

37
2Ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIOS DE ECOTOXICIDAD, BIORREMEDIACION
Y FITO-BIORREMEDIACION EN SUELOS
CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS (DIESEL).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
FRANCISCO DAMIAN CERVANTES



DIRECTOR DE TESIS: DRA. RANJANI KRISHNAN PADMA

1999

SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA

2-10-99

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Estudios de ecotoxicidad, biorremediación y fito-biorremediación en
suelos contaminados con hidrocarburos (diesel).

realizado por Francisco Damián Cervantes

con número de cuenta 8736263-9 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dra. Ranjani Krishnan Padma

Propietario M.enC. Eduardo Martínez Romero

Propietario Biol. Pedro Eloy Mendoza Hernandez

Suplente Biol. Irene Sánchez Gaiter

Suplente Dra. Norma García Calderón

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz
DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ
DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Dedicatorias

Este trabajo esta dedicado especialmente a mi madre Rufina Cervantes Reyes y a mi padre Francisco Damián de Jesús, quienes han hecho posible la vida de este iluso soñador y han estado conmigo, dándome siempre más de lo que podrían darme.

A mis hermanos, Amando y su esposa Lourdes de quienes he recibido su apoyo en todo momento, a Carmen, Clara, Aarón y Gumaro Para ellas y ellos que siempre me han ayudado incondicionalmente.

A mis sobrinas Paulina y Angélica, dos gotas de lluvia suficientes para formar un arcoiris que colorea el cielo y la tierra

A mis amigas(os) de Ciencias David, Luis, Enrique, Jesús, Juana N, Juana A., Mireya, Yolanda, Paula, Marina, Teresa, Gabriela, Jaina y toda su banda, Eduardo y Dulce. Quienes han compartido conmigo su amistad y los altibajos que me ocasionaron esta tesis

A mis amigas(os) del laboratorio Patty, Betty, Erika, Tania, Rosario, Yara, Nora, Rosaura, Kata, Petra que debe estar en algún lugar de Austria, Roberto, Fidel por su amistad y además a la señora Irene por su apoyo.

En especial para ese fantasma que ronda los solitarios rincones de mi ser Ma. Elena, aunque su vuelo lleve una dirección diferente al que mis alas recortadas se dirigen.

A quienes sueñan lo imposible y no conformes con ello se atreven a desafiar al mundo así sea con una palabra, un poema, un dibujo, un grito o con un fusil de madera para hacer realidad esos sueños.

CUERPO DESNUDO

La llovizna cae pertinaz del cielo gris, confundiendo el horizonte con el mar tranquilo, la arena de la playa siente el caminar de unos pies desnudos, los cuales se hunden levemente a cada paso. Este atardecer cálido, el cuerpo desnudo de los pies descalzos sienten el hormigueo de la lluvia sobre su epidermis, más allá, las olas se rompen sobre las filosas rocas, las anémonas se abren y cierran intermitentemente, los erizos agujijonean al mar cuando este se les abalanza. La brisa suavemente golpea el rostro de ojos cerrados del cuerpo desnudo, estos, perdidos en el abismo interior, miran un universo desconocido

Un relámpago enciende el ciclo al tiempo de desplomarse ese cuerpo sobre la arena, un cangrejo atraviesa sobre él en su paseo y le deja la marca de sus patas. La llovizna se convierte en aguacero, encrespa al mar, lo enfurece junto con un viento desordenado, entonces las olas llegan a golpear al cuerpo sobre la playa desierta; lo cubren lo descubren, lo dejan salado, lo inundan

En su mente vuelan mil ideas, colores, descubrimientos insospechados, locuras sin tiempo ni lugar, ríos de soledades vertidos sobre mares de diálogos con las estrellas, páginas en blanco para plasmar un dibujo en blanco y negro

La marea sube, la noche llega, el cuerpo queda sumergido en un mar descansando bajo el final de la lluvia y un manto negro estrellado. Salen burbujas de su boca y nariz por algún tiempo, se liberan de su interior soliloquios luminosos hacia el esplendor nocturno tiñendo las estrellas de un color indefinido, algunas palomillas revolotean alrededor de la luna, tras beber de su néctar plateado se alejan perdiéndose entre los árboles.

Al amanecer baja la marea, el sol ilumina todo con un dorado toque de locura, los niños juegan y buscan conchas de caracoles sobre la playa. El cielo tiene un extraño toque azul sin que nadie sé de cuenta. Las gaviotas y los pelícanos vuelan al ras del mar sin pecatarlo los peces; un niño grita a los otros, espantando a las aves cercanas, todos se arremolinan y en el centro queda un ser quimérico que se arrastra lenta, muy lentamente al mar, tiene la misma mirada tras sus ojos cerrados a la que tenía el cuerpo desnudo de la noche anterior.

Los niños se miran entre sí con complicidad, y dejan al ser llegar y perderse en la mar.

ÍNDICE

Resumen.	2
I Introducción	3
I.1 Contaminación	3
I.2. Clasificación de contaminantes.	4
I.5 xenobioticos y biogenicos.	4
I.3. Biodegradación	5
I.4. Biorremediación	5
I.5. Hidrocarburos como xenobioticos	6
II. Antecedentes	8
II.1 Contaminación por hidrocarburos de petróleo	8
II.2.1. Estudios de ecotoxicidad.	10
II.2.2. Fitotoxicidad.	10
II.2.3 Toxicidad por hidrocarburos.	11
II.3. Rizósfera	12
II.4. Toxicidad en lombrices.	15
II.5. Ventajas y Desventajas.	17
II.6 La química de la Biodegradación.	17
II.6.1. Procesos de biodegradación de hidrocarburos.	18
II.6.2 Degradación de Hidrocarburos Alifáticos	18
II.6.3. Degradación de Hidrocarburos Aromáticos.	19
III. Objetivos	21
IV Material y Método.	22
V Resultados	29
VI Discusión	42
VII Conclusiones	47
VIII Recomendaciones	48
Bibliografía	49

RESUMEN

La biorremediación es un tratamiento que utiliza el metabolismo de microorganismos para degradar y transformar compuestos químicos orgánicos en suelos contaminados. La restauración biológica de suelos contaminados con hidrocarburos, utilizando la biorremediación es una alternativa para tratar este tipo de suelos.

En el presente estudio se hizo una evaluación de la toxicidad, biorremediación y la fitorremediación de un suelo contaminado con diesel, a través de parámetros fisico-químicos y biológicos lo que incluyó la capacidad de retención de agua, textura del suelo, peso seco del suelo, tipo y concentración de contaminantes, respiración de microorganismos en el suelo, natural e inducida. Se hicieron estimaciones de la toxicidad en la germinación y primeros estadios de crecimiento en semillas de *Zea mays* y de *Trigonella foenum graecum* y de la toxicidad en lombrices de tierra. Además se realizó una prueba de biorremediación en contenedores para obtener información de su aplicación con condiciones simuladas. Se realizaron también pruebas de fitorremediación utilizando la planta *Hydrocotyle ranunculoides*.

Los resultados del estudio toxicológico indican una inhibición en la germinación de las semillas de *Trigonella foenum graecum*, así como un mayor efecto tóxico en el desarrollo de sus primeros estadios de crecimiento a los que presenta *Zea mays*. Por su parte las lombrices mostraron una alta sensibilidad a la contaminación, ya que no sobrevivieron en ninguna de las concentraciones de diesel utilizadas. La biorremediación a escala, presentó la desaparición de las cadenas más cortas y una reducción en las demás cadenas.

Los resultados de la fitorremediación mostraron en la concentración de contaminación más baja, la desaparición total del contaminante y una reducción en mayor proporción en las otras cadenas monitoreadas, comparadas con la prueba de biorremediación. La prueba de biorremediación comparada con la fitorremediación muestra que existe una mayor efectividad en la disipación del diesel utilizando plantas. Con esto se concluye que la fitorremediación es una alternativa viable para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos como el diesel.

I. Introducción.

El suelo desempeña un papel de gran relevancia en los organismos vivos, ya que su composición físicoquímica determina hábitats en el ecosistema terrestre. Como el suelo es una mezcla de minerales, partículas orgánicas de diferentes tamaños y de composición variada, puede influir de una manera determinante en la diversidad de un ambiente dado. Además, todo factor que tenga influencia en las propiedades del suelo en mayor o menor grado tendrá también efecto en los organismos presentes en él, estos factores pueden ser propios del ambiente o producto de la intervención del hombre (Porta *et al.*, 1994).

Es importante conocer el destino de los compuestos químicos presentes sobre la superficie de la tierra a causa de su producción por el hombre, tal como lo es la explotación de los hidrocarburos de petróleo. Debido al amplio número de lugares contaminados por esta industria, se deben desarrollar estrategias de evaluación de daños y técnicas de limpieza y saneamiento para aplicar la más conveniente de acuerdo al tipo de contaminación que se presente (Wise y Trantolo, 1994).

Para el caso de México es de gran relevancia conocer y desarrollar técnicas de limpieza y evaluación de daños a causa de los hidrocarburos de petróleo, dado que uno de los soportes de la economía nacional es la producción y exportación de petróleo. La constante extracción de hidrocarburos incrementa las probabilidades de este tipo de contaminación, lo que nos lleva a buscar vías para tratar sitios contaminados de forma inmediata después de un derrame y que implique el menor riesgo para el sitio.

I.1. Contaminación

La contaminación se define como el suministro de impurezas al ambiente y con esto la producción de un deterioro en la atmósfera, el agua y el suelo a través de diversos químicos tóxicos y materiales de deshecho. El deterioro varía dependiendo del tipo y de la concentración del contaminante (Shaheen, 1992).

En este contexto, el depósito inapropiado y los derrames durante el transporte de los compuestos tóxicos orgánicos e inorgánicos hacia el ambiente produce una amplia contaminación en el suelo, aguas subterráneas y el mar. Los efectos de estos materiales en los seres vivos pueden producirles daños y además de tener repercusiones

muy serias tanto ecológica como económicamente al modificar el ambiente (Bartha, 1986)

La atención hacia este tipo de contaminación se ha incrementado, y se ha iniciado el desarrollo e implementación de tecnologías de limpia y la evaluación de su impacto sobre el ambiente

Una de estas tecnologías es el tratamiento biológico de suelos contaminados. Ésta se realiza mediante la transformación de compuestos químicos simples o complejos, hacia otras formas no peligrosas (Metting, 1992), por medio del metabolismo de poblaciones microbianas.

Esta transformación de contaminantes va ligada al hecho de que se puede cambiar la forma, fase o estado de óxido-reducción del contaminante (Mitchel, 1993), y puede ser compleja, teniendo muchos cambios secuenciales para un determinado compuesto o una simple oxidación, reducción o pérdida de un grupo funcional de una molécula (Metting, 1992).

I.2. Clasificación de contaminantes.

I.2.1. Xenobióticos y biogénicos.

Los compuestos xenobióticos son por definición no naturales o hechos por el hombre, en tanto que los biogénicos son los que se presentan naturalmente en el ambiente. Los hidrocarburos caen dentro del primer término dado que por el proceso de refinación y síntesis se altera su estructura o se produce uno de estructura que no existía antes. Además, son en los sitios donde se derraman, compuestos totalmente extraños, a diferencia de los biogénicos que están presentes independientemente de la acción del hombre (Metting, 1992).

Para tratar a este tipo de contaminantes, la biorremediación está emergiendo como el tratamiento más efectivo para suelos contaminados con hidrocarburos, especialmente cuando el contaminante es un combustible medio destilado como el diesel u otro como el combustible para aviones (Wise y Trantolo, 1994).

I.3. Biodegradación.

La biodegradación de moléculas complejas, involucra por lo general los efectos interactivos de una mezcla de poblaciones de microorganismos y descansa sobre la versatilidad metabólica de bacterias y hongos unicelulares. El término de biodegradación, se define como la transformación biológica de un químico orgánico a otra forma más simple, sin tomar en cuenta qué tanto cambio pudo sufrir la molécula en cuestión. Si la biodegradación de un compuesto orgánico termina en moléculas inorgánicas se le llama mineralización (Metting, 1992).

I.4. Biorremediación

La biorremediación se define como un tratamiento que utiliza el metabolismo de microorganismos para degradar y transformar químicos orgánicos en suelos contaminados (Calabrese y Kostecki, 1992). El éxito en la sobrevivencia y proliferación de las bacterias en el suelo, como inóculo, es un factor importante para promover el control biológico de la contaminación, la solubilización de nutrientes y así obtener la biorremediación (Young *et al.*, 1995)

El manejo de condiciones específicas para desarrollar la biorremediación, es el resultado de la explotación del metabolismo microbiano para catalizar reacciones químicas. En general estos procesos no se presentan si el microorganismo no se beneficia de esto, lo cual involucra la concentración final de los niveles del contaminante que se pueden obtener del metabolismo y la acción benéfica de enzimas no específicas. Ya que se puede llegar a un nivel del compuesto tan bajo, que ya no se tome como fuente de energía. Es decir, el microorganismo aprovechará para su crecimiento al compuesto xenobiótico, siempre y cuando éste se encuentre disponible en mayor cantidad a otros substratos orgánicos. Cuando el substrato orgánico natural es mayor al xenobiótico la degradación de este último no se realizará (Metting, 1993).

