capacidad de retención de agua, contra la fuerza de gravedad, lo cual es un factor de importancia para la presencia de los ciliados; los que dependen de las películas de agua para sobrevivir. Otro parámetro relevante fue el espacio poroso, ya que en el suelo estos poros se encuentran llenos de agua y aire, el suelo trabajado presentó un espacio poroso de 11.77%. Al relacionar este parámetro con la textura del suelo se determina que este tiene una alta capacidad de retención de agua. La presencia de las arcillas hacen que se tengan espacios porosos pequeños por lo que es posible la retención del agua en los espacios capilares del suelo. La capacidad de campo del suelo estudiado resulto de 750 mL/ Kg de suelo.

En la Tabla 7.2 se presentan los datos obtenidos de los análisis físicos y químicos del suelo. Al respecto, se puede resaltar el parámetro de materia orgánica, el cual es de gran importancia ya que interviene en la regulación del pH y aporta al suelo nutrientes como son el nitrógeno, fósforo, azufre, entre otros. En este caso específico se encontró que este suelo presenta un porcentaje de materia orgánica de 5.11%, valor reportado en la literatura como medio – alto, ya que en las zonas tropicales la cantidad de materia orgánica no suele ser muy elevada (Aguilera, 1989).

Tabla 7.2 Datos obtenidos de la caracterización de la muestra compuesta del suelo de Tabasco

Parámetro	Valor
pH (unidades)	7.4
Temperatura "in situ" (°C)	30
Materia orgánica (%)	5.11
Porcentaje de humedad (%)	1.195
Textura	Arcillo – arenosa
Densidad real (g/mL)	1.12
Densidad aparente (g/mL)	0.99
Espacio poroso (%)	11.77
Capacidad de campo (mL/ Kg. de Suelo)	750

7.2.2 Análisis ciliatológico

Para realizar el análisis ciliatológico se procedió a poner, en cajas de Petri, 30 gramos de suelo, siguiendo la metodología mencionada en el inciso 7.1.3. De estas observaciones también se obtuvieron microfotografías y un video de los organismos encontrados. Las observaciones realizadas a lo largo de los 26 días de observación de las muestras, arrojaron la presencia de los géneros indicados en el tabla 7.3. Los cuales se ilustran en el anexo 1.

Tabla 7.3 Géneros de ciliados encontrados en la muestra de suelo de Tabasco.

Ciliado	Comentario
<i>Blepharisma</i>	Raro
<i>Colpoda</i>	Poco abundante
<i>Dileptus</i>	Raro
<i>Oxytricha</i>	Raro
<i>Vorticella</i>	Poco abundante

Se encontraron además algunos otros protozoos como flagelados, amibas testadas y desnudas, heliozoos y algunos micrometazoos tales como rotíferos y gastrotricos. Sólo en un par de ocasiones se observaron nemátodos. Sin embargo, como se puede apreciar en la tabla anterior, en el suelo analizado no se encontró ni gran abundancia ni diversidad de ciliados. Prácticamente en todas las cajas observadas se encontraron la misma baja abundancia y diversidad. Al aumentar la temperatura de 28°C a 32°C, se observó una disminución en la abundancia pero no en la diversidad de ciliados. Una vez terminadas las observaciones de las diferentes cajas con suelo, se procedió al aislamiento de los colpódidos seleccionados para la segunda etapa experimental. En las microfotografías de la figura 7.9, se aprecia el organismo cultivado en el laboratorio empleando la impregnación argéntica de Klein. La imagen permite observar el número de cinetias que presenta este microorganismo, las cuales son importantes para su identificación. Adicionalmente, empleando un equipo de videograbación integrado a un microscopio óptico marca Iroscope equipado con cámara e impresora digital marca - color printer y videogradora, fue posible observar y grabar el proceso de reproducción asexual del organismo cultivado. A continuación se presentan algunas tomas microfotográficas tanto de las impregnaciones de Klein, como de la secuencia de reproducción del microorganismo cultivado (figura 7.9 -7.10).

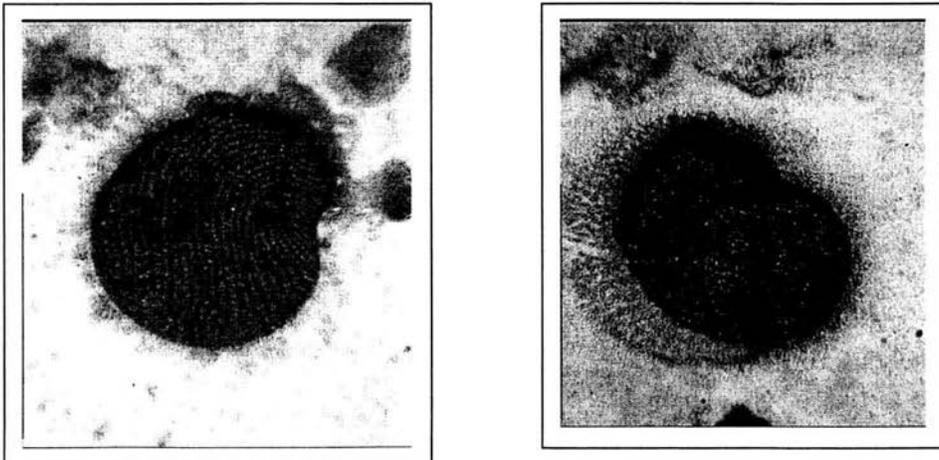


Figura 7.9 Microfotografía del colpódido extraído del suelo de Tabasco, impregnación de Klein
(Campo claro 100X)

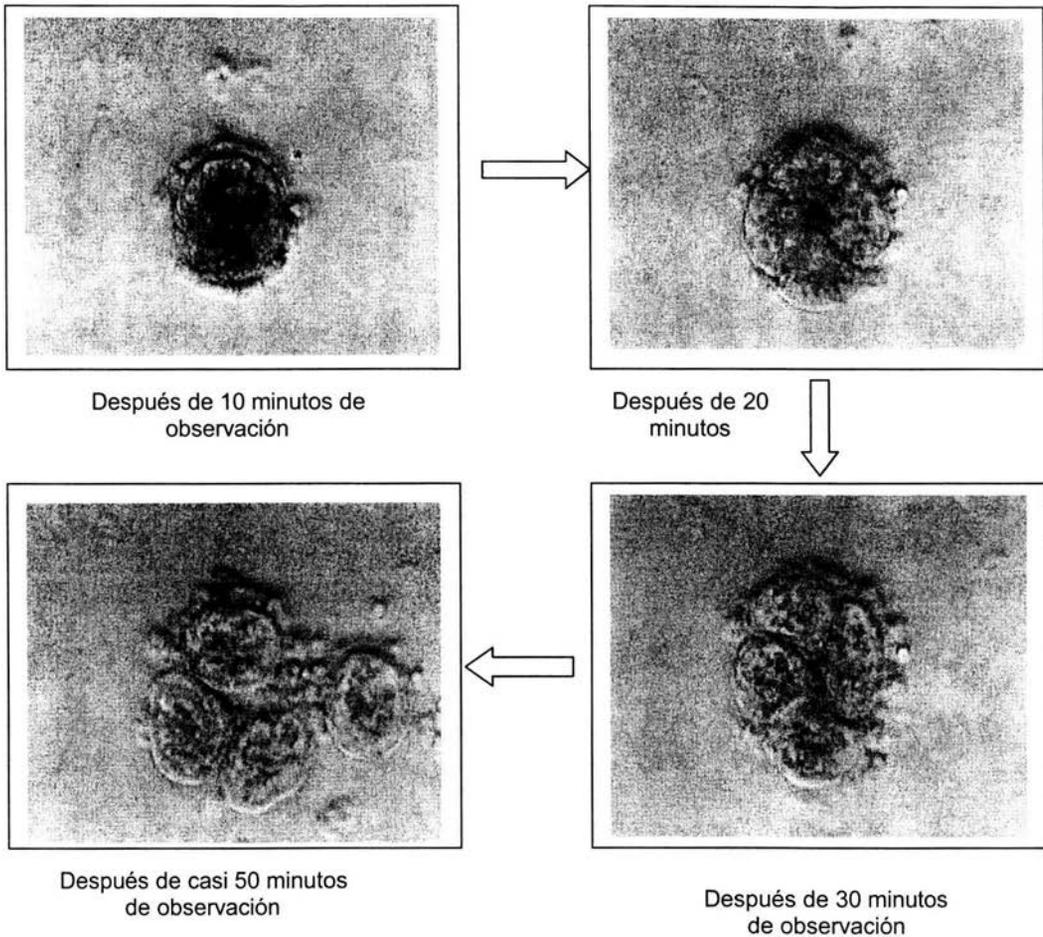


Figura 7.10. Secuencia de reproducción asexual del ciliado cultivado en el laboratorio.

De lo anterior fue posible establecer que el organismo cultivado presenta una reproducción asexual múltiple, dentro del quiste, dando lugar a cuatro individuos de un menor tamaño, esta secuencia reproductiva también fue de utilidad para la identificación del ciliado.

Una vez separados los organismos se tomaron tres de estos con la finalidad de establecer el tiempo de duplicación mediante cuenta directa. A las 21 horas de cultivo se contó un total de

12 organismos. A las siguientes 21 horas, se realizó nuevamente la cuenta y así se hicieron tres cuentas más en intervalos de 21 hrs. sucesivamente hasta las 72 horas.

En la figura 7.11 se grafican los resultados obtenidos en escala aritmética, pudiéndose apreciar el crecimiento gradual (exponencial) de la población después de 72 horas de observación. A partir de los datos obtenidos se pudo establecer que el tiempo de duplicación es de siete horas. Este dato es útil como referencia para establecer el tiempo máximo de prueba para los ensayos de toxicidad aguda, ya que no interferiría con la cuenta de organismos muertos o sobrevivientes.

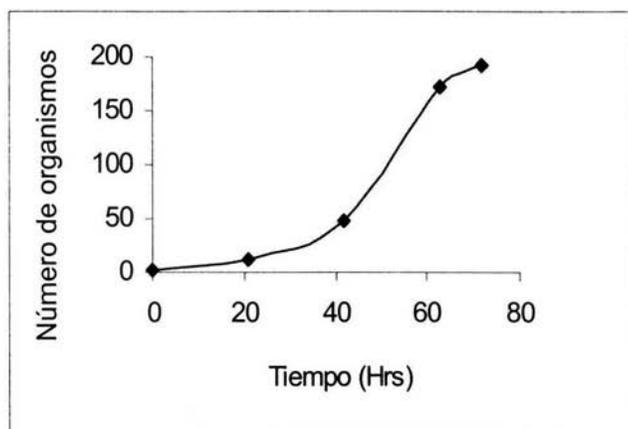


Figura 7.11. Curva de crecimiento del ciliado *Colpoda cucullus* cultivado en el laboratorio

Para la correcta identificación del ciliado se realizaron mediciones del organismo vivo y teñido, determinándose que mide $65.1 \mu\text{m}$ de largo por $37.2 \mu\text{m}$ de anchura. Presenta un número de cinetias que oscilan entre 26 a 35. También fueron observadas las vacuolas alimenticias características y numerosas para esta especie. Las características anteriores de acuerdo con la literatura especializada, corresponden al ciliado edáficoola *Colpoda cucullus*. La identificación se vio comprobada al constatar la existencia de división múltiple durante la reproducción asexual observada. En la figura 7.12, se presentan algunos esquemas del

ciliado *Colpoda cucullus* en los que es posible apreciar el número de cinetias, así como también la reproducción asexual dentro del quiste.

