



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA Y
ARQUITECTURA
UNIDAD ZACATENCO**

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS (HPA'S) UTILIZANDO REACTORES
DE SUELOS ACTIVADOS
INOCULADOS BIOLÓGICAMENTE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA

LICENCIADA EN QUÍMICA BLANCA GABRIELA CUEVAS GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS

M.C. RICARDO CONTRERAS CONTRERAS



ZACATENCO, MEXICO D. F. 2008



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D.F. siendo las 18:00 horas del día 27 del mes de Agosto del 2008 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de E.S.I.A.-U.Z. para examinar la tesis de grado titulada: "REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAS) UTILIZANDO REACTORES DE SUELOS ACTIVADOS INOCULADOS BIOLÓGICAMENTE".

Presentada por el alumno:

CUEVAS

Apellido paterno

GONZÁLEZ

Apellido materno

BLANCA GABRIELA

Nombre(s)

Con registro:

A	0	6	0	0	7	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

M. EN C. RICARDO CONTRERAS CONTRERAS

DR. JESÚS BERNARDO MALDONADO VERVER
Y VARGAS

DR. JORGE MELÉNDEZ ESTRADA

M. EN I. FELIPE LÓPEZ SÁNCHEZ

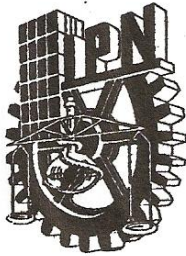


M. EN C. JAVIER AVILA MORENO

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

M. C. PINO DURÁN ESCAMILLA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de MÉXICO el día 2 del mes SEPTIEMBRE del año 2008, el (la) que suscribe BLANCA GABRIELA CUEVAS GONZÁLEZ alumno (a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA AMBIENTAL con número de registro A060071, adscrito a ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA-UNIDAD ZACATENCO, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de M.C. RICARDO CONTRERAS CONTRERAS y cede los derechos del trabajo intitulado REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA'S) UTILIZANDO REACTORES DE SUELOS ACTIVADOS INOCULADOS BIOLÓGICAMENTE, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección blancac3@terra.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BLANCA GABRIELA CUEVAS GONZALEZ

AGRADECIMIENTOS

A mis Hijos:

Gabriel Jesús
Octavio Abraham
Arturo Samuel

Dedico especialmente esta tesis a mis hijos y hermano Carlos Esteban, por que sus vidas son la razón de la mía, sus alegrías son mi alegría y su amor es el motivo de superación como madre, amiga y ser humano. LOS AMO.

A mis padres:

Gabriel Cuevas Zea y Margarita González Encizo, en forma especial a mi madre Margarita González Encizo, agradezco su apoyo y con sus principios me dan fuerza para seguir y alcanzar las metas propuestas.

A mis hermanos:

Por el gran amor que les tengo. Que sea una pequeña muestra de agradecimiento y respeto. GRACIAS POR SU CARIÑO.

A mi esposo:

Gracias por su apoyo al logro de esta meta.

A Dios:

Por darme la fe y la fuerza para seguir en esta vida.

A Instituciones:

Consejo del Sistema Nacional de Educación Tecnológica (CoSNET), por el financiamiento al Proyecto Clave: 1035.03-P

Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, por el apoyo a la realización de este trabajo de manera institucional.

Instituto Politécnico Nacional, en especial a la Unidad de Posgrado en Ingeniería Ambiental de la Escuela Superior de Ingeniería y Arquitectura por brindarme la gran oportunidad de incrementar mi nivel profesional.

A personas:

M.C. Ricardo Contreras Contreras, por la gran dedicación y paciencia para la orientación y revisión del presente trabajo dándome su apoyo como profesor y amigo.

A todas aquellas personas que me apoyaron en el desarrollo de esta tesis experimental:

M. en I. Felipe López Sánchez
M. en C. Javier Ávila Moreno
Dr. Bernardo Maldonado Verver
Dr. Jorge Meléndez Estrada

Y a todas aquellas personas que colaboraron para la realización de esta tesis y que involuntariamente fueron omitidas.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1.1 PROBLEMÁTICA	3
1.2 OBJETIVO GENERAL	5
1.3 OBJETIVOS PARTICULARES	5
1.4 HIPÓTESIS	5
1.5 JUSTIFICACIÓN	6
2.- FUNDAMENTOS	8
2.1 MARCO TEÓRICO	8
2.2 GENERALIDADES	11
2.2.1 Propiedades fisicoquímicas de los HPA'S	18
2.2.2 Características toxicológicas	18
2.2.3 Contaminación generada por los HPA'S	19
2.3 CARACTERÍSTICAS DEL COMPUESTO MODELO	21
2.3.1 Características fisicoquímicas del compuesto modelo	21
2.3.2 Toxicidad del compuesto modelo	23
2.4 PROCESO DE BIODEGRADACIÓN	24
2.4.1 Microorganismos biodegradadores	24
2.4.2 Utilización de inóculos exógenos	24
2.4.3 Características de los microorganismos biodegradadores	26
2.4.4 Rutas de biodegradación de los HPA'S	27
2.4.5 Ruta metabólica de degradación de antraceno	29
2.5 FACTORES INVOLUCRADOS EN LA BIODEGRADACIÓN DE HPAS	33
2.5.1 Biodisponibilidad	33
2.5.2 Temperatura	34
2.5.3 Oxigenación	35
2.5.4 Salinidad	35
2.5.5 Humedad	35

2.5.6 Acidez y alcalinidad	35
2.5.7 Nutrientes	36
2.6 BIORREMEDIACIÓN DE COMPUESTOS RECALCITANTES	37
2.7 TENSOACTIVOS EN BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS	38
2.8 REACTOR DE SUELOS ACTIVADOS (RSA)	39
3.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL	42
3.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO	44
3.2 CONTROL DE HUMEDAD	46
3.3 INÓCULO	47
3.4 ACLIMATACIÓN DE REACTORES INOCULADORES	47
3.5 BIODEGRADACIÓN BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DEL MEDIO MINERAL	51
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
4.1 ACLIMATACIÓN DE REACTORES INOCULADORES AEROBIO Y ANAEROBIO (SULFATO REDUCTO)	52
4.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	60
4.2.1 Resultados experimentales del análisis cromatográfico	61
4.3 ENSAYO DE FACTIVIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE HPA'S	67
4.4 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	67
4.5 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL SUELO CON INÓCULO (TRATAMIENTO 1)	70
4.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL SUELO CON HPA'S Y AZIDA DE SODIO	70

4.7 EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE HPA'S EN EL SUELO POR FENÓMENOS ABIÓTICOS (TRATAMIENTO 2)	71
4.8 ESTUDIO DE FACTIBILIDAD DE BIODEGRACIÓN DE ANTRACENO (TRATAMIENTO 3)	74
4.9 RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL ANÁLISIS CROMÁTOGRAFICO DE METABOLITOS	78
4.10 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA DEGRADACIÓN DE ANTRACENO EN MEDIO SÓLIDO	80
5.- CONCLUSIONES	82
6.- RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS FUTUROS	84
7.- BLIOGRAFÍA	85
8.-GLOSARIO	93
8.- ANEXOS	107

RESUMEN

La biorremediación ha llegado a ser la tecnología elegida para remediar los ambientes afectados por las actividades antropogénicas, particularmente a agua y suelo expuestos a hidrocarburos. También ha llegado a ser un área de estudio intensivo para investigación y desarrollo en la academia, gobierno e industria debido a que las nuevas leyes así como tratados internacionales protegen el medio ambiente. En México La legislación ambiental es relativamente joven y está fundamentada en La Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA) que se refiere a la preservación y restauración del equilibrio ecológico, así como a la protección al ambiente, en el territorio nacional y las zonas sobre las que la nación ejerce su soberanía y jurisdicción. El interés creciente en el uso de biorremediación para limpiar suelos contaminados con compuestos orgánicos, se debe a que en muchos casos de contaminación del suelo, esta tecnología potencialmente puede alcanzar la degradación final de los contaminantes orgánicos a bajos costos y de manera eficiente. (Cookson, 1995).

La presente propuesta ofrece una alternativa para la biodegradabilidad de mezclas simples de compuestos modelo de interés para el sector agropecuario, industrial, petroquímica, petrolera, textil, metalmecánica y química, bajo diferentes condiciones de aceptores de electrones y que son efectivos en ambientes anóxicos y aerobios típicos, contenidos en suelos contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA'S). El compuesto modelo elegido es el antraceno. Para lo cual se utilizan reactores de suelos activados (RSA) en condiciones aerobias y anaerobias para poder comparar la efectividad, usando sustratos de bajo costo como es la sacarosa a concentraciones en donde se lleva a cabo la bioestimulación del crecimiento del consorcio microbiano que degraden y aumenten la biodisponibilidad de los HPA'S y bajo condiciones de aceptores de electrones como el O_2 y SO_4 .

Con los resultados obtenidos se ofrece una técnica económica, rápida y factible para efectuar la remoción de compuestos aromáticos policíclicos problemáticos, en suelos pesados contaminados, que revelan que los reactores inoculadores aerobios son más factibles a remover el antraceno del suelo, probablemente debido a que en ambientes aerobios se favorece la oxidación.

SUMMARY

The bioremediation has become the technology chosen to remedy the environments affected by anthropogenic activities, particularly water and soil exposed to hydrocarbons. It has also become a study area for intensive research and development in academia, government and industry because the new laws and international treaties protecting the environment. In Mexico Environmental legislation is relatively young and is based in The General Law of Ecological Balance and Environmental Protection (LGEEPA) which relates to the preservation and restoration of ecological balance, as well as environmental protection, within the national territory and the areas on which the nation exercises its sovereignty and jurisdiction. The growing interest in using bioremediation to clean up contaminated soil with organic compounds, is because in many cases of soil contamination, this technology could potentially reach the final degradation of organic pollutants at low cost and efficiently. (Coorson, 1995).

This proposal offers an alternative to the biodegradability of mixtures of simple compound interest model for agriculture, industrial, petrochemical, oil, textile, chemical and metalworking, under different conditions electron acceptors other than O₂ and that are effective in environments anoxic and anaerobic typical content in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH'S). The compound is the model chosen anthracene. For the reactors which are used soil activated (RSA) on aerobic and anaerobic order to compare their effectiveness, using low-cost substrates such as sucrose concentrations carrying out the biostimulation growth of microbial consortia that degrade and increase bioavailability of the HPA'S and under conditions of electron acceptors such as O₂ and SO₄.

With the results provides a technique effective, fast and feasible to carry out the removal of polycyclic aromatic compounds problematic, in heavy soils contaminated, showing that inoculation aerobic reactors are more feasible to remove the soil anthracene, probably because in environments that are conducive aerobic oxidation.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 PROBLEMÁTICA

Los hidrocarburos poliaromáticos son constantemente liberados al ambiente principalmente a partir de las actividades antropogénicas, siendo la mayor fuente de liberación, los procesos de quema de combustibles fósiles, la licuefacción del carbón, la gasificación del petróleo y los derrames accidentales de petróleo. Cuando ocurre un derrame de petróleo en el ambiente, los compuestos de bajo peso molecular generalmente se pierden por volatilización, mientras que los hidrocarburos poliaromáticos y heterocíclicos permanecen como remanente, haciéndose de esta manera persistente en el ambiente. Los hidrocarburos poliaromáticos con dos o más anillos, heterocíclicos y sus homólogos alquil sustituidos, que son liberados en los ecosistemas, constituyen un grave problema porque contaminan fuentes de agua y suelos, ocasionando un gran impacto ecológico, en virtud de los efectos recalcitrantes y tóxicos que ejercen sobre los seres vivos (Tissot y Welte, 1984). Es por ello que estos hidrocarburos deben ser removidos o su concentración debe ser sustancialmente reducida del ambiente. Con este propósito, frecuentemente son utilizados procesos de degradación industrial tanto químicos como físicos, que pese haber demostrado su potencial para la recuperación de cientos de lugares contaminados, resultan relativamente inadecuados para la remoción de hidrocarburos complejos y además el costo de su aplicación resulta elevado (Parales *et al.* 2001) .

Durante los últimos años ha sido objeto de intensa investigación el desarrollo de biotecnologías que complementen los procesos físicos y químicos ya existentes, basadas en la utilización de microorganismos para la recuperación de los ambientes contaminados con petróleo y otros combustibles, en virtud de la capacidad que poseen estos organismos de oxidar los compuestos hidrocarbonatos del petróleo degradándolos hasta metabolitos que pueden ser fácilmente removidos o dispersados del ambiente (Monticello, 1994).

En este sentido, la habilidad que poseen algunas bacterias de metabolizar hidrocarburos aromáticos sencillos tales como tolueno, xileno y naftaleno ha sido ampliamente estudiada (Kanaly y Harayama 2000; Van *et al.*, 2003).

Se han descrito pocos géneros bacterianos capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos en particular el antraceno, fenantreno (Johsen *et al* 2002; Wick *et al.* 2003) y dibenzotiofeno (DBT) (Baldi *et al* 2003) Generalmente las especies señaladas por su capacidad de degradar monoaromáticos no son capaces de metabolizar aromáticos más complejos.

Queda el reto de sanear suelos pesados (ricos en arcillas y materia orgánica) que presentan baja conductividad hidráulica, muy baja permeabilidad, muestran una gran irreversibilidad en la retención de contaminantes, dificultando enormemente una disponibilidad adecuada para su biodegradación.

La utilización de un sistema de reactores de suelos activados tiene características ventajosas como: aumento en el contacto suelo-microorganismos, incremento de tasas de transferencia de masa, el posible uso de suplementación de nutrientes, inoculación con microorganismos adaptados, adición de tensoactivos, es posible también la manipulación de las rutas catabólicas a partir de la introducción de varios aceptores de electrones, etc. Lo anterior favorece en un aumento de la cinética de remoción de los contaminantes del suelo, contrarrestando los tiempos de saneamiento y minimiza los volúmenes de operación de los reactores para un tratamiento dado. Por otro lado, la mayoría de los estudios de biorremediación ha estado enfocada a la remoción de hidrocarburos típicos de gasolina y diesel. Relativamente poco se ha hecho en México sobre hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA'S), que se sabe son muy recalcitrantes y tienen efectos negativos a la salud y el ambiente. Referente a la biodegradación de los HPA'S se limitan los trabajos a estudios con moléculas con menos de dos anillos pero de tres a más anillos como el antraceno, pireno, fluorantreno, benzo-antraceno, se requieren de más estudios. Además de que pocas contribuciones documentadas se tienen de la degradación de HPA'S por consorcios que den remoción a HPA'S con más de tres anillos en muestras ambientales. Futuras investigaciones son necesarias para explorar las interacciones de degradación de HPA'S no solo por microorganismos aislados sino también por consorcios autóctonos y no autóctonos.

1.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la remoción de antraceno en un suelo pesado, utilizando reactores de suelos activados mediante la inoculación de consorcios de microorganismos en ambiente aerobio y anaerobio a escala laboratorio.

1.3 OBJETIVOS PARTICULARES

Arrancar, aclimatar y operar reactores inoculadores en continuo con un consorcio microbiano adaptado al consumo de antraceno, en sistemas aerobios y sulfato-reductor.

Obtener parámetros de biodegradación para antraceno, en reactores de suelos activados en condiciones aerobias y anaerobias.

Evaluar las condiciones implementadas a los reactores de suelos activados sobre la remoción de antraceno, de acuerdo a la adición o eliminación del sustrato fácilmente biodegradable.

1.4 HIPÓTESIS

Si se tiene que los HPA'S (Hidrocarburos poliaromáticos) son catalogados como compuestos resistentes a la biodegradación en un suelo pesado, se considera que es posible lograr su biorremediación al ser sometido a la adición de nutrientes e inoculación de consorcios controlados en ambientes aerobios y anaerobios en reactores de suelos activados.

Por consiguiente se pretende obtener una técnica económica rápida y factible para efectuar la biodegradación del antraceno que es uno de compuestos aromáticos policíclicos problemáticos, en suelos pesados (suelo arcilloso con alto contenido de materia orgánica) contaminados, esto consiste en uso de reactores de suelos activados en continuo con manejo de aceptores de electrones de diferente opción, para poder comparar la efectividad de cada uno, usando como fuente de carbono el HPA'S aunado con la bioestimulación de la sacarosa que favorezca el crecimiento de consorcios microbianos degradadores y aumentar la biodisponibilidad de los HPA'S.

1.4 JUSTIFICACIÓN

El surgimiento y la experimentación de la biorremediación como una industria ha sido aceptada como alternativa económicamente viable y efectiva para la limpieza de suelos y superficies de aguas contaminadas con un alto grado tóxico.

La biorremediación ha llegado a ser la tecnología elegida para remediar los ambientes contaminados, particularmente, sitios contaminados con hidrocarburos del petróleo. Las medidas biocorrectoras se llevan empleando en el saneamiento de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos desde hace décadas con importante éxito. Estas técnicas biológicas pueden ser de tipo aerobio (presencia de un medio oxidante), o bien de tipo anaerobio (medio reductor). Sin embargo, la gran mayoría de estudios y aplicaciones de la biorremediación se ha sesgado a técnicas in situ para el saneamiento de suelos fácilmente tratables.

Queda el reto de sanear suelos pesados; ricos en arcillas y materia permeabilidad y muestran una gran irreversibilidad en la retención de contaminantes, lo cual dificulta enormemente una disponibilidad adecuada para su biodegradación.

La utilización de sistemas de reactores de suelos activados en estos suelos tiene características ventajosas como son; un aumento en el contacto suelo-microorganismos, incremento de tasas de transferencia de masa, es posible el uso de suplementación de nutrientes, inoculación con microorganismos adaptados, adición de tensoactivos, es posible también la manipulación de las rutas catabólicas a partir de la introducción de varios aceptores de electrones, etc. Lo anterior favorece en un aumento de la cinética de remoción de los contaminantes del suelo, contrarresta los tiempos de saneamiento y minimiza los volúmenes de operación de los reactores para un tratamiento dado.

Por otro lado, la mayoría de los estudios de biorremediación ha estado enfocada a la remoción de hidrocarburos típicos de gasolinas y diesel. Relativamente poco se ha hecho en México sobre hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA'S), que se sabe son muy recalcitrantes y tienen

efectos negativos a la salud y al ambiente. Referente a la biodegradación de los HPA'S se limitan los trabajos a estudios con moléculas con menos de dos anillos pero de tres a más anillos como el antraceno, pireno, fluorantreno, benzo- antraceno, necesitan de más estudios. Además de que pocas contribuciones documentadas se tienen de la degradación de HPA'S por consorcios que degraden HPA'S con tres anillos o más en muestras ambientales. Futuras investigaciones son necesarias para explorar las interacciones de degradación de HPA'S no solo por microorganismos aislados sino también por consorcios.

2 FUNDAMENTOS

2.1 MARCO TEORICO

Como consecuencia directa del uso masivo del petróleo como fuente de energía y como materia prima, ha surgido en los últimos 50 años el fenómeno de la contaminación de suelos y sistemas acuáticos, lo cual ha ocasionado el deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente generando una amenaza a la salud, así como la extinción de gran cantidad de especies vegetales y animales. Esta condición reta a nuestra sociedad de manera global para encontrar medidas efectivas que remedien los efectos negativos del avance tecnológico (Bredehoeft, *et al.*, 1994).

Una medida que ha tenido un éxito significativo para transformar o degradar los contaminantes es la aplicación de técnicas de biorremediación. En los próximos diez años, la biorremediación desempeñará un papel relevante en la restauración de suelos, lodos y aguas contaminadas. En la pasada década, la biorremediación pasó de ser una tecnología casi desconocida a una de las mayormente consideradas para la limpieza de sitios contaminados. La razón de este crecimiento consiste en su bajo costo con respecto a otras técnicas. También atrae la atención porque destruye la mayoría de los desechos orgánicos, transformándolos de manera que los subproductos del tratamiento son inocuos. Esta utiliza generalmente microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y algas), y recientemente han comenzado a utilizarse plantas superiores para algunas aplicaciones.

La degradación microbiana constituye el principal proceso de descontaminación natural. Este proceso se puede acelerar y/o mejorar mediante la aplicación de tecnologías de biorremediación. El crudo de petróleo se caracteriza por ser una matriz contaminante que contiene una elevada diversidad de compuestos, por lo que es un sustrato ideal para evaluar el potencial catabólico de cepas o consorcios microbianos de interés en biorremediación.

Aunque nuevos enfoques en la biorremediación han surgido basados en la biología molecular y la ingeniería de bioprocesos, la biorremediación clásica continúa siendo el enfoque favorito para procesar desechos

biológicos y evitar la propagación de bacterias patógenas (Bouwer y Zehnder, 1993; Leahy y Colwell 1990). La biorremediación también juega un papel cada vez más importante en la concentración de metales, en la recuperación de materiales radioactivos y en la remoción de hidrocarburos en suelos (Brim *et al.*, 2000; Robinson y Tuovinen, 1984).

La biorremediación puede ser usada como un método de limpieza de contaminantes de suelos, aire y agua. La aplicación de esta tecnología en sistemas contaminados por hidrocarburos ha dado respuestas satisfactorias a la recuperación de suelos. Dentro de las diferentes fracciones del petróleo, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA'S), son los de mayor toxicidad y al mismo tiempo los más recalcitrantes a los métodos convencionales de remediación en suelos. Los HPA'S son compuestos aromáticos conteniendo dos o más anillos bencénicos fusionados en arreglos angulares, lineales o agrupados.

También son contaminantes ubicuos que se forman naturalmente en el curso de algunas reacciones geológicas y la fosilización de plantas o antropogénicamente en relación con las industrias del petróleo, la producción de gas y de la preservación de madera. Los HPA'S de bajo peso molecular son susceptibles de biorremediación, sin embargo, los de alto peso molecular son recalcitrantes a la degradación biológica (Cerniglia, 1992; Wilson y Jones, 1993).

Las tasas de degradación de HPA'S son variables y no dependen solamente de su estructura, sino también de parámetros físicos y químicos del sitio, así como del número y variedad de microorganismos presentes. Existe en la naturaleza una gran cantidad de microorganismos capaces de biodegradar una amplia variedad de hidrocarburos aromáticos, desde los más simples como el benceno hasta los más complejos como los alquilbencenos, aromáticos policíclicos tales como el naftaleno, fenantreno y antraceno (Atlas y Cerniglia, 1995).