La biorremediación es una elección apropiada para el tratamiento de muchos residuos peligrosos industriales y tóxicos, antes y después de su descarga al ambiente. La biorremediación es además, un proceso natural y final. En este tratamiento, la tasa de biodegradación natural debe ser acelerada y optimizada en un sitio contaminado con el fin de reducir la concentración del contaminante a un nivel tóxico menor o nulo, en un periodo de tiempo razonable y finito (Wise y Trantolo, 1994). Un buen final al utilizar el

tratamiento de biorremediación es llegar a la mineralización total del compuesto xenobiótico. La mineralización en condiciones aeróbicas, resulta en la formación de biomasa adicional para las bacterias, agua, bióxido de carbono y productos inorgánicos (Metting, 1992)

Algunos compuestos se resisten a la biodegradación después de un periodo de tiempo dado, de acuerdo a la estructura de su molécula y de las condiciones ambientales, éstos reciben el nombre de persistentes. Los compuestos que a su vez resisten inherentemente a cualquier grado de biodegradación se llaman recalcitrantes. Pero actualmente, es imposible probar que un componente dado sea verdaderamente recalcitrante bajo todas las condiciones del ambiente (Wise y Trantolo, 1994).

En condiciones favorables los microorganismos catabolizan substratos complejos para proveerse de carbono y energía. El crecimiento microbiano está en función de la concentración del substrato y de su diversidad. Cuando el ambiente contiene mayores cantidades de compuestos no tóxicos de material fácilmente biodegradable, se presenta una represión catabólica para los compuestos xenobióticos como los hidrocarburos, ya que la alta concentración de los primeros los hace más disponibles y no puede realizarse la degradación de xenobióticos. En circunstancias diferentes, donde todos los materiales fácilmente biodegradables se encuentran en menor disponibilidad, la represión catabólica se suprime y sí se lleva a cabo la biodegradación de compuestos xenobióticos (Metting, 1993).

1.5. Hidrocarburos como xenobióticos.

A través del tiempo, los hidrocarburos han entrado a la biosfera sólo de forma localizada, gradual, por filtros naturales y por la erosión. El resultado de estas exposiciones esporádicas produjo la evolución de vías de biodegradación. Pero globalmente, los hidrocarburos en los últimos 20 siglos han ejercido poca presión selectiva en toda la población microbiana por su escasa presencia. En los últimos años, las actividades del hombre incrementaron radicalmente la exposición de hidrocarburos en la biosfera, esto lo vuelve un problema toda vez que afectan al ambiente y no todos los microorganismos tienen la capacidad de asimilarlos (Bartha, 1986).

Con un control apropiado, los hidrocarburos son una fuente eficiente de energía, conveniente y muy útil. Pero fuera de control, se produce la contaminación en el sitio del

derrame, y esto forma en un inicio capas de petróleo que se extienden rápidamente en cuestión de minutos. Esta situación provoca que el crecimiento de la industria del petróleo por el país y todo el mundo, sea paralela a la creación de sistemas de seguridad incrementando precauciones y la vigilancia contra cualquier posibilidad de contaminación y daño al ambiente (Shaheen, 1992)

II. Antecedentes

II.1 Contaminación por hidrocarburos de petróleo

Desde 1946, la contaminación por petróleo y su biodegradación ha estado sujeta a investigación cuando Zobell inició el trabajo concentrándose en el medio marino. Desde entonces, el campo se ha expandido hacia el ártico, aguas dulces y el medio terrestre (Wise y Trantolo, 1994)

Como contaminante, los hidrocarburos ocupan una posición intermedia entre altamente biodegradables, biogénicos y altamente recalcitrantes. Tienen un origen biogénico, pero por procesos geoquímicos y después por refinamiento se alteran de una forma importante (Bartha, 1986). La fracción biodegradable se puede transformar por medio de microorganismos a una forma estabilizada. Mientras la fracción recalcitrante tiene una alta resistencia a la biodegradación, la fracción persistente puede bajo una serie de condiciones específicas de acuerdo al compuesto de que se trate, sufrir la biodegradación (Wise y Trantolo, 1994)

Tanto en la tierra como en el mar, el nivel de descargas (afluentes, derrames urbanos, operaciones de limpieza, etc.) representa probablemente más del 90% de la contaminación total de hidrocarburos antropogénicos (Bartha, 1986) Los suelos en particular, pueden recibir hidrocarburos como el petróleo crudo en lugares adyacentes a pozos petroleros o bien por fugas en los conductos. En tales lugares contaminados los vegetales son afectados drásticamente y la agricultura puede llegar a ser imposible (Joergensen *et al.*, 1995)

En el suelo los hidrocarburos están sujetos a una rápida infiltración vertical y, a menos que esto se prevenga por un clima frío o por saturación de agua, la evaporación y la fotodegradación de hidrocarburos en la tierra es muy bajo, sólo cantidades del 1-2% del derrame (Bartha, 1986).

Aunque la fotodegradación de los hidrocarburos es muy baja y los combustibles derivados del petróleo crudo son tóxicos para muchos organismos, éstos son aprovechables fácilmente como sustrato para algunos grupos de organismos. En particular, bacterias y hongos si existen condiciones favorables. Las poblaciones microbianas responden a la adición, en el suelo, de parafina, petróleo, productos del petróleo y otros hidrocarburos alifáticos, provocando que estos sustratos vertidos en el suelo desaparezcan. Estas transformaciones tienen una gran importancia en el ciclo terrestre del carbono ya que las

ceras y otros constituyentes del tejido vegetal contienen hidrocarburos alifáticos. Se ha calculado que aproximadamente el 0.02% de los tejidos vegetales pueden considerarse como hidrocarburos o compuestos semejantes a hidrocarburos en su estructura (Alexander, 1980).

Los suelos se pueden utilizar para almacenar los desechos de petróleo, siendo este método de depósito y aislamiento una forma efectiva para prevenir un daño mayor al ambiente. Pero es más apropiado manipular el sitio mismo, sin trasladar el suelo contaminado a otro lugar y favorecer el crecimiento de cepas bacterianas específicas, facilitando la degradación para obtener una disminución de la contaminación actual y potencial de los hidrocarburos (Joergensen *et al.*, 1995).

Los combustibles del petróleo derramados en el suelo, pueden contener productos naturales no modificados además de los sintetizados por el hombre. Así que su susceptibilidad para la biodegradación está, en particular, determinada por el tiempo que tienen existiendo en el ecosistema. Porque los sintetizados son “nuevos”, y el tipo de enlaces y/o estructura lo vuelven inaccesible para las enzimas del metabolismo microbiano. Además, es conveniente que la fuente de microorganismos para la biodegradación del petróleo se localice en el lugar de descarga o derrame. También lo es, determinar si las condiciones que existen en el ambiente de un sitio pueden modificarse, a fin de acelerar la biodegradación de productos del petróleo recalcitrantes o persistentes, por medio de cepas particulares (Wise y Trantolo, 1994).

Muchas de las tecnologías de biorremediación tienen sus bases en el conocimiento de la biodegradación de hidrocarburos alifáticos. Esta transformación, involucra la actividad de monooxigenasas y la división de las cadenas por beta-oxidación. Esto significa que, la presencia de oxígeno es muy importante para una biodegradación efectiva, aunque esto no quiere decir que no se lleve a cabo en ausencia de oxígeno. La alternativa de bioremediación es utilizar la ventilación del suelo para promover la biorremediación *in situ*, ésta es una alternativa prometedora (Wise y Trantolo, 1994).

Al utilizar la ventilación, para obtener una más rápida degradación del hidrocarburo, es necesario evaluar la actividad bacteriana. Esto se logra al determinando el nivel de destrucción del contaminante efectuado por las poblaciones microbianas, el cual es un cambio asociado a la “aplicación” de biorremediación *in situ* (Hickey, 1995 [a]) y/o el monitorear la tasa de consumo de oxígeno o producción de bióxido de carbono

(Hickey, 1995 [b]) para, si es necesario, aumentar la población de microorganismos por medio de inóculos

La medición de la producción de bióxido de carbono de los microorganismos (respiración del suelo), se ha utilizado durante muchos años como un indicador de actividad microbiana o para determinar la biodegradación y grado de mineralización de un compuesto orgánico. De hecho, la evolución de CO₂ se utiliza como una técnica estándar para evaluar la biodegradación y grado de mineralización de compuestos orgánicos del suelo (Sharabi y Bartha, 1993). Ya que la biomasa microbiana del suelo y las proporciones de carbono orgánico-biomasa de carbono, responden fácilmente a efectos de perturbaciones y estos son indicadores efectivos sobre el deterioro de la calidad del suelo (Wardle y Ghani, 1995).

II.2.1 Estudios de ecotoxicidad.

Las plantas juegan dentro de las cadenas tróficas un papel fundamental como productores primarios de biomasa, como hábitat para otras especies, etc. Su valor desde el punto de vista humano, se incrementa apreciablemente como un medio de contrapeso a procesos de industrialización. Ya que, se les utiliza por los efectos que sufren a causa de la generación de residuos para evaluar y controlar la contaminación. Estos procesos incluyen la quema de combustible fósil, producción de aguas cloacales, sólidos inorgánicos, orgánicos y afluentes (Cunningham y Ow, 1996).

II.2.2. Fitotoxicidad

Las pruebas de fitotoxicidad utilizan a las plantas como indicadoras de los efectos del contaminante en el ambiente y proveen puntos de referencia útiles para otras pruebas microbianas. Es importante y práctico conocer el tiempo en que un tratamiento de biorremediación reduce la contaminación, y una planta puede establecerse en el área que fue o está siendo sujeta a biorremediación. Ya que ésta estabiliza el área que cubre, evita vientos, polvaredas, problemas de erosión y de pérdida y recuperación de agua, asimismo es estéticamente agradable (Wise y Trantolo, 1994)

Las plantas para establecerse desarrollan diferentes métodos de dispersión para sus semillas, estas deben de tener condiciones adecuadas de humedad, temperatura y luz para

poder germinar. La germinación de semillas se utiliza en bioensayos de toxicidad para tener un criterio y estimar el impacto de hidrocarburos de petróleo en el suelo (Salanitro *et al.*, 1997)

Existen dos tipos de pruebas: la de toxicidad aguda y la de toxicidad crónica.

Las pruebas de toxicidad aguda son el mejor medio para conducir a una rápida evaluación preliminar de distribución y extensión de las condiciones tóxicas en un sitio. Sin embargo, éstas no se consideran indicadoras adecuadas del efecto potencial del contaminante en estadios de vida críticos o de respuestas a exposiciones por un amplio periodo de tiempo al contaminante. Las pruebas de toxicidad crónica generalmente son más sensibles que las de toxicidad aguda y pueden ser usadas para predecir el 'no efecto' o niveles 'seguros' de contaminación. Por otra parte, las pruebas crónicas proveen un mejor índice de campo en cuanto a la respuesta de una población o con una mayor aproximación a la exposición real en el campo (Ramanathan y Burks, 1996).

En el caso de las plantas acuáticas representadas por las especies macrófitas, su relevancia es por la producción de oxígeno, su papel en el ciclo de nutrientes, control de calidad del agua y estabilización de sedimentos. Además, proveen hábitat y refugio para la vida acuática. Las plantas acuáticas se han utilizado frecuentemente para la remoción de sólidos suspendidos, nutrientes, metales pesados, tóxicos orgánicos y bacterias ácidas del drenaje. En contraste no han sido utilizadas comúnmente como especies de prueba, en diseños de toxicidad al evaluar la peligrosidad de un contaminante potencial. A pesar de que los datos de fitotoxicidad están considerados en el desarrollo de criterios para proteger la calidad del agua y para proteger la vida acuática (Lewis, 1995)

II.2.3. Toxicidad por hidrocarburos

Los hidrocarburos contaminantes en el suelo generalmente producen efectos negativos en las comunidades de plantas. El modo en que los hidrocarburos actúan sobre las plantas es complejo. La toxicidad es por contacto directo y por efectos indirectos mediados por la interacción de los hidrocarburos contaminantes con los componentes bióticos y abióticos del suelo.

Los efectos indirectos de los hidrocarburos contaminantes en el suelo se originan por el consumo de éstos por microorganismos, lo que provoca una privación de oxígeno

para la raíz de la planta ya que se utiliza para oxidar al hidrocarburo. Además, a causa de la degradación de petróleo por microorganismos, éstos también compiten con las plantas por los nutrientes minerales.

La toxicidad por contacto directo se produce por el efecto solvente de los hidrocarburos de bajo punto de ebullición sobre la estructura de la membrana celular, la cual se rompe y disuelve en éste. Esta toxicidad se puede ordenar de la siguiente manera, en forma decreciente:

monoaromáticos>olefinas>naftalenos>parafinas

Los hidrocarburos afectan también a la estructura física del suelo, disminuyen su capacidad para almacenar humedad y aire. Los intermediarios metabólicos de la degradación de hidrocarburos en el suelo pueden incrementar temporalmente la toxicidad de estos contaminantes. Estos productos de su degradación incompleta, incluyen ácidos fáticos, fenólicos y materiales terpenoides, todos éstos tienen propiedades fitotóxicas. El efecto de este tipo de contaminantes sobre la planta depende mucho de su forma (aromático, cíclico o alifático) lo que implica la rapidez o la lentitud para degradarlo además, también influye la cantidad de hidrocarburos presentes, el tipo de suelo y el tipo de plantas presentes en el sitio de la contaminación (Wise y Trantolo, 1994).

II.3. Rizósfera

El ciclo de vida de una planta tiene efectos profundos en los procesos químicos, físicos y biológicos que se presentan en la vecindad inmediata donde ésta se encuentra. Las plantas alteran profundamente el suelo que tienen alrededor, al adquirir agua, nutrientes y al fenecer. Las raíces en particular, tienen un papel relevante en el área de suelo que ocupan (Cunningham y Ow, 1996).