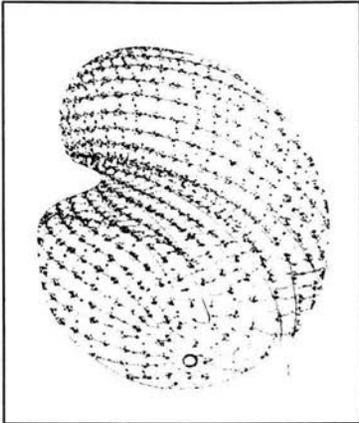


Figura 7.12. A) Esquema de *Colpoda cucullus* en estado trófico (Tomado de Foissner 1993).

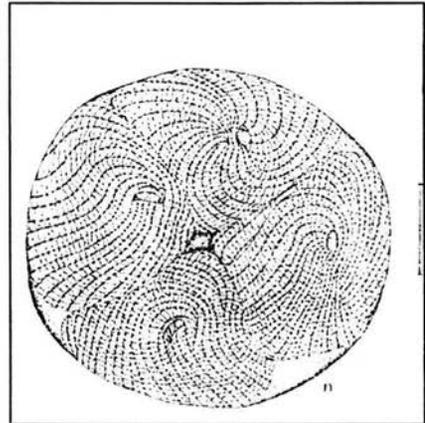


Figura 7.12. B) Esquema de quiste de *Colpoda cucullus* en división mostrando los característicos cuatro tomitos (Tomado de Foissner 1993).

Para complementar la observación del ciliado *Colpoda cucullus* se realizó la aplicación de técnicas de microscopía electrónica de barrido, una de cuyas imágenes se presenta en la figura 7.13.

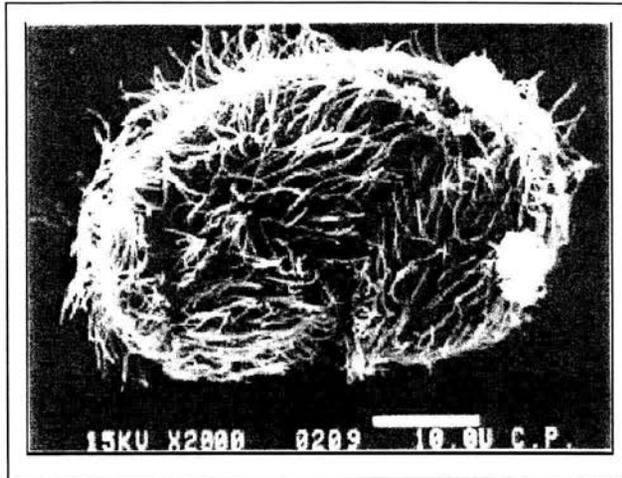


Figura 7.13. Micrografía electrónica de barrido de *Colpoda cucullus* (cultivado en el laboratorio y extraído de la muestra de suelo de Tabasco).

De esta primera parte experimental se concluyó que:

- Los primeros microorganismos edáficos en aparecer en los microhábitats cerrados, después de las bacterias, fueron los pertenecientes al ciliado *Colpoda cucullus*.
- Los lixiviados de recorte de perforación al que fueron expuestos estos microorganismos no causaron un daño inmediato evidente.
- El IHA-K, empleado por PEMEX en los fluidos de perforación resultó ser letal para estos ciliados.
- Las técnicas empleadas para la obtención y aislamiento de estos microorganismos fueron las adecuadas para el desarrollo de la siguiente etapa experimental.
- Se logró el aislamiento y cultivo en el laboratorio del ciliado edáfico *Colpoda cucullus*, con el cual se procederá a la segunda etapa experimental.

8. Segunda etapa experimental

La segunda etapa experimental se realizó con base en los resultados obtenidos en la primera etapa, misma que se enfocó a determinar el nivel de toxicidad provocado por la exposición de recorte de perforación en la comunidad de protozoos y del IHA-K en poblaciones controladas de *Colpoda cucullus*, la cual se describe a continuación.

8.1 Metodología Experimental

8.1.2 Pruebas de tolerancia y toxicidad

Empleando recorte de perforación

Para la realización de las pruebas de sobrevivencia de los protozoos, encontrados en el suelo de Cunduacán, se procedió a poner en cajas de Petri diferentes proporciones de suelo limpio: recorte de perforación (1:1; 1:2; 1:3 y 1:4). De esta manera se pudo eliminar por completo el suelo hasta quedar sólo con el recorte de perforación. A estas diferentes cajas se les hizo un seguimiento por 21 días observando alícuotas al microscopio estereoscópico y óptico para corroborar la presencia o no de microorganismos.

Pruebas empleando IHA-K

Para llevar a cabo las pruebas de tolerancia y de toxicidad con los individuos de *Colpoda cucullus*, seleccionados, se colocaron en una caja de Petri, de aproximadamente un centímetro de diámetro, 10 organismos manejándose tres cajas de prueba y una como testigo, manipulándose un total de 60 organismos por cada experimento realizado.

Durante las pruebas de tolerancia al lixiviado de recorte de perforación, se realizó una dilución que fue de 1 en 10, ya que este lixiviado fue obtenido de un recorte de perforación que estaba formado por suelo compacto. Mientras que para realizar las pruebas de toxicidad

se utilizó al 100% el IHA-K y a diluciones de 50, 25 12.5 y 6.5% (figura 8.1). Al igual que en la experimentación anterior, se colocaron tres cajas para evaluar cada concentración de contaminante y su respectivo testigo, todas las cajas con igual número de organismos de prueba.

Los organismos expuestos a las diferentes concentraciones tanto de lixiviado de recorte de perforación como de IHA-K, fueron contados de manera directa, utilizando el microscopio estereoscópico figura 8.2.

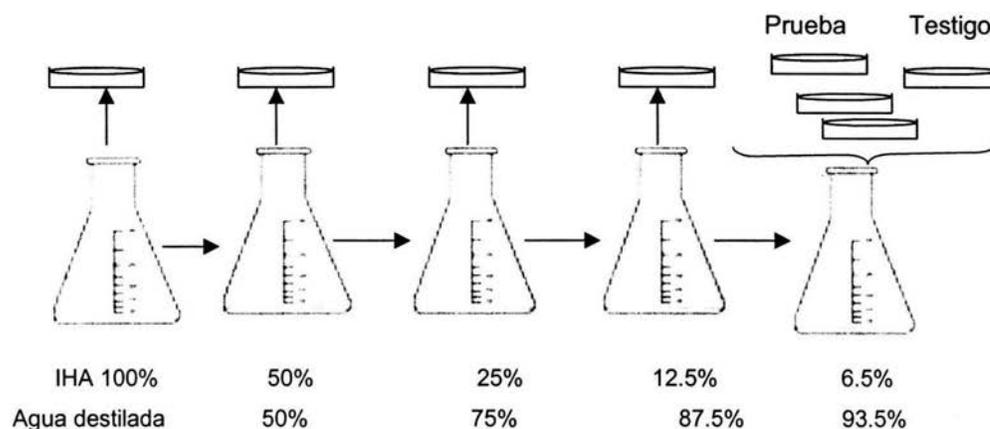


Figura 8.1. Esquema de las diluciones del IHA empleadas en el experimento con IHA - K.

Las características que se manejaron en cada prueba experimental fueron las siguientes:

- | | |
|--|--------|
| - Recipientes de prueba (número de repeticiones) | 3 |
| - Recipiente testigo experimental | 3 |
| - Número de organismos expuestos por recipiente | 10 |
| - Cantidad de IHA y lixiviado adicionado | 0.1 mL |
| - Tiempo de observación, cada 5 minutos hasta | 1 hora |

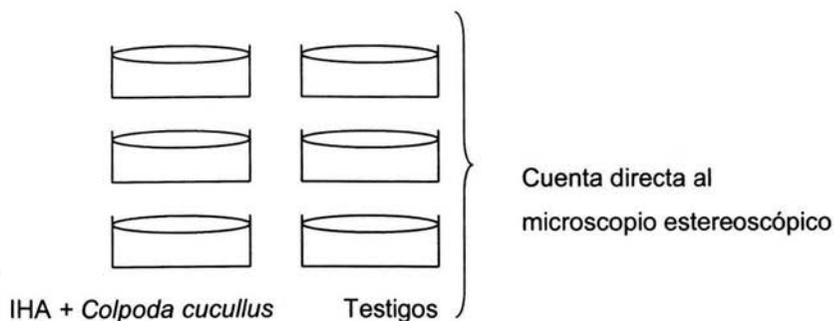


Figura 8.2. Ejemplo de la disposición de las cajas conteniendo al ciliado edafícola *Colpoda cucullus* al ser expuesto a las diferentes concentraciones de contaminantes evaluados

8.2. Pruebas para *Colpoda cucullus* empleando un tóxico de referencia

Para tener datos de respuesta poblacional reproducible (lote de microorganismos de prueba con respuesta conocida) controlada se realizó una prueba de exposición a dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) como tóxico de referencia, llevándose a cabo la exposición y cuenta de la manera antes descrita, (sección 8.1.2). Se manejaron diferentes concentraciones a efecto de determinar la CL_{50} para *Colpoda cucullus*. Las concentraciones utilizadas fueron 15, 20, 25, 30, 35 y 45 mg/L. Lo anterior tomando como base que para otro ciliado (*Colpoda inflata*) la CL_{50} , para el mismo compuesto es de una concentración de 15 mg/L (APHA, 1998).

Por otra parte, se realizaron pruebas de recuperación del IHA-K. Para ello se procedió a incorporar el contaminante problema (IHA-K) a una muestra de 5 g de suelo, con la finalidad de obtener el dato del lavado total de la porción hidrosoluble de este contaminante. La determinación se hizo mediante la prueba de DQO del lixiviado obtenido al lavar el suelo contaminado. Esta prueba se realizó de la siguiente manera: una muestra de suelo de 5 gramos fue depositada en un embudo y contaminada con el IHA-K, hasta llegar a la saturación del suelo. El volumen requerido fue 3.7 mL de IHA-K. Posteriormente, se procedió a realizar una serie de lavados con agua destilada. Lo anterior

se hizo agregando 10 mL de agua destilada al suelo conteniendo el IHA-K para obtener el lixiviado que contenía la parte hidrosoluble del IHA-K. Al lixiviado obtenido se le realizaron pruebas de DQO, para determinar la concentración de materia orgánica que contenía. En la figura 8.3 se observa el dispositivo experimental empleado para la obtención de estos lixiviados.

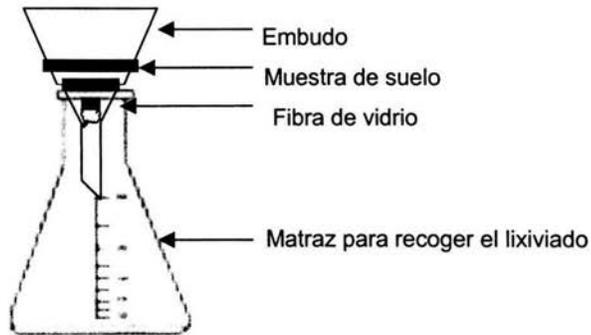


Figura 8.3. Esquema del dispositivo empleado para las pruebas de recuperación del IHA.