En anteriores décadas las investigaciones de biodegradación de los HPA'S se resumía a trabajar con moléculas de menos de tres anillos (Kanaly y Harayama, 2000) pero de cuatro a más anillos como el pireno, fluorantreno, benzo-antraceno, necesitan de mas investigaciones (Watanabe y Baker 2000). Pocos estudios se tienen documentados de la degradación por bacterias de HPA'S con más de cinco anillos en muestras ambientales. Al menos algunas

investigaciones tienden a trabajar con benzo-pireno (BP), esta es una molécula de cinco anillos que se presenta abundantemente como componente en el carbón de alquitrán (Kelley y Cerniglia, 1995). Los microorganismos generalmente degradan primero los compuestos de alta energía. El metabolismo del sustrato preferencial es una función de la velocidad de crecimiento del microorganismo así como de la aparición de los compuestos individuales. En una mezcla de hidrocarburos, el benceno puede degradarse más rápido que el naftaleno, y este último más rápido que el pireno. Si los compuestos que son utilizados como fuente de energía son degradados antes que los compuestos que requieren cometabolismo, como en el caso de HPA'S, la degradación de estos HPA'S puede detenerse. La degradación de sustrato preferencial puede causar dificultad para la degradación de muchos compuestos tóxicos (Cookson, 1995).

La degradación de HPA'S depende de la complejidad química de los HPA'S y del alcance de la adaptación enzimática. Los HPA'S que contienen tres anillos aromáticos, son más fácilmente degradables que los que contienen más de cuatro anillos, puesto que estos últimos son más recalcitrantes o persistentes.

La facilidad con lo que se degraden los HPA'S ya sea en metabolismo aerobio o anaerobio están en función de la solubilidad del HPA'S, número de anillos fusionados, número de sustituyentes, tipo de sustitución, posición de sustitución y también por la toxicidad.

Muchos de los HPA'S están asociados con la refinación del petróleo y la combustión de carbón de hulla. Se ha reportado que las actividades relacionadas con la utilización del petróleo generan el 70 % de la HPA'S.

En general, los destilados del petróleo tienen efectos tóxicos muy graves cuando son aspirados afectando el tronco bronquial. Son disolventes de las grasas y alteran el sistema nervioso central (SNC) (Dreisbach y Roberson, 1981). Los hidrocarburos aromáticos son más irritantes que los alifáticos, causan dermatitis y quemaduras severas. Si son aspirados causan edema pulmonar y neumonitis química. Por ejemplo, se han reportado conjuntivitis y quemaduras de cornea a causa del benceno y de sus derivados arílicos. El naftaleno causa cataratas (Wang y Bartha 1990). Los HPA'S pueden ser degradados completamente o ser extremadamente resistentes o originar productos intermediarios que son altamente carcinogénicos. Al respecto se tiene que el

benzo(a) pireno (BAP) puede ser cometabolizado al ser oxidado por microorganismos como *Mycobacterium* (Schneider *et al*, 1996).

En experimentos de laboratorio no han reportado mineralización de los productos de oxidación del BP, se puede especular que cada desdoblamiento de los anillos de los intermediarios, son producidos cometabólicamente en suelos con presencia de otros hidrocarburos del petróleo, estos pueden ser metabolizados en un suelo del ecosistema que contenga una variedad de microorganismos que actúen como consorcio.

Esta idea es fundamentada por el hecho de que el pireno se puede mineralizar como resultado de la oxidación cometabólica y continua que llevada a cabo por un consorcio de degradadores de hidrocarburos.

2.2 GENERALIDADES

2.2.1 Hidrocarburos poliaromáticos

Los hidrocarburos poliaromáticos (HPA'S) son considerados como los componentes más tóxicos de los productos del petróleo, y también están asociados a efectos crónicos y cancerígenos. A menudo, son distinguidos por el número de anillos que poseen. Los compuestos aromáticos con dos o más anillos son referidos como hidrocarburos poliaromáticos, hay más de cien diferentes (Roy, 1997).

Una definición estricta es aquella que los define como compuestos formados por dos o más anillos aromáticos unidos. Estos pueden ser divididos en dos grupos según su peso molecular: los de bajo peso molecular formados por los HPA'S de 2 a 3 anillos, y los de alto peso molecular formados por aquellos HPA'S que contienen en su estructura más de 3 anillos.

Los HPA'S son los componentes más peligrosos en los derrames de petróleo. Los HPA'S se encuentran en el crudo, en el aceite del motor usado, en el hollín, en los humos de las combustiones incompletas, y en varias mezclas químicas complejas peligrosas.

Químicamente los HPA'S suelen ser sólidos, transparentes, blancos o amarillos verdosos pálido. Ellos pueden tener un débil y agradable olor.

Estudios realizados (Roy, 1997) en animales han mostrado que los HPA'S pueden causar efectos nocivos en la piel, en los fluidos corporales y en el sistema corporal, si los animales están expuestos durante cortos o largos períodos de tiempo a estos compuestos químicos.

Los peligros de los HPA'S en los medios acuáticos son a menudo difíciles de prever, debido al gran número de HPA'S y HPA'S alquílicos de interés potencial y el gran número de variables que pueden aumentar o disminuir los riesgos. El interés tradicional de la toxicología medioambiental relativa a los HPA'S está centrado en la interrupción metabólica del benzo(a) pireno y otros HPA'S, el metabolismo de los cuales es más cancerígeno y peligroso que el de los componentes originales. Los HPA'S suelen depositarse en sedimentos y suelos en pequeñas concentraciones debido a su baja solubilidad en agua. Excepto para los más solubles y particularmente tóxicos de dos, como es el caso del naftaleno, para la mayoría de HPA'S la toxicidad en aguas, no ha sido históricamente un gran problema. Sin embargo, estudios (Roy, 1997) han mostrado que algunos HPA'S pesados pueden mostrar toxicidad en aguas a niveles bajos de solubilidad, debido a la presencia de luz ultravioleta (UV) o a otros tipos de radiaciones solares que ayudan a la toxicidad fotoinducida. Algunos expertos creen que la gran mayoría de los peligros reales de los sistemas acuáticos debidos a los HPA'S pueden resultar de la toxicidad fotoinducida causada por la excitación de los estados del HPA'S debido a la presencia de oxígeno y radiación UV.

Los procesos más importantes que contribuyen a la degradación de HPA'S en aguas son la oxidación química, la foto oxidación, y la biodegradación con microorganismos acuáticos. En el medio acuático, los naftalenos son particularmente peligrosos debido a su combinación particular de movilidad, toxicidad y en general peligro medio ambiental. Los naftalenos clorados son muy tóxicos para los organismos acuáticos y también son muy persistentes, por esto las aguas con concentraciones muy elevadas de HPA'S no deberían ser tratadas con cloro.

En el medio ambiente las personas están expuestas de una forma más probable a los vapores de HPA'S y a otras partículas en el aire. Las fuentes son diversas: humo de tabaco, humos de escape de vehículos, asfalto, carreteras, carbón, residuos de incineración municipal e industrial, incendios (Letzel, *et al.* 1999). Los niveles de algunos HPA'S representativos en el aire suelen ser de 0.02-1.2 ng/m³ en las zonas rurales y de 0.15-19.3 ng/m³ en las zonas urbanas. En suelos, la detección de HPA'S puede venir dada en zonas donde se ha producido la combustión de gasolina, carbón, madera etc.

En el medio acuático los HPA'S no están distribuidos de una forma uniforme. Las concentraciones más elevadas se encuentran en las zonas más próximas a la superficie y decrecen logarítmicamente con la distancia a ésta.

La degradación metabólica de los HPA'S cancerígenos es muy lenta en el subsuelo debido a que en ellos y en los sedimentos hay menos oxígeno y luz. Los HPA'S más pesados (de 4 a 6 anillos) son más persistentes que los ligeros (de 2 y 3 anillos) (Conte, *et al.*, 2000). El movimiento de los HPA'S en el medio depende de las propiedades de éstos: solubilidad en agua, presión de vapor, peso molecular, la facilidad de disolverse en agua, su evaporaciones el aire y número de anillos principalmente. Los HPA'S tienden a asociarse principalmente con materiales orgánicos e inorgánicos en suspensión y en sedimentos (Rogers, *et al.* 2002).

Los HPA'S se incluyen entre las sustancias básicas neutrales. Este grupo de sustancias suele tener las siguientes propiedades físico y químicas: escasa solubilidad, baja constante de Henry, baja presión de vapor, un elevado coeficiente de repartición agua-octanol (K_{ow}), un bajo coeficiente de repartición de carbono orgánico (K_{oc}) y un alto factor de bioconcentración (FBC).

De todos los hidrocarburos poliaromáticos, la U.S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency) ha identificado 16 como prioritarios medioambientalmente, por ser altamente contaminantes. Estos son el naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k) fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno y

Indenol(1,2,3,cd)pireno. De estos compuestos el benzo benzo(a)antracencriseno(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno indeno(1,2,3,cd)pireno, han sido identificados por la U.S. EPA como cancerígenos (Rogers, *et al.* 2002) .

La atenuación natural, también llamada remediación intrínseca, es un proceso natural de limpieza, al que se llega cuando los mecanismos de autoremediación son activados en un suelo contaminado. Los mecanismos de la atenuación natural contienen una serie de procesos físicos, químicos y/o biológicos que, bajo condiciones favorables, actúan sin intervención externa para reducir la masa, toxicidad, movilidad, biodisponibilidad, volumen o concentración de contaminante en suelos o aguas subterráneas. Estos mecanismos pueden ser clasificados como destructivos o no destructivos. Los mecanismos destructivos son principalmente químicos y biológicos e incluyen biodegradación, oxidación abiótica, transformación, hidrólisis, destrucción UV (sólo en la superficie), estabilización y mineralización.

Los mecanismos no destructivos son mayoritariamente físicos, incluyen sorción, difusión, dispersión y volatilización (Basel, 2002). Estos mecanismos no destructivos excepto la volatilización incluyendo la biodegradación, son los que también controlan el transporte de contaminantes por el medio subterráneo (Schirmer, 2004). Los procesos de atenuación natural y de transporte más importantes se detallan a continuación.

BIODEGRADACIÓN

La biodegradación es el más importante de los procesos que integran la atenuación natural y consiste en la transferencia de electrones desde los dadores (sustrato) hasta los aceptores (oxidantes). Esto causa la oxidación del danador de electrones y la reducción del aceptor. Este proceso está limitado por la disponibilidad de los aceptores de electrones y generalmente transcurre hasta que los contaminantes son transformados o eliminados (Basel, 2002).

A causa de la baja solubilidad y altos coeficientes de repartición agua-octanol de los HPA'S, la biodegradabilidad de éstos depende en gran medida de su biodisponibilidad. Los suelos que han estado contaminados por PAH durante un largo tiempo, típicamente muestran menos compuestos biodisponibles que otros suelos contaminados más recientemente (Carmichael, *et al.*1997).

Sin embargo, en algunos casos, los HPA'S sorbidos en suelos o sedimentos superficiales pueden estar más biodisponibles al estar más cerca de microorganismos también adsorbidos en el suelo. Se ha probado que algunos organismos del suelo producen biosurfactantes que pueden favorecer la velocidad de transferencia de masa desde las fases sorbidas, resultando en diferentes biodisponibilidades si las comparamos con microorganismos que dependen estrictamente de la transferencia de masa físico y químicas desde estas fases. La influencia global que estos organismos productores de biosurfactante tienen en la velocidad y extensión de la biodegradación que aún no ha sido estudiada. Actualmente tampoco existen métodos fiables para cuantificar

la biodisponibilidad o la cantidad de HPA'S que son susceptibles de biodegradación en un suelo dado.

Todos los 16 HPA'S prioritarios por la U.S. EPA son susceptibles de biodegradación. Los HPA'S de 2 o 3 anillos pueden ser eliminados completamente por los microorganismos tomándolos como única fuente de carbono y energía y bajo condiciones aeróbicas. Normalmente un organismo capaz de degradar compuestos con muchos anillos es capaz de degradar compuestos con menor número de anillos, sin embargo la mineralización microbiana de HPA'S de 4 o más anillos ocurre por cometabolismo estimulado por los procesos de oxidación de hidrocarburos poliaromáticos (HPA'S) mediante peróxidos inorgánicos en barreras reactivas permeables.

VOLATILIZACIÓN

La presión de vapor y la constante de Henry controlan el equilibrio de partición de la FLNA (fase líquida no acuosa) y el agua subterránea respectivamente. Una constante de Henry mayor, indica mayor tendencia del compuesto a volatilizarse (Seagren, *et al.* 2002). Por lo tanto los HPA'S, que tienen baja constante de Henry y baja presión de vapor, no se volatilizan con facilidad aunque las pérdidas por volatilización en el subsuelo podrían ser uno de los procesos de atenuación para los PAH de bajo peso molecular, como el naftaleno, y de HPA'S hasta 3 anillos. A más de 3 anillos no se esperan pérdidas significativas por volatilización (Bossert, y Bartha 1986 y Park, *et al.* 1990). Generalmente se asume una correlación inversa entre número de anillos y pérdidas por volatilización.

HIDRÓLISIS

Los PAH'S son químicamente estables y no son hidrolizados por grupos reactivos bajo las condiciones ambientales del subsuelo. Por lo tanto, la hidrólisis no contribuye al cambio abiótico en los HPA'S (Howard, *et al.* 1991). Los HPA'S pueden ser fotodegradados pero este efecto es mínimo en el subsuelo.

SORCIÓN

La sorción de HPA'S es un área de investigación muy importante, puede definirse como la interacción de una fase líquida con una sólida, y comprende en el detalle tres mecanismos: adsorción, precipitación superficial y sorción.

- La adsorción consiste en la acumulación de una especie del líquido (adsorbato) sobre la superficie de una fase sólida (adsorbente). Es un proceso complejo, en el que se establecen fuerzas de asociación entre ambos componentes de muy diverso tipo: enlaces (covalentes, iónicos, por fuerzas de van der Waals, por puentes de hidrógeno), intercambio de ligandos, energía de orientación dipolo-dipolo, efecto hidrofóbico).
- La precipitación superficial consiste en la formación de un precipitado cristalino sobre el sólido, que puede tener su misma u otra composición.
- La sorción implica la incorporación de la o las fases dentro del sólido, de forma más o menos uniforme en la estructura cristalina

Uno de los mayores procesos de atenuación natural en el subsuelo puede ser la sorción en la materia orgánica y superficies minerales. La sorción puede afectar a la migración de los HPA'S relativa al flujo subterráneo y también afecta a su concentración en disolución, lo cual a su vez afecta a la velocidad de otros procesos de transporte y transformación, por ejemplo biodegradación y volatilización (ASTM, 1998).

Además, la localización de los lugares de sorción puede tener un impacto en la desorción de los HPA'S en el medio suelo-acuoso, ya que la difusión en los microporos y materia intraorgánica puede afectar intensamente a la

transferencia de materia a la fase acuosa (Brusseau, *et al.* 1991 y Luthy, *et al.* 1997). Por estas razones, la sorción de HPA'S exhibe fuertes relaciones no lineales e histéresis en las isothermas, que se intensifican con el paso del tiempo (Macleod y Semple, 2000).

Además de la sorción, los HPA'S sorbidos pueden ser redistribuidos e incorporados a los materiales húmicos por enlaces covalentes, o pueden unirse irreversiblemente por acoplamiento oxidativo a enzimas microbianas o a la superficie de óxidos metálicos (Bollag, 1992). Por lo tanto el uso de modelos de sorción lineales y reversibles con coeficientes distribuidos no uniformemente pueden no ser adecuados para modelizar la sorción individualmente de cada HPA'S sorbido en el subsuelo.

DISOLUCIÓN

Según la solubilidad en agua de los HPA'S y la composición de la FLNA, los compuestos pueden disolverse lentamente en el flujo de agua subterránea, saliendo así de la FLNA. Para una mezcla de contaminantes este fenómeno puede ser descrito en muchos casos con la ley de Raoult, que afirma que la concentración de saturación de la sustancia en las aguas subterráneas en equilibrio depende de la fracción molar de la sustancia en la mezcla. Los componentes de solubilidad mayor son eliminados de la pluma preferentemente, así pues su fracción molar disminuye con el tiempo y por lo tanto la concentración de estos compuestos que emanan de la pluma también disminuye. Por otro lado, la fracción molar de los compuestos menos solubles va aumentando con el tiempo, y sus concentraciones en el flujo de agua subterránea también van aumentando. En general, a mayor caudal del acuífero, mayores cantidades de contaminante eliminadas de la pluma (Schirmer y Butler 2004).

DISPERSIÓN Y DIFUSIÓN

La dispersión y la difusión son los únicos mecanismos de mezcla para solutos en el subsuelo, y por lo tanto pueden desempeñar un papel fundamental para mezclar la pluma de contaminante con aceptores de electrones presentes en el acuífero, cuestión importante en cuanto a biodegradación (Cho, *et al.* 1997).

Además la dispersión y la difusión también pueden ser fundamentales para suministrar esos aceptores de electrones a la zona contaminada.

La dispersión hidrodinámica puede resultar en la disminución de la concentración del contaminante a causa de la dilución. Esto podría resultar de importancia para aquellos compuestos recalcitrantes a la biodegradación (Seagrem, *et al.* 2002) .

2.2.1 Propiedades físico y químicas de los HPA'S

Son sólidos a temperatura ambiente y su volatilidad es muy pequeña. Dependiendo de su carácter aromático, los HAP'S absorben luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico.

Las características comunes de estas sustancias son: puntos de fusión y ebullición elevados, presión de vapor baja, solubles en muchos disolventes orgánicos, pero muy poco solubles en agua, tanto menos cuanto mayor sea su peso molecular y por tanto lipófilos, así que son potencialmente bioacumulados y concentrados en sedimentos y suelos en función de su persistencia.

Aunque la solubilidad de los PAH'S puros en agua es sumamente baja estos compuestos pueden ser solubles a través de otras sustancias orgánicas como los detergentes. Además estos HPA'S son capaces de asociarse con coloides presentes en el agua y de esta forma pueden transportarse a través de ella.

La principal vía de degradación de estos compuestos incluye procesos químicos, fotolíticos o metabólicos asociados a microorganismos.

2.2.2 Características toxicológicas

Los principales impactos de los hidrocarburos poliaromáticos en la salud humana se centran en sus propiedades genotóxicas, es decir causan daños al material genético (teratogénicas, mutagénicas y carcinogénicas). Los más potentes carcinógenos son el benzo(a) antraceno, benzo(a) pireno y el dibenzo (ah) antraceno.

En general, los destilados del petróleo tienen efectos tóxicos muy graves cuando son aspirados al árbol traqueobronquial. Son disolventes de las grasas y alteran el sistema nervioso central (SNC) (Dreisbach y Roberson, 1981).

Los hidrocarburos aromáticos son más irritantes que los alifáticos, causan dermatitis y quemaduras severas. Si son aspirados causan edema pulmonar y neumonitis química.

Los HAP'S se absorben por las vías respiratorias, el aparato digestivo y la piel. La tasa de absorción por los pulmones depende del tipo de HAP'S, el tamaño de las partículas sobre las que están adsorbidos y la composición del adsorbente. Los HAP'S adsorbidos sobre partículas se eliminan de los pulmones con mayor lentitud que los hidrocarburos libres. La inhalación a concentraciones altas puede causar irritación bronquial y edema pulmonar. Una vez que han sido adsorbidos y distribuidos en el sistema circulatorio deprimen el Sistema Nervioso Central provocando, temblores, reflejos hiperactivos y convulsiones.

2.2.3 Contaminación generada por hidrocarburos poliaromáticos HPA'S

Químicamente, el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos, es decir, de compuestos ricos en carbono e hidrógeno, aunque contiene otros elementos minoritarios como azufre, oxígeno y nitrógeno, así como trazas de metales. Es complicada porque dada la capacidad del átomo de carbono de formar cuatro enlaces con otros átomos de carbono, se pueden organizar como cadenas ó como ciclos.

Los hidrocarburos forman parte de los contaminantes más ampliamente distribuidos en el ambiente ocasionando un efecto adverso a éste y a la salud pública.

Las fuentes de contaminación son diversas; en el ámbito mundial se estima que anualmente de 5 a 10 millones de toneladas de hidrocarburos entran al océano, de ellos casi el 45% ocurre por manejo del petróleo en barcos (incluyendo accidentes), 37% proviene de aguas industriales y residuos domiciliarios y sólo el 12% por actividades de explotación y producción. Cuando se conoce la causa de la contaminación por hidrocarburos se buscan compuestos específicos.

La magnitud de la contaminación se puede expresar a través de un contaminante clave, que puede ser el que se encuentre en mayor proporción o el que sea más peligroso. En el caso de la gasolina, se cuantifican los hidrocarburos monoaromáticos, benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX). Algunos autores eligen solamente el benceno por ser el más tóxico. Si se desconoce la causa de la contaminación o si se trata de una mezcla de contaminantes, la concentración de éstos puede ser expresada de manera global como hidrocarburos totales del petróleo (HTP).

En México, en zonas suburbanas las aguas residuales industriales, que generalmente contienen residuos de estos compuestos, son descargadas en canales a cielo abierto, sin barrera física que impida su migración hacia el subsuelo, provocando la contaminación del suelo mismo y de las aguas subterráneas.

Saval (1997), establece que la contaminación del subsuelo puede deberse a la infiltración de lixiviados generados por las lluvias, arrastrando gasolinas, turbosina, diesel y gasóleo que fluyen y durante su trayectoria son adsorbidos por el material geológico hasta que alcanzan el nivel freático. Así, los hidrocarburos se dispersan de acuerdo a la dirección de la corriente subterránea, creando manchas de contaminación de gran superficie.

También se ha reportado la presencia de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX), a 4 m de profundidad en el subsuelo de un canal de la subcuenca de Chalco, Edo. de México, donde se vierten aguas residuales industriales (Mizari-Hiriart, 1997). García (2000), evaluó la influencia de las descargas de aguas negras del Valle de México en la calidad del agua subterránea de tres municipios en el Estado de Hidalgo.

Mediante el análisis de compuestos orgánicos de diversas familias químicas tanto en las aguas negras como en las aguas subterráneas, se encontraron evidencias fehacientes de que las aguas negras se infiltran en el subsuelo contaminando las aguas subterráneas. De este estudio se destaca el caso del fenol cuya concentración en el agua subterránea (1 ppm) sobrepasa el límite establecido en la normatividad mexicana para el agua potable igual a 0.001 ppm (NOM-127-SSA1-1994), así como la presencia de otros compuestos como el benceno, el cual se reportó a niveles de concentración del orden de 1 ppm,

indicando que las aguas residuales generadas en los procesos de refinación del petróleo, contienen cantidades significativas de compuestos orgánicos, principalmente los hidrocarburos mono-aromáticos (Razo y col. 2000). También reportan que en un estudio del análisis de aguas residuales provenientes de refinerías mexicanas se encontraron concentraciones de hidrocarburos, principalmente benceno, tolueno y fenol, del orden de 5 mg/L.

La contaminación del medio ambiente marino por introducción de HPA'S, se produce generalmente por acciones antropogénicas, principalmente por derrames producidos en el transporte del petróleo a través del mundo, instalaciones fijas y otras fuentes como: desechos municipales, desechos industriales, aportes de ríos y intercambio atmosférico.