Una gran variedad de organismos son capaces de existir por la influencia de las comunidades vegetales, en niveles intermedios de perturbación o estrés. Las raíces son un medio de absorción de los nutrientes y agua presentes en el suelo, tienen la función de sostén para la planta; presentan, además, una gran influencia para modificar de forma muy importante el área donde están. A esta área se le conoce como la rizósfera. La rizósfera es el volumen de suelo influenciado por las raíces de las plantas y sus comunidades

microbianas asociadas (Metting, 1993). La rizósfera es un ejemplo de hábitat natural, donde los exudados estimulan la producción microbiana (Cristensen *et al.*, 1995)

En 1904 Hiltner estudió la pérdida de componentes de nitrógeno en los nódulos de leguminosas y fue el primero en mencionar el término de rizosfera. La rizósfera puede dividirse en: la endorizosfera, que son las capas celulares de la raíz misma; el rizoplano, que comprende la superficie del sistema de la raíz y la ectorizosfera, que es el área alrededor de la raíz. Los microorganismos interactúan con el componente físico del ambiente de las raíces, y el resultado altera la naturaleza física del suelo. Además, tiene entrada y salida de energía y biomasa (Lynch, 1990)

La forma como las raíces ejercen su influencia en el suelo y en los microorganismos se da por su forma de crecimiento. Al crecer, el ápice de la raíz surge de un grupo de células que forma parte del meristemo medio de la raíz o está separado de él. El ápice de la raíz produce mucilago (Salisbury y Ross, 1992).

El mucilago va quedando en la parte posterior de la parte apical de la raíz y a su alrededor, conforme ésta crece. En ese sitio, el mucilago desarrolla un papel central en la adhesión de partículas del suelo, sobre los microorganismos y actúa como una fuente nutritiva para estos últimos. Estos exudados, que sirven como sustrato, tienen la tendencia a estimular la biomasa microbiana y fúngica en sus raíces, con las que forma asociaciones (Cristensen *et al.*, 1995). De esta forma las raíces afectan las propiedades de su propio ambiente, alteran el pH, la composición del suelo, aire y actividad microbiana dando como resultado un microambiente muy diferente en la rizósfera, comparada con el del resto del suelo (Wild, 1993).

Las razones para utilizar el ambiente de la rizósfera para la degradación de hidrocarburos son las siguientes:

*Muchas plantas consumen O_2 del suelo y liberan CO_2 , sin embargo, las plantas con un aerénquima bien desarrollado liberan O_2 de su raíz dentro de la rizosfera y actúa como aceptor de electrones facilitando con su presencia la utilización de los hidrocarburos como fuente de carbono por las bacterias.

*La absorción de agua y nutrimentos por la raíz crea gradientes de potencial de agua y produce concentraciones de nutrimentos en la superficie de la raíz. Lo cual ayuda a sostener la población bacteriana.

*Con el fin de mantener un balance de cargas dentro de la planta y el pH del ambiente, se intercambia una proporción de cationes (C) y aniones (A) con influencia de la raíz, para esto se excretan hacia la rizosfera protones, iones de calcio (Ca^{2+}) o iones nitrato (NO^{-3}).

- Si se produce una entrada de $\text{C} > \text{A}$, se excretan protones y el pH de la rizosfera decrece
- Si se produce una entrada de $\text{C} < \text{A}$, se excretan iones de calcio y el pH de la rizosfera se incrementa. Estos cambios, evitan en cierta medida cambios bruscos que afecten las poblaciones microbianas.

*Las raíces de muchas especies de plantas desarrollan asociaciones con bacterias (nódulos) y/u hongos (micorrizas). Aunque los hongos no se abordan en el presente trabajo, algunas especies de estos pueden degradar también compuestos orgánicos como los hidrocarburos.

*Las sustancias orgánicas liberadas de las raíces (exudados), además de estimular el crecimiento de microorganismos, también pueden afectar directamente la entrada por las raíces de nutrientes entre otros, hierro y manganeso (Wild, 1993).

Para la proliferación y sobrevivencia de los microorganismos en la rizósfera, la disponibilidad de carbono ha llegado a ser una limitante (Cheng *et al.*, 1996). Por esto, la contaminación con hidrocarburos se puede aprovechar para utilizarlos como fuente importante de carbono en un momento determinado a causa de un derrame y reducir o desaparecer la presencia de hidrocarburos en el ambiente.

Muchos de los efectos secundarios por la contaminación sobre las poblaciones del suelo en general, se presentan también sobre los microorganismos de la rizósfera. Éstos son capaces de modificar los efectos que tienen los contaminantes xenobióticos sobre las plantas. Los procesos de la rizósfera juegan un papel importante en la evolución de contaminantes ambientales. Además de su utilidad en la transformación de compuestos orgánicos y bioacumulación de metales en las plantas, también toman y transforman compuestos orgánicos, como materiales halogenados e hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) (Lynch, 1990)

Otros factores que influyen en la concentración y disponibilidad del contaminante orgánico por parte de las raíces es el movimiento de éste en el suelo, lo cual depende de

la solubilidad relativa del químico en el agua, la presión de vapor, el tamaño molecular, la carga y la presencia de otros químicos orgánicos. Las propiedades del suelo para absorber y secuestrar compuestos orgánicos, se asocian directamente con la materia orgánica contenida en el suelo, el tipo y la cantidad de arcilla presente, la estructura del suelo, el pH, así como la edad del derrame y el flujo de agua (Cunningham y Ow, 1996).

En el área de la rizósfera, los microorganismos desempeñan un papel más útil en la descomposición de muchos contaminantes orgánicos. La investigación en remediación, aunque originalmente centrada sobre la actividad microbiana, ha provisto una apreciación adicional de la capacidad degradativa de las plantas. Ya que el aislamiento de enzimas en sedimentos que tienen potencial de degradación del trinitrotolueno, condujo a descubrir que su origen estaba en la planta (Cunningham y Ow, 1996)

II.4. Toxicidad en lombrices.

Otros organismos aparte de las plantas que se utilizan como indicadores para la contaminación, se encuentran en el Orden Oligochaeta. En este Orden se localiza la clase lumbricidae al cual pertenecen las lombrices de tierra. Las lombrices desempeñan una actividad esencial en la aireación y estructuración de los suelos, contribuyen de manera importante a la fertilidad de éstos al transformar restos orgánicos (hojas muertas, heces de animales, etc.) en compuestos completamente asimilables por la planta. El número de lombrices varía considerablemente según el clima, la fauna del suelo y/o el tipo de vegetación. Los lumbrícidos aceleran la descomposición de la materia orgánica por lo cual desempeñan un papel muy importante en la dinámica de la ecología del suelo facilitando el crecimiento vegetal.

Aunque la porosidad del suelo no aumenta necesariamente con la acción de estos animales, especialmente si ya es elevada desde un principio, la capacidad de infiltración y de retención de agua del suelo si aumentan considerablemente

La destrucción de lumbrícidos provoca la acumulación de materia orgánica escasamente descompuesta en la superficie del suelo, un descenso rápido en la capacidad de giltración del agua y una mengua de la calidad estructural de los suelos El estudio de la biología de los oligoquetos proporciona información muy valiosa, ya que su presencia indica la fertilidad del medio y permite deducir las características del funcionamiento

ecológico de los suelos. Se obtiene además, información que se refiere al grado de contaminación del medio terrestre por microcontaminantes orgánicos, como compuestos organoclorados y metales pesados (Moody *et al.*, 1995).

En ecosistemas tropicales las lombrices de tierra ingieren una gran cantidad de suelo mineral, materia orgánica del suelo, residuos de la superficie y producen residuos que depositan bajo el suelo y sobre la superficie. El desarrollo del perfil del suelo puede ser influenciado por las lombrices de tierra, así como de las capas superficiales del mismo. La comparación entre el suelo que ha pasado a través del tracto digestivo de la lombriz y el suelo que no lo hace, indica que el pasaje a través del intestino de la lombriz da por resultado un incremento en el contenido de bacterias. Esto aumenta la respiración microbiana, la nitrificación y la denitrificación. También puede tener un mayor contenido en residuos orgánicos que el resto del suelo, lo que indica que la actividad microbiana es estimulada por su paso en el intestino (Daniel y Anderson, 1992). De esta manera las lombrices de tierra tienen influencia sobre los procesos biogeoquímicos en el suelo (Bohlen *et al.*, 1995).

El efecto que tienen las lombrices sobre la calidad del suelo ha incrementado el interés para el desarrollo de bioindicadores fácilmente medibles que sean sensitivos a perturbaciones (Wardle *et al.*, 1996). En la investigación sobre la contaminación del suelo, las lombrices se propusieron como "organismos monitores" para muchos contaminantes por su importancia en la función del suelo y por su alta biomasa (Black y Susser, 1992). Una de las pruebas utilizadas es la LC50 diseñada por la Organización para la cooperación económica y el desarrollo (OECD por sus siglas en inglés), para evaluar la toxicidad de productos químicos.

Estas pruebas tienden a producir un resultado más consistente y reproducible que las pruebas de campo por el conocimiento del número utilizado de lombrices de una sola especie y la concentración conocida del contaminante. Sin embargo, tales ensayos de laboratorio se han aplicado a un amplio intervalo de tipos de suelo con una gran diferencia de capacidad de adsorción para químicos. Así que la LC50 difiere considerablemente en los experimentos (Clive y Bater, 1992). A pesar de esto, las lombrices pueden usarse como un indicador para predecir el efecto de químicos sobre otros invertebrados en un suelo particular.

II.5. Ventajas y desventajas de utilizar la biorremediación en el tratamiento de suelos contaminados

Para el éxito de un tratamiento de biorremediación, el peso de la degradación del contaminante debe caer sobre la capacidad microbiológica propia del suelo. Además, se debe favorecer un crecimiento apropiado de microorganismos en el ambiente y, para esto, contar con un diseño apropiado que proporcione las condiciones óptimas de aireación y nutrimentos principalmente.

La mayor ventaja es que es un proceso natural. La biorremediación es teóricamente útil para la destrucción completa de una amplia variedad de contaminantes. En la práctica, al llegar el contaminante a un nivel más bajo que otros compuestos orgánicos más fácilmente asimilables como fuente de carbono, los microorganismos dejan de consumir a los hidrocarburos.

Los métodos *in situ* ofrecen el potencial para remediar suelo contaminado sin excavar y pueden ser implantados en la profundidad de éste y a su alrededor, aún existiendo construcciones, tuberías y superficies pavimentadas, lo que facilita la limpieza de derrames en gasolineras y/o depósitos. Evitando así la migración de estos contaminantes.

Aunque la biorremediación tiene una gran importancia y ventajas distintivas para el tratamiento de suelo contaminado, presenta desventajas substanciales. La principal, es que después de utilizar los microorganismos un hidrocarburo en particular, se vuelven muy específicos y no utilizan otro.

Los casos en que la contaminación es reciente tal como se presenta inmediatamente después de un derrame, existe la gran oportunidad para capacitar microorganismos que estarán ausentes o muy reducidos en su número, es decir, tomar a éstos y acoplarlos a hidrocarburos semejantes a los del derrame y producir inóculos para incorporarlos al suelo contaminado (Metting, 1992).

En otros casos se presentarán microorganismos con capacidad de degradación, pero en un bajo número para efectuar una limpieza exitosa en un corto periodo de tiempo o simplemente las condiciones son desfavorables para su actividad y proliferación.

Regularmente no todos los componentes xenobióticos son susceptibles a una biodegradación rápida y completa. Se requiere conjuntar diversos factores para su éxito, incluyendo la presencia de poblaciones microbianas metabólicamente capaces de degradar al contaminante, condiciones favorables en el ambiente para su crecimiento como la composición y las propiedades del suelo además de concentraciones favorables de sustrato y nutrimentos (Metting, 1992).

II.6. La química de la biodegradación

II.6.1. Procesos de biodegradación para hidrocarburos alifáticos y aromáticos

Los criterios que deben presentarse para satisfacer una biodegradación efectiva son:

- 1.- La presencia de microorganismos o consorcios microbianos capaces de realizar la biodegradación
- 2.- Disponibilidad del contaminante de interés para los microorganismos
- 3.- Proveer de un medio favorable para los microorganismos

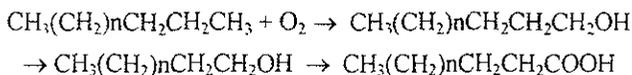
Los atributos de los hidrocarburos alifáticos a tomar en cuenta para su degradación incluyen

- 1 - Las cadenas largas de n-alcános son transformadas más lento que las cortas.
- 2 - Debido a que son hidrocarburos saturados son más fácilmente degradados que sus análogos no saturados.
- 3.- El grado de ramificación está inversamente relacionado a la tasa de degradación.
- 4 - Los hidrocarburos alifáticos recalcitrantes son comúnmente compuestos altamente metilados.
- 5 - Los hidrocarburos cíclicos son degradados siguiendo una oxidación inicial del anillo degradándolo por la misma vía utilizada para los hidrocarburos alifáticos.

II.6.2. Degradación de hidrocarburos alifáticos

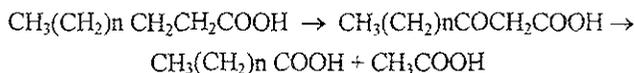
La oxidación es un proceso mediante el cual los microorganismos degradan los hidrocarburos a través de una serie de etapas (Alexander, 1980) que como resultado producen alcohol, aldehído y finalmente un ácido graso

REACCIÓN 1



Esto se lleva a cabo bajo la presencia de oxígeno. El ácido graso se descompone por beta-oxidación, donde se eliminan dos carbonos de la cadena terminal y se transforma en ácido acético

REACCIÓN 2



De este modo se degrada el ácido acético para producir carbono y energía, el ácido graso restante ahora con dos carbonos menos, sufre repetidas veces una etapa similar degradativa al de la reacción uno y es fragmentado para su uso en la célula

Muy raramente los productos intermedios de la degradación llegan a tener concentraciones altas, excepto en organismos que presentan cometabolismo. Éstos fragmentan las cadenas sin llegar a utilizarlas como fuente de carbono, dando lugar a cadenas más cortas, pero a una mayor concentración de metabolitos que pueden resultar tóxicos para las bacterias mismas (Alexander, 1994).