8.3. Recuperación del IHA

De las pruebas de recuperación de IHA practicadas (figura 8.4), se obtuvo que la mayor parte de los compuestos hidrosolubles en agua se obtienen al realizar un primer lavado, con 10 mL de agua destilada, del suelo contaminado. Este primer lixiviado presentó una DQO de 236, 800 mg O_2/L , fue el valor más alto que se registro. En los lavados subsecuentes, este valor disminuyó gradualmente hasta llegar a una concentración de 35,200 mg O_2/L como DQO total, mientras que como DQO soluble fue de 19,200 mg O_2/L . Este último valor fue también obtenido para el testigo (suelo limpio procedente de Cunduacán, Tabasco). Cabe señalar que con la adición de los primeros 20 mL de agua destilada es posible obtener casi en su totalidad la fracción hidrosoluble del IHA-K, en términos de DQO soluble del lixiviado, la cual es de un valor de 19 200 mg O_2/L . Por este motivo, se considera que después de lavar el suelo con los primeros 20 mL de agua,

empieza el arrastre de las fracciones de materia orgánica hidrosoluble que contiene el suelo como tal.

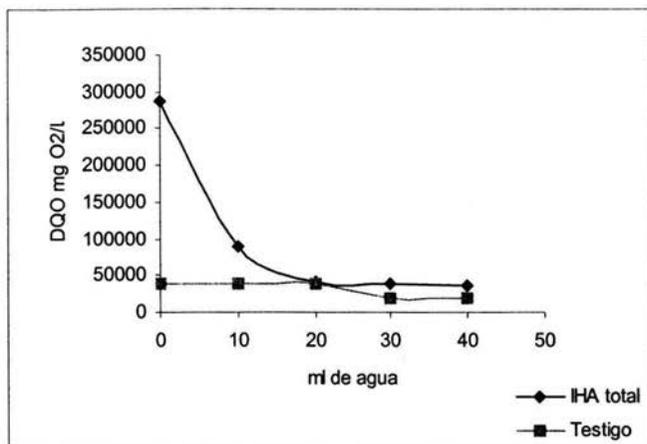


Figura 8.4. Gráfica de recuperación, en términos de DQO total del lixiviado de IHA al contaminar una muestra de suelo.

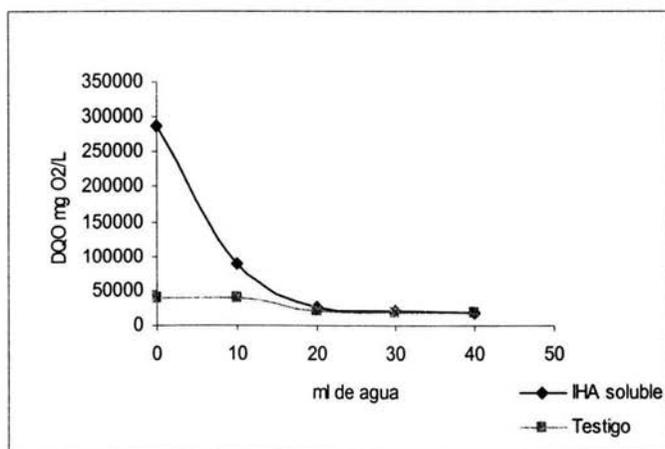


Figura 8.5. Gráfica de recuperación, en términos de DQO soluble del lixiviado del IHA al contaminar una muestra de suelo.

8.4 Resultados y Discusión

8.4.1 Sobrevivencia de la comunidad de ciliados expuestos a recorte de perforación

De la contaminación del suelo limpio, procedente de Tabasco, con recorte de perforación en diferentes proporciones para la observación de los posibles cambios que se presentaran en la comunidad de ciliados se obtuvieron los siguientes resultados: En la caja 1, conteniendo una proporción 1:1 (suelo: recorte) se encontró que los ciliados aumentaron en número, pero las especies fueron las mismas a las ya observadas (figura 8.6). El aumento en el número de organismos probablemente se debió a que con el recorte de perforación se propicio la presencia de un mayor número de bacterias, mismas que no fueron contadas debido a que no era el objetivo del presente trabajo. De igual forma se observó que después de los flagelados, los ciliados hipotricos fueron los que se encontraron en mayor número, seguido por *Colpoda cucullus*. Los microorganismos menos abundantes fueron las amibas.

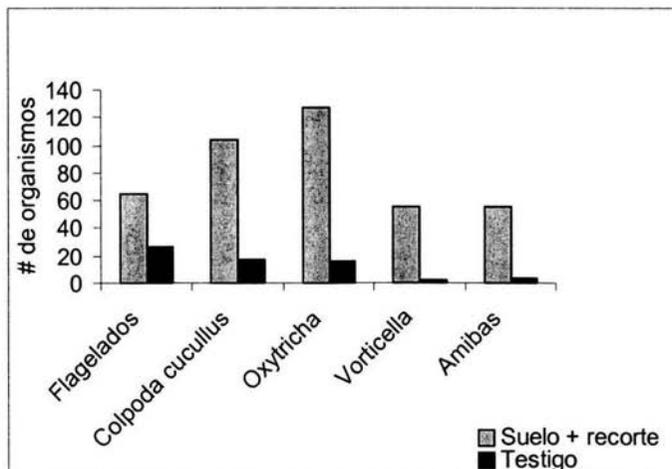


Figura 8.6 Grupos de organismos y número en que fueron encontrados en la caja con suelo más recorte de perforación en proporción 1:1

En la caja 2, con una relación 1:2 (suelo: recorte), se realizó el seguimiento por 21 días para observar y registrar los posibles cambios en la comunidad (figura 8.7). Con el aumento del recorte en esta segunda caja los microorganismos tardaron seis días en exquistarse, apareciendo los primeros organismos hasta el séptimo día. En esta caja se percibía, un fuerte olor a hidrocarburos y el agua tenía una apariencia de color pardo rojizo oscuro. Los resultados indican que para estas nuevas condiciones de prueba, los ciliados más abundantes fueron los pertenecientes a *Colpoda cucullus*. Su presencia permite inferir que estos ciliados aparentemente se adaptan mejor. Posteriormente se presentaron los peritricos, observándose una disminución de los otros ciliados.

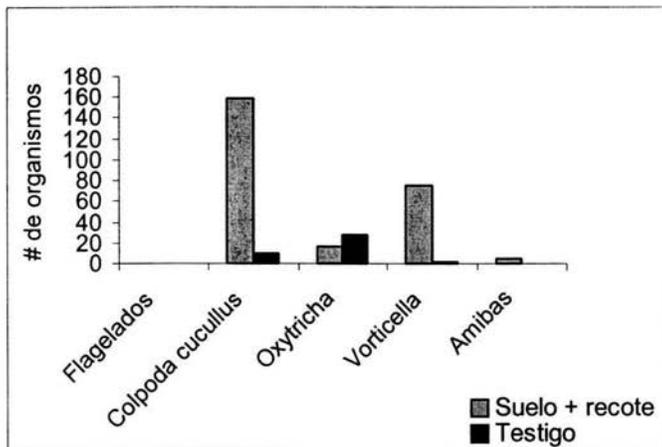


Figura 8.7. Grupos de organismos y número en que fueron encontrados en la caja con suelo más recorte de perforación en proporción 1:2

En la caja Petri con una proporción 1:3 (suelo: recorte). Se encontró que algunos protozoos tardaron ocho días en exquistarse. Esto pudo deberse a que las bacterias tardaron más tiempo en empezar a proliferar. Cabe señalar que en este experimento los flagelados y las amibas no fueron muy evidentes. Los individuos de *Colpoda* y los hipotricos disminuyeron en número, respecto de los observados en la proporción 1:2 (suelo: recorte), siendo los peritricos los más abundantes en estas condiciones (figura 8.8).

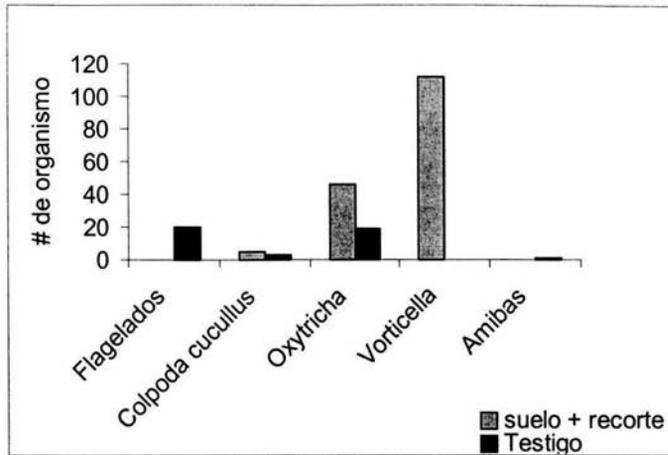


Figura 8.8. Grupos de organismos y número en que fueron encontrados en la caja con suelo más recorte de perforación en proporción 1:3

En la caja 4, la cual sólo contenía recorte de perforación, y procediéndose de la misma manera, se encontró que la muestra presentaba un color pardo rojizo oscuro del cual se desprendía un fuerte olor a hidrocarburos. Al inicio solamente se observó la presencia de una gran cantidad de bacterias y después de varios días (más de 8) se empezaron a encontrar los primeros ciliados. Los ciliados más abundantes fueron *Colpoda cucullus*, seguidos por el hipotrico *Oxytricha*. Es importante hacer notar que no se observaron flagelados, peritricos y amibas, lo que hace suponer que estos tres grupos son más susceptibles al incremento de los contaminantes presentes en los recortes de perforación. Asimismo, puede suponerse que los quistes de estos ciliados no sobrevivieron y por tanto su ausencia como formas tróficas. Del mismo modo, estos últimos resultados junto con las observaciones anteriores permiten inferir que la presencia de ciliados tróficamente activos obedeció a la combinación, tanto de menor presencia de contaminantes como a la pre-existencia de formas viables en el suelo adicionado al recorte.

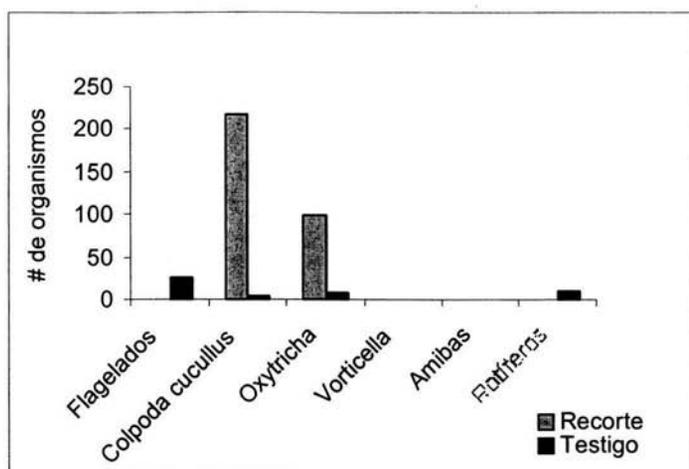


Figura 8.9. Grupos de organismos y número en que fueron encontrados en la caja con recorte de perforación.