2.3 CARACTERÍSTICAS DEL COMPUESTO MODELO.

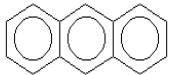
2.3.1 Características físico y químicas del compuesto modelo.

El antraceno es un compuesto de una amplia gama de sustancias, tanto de origen natural como sintética, conocida como hidrocarburos poliaromáticos (Kosteky y Calebrese, 1992). Estos compuestos por su aromaticidad, presentan una reactividad química relativamente baja y son difícilmente biodegradables, lo cual es importante desde el punto de vista ambiental.

El antraceno (del griego *anthrax*, carbón), es un hidrocarburo poliaromático, formado por tres anillos bencénicos unidos linealmente, en la tabla 2.1 se presentan las principales características físico y químicas del antraceno.

Con respecto a los riesgos se tiene que está en la lista de sustancias peligrosas, ya reglamentada por la, OSHA (Occupational Safety and Health Administration), ACGIH (American Conference of Governmental Industries Hygenists), FDA (Food Drug Administration), DOT (Departament of Trasportation), HHAG, y la EPA (Enviromental Protection Agenci). (Right to Know Program, 2002).

Tabla 2.1 Datos físicos y químicos.

DENOMINACIÓN QUÍMICA	Antraceno
Formula estructural	
# CAS	120127
Peso Molecular (g/MOL)	178.22
Numero de anillos	3
Punto de ebullición (°C)	342
Punto de Fusión (°C)	218
Solubilidad en agua (mg/L)	7.3E-02
Presión de vapor a 20°C (Pa)	2.61E-02
Constante partición Henry	2.67E-03
Log Coeficiente Partición octanol-agua	4.45
Coeficiente partición carbono orgánico (L/Kg).	2.95E+04
Difusión en aire (cm ² /s)	3.24E-02
Difusión en agua (cm ² /s)	7.74E-06
Captación de suelo a planta seca	11.0E-02
Captación de suelo a planta húmeda	2.2E-02
Factor de absorción dérmico	1.00E-02
Coeficiente de transferencia de carne (día/kg)	6.3 E-04
Coeficiente de transferencia de carne (día/kg)	2.0E-04
COLOR/FORMA	Placas monoclinicas por recristalización en alcohol; en estado puro es incoloro, con fluorescencia azul.

Fuente: Kosteky y Calebrese, 1992

Dentro de los riesgos más importantes a su exposición se mencionan los siguientes:

- En contacto con la piel puede causar irritación, picazón y ardor, que se agravan mucho con la exposición a la luz solar, el contacto repetido causa espesamiento de la piel y cambios de pigmentación.
- El respirar irrita la nariz, la garganta, genera tos y respiración con silbido.
- El contacto con los ojos ocasiona irritación y quemaduras.

En la tabla 2.2 se muestran los riesgos físicos y químicos del compuesto modelo que se trata en este trabajo.

Tabla 2.2 Riesgos físicos y químicos

DENOMINACIÓN QUÍMICA	FÍSICAS	QUÍMICAS
Antraceno	Posibilidad de ignición a distancia cuando se encuentra en forma de polvo o granular y se mezcla con el aire.	Se descompone al calentarse, por contacto de la luz solar y por influencia de oxidantes fuertes, produciendo humos tóxicos, con peligro de incendio y explosión.

2.3.2 Toxicidad del compuesto modelo

El antraceno puede causar mutaciones, al contacto con la piel puede causar irritación, picazón y ardor que se agrava con la exposición a la luz del sol, es posible que pueda causar alergia en la piel.

Respirar el antraceno puede irritar la nariz, la garganta y los pulmones causando tos y respiración con silbido. En contacto con los ojos puede causar irritación y quemaduras.

2.4 PROCESO DE BIODEGRADACIÓN

2.4.1 Microorganismos biodegradadores

La capacidad de degradación de compuestos que contienen anillos aromáticos está ampliamente distribuida en la naturaleza, y de hecho, se han aislado numerosas especies de bacterias y hongos degradadores de compuestos aromáticos conteniendo entre 2 y 5 anillos (Cerniglia, 1992; Sutherland, 1992; Kanaly y Harayama, 2000).

Se han descrito una gran variedad de géneros bacterianos degradadores de HAP'S que incluyen: Achromobacter, Acidovorax, Acinetobacter, Aeromonas, Agrobacterium, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Beijerinckia, Burkholderia, Comamonas, Corynebacterium, Flavobacterium, Microbacterium, Micrococcus, Moraxella, Mycobacterium, Neptunomonas, Nocardia, Paenibacillus, Porphyrobacter, Pseudomonas, Ralstonia, Rhodococcus, Sphingomonas, Streptomyces, Vibrio y Xanthomonas.

Asimismo también se han descrito una gran variedad de géneros de hongos degradadores de HAP'S como: Agrocybe, Aspergillus, Candida, Crinipellis, Chrysosporium, Cunninghamella, Bjerkandera, Fusarium, Kuehneromyces, Marasmiellus, Marasmius, Mortierella, Mucor, Naematoloma, Laetiporus, Phanerochaete, Pleurotus, Penicillium, Ramaria, Rhizoctonia, Rhodotorula, Saccharomyces, Syncephalastrum, Trametes y Trichoderma (Cerniglia, 1992)

2.4.2 Utilización de inóculos exógenos en experiencias de biorremediación.

Ha habido éxitos y fracasos en la utilización de inóculos microbianos exógenos especializados en la descontaminación de diferentes enclaves contaminados. En casos de emplazamientos contaminados por hidrocarburos con exposiciones largas o recurrentemente contaminados, la población autóctona habitualmente responde eficientemente a estrategias de bioestimulación incrementando su población y consiguiendo una biodegradación significativa de los contaminantes (Alexander, 1999). De hecho, se han descrito resultados favorables en procesos de biostimulación en suelos contaminados con distintas familias de hidrocarburos; con aceites

minerales pesados (Sabaté *et al.*, 2004), en suelos contaminados por HAP'S (Samanta *et al.*, 2002; Atagana, 2004), en enclaves contaminados con crudo de petróleo (Macnaughton *et al.*, 1999; Van Hamme *et al.*, 2003; Kaplan y Kitts, 2004), bifenilos policlorados (PCBs) (Nogales *et al.*, 2001) y herbicidas (Singh *et al.*, 2003).

En las situaciones en que la población indígena degradadora de hidrocarburos es inexistente o muy baja, debido a la toxicidad intrínseca de la matriz contaminante o por ser un enclave contaminado muy recientemente, el uso de inóculos exógenos puede ser beneficioso (Vogel, 1996; Alexander, 1999). En realidad se han descrito numerosas situaciones en las que el bioaumentación ha funcionado, en suelos, lodos y aguas subterráneas contaminadas. Sin embargo, es necesario en cada caso particular estudiar la necesidad o no de aplicar inóculos exógenos, así como sus condiciones óptimas de aplicación (Vogel, 1996).

Un gran número de inóculos exógenos utilizados en procesos de bioaumentación se corresponden a cultivos puros de cepas microbianas individuales, en cambio se utilizan consorcios no definidos en pocas ocasiones, aunque en realidad posean un mayor potencial catabólico. Su escasa utilización, reside en que es muy difícil conocer todos los componentes microbianos que existen en un consorcio no definido, cuya obtención es en base a procesos de enriquecimiento secuencial de muestras ambientales reales. Por lo tanto se hace necesario conocer la composición microbiana de los consorcios para adecuarse a la legislación ambiental así como también para comprender mejor el funcionamiento del mismo.

Por lo tanto, los microorganismos desempeñan un papel muy importante para eliminar los contaminantes presentes en un determinado lugar; ya que al estar en contacto con estos compuestos desarrollan los mecanismos necesarios para su asimilación. Entonces la eliminación de estos compuestos generalmente se realiza mediante el trabajo conjunto de todas las poblaciones microbianas presentes en dicho lugar.

Es importante citar que existen ciertos géneros de microorganismos que generalmente se encuentran en los lugares afectados, sin importar la situación geográfica en la que se presente la contaminación y estos son los siguientes:

Pseudomonas, *Arthrobacter*, *Torulopsis*, *Candida*, entre otros, por citar algunos de los principales géneros. Los microorganismos son seleccionados de manera natural en presencia de los contaminantes y la actividad degradadora puede ser estimulada por adición de nutrimentos básicos (Kosteky y Calabrese, 1992).

Un paso crítico en los procesos de biodegradación de los compuestos orgánicos es la selección adecuada de los microorganismos biodegradadores. El microorganismo ideal es el que degrada a los contaminantes orgánicos y no es patógeno para el hombre.

Las bacterias son los microorganismos degradadores dominantes de hidrocarburos en los diversos sistemas acuáticos. De las especies que degradan hidrocarburos las más comunes son los géneros *Pseudomonas* y *Micrococcus*. El papel de los hongos y de las levaduras como degradadores de hidrocarburos es menos significativa. Aunque también se han encontrado diversos grupos de hongos y algas capaces de metabolizarlos (Atlas y Cerniglia, 1995; Glegg, et al. 1999).

2.4.3 Características de los microorganismos biodegradadores

Existe una gran variedad de microorganismos identificados en la degradación de compuestos derivados del petróleo; casi todos son eubacterias, aunque en algunos casos se encontraron arqueobacterias y eucariotes. Aunque no han sido caracterizados en su totalidad, muchos de estos microorganismos poseen actividades de peroxidasas y oxigenasas, que permiten la oxidación más ó menos específicas de algunas fracciones del petróleo. Esta oxidación cambia las propiedades de los compuestos, haciéndolos susceptibles de ataques secundarios y facilitando su conversión a bióxido de carbono y agua.

En algunas ocasiones no es necesario llegar a la mineralización, sino que basta una oxidación para disminuir notablemente su toxicidad o aumentar su solubilidad en agua, incrementando su biodisponibilidad. Cabe mencionar que dichos microorganismos, para degradar cualquier contaminante insoluble en agua, necesita forzosamente como primer paso para su asimilación la emulsificación de este, lo cual se realiza a través de la producción de agentes tensoactivos que los propios microorganismos excretan al medio de reacción o en otros casos, la membrana misma de ellos tiene la capacidad de emulsificar y pueden encontrarse en el mismo medio.

2.4.4 Rutas de biodegradación de los HAP'S

Los microorganismos juegan un papel importante en la eliminación de los HAP'S en los ecosistemas terrestres y acuáticos, siendo la degradación microbiana el principal proceso de descontaminación natural (Sutherland *et al.*, 1995). Por lo tanto es necesario un buen conocimiento y control de este proceso natural para aplicarlo a tecnologías de biorremediación (Wise, 2000)

En la figura 2.1 se muestran las primeras reacciones de transformación aeróbica de los HAP'S, siendo característico de los hongos y los mamíferos la introducción de un solo átomo de oxígeno mediante una monooxigenasa que contiene el citocromo P-450, y la transformación a *trans*-dihidrodiol. En este proceso de transformación se generan metabolitos más solubles, para su posterior eliminación (proceso de detoxificación) (Cerniglia, 1984; Cerniglia *et al.*, 1985; Sutherland *et al.*, 1995). Los hongos lignolíticos pueden degradar e incluso mineralizar los HAP'S mediante el conjunto de enzimas implicados en la utilización de polímeros vegetales como la lignina. (Bumpus, 1989; Cerniglia *et al.*, 1992; Hammel *et al.* 1992).

Las bacterias inician la oxidación del anillo aromático mediante la incorporación de dos átomos de oxígeno catalizado por una dioxigenasa (fig. 2.1). A partir de esta reacción se forma un *cis*-dihidrodiol, a diferencia de los hongos y mamíferos que generan un *trans*-dihidrodiol, y el anillo pierde la aromaticidad. A continuación una deshidrogenasa NAD⁺ dependiente, reconstituye el anillo aromático formando un catecol (diol). Los dioles son moléculas a partir de las cuales se produce la ruptura del anillo aromático mediante dioxigenasas estereoselectivas. La ruptura se puede dar entre los dos grupos hidroxilos, denominándose *orto*-ruptura, o adyacente a estos grupos, denominándose *meta*-ruptura.

Las bacterias inician la oxidación del anillo aromático mediante la incorporación de dos átomos de oxígeno catalizado por una dioxigenasa (fig. 2.1). A partir de esta reacción se forma un *cis*-dihidrodiol, a diferencia de los hongos y mamíferos que generan un *trans*-dihidrodiol, y el anillo pierde la aromaticidad.

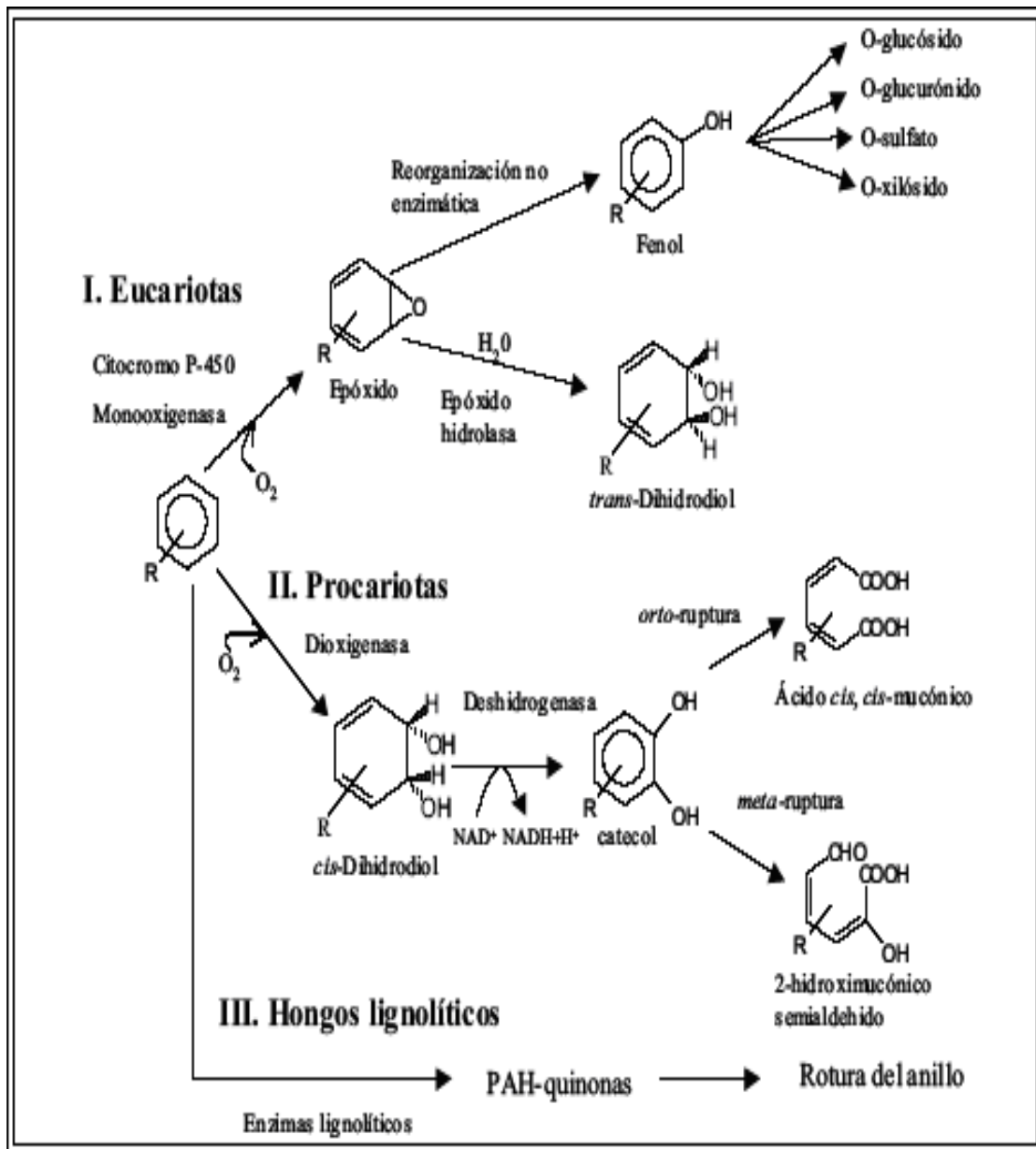


FIG. 2.1 Reacciones iniciales del metabolismo aerobio de los HPA'S

A continuación una deshidrogenasa NAD⁺ dependiente, reconstituye el anillo aromático formando un catecol (diol). Los dioles son moléculas a partir de las cuales se produce la ruptura del anillo aromático mediante dioxigenasas estéreo selectivas. La ruptura se puede dar entre los dos grupos hidroxilos, denominándose *orto*-ruptura, o adyacente a estos grupos, denominándose *meta*-ruptura.

Existe en la naturaleza una gran cantidad de microorganismos capaces de biodegradar una amplia variedad de hidrocarburos aromáticos, desde los más simples como el benceno, hasta los más complejos como los alquilbencenos y aromáticos polinucleares tales como el naftaleno, fenantreno y antraceno (Atlas y Cerniglia, 1995).

Recientemente se ha comprobado que la biodegradación de HPA'S en condiciones aerobias produce una mayor remoción y en ella interviene el Citocromo P-450 como catalizador de la reacción de oxidación (Savas, *et al.* 1997).

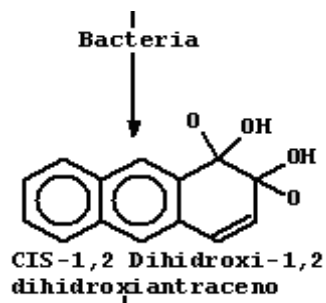
Los microorganismos que llevan a cabo este proceso pueden ser hongos o bacterias, incluso se han llegado a secuenciar las rutas metabólicas de degradación (Stanley, 1986; Shutherland, 1992).

2.4.5 Ruta metabólica de degradación del antraceno

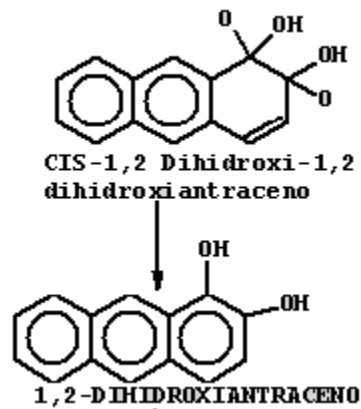
Se ha estudiado la degradación del antraceno ampliamente. Aunque sus metabolitos no son carcinogénicos, su emisión en el ambiente ha despertado un interés considerable. Adicionalmente, se usa antraceno como sustrato en estudios que pertenecen a la degradación de HPA'S en el medio ambiente.

La oxidación bacteriana del antraceno es similar al naftaleno. Algunos microorganismos aislados de la tierra tienen la habilidad de utilizar el antraceno como fuente de carbono y energía.

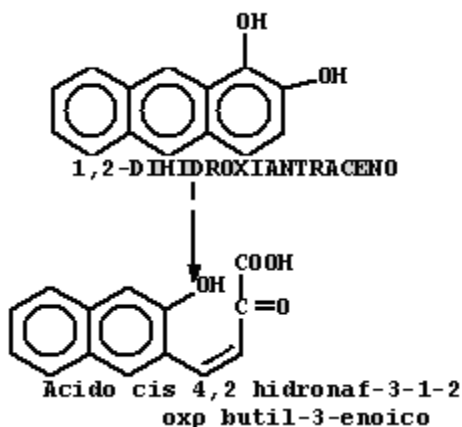
La degradación durante la mineralización bacteriana de antraceno se muestra en la figura 2.1., varias especies de *Pseudomonas*, bacterias, hongos y especies como: *Beijerinckia*, *Cunninghamella elegans*, entre otras pueden oxidar al antraceno e inicialmente formar (+)-cis-1R, 2S-dihidroxi-1,2-dihidroantraceno.



El segundo paso en la oxidación bacteriana del antraceno es la conversión de cis-1,2-dihidroxi-1,2dihidroantraceno en 1,2-dihidroxi-antraceno,

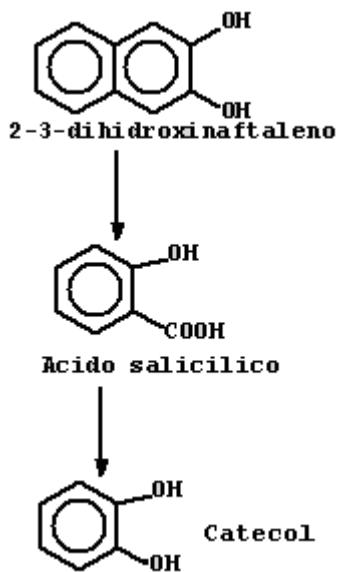


Se ha encontrado que la especie de *Pseudomonas* sp. afectan al 1,2-dihidroxi-antraceno enzimáticamente por la dioxigenasa para dar ácido cis-4-(2-hidroxinaphtaleno-3-1)-2-oxobutil-3-enoico.

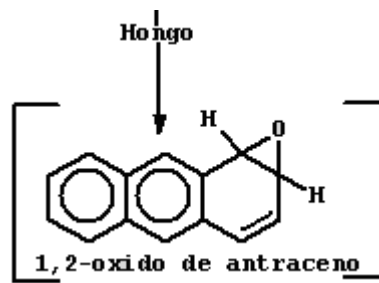


El metabolismo de este producto lleva a cabo la formación de ácido 2-hidroxi-3-naphtoico.

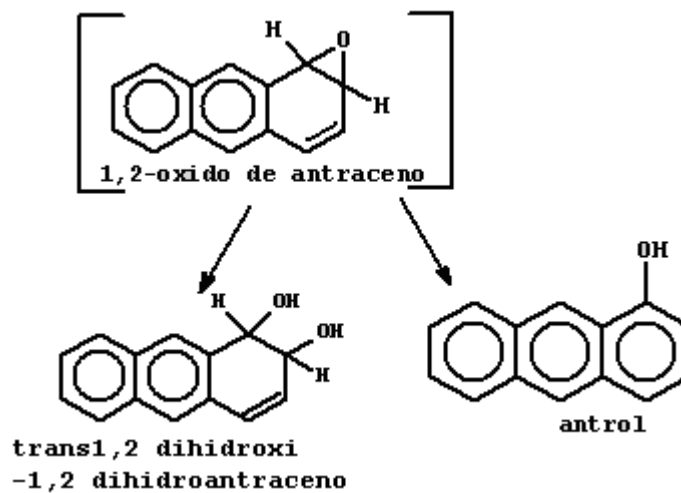
Este compuesto se metaboliza más a través de salicilatos y catecol por enzimas similares a las que metabolizan al naftaleno.



Los hongos también metabolizan al antraceno. Como el *Cunninghamella elegans* que oxida al antraceno inicialmente en posición-1,2 para formar trans-1S, 2S-dihidroxi-1,2dihidroantraceno.



El 1,2-oxido de antraceno se reestructura para formar 1-antról, que se conjuga rápidamente como consecuencia del sulfato.