II.6.3. Degradación de hidrocarburos aromáticos

La ruptura de anillos aromáticos involucra monooxigenasas y dioxigenasas. Las bacterias relacionadas con la descomposición de estos compuestos presentan una distribución amplia y además utilizan una diversidad enorme de sustancias orgánicas. Todos los hidrocarburos aromáticos presentes naturalmente en el ambiente y varios de los que se sintetizan en laboratorio pueden ser metabolizados por microorganismos.

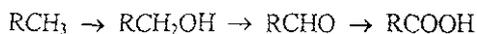
La degradación de hidrocarburos aromáticos se puede clasificar con base en los compuestos intermedios comunes, los cuales se metabolizan siguiendo procesos

esencialmente semejantes. Los intermediarios más comunes son el catecol, el ácido protocatéquico y en menor grado el ácido gentisínico .

La primera fase es la modificación o eliminación de sus sustituyentes en el anillo bencénico y la introducción de grupos hidroxilo (OH).

Los grupos metilo son convertidos a grupos carboxilo antes de la ruptura del anillo, esta reacción se realiza gradualmente (aunque a veces el metilo no es eliminado antes de que el anillo sea abierto).

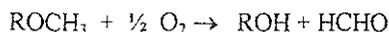
REACCION 3



El carboxilo no siempre es eliminado antes de la ruptura del anillo

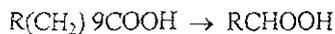
El metoxilo es reemplazado por un hidroxilo (OH) y da lugar a formaldehído.

REACCIÓN 4



Las cadenas alifáticas largas son acortadas para producir un residuo con dos átomos de carbono menos, esto ocurre generalmente por beta-oxidación

REACCIÓN 5



Los tres intermediarios centrales son degradados por cinco vías metabólicas muy semejantes. Los cinco productos de esta fase (ácido succínico, fumárico, pirúvico, acético y el acetaldehído), son fácilmente utilizados por la célula.

III. Objetivo.

III.1 Objetivo general

Analizar la toxicidad, biorremediación y fito-biorremediación de un suelo contaminado manualmente con hidrocarburos (diesel)

Objetivos particulares

a) Determinar el comportamiento del contaminante en un suelo sin agregar microorganismos.

b) Estimar el efecto de la contaminación del suelo por diesel en sobre la germinación y primeros estadios de crecimiento de maíz y alholva

c) Describir el efecto del suelo contaminado sobre los organismos invertebrados (lombrices)

d) Evaluar la sobrevivencia y crecimiento en suelo contaminado de *H. rarunculoides*, así como la influencia de las raíces de la misma en la concentración de diesel en el suelo.

IV. Materiales y métodos

IV.1. Preparación del suelo y obtención de parámetros

El suelo se colectó en marzo de 1997 de una profundidad de 0 a 15 cm, perteneciente a las instalaciones del edificio “E” de la Facultad de Química. Se secó a temperatura ambiente y se tamizó a un tamaño de grano de 2mm. Se colectaron 60 kg y se guardaron en un recipiente de plástico (de un volumen aproximado de 80 kg) a 4°C de temperatura. Este suelo se utilizó para todos los experimentos.

La razón de utilizar este suelo fue para observar el efecto de un contaminante conocido utilizando concentraciones controladas. Se aplicaron varios intervalos de contaminación (5 000 partes por millón [ppm], 10 000 ppm, 15 000 ppm, 20 000 ppm además de un control de suelo sin contaminar).

Se obtuvieron los parámetros edáficos. En primer lugar se determinó el tamaño de partículas del suelo. Para el estudio de biorremediación, se obtuvo semanalmente la pérdida de peso por humedad del suelo, la pérdida por ignición, el pH y la respiración bacteriana natural e inducida del suelo. Además, de la cuantificación de hidrocarburos (utilizando el equipo soxhlet para extraerlos y cromatografía de gases para cuantificarlos), esto último se realizó también para el estudio con la rizósfera.

IV.1.2. Parámetros físicos

IV.1.2.1. Determinación del tamaño de partículas

En caso de que el suelo presentara un contenido orgánico del 5% o menor, el método no requiere un tratamiento preliminar. Si tuviera de un 5% a 15% de materia orgánica se necesitara realizar un tratamiento previo con peróxido de hidrógeno para su oxidación. Este método no puede aplicarse a muestras con un contenido orgánico más grande del 15%. Este tratamiento se realizó porque la materia orgánica puede interferir en la disociación de las partículas, y originar errores en los resultados de la determinación del tamaño de partículas.

Procedimiento: Se mezclaron 10 g de suelo seco con 25ml de una solución de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ (0.1mol/L) y se dejaron reposar por 8 h, después, se le adicionaron 200 ml de agua destilada y se agitó la solución por 6 h, procediendo a tamizar (tamiz de 63 μ) agregando agua destilada. No es necesario adicionar más de

200 ml de agua. Se obtuvo la cantidad de la fracción retenida utilizando la determinación de masa seca. La solución con partículas más pequeñas a 63μ del análisis de sedimentación se tomó y se transfirió a una probeta de 1000 ml. Después de homogeneizar la solución, se coloca a temperatura constante (20°C). A los intervalos de tiempo mostrados se removieron 20 ml de la suspensión a una profundidad de 10 cm de la superficie. Se utilizó la masa seca de estas muestras de 20 ml, para calcular el tamaño de las diferentes fracciones.

El intervalo de tiempo a que se remueven es:

$63\mu - 20\mu$	29 seg
$20\mu - 10\mu$	4 min
$10\mu - 6\mu$	18 min
$6\mu - 2\mu$	51 min
$< 2\mu$	1h 40 min

IV.1.2.3. Pérdida de peso por humedad higroscópica.

Se colocaron 10 g de suelo en crisoles a peso constante. Esto se hizo colocando los crisoles en la estufa a 105°C por 24 h y se dejaron enfriar en un desecador. Posteriormente se les adiciono el suelo y se colocaron en la estufa a 105°C por 24 h y se pesaron en una balanza analítica

$$\%PS = \frac{(PSC - PC)100}{PSH}$$

Donde.

PS=Peso seco

PSC=Peso seco del crisol.

PC=Peso del crisol inicial.

PSH=Peso húmedo del suelo

IV.1.4. Pérdida de peso por ignición.

Se pesaron 10 g de suelo en crisoles a peso constante y posteriormente se colocaron en la mufla a 550°C por 8 h, el suelo adquiere un color rojizo. Después se colocaron en un desecador para enfriarse y se obtuvo su peso por medio de una balanza analítica

$$\%MO = \frac{(PSC - PC)100}{PSH}$$

Donde.

MO=Materia orgánica

PSC= Peso seco del crisol

PC= Peso del crisol inicial

PSH Peso húmedo del suelo.

IV.1.5. pH. Relación 1:25

Se colocaron 10 g de suelo dentro de vasos de precipitado, se les adicionó 25 ml de una solución de $CaCl_2$ a 0.01 M y se les mezcló por dos horas. Posteriormente se obtuvo la medida utilizando un electrodo de pH (potenciometro WTW).

IV.1.6. Capacidad Máxima de Retención de Agua.

Se colocó un embudo de porcelana de 17 cm de diámetro dentro de un vaso de precipitado. En el embudo se colocó una hoja de papel de aluminio y entonces se llenó de arena, se saturó con agua y se colocó encima una tela mojada. Entonces, sobre el embudo con arena se preparo un cilindro de 4 cm de diámetro, y se le cerró de un lado con tela de poliéster, se le introdujeron 400 g de suelo y se cerró con parafilm. Después se colocó en un baño de agua que llegó hasta 1 cm por debajo del nivel de la superficie del suelo colocado dentro del cilindro y se esperó una hora. Posteriormente se colocó el cilindro sobre el embudo preparado anteriormente y se esperó. Finalmente, se peso el cilindro nuevamente.

$$100 - \%PS = \%CASS$$

$$(PFSH - PC - PMS)100 / PMS = \%CAC$$

$$(CASS + CAC) / PS = g H_2O / g PS$$

Donde:

PS= Peso seco.

CASS=Contenido de agua del suelo seco.

CAC=Contenido de agua de

PFSH=Peso final del suelo húmedo

PC=Peso del cilindro.

PMS=Peso de la muestra del suelo.

Parámetros Químicos

IV.1.7. Extracción de hidrocarburos por Soxhlet

Se utilizaron 10g de suelo el cual se mezcló con la misma cantidad de Na_2SO_4 (para evitar la humedad) en un tubo de extracción de celulosa. El tubo se introdujo dentro de un extractor Soxhlet de 50 ml y se adicionaron 50 ml de CH_2Cl_2 . El extractor Soxhlet se conectó a un refrigerante con una temperatura de 3°C . El procedimiento de extracción finalizó después de 24 h. Las sustancias polares fueron removidas del extracto, por adsorción utilizando Al_2O_3 (8 g). El extracto se concentró con un rotavapor y fue aforado a 25 ml.

IV.1.8. Análisis de Hidrocarburos por Cromatografía de Gases

Se obtuvo la concentración de hidrocarburos por medio de la alteración del espectro del contaminante, debido a su degradación por la actividad microbiana, la cual metabolizó los hidrocarburos. Se utilizó un cromatógrafo de gases con un detector de ionización de flama (GC/FID) para monitorear la degradación de diesel.

Información sobre el cromatógrafo utilizado

Cromatografo de Gases: Perkin Elmer

Columna: HP-Ultra 1, Enlaces de goma de metil silicon, 25m * 0,32 mm * 0,52 μc

Detector: FID

Inyección manual

Volumen de inyección: 1 μl

Gas Acarreador: Helio

Programa de temperatura: T° inicial 40°C por 5 min. Posteriormente un incremento de 1°C por min hasta 240° . T° del inyector 250° . T° del detector 300°C

Parámetros Biológicos del Suelo.

IV.1.9. Producción de CO_2 (respiración natural)

Se pesaron 20 g de suelo dentro de pequeños receptáculos de poliéster (de 15 cm diámetro) cada uno se colocó dentro de frascos de 250 ml con 20 ml de una solución de NaOH al 0.05 N y se cerraron apropiadamente (sí es necesario con parafilm). Se incubaron a 25°C por 24 h. Después se les adicionó 2 ml de una solución de BaCl_2 (1M) y el CO_2 absorbido se precipitó (como BaCO_3), entonces el NaOH del frasco se tituló con una solución de HCl al 0.05N utilizando como

indicador fenolftaleína al 70%. Los testigos se obtuvieron por el mismo procedimiento pero sin muestra de suelo

$$\text{mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS} \cdot 24\text{h}^{-1} = \frac{(\text{HCl C} - \text{HCl E})(1.1)(100)}{(\text{PSH})(\text{MS})}$$

Donde:

MS=Masa seca

HCl C=ml de HCl en el control

HCl E=ml de HCl experimental.

PSH=Peso del suelo húmedo.

IV.1.10. Producción de CO₂ agregando glucosa (respiración inducida)

Se realizó de forma similar a la natural pero se le adicionó 0.4% de D(+) glucosa al suelo.

$$\text{mg CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ MS} \cdot 24\text{h}^{-1} = \frac{(\text{HCl C} - \text{HCl E})(1.1)(100)}{(\text{PSH})(\text{MS})}$$

IV. 2. Remediación en contenedores en condiciones de campo

IV.2.1. Contaminación del suelo.

La prueba de remediación se realizó de la siguiente forma:

El suelo se contaminó con 20 000 mg/kg de diesel disueltos en dietil éter para obtener una distribución homogénea del contaminante y obtener la contaminación deseada en los 13 kg de suelo (por duplicado)

El suelo contaminado a 20 000 ppm con diesel para el experimento de remediación se colocó en 2 contenedores. La aireación, temperatura y contenido de agua estuvieron bajo condiciones de campo. El contenido de agua se ajustó aproximadamente a un 75-80% de la capacidad de campo, la aireación se llevó a cabo de forma manual y diaria (una vez al día)

La remediación se controló semanalmente midiendo la humedad, la pérdida de peso por ignición, pH, la producción de CO₂ (respiración natural e inducida) e identificación y concentración de hidrocarburos. Los resultados obtenidos son la media de muestras por duplicado

Para las pruebas de toxicidad y fitorremediación se contaminaron 5 kg de suelo utilizando 20g de diesel mezclado en 1 litro de dietil éter para obtener una distribución homogénea del contaminante en el suelo. Después se añadió una parte de este suelo a suelo no contaminado para obtener las diferentes concentraciones utilizadas en los experimentos

IV.3. Evaluación Ecotoxicológica.

IV.3.1 Pruebas de inhibición de crecimiento en plantas

El procedimiento de trabajo se realizó de acuerdo a la guía OECD 208

Las semillas que se utilizaron fueron las siguientes.

Maíz *Zea mays*.

Alholva *Trigonella foenum graecum*.

Los experimentos se llevaron a cabo (con tres réplicas) a concentraciones de 0.ppm (control), 5 000 ppm, 10 000 ppm, 15 000 ppm, y 20 000 ppm respectivamente. Las semillas de maíz y las de alholva (10 en cada repetición) fueron expuestas a las diferentes concentraciones de contaminación. Los experimentos de crecimiento se llevaron a cabo bajo las condiciones ambientales en el jardín y con una irrigación controlada de 25 ml de agua, dos veces al día. Después de 4 semanas, las plantas se cosecharon y separando raíz de tallo. Se obtuvo el peso fresco y el peso seco de ambas partes de la plantas, también se midió la longitud y se contó su número de hojas.