Es importante mencionar que en algunas ocasiones y en las diferentes cajas testigo fue posible encontrar algunos rotíferos en bajas cantidades. En las cajas empleadas como testigos de referencia, muchos de los microorganismos no se observaron, tal es el caso de hipotricos y peritricos, o bien, se encontraban en un número muy reducido. Al parecer su poca abundancia se debe a que este tipo de suelo presentaba una cantidad pobre de bacterias, lo que resultaba insuficiente para mantener una mayor abundancia de ciliados los cuales se alimentan directamente de las mismas. La presencia de mayor número de bacterias en el suelo conteniendo recorte de perforación, está estrechamente asociada a la existencia en el mismo de materia orgánica y nutrientes propios de la composición de los aditivos contenidos en el recorte de perforación y que sirvieron de sustrato a las bacterias.

A continuación se muestra una gráfica (Figura 8.10) comparativa en la que se presentan las cuatro cajas manejadas para este experimento y en donde se observa con una mayor claridad que algunos de los grupos de microorganismos desaparecieron con el aumento del recorte de perforación.

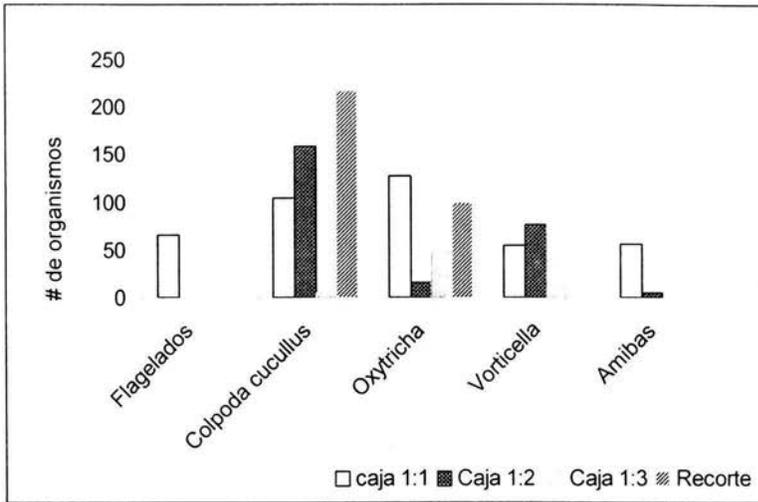


Figura 8.10. Gráfica e la que se observa la desaparición de algunos grupos de organismos conforma aumenta le recorte de perforación en el suelo

Así en la figura 8.10 es posible apreciar que en la caja que contiene solo recorte desaparecieron flagelados, vorticelas y amibas sobreviviendo sólo *Colpoda cucullus* y el hipotrico *Oxytricha*

8.4.2 Tóxico de referencia

Como tóxico de referencia se utilizó el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), el cual es un compuesto ampliamente utilizado para ese fin en pruebas de toxicidad y también es el utilizado en pruebas de toxicidad con *Colpoda inflata* (APHA,1998), el cual inhibe su crecimiento a una concentración de 15 mg/L. Adicionalmente, el dicromato de potasio tiene una vida de anaquel relativamente larga y estable, lo que facilita su empleo. Debido a que para *C. cucullus* no se conocía la CL_{50} para este compuesto, se evaluaron concentraciones crecientes de 5 en 5 mg/L, empezando desde 15 mg/L hasta llegar a una concentración de 45 mg/L. Los datos obtenidos fueron debidamente procesados según lo indicado en la Norma Mexicana NMX-AA-087-1995-SCFI. Mediante el análisis **probit** de los promedios

para la CL_{50} , la cual correspondió a una concentración de **22.89 mg/L**. Las tablas conteniendo los resultados obtenidos del análisis probit se muestran en el Anexo 2. Como se puede observar el resultado de R^2 es bajo, no obstante para efectos de referencia resulta de utilidad.

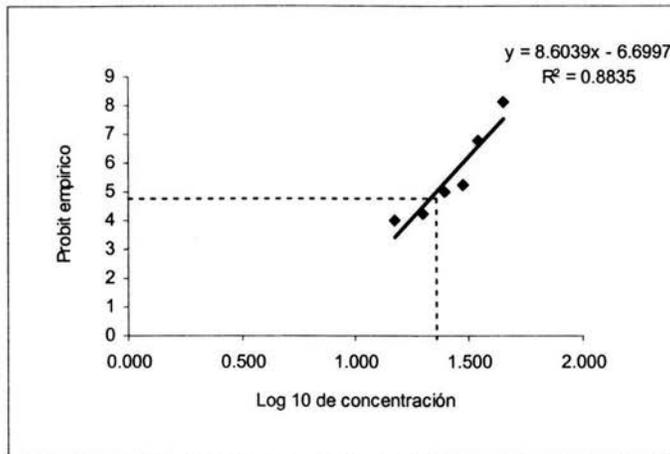


Figura 8.11. Gráfica obtenida del análisis probit para el tóxico de referencia $K_2Cr_2O_7$ usado en este trabajo.

8.4.3 Pruebas de sobrevivencia de *Colpoda cucullus* con Lixiviado de Recorte de Perforación (LRP) e IHA-K.

Para llevar a cabo estas pruebas se manejaron diferentes concentraciones, empezando con las más elevadas tanto para el lixiviado de recorte de perforación, como para el IHA-K, en este caso como no se tenían referencia específicas de los componentes que forman el IHA-K se manejaron concentraciones logarítmicas que fueron desde el 100 hasta el 6.5%, obtenidas como se muestra en la figura 8.1 de la metodología experimental.

En las gráficas 8.12 a 8.17, se observan los resultados obtenidos de la exposición de *Colpoda cucullus* a las diferentes concentraciones del LRP y de IHA-K.

Con el LRP se encontró que *Colpoda cucullus* no presenta mortandad, por lo que se considero que el IHA-K contenido en dichos recortes se encuentra en una concentración igual o por debajo de la establecida para la CL₅₀. En la grafica 8.12 se puede observar que con el lixiviado de recorte de perforación se pierde sólo un organismo y esto ocurre hasta después de los primeros 30 minutos de observación, terminando después de una hora de exposición con un total de nueve organismos. Los resultados obtenidos demuestran que para las condiciones de prueba el LRP no es un tóxico agudo letal para esta especie.

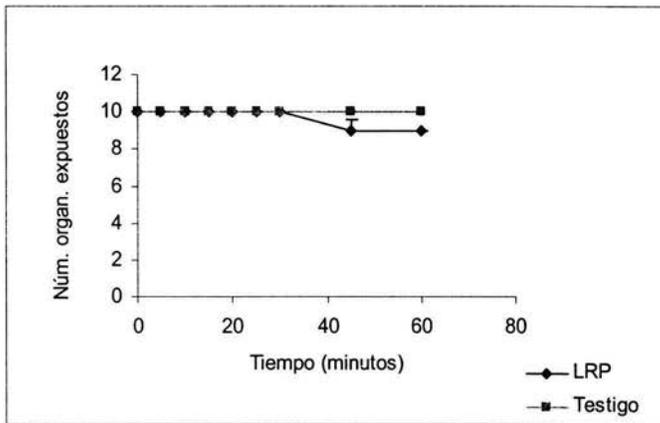


Figura 8.12 Respuesta de *Colpoda cucullus* al ser expuesto a LRP.

Como siguiente etapa experimental se determinó la sobrevivencia de *Colpoda cucullus* al exponerlo a diferentes concentraciones de IHA-K.

De la exposición de *Colpoda cucullus* al IHA-K a una concentración del 100%, se observó que los 10 individuos mueren durante los primeros cinco minutos de estar en contacto con el contaminante (figura 8.13).

A la concentración de 50% se encontró, de igual manera, que los organismos, siguen presentado una alta sensibilidad a la presencia de IHA-K ya que también se observó la mortandad total de los ciliados de prueba. De igual manera se observó mortandad total a las concentraciones de 25 y 12.5%. Lo anterior indica que *Colpoda cucullus* presenta una

gran sensibilidad a la presencia de esas concentraciones de IHA-K (figuras 8.14, 8.15 y 8.16).

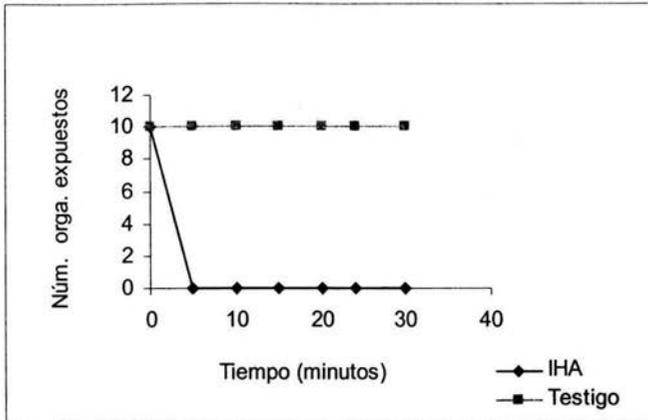


Figura 8.13. Exposición de *Colpoda cucullus* al IHA [100%]

En todas las observaciones realizadas los microorganismos murieron de manera casi inmediata observándose en algunas ocasiones la lisis de las células (en el anexo 3 se muestran las tablas con los resultados de las cuentas realizadas).

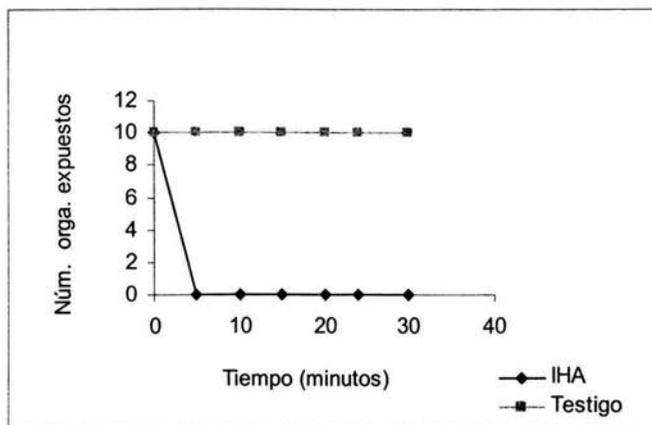
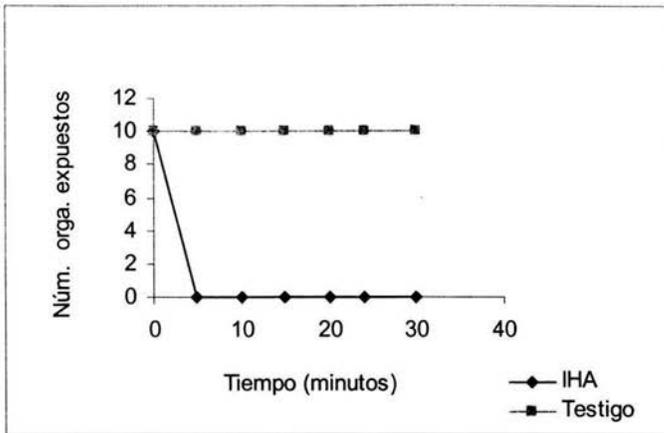
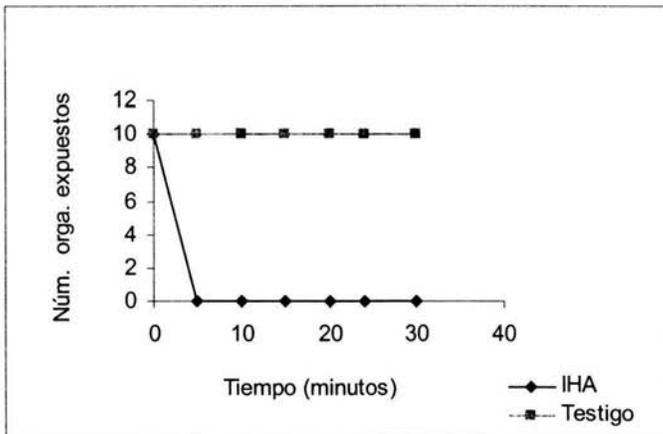


Figura 8.14. Exposición de *Colpoda cucullus* al IHA [50%]

Figura 8.15. Exposición de *Colpoda cucullus* al IHA [25%]Figura 8.16. Exposición de *Colpoda cucullus* al IHA [12.5%]

Se encontró que con el IHA a una concentración de 6.5% se tiene la LC_{50} de este contaminante, ya que después del tiempo total establecido para la observación y cuenta, que fue de 1 h se encontraron cinco individuos, que si eran regresados al medio de cultivo se desarrollaban de manera normal. En la figura 8.17 se muestra los resultados obtenidos

de estos cuencos donde se observa que después de 20 minutos de exposición continúan vivos cinco organismos hasta el fin del tiempo de observación.