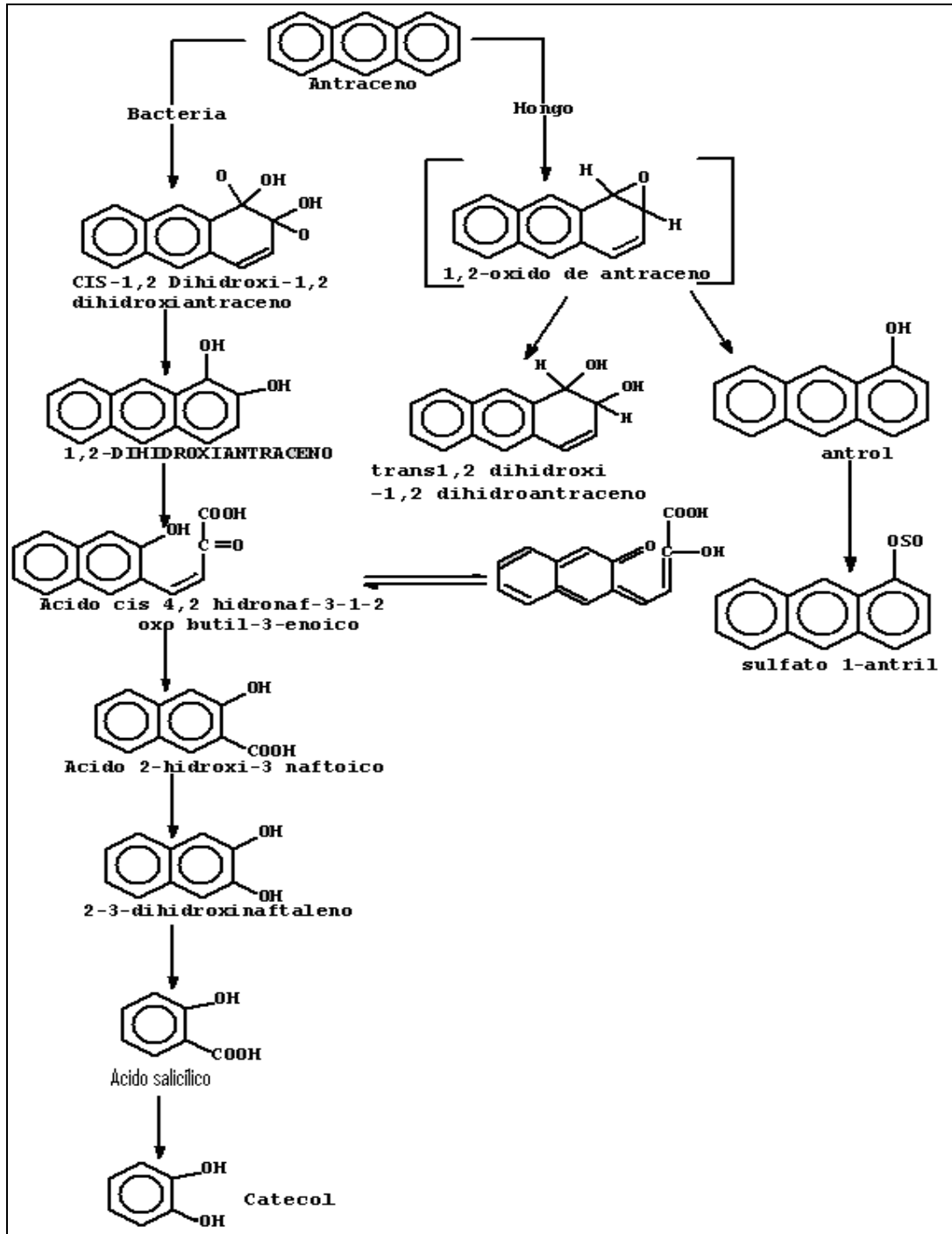


Figura 2.2 Degradación del antraceno.

2.5 FACTORES INVOLUCRADOS EN LA BIODEGRADACIÓN DE HPA'S.

Para que se lleve a cabo este proceso de degradación es necesario proveer a los microorganismos una serie de requisitos como son: concentración adecuada de nutrientes (fuente de nitrógeno y fósforo principalmente), presencia de un aceptor final de electrones (en caso de que el proceso sea aerobio el oxígeno es el aceptor final, mientras que si el proceso es anaerobio se puede utilizar el sulfato o el nitrato), condiciones físico y químicas como son: pH y temperatura.

Además el suelo debe cumplir con otras propiedades: conductividad eléctrica (que esta relacionada con la salinidad), textura, capacidad de campo (o sea, la cantidad de agua que puede retener el suelo) y permeabilidad (que de alguna forma indica el tipo de suelo los cuales pueden ser: arcillosos, limosos, arenosos, etc.) Otros factores físicos son: temperatura, oxigenación, salinidad, humedad, acidez, alcalinidad y nutrimentos (Leahy y Colwel, 1990).

2.5.1 Biodisponibilidad.

Específicamente, se han descrito en forma general los factores principales que están involucrados en la biodegradación de HPA'S en medio líquido donde el HPA'S está relativamente biodisponible. A continuación se describen, con base en estudio de casos, otros factores que intervienen en la biodegradación de HPA'S en el suelo, principalmente aquellos que propician la biodisponibilidad del hidrocarburo. En la biodegradación del HPA'S en el suelo, la biodisponibilidad de hidrocarburo puede llegar a ser el paso que determine la factibilidad de remoción.

Para entender la poca biodisponibilidad de los HP'S en el suelo es necesario recordar que el suelo es una matriz compleja, formada principalmente por arena, limo, arcilla y materia orgánica, siendo la proporción de arcilla el factor más importante en la adsorción de materia orgánica incluyendo los HPA'S, de tal forma que un suelo con una gran cantidad de arcilla deja en menor biodisponibilidad a los HPA (Siebe, 1997).

Ante esta problemática se han propuesto dos soluciones: mezclar el suelo con composta o otra materia que sirva como soporte para los

microorganismos y que a su vez compita con el suelo para la adsorción de HPA'S (Käster y Mahro, 1995) o agregar un compuesto surfactante (tensoactivo) capaz de reabsorber los HPA de la arcilla y hacerlos disponibles en el agua presente en el suelo, el inconveniente de utilizar esto es que los microorganismos no solo degradan al HPA sino también al agente surfactante (Madsen y Kristense, 1997; Soeder *et al*, 1996).

Sin embargo se ha observado que algunos microorganismos son capaces de generar compuestos extracelulares (enzimas) para desorber el HPA'S del suelo tal como sucede con algunos hongos (Andersson y Henrysson 1996).

2.5.2 Temperatura

La temperatura influye en la velocidad de degradación marcadamente, dependiendo del tipo de microorganismos disponibles. Normalmente las temperaturas más adecuadas se encuentran entre 20 ° C y 40 ° C, (los microorganismos que trabajan a estas temperaturas se denominan mesófilos). La velocidad de degradación aumenta con la temperatura, por lo que un incremento de la misma es útil. Cuando supera los 40°C se produce una disminución de la actividad microbiana, o bien se produce una rotación poblacional hacia especies más resistentes a las altas temperaturas, como ocurre en los procesos de compostaje en donde se alcanzan temperaturas de 65 °C. Durante el cambio de poblaciones se produce una disminución de la actividad microbiana. Se han registrado procesos de campo en donde la temperatura del suelo contaminado con petróleo alcanzó 70 °C, y se mantuvo la actividad degradadora (Ercoli, *et al*. 2001).

En los procesos aerobios la actividad microbiana produce un aumento de la temperatura del suelo llevándolo a rangos entre 20 °C y 45 °C cuando la temperatura ambiente oscila entre 20 °C y 23 °C con muy buenos resultados degradativos.

En la actividad de los microorganismos y en la composición de la flora microbiana, la degradación generalmente disminuye cuando la temperatura desciende, lo que se relaciona con una baja de la actividad enzimática (Gibbs *et al*, 1975).

2.5.3 Oxigenación

La oxigenación es el paso inicial del catabolismo de HPA usando el complejo enzimático Citocromo P-450, que requiere de oxígeno. La disponibilidad de oxígeno en suelos depende del consumo microbiano, la unidad de suelo, si se encuentra inundado y de la presencia de sustratos utilizables. (Bossert y Bartha, 1984).

2.5.4 Salinidad

El grado de metabolización de un hidrocarburo disminuye cuando se incrementa la salinidad en un intervalo de 3.3 a 28.4%.

2.5.5 Humedad

El agua es importante para el desarrollo de los microorganismos ya que actúa como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula. Es conveniente mantener una humedad del orden del 70% de la capacidad de campo, la cual se define como la masa de agua que admite el suelo hasta la saturación, que depende de cada tipo de suelo. Un exceso de humedad produce inhibición del proceso por anaerobiosis. Un déficit impide el desarrollo de los microorganismos.

Se considera que la humedad adecuada para la actividad microbiana es de 40% al 68% para sistemas aerobios. En suelos con humedad mayor al 70% se reduce la transferencia de oxígeno y disminuye de manera significativa la actividad microbiana (Cookson, 1995; Griffin, 1980).

2.5.6 Acidez y alcalinidad

Un suelo con pH de 6 a 7 se considera neutro, con pH menor de 4.5 es muy ácido y muy básico de 8 en adelante. El pH del suelo se relaciona con la capacidad de intercambio iónico del mismo (Primo, 1981).

El pH afecta el comportamiento de las funciones celulares, transporte de la membrana celular y el equilibrio de reacciones catalizadas de los microorganismos. El crecimiento bacteriano se lleva a cabo en condiciones óptimas de pH neutro a ligeramente alcalino. La degradación de hidrocarburos se reporta como rápida a pH cercano a 7, para el caso de algunos hongos

como *Phanerochaete chrysosporium*, su actividad aumenta a pH de 4.5 (Rodríguez *et al*, 1999; Dhawale *et al*, 1992).

El pH del suelo es importante para el desarrollo de los microorganismos degradadores, siendo los más adecuados los comprendidos entre 6 y 8. Cuando el pH excede 8 se debe disminuir el mismo mediante adición de azufre al suelo. Si es menor de 6 se puede incrementar mediante la incorporación de carbonato de calcio o hidróxido de calcio al suelo. En todos los casos de modificación del pH del suelo se deben realizar ensayos previos para definir la masa a incorporar de azufre o carbonato según el caso. Cuando se encuentran metales pesados en el terreno a muy altas concentraciones se debe trabajar a un pH que mantenga el metal inmovilizado o en forma no soluble (pH alto), para disminuir la toxicidad de los microorganismos. En estos casos es conveniente evaluar la posibilidad de trabajar a pH distintos de los óptimos para evitar efectos tóxicos. Se han registrado procesos de biodegradación de hidrocarburos a pH superior a 8.

2.5.7 Nutrimentos

La composición básica de las bacterias es de 80% agua y 20% de materia seca, de la que el 90% es materia orgánica y el 10% de inorgánica. Una fórmula que permite describir de manera aproximada su fracción orgánica es $C_5H_7O_2N$ (EPA, 846). Cuando también se considera la presencia de fósforo, se puede emplear la formulación $C_{60}H_{87}O_{23}N_{12}P$. Los compuestos que forman parte de la fracción inorgánica incluyen P_2O_5 (50%), SO_3 (15%), Na_2O (11%), CaO (9%), MgO (8%), K_2O (6%) y Fe_2O_3 (1%) (Metcalf y Eddy, 1998). Puesto que todos estos elementos y compuestos deben proceder del entorno en que se desarrolla la célula, la falta de cualquiera de ellos limitará el crecimiento celular. Con base en esta información se realiza un cálculo teórico de la cantidad de nitrógeno y fósforo para la síntesis de la masa molecular (Mills y Frankenberger, 1994).

Sin embargo, mejor que calcular las necesidades teóricas nutricionales o utilizar una regla empírica se debería determinar como parte de los ensayos de tratabilidad en donde se ha adoptado una regla empírica 100:25:5 (La Greca y Buckingham, 1998). También las que son producto de la experimentación ajustando la relación C:N:P hasta obtener la óptima relación C:N:P 100:10:1, o donde se observan mejores rendimientos (Rojas *et al*, 2000). Las necesidades específicas son mucho más dependientes del tipo de residuo, la disponibilidad

de nutrimentos en el mismo, producción de biomasa y el diseño del sistema en tratamiento. De esta forma se tienen diferentes relaciones C:N:P. Encontrando las diferentes relaciones que se basan en la cantidad de carbono orgánico total COT, con la proporción de COT:N:P de 100:23:4.3 pero por lo general es necesario 150 mg de nitrógeno y 30 mg de fósforo para convertir 1 g de hidrocarburo en material celular (Crawford y Crawford, 1997).

Asimismo se debe considerar que durante la degradación del hidrocarburo, se convierte aproximadamente la mitad en material celular y el resto se oxida para obtener energía.

La energía liberada en las reacciones de oxido-reducción no se desperdicia sino que se emplea en la formación de ciertos compuestos bioquímicos que contienen enlaces fosfato de alta energía, el más común es el ATP, que actúa como receptor primario de energía en la célula (Neidhardt *et al*, 1993).

Los nutrimentos requeridos para el crecimiento de los microorganismos son: nitrógeno y fósforo los que probablemente llegan a estar presentes de manera deficiente en el suelo contaminado, por lo que normalmente se deben agregar al sistema de biorremediación en forma disponible (ejemplo: amonio como fuente de nitrógeno y fosfatos como fuente de fósforo) específicamente la adición de fosfatos contribuye en la formación de ATP para llevar a cabo la función metabólica, y en la conformación de aminoácidos y fosfolípidos así como otros compuestos necesarios para el desarrollo de microorganismos. Al igual que el fósforo otro nutrimento de suma importancia es el nitrógeno que es clave para la construcción de aminoácidos y ácidos nucleicos.

2.6 BIORREMEDIACIÓN DE COMPUESTOS RECALCITRANTES

El desarrollo de químicos sintéticos derivados del petróleo provee muchos materiales extremadamente útiles, tales como plásticos, plaguicidas, aislantes, refrigerantes y retardantes de flama. Muchos de estos materiales nunca habían existido en la naturaleza y por lo tanto los microorganismos no poseen enzimas para degradarlos. De aquí que se consideren no biodegradables o recalcitrantes. Los términos no son completamente precisos sin embargo, ya que ahora se sabe que muchos compuestos clasificados como recalcitrantes son degradados lentamente en el suelo o en medios acuosos.

Ejemplos de tales compuestos tóxicos que han causado desastres ecológicos incluyen al DDT (diclorofeniltricloroetano), bifenilos policlorados y pentaclorofenol.

El estudio de la diversidad microbiana y las dinámicas de sus poblaciones en consorcios biodegradadores está creciendo notablemente en el área de la ecología microbiana.

El interés en esta área ha sido catalizado por el rápido avance de métodos de ecología molecular ya que a través de su uso se tiene una mejor perspectiva de la composición de comunidades microbianas no cultivables. Las comunidades microbianas en ecosistemas contaminados tienden a ser dominadas por aquellos organismos capaces de utilizar y/o de sobrevivir a los compuestos tóxicos.

Como resultado, estas comunidades son menos diversas que aquellos sistemas de referencia no contaminados, aunque la diversidad también puede estar influenciada por la complejidad de la mezcla de compuestos presentes y por el tiempo que las poblaciones han estado expuestas.

A pesar de la relativamente larga historia de investigación en la biorremediación de derrames de petróleo, ésta continúa siendo una disciplina esencialmente empírica y muchos de los factores biológicos que controlan los procesos no han sido adecuadamente comprendidos. Por ejemplo, la adición de nutrientes es una práctica ampliamente aceptada en la limpieza de derrames aunque es escaso el conocimiento de sus efectos durante el proceso de la biorremediación

Existen evidencias experimentales que indican que los niveles de nutrientes, y su concentración relativa con respecto a los contaminantes, influyen en la composición de las poblaciones de microorganismos degradadores, lo cual a su vez afecta la tasa de degradación de los contaminantes.

2.7 TENSOACTIVOS EN BIORREMIACIÓN DE SUELOS

Las variables más importantes que limitan la biorremediación de HPA'S de alto peso molecular son la transferencia de masa y las pérdidas abióticas.

Dada la baja solubilidad de estos compuestos en agua, una de las estrategias para la biorremediación en suelo es la adición de tensoactivos naturales o sintéticos, que solubilicen a los HPA'S y aumenten su biodisponibilidad (Rosenberg y Ron 1999).

Una variación interesante es la identificación de organismos que degraden tanto los compuestos contaminantes como los surfactantes, de manera que no se acumulen otros compuestos xenobióticos al suelo (Frederick y Ergon 1994).

Los tensoactivos pueden ser utilizados para ayudar a llevar a cabo los tratamientos de biorremediación de suelos contaminados.

Los tensoactivos son moléculas alifáticas y son utilizados para reducir el área y la tensión superficial, cuando se presentan en concentraciones mayores que la concentración micelar crítica (CMC), los tensoactivos pueden producir micelas de compuestos orgánicos hidrofóbicos (HOCs) en agua, las microemulsiones incrementan el área superficial entre los HOCs y la fase acuosa, de este mismo modo se incrementa la concentración acuosa de HOCs. La reducción de la tensión superficial provoca la formación de burbujas.

Los tensoactivos biológicos (biotensoactivos o bioemulsificantes) son producidos por muchos géneros de microorganismos, los cuales utilizan para su crecimiento los HOCs. Al incrementarse la presencia de HOCs en la fase acuosa provoca que los microorganismos aceleren la degradación de los mismos.

Los biotensoactivos son utilizados en la biorremediación *in situ* y *ex situ* de suelos y aguas contaminadas. Asimismo, en procesos alimenticios, solubilización de agroquímicos, limpieza industrial y en la dispersión de cosméticos y de textiles.

Debido a que los hidrocarburos son hidrofóbicos en la biorremediación de áreas contaminadas con estos compuestos, se utilizan tensoactivos que emulsifican a los hidrocarburos para que los microorganismos puedan actuar sobre ellos. (Shankar et al. 1996).

2.8 REACTOR DE SUELOS ACTIVADOS (RSA)

El reactor de suelos activados es utilizado para tratar sólidos o lodos contaminados como suelos arcillosos y lodos aceitosos. El RSA puede aplicarse

en compuestos orgánicos difíciles tales como hidrocarburos poliaromáticos, insecticidas, hidrocarburos del petróleo y poliaromáticos clorados (Cookson, 1995).

El tratamiento de estos contaminantes es generalmente llevado a cabo en un proceso continuo. Algunas veces los sólidos son procesados para concentrar a los contaminantes y reducir el volumen de material en el reactor.

El suelo dentro del reactor es mantenido en suspensión y mezclado con nutrientes. Los RSA pueden contener del 60-95% de agua, y esto va a depender de la naturaleza del contaminante. Si es necesario se puede adicionar un ácido o un álcali para mantener el pH. También se puede adicionar microorganismos que tengan capacidad de degradación de los contaminantes (Crawford y Mohn, 1985).

El reactor de suelos activados presenta varias ventajas al ser comparado con sistemas de fase sólida. El RSA incrementa la velocidad de degradación del contaminante, esto es debido a que aumenta el contacto entre los microorganismos y el contaminante.

La fase acuosa aumenta la solubilidad de los compuestos químicos orgánicos, además de aumentar la homogeneidad del medio, por lo que mejora la distribución de nutrientes, aceptores de electrones y sustrato primarios. También facilita la desorción de los contaminantes en el suelo al utilizar tensoactivos (Cookson, 1995).

En el RSA hay una mayor transferencia de masa, lo que facilita la eficiencia de degradación de los contaminantes.

El tiempo de retención de los RSA es bajo, lo que permite que el proceso sea más rápido, además de que se puede utilizar tanto para un sistema aerobio como anaerobio. Las condiciones en las cuales se lleva la degradación de los contaminantes en RSA pueden ser controladas, lo que ayuda a optimizar los parámetros físico y químicos (Cookson, 1995).

Pero el RSA tiene también desventajas, todas relacionadas con requerimientos adicionales del proceso y el manejo de materiales, causando altos costos.

2. FUNDAMENTOS

El RSA es más costoso comparado con otras técnicas de biorremediación como son la labranza y el composteo, pero es menos costoso que la incineración extracción con solventes y deserción térmica. Otra desventaja es que cuando se lleva a cabo la separación de los sólidos después del tratamiento de los lodos, resultan cantidades significativas de agua de desecho, la cual puede requerir un tratamiento posterior después de la descarga (Cookson, 1995)

3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

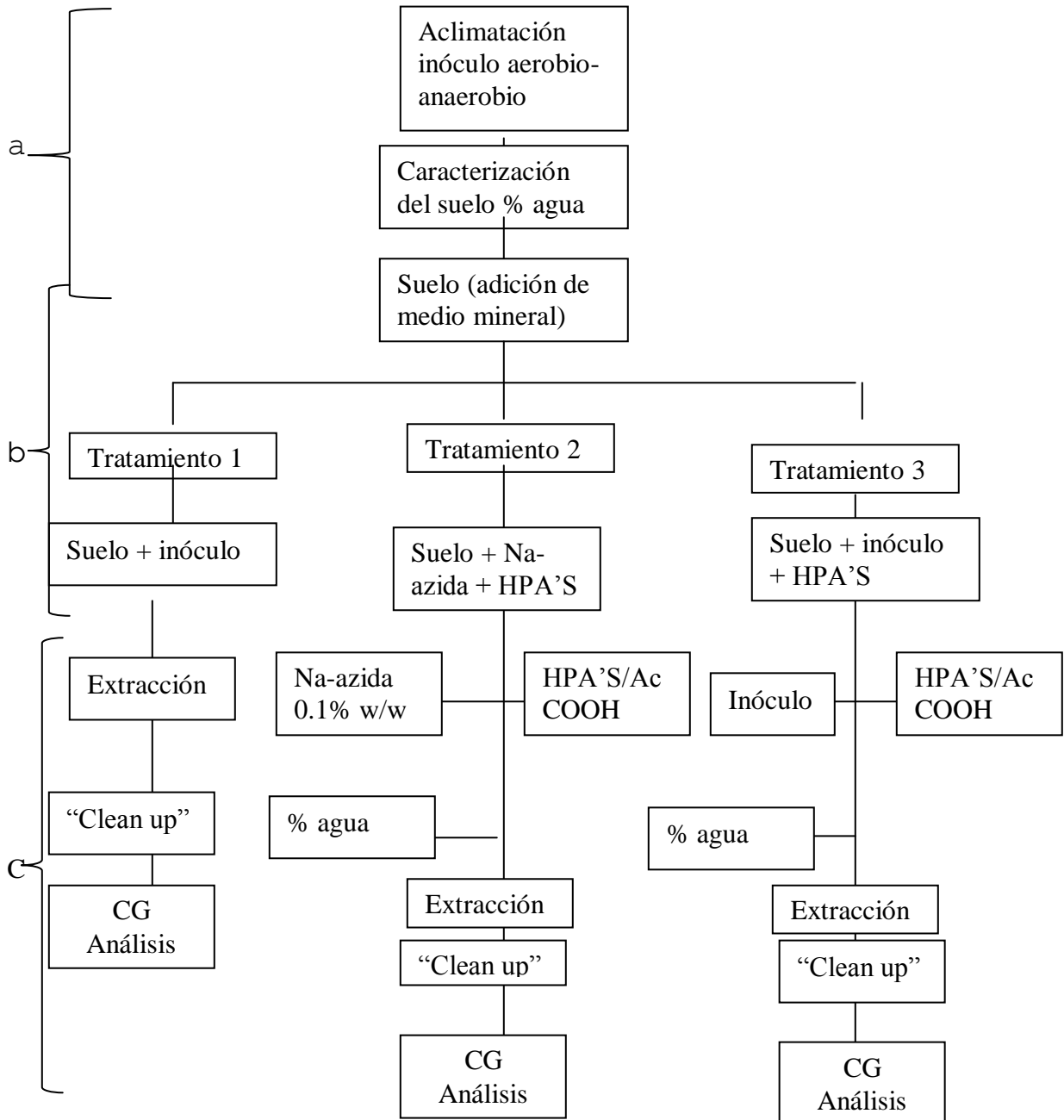
Para realizar el estudio que permita determinar la factibilidad de la eliminación de los HPA'S del suelo por microorganismos fue necesario considerar, en lo posible todos los fenómenos que se pudieran presentar durante la fase experimental como: fotocátalisis, evaporación, descomposición térmica o por el contrario, dado la naturaleza de los HPA'S, se presentara una adsorción tal que fuera imposible retirarlos del suelo.