Para establecer si existe o no una diferencia, entre las longitudes de tallo y raíz, en las diferentes concentraciones de contaminación, se realizó la prueba de análisis de varianza de Turkey (utilizando el paquete estadístico Anova-Manova [$p < 0.05$])

$$\text{ITR} = \frac{\text{peso seco de la raíz en suelo contaminado}}{\text{peso seco de la raíz en suelo no contaminado}}$$

$$\text{ITT} = \frac{\text{peso seco del tallo del suelo contaminado}}{\text{peso seco del tallo del suelo no contaminado}}$$

Donde:

ITR Índice de tolerancia de la raíz.

ITT = Índice de tolerancia del tallo.

IV.3.2. Pruebas de Toxicidad Aguda en Lombrices de Tierra

El procedimiento de trabajo se realizó de acuerdo a la guía OECD 207(1984). Donde LC 50 se refiere a la concentración media letal. Es decir, la concentración de la sustancia prueba que mata al 50% de los animales utilizados en la prueba.

Las lombrices utilizadas procedieron de un jardín diferente al del suelo colectado y fueron aclimatadas al suelo de la prueba por 5 días. Se utilizaron 10 lombrices en cada prueba, en frascos de 1000 ml con 500 g de suelo contaminado y por triplicado. Los niveles de contaminación fueron de 0 ppm (control), 5 000 ppm, 10 000 ppm, 15 000 ppm, y 20 000 ppm de diesel. Durante la duración del experimento (2 semanas) el suelo se mantuvo en iluminación constante para que las lombrices permanecieran siempre en contacto con el suelo. A los 7 y 14 días se determinó la mortalidad.

IV.4. Fito-biorremediación

Este experimento se basó en la guía OECD 280 para toxicidad en plantas pero con las modificaciones requeridas para adaptarlo al objetivo de este apartado.

Los experimentos se llevaron a cabo (con tres réplicas) a concentraciones de 5 000 ppm, 10 000 ppm, 15 000 ppm, 20 000 ppm respectivamente y dos controles de suelo, uno contaminado a las diferentes concentraciones sin plantas y otro sin contaminar con plantas. La planta *Hydrocotyle ranunculoides* fue expuesta a las diferentes concentraciones. El experimento se llevó a cabo bajo condiciones ambientales y con una irrigación controlada de agua, para mantener una humedad constante (agregando de 20 a 30 ml de agua según el grado de evaporación).

Después de 7 semanas se cosecharon las plantas y se obtuvo peso húmedo y seco (colocándolas en un horno por 48 h a 70^o C), además, se midió la longitud de raíces y del tallo. Se estimó la concentración del contaminante en el área de influencia de la rizósfera por medio de cromatografía de gases.

Y para establecer si existe o no una diferencia, entre las longitudes de tallo y raíz, en las diferentes concentraciones de contaminación, se realizó la prueba de análisis de varianza de Turkey.

V. Resultados.

V.1. Caracterización del suelo.

Los resultados de la caracterización física, química y biológica del suelo sin contaminar se muestran en las tablas No. 1 y No. 2.

Tabla 1 Resultados del análisis de partículas después de un tratamiento con H₂O₂

Fracción	Porcentaje de fracción	Tamaño de partícula (µm)
1	38.3	>63
2	17.5	63-20
3	10.9	20-10
4	7.2	10- 6
5	4.5	6-2
6	21.5	< 2

De acuerdo al criterio de la Sociedad Internacional de la Ciencia del Suelo (ISSS por sus siglas en inglés) para la clasificación de la textura de suelos, por el tamaño de sus partículas este es un suelo franco-arcilloso. Como presenta aproximadamente un 40% de arena fina y lo demás es limo y arcilla a partes iguales, como el contenido de coloides arcillosos es elevado, su textura provoca una relativamente buena distribución de agua para su uso por plantas.

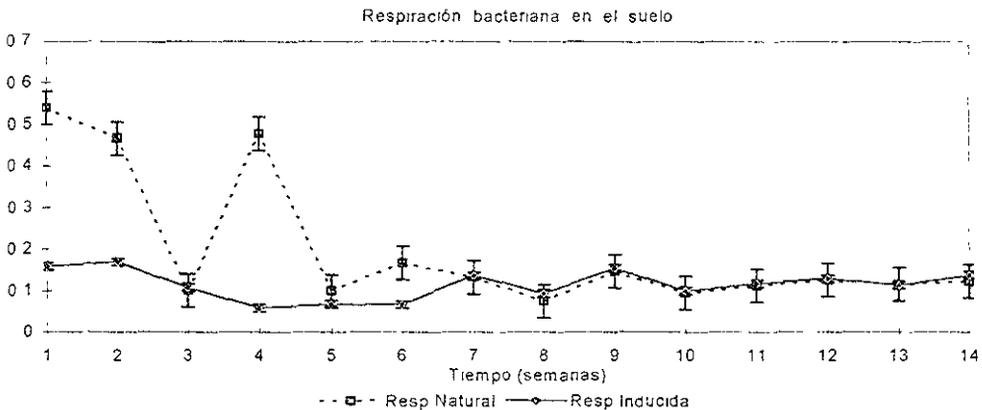
Tabla 2. Resultados de la caracterización fisicoquímica y biológica del suelo

Pérdida de peso por humedad higroscópica	6.3%
Peso seco del suelo	93.7%
Carbono orgánico del suelo (cenizas)	12.53%
pH	7.25
Capacidad máxima de retención de agua	0.422mgH ₂ O/g

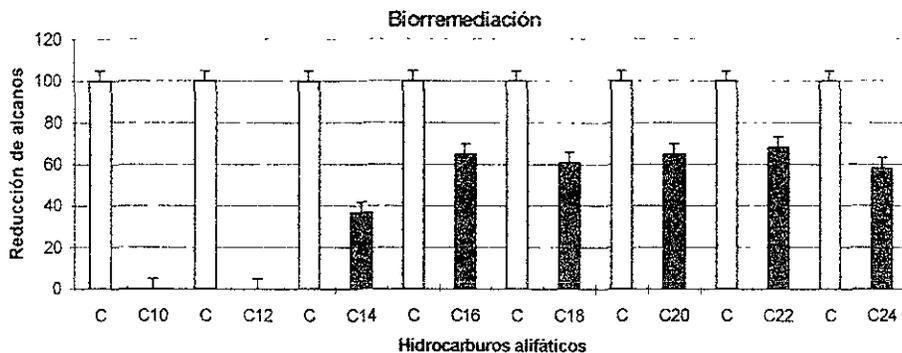
Al momento de colectarlo el contenido de humedad del suelo fue bajo, (6.3%) lo que es conveniente para poderlo, ya que la humedad requerida es del 80%. El contenido orgánico de carbono se presenta alto, lo que es favorable, y no afecta en la actividad de biodegradación y el pH se encuentra en un nivel óptimo para la actividad microbiana. La capacidad máxima de retención de agua es aceptable para su disponibilidad, ya que el mínimo para una buena actividad microbiana es del 50% de humedad, y esta capacidad de retención es moderada para su disponibilidad hacia las plantas. Aunque siempre se mantuvo la humedad en un promedio del 80%.

V.2. Biorremediación.

La actividad microbiana evaluada por su respiración; es uno de los parámetros para el seguimiento de la biorremediación. La actividad microbiana presenta variaciones en la producción de CO_2 en las primeras semanas, debido principalmente a las variaciones de temperatura durante la incubación, ya que la temperatura estuvo a más de 25°C . No se observa una variación global entre la respiración natural e inducida, siendo la segunda menor a pesar de la adición de glucosa (gráfica 1). Por otra parte, por la baja solubilidad de los alcanos en agua y ya que su tasa de degradación decrece con el aumento del peso molecular, las cadenas largas tardan más tiempo en desaparecer. Esto puede observarse con los hidrocarburos de C10 a C16 (gráfica 2) que fueron los de menor concentración. La baja reducción de C18-C20 puede deberse a una baja disponibilidad de éstos para los microorganismos por su baja solubilidad en agua y la adsorción de éstos en la matriz del suelo. Aunque también puede deberse a la longitud de cadena que los microorganismos degradan con más facilidad, ya que las cadenas más cortas son más fáciles de tomar como sustrato. Los hidrocarburos C22-C24, disminuyen notablemente, lo que se explica por la adsorción de estos compuestos en la matriz del suelo y como consecuencia, sólo una parte del contaminante puede extraerse, pues debería de presentar concentraciones más elevadas en la extracción y sucede lo contrario.



Gráfica 1. Comportamiento de la respiración natural [$EE= 0.1980\pm 0.04 \text{ mgCO}_2$], e inducida [$1.14\pm 0.009 \text{ mgCO}_2$] durante 14 semanas en contenedores de suelo

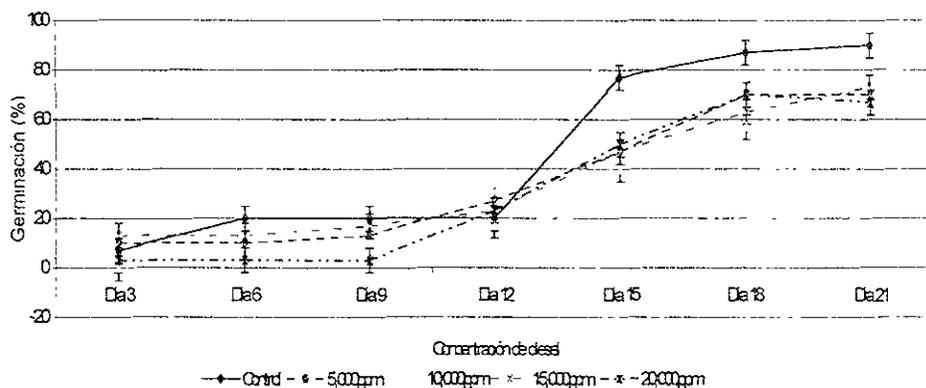


Gráfica 2. Reducción de hidrocarburos (alcanos de C10 a C22 y control C), al final del tiempo de experimentación

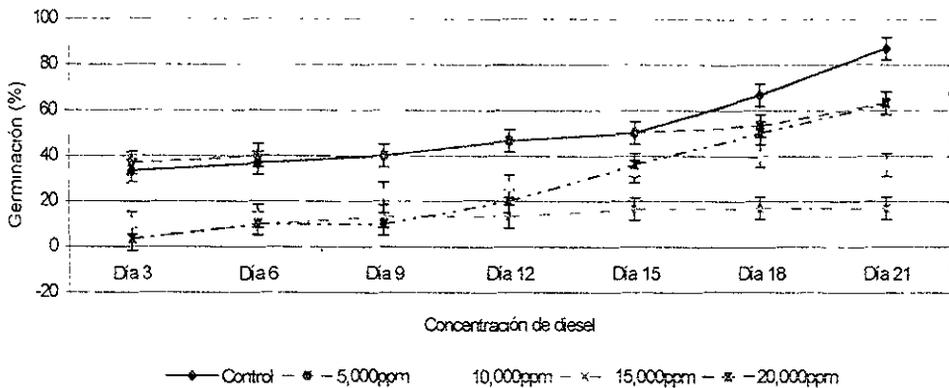
V.3. Evaluación Ecotoxicológica

V.3.1 Germinación

La germinación resultó afectada en las dos especies utilizadas. El porcentaje de germinación de *Zea mays* y de *Trigonella foenum graecum* disminuye a medida que aumenta la concentración de contaminación (gráficas 3 y 4)



Gráfica 3. Porcentaje de germinación en semillas de *Z. mays* durante 21 días en suelo contaminado (EE= día3=33±2.3, día6=49±3.21, día9=56±3.52, día12=110±1.67, día15=110±6.41, día18=347±5.02, día21=367±4.29).



Gráfica 4. Porcentaje de germinación en semillas de *T. foenum graecum* durante 21 días en suelo contaminado (EE= día3=85±7.35, día6=109±6.71, día9=126±6.38, día12=153±6.85, día15=185±6.20, día18=226±8.27, día21=266±12.13)

La germinación en *Z. mais* no se afecta por la contaminación con diesel, pero sucede lo contrario con *T. foenum graecum* ya que presenta diferencias significativas en su germinación (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Resultados del análisis de varianza.

<i>Z. mais</i>					
Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l	Cuadrado medio	F	ρ
Contaminante		4	0.093	1.076	0.417n s
Error		10	0.866		
Total		14	0.959		

Tabla 4 Resultados del análisis de varianza.

<i>T. foenum graecum</i>					
Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l	Cuadrado medio	F	ρ
Contaminante		4	12.233	9.657	0.001**
Error		10	1.266		
Total		14	13.499		

La germinación en las concentraciones de 15 000 y 20 000 ppm en *T. foenum graecum* presentan diferencias significativas, en tanto que las concentraciones de 5 000 y 10 000 ppm no presentan diferencias entre sí (Tabla 5).

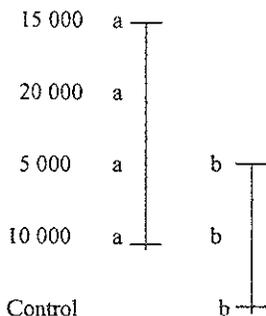


Tabla 5. Prueba de Turkey para la germinación en *T. foenum graecum*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos.

V.4.1. Índices de tolerancia en raíz y tallo.

Los efectos del daño tóxico se determinaron con la biomasa y la longitud de tallos y raíces de las plantas. En la raíz la reducción de longitud y biomasa fue similar, no así en el tallo. Las plantas reaccionaron de forma diferente al estrés provocados por el suelo contaminado.