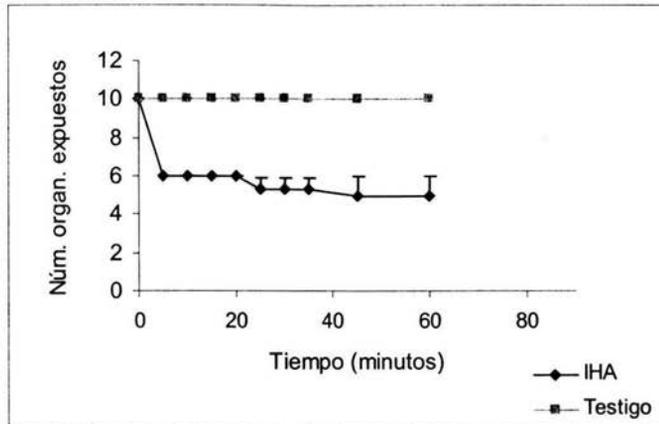


Figura 8.17. Gráfica en la que se observa la disminución del número de *Colpoda cucullus* al ser expuestos a IHA [6.5%]

Los resultados obtenidos indican que el IHA-K, es un contaminante altamente tóxico para *Colpoda cucullus* presentando una CL_{50} a una concentración de 6.5% con a un valor de DQO de 15 392 mg O_2/L , lo que corresponde a un valor en unidades de toxicidad de 4.36.

En general se encontró que los recortes de perforación, como tales, no causan daño al suelo ni a los microorganismos al ser depositados sin un tratamiento previo, que no se deriva más allá de la recuperación del IHA-K, sin embargo, se encontró que si estos recortes se depositan en exceso en una porción de suelo los microorganismos tales como los protozoos si se ven afectados por el incremento de los contaminantes contenidos en los recortes, mientras que las bacterias se ven beneficiadas; una vez que se encuentran adaptadas pueden degradar los contaminantes que se encuentran en los recortes ya que trabajos previos demostraron que estos microorganismos pueden degradar el IHA-K y los hidrocarburos que se encuentren presentes en el suelo por la disposición de los recortes de perforación (Lilly, 2002).

Por otro lado, se encontró que el IHA-K, si presenta propiamente un gran riesgo de contaminación para el suelo, no sólo por la afectación que causa a microorganismos como los protozoos, si no también porque éste es un compuesto que al presentar una fracción fácilmente hidrosoluble es arrastrado a los mantos freáticos con una gran rapidez y con muy poca agua, lo que ocasiona en consecuencia no solo contaminación del suelo sino también de los mantos freáticos. Asimismo, teniendo en consideración que el suelo en donde probablemente serán depositados los recortes de perforación presenta una estructura que permite la rápida infiltración del agua (por la gran cantidad de espacios porosos que posee así como por su textura), se hace necesario enfatizar que dichos recortes no deben depositarse en cantidades que causen daño a los microorganismos presentes en el suelo o que por arrastre puedan contaminar los mantos freáticos o corrientes de agua superficiales.

De los microorganismos que se eligieron para la realización de este trabajo se llegó a establecer que los protozoos ciliados son uno de los grupos más abundantes que se encuentra en el suelo además de presentar una rápida respuesta a los cambios ambientales provocados por estrés antropogénico (Bamforth, 2001) aunque en el suelo trabajado no se encontró gran abundancia de microorganismos. De igual forma, fue posible establecer las mejores condiciones de cultivo y mantenimiento en el laboratorio para el ciliado edáfico *Colpoda cucullus* como microorganismo de prueba para la realización de ensayos de toxicidad aguda proporcionando una rápida respuesta al ser expuesto a los contaminantes. Esta especie presenta algunas ventajas, con respecto a otros microorganismos usados para este tipo de pruebas. Por ejemplo, no se requiere la presencia de grandes cantidades de contaminante (dada su alta sensibilidad), solo basta con una pequeña cantidad de suelo e IHA para exponer a los microorganismos y observar el correspondiente efecto. Además, el tiempo en la realización de la prueba es de aproximadamente una hora. También es posible observar los resultados en términos de daños causados a los ciliados, medida como la mortandad de los mismos. Siendo microorganismos eucariontes, es posible que los efectos observados por algún contaminante pueda extrapolarse a organismos superiores, además de que éstos forman parte importante de la trama alimentaria. Por lo anterior es factible que este tipo de

microorganismo sean considerado altamente factible para la evaluación de contaminantes potencialmente tóxicos que se depositen en el suelo. Una ventaja adicional es que al ser organismos autóctonos de las áreas en contacto con los contaminantes a evaluar proporcionan una respuesta que se acerca más a la extrapolación de la respuesta en un hábitat como el de suelo. En este contexto, el ciliado edafícola *Colpoda cucullus* demostró ser un microorganismo sensible al IHA, así como a las altas concentraciones del recorte de perforación. Por este motivo fue posible su empleo como microorganismo de prueba para llevar a cabo los ensayos de toxicidad aguda de IHA y así poder establecer la CL₅₀ de este contaminante, depositado en suelos aledaños a perforación de pozos petroleros terrestres.

9. Conclusiones

De los experimentos realizados en este trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

- Es factible emplear a la comunidad de ciliados edafícolas como indicadores de contaminación por recortes de perforación de pozos de petróleo que contienen IHA. Lo anterior debido a que mientras mayor sea la cantidad de recortes depositados en el suelo, mayor es la disminución del número de protozoos edafícolas, llegando inclusive a ocasionar la desaparición de amibas y flagelados. El inconveniente que presenta su aplicación es la dificultad para la identificación de los diferentes taxa, lo cual obliga la participación de personal especializado en esa área.
- Se determinó que la presencia de recortes de perforación que contienen IHA-K afecta de manera evidente a la comunidad de ciliados edafícolas. Dicho efecto deja de percibirse a partir de que el recorte de perforación se encuentra mezclado en proporciones 3:1 (suelo: recorte).
- El extracto de recorte de perforación tal cual no resultó ser dañino para el ciliado edafícola *Colpoda cucullus*, por lo que se infiere que las concentraciones de IHA-K, que se encuentra presente en estos está a una concentración menor o igual a la determinada como CL_{50} .
- Se evaluó la toxicidad de IHA-K sobre el ciliado edafícola *Colpoda cucullus*, especie autóctona de suelos potencialmente receptores de recortes de perforación. Al respecto, se determinó que resulta letal al 100% y a las concentraciones de, 50, 25 y 12.5%, correspondiendo la CL_{50} a la concentración de 6.5%.

10 Recomendaciones para estudios futuros

- Se recomienda seguir realizando experimentos de toxicidad con *Colpoda cucullus* de tal manera que se pueda llegar a establecer una metodología estandarizada que sirva para la evaluación del nivel de contaminación prevaleciente en un determinado suelo.
- Es importante establecer cultivos axénicos de ciliados o un método de conservación y preservación de los mismos que permita contar con ellos para el desarrollo de estudios continuos.
- Llevar a cabo pruebas de toxicidad que permitan contribuir a reforzar el uso de *C. cucullus* como bioindicador de suelos contaminados.

11. Literatura citada

- Aguilera HN. (1989). Tratado de edafología de México. Laboratorio de investigación de edafología. Depto. de Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. 200 p.
- Al – Shahwani SM. y Horan NJ. (1991). The use of protozoa to indicate in the performance of activated sludge plants. *Water Research*, 25 (6): 633 – 638.
- Aladro – Lubel MA, Martínez MME y Mayén - Estrada R. (1990). Manual de ciliados psamofilos marinos y salobres de México. Cuadernos 9. Instituto de Biología, UNAM. 167 p.
- Aleff K y Nanniper P. (1998). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press. Toronto. 556 p.
- Ambriz RKT. (2001). Estudio fisicoquímico y microbiológico de la degradación aerobia rápida de inhibidores de hidratación de arcillas (IHA) emplead en la formulación de fluidos de perforación. Tesis. Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM. 205 p.
- APHA, AWWA y WEF. (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th edition. Clesceri LS, Greenber AE, Eaton AD, Editors. United States of America. 1033 p.
- Arévalo TME. (1967). Sistemática y morfología de algunas especies de protozoarios edafícolas aislados de un tipo de suelo de ando, del estado de Morelos, México. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. 70 p.
- Bair C. (2001). *Química Ambiental*. Editorial Reverté S. A. México 607 p.
- Bamforth SS. (2001). Proportions of active ciliates in soil. *Biology and Fertil Soils* 33: 197 –203.
- Basurto PC. (1970). Estudio edafológico de tres muestras de andosol forestal con clima templado. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. 50 p.
- Boopathy R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*. 74: 63 – 67.
- Bovee EC. Clase Lobosea Carpenter 1861. En Lee JJ, Hunter HS, Bovee EC. (1985). *An illustrated guide to the protozoa*. Society of protozoologists. Kansas, USA. 158 – 211 p.
- Campbell CD, Warren A, Cameron AM y Hope SJ. (1997). Direct toxicity assessment or two soils amended with sewage sludge contaminated with heavy metals using a protozoan (*Colpoda steinii*) bioassay. *Chemosphera*, 34 (3): 501 – 514.