Por lo anterior y a efecto de corroborar que la degradación que se presentó fue atribuible únicamente a la acción de los microorganismos y no a fenómenos abióticos, se plantearon tres experimentos simultáneos con las características indicadas en la tabla 3.1 de acuerdo con esto el tratamiento 1: sirve como testigo y para determinar las posibles interferencias de los compuestos orgánicos presentes inicialmente en el suelo. En el tratamiento 2: la adición de azida de sodio servirá para inhibir la actividad microbiana y detectar la degradación abiótica que se pueda presentar y el tratamiento 3: en el que se observa cómo se lleva a cabo la degradación microbiana de los HPA'S.

Tabla 3.1 Características de los experimentos realizados con suelo

TRATAMIENTO	Suelo Seco Caracterizado (g)	Medio Mineral (ml)	Antraceno (mg)	Solvente (Acetona) (ml)
(1) Suelo + Inóculo	300	80	0,50,100,300, 500 y 1000	0
(2) Suelo + HPA'S + Azida	300	80	0,50,100,300, 500 y 1000	250
(3) Suelo + Inóculo + HPA'S	300	80	0,50,100,300, 500 y 1000	250

3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL



NOTA: "Clean up" se refiere a la extracción fase líquida del compuesto de interés a ser cuantificado
CG; cromatografía de gases.

Figura 3.1 Diagrama de flujo de etapas del trabajo.

En la figura 3.1 se presentan las diferentes actividades realizadas que constan principalmente de: a) contaminación del suelo con HPA'S, b) inoculación del suelo, c) aplicación de metodología analítica, extracción, acondicionamiento del extracto "clean up", análisis en el cromatógrafo de gases.

3.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO.

El suelo base utilizado, fue caracterizado con los siguientes resultados que se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Caracterización del suelo modelo.

Localización	Ejido la resurrección, Texcoco, Edo. de México
Tipo	Tepic Haplusert
Profundidad	27 a 51 cm., Perfil A
Color	Pardo grisáceo oscuro
Clase textural	Arcilloso-limoso
% Arcilla	48
% Materia orgánica	2.17
pH	7.1

La composta utilizada para aumentar la materia orgánica en el suelo modelo también fue caracterizada para tener un contenido total de materia orgánica del 4%.

El suelo fue previamente tamizado, permitiendo solamente el paso de partículas menores a 2 mm utilizando un tamiz malla 35, con el propósito de eliminar raíces y hojas, así como para diseminar los agregados existentes, contar con un suelo homogéneo y con características de textura adecuada para la realización del estudio.

Se agregan 11.7 gramos de composta seca previamente molida en licuadora y se mezcla con el suelo modelo para aumentar el contenido de materia orgánica al 4%. Su caracterización fue proporcionada por el Colegio de Posgraduados (Tabla 3.3)

Tabla 3.3 Caracterización de la composta

pH	6.8
Conductividad eléctrica	8 dS m ⁻¹
Materia orgánica	51 %
Nitrógeno total	1.7 %
Fósforo total	1.4 %
Potasio total	2.3 %
Calcio	2.2 %
Magnesio	0.8 %
Sodio	0.19 %
Hierro	5500 ppm
Cobre	12 ppm
Zinc	102 ppm
Manganeso	155 ppm
Nitrato	37 meqL ⁻¹
Amonio	23 meqL ⁻¹
Relación ácidos húmicos/fulvicos	1.67-1.90

La cantidad de composta añadida al suelo, se calculó de la siguiente manera:

SB= gramos de suelo base
 SM= Gramos de suelo modelo
 C= gramos de composta
 MO= % materia orgánica

$$(MO \text{ del SM})(SM+C) = (MO \text{ del SB}) + (MO \text{ de C}) \text{ ©}$$

$$(0.04)(100+C) = 2.17 + 0.51C$$

Despejando C, tenemos:

C= 3.9 gramos de composta por cada 100 g de suelo base.

3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Se esteriliza la muestra de suelo a 121 °C/ 151 lb durante 1 hora a 35 °C durante 24 horas. Se repite esta operación tres veces.

Este suelo ya esterilizado se somete al tratamiento 1 el cual se adiciona 21.616 gramos de inóculo sin HPA'S y 80 ml de medio basal de sales (MBS).

En los tratamientos 2 y 3 el suelo fue contaminado con las siguientes concentraciones de HPA: 300 mg de antraceno por kilogramo de suelo seco para lograr esto, antes de agregar el medio mineral y los microorganismos, se preparó una solución de antraceno en concentración igual a la que tendría en el suelo. Como disolvente se utilizaron 250 ml de acetona.

Esta solución se agrega al suelo modelo esparciéndola homogéneamente, extendiéndola en una charola.

Se mezcla con una espátula homogéneamente y se dejó en la oscuridad. Posteriormente se agregó el inóculo o la azida de sodio según correspondió. Una vez realizado lo anterior, se cubrió la parte exterior de la charola con papel aluminio con el propósito de evitar la fotodegradación. La temperatura se mantuvo constante a 20°C. La tabla 3.1 resume las características de cada experimento.

3.2 CONTROL DE HUMEDAD

La muestra se coloca en el horno a una temperatura de 105°C durante 24 horas tiempo suficiente para que se evapore el agua que contiene. Una vez realizado lo anterior, se pesa y por diferencia de pesos entre el inicial y el final, se determina la cantidad de agua presente.

Este tipo de análisis debe hacerse en muestras representativas y por triplicado a efecto de contar con resultados confiables. Debe recordarse que del suelo bajo estudio ya se había determinado con anterioridad la Máxima Capacidad de Retención de Agua (MCRA), la cual fue de 0.373g de agua por gramo de suelo seco.

Además se sabe que para que ocurra la biodegradación en el suelo, este debe contar con aproximadamente un 60 % como máximo respecto a la MCRA. En este caso el valor fue de 0.2238 gramos de agua por gramo de suelo seco, el cual corresponde a un valor aceptable.

3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Se prepara una serie por triplicado de 6 botellas selladas con tapones de incubar a temperatura ambiente a 100 rpm en la oscuridad se sacrifican los controles a 0, 15 y 30 días. Para sistemas aerobios solo se les coloca una torunda de algodón por lo que en consecuencia por fenómenos naturales de evaporación la cantidad de agua disminuye pero muy poco. En el sistema anaerobio se preparan en una cámara anaerobia, la cual se procesa toda la preparación en condiciones en ausencia de oxígeno y para asegurar las condiciones anaeróbicas se sellan los frascos con septas y se engargolan con tapas de aluminio.

3.3 INÓCULO.

Con respecto al inóculo incorporado al suelo bajo estudio, como se menciono con anterioridad, procedió de excreta de vaca, se le determinó también la cantidad de humedad. Para ello, se tomó una muestra de 100 grs. de excreta y se depositó en un recipiente a peso constante y se coloco en la estufa a 105°C durante 24 hrs dándonos un peso de 40.5 grs. Así, al momento de agregar la excreta (inóculo microbiano) también se incorporó humedad al suelo lo cual debe tomarse en cuenta para el cálculo de la humedad relativa deseada para los tratamientos 1 y 3. De manera similar, al agregar la solución de azida de sodio al suelo del tratamiento 2, se agregó agua, la cual fue considerada para el cálculo del valor deseado. En este sentido la concentración final deseada fue de 0.1 % gramos de azida de sodio por gramo de suelo seco.

3.4 ACLIMATACIÓN DE REACTORES INOCULADOS.

Montaje, arranque y operación de reactores inoculadores en ambiente aerobio y anaerobio (sulfato-reductor)

El inóculo inicial del reactor inoculador aerobio se formó al igual del reactor inoculador anaerobio de suelo y excreta de vaca (Tabla 3.4).

3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Tabla 3.4 Origen y composición del inóculo inicial de los reactores inoculadores aerobio, y sulfato-reductor.

REACTORES INOCULADORES	
AEROBIO	ANAEROBIO (SULFATO-REDUCTOR)
100 g de suelo cribado	100 g de suelo cribado
300 g de excreta de vaca	300 g de excreta de vaca
1.5 g de Na ₂ CO ₃	1.5 g de Na ₂ CO ₃

Se prepararon 1650 ml de inóculo anaerobio (sulfato-reductor) y se colocó en un frasco de vidrio (RI-SR), se completó con 1350 ml de alimentación sulfato-reductor, para tener un volumen de operación de 3000 ml. Posteriormente se selló y se gaseó con nitrógeno.

Para evitar fenómenos de fotólisis este reactor se mantuvo en un cuarto oscuro para su control.

En la figura 3.2 y 3.3 se muestran los reactores de suelos activados en los dos sistemas de degradación anaerobia (sulfato reductor) y aerobia respectivamente



Figura 3.2 Reactor Inoculador anaerobio

Se prepararon 1650 ml de inóculo aerobio y se colocó en una celda de lucita y se adicionó 2350 ml de agua de alimentación aerobia, para tener un volumen de operación de 4000 ml. En el reactor aerobio se aplicó aire

3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

moderadamente y en forma continua, este aire pasó antes por una trampa de agua para asegurar que no llegaran al cultivo el aceite, suciedad y óxidos de tubería del aire comprimido. En la figura 3.3 se muestra el reactor inoculador aerobio RI-A



Figura 3.3 Reactor Inoculador aerobio

La composición del agua de alimentación para cada uno de los reactores inoculadores se muestra en la tabla 3.5.

Tabla 3.5 Composición del agua de alimentación para los reactores inoculadores.

AGUA DE ALIMENTACIÓN PARA LOS REACTORES INOCULADORES	
AEROBIA	SULFATO-REDUCTORA
1.7 g/L polipeptona	0.01 g/L NaHCO ₃ 0.6 g/L K ₂ HPO ₄ 0.6 g/L NH ₄ Cl 0.75 ml/L ácido acético 1.5 g/L K ₂ SO ₄

El tiempo de residencia reportado para los reactores anaerobios es de 25 días, por lo que el flujo de alimentación se determinó de la siguiente manera:

3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

TRH=25 días

Vop= 3000 ml

Q=Vop/THR=120 ml/día

En la figura 3.2 y 3.3 se muestran los reactores de suelos activados en los dos sistemas de degradación aerobia y anaerobia (sulfato reductor)

Por lo tanto se purgo y alimento 120 ml de agua de alimentación.

Para el reactor aerobio el tiempo reportado es de 12 días, por lo que el flujo de alimentación de acuerdo a la ecuación anterior se determino de la siguiente manera:

TRH=12 días

Vop= 4000 ml

Q=Vop/THR=330 ml/día

Por lo que se purgó y alimentó diariamente 330 ml de agua de alimentación. Algunos de los parámetros de los reactores inoculadores se observa en la tabla 3.6.

Tabla 3.6 Parámetros de los reactores inoculadores: aerobio y sulfato-reductor.

VARIABLES	REACTOR INOCULADOR	
	Aerobio	Sulfato-reductor
Tiempo de retención (días)	12	25
Carga orgánica (mg DQO/L-día)	77.5	132
Flujo de alimentación (ml/día)	330	120
Volumen de operación (L)	4	3

3.5 BIODEGRADACIÓN BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DEL MEDIO MINERAL.

En la siguiente etapa experimental se llevó a cabo la biodegradación de HPA en forma inducida, utilizando pH y adición de nutrientes (medio mineral) específicamente controlando la relación carbono, nitrógeno, fósforo, con el propósito de favorecer las condiciones de degradación de los microorganismos en ambos reactores.

En cuanto a la adición de los nutrientes, se ha encontrado en la literatura que uno de los parámetros que influye en el desarrollo de los microorganismos es la relación molar entre carbono, nitrógeno y fósforo marcando como un óptimo la proporción de 100:10:1 respectivamente. Por lo que antes de agregarlos se debe tomar en cuenta la cantidad de nutrientes existentes en el suelo a emplear. Con base en esta se determina la cantidad de fósforo o nitrógeno necesarios para llegar a la relación óptima.

Preparación del medio basal de sales (MBS)

El medio tiene la siguiente composición por litro de agua destilada:

- 1 g NH_4NO_3
- 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1.5 g K_2HPO_4
- 1 g NaHCO_3
- 0.02 g Citrato férrico
- 0.001 g sacarosa
- 10 ml agua de grifo (traza de metales)

El pH del medio debe ser ajustado a 7

El medio debe ser esterilizado en autoclave, 15lb/121°C por 15 minutos.

El pH fue otro parámetro observable para la aclimatación del reactor y la conductividad eléctrica.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 ACLIMATACIÓN DE REACTORES INOCULADOS AEROBIO Y ANAEROBIO (SULFATO-REDUCTOR)

Se llevó a cabo la aclimatación de los reactores inoculadores con antraceno en ambiente aerobio y anaerobio. Los reactores inoculadores se trabajaron a diferentes concentraciones y llevados a estado estable, es decir que sus condiciones de manejo y medio no cambien y así poder obtener un inóculo que sea capaz de degradar los compuestos encontrándose las concentraciones para una aclimatación adecuada, dadas en la tabla 4.1.

Tabla 4.1 Concentración de aclimatación en reactores

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN
Antraceno fase A	1000 mg/l
Antraceno fase B	150 mg/l
Antraceno fase C	500 mg/l

Para ello se trabajaron tablas de factores, tablas de respuestas, tablas de seguimiento y análisis.

En la figura 4.1 se observa en la primera etapa al adicionar 1000 mg/l disminuye el pH esto se debe a al cambio del agua de alimentación para los reactores inoculadores por el medio mineral de sales. En las primeras semanas. Se disminuye la concentración del antraceno tanto en el reactor inoculador aerobio como en el anaerobio en la segunda etapa a una concentración de 1000 mg/l del contaminante y en la tercera etapa la alimentación del contaminante a 300 mg/l este parámetro se mantiene estable en las dos últimas fases.

En ambos rectoros RI-A y RI-SR se observó un pH básico, el cual fue óptimo para el crecimiento bacteriano (Brock y Madigan, 1993). El RI-A obtuvo valores entre 7.8 y 8.1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

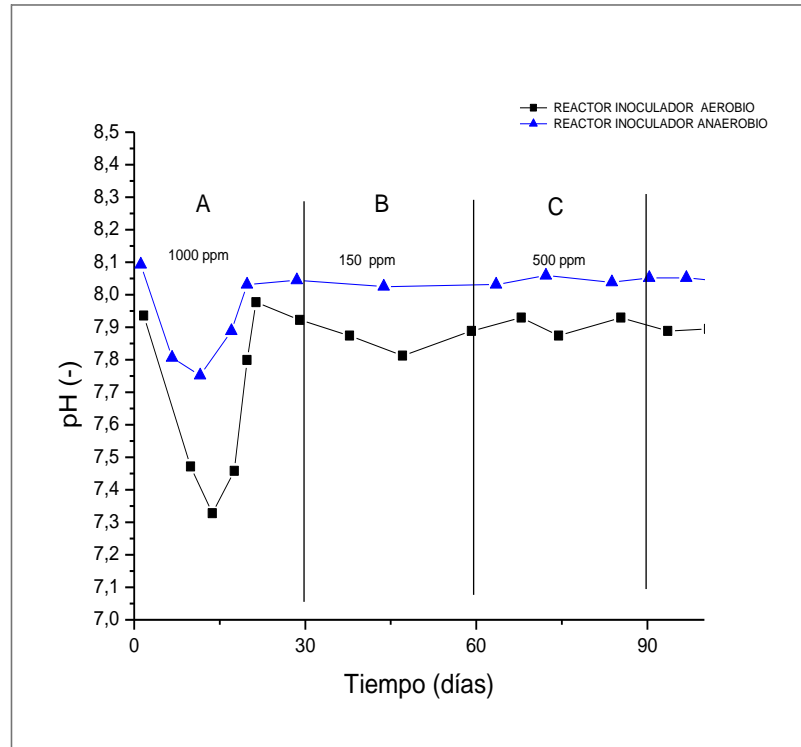


Figura 4.1 Evolución del pH en los reactores inoculadores en las diferentes etapas de aclimatación del antraceno. Etapa A. RI-A y RI-SR:1000 (mg antraceno/L día), Etapa B RI-A y RI-SR 150 (mg antraceno/L día) y etapa C 500 (mg antraceno/L día).

En las etapas A y B de aclimatación del antraceno, los porcentajes de remoción de materia orgánica en los RI se vieron afectados por la adición del antraceno, lo cual se observó en la variación del parámetro (Figura 4.2).

Al disminuir la carga volumétrica del antraceno en la alimentación C, la remoción de materia orgánica en los dos reactores fue eficiente, lo cual indicó que el consorcio en cada ambiente no fue impactado negativamente.

Se partió de una DQO inicial de 1896 (mg/L).

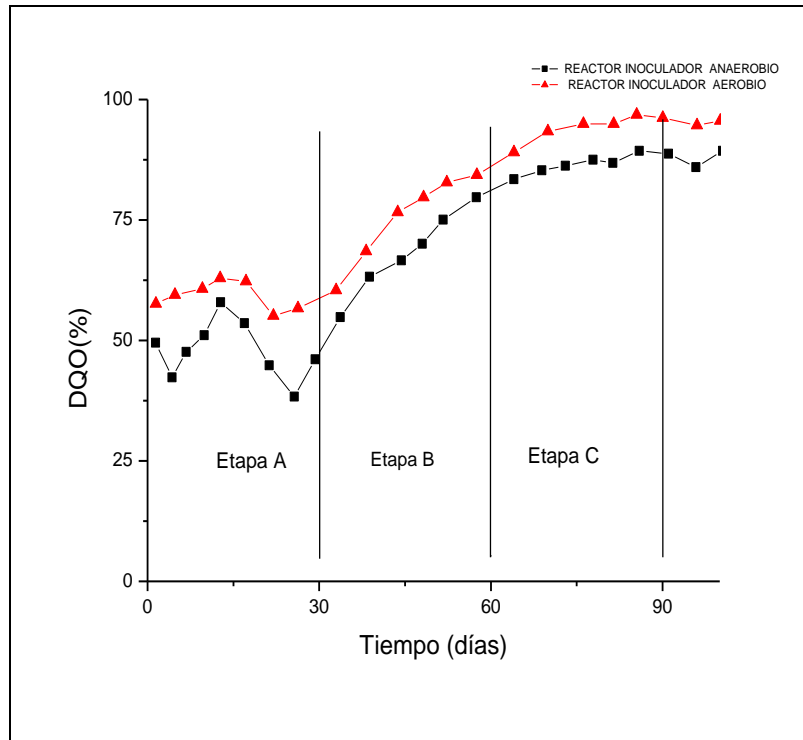


Figura 4.2 Evolución de remoción de materia orgánica en los reactores inoculadores en aclimatación del antraceno. Etapa A. RI-A y RI-SR:1000 (mg antraceno/L día), Etapa B RI-A y RI-SR 150 (mg antraceno/L día) y etapa C 500 (mg antraceno/L día).

En las primeras dos etapas de aclimatación del antraceno la remoción bruta vario considerablemente en los reactores inoculadores (Figura 4.3).

Lo que se muestra en la gráfica es que las etapas A y B la remoción del antraceno es constante, en cambio en la etapa C se nota una gran variación para ambos reactores. En la etapa C, el RIA fue mas eficiente en la remoción del antraceno, con un valor promedio del 94.85% comparado con el sulfato-reductor que es del 36.1 %. Cabe mencionar que el control abiótico aerobio tuvo un porcentaje de remoción del antraceno del 6 %.

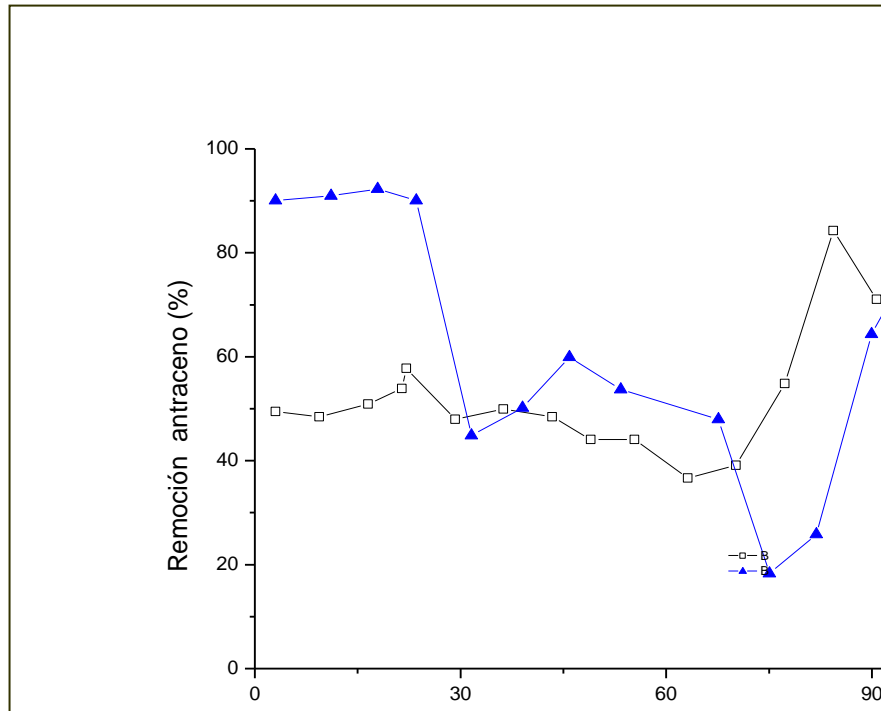


Figura 4.3 Evolución de la remoción bruta en los reactores inoculadores en aclimatación del antraceno. Etapa A. RI-A y RI-SR:1000 (mg antraceno/L día), Etapa B RI-A y RI-SR 150 (mg antraceno/L día) y etapa C 500 (mg antraceno/L día).