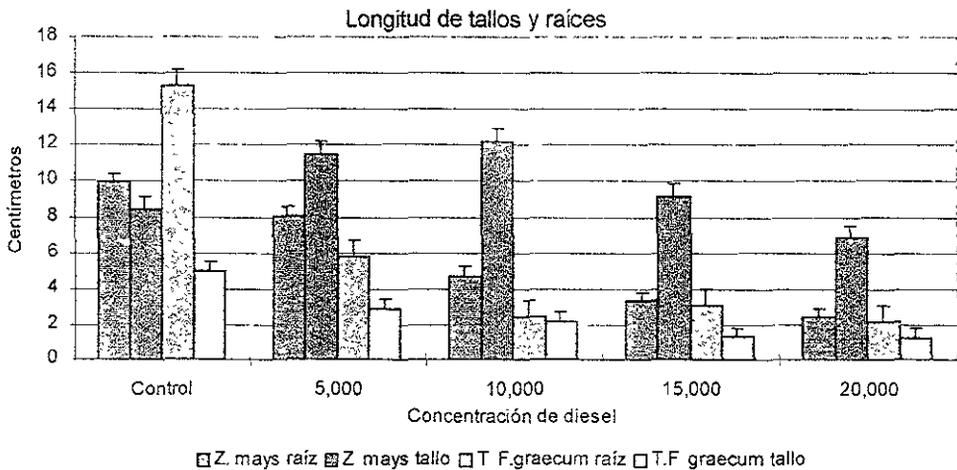
La producción de biomasa con relación a las diferentes concentraciones de diesel se evaluó utilizando los índices ITR y ITT (Tabla 6). Para *T. foenum graecum* la biomasa declina en un 68.1% en el tallo y 83.1% en raíces en presencia de diesel, a comparación de *Z. mays* que fue de un 10.4% en tallo y un 10.4% en la raíz a la concentración más elevada de diesel (20,000 ppm) [Gráfica 5].

Tabla 6. Índices de tolerancia de raíces y tallo en suelo contaminado con diesel

Concentración diesel	Maíz		Alholva	
	ITT	ITR	ITT	ITR
Control	1	1	1	1
5.000	1.04	1.04	0.401	0.427
10.000	0.998	1.001	0.272	0.231
15.000	0.905	0.905	0.111	0.183
20.000	0.896	0.896	0.319	0.169

De acuerdo a la producción de biomasa las plántulas de *Z. mays* tienen menor sensibilidad a la contaminación del suelo con diesel. Otros síntomas fueron la presencia de clorosis y la dificultad para desenvolver sus hojas en las concentraciones más altas de contaminación. De acuerdo al análisis estadístico la longitud de tallo no presenta diferencias entre las plantas del control y las que crecieron en las diferentes concentraciones de diesel (tabla 7)

En *T. foenum graecum* hubo una reducción significativa de acuerdo al análisis estadístico, en la longitud del tallo y de la raíz (tablas 12,13 y 14), una falta de nódulos en sus raíces en las tres más elevadas concentraciones de diesel. Además, en todas las concentraciones de diesel sus hojas presentaron clorosis y rugosidades en sus orillas.



Gráfica 5 Efectos tóxicos del suelo contaminado con diesel sobre el *Z. mays* y *T. foenum graecum* longitud en raíces y tallo (cm).

El maíz no presentó diferencias significativas en la longitud de su tallo, pero en la longitud de sus raíces si tiene diferencias significativas (Tablas 7, 8 y 9).

Tabla 7 Resultados del análisis de varianza (longitud del tallo)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	<i>Z. mays</i>			
		g.l	Cuadrado medio	F	ρ
Contaminante		4	9.454	1.9523	0.178n.s.
Error		10	4.842		
Total		14	14.296		

Tabla 8. Resultados del análisis de varianza (longitud de la raíz)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	<i>Z. mays</i>			
		g.l.	Cuadrado medio	F	ρ
Contaminante		4	31.026	18 5586	0.00012***
Error		10	1 671		
Total		14	32.697		

La longitud de raíces en las concentraciones de 10 000, 15 000 y 20 000 ppm en *Z. mays* presentan diferencias significativas; en tanto que las concentraciones de 5 000 y 10 000 ppm no presentan diferencias entre sí, mientras que la concentración de 5 000 ppm no presenta diferencias con el control (Tabla 5)

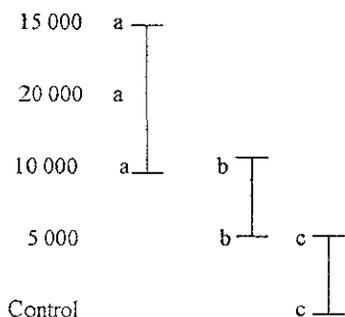


Tabla 9. Prueba de Turkey para la longitud de las raíces de *Z. mays*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\rho < 0.05$) entre tratamientos.

Alholva no presentó diferencias significativas en su longitud de su tallo, pero sí en la longitud de sus raíces, donde la diferencia es muy grande (Tablas 10, 11 y 12)

Tabla 10. Resultados del análisis de varianza (longitud del tallo)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	<i>T. foenum graecum</i>			
		g.l.	Cuadrado medio	F	ρ
Contaminante		4	5.398	3.219	0.060n.s
Error		10	1.676		
Total		14	7 074		

Tabla 11. Resultados del análisis de varianza (longitud de la raíz)

<i>T. foenum graecum</i>					
Fuente de variación	Suma de cuadrados	g l.	Cuadrado medio	F	ρ
Contaminante		4	88.906	15 6502	0.00026
Error		10	5.680		
Total		14	94 586		

La longitud de raíces en las concentraciones de 5 000, 10 000, 15 000 y 20 000 ppm en *T. foenum graecum* presentan diferencias significativas con el control, en tanto que todas las concentraciones entre sí, no tienen diferencias (Tabla 12).

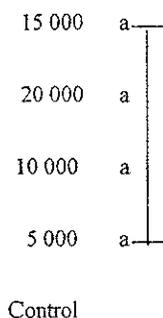
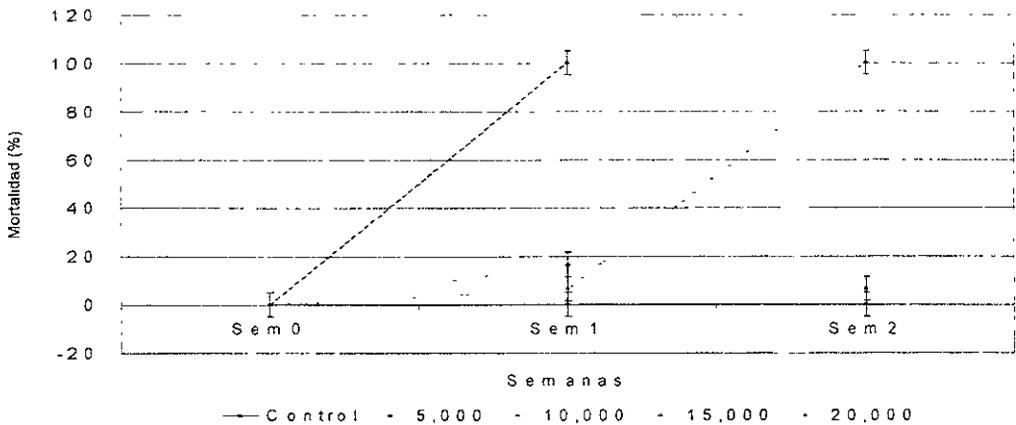


Tabla 12. Prueba de Turkey para la longitud de las raíces de *Z. mays*. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\rho < 0.05$) entre tratamientos

V.5. Toxicidad Aguda en Lombrices de tierra.

Este experimento mostró que en suelo contaminado con diesel hasta en la concentración de 5 000 ppm, la mortalidad es casi del 100% a las dos semanas.

El porcentaje de mortalidad en lombrices en la primera y segunda semana es muy alto, fluctúa entre el 6.6 y el 100% lo que es un claro indicador de la alta sensibilidad de estos organismos al diesel (Gráfica 6).



Gráfica 6 Comportamiento del número de lombrices a lo largo del tiempo, con respecto a las diferentes concentraciones de diesel

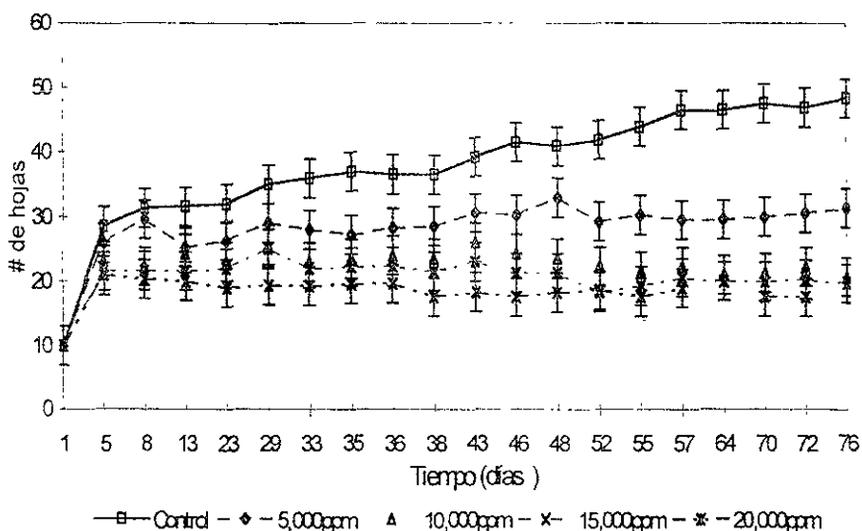
V.5. Fito-biorremediación

En *H. ranunculoides* el peso fue menor en las concentraciones más altas de contaminación, la longitud del tallo no tuvo diferencias significativas [tabla 18] pero la raíz sí [tabla 19] el número de estolones decreció a las concentraciones más altas así como la longitud de estolones y el número de nodos (tabla 13).

Tabla 13. Variables de respuesta de *H. ranunculoides*, al finalizar los 76 días de experimentación en las diferentes concentraciones de contaminación

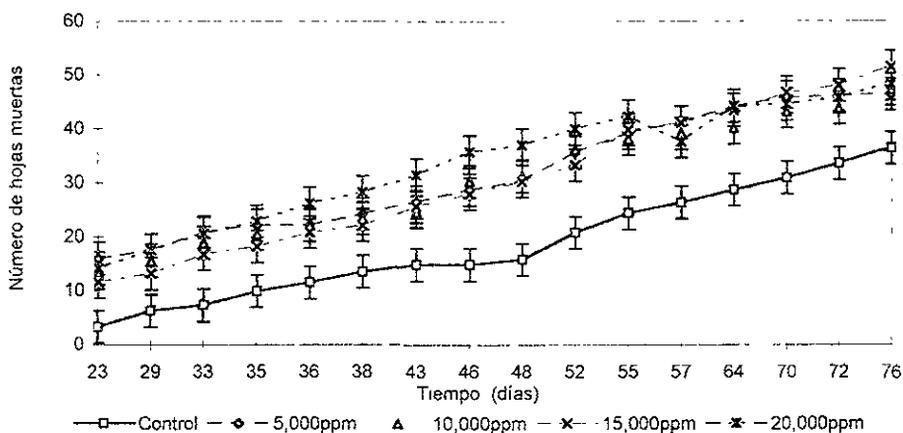
	Concentración de diesel (ppm)				
	Control	5 000	10 000	15 000	20 000
Peso húmedo (g)	23.29	18.06	11.09	16.83	10.58
Peso seco (g)	2.9	2.19	1.39	1.75	1.25
Tallo (cm)	3.71	4.26	3.63	4.03	3.97
Raíz (cm)	5.8	4.42	3.54	4.07	4.07
Número de estolones	8	8	9	7.3	7.3
Longitud estolones (cm)	18.1	15.90	11.65	11.77	9.76
Número de nodos	66.66	64	63.66	69.6	49

El número de hojas va en aumento en los primeros 5 días, en todas las concentraciones de contaminantes Después, este aumento sólo prosigue en el control en menor proporción que en los primeros días durante el tiempo que dura el experimento En el suelo contaminado el número de hojas aunque con diferencias en cantidad, siendo relativamente menor en las concentraciones más elevadas de contaminación, se mantiene constante (gráfica 7).



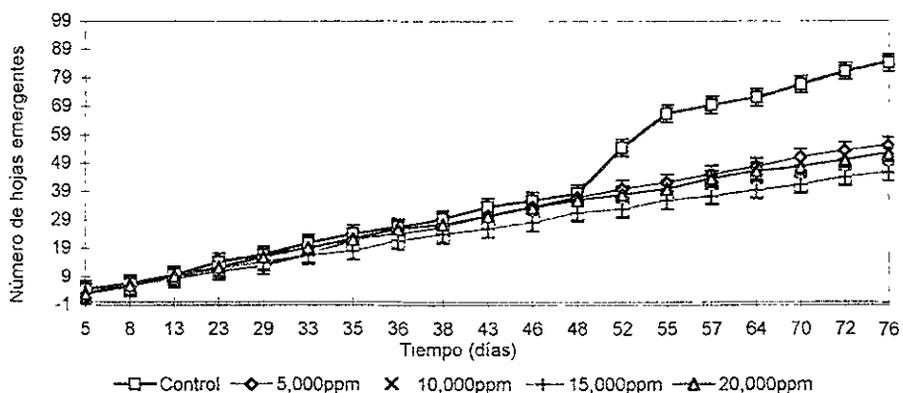
Gráfica 7. Hojas vivas adultas (acumuladas) de *H. ranunculoides* durante el tiempo de experimentación (76 días), (EE= Control=758±1.02, 5 000ppm=563±0.53, 10 000ppm=448±0.37, 15 000ppm =413±0.33, 20 000=330±0.26).