- Castro OLP y Luna – Pabello VM. (2003). Evaluación de la CL₅₀ de un IHA usado en fluidos de perforación de pozos petroleros empleando ciliados edafícolas. En memorias del IV Congreso de Microbiología Ambiental y II Simposio de Biotecnología. Bogota, Colombia 7 – 9 Mayo.
- Coûteaux MM y Darbyshire FB. (1998). Functional diversity amongst oil protozoa. *Applied Soil Ecology*, 10: 229-237
- Darbyshire JF. (1994). Soil protozoa: Protozoan distribution and adaptation. *CBA international*. 203 p.
- Dive D, Robert S, Angrand E, Bel C, Bonnemain H, Brun L, Demarque Y, Le Du A, El Bouhoti R, Fourmaux MN y Guery L. (1998). A bioassay using the measurement of the growth inhibition of a ciliate protozoan: *Colpidium campylum* Stokes. *Hidrobiología*, 188 / 189: 181 – 188.
- Febure – Chevalier. Clase Heliozoa Haeckel 1866. En Lee JJ, Hunter HS, Bovee EC. (1985). *An illustrated guide to the protozoa*. Society of protozoologists. Kansas, USA. 302 – 317 p.
- Fent K. (2003). Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*, 140 –141: 353 – 365.
- Foissner W. (1993). *Colpodea (Ciliophora) Protozoenbiota*. Vol. 4/4. Gustav Fischer Verlag. New York. 784 p.
- Foissner W. (1999). Soil protozoa a bioindicators: pros and cons, methods, diversity, representative examples. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 74:95-112.
- Galván LS. (2000). Estudio teórico – experimental de la inmigración de arsénico a través de suelos arcillosos. Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental. Facultad de Química, UNAM. 100 p.
- García LM. (2001). Cantidad de bacterias y protozoarios en islas de recursos de un suelo conservado y uno degradado en Zapotitlan de las Salinas, Puebla. Tesis Profesional, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. 65 p.
- Garza V, Badii M y Salas F. (2002). Indicadores de contaminación y bioindicadores. En Internet [www.http.geocitios.publicaciones](http://www.geocitios.publicaciones): Ambiente sin fronteras.
- Guzmán LAG. (2001). Pruebas de biotratibilidad de agua subterránea y suelos contaminados con mezclas de diesel y gasolina. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, UNAM. 60 p.
- Haimii J. (2000). Descomposer animal and biorremediation of soils. *Environmental Pollution*, 107: 233 – 238.

- Holubar P y Grudke T. (2000). Effects of bacterivorous ciliated protozoans on degradation efficiency of a petrochemical activated sludge process. *Water Research*. 34 (7): 2051-2060.
- INEGI (2001). Anuario estadístico de Tabasco. Gobierno del estado. 465 p.
- INEGI (2000). Cuaderno estadístico municipal Cunduacán, Tabasco. Gobierno del estado de Tabasco. H. Ayuntamiento de Cunduacán. 150 p.
- Jackson RM y Raw F. (1974). La vida en el suelo. Cuadernos de Biología. Ediciones Omega. Barcelona. 70 p.
- Leedale GF y Vickerman K. Phylum Euglenozoa. En Lee JJ, Bradbury P. (2000). An illustrated guide to the protozoa. Society of protozoologists. Kansas, USA. 1135 - 1185 p.
- Lilly ZT. (2002). Aislamiento y caracterización de bacterias biodegradadoras de inhibidores de hidratación de arcillas. Tesis Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química, UNAM. 68 p.
- Luna - Pabello VM. (1993). Estudio comparativo de las poblaciones de protozoarios ciliados en un reactor de biodiscos con diferentes sustratos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM. 152 p.
- Luna - Pabello VM., Aladro – Lubel MA. y Duran BC. (1994). Efecto del sustrato sobre las poblaciones de ciliados en un reactor de biodiscos: Caso tipo nejayote, vinazas y aguas blancas de papel. Vol. 3 Serie Química Ambiental del Agua. Facultad de Química, UNAM. 224 p.
- Luna - Pabello VM, Guzmán FF, Arenas AJ, Rodríguez PR, Morales HL, Ramírez LA, Ramírez RC, Zúñiga LSR. (1996). Análisis fisicoquímicos y microbiológicos de aguas potables y residuales de la industria petrolera, interpretación y evaluación de resultados. Gerencia de Protección Ambiental del IMP y Facultad de Química, UNAM. 108 p.
- Luna - Pabello VM, Del Río SR, Suárez MA, Ambriz RKT, Jiménez TBJ, Morales MBR, Piña CM. (1997). Técnicas de biorremediación de suelo bajo el enfoque de tecnologías disponibles, potenciabilidades y aplicaciones para ser practicadas en México. *Petróleos Mexicanos* y Facultad de Química, UNAM. 70 p.
- Luna - Pabello VM, García MVJ y Duran BC. (1997). Guía para la aplicación de la prueba de toxicidad empleando *Tetrahymena pyriformis*. Serie Química Ambiental del Agua, Facultad de Química, UNAM. 42 p.
- Luna – Pabello VM, Domínguez CLE, Espinosa LA, Ambriz RKT, Ruíz SA, Rodiles LO. (2001). Desarrollo de un método de biodegradabilidad aerobia rápida para inhibidores de hidratación de arcillas empleados en fluidos de perforación de

- pozos petroleros. Proyecto FIES 97 – 031. Facultad de Química, UNAM. Instituto Mexicano del Petróleo, México D. F. 210 p.
- Lynn y Small E. Phylum Ciliophora. En Lee JJ, Leedale GF, (2000). An illustrated guide to the protozoa. Second Edition. Society of protozoologists. Kansas, USA. 371 - 656 p.
- Madoni P. (2000). The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. *Environmental Pollution*, 109: 53 – 59.
- Maya CL. (2000). Caracterización física, química y microbiológica de muestras de subsuelo del río de Los Remedios Edo. de México. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, UNAM. 69 p.
- Martín A. (1980). Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editores S. A. 150 p.
- Martínez PJA y Gutiérrez ME. (1985). Introducción a la Protozoología. Editorial Trillas. México. 186 p.
- Meyer O. (2003). Testing and assessment strategies including alternative and new approaches. *Toxicology Letters*, 140 –141: 21 –30.
- Morgan P y Watkinson RJ. (1989). Hydrocarbon degradation in soil and methods for soil biotreatment. *Critical Reviews in Biotechnology*. 8(4): 305-317.
- Nicolau A, Días N, Mota M y Lima N. (2001). Physiological responses of *Tetrahymena pyriformis* to Koper, zinc, cycloheximida and triton X – 100. *FEMS Microbiology Ecology*, 30: 209 – 216.
- Nicolau. N y Rajaram P. (1999). Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment. *Research Microbiology*, 152: 621 – 630.
- Norma Mexicana MNX – AA – 087 – 1995 – SCFI. Análisis de agua – Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna* (Crustacea – Cladocera) Método de prueba.
- Parry – Laybourn J, Boyall J y Rogers P. (1999). The role of flagellated and ciliated protozoa in lagoon and grass filter sewage treatment systems. *Water Research*, 33 (13): 2971 – 2977
- Peper IL, Gerba CP y Brusseau ML. (1996). *Pollution Science*. Academic Press. San Diego California. 377 p.
- Pérez – Uz B., Franco M., Martín – Cereda M, Arregui L, Campos I, Serrano S y Fernández – Galiano D. (1998). Biofilms characterization of several wastewater treatment plants with rotating biological contactors in Madrid (Spain). *Water Science and Technology*, Vol. 37 (4 – 5): 215 – 218.

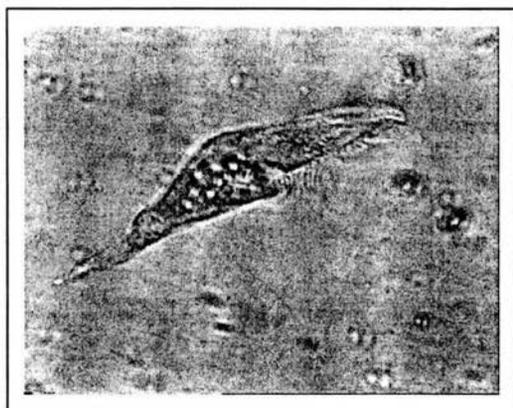
- Pineda MJA. (2003). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos y situación actual de esta tecnología en México. Tesis Profesional Ingeniería Química. Facultad de Química, UNAM (en proceso).
- Pratt JR, Mochan D y Xu Z. (1997). Rapid toxicity estimation using soil ciliates: sensitivity and bioavailability. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*. 58: 387 – 393.
- Randy HAS, Domínguez VI y García HL. (1999). Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico Mexicano. *Terra*, 17(2): 159 – 174.
- Regih R, Allison E, Bryan SG y James IP. (2002). Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (12): 6094 – 6105.
- Rodríguez FH y Rodríguez AJ. (2002). Métodos de análisis de suelos y plantas: Criterios de interpretación. Editorial Trillas. 196 p.
- Rodríguez ZS y García S. (1997). Species richness and abundance of naked in the rhizoplane of the desert plant *Escontria chiotilla* (cactacea). *Journal Eukariotic Microbiology*. 44 (2): 122 – 126.
- Salamanca PSG. (2003). Selección de cepas bacterianas y evaluación de su capacidad de biodegradar un inhibidor de hidratación de arcillas empleado en perforación de pozos de petróleo. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UNAM. 94 p.
- Salvado H y García MP. (1995). Capability of ciliated protozoa as indicators of effluent quality in activate sludge plants. *Water Research*, 29 (4): 1041 – 1050.
- Saval BS. (1995). PEMEX: Ambiente y energía; los retos del futuro. UNAM, Petróleos mexicanos. México, Instituto de Investigaciones Jurídicas. Serie E. Número 69. 151 – 189 p.
- Saval BS. (1997). Biorremediación de un suelo contaminado con diesel. Investigación: Coordinación de Bioprocesos ambientales Instituto de Ingeniería UNAM. 24 – 30 p.
- Saval BS. (1998). Biorremediación: Alternativa para la limpieza de suelos y acuíferos contaminados con hidrocarburos. *Ingeniería y Ciencias Ambientales*. 34: 6 – 9.
- Sleigh MA. (1989). Protozoan and other protist. Cambridge University Press. 281 p.
- Tan KH. (1994). Environmental soil science. Marcel Dekker. INC. New York. 247 p.
- Van Straalen NM y Krovoluttsky A. (1996). Bioindicator systems for soil pollution. Kluwer Academic Publishers. London. 259 p.

- Vásquez PA, Guarapana AY, Szott L, Swisher ME. (2002). Macrofauna edáfica asociada a diferentes agroecosistemas como bioindicador de calidad del suelo. En memorias del III Reunión Nacional sobre agricultura sustentable. 3 p.
- Vasudevan N y Rajaram P. (2001). Biorremediation of soil sludge contaminated. *Environmental International*, 26: 409 – 411.
- Zamudio R y Cedeño JA. (1998).“ Biorremediación de recortes de pozos petroleros.” *Boletín Ambiental: Centro de calidad ambiental, Contaminación del Suelo*, 3(8): 1 – 4.

ANEXOS

Anexo 1. Compilación de imágenes de protozoos encontrados en muestras de suelo natural de Cunduacán, Tabasco.

Microfotografías de los microorganismos encontrados en la muestra de suelo de Tabasco, de los cuales solo se pudo identificar a algunos de los organismos encontrados. Para la ubicación taxonómica de los mismos se siguieron las clasificaciones siguientes: Small y Linn (2000) para los ciliados, Bovee EC (1985) para los pertenecientes a las amibas, Febure – Chevalier (1985) para el heliozoario y Leedale GF y Vickerman (2000) para el flagelado.