El factor alfa se determinó en los reactores anaerobios, debido a que es un parámetro que indica si el sistema está funcionando adecuadamente, el cual relaciona la alcalinidad intermedia con la alcalinidad parcial del medio, así cuando el valor alfa es menor de 0.5, indica que el reactor tiene buen régimen y que la capacidad buffer del sistema es la adecuada (Hawkes *et al*, 1994).

En la figura 4.4, se observa, que cuando se le agrego el contaminante en la etapa A, este provoco que el sistema se desestabilice aumentando el valor alfa por arriba de 0.6 para ambos reactores inoculadores, cuando se disminuyo la concentración del antraceno en las siguientes etapas A y B, el valor alfa se

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

recupero, teniendo valores entre 0.2 y 0.4 . En la etapa C, en ambos reactores inoculadores anaerobios se observó un coeficiente alfa menor a 0.3, indicó un buen funcionamiento de los reactores y una capacidad amortiguadora adecuada del sistema (Hawkes *et al*, 1994)

El volumen de biogás(Figura 4.5) producido en el reactor inoculador anaerobio en las etapas A y B la producción de biogás era inestable y escaso mientras en la etapa C la concentración de biogás recupero su estabilidad generadora, lo cual fue un indicador de actividad microbiano anaerobia. La prueba de flama en el RI-SR dio positiva y la flama que presentó fue azul, lo cual indicó presencia de metano. La composición de biogás en ambiente sulfato-reductor se ha reportado básicamente de CO_2 y H_2S (Hagglblom y Young 1995)

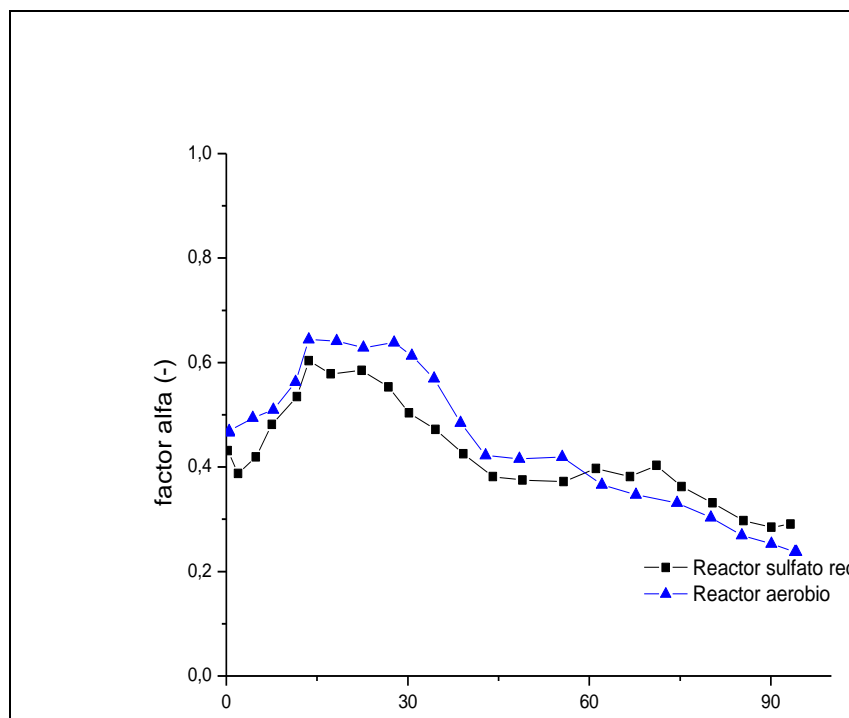


Figura 4.4 Evolución del coeficiente alfa en los reactores inoculadores anaerobio y sulfatoreductor en las diferentes etapas de aclimatación del antraceno. Etapa A. RI-A y RI-SR:1000 (mg antraceno/L día), Etapa B RI-A y RI-SR 150 (mg antraceno/L día) y etapa C 500 (mg antraceno/L día).

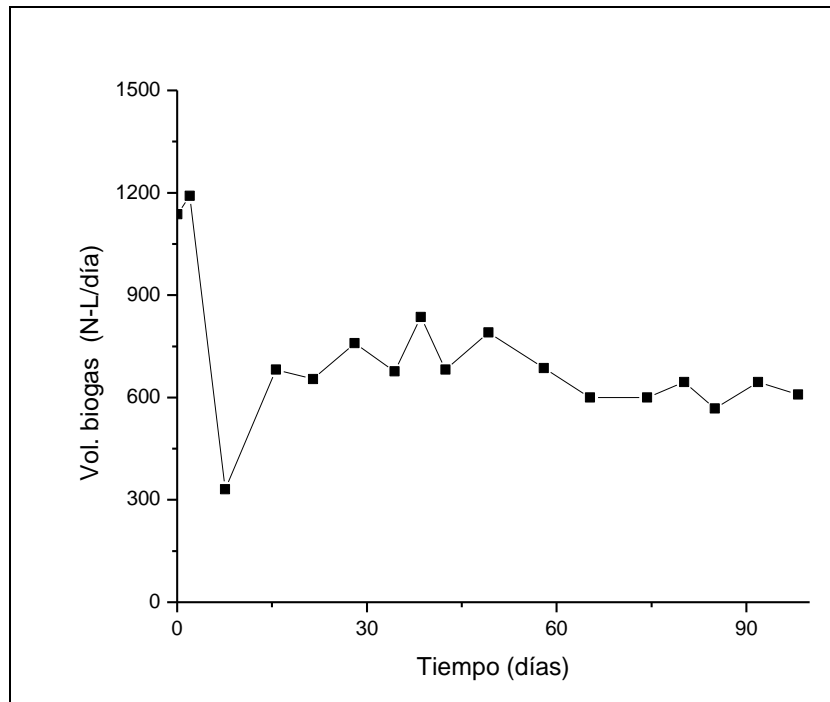


Figura 4.5 Evolución del volumen de biogás en el reactor inoculador anaerobio en diferentes etapas de aclimatación del antraceno. Etapa A. RI-A y RI-SR:1000 (mg antraceno/L día), Etapa B RI-A y RI-SR 150 (mg antraceno/L día) y etapa C 500 (mg antraceno/L día).

Para saber la cantidad de microorganismos que estaban presentes en los reactores inoculadores, se realizaron cuentas microbianas.

En la Tabla 4.2 se observa que los microorganismos sulfato-reductores tuvieron un valor de 6.06 (Log UFC) el cual fue un valor más alto comparado con el obtenido en el reactor inoculador aerobio, el cual tuvo un valor de microorganismos 4.51 (Log UFC).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.2. Cuenta microbianas en los reactores inoculadores aerobios y sulfato-reductor.

	Cuenta Total de bacterias aerobias		Cuenta de bacterias aerobias degradadoras		Cuentas de bacterias sulfato-reductoras degradadoras	
	UFC (Bacteria/ml)	Log UFC	UFC (Bacteria/ml)	Log UFC	UFC (Bacteria/ml)	Log UFC
X S	1.24 E +08	8.09	1.2 E + 05	5.01	1.05E + 06	
	3.10 E + 08	8.49	2.6 E + 05	5.41	2.11E + 06	6.02
	8.00 E + 07	7.90	1.73E + 04	4.24	1.09E + 06	6.32
	1.30 E + 07	7.11	7.60 E + 04	4.88	4.10E + 05	6.27
	2.22 E + 06	6.34	1.14 E + 04	4.14		5.61
	8.10 E + 05	5.90	8.00 E + 03	3.90		
	8.70 E + 05	5.93	1.01 E + 04	4.00		
		7.11		4.51		6.06
		1.08		0.58		0.32

Esto se relaciona con el hecho de que los reactores inoculadores aerobios (RI-A) fueron los que no variaron y fueron más renuentes a la adición del antraceno, como se observa en los parámetros antes vistos, debido probablemente a que en condiciones aerobias se lleva más fácilmente la oxidación.

En La tabla 4.3, se observa la remoción bruta (%) y la remoción volumétrica (mg antraceno/día) la cuales indican que fueron mayores en el reactor inoculador aerobio que en el sulfato reductor. Sin embargo los valores de remoción específica del antraceno (mg antraceno/mg biomasa día) fueron mayores en el reactor inoculador aerobio.

Esto se debió a que la biomasa aclimatada (cuantificada como sólidos suspendidos volátiles) fueron aproximadamente 15 veces mayor en el aerobio que en el anaerobio. Cabe entonces mencionar que la remoción específica es inversamente proporcional a la cantidad de biomasa presente en el reactor.

La mayor cantidad de biomasa en el reactor aerobio puede deberse a

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

que el metabolismo aerobio es más rápido, ya que su rendimiento celular esta en el orden de 0.5 g de biomasa /g de sustrato consumido, comparado con el sistema anaerobio en el orden de 0.1 g de biomasa/g sustrato consumido esto es por la generación de biomasa y decremento de la degradación de la materia orgánica ya que el DQO es bajo. Los valores obtenidos de SSV se confirmaron con la cantidad de bacterias antraceno clásicas (cuantificadas con Log UFC) en donde en el reactor inoculador aerobio tubo un orden de magnitud superior con el sulfato-reductor.

Tabla 4.3 Tabla de comportamiento de los distintos parámetros determinados en los reactores inoculadores (Etapa C)

PARAMETROS	REACTOR INOCULADOR			
	Aerobio		Sulfato-reductor	
	PROM	DESV ST	PROM	DESV ST
PH	8.39	0.004	7.35	0.096
% Remoción DQO	870.73	800.57	800.72	1080.0
%Remoción bruta antraceno	94.48	370	48.37	627.4
Remoción vol. (mg Antraceno/día)	2.45	-	1.17	-
Remoción específica antraceno x 10 ³ (mg antraceno SSV-día)	7.7	-	2.90	-
Sólidos Suspendidos Volátiles (mg/L)	949.39		506.2	
Vol. Biogás (N-mL/día)	-	-	83.29	1075.5
Coeficiente alfa (-)	-	-	0.18	0.012
Cuenta de bacterias antraceno clásicas (Log UFC)	7.11	1.08	6.06	0.32

4.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Como se menciona anteriormente, la cuantificación de los HPA y los metabolitos se realizó por medio del análisis cromatográfico ver figura 4.6 y tabla 4.4, para lo cual se cuenta con un cromatógrafo de gases que tiene como detector de ionización de flama, serie HP 6890 utilizando una columna capilar HP 5MS, el cual además de separar los compuestos analíticos permite identificar y constatar si efectivamente corresponde al compuesto esperado

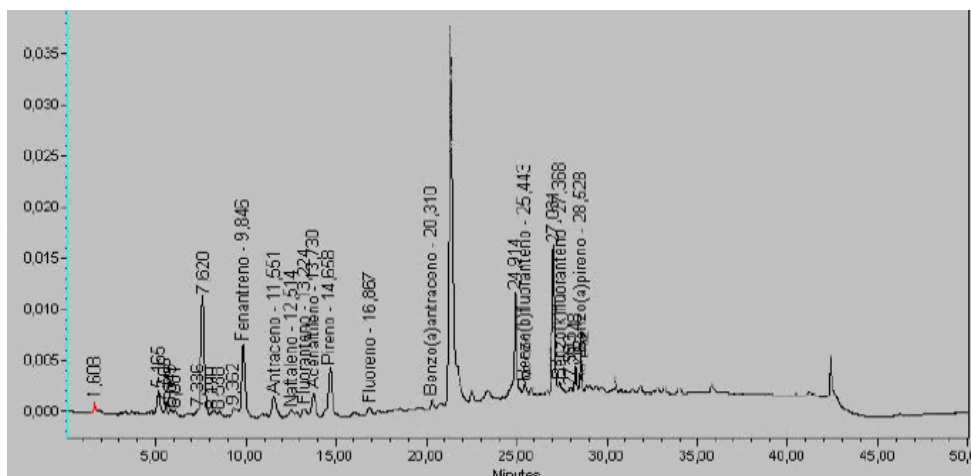


Figura 4.6 Cromatograma del estándar de HPAs

TABLA 4.4 Tiempos de retención de los 16 HPA'S, estándar interno

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Nitrobenzeno d-5 (estándar surrogado)	11.18
Naftaleno d-8 (estándar interno)	12.72
Naftaleno	12.76
Acenafileno	16.47
Acenafteno	16.91
Fluoreno	18.10
2,4,6 Tribromofenol (estándar surrogado)	18.75
Fenantreno	20.32
Antraceno	20.42
Fluoranteno	23.12
Pireno	23.62
Benzo(a)antraceno	26.48
Criseno	26.57
Benzo(b)fluoranteno	28.87
Benzo(k)fluoranteno	28.93
Benzo(a)pireno	29.51
Indeno(1,2,3-cd)pireno	31.85
Dibenzo(a,h)antraceno	31.92
Benzo(g,h,i)perileno	32.45

4.2.1 Resultados experimentales del análisis cromatográfico.

Evaluación de la adsorción del antraceno en el suelo modelo.

Los componentes más importantes del suelo para la adsorción del antraceno son las fracciones coloidales las cuales están constituidas predominantemente de minerales arcillas y materia orgánica. La superficie de las arcillas está cargada negativamente por lo que el intercambio de cationes está presente.

Las arcillas son también hidrofóbicas debido a la solvatación por el intercambio de iones y por la alta densidad de los grupos hidroxilo. La materia orgánica del suelo es esencialmente un polímero aromático, más hidrofóbico que las arcillas, con grupos predominantes como carboxilos, hidroxilos y carbonilos.

Tanto la materia orgánica como las arcillas tienen el potencial para adsorber moléculas por intercambio catiónico, coordinación con intercambio de iones, enlace de hidrógeno, fuerzas físicas y efectos de entropía. En el suelo siempre se encontraran tanto los materiales húmicos como los minerales arcillosos en asociación.

Los suelos tienen sitios cargados positiva y negativamente, lo que provoca que las moléculas iónicas puedan ser adsorbidas por intercambio de iones. Cuando el antraceno está en estado aniónico, es repelido por las cargas negativas de los coloides del suelo y atraído por algunas cargas iónicas.

En los suelos cargados negativamente, la adsorción de aniones no es común, sólo en algunas ocasiones en donde el suelo contiene óxidos de fierro que provocan una carga positiva, lo cual aumenta la adsorción de aniones del antraceno (Weber y Miller, 1989).

La tabla 4.5 muestra un tipo de isoterma tipo S subtipo 1 (Giles *et al*, 1974), en donde la cantidad total del antraceno adsorbido por el suelo es menor al %1. El

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

comportamiento tipo S indica cooperación adsorptiva, la isoterma es no lineal y convexa con respecto a la abscisa (Figura 4.7). La adsorción inicial es baja comparada con el solvente o soluto y se incrementa cuando el número de moléculas de soluto sobre la superficie se incrementan (Weber & Miller, 1989)

Tabla 4.5 Datos obtenidos en la adsorción del contaminante por el suelo.

C (mg antraceno/L)	q (mg antraceno/Kg suelo)
0	0
50.67	1.19
104.54	4.54
304.82	6.52
618.35	14.11
1010.23	68.52

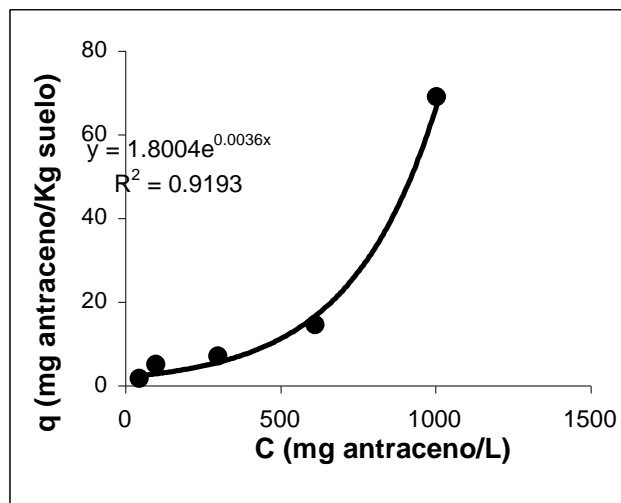


Figura 4.7 Isoterma de adsorción experimental para el antraceno en el suelo modelo

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por lo que para caracterizar la adsorción del suelo modelo utilizado, se le aplica la isoterma de Freundlich:

$$q = K_F C^{1/n}$$

Donde:

q = cantidad del antraceno adsorbido en el suelo (mg antraceno/ Kg de suelo)

C = concentración del antraceno en la solución (mg antraceno/L)

K_F = coeficiente de adsorción, constante que refleja la capacidad de adsorción $m^{(3/n)}/Kg^{(1-n)/n}$

$1/n$ = constante que refleja la intensidad del enlace

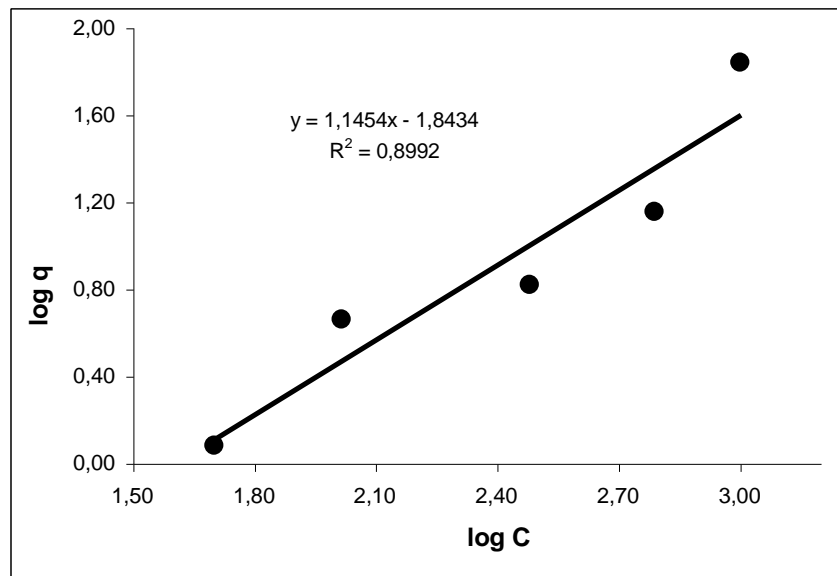


Figura 4.8 Relación logarítmica entre la cantidad de antraceno adsorbido por el suelo y la concentración del antraceno en la solución.

Para obtener las constantes K y $1/n$, se grafica Log q vs. Log C (Figura 4.8), donde se observa un comportamiento lineal, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$\text{Log } q = 1.1454 * \text{Log } C - 1.8434$$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Donde $1/n = 1.1454$ (pendiente)

$\text{Log } K = -1.8434$ (ordenada al origen)

$K = \text{anti log } (1.3434) = 0.0143$

Por lo tanto la ecuación de Freundlich que describe a nuestro sistema es la siguiente:

$$q = 0.0143C^{1.1454}$$

A partir de esta ecuación se calcularon los valores de la adsorción del contaminante en el suelo (q) y se graficaron junto con los valores experimentales (Figura 4.8)

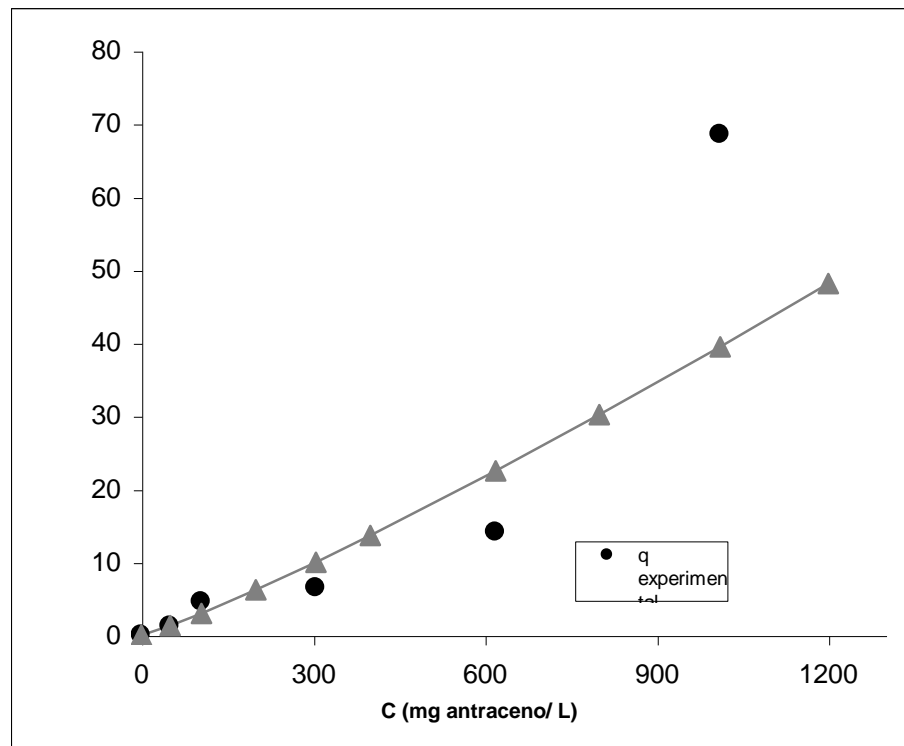


Figura 4.9 Isotermas de adsorción aplicando el modelo de Freundlich

En la figura 4.9, observamos que los valores de q experimentales a diferentes concentraciones de antraceno en solución, a concentraciones menores a 600 mg/L del antraceno, están cercanos a los valores de q calculados con el modelo de Freundlich.

También que la constante K , la cual refleja la capacidad de adsorción, tiene un valor muy pequeño, lo que indica una mínima adsorción del suelo modelo utilizado.

Curvas patrón

En este apartado se reportan solo los datos experimentales de los ensayos de biodegradación tal como fueron obtenidos del análisis cromatográfico, para posteriormente realizar un análisis de estos resultados.

El análisis cuantitativo de las muestras se realizó en un cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas, el cual se calibró con un estándar interno, compuesto de una mezcla de HPA'S. El estándar de antraceno se trabajó a diferentes concentraciones que van de 1 a 100 ppm con el propósito de establecer si existía linealidad entre la concentración del antraceno y la respuesta del detector, lo cual se cumplió para el intervalo de concentraciones de 0 ppm a 100 ppm (Tabla 4.6).