El comportamiento de la mortalidad de hojas en todas las concentraciones y en el control es similar a lo largo del tiempo, presenta poca variación entre las diferentes concentraciones de contaminantes La menor mortalidad se observa en el control (gráfica 8).



Gráfica 8. Hojas muertas (acumuladas) de *H. ranunculoides* durante el tiempo de experimentación (76 días) (EE= Control=298±2.50, 5 000ppm=508±2.65, 10 000ppm=448±2.65, 15 000ppm=491±3.18, 20 000=537±2.63).

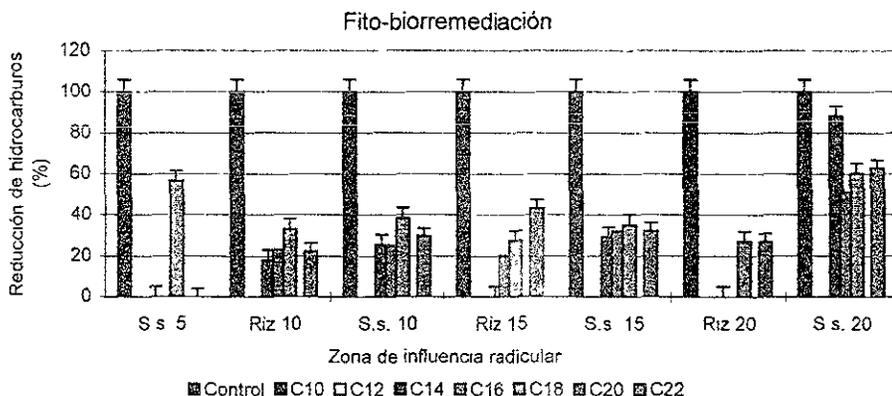
La emergencia de hojas fue similar y continua en todas las concentraciones. El control se separó hacia el día 48, donde comienza a presentar un mayor incremento en el número de hojas emergentes que con respecto a todos los tratamientos (gráfica 9).



Gráfica 9 Hojas emergentes (acumuladas) de *H. ranunculoides* durante el tiempo de experimentación (76 días) (EE= Control=765±3.12, 5 000ppm=566±1.95, 10 000ppm=500±1.56, 15 000ppm=486±1.52, 20 000=559±1.78).

En cuanto a la disminución en la concentración de hidrocarburos alifáticos debido a la presencia de plantas, se observa un alto porcentaje de su disipación en el área de influencia de la rizósfera comparado con el área fuera de la influencia de la rizósfera. El

100%, representa la cantidad de hidrocarburos presentes en el suelo sin presencia de plantas al final del experimento). También se observa la comparación entre los hidrocarburos presentes en el área de la rizósfera y del suelo superficial [s.s] (ya que hubo tendencia de los hidrocarburos alifáticos a subir a la superficie debido a la irrigación del suelo, por ser inmiscibles en el agua y por tener menor densidad que ésta (Gráfica 10)



Gráfica 10 Concentración de hidrocarburos alifáticos en el suelo en el último día, al final del experimento (76 días). Donde s.s.=suelo superficial, Riz=rizósfera, 5 =5 000, 10 =10 000, 15 =15 000 y 20 =20 000ppm.

La longitud de tallos de *H. ranunculoides* no presenta diferencias significativas, sin embargo en la longitud de raíces sí las presenta (Tablas 14, 15 y 16)

Tabla 14 Resultados del análisis de varianza (longitud del tallo).

<i>H. ranunculoides</i>					
Fuente de variación	Suma de cuadrados	g.l.	Cuadrado medio	F	p
Contaminante		4	0.5155	0.6251	0.6552ns
Error		10	0.8245		
Total		14	1.3400		

Tabla 15. Resultados del análisis de varianza para la longitud final de raíces de *H. ranunculoides*

<i>H. ranunculoides</i>					
Fuente de variación	Suma de cuadrados	g l	Cuadrado medio	F	ρ
Contaminante		4	0.8243	4.3936	0.0262*
Error		10	0.1876		
Total		14	1.0119		

La longitud de raíces en las concentraciones de 10 000, 15 000 y 20 000 ppm de *H. ranunculoides* presentan diferencias significativas. En tanto que la concentración de 5 000 ppm no presenta una diferencia con las demás concentraciones de suelo contaminado, aunque no tiene una diferencia significativa con el control (Tabla 5)

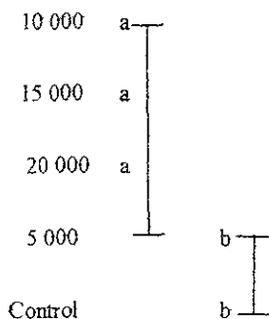


Tabla 9. Prueba de Turkey para la longitud de las raíces de *H. ranunculoides* de Letras diferentes indican diferencias significativas ($\rho < 0.05$) entre tratamientos.

VI. Discusión

VI.1. Remediación.

Para obtener éxito en la biorremediación *in situ*, se requiere lograr una correlación entre el decremento en la concentración del contaminante con la actividad microbiana

Una forma de evaluar el desempeño de los microorganismos en la toma de hidrocarburos como fuente de carbono es el monitoreo de consumo de CO₂, lo cual es importante para observar y saber cómo se desarrolla la mineralización (Hess, Schmidt y Coloks, 1996), ya que su producción es proporcional a la cantidad de sustrato utilizado (Sharabi y Bartha, 1993).

La producción de CO₂ a pesar de mantenerse constante, denotando la presencia y actividad de microorganismos a un nivel bajo comparado al reportado por Santer (1997) en un estudio similar, implica una degradación lenta del diesel. Esto puede deberse también a que la disponibilidad del contaminante para su degradación puede limitarse por la presencia elevada de arcilla en la matriz del suelo (Huesmann, 1995) no obstante, se obtuvo un medio para la degradación de hidrocarburos monitoreando y controlando parámetros fisicoquímicos y biológicos del suelo, como se observó con las cadenas de bajo peso molecular, es decir las más cortas (Colombo, Cabello y Arambarri, 1996) El alto contenido de cadenas largas respecto de las cadenas cortas, de hidrocarburos alifáticos, puede deberse a una baja disponibilidad de éstos para los microorganismos o puede deberse a que no fueron metabolizados por los microorganismos que degradan la fracción ligera de hidrocarburos (Hickey, 1995 [a]).

Es importante el utilizar las bacterias ya existentes en el medio (autóctonas), ya que están mejor adaptadas a las propiedades del suelo y pueden ser más fácilmente aclimatables a la contaminación. Ya que al introducir especies extrañas, éstas deben aclimatarse no sólo a la contaminación, sino también a las propiedades del suelo. Con estas últimas no se han obtenido buenos resultados (Clabrese y Kostecki, 1992).

VI.2. Evaluación ecotoxicológica.

El efecto que producen los niveles de contaminación utilizados sobre la germinación y en los primeros estadios del ciclo de vida ofrecen información de lo que puede pasar en la naturaleza. En condiciones favorables al hidratarse las semillas

presentan cambios e inician su metabolismo, transporte de nutrimentos y división celular Durante este periodo, la semilla tiene una alta sensibilidad en su germinación si se ve sometida al estrés ambiental (Wang, 1991), como lo es el causado por los hidrocarburos ya que reducen la capacidad de almacenar humedad del suelo y dan lugar a una baja disponibilidad de oxígeno siendo estos factores tan importantes para iniciar el proceso de la germinación (Wise y Trantolo, 1994).

La inhibición de la germinación de las semillas debido a la contaminación con hidrocarburos puede variar (Salanitro *et al.*, 1997), como es en el caso de *T. foenum graecum* que resultó más sensible a la contaminación que *Z. mays*, la germinación de esta última no resultó afectada.

Ya que la capacidad de germinación se afecta por este tipo de disturbio, el determinar qué tipo de especies en particular dominan una población, es importante porque éstas pueden estar menos limitadas por su capacidad de resistencia a este tipo de contaminante y desarrollarse colonizando un hábitat con unas condiciones ambientales adversas. Esto determina su grado de adaptación a las condiciones dada por una eventual contaminación (Wardle y Giller, 1996)

Por otra parte el efecto de la contaminación en el desarrollo de las plantulas, en el tipo de suelo utilizado, demuestra un mayor impacto en las raíces tanto en su longitud como en su biomasa. Lo que le da pocas oportunidades de sobrevivir y desarrollarse de continuar en esas condiciones. Aunque la fitotoxicidad por hidrocarburos no ha sido estudiada a profundidad ésta es difícil de predecir y depende del tipo de suelo, concentración de los hidrocarburos contaminantes y las especies de plantas presentes en el sitio contaminado (Salanitro *et al.*, 1997).

VI.3. Toxicidad Aguda en Lombrices de tierra.

El efecto global sobre el ecosistema de todas las interacciones entre lumbricidos, suelo, plantas, microorganismos y clima no son fácilmente evaluables. El interés hacia el papel de organismos del suelo ante las perturbaciones, se ha intensificado por la amplia influencia de éstas en la descomposición de materia orgánica y ciclo de nutrimentos (Clive y Bater, 1992).

El efecto de las concentraciones de diesel, que son las mismas a las utilizadas con las plantas, tuvieron un efecto mucho más drástico en los invertebrados, lo cual nos da un panorama de lo que sucedería con organismos similares en un suelo contaminado con similares concentraciones de hidrocarburos. En consecuencia, el suelo

sufriría cambios como la acumulación de materia orgánica y el descenso en su capacidad de filtración de agua (Moody *et al.*, 1995).

La alta sensibilidad y consecuente mortalidad de estos organismos en las concentraciones de contaminación utilizadas, dan lugar a utilizar concentraciones menores para conocer un intervalo de contaminación donde puedan sobrevivir éstas y aún reproducirse, con el fin de delimitar la concentración mínima donde puedan introducirse estos organismos en un lugar sujeto a biorremediación.

Aunque son pocos los estudios que se han enfocado en los invertebrados, estos deben de tomarse en cuenta en estudios de restauración por su sensibilidad y porque la colonización por invertebrados como un proceso que tarda mucho tiempo puede poner en peligro a aves que su alimentación dependa de estos organismos (Web, 1996). Además por su influencia en el suelo, las lombrices se utilizan como una especie indicadora para predecir el efecto de químicos sobre otros invertebrados del suelo (Black y Susser, 1992)

VI.4. Fito-biorremediación

Se debe de reevaluar a las plantas como entidades de absorción o destrucción de compuestos (Cunningham y Berti, 1993). En este contexto, el uso de las raíces para incrementar la degradación de contaminantes, por el papel que juegan los exudados para el establecimiento y mantenimiento de poblaciones bacterianas de la rizósfera (Glandford *et al.*; 1993; Tate, 1995), resulta importante y en el caso de hidrocarburos, promete ser una alternativa viable ya que el metabolismo microbiano actúa sobre un amplio intervalo de sustratos, y realiza los pasos degradativos más difíciles y consume el compuesto xenobiótico para transformarlo hasta una molécula simple (Cunningham y Berti, 1993).

En el caso de *H. ranunculoides*, resultó ser una planta útil para estos fines ya que fue capaz de tolerar y sobrevivir en todas las concentraciones de contaminantes.

Ya que, aún en las concentraciones más elevadas de contaminante se presentó un descenso en la concentración de diesel. Por otra parte los efectos tóxicos se reflejaron en la menor longitud de las raíces y número de hojas vivas, que se presentaron en la concentración de contaminación más alta. Aunque por otra parte, no presentaron diferencias de longitud entre los diferentes niveles de contaminación respecto del control.

A pesar de que utilizando plantas se puede obtener una degradación acelerada tanto para plaguicidas como para hidrocarburos de petróleo, con algunos compuestos la cantidad

de degradación ha sido relativamente bajo (Cunningham y Ow, 1996), sin embargo los resultados de este estudio comparándose al de la prueba de remediación sólo controlando los parámetros fisicoquímicos, la diferencia entre las concentraciones de alcanos es menor en el suelo influenciado por las raíces que en suelo sin la influencia de éstas

Otros aspectos a tomar en cuenta son las características propias de la planta ya que cada especie tiene su propia capacidad para tolerar la contaminación, y esta varía con la especie de planta (Todd *et al*, 1993), también varía su capacidad para proporcionar exudados suficientes para el mantenimiento de la flora bacteriana y su diversidad. Además, se debe tomar en cuenta su nivel de resistencia a los hidrocarburos y su capacidad de crecimiento

Sin embargo, para estudios posteriores es importante investigar la relación raíz-bacteria e investigar si en la degradación de hidrocarburos además de la importancia los microorganismos asociados a la rizósfera, la influencia de posibles enzimas secretadas por las raíces de la planta (Cunningham y Berti, 1993), ya que investigaciones realizadas por Schnoor *et al*, 1995 afirman que así puede suceder, siempre y cuando la enzima se encuentre fuera de la raíz.

VI.5. Evaluación general.

La toxicidad de hidrocarburos como el diesel, puede tener un efecto negativo en las comunidades, tanto vegetales como animales, lo cual conduce a buscar métodos para sanear el suelo de este contaminante y evaluar sus efectos potenciales

Comparando el experimento de remediación semanal, con la fitobiorremediación, estos resultados permiten observar que la influencia de las raíces tuvo un efecto positivo, en cuanto a la desaparición del contaminante. Los resultados obtenidos ayudan a entender cómo las raíces pueden tener un papel relevante en el control de contaminantes como los hidrocarburos ya que proporcionan un ambiente mucho más propicio para el desarrollo microbiano por los exudados que ésta produce, el oxígeno que libera y el poder de intercambio iónico que tiene para modificar el pH del medio que le rodea.