Phylum Ciliophora Doflein, 1901

Subphylum Postciliodesmatophora Gerassimova y Seravin, 1976

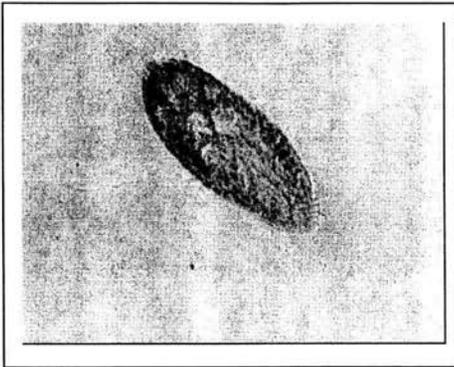
Clase Heterotrichea Stein, 1859

Orden Heterotrichida Stein, 1859

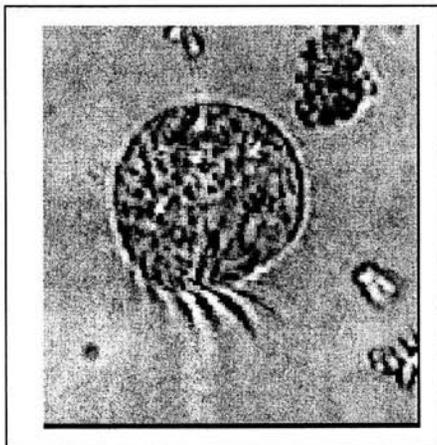
Familia Blepharismidae Jankowski, en Small y Lynn, 1985

Género *Blepharisma* Perty, 1849

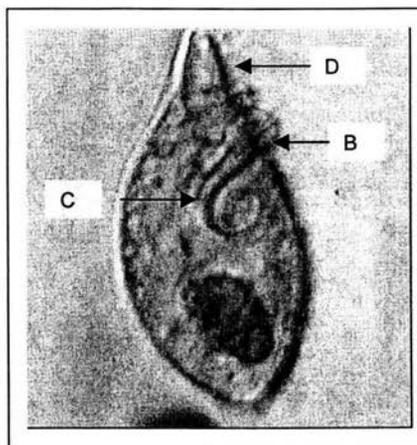
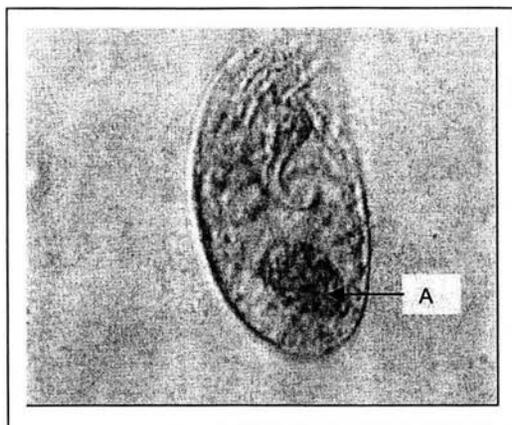
Campo claro 20X



Phylum Ciliophora Doflein, 1901
Subphylum Intramacronucleata Lynn, 1996
Clase Spirotrichea Bütschli, 1889
Subclase Stichotrichia Small y Lynn, 1985
Orden Sporadotrichida Faure – Fremiet,
1961
Familia Oxytrichidae Ehrenberg, 1838
Género *Oxytricha* Bory de Saint – Vincent en
Lamouroux, Bory de Saint – Vincent y
Deslogchamps, 1824.
Campo claro 20X



Phylum Ciliophora Doflein, 1901
Subphylum Intramacronucleata Lynn, 1996
Clase Spirotrichea Bütschli, 1889
Subclase Oligotrichia Bütschli, 1887
Orden Halteriida Petz y Foissner, 1992
Familia Halteriidae Claparède y
Lachmann, 1858
Género *Halteria* Dujardin, 1841
Campo claro 40X



A

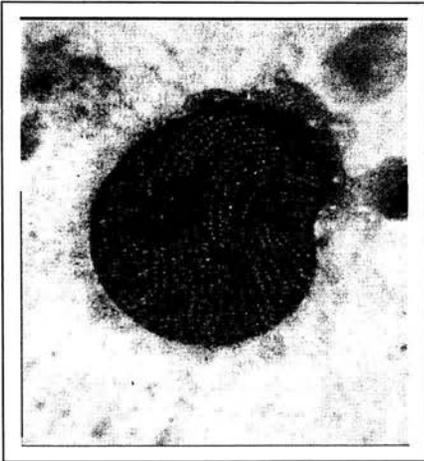
B

A y B) Tinción con verde de metilo resaltando: A) núcleo, B) Citostoma, C) Citofaringe, D) Cilios (Campo claro 100X)

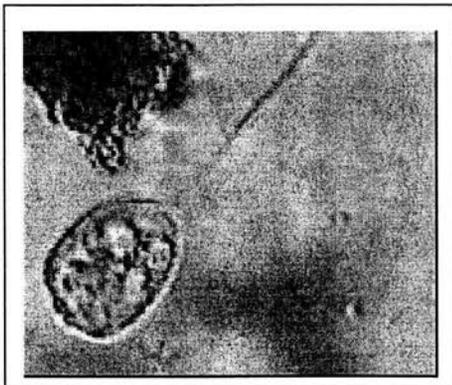


Phylum Ciliophora Doflein, 1901
 Subphylum Intramacronucleata Lynn, 1996
 Clase Phyllopharyngea de Puytorac *et al.*, 1974
 Subclase Phyllopharyngia de Puytorac *et al.*, 1974
 Orden Chlamyodontida Deroux, 1976
 Familia Chilodonellidae Deroux 1976
 Género *Chilodonella* Strand, 1928

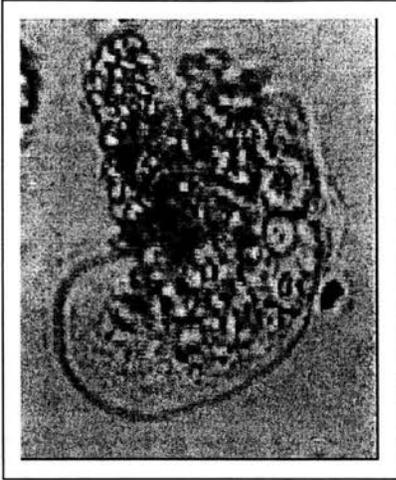
C) Impregnación de Klein, contraste de fases 100X



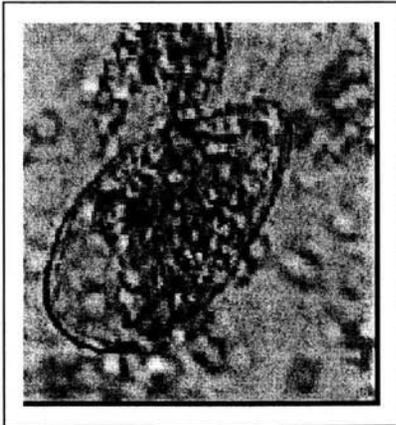
Phylum Ciliophora Doflein, 1901
Subphylum Intramacronucleata Lynn, 1996
Clase Colpodea Small y Lynn, 1981
Orden Colopodida de Puytorac *et al.*, 1974
Familia Colpodidae Bory de St. Vincent, 1773
Género Colpoda Müller, 1773
Especie *C. cucullus* (Müller, 1773)



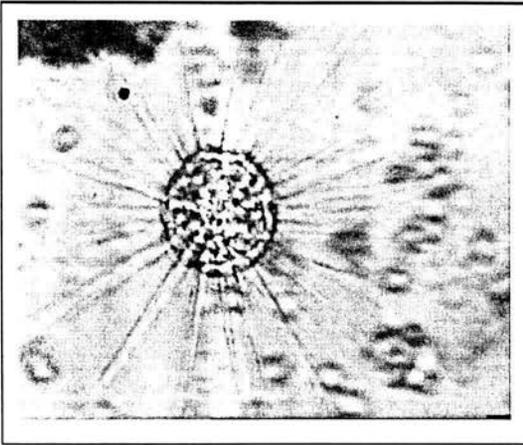
Phylum Ciliophora Doflein, 1091
Subphylum Intramacronucleata Lynn, 1996
Clase Oligohymenophorea de Puytorac *et al.*,
1974
Subclase Peritrichia Stein, 1859
Orden Sessilida Kahl, 1933
Familia Vorticellidae Ehrenberg, 1838
Género *Vorticella* Linnaeus, 1767
Campo claro 40X



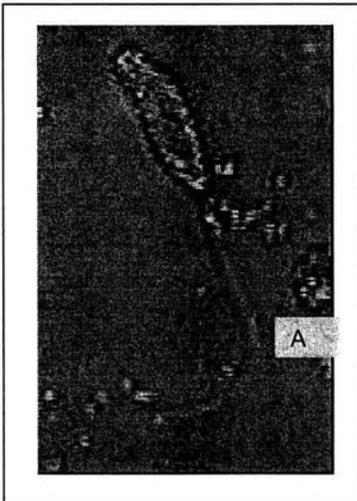
Phylum Sarcomastigophora Honinberg y
Balamuth, 1963
Subphylum Sarcodina Schmarda, 1871
Superclase Rhizopodea Von Siebold, 1845
Clase Lobosea Carpenter, 1861
Subclase Gymnamoebida Haeckel, 1862
Orden Amoebida Kent, 1880
Campo claro 40X.



Phylum: Sarcomastigophora Honinberg y
Balamuth, 1963
Subphylum: Sarcodina Schmarda, 1871
Superclase: Rhizopodea Von Siebold, 1845
Clase: Lobosea Carpenter, 1861
Subclase Testacealobosia de Saedeleer, 1934
Campo claro 40X



Phylum Sarcomastogophora Honinberg
y Balamuth, 1963
Subphylum Sarcodina Schmarda, 1871
Superclase Actinopodea Calkins, 1866
Clase Heliozoa Haeckel 1866,
Orden Actinophryida Kuhn, 1926
Familia Actinophryidae Claus 1874
Género *Actinophrys* Claus 1874
Campo claro 40X.



Phylum Euglenozoa Cavalier – Smith, 1981
Clase Euglenoidea Bütschli, 1884
Orden Euglenida Bütschli. 1884
Suborden Heteronematina Leedale, 1967
Género *Peranema* Dujardin, 1841
Capo claro 40X

Anexo 2. Análisis probit para el tóxico de referencia

En la siguiente Tabla se observan los datos para la obtención de la concentración letal media del toxico de referencia

Conc.(mg/L)	Log10 conc.	Num de org.	Mortalidad obs.	%de mortalidad	FROBIT emp.	FROBIT calc.
15	1.176	10	1.66	16.6	4.01	3.419
20	1.301	10	2.33	23.3	4.26	4.494
25	1.398	10	5	50	5	5.328
30	1.477	10	6	60	5.25	6.009
35	1.544	10	9.6	96	6.75	6.585
45	1.653	10	10	100	8.09	7.524

La CL_{50} se obtuvo por medio de la sustitución de la ecuación de la recta ($Y = mx + b$) de la siguiente manera:

Para $Y = 5$

$$Y = 8.6039X - 6.6997$$

$$Y + 6.6997 = 8.6039X$$

$$X = \frac{Y + 6.6997}{8.6039} = 1.3598$$

$$\text{Log } X = 1.3598$$

$$\text{Antilog}(\log X) = \text{antilog}(1.3598)$$

X = 22.87 mg /L Esta es la concentración teórica a la cual se encuentra la concentración letal media y por lo tanto el 50% de la mortandad de los microorganismos expuestos

Intervalo de incremento.

$$S = \frac{X_2 - X_1}{CP_2 - CP_1}$$

$$CP_2 - CP_1$$

Donde: $X_2 - X_1$ son los valores más altos y más bajos obtenidos a partir de la $[\log_{10}]$.