Cabe aclarar que se utilizó un estándar de HPA'S para calibrar el equipo y establecer los puntos de tiempos de retención del antraceno a diferentes concentraciones y así obtener la curva patrón del antraceno segura y confiable (Figura 4.10). Posteriormente se inyectaron las muestras de diferentes tratamientos que se llevaron a cabo en este estudio de biodegradación del antraceno conjuntamente con el objeto de que todos los análisis fueron realizados en idénticas condiciones. Se obtuvieron coeficientes de regresión de 0.94 o menos, lo que es muy probable se deba a que las condiciones de respuesta del detector de masa varíen a lo largo del tiempo, especialmente si el análisis se realiza en forma continua con una duración de 40 horas, aproximadamente.

La cuantificación de los análisis cromatográficos se realizó mediante el programa interno con el que cuenta el procesador del cromatógrafo, para lo cual se construye una curva patrón utilizando los datos de los estándares de HPA'S, inyectados junto con las muestras correlacionando el área de los picos con la concentración correspondiente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados derivados de la fase experimental se presentan en la tabla 4.6 .

Tabla 4.6 Resultados de fase experimental de la curva patrón

Concentración ppm	Área
1.09	646021
20.8	20332131
41.6	65981204
71.5	67227787
109.28	101486325

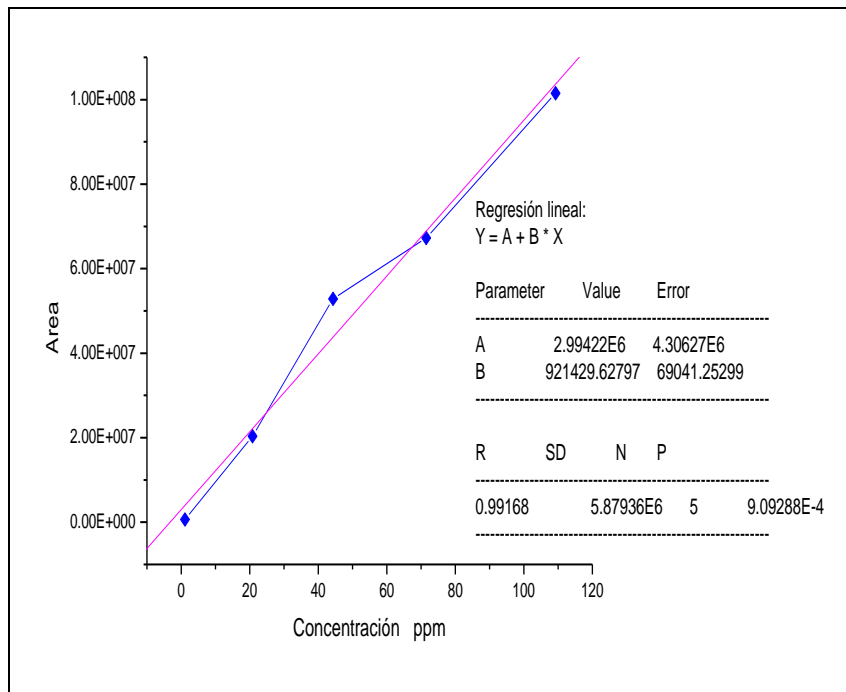


Figura 4.10 Curva patrón de antraceno

4.3 ENSAYO DE FACTIBILIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE HPA

Debido a la dificultad que implica el manejo de suelos contaminados por hidrocarburos como consecuencia de la actividad propia de la industria del petróleo, no es recomendable utilizar estos experimentos tendientes a la evaluación de cada uno de los factores que intervienen en la degradación de este tipo de contaminantes.

Principalmente por que al trabajar con suelos poco homogéneos no es posible lograr la reproducibilidad de los experimentos, ya que no existe un punto de referencia para realizar la comparación entre degradación abiótica y microbiología, además de que este suelo tiene como fuente de carbono una cantidad inespecífica de compuestos.

4.4 EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

El suelo es una matriz tan compleja, que aun cuando se controlan en el ámbito microscópico las variables asociadas a dicho sistema como humedad, temperatura, pH, etc., siempre existe la posibilidad que el sistema presente características diferentes. Lo cual influye en procesos de adsorción o desorción de compuestos específicamente en el proceso de extracción. Por lo anterior se requirió de una manipulación cuidadosa de cada una de las variables del proceso para cuantificar el compuesto de interés, ya que la mínima variación en este podría afectar los resultados.

El análisis cromatográfico del suelo con inóculo (tratamiento 1) sirvió como blanco de referencia, ya que en el extracto del suelo además de los HPA hay compuestos orgánicos, ácidos húmicos y fulbicos que podrían causar interferencia en la interpretación de los resultados.

Sin embargo, como se observa el cromatógrama A y B, de la figura 4.11, el antraceno se logra diferenciar de otros picos que producen otros compuestos presentes en el suelo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

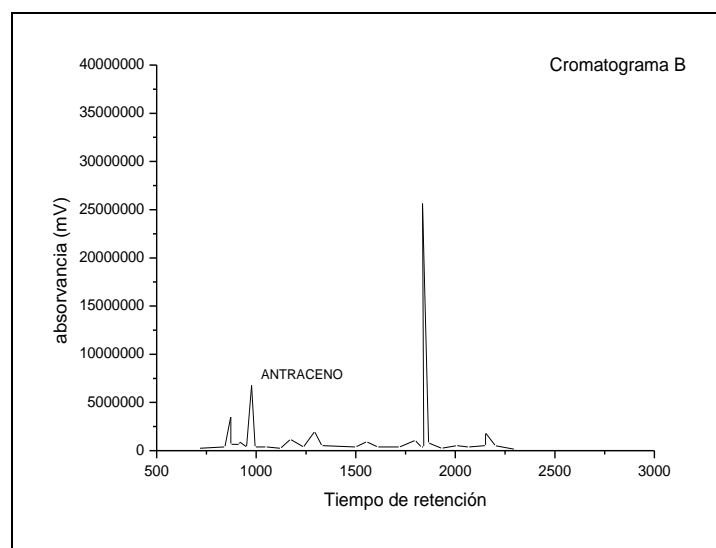
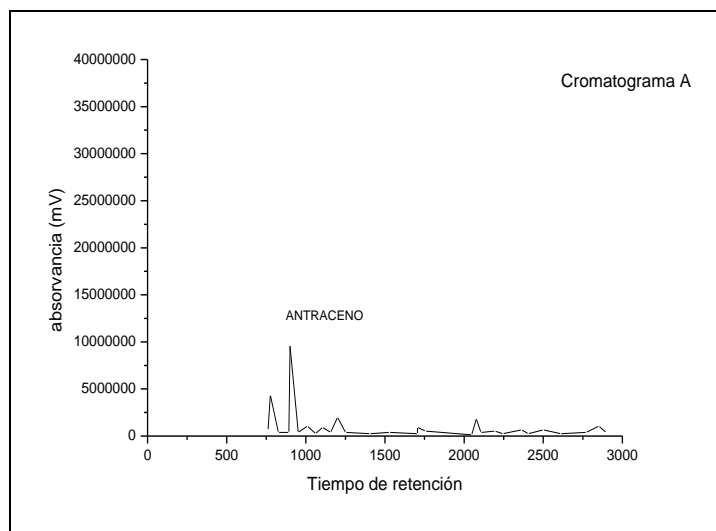


Figura 4.11 Cromatograma A del suelo con inóculo (tratamiento 1) y el cromatograma B del suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se describe anteriormente en la sección 4.2.1 para la cuantificación de los HPA adicionados al suelo, se elaboraron las curvas de calibración con una solución estándar de HPA. Lo anterior permitió el cálculo de las respectivas concentraciones en los extractos de los diferentes tratamientos del suelo. A la obtención del extracto, denominado "crudo", prosiguió el proceso de "Clean up" para obtener las dos fracciones y la cuantificación correspondiente. Para evaluar el proceso de fraccionamiento, antes de fraccionar los extractos del tratamiento 3 se tomó una alícuota de 70 μ L, para su análisis cromatográfico.

Asimismo se analizaron los correspondientes extractos después de ser fraccionados, con el propósito de evaluar el proceso de fragmentación, el cual se lleva a cabo con un 85% de eficiencia promedio como se muestra en la tabla 4.7. Si bien no es la mejor eficiencia que se podría obtener es aceptable.

Tabla 4.7 Porcentaje de recuperación del fraccionamiento de los extractos (a) y (b) del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

Extracto a

Muestra/ Día	Antraceno
(a)/0	81.45
(a)/15	89.47
(a)/30	76.84

Extracto b

Muestra/ Día	% Antraceno
(b)/0	79.35
(b)/15	98.04
(b)/30	72.24

Presentando el resultado de este proceso de análisis en cada uno de los tratamientos con repeticiones por triplicado.

4.5 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL SUELO CON INÓCULO (TRATAMIENTO 1)

Para el tratamiento 1 la toma de muestras fue conforme a lo programado, el procedimiento de extracción se realizó de acuerdo con el protocolo, el peso de suelo seco se calculó tomando en cuenta la cantidad de agua.

La extracción se llevó a cabo en todas las muestras pero el análisis cromatográfico solo a los días 0, 4, 8, 16, 90, no encontrando concentración de antraceno lo cual era de esperarse.

4.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL SUELO CON HPA Y AZIDA DE SODIO (TRATAMIENTO 2)

La extracción en el tratamiento 2, que inicialmente tuvo una concentración de 300 p.p.m. El tratamiento 2 sirve como referencia para observar la posible remoción del antraceno por factores abióticos.

Los extractos fueron obtenidos por duplicado (a) y (b) para los ensayos correspondientes a los días 0, 4, 8, 16 y 90, después de ser fraccionados se diluyen 1:10, se analizan en el cromatógrafo de gases, los datos para la primera fracción (HPA) se reportan en la tabla 4.8

Tabla 4.8 Resultados del análisis cromatográfico en los extractos del suelo con antraceno y azida de sodio (tratamiento 2), concentración en ppm.

Muestra/ día	Antraceno
1/día 0	25.400
2/día 4	52.050
3/día 8	13.580
4/día 16	28.500
5/día 90	59.289
6/día 0	22.800
7/día 4	49.383
8/día 8	10.813
9/día 16	26.500
10/día 90	62.088

Una vez obtenidos estos datos, se calculó la concentración de antraceno, corrigiendo por los factores de dilución y por la cantidad de suelo seco en la muestra, los resultados se reportan en la tabla 4.9.

Tabla 4.9 Concentración (ppm) en los extractos (a) y (b) del suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2), valores por el factor de dilución.

Muestra/ día	Antraceno
11/día 0	158.749
12/día 4	317.233
13/día 8	78.602
14/día 16	172.751
15/día 90	340.649
16/día 0	135.325
17/día 4	298.600
18/día 8	78.997
19/día 16	156.685
20 /día 90	343.412

4.7 EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE HPA EN EL SUELO POR FENÓMENOS ABIÓTICOS (TRATAMIENTO 2).

La primera situación que se observa es el comportamiento ondulatorio en las muestras del suelo con azida de sodio (tratamiento 2), donde los datos que corresponden al día cero tienen valores inferiores a 500 ppm antraceno, aumentando para el día cuatro y disminuyendo posteriormente, tal como se observa en la figura 4.12. Este comportamiento se observa también en el tratamiento 3.

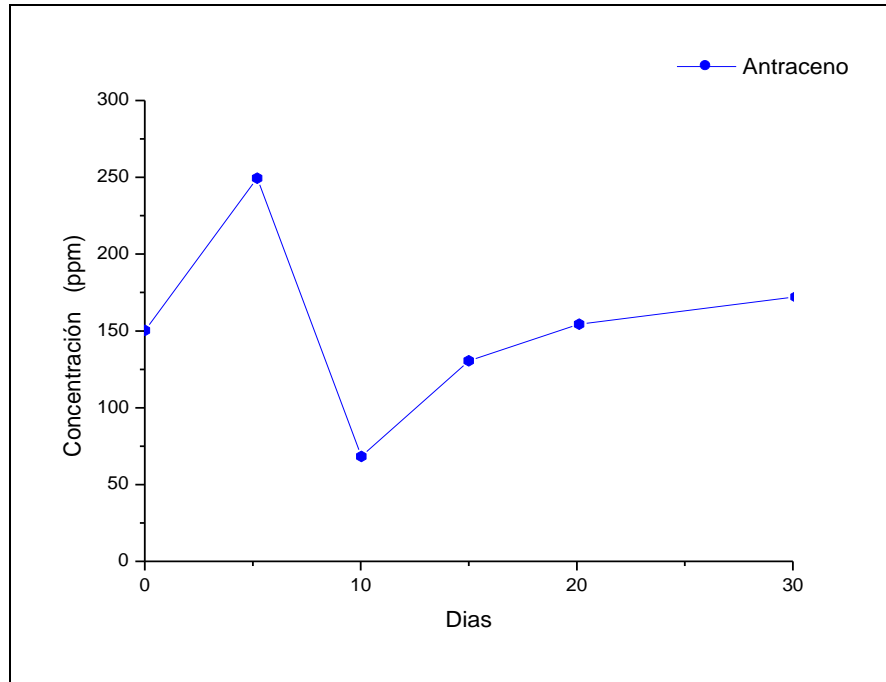


Figura 4.12 Promedio de los análisis cromatográficos de los extractos del suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2).

Como se explicó anteriormente en este suelo no se registra actividad microbiológica por la adición de la azida de sodio, por lo que las variaciones que se presentan se deben a procesos abióticos como la concentración de sales presentes por la adición de medio mineral. Se sabe también que los HPA no se evaporan fácilmente y que por el contrario se adsorben fuertemente, es por lo anterior que se puede garantizar que la concentración en el suelo de cada uno de los HPA permanece sin cambios.

De forma que los cambios que se presentan en los resultados del análisis de los extractos se deben a factores físicos y químicos que se conjugan. Para poder entender lo que sucede se parte de los resultados del extracto de la muestra del día cero del tratamiento 2 de la cual se conoce indudablemente la concentración de los HPA en el suelo.

El hecho de que el análisis cromatográfico presente resultados diferentes se debe a que durante el proceso de extracción siempre queda un remanente en el suelo lo cual se conoce como eficiencia de extracción, figuras 4.13.

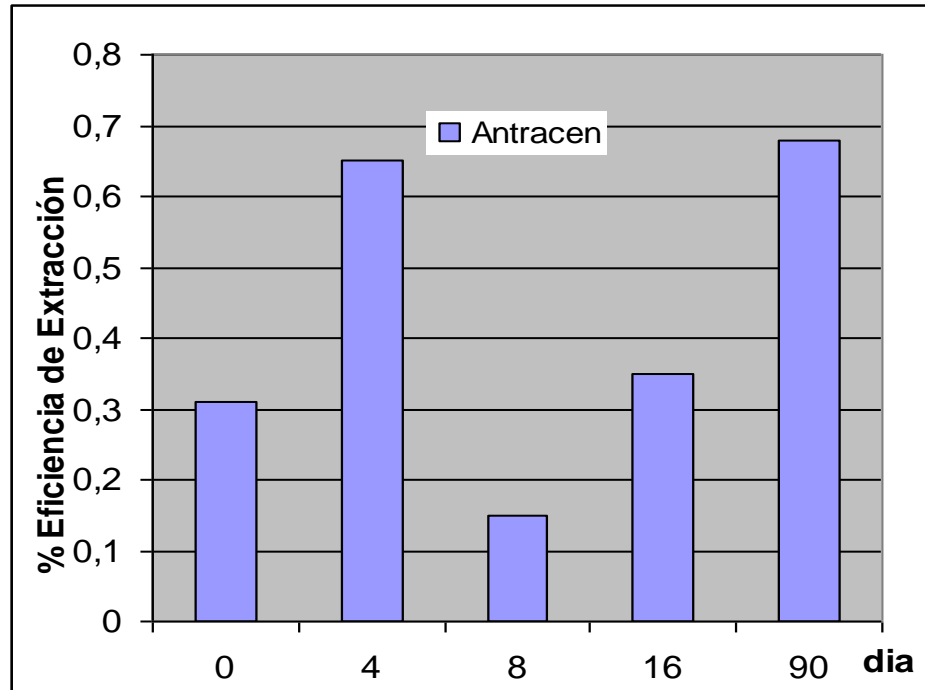


Figura 4.13 Eficiencia de extracción en el suelo con HPA y azida de sodio (tratamiento 2).

Debido a la adsorción que se establece entre los HPA y el suelo, generalmente esta permanece constante. Sin embargo, en este caso se observa que para las muestras posteriores al día cero, la eficiencia de extracción fue variable.

Esto se debió principalmente a que cuando a escala microscópica se mantuvieron las condiciones de humedad en el suelo, a nivel microscópico fue necesario un cierto tiempo para llegar al equilibrio por el proceso de extracción líquido-líquido "clean up" por esta razón la eficiencia varió en forma impredecible.

Se observa también que durante la extracción soxhlet existe una selectividad del disolvente utilizado (diclorometano) hacia el HPA.

Por lo que durante los primeros días, la absorción de los HPA fue muy fuerte con la extracción se permitió desorber en su totalidad a los HPA.

Esto debido a que en la forma como se realizaron los experimentos se requiere de un cierto tiempo para la completa difusión del agua en los poros del suelo afectando de esta forma al equilibrio de interacción - adsorción para los ensayos posteriores.

Una vez evaluada la retención por factores abióticos se procede a corregir los resultados del suelo, que se obtuvieron con ayuda del estándar interno.

4.8 ESTUDIO DE FACTIBILIDAD DE BIODEGRADACIÓN DE ANTRACENO (TRATAMIENTO 3).

En la figura 4.14 se presentaron resultados tal y como surgen del análisis cromatográfico de los extractos del suelo con HPA e inóculo en donde se observó un comportamiento decreciente en la presencia de antraceno, en cuanto a la oscilación de la concentración de los HPA. Igual que en tratamiento 2 al analizar la eficiencia de extracción se observa que hay una correlación entre los tres tratamientos.

Se asume que la variación del comportamiento en la eficiencia de extracción después del día 32 se debió a la biodegradación, al comparar los resultados obtenidos con los del tratamiento 2.

Sin embargo, en forma adicional, y para garantizar que la degradación del antraceno es producto de la acción de los microorganismos se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC) por cuenta en placa (siguiendo el procedimiento detallado en el anexo D).

Los resultados promedio se presentan en la tabla 4.10. El análisis microbiológico solo se consideró en forma cuantitativa y no cualitativa ya que este fue objeto de un trabajo paralelo a esta investigación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

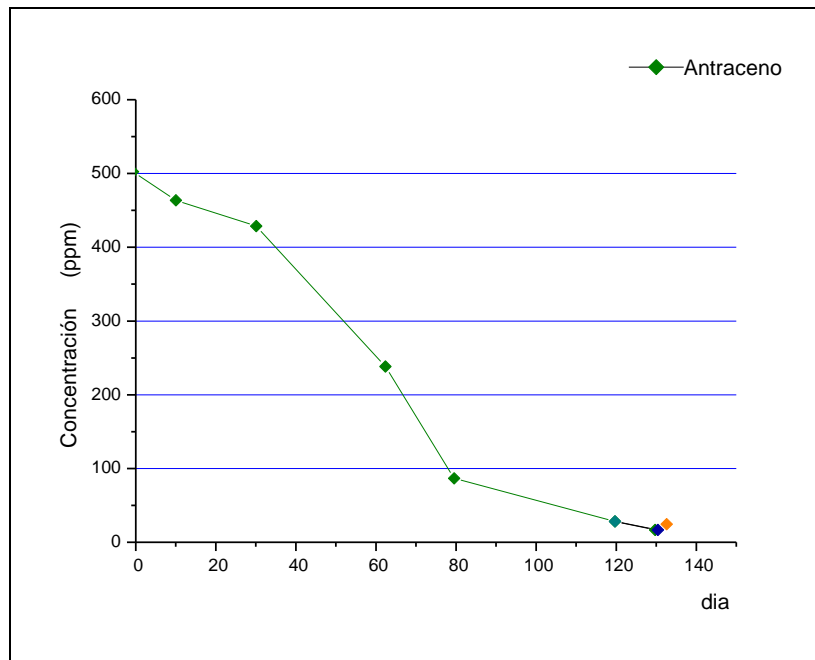


Figura 4.14 Análisis cromatográfico promedio de antraceno en el tratamiento 3.

Tabla 4.10 Promedio de la cuenta en placa de UFC.

Día	(UFC) en el suelo con azida de sodio e HPA (tratamiento 2)	(UFC) en el suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3)
4	0	25±10
32	0	90±7
64	0	223±14
132	0	115±12

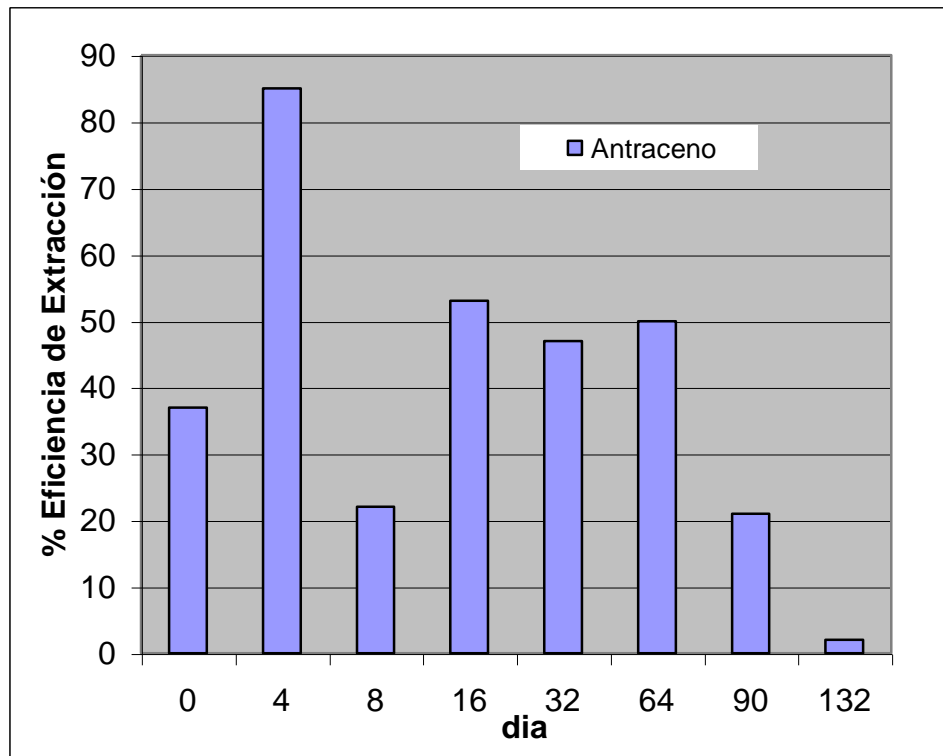


Figura 4.15 Eficiencia de extracción promedio en las muestras del suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

Así, la determinación de la concentración de antraceno en el suelo para los 132 días, se realizó corrigiendo los valores obtenidos del análisis cromatográfico por un factor que fue determinado por la eficiencia de extracción del estándar interno y la proporción que mantiene con el antraceno en los primeros 32 días.