Y tomando en cuenta la toxicidad en la germinación de semillas, el uso de plantas con crecimiento vegetativo resulta importante a la vista de los resultados obtenidos ya que una planta creciendo en condiciones de contaminación con hidrocarburos, si no presenta crecimiento vegetativo tiene más “problemas”, ya que en

el caso de soportar la contaminación, se requeriría evaluar su capacidad de producir semillas y a éstas su capacidad de germinar, que como se observa, esta capacidad puede verse muy afectada. Por otra parte, la fauna del suelo debe estudiarse mas a fondo, pues si bien las lombrices son una importante parte de esta fauna no es la única presente, otra también importante son los artrópodos, los cuales pueden habitar el suelo permanentemente o pasar alguna fase de su ciclo de vida en éste.

VII. Conclusiones.

1.- La contaminación en particular con productos derivados del petróleo, puede ocasionar un fuerte impacto sobre los seres vivos por los cambios que sufre el ambiente

2.- Los microorganismos presentes en el suelo son capaces de aclimatarse a los cambios que sufre el suelo por la contaminación por diesel, degradarlo y tomarlo como fuente de energía

3.- La germinación de semillas de alholva se ve afectada por la contaminación con diesel.

4.- La longitud de tallos y raíces tanto de maíz como de alholva se afecta por la contaminación, disminuyendo en forma más pronunciada en las raíces respecto del tallo.

5.- En las lombrices el diesel tiene un efecto muy tóxico, ya que en ninguna de las concentraciones de contaminante logran sobrevivir

6.- *Hydrocotyle ranunculoides* resultó ser una planta prometedora para el manejo de la contaminación por diesel por

a) Desarrollarse en todas las concentraciones de contaminación.

b) Presentar crecimiento vegetativo en todas las concentraciones de contaminación y, desarrollar raíces capaces de soportar los niveles de contaminación utilizados

c) Provocar un decremento en la concentración de hidrocarburos alifáticos en el suelo, en todas las pruebas a que fue sometida.

VIII. Recomendaciones.

1.-Para manejar la contaminación es más recomendable utilizar la flora microbiana autóctona por estar mejor adaptada y ser más fácil de aclimatar que una alóctona

2.-En caso de necesitarlo por una baja densidad en la población bacteriana hacer cultivos de estas mismas bacterias, e introducir las al medio para con esto, acelerar la degradación del contaminante

3.-Si es necesario, se pueden obtener condiciones más propicias suministrando al suelo un medio mineral que contenga nitrógeno y fósforo.

4.-En las pruebas de toxicidad, para el caso de las semillas de una comunidad vegetal contaminada de forma natural, es recomendable hacerlas con semillas también autóctonas.

5.-Además de las pruebas de toxicidad, con lombrices, se recomienda hacer pruebas con otros organismos como lo son los artrópodos terrestres por su importancia ecológica, para tener un panorama más general del impacto ambiental

6.-Un estudio a futuro es el de la población bacteriana, su distribución en las raíces y la implicación de los exudados para la población microbiana.

7.-Otro aspecto importante para su estudio es el tipo de especies con presencia en el suelo, su distribución, y averiguar si la desaparición del contaminante se debió además de la acción de microorganismos, al posible efecto de enzimas de las plantas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, M 1980 Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor,S A México 219-238
- Alexander, M. 1994 Biodegradation and Biorremediation. Academic Press California. EEUU 16-36
- Back, H. y Susser, P. 1992. Concentration of Volatile Chlorinated Hydrocarbons and Trichloroacetic Acid in Earthworms Soil Biol. Biochem 24 1745-1749
- Bartha, R 1986 Biotechnology of Petroleum Pollutant Biodegradation Microb. Ecol 12:155-172
- Bohlen, R.W. Parmelee, J.M Blair, C.A. y Stinner, B.R. 1995. Efficacy of Methods for Manipulating Earthworm Populations in Large-Scale Field Experiments in Agroecosystems. Soil Biol Biochem 27,993-999.
- Boyle, J.J. y Shann, J.R 1995. Biodegradation of Phenol, 2,4-DCP,2,4D, and, 2,4,5-T in Field-Collected Rhizosphere and Nonrhizosphere Soils J Environ Qual 24:782-785.
- Brazil, G.M. Kenefick, L. Callanan, M. Haro, A. L Dowling, D.N y O'gara, F 1995 Construction of a Rhizosphere Pseudomonad with Potential to Degrade Polychlorinated Biphenyls and Detection of bph Gene Expression in the Rhizosphere. Appl and Environ Microbiol 61 5 1946 1952
- Calabrese, E.J. y Kostecki, P.T. 1992. Hydrocarbon Contaminated Soils and Grounwater Lewis Publishers. pp. 409-415
- Cheng, W Zhang, Q. Coleman, D.C. Carrol, C.R. y Hoffman, C.A 1996. Is Available Carbon Limiting Microbial Respiration In the Rhizosphere Soil Biol. Biochem. 28,1283-1288.

Christensen, H Roon, R Ekelund, F. y Christensen, S 1995. Bacterial Production Determined by [³H] Thymidine Incorporation in Field Rhizospheres as Evaluated by Comparison to Rhizodeposition Soil Biol. Biochem 27,93-99

Clive, A.E. y Bater, J.E. 1992 The use of Earthworms in Environmental Management. Soil Biol Biochem. 24:1683-1689.

Colombo, J.C Cabello, M. Arambarry, A.M. 1996 Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons by Natural Soil Microflora and Pure Cultures of Imperfect and Lignolitic Fungi. Environmental Pollution. 94.335-362.

Cunningham, S D y Berti, W.R 1993 Remediation of Contaminated Soil with Green Plants a Overview In Vitro Cell Dev.Biol. 29 207-212

Cunningham, S.D y Ow, D L 1996. Promises and Prospects of Phytoremediation. Plant Phisology. 110:715-719.

Daniel, O y Anderson, J.M 1992. Microbial Biomass and Activity in Contrasting Soil Materials After Passage Through the Gut of Earthworm *Lumbricus rubellus hoffmeister* Soil Biol Biochem 24:465-470

Fan, S y Scow, K. M. 1993. Biodegradation of Trichloroethylene and Toluene by Indigenous Microbial Population in Soil. Appl and Environ. Microbiol. 69.1911-1918.

Frankenberg, Jr W T y Johanson, J B 1982. Influence of Crude Oil and Refined Petroleum Products on Soil Dehydrogenase Activity. J.Environ Qual. 11.602-607

Frankenberg, Jr.W T 1988 Use of Urea as a Nitrogen Fertilizer in Bioreclamation of Petroleum Hydrocarbons in Soil Bull.Environ.Contam Toxicol 40:66-68

Glandford, D.C.M. y Peters, L G L Van Der Sluis, Y. Bakker, P.P.A.H.M. y Schippers, B 1993 Crop Specificity of Rhizosphere Pseudomonads and the Involvement of Roots Agglutinins. Soil Biol Biochem 28.1729-1737

Hess, T.F. y Schmidt, S.K. 1995. Improved Procedure for Obtaining Statistically Valid Parameter Estimates From Soil Respiration Data. *Soil Biol. Biochem.* 27:1-7

Hess, T.F. Schmidt, S.K. y Coloks, G.M. 1996. Maintenance Energy Model for Microbial Degradation of Toxic Chemicals in Soil. *Soil Biol. Biochem.* 28:1729-1737

Hickey, W.J. 1995 [a]. In Situ Respirometry. Field Methods and Implications for Hydrocarbon Biodegradation in Subsurface Soils. *J. Environ. Qual.* 24:583-588.

Hickey, W.J. 1995 [b]. Soil Ventilation: Effects on Microbial Populations in Gasoline Contaminated Subsurface Soils. *J. Environ. Qual.* 24:571-582

Hopkins, W.G. 1995. Introduction to Plant Physiology. John Wiley & Sons. New York. pp 271-272.

Hozore, E. y Alexander, M. 1991. Bacterial Characteristics Important to Rhizosphere Competence. *Soil Biol. Biochem.* 23:717-723

Huesemann, M.H. 1995. Predictive Model for Estimating the Extent of Petroleum Hydrocarbons Biodegradation in Contaminated Soils. *Environ. Sci. Technol.* 29:7-18.

Joergensen, R.G. Schmaedeke, J. Windhoust, K. y Meyer, B. 1995. Biomass and Activity of Microorganisms in a Fuel Contaminated Soil. *Soil Biol. Biochem.* 27:1137-1143.

Kristufek, V. Ravasz, K. y Pizl, V. 1992. Changes in Densities of Bacteria and Microfungi During Gut Transit in *Lumbricus Rubellus* and *Aporrectodea Caliginosa* (Oligochaeta:Lumbricidae). *Soil Biol. Biochem.* 24:1499-1500.

Lewis, M.A. 1995. Use of Freshwater Plants for Phytotoxicity Testing: A Review. *Environmental Pollution* 87:319-336.

Lynch, J.M. 1990. The rhizosphere, Wiley. England. pp80-82.

Metting, B 1992 Soil Microbial Ecology Applications in Agricultural and Environmental Management Marcel Dekker. USA p483

Metting, F B.Jr. 1993 Soil Microbial Ecology Marcel Dekker, Inc. New York p 493-494
502-503

Mitchel, R 1993. Environmental Microbiology. Wiley-Liss USA p 205-208,224-225

Moody, S A. Briones, M.J.I. Pearce, T G. y Dighton, J. 1995. Selective Consumption of
Descomposing Weat Straw by Earthworms. Soil Biol. Biochem 27,1209-11213

Organization for Economic Cooperation and Development (1984) Earthworms, Acute
Toxicity Test, OECD Guideline for Chemicals, No. 207 Paris.1-7

Organization for Economic Cooperation and Development (1984) Terrestrial Plants,
Growth Test, OECD Guideline for Chemicals, No. 208., Paris.1-5

Porta, C Lopez, A. Roquero, L. 1994. Edafologia Para la Agricultura y el Medio Ambiente
De. Mundi-Prensa. Madrid 738-743

Ramanathan, A y Burks, S L. 1996. Hazard Evaluation of Soil Contaminant with Acuatic
Animals and Plants Toxicity Test. Bull.Environ.Contam Toxicol.56:956-963.

Salanitro, J.P. Dorn, P.B. Huesemann, M.H. Moore, K.O. Rhodes, I.A. Jackson, L.M.R.,
Vipond, T.E. Western, MM y Wisniewski, H L 1997 Crude Oil Hydrocarbon
Biorremediation and Soil Ecotoxicity Assessment Environ.Sci.Technol.: 31:1769-1776

Salisbury, F B y Ross, 1992 Physiology of the Plant Wadsworth Publishing Company
California. pp.346-347.

Santer, P 1997 Bioremediation an Ecotoxicological Evaluation of Diesel-Contaminated
Soil. Diplomarbeit Durchgesührt am IFA Tulln Ababteilungum Weltbiotechnologie
Univeritat Fur Boden Kultur Wien. p 76.

Santruckova, H y Straskraba, M 1991. On the Relationship Between Specific Respiration Activity and Microbial Biomass in Soils. *Soil Biol. Biochem* 23:525-532

Schmidt, S.K 1995. Improved Procedure for Obtaining Statistically Valid Parameter Estimates From Soil Respiration Data. *Soil Biol. Biochem* 27:1017-1026

Schnoor, J.L Licht, L.A McCutcheon, S.C. Wolfe, N.L y Carreira, L.H 1995. Phytoremediation of contaminated soils and Sediments. *Environ Sci. Technol* 29: 318-323.

Sepic, E., Leskovsek, T 1995. Aerobic Bacterial Degradation of Selected Poliaromatic Compounds and n-Alkanes Found in Petroleum. *J of Chromatography A*. 697 515-523

Simonich, S.L. y Hites, R.A. 1994 Importance of Vegetation in Removing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from the Atmosphere. *Nature*. 370:49-51.

Shaheen, E.I. 1992. *Technology of Environmental Pollution Control*. Pennwell. Oklahoma SA.

Sharabi, N.E. y Bartha, R 1993. Testing of Some Assumptions About Biodegradability in Soil as a Measured by Carbon Dioxide Evolution Appl and Environ. Microbiol. 59 1201-1205.

Tate, R. L. 1995 *Soil Microbiology*. John Willey & Sons, Inc New York USA pp.171-179

Tood, A.A Guthrie, E.A. Walton, B.T. 1993 Bioremediation in the Rhizosphere. *Environ Sci. Technol* 27:2630-2636.

Wang, W. 1991. Literature review on Higher Plants for Toxicity Testing. *Water, Air, and Soil Pollution* 59 381-400

Wardle, D.A. y Ghani, A. 1995. A Critique of the Microbial Metabolic Quotient (qCo₂) as a Bioindicator of disturbance and Ecosystem Development. *Soil Biol. Biochem*. 27.

Wardle, D.A. y Giller, K.E. 1996. The Quest for a Contemporary Ecological Dimension to Soil Biology. *Soil Biol. Biochem* 28.1741-1748

Web, N.G. 1996 Restoration Ecology: Science, Technology and Society. Trends in Ecology & Evolution, 396-397

Werner, D. 1992. Symbiosis of Plants and Microbes. Chapman & Hall. London. p. 20-27

Wild, A.1993. Soil and The Enviromental Introduction. Cambridge University Press New York, USA. pp.10-11, 109.

Wise, D L. y Trantolo, D J 1994. Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soil. Dekker,Inc. New York, EUA.pp 149-599,317.

Wood, M. 1989. Soil Biology. Blackie Chapman and Hall Inc.USA. p 54-55.

Young, C.S. Lethbridge, L.J. Shaw y Burns R G 1995. Survival of inoculated *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in non-planted and rhizosphere soil . Soil Biol. & Biochem.27,1017-1026