$CP_2 - CP_1$ Valores más altos y más bajos del Probit calculado.

$$S = \frac{1.653 - 1.176}{7.524 - 3.149}$$

$$7.524 - 3.149$$

S = 0.116

Determinación del error patrón

Log10 conc.	Num. de org.	PROBIT calc.	Fact. Ponderado	Producto Nw	Producto NwX	Produc. NwX2
1.176	10	3.419	0.238	2.38	2.798	3.29
1.301	10	4.494	0.538	5.58	7.259	9.444
1.398	10	5.328	0.616	6.16	8.611	12.039
1.477	10	6.009	0.439	4.39	6.484	9.57
1.544	10	6.585	0.269	2.69	4.153	6.41
1.653	10	7.524	0.05	0.5	0.082	1.366
Pro. 1.425			Suma	21.7	29.387	42.119

Error patrón

$$Eslog_{10}CL_{50} = S^2 \left[\frac{1}{\sum Nw} + \frac{\sum Nw (m - z)^2}{\sum Nw (\sum Nw X^2) - (\sum Nw X)^2} \right]^{0.5}$$

Donde: S (intervalo de incremento) = 0.116

M (constante) = 8.6039

Producto Nw = 21.7

Producto NwX = 29.38

Producto NwX² = 42.11

Z = $\frac{NwX}{Nw} = 1.353$

Nw

$$Eslog_{10}CL_{50} = 0.0134 \left[\frac{1}{21.7} + \frac{21.7 (8.6039 - 1.353)^2}{21.7 (42.11) - (863.184)} \right]^{0.5}$$

$$Eslog_{10}CL_{50} = 0.0134 \left[\frac{0.03610 + 21.7 (52.5755)}{913.787 - (863.184)} \right]^{0.5}$$

$$\begin{aligned} \text{Eslog}_{10}\text{CL}_{50} &= 0.0134 \left(0.03610 + \frac{164.4245}{50.603} \right) 0.5 \\ &= 0.0134 (3.2794)0.5 \end{aligned}$$

$$\text{Eslog}_{10}\text{CL}_{50} = 0.021971$$

Intervalo de confianza

$$\text{ICCL}_{50} = (\text{CL}_{50}) (\text{Eslog}_{10}\text{CL}_{50}) (\text{Log}_{10})$$

$$\text{ICCL}_{50} = (22.89) (0.021971) (1.424)$$

$$\text{ICCL}_{50} = 0.7161$$

Para la obtención de las unidades de toxicidad aguda se realizó la siguiente ecuación:

$$\text{U.T.} = \frac{1}{\text{CL}_{50}} * 100$$

$$\text{U.T.} = \frac{1}{22.89} * 100$$

$$\text{U.T.} = 4.368$$

Anexo 3. Resultados experimentales obtenidos empleando a *Colpoda cucullus*.

En este anexo se muestran las tablas con los resultados de las cuentas de cada una de las exposiciones de *Colpoda cucullus* al LRP y al IHA.

Tabla 1. Cuenta directa de exposición de *Colpoda cucullus* al lixiviado de recorte de perforación [10⁰]

Caja 1	Caja 2	Caja 3	Desv. Estan.	# de organis.	Testigo
10	10	10	0	10	10
10	10	10	0	10	10
10	10	10	0	10	10
10	10	10	0	10	10
10	10	10	0	10	10
10	10	10	0	10	10
10	10	10	0	10	10
9	9	10	0.58	9.0	10
9	9	9	0	9	10

Tabla 2. Cuenta directa de exposición de *Colpoda cucullus* al IHA al 100%

Tiempo (min)	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Des. Estan	# de organis.	Testigo
0	10	10	10	0	10	10
5	0	0	0	0	0	10
10	0	0	0	0	0	10
15	0	0	0	0	0	10
20	0	0	0	0	0	10
24	0	0	0	0	0	10
30	0	0	0	0	0	10

Tabla 3. Cuenta directa de exposición de *Colpoda cucullus* al IHA al 50%

Tiempo (min)	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Des. Estan	# de organis.	Testigo
0	10	10	10	0	10	10
5	0	0	0	0	0	10
10	0	0	0	0	0	10
15	0	0	0	0	0	10
20	0	0	0	0	0	10
24	0	0	0	0	0	10
30	0	0	0	0	0	10

Tabla 4. Cuenta directa de exposición de *Colpoda cucullus* al IHA al 25%

Tiempo (min)	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Des. Estan	# de organis.	Testigo
0	10	10	10	0	10	10
5	0	0	0	0	0	10
10	0	0	0	0	0	10
15	0	0	0	0	0	10
20	0	0	0	0	0	10
24	0	0	0	0	0	10
30	0	0	0	0	0	10

Tabla 5. Cuenta directa de exposición de *Colpoda cucullus* al IHA al 12.5%

Tiempo (min)	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Des. Estan	# de organis.	Testigo
0	10	10	10	0	10	10
5	0	0	0	0	0	10
10	0	0	0	0	0	10
15	0	0	0	0	0	10
20	0	0	0	0	0	10
24	0	0	0	0	0	10
30	0	0	0	0	0	10

Tabla 5. Cuenta directa de exposición de *Colpoda cucullus* al IHA al 6.5%

Tiempo (min)	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Desv. Estan.	# de organis.	Testigo
0	10	10	10	0	10	10
5	6	6	6	0	6	10
10	6	6	6	0	6	10
15	6	6	6	0	6	10
20	6	6	6	0	6	10
25	5	5	6	0.58	5	10
30	5	5	6	0.58	5	10
35	5	5	6	0.58	5	10
45	5	4	6	1	5	10
60	5	4	6	1	5	10

El tiempo de observación se marco como de una hora en todos los experimentos para estandarización de la técnica manejada en el laboratorio.

Anexo 4. Resultados experimentales obtenidos de las pruebas de recuperación del IHA – K.

Tablas de resultados obtenidos de la prueba de DQO para la recuperación del IHA - K en una muestra de suelo.

Tabla 7 Datos obtenidos de las pruebas de DQO total para la recuperación de la fracción hidrosoluble del IHA – K.

ml H ₂ O	IHA total	Testigo
0	286800	38400
10	89600	38400
20	41600	38400
30	38400	19200
40	35200	19200

Tabla 8 Datos obtenidos de las pruebas de DQO soluble para la recuperación de la fracción hidrosoluble del IHA - K

ml H ₂ O	IHA soluble	Testigo
0	286800	38400
10	89600	38400
20	25600	19600
30	20800	19200
40	19200	19200

Anexo 5. Información para la conformación de una propuesta de proyecto de Norma Mexicana para la evaluación de la toxicidad aguda de suelos empleando al ciliado edafícola *Colpoda cucullus*

Análisis de suelo – Evaluación de la toxicidad aguda con el ciliado edafícola *Colpoda cucullus*.

Método de prueba que se desarrollo experimentalmente en el laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM.

Índice de contenido:

- Objetivos
- Campo de aplicación
- Definiciones
- Principio de aplicación
- Procedimiento
- Expresión de resultados

1.- Objetivo: El presente proyecto de Norma pretende establecer una metodología rápida para evaluar la limpieza de suelos, por medio de pruebas de toxicidad aguda utilizando un ciliado edafícola como *Colpoda cucullus*, después de que se hayan sometido a algún proceso de restauración o biorremediación.

2.- Campo de aplicación. Esta metodología se propone para evaluar el grado de limpieza de los suelos contaminados que han sido sometidos a algún tratamiento de biorremediación, estableciendo la CL₅₀ de dicho contaminante.

3.- Definiciones:

Biorremediación: Alternativa tecnológica para la limpieza de suelos y acuíferos contaminados, donde se aprovecha el potencial de los microorganismos para mineralizar o transformar contaminantes orgánicos en compuestos químicamente más sencillos.

Ciliados: Microorganismos pertenecientes al grupo de los protozoos. Separados en *Phylum ciliophora* y cuyas características permiten su uso como posibles bioindicadores de suelos contaminados.

Colpoda cucullus: Microorganismo perteneciente a la clase Colpodea, es un importante miembro de la comunidad de ciliados edafícolas de rápida reproducción.

Concentración letal media (CL₅₀): Es la concentración de una sustancia (pura o combinada) o efluente, que origina un efecto letal en el 50% de los organismos expuestos.

Muestra compuesta: Es aquella que se origina con la mezcla de muestras simples cualquiera que esta sea, esto puede hacerse por cuarteo mezclando lo mejor posible las muestras individuales.

Lixiviado: Fase líquida procedente de la infiltración de agua en un medio poroso que usualmente arrastra los contaminantes en el existentes.

Protozoos: Organismos unicelulares que no forman órganos ni tejidos, de tamaño variable que oscila entre las 10 micras y 3 milímetros pudiendo ser solitarios o coloniales. Se encuentran en ambientes tanto acuáticos como terrestres, prefiriendo los lugares donde se encuentre una película de agua o cierta humedad.

Prueba de toxicidad (bioensayo): Es la exposición controlada de un organismo a una sustancia pura o combinada así como aguas, provenientes de algún tipo de industria, para evaluar su efecto.

Toxicidad: Es el efecto adverso que produce un tóxico.

Toxicidad aguda: Es el efecto letal que se produce después a lo organismos de prueba a sustancias que pueden ser puras o combinadas una sola vez durante un periodo corto de tiempo.

Tóxico de referencia: Es una sustancia química utilizada en los bioensayos, cuyo efecto en los organismos a determinadas concentraciones es conocido, por lo tanto, permite establecer el estado de respuesta de los organismos de prueba empleados.

4.- Muestreo: El muestreo de los suelos debe realizarse marcando un área determinada en el sitio de interés donde los puntos de muestreo se establecerán en zig – zag, para que este sea significativo. La vegetación superficial deberá ser retirada, con cuidado, para así tomar los primeros 15 centímetros de profundidad estas muestras se pondrán en bolsas de plástico o en frascos de vidrio etiquetándose debidamente para transportarlas al laboratorio para su procesamiento. En los análisis que se les realizan a estas muestras se deberá tener en cuenta parámetros tanto físicos, químicos como biológicos.

5.- Principio: Este método se propone para examinar lixiviados (obtenidos en el laboratorio) de suelos biorremediados o parcialmente tratados, y exponiendo en condiciones controladas de laboratorio al ciliado edáficoola *Colpoda cucullus*, a dichos lixiviados y de esta manera establecer el grado de limpieza que presente dichos suelos, evaluando el efecto que los lixiviados presenten sobre este organismo.

6.- Reactivos y materiales: Para realizar este procedimiento no es necesario tener en una infraestructura sofisticada ya que los microorganismos son de fácil mantenimiento en el laboratorio.

Materiales

- Matraces Erlenmeyer
- Pipetas Pasteur
- Cajas de Petri
- Porta y cubre objetos.

Aparatos

- Microscopio estereoscópico
- Incubadora a 28°C
- Microscopio óptico

Reactivos

- Tóxico de referencia ($K_2Cr_2O_7$)

7.- Procedimiento: Lo primero con lo que se debe contar es con los cultivos del ciliado *Colpoda cucullus*, que se mantendrán en una incubadora a 28°C, una vez que se tienen

estos se procederá a trabajar con las muestras de suelo realizándole primero los análisis físicos y químicos correspondientes para posteriormente obtener un lixiviado al que serán expuestos los microorganismos para evaluar la respuesta de estos ante dicho lixiviado.

8.- Expresión de resultados: Para la obtención de la concentración letal media (CL_{50}) es recomendable utilizar el método de unidades probabilísticas "Probit", el cual evalúa la relación concentración respuesta de un contaminante sobre un organismo, siendo el método manejado en este trabajo por ser el que se menciona en la propuesta de NOM aquí referenciada y cuya explicación se encuentra también en dicha NOM.