De esta forma se procedió a calcular la concentración de antraceno en suelo, se obtienen los resultados de la tabla 4.11, donde se analiza la factibilidad de biodegradación del compuesto y respectivamente en la eficiencia de extracción ver figura 4.15.

La figura 4.16 muestra la remoción total del antraceno a los 132 días que demuestra su biodegradación, por lo que para observar cuales son por exclusivamente necesario restar de los efectos por remoción abiótica, se contrasta con el porcentaje de remoción del mismo.

Tabla 4.11 Concentración promedio de antraceno en el tratamiento 3.

Día	Antraceno
0	499.77±2.59
4	463.53±21.26
8	516.90±82.52
16	502.39±10.76
32	421.70±26.58
64	227.32±39.53
80	95.74±5.78
132	15.69±1.50

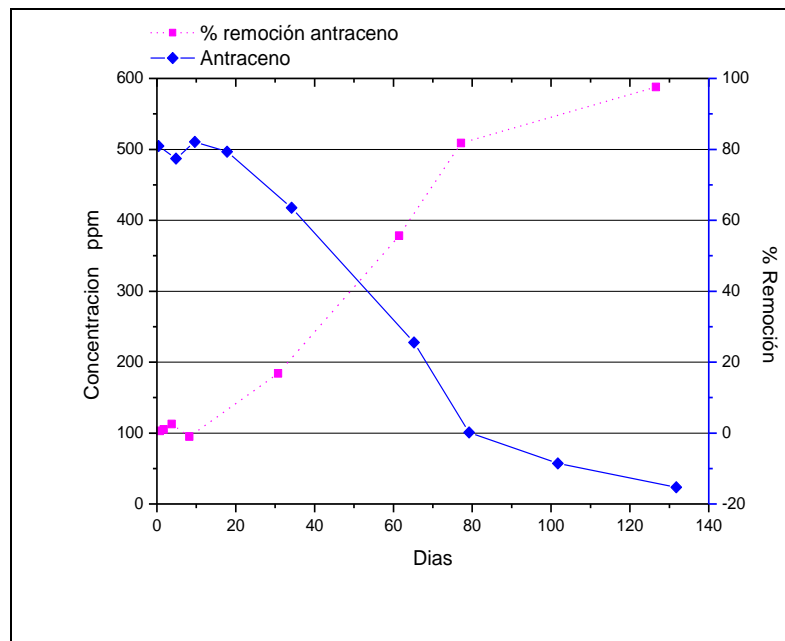


Figura 4.16 Evaluación de biodegradación de los HPA, en el suelo con HPA e inóculo (tratamiento 3).

La remoción de HPA por microorganismos figura 4.16 se logra al restar a los datos obtenidos en la tabla 4.11, el cálculo de porcentaje de remoción se hace con respecto a la concentración inicial teórica de 500 ppm. Por esta razón algunos porcentajes de remoción son positivos. Las concentraciones superiores a las teóricas, se debe a que aun cuando a nivel microscópico el suelo se mantiene homogéneo, pueden existir zonas donde la concentración es un poco más alta o baja por la presencia de biomasa siendo una posibilidad por que el antraceno se adhiere a la pared celular .

4.9 RESULTADOS EXPERIMENTALES DEL ANALISIS CROMATOGRAFICO DE METABOLITOS

Es posible observar la respuesta del equipo a diferentes concentraciones del antraceno inyectando muestras directamente al cromatógrafo, sin embargo esto no es posible para los metabolitos que se forman durante la biodegradación del antraceno en forma general ya que son compuestos que con un aumento de la temperatura su estructura cambia o estos también se diluyen si se están en medios acuosos como es el caso de metabolitos con grupos carboxilo, aldehídos o hidróxido (COOH, CHO y OH) unidos a un grupo aromático de los HPA'S, de modo que para poder ser detectados en el cromatógrafo de gases es necesario protegerlos de una posible descomposición en el momento en que son inyectados y una forma es mediante la reacción de silinización, según se establece en los trabajos de Whischmann, (1996).

La reacción de silinización es una reacción química en la cual se agrega un grupo trimetil silicato al metabolito en la posición de hidrógeno que está unido al grupo carboxilo o hidroxilo. Esto implica además que el disolvente no debe contener ninguno de estos grupos y de preferencia debe ser no polar como hexano o diclometano, también debe tomarse en cuenta que el reactivo silinizante es costoso es toxico, por lo que se trabaja con cantidades de microlitos, en microviales de una capacidad de 200 microlitos, y en la campana.

Se llevaron a cabo diferentes pruebas de la reacción de silinización por varios meses para poder ser cuantificarlos en la biodegradación del antraceno

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

en los RSA-SR y RSA-A pero se tuvo muchos problemas con la temperatura del cromatógrafo y los analitos no se detectaban de manera confiable por lo que se comprobó el consumo de antraceno de forma indirecta mediante la determinación de un analito final generado en ruta catabólico de degradación del antraceno que es ácido salicílico (Figura 2.2).

La técnica analítica cuantitativa que se utilizó para determinar la concentración de ácido salicílico generado por la degradación de dicho sustrato a los distintos tiempos, se empleó un método colorimétrico que consiste en la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm de un complejo coloreado formado entre el salicilato y el ion férrico, utilizando en cada caso la alícuota remanente de la muestra a cada tiempo (Figura 4.18).

De esta manera se determinó la concentración en mol/litro de la cantidad presente del ácido salicílico en ambos reactores ver figura 4.19.

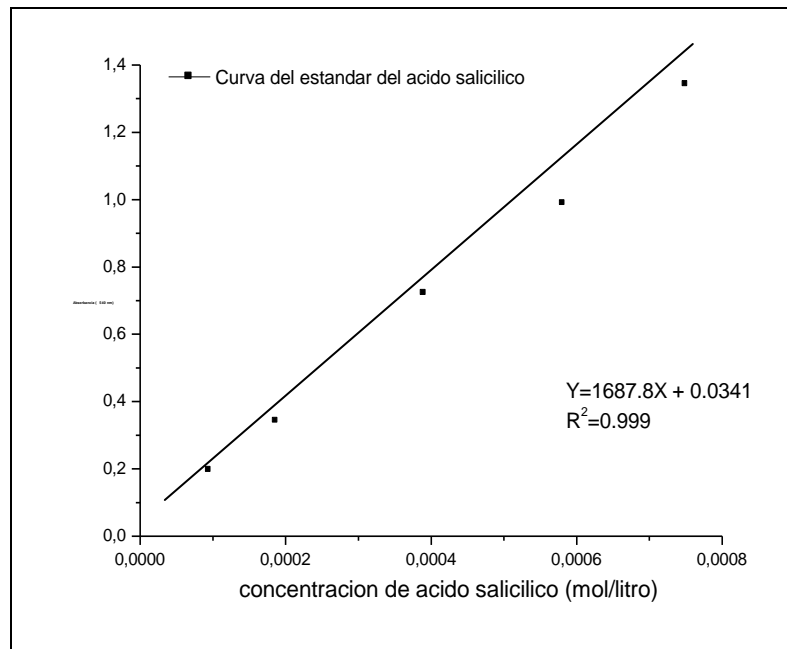


Figura 4.18 Curva de calibración del estándar de ácido salicílico

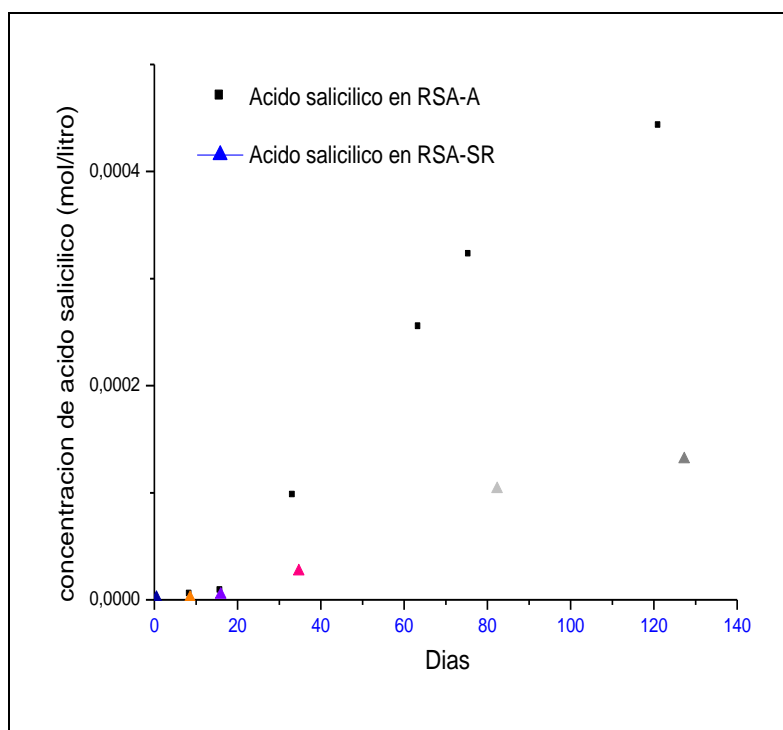


Figura 4.19 Concentración en mol por litro de ácido salicílico en reactores de suelos activados en RSA-A y RSA-SR en 132 Días

4.10 DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA DEGRADACIÓN DE ANTRACENO EN MEDIO SÓLIDO.

Se realizó en placas de Agar MMB, con antraceno en su superficie, donde se sembraron los microorganismos (consorcio). Se observa el halo de consumo de antraceno en transiluminador UV. En la fotografía si se mira de frente la fotografía de lado izquierdo es el antraceno con el consorcio y del lado derecho después de 10 días. Se debe observar que solo es un análisis cualitativo.



Figura 4.20 Fotografía del análisis cultivo en placa de la degradación del antraceno por el consorcio

5. CONCLUSIONES

En lo que se refiere al objetivo general de evaluar la remoción de antraceno en un suelo pesado, utilizando reactores de suelos activados mediante la inoculación de consorcios de microorganismos en ambiente aerobio y anaerobio a escala laboratorio se logra satisfactoriamente ya que por los resultados obtenidos el reactor inoculador aerobio fue el más eficiente en la remoción del contaminante aplicado al reactor de suelos activados correspondiente a un 95% de remoción, comparado con el sulfato-reductor de ambiente anaerobio que es de un 36.1 %. Lo que probablemente se deba a que en sistemas aerobios se degrada más fácilmente el antraceno ya que se favorece la oxidación.

Para el caso de los objetivos particulares que se refieren a:

- Arrancar, aclimatar y operar reactores inoculadores de un consorcio microbiano adaptado al consumo de antraceno, en continuo en sistema aerobio y sulfato-reductor, se logro mantenerlos en estado estable, lo cual se puso de manifiesto en la poca variación de los parámetros evaluados pH, DQO, y cuentas microbiológicas y a la determinación de sólidos suspendidos volátiles
- Obtener parámetros de biodegradación para antraceno, en reactores de suelos activados en condiciones aerobias y anaerobias. Los resultados obtenidos en los experimentos de disponibilidad del antraceno en el suelo modelo, permiten concluir en que en los ensayos de absorción el mejor ajuste de los datos experimentales es de Freundlich hasta 600 mg/L. lo que permite cuantificar la remoción del antraceno por métodos cromatograficos.
- Evaluar las condiciones implementadas a los reactores batch sobre la remoción de antraceno, de acuerdo a la adición o eliminación del sustrato fácilmente biodegradable, este se cumple satisfactoriamente ya que en sistemas aerobios no importa la presencia de sustrato de sacarosa ya que igualmente se presentó la degradación del antraceno con y sin sacarosa esta última es adicionada para inducir la biodegradación.

El análisis de la hipótesis planteada en este trabajo es el siguiente:

Con base a los resultados obtenidos en los experimentos de disponibilidad del antraceno en el suelo modelo, se ratificó que si se tiene que los HPA'S (Hidrocarburos poliaromáticos) en este caso particular el compuesto modelo antraceno es catalogado como un compuesto resistente a la biodegradación en un suelo pesado, se considera que si es posible lograr su biorremediación al ser sometido a la adición de nutrientes e inoculación de consorcios controlados en ambientes aerobios y anaerobios en reactores de suelos activados siendo más favorable el aerobio que el anaerobio de acuerdo a los datos experimentales obtenidos la remoción del 95 % en el sistema aerobio y del 36.1 de remoción en ambiente anaerobio que se muestra en el tratamiento tres propuesto.

Por consiguientes se obtiene una técnica económica rápida y factible para efectuar la biodegradación del compuesto antraceno, en suelos pesados (suelo arcilloso con alto contenido de materia orgánica), que consiste básicamente en uso de reactores de suelos activados con manejo de aceptores de electrones de diferente opción como es el sulfato y el oxígeno como las dos variantes evaluadas así como la inoculación de consorcios, la inducción de la degradación de la fuente de carbono, para poder comparar la efectividad de cada ambiente, usando sustratos de fuente de carbono del antraceno y la sacarosa que favorezcan el fortalecimiento de consorcios microbianos degradadores y así aumentar la biodisponibilidad, para favorecer la remoción del contaminante en ambos reactores.

6. RECOMENDACIONES Y TRABAJOS FUTUROS

Algunas sugerencias para las próximas experimentaciones derivadas de este trabajo son:

Como en todo proceso de biorremediación, los microorganismos son el corazón del proceso en el caso de los RSA también lo es. Los RSA pueden ser estudiados para saber como funcionan con consorcios microbianos provenientes de la propia microflora nativa, y otros enriquecidos o inóculos de consorcios especializados en la biodegradación de los contaminantes de interés. Algunos sugeridos son los grupos microbianos importantes identificados en RSA incluyen bacterias del grupo de las pseudomonadales, actinomicetos, bacterias metanótrofas y deshalorrespiradoras, algunas arqueas como las metanogénicas, y más recientemente aunque no en escala comercial, hongos ligninolíticos.

Desarrollo de ensayos de ecotoxicidad de los grupos microbianos mencionados anteriormente, para complementar la evaluación de la efectividad del proceso de biorremediación empleado

Es conveniente el, utilizar tensoactivos o solventes para facilitar la desorción y favorecer la solubilidad de contaminante para que pueda ser removido del suelo y favorecer la adsorción.

Desarrollo de procesos basados en la utilización de aceptores de electrones secuenciales esto se refiere compuestos poliaromáticos de mas de tres anillos o combinados con otros elementos diferentes a anillos aromáticos como serian algunos, contaminantes recalcitrantes y tóxicos (plaguicidas y compuestos órganoclorados, explosivos, etc.)

Estudios más profundos para determinar sobre la disponibilidad de contaminantes y su cometabolismo microbiano en presencia de otras fuentes de carbono.

Una de las razones principales que justifican una prolongada persistencia de los compuestos orgánicos hidrófobos en el ambiente, es su limitada solubilización, Una posibilidad de resolver este escollo y por lo tanto su degradación, sería la aplicación de biosurfactantes.

7. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, J. A., E. Ramos, B. Fernández, A. Núñez. Gestión de residuos sólidos petrolizados. EUA, 2001.

Alexander, M. 1999. Biodegradation and Bioremediation. Segunda edición. Academic Press, Inc., San Diego

Andersson B. E. y Henrysson T. 1996. Accumulation and degradation of dead end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnology*. 46: 647-652.

ASTM, *Standard guide for remediation of ground water by natural attenuation at petroleum release sites*, 1998, ASTM E-1943-98, West Conshohocken, Pa. 1998.

Atlas, R. y Cerniglia, C. 1995. Bioremediation of petroleum pollutants. *Bioscience* 43:5: 332-338.

Atagana, H. I. 2004. Bioremediation of creosote-contaminated soil in South Africa by landfarming. *Journal of Applied Microbiology*. 96:510-520.

Baldi F., Pepi M., Fava F. *Appl Env Microbiol* 69: 4689-4696, 2003.

Basel Al-Yousfi, *Natural Attenuation: How Is Mother Nature Aiding Us to Cleanse Our Environmental Sins?* Practice Periodical Of Hazardous, Toxic, And Radioactive Waste Management, Volume 6, Issue 3, pp. 139-140, 2002.

Belloso Claudio. XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Biodegradación de Suelos Contenidos en Terrarios. 1998.

Bollag J.M., *Decontaminating soil with enzymes*, 1992, *Environmental Science and Technology*, 26(10), 1992.

Bossert I.D., Bartha R., *Structure-biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil*, 1986, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 37, 490-495, 1986.

Bower, J., E.; Zehnder, J., B. Bioremediation of organic compounds – putting microbial metabolism to work. *Bioremediation*, 11, 320 – 367 (1993).

Bredehoeft, J D; Wesley, J B; Fouch, T D., 1994, Simulations of the origin of fluid pressure, fracture generation, and the movement of fluids in the Uinta Basin, Utah: American Association of Petroleum Geologists (AAPG) Bulletin, v. 78, no.11, p.1729-1747

Brim, H., S. C. McFarland, J. K. Fredrickson, K. W. Minton, M. Zhai, L. P. Wackett, and M. J. Daly. 2000. Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nature Biotechnology*, 18: 85-90.

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

Brusseau M.L., Jessup R.E., Rao P. S. C., *Nonequilibrium sorption of organic chemicals: elucidation of rate-limiting processes*, *Environmental Science and Technology*, 25 (1), 134–142, 1991.

Bumpus, J. A. 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:154-158.

Carmichael L. M., Christman R. F., Pfaender F. K., *Desorption and mineralization kinetics of phenanthrene and chrysene in contaminated soils*, *Environmental Science and Technology*, 31(1), 126–132, 1997.

Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3:351-368.

Cerniglia, C. E. 1984. Microbial transformation of aromatic hydrocarbons. In R. M. Atlas, editor, *Petroleum Microbiology*. p. 99-128. Macmillan Publishing Co. New York.

Cerniglia, C. E., G. L. White y R. H. Heflich. 1985. Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch. Microbiol.* 143:105-110.

Cerniglia, C. E., J. B. Sutherland y S. A. Crow. 1992. Fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. En : G. Winkelmann (Ed.) *Microbial degradation of natural products*. VCH. Weinheim. pp. 193-217.

Cho J.S. [et al.], Implementation of natural attenuation at a JP-4 jet fuel release after active remediation, 1997, *Biodegradation*, 8(4), 265–73, 1997.

- Conte, [et al.], increased retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils induced by soil treatment with humic substances. *Environmental Pollution*, 112 (2001) 27-31. , 2000.
- Cookson, J. T. 1995. *Bioremediation engineering. Design and application*. Ed. Mc Graw Hill, EUA. 524.
- Crawford, R. L. y W. W. Mohn. 1985. Microbiological removal of pentachlorophenol from soil using a *Flavobacterium*. *Enzyme Microb.Technol.* 7:617-620.
- Dhawale S. W., Dhawale S. S. y Dean-Ross D. 1992. Degradation of fenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium* occurs under ligninolytic as well as nonligninolytic conditions. *Appl. Environ. Microbio.* 53: 3000-3006.
- Dreisbach, R y Roberson, W. 1981. *Manual de toxicología clínica. Prevención, diagnostico y tratamiento*. El Manual Moderno, 12ª. Ed. DF. México.
- Ercoli, E. y otros. *Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de HC en suelos*. Univ. Nac. de Cuyo, Argentina, 2001
- EPA Method 846.Uddate III cd rom
- Frederick R. J. y Egan M. 1994. Environmentally compatible applications of biotechnology. *Bioscience.* 44(8): 529-534.
- Garcia , V. 2000. *Influencia del agua de riego sobre la calidad del agua subterránea con compuestos orgánicos*. Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Gibbs C. F. Pugh K. B. y Andrews A. R. 1975. Quantitative studies on marine degradation of oil. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 188: 83-94.
- Giles C.G., D'Silva., and Easton J.A. (1974) A general treatment and classification of the solute adsorption isotherm. Part 2. Experimental interpretations. *J Cholloid Interfase Sci.* 47:766-778
- Glegg, G.; Hickman L. y Rowland, J. 1999. Contamination of limpets (*Patella vulgate*) following the sea empress. *Marine Pollut. Bull.* 38:2:119-125.
- Griffin D. M. 1980. Water potential as a selective factor in the microbial ecologic of soils. *Water potential relation in soil microbiology*. Soil science society of America 141-151.

Hagglblom M. M. and Young L.y: (1995) anaerobic degradation of halogenated phenols by sulphate-electron acceptors on methanogenic degradation of chlorinated phenols. *Environ Toxicol.Chem.* 12:1395-1403.

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

Hawkes F.R., Guwy A.J., Hawkes D.L. and Rozzi A.G. (1994) On-line monitoring of anaerobic digestion: application of a device for continuous measurement of bicarbonate alkalinity. *Wat. Sci. Tech:* 12:1-10

Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management, Volume 6, Issue 3, pp. 141-155 (July 2002)

Howard P.H. [et al.], 1991, *Handbook of environmental degradation rates*, Lewis, Chelsea, Mich

Johnsen A., Winding A., Karlson U., Roslev P. *Appl Environ Microbiol* 68: 6106-6113, 2002.

Kaplan, C. W. y C. L. Kitts. 2004. Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. *Appl. Environ. Microbiol.*70:1777-1786.

Kanaly, R. A., and Harayama, S. Biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria J Bacteriol. *Journal of Bacteriol* .182: 2059-2067. 2000

Käster M. y Mahro B. 1995. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil affected by the organic matriz of compost. *Appl Microbiol Biotechnol.* 44: 668-675.

Kelley I. y Cerniglia C. 1995. Degradation of mixture of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by mycobacterium Strain PYR-1, J. Soil Contamination. 4:77-91.

Kosteky, P. y Calebrese, E. 1992. Hydrocarbon contaminated soil and groundwater. Lewis Publishers, Chelsea.

La Greca M. D. y Buckingham P. 1998. Gestión de residuos tóxicos. Jeffrey C. Evans. México.

Leahy J. G. y Colwell R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*. 54(3): 305-315.

Letzel [et al.], Separation and identification of polar degradation products of benzo[a]pyrene with ozone by atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry after optimized column chromatographic clean-up, *Journal of Chromatography A*, 855 (1999) 501-514.

LGEEPA (Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente) LEGISLACION DE ECOLOGIA. 2002. Editorial SISTA

Luthy R.G. [et al.], *Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents*, 1997, *Environmental Science and Technology*, 31, 3341–3347.

Macleod C.J.A., Semple K.T., *Influence of contact time on extractability and degradation of pyrene in soils*, 2000, *Environmental Science and Technology*, 34 (23), 4952–4957, 2000.

Macnaughton, S. J., J. R. Stephen, A. D. Venosa, G. A. Davis, Y. J. Chang y D. C. White. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3566-3574.

Madsen T. y Kristensen P. 1997. Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 16: 631-637.

Metcalf y Eddy 1998. *Ingeniería de aguas residuales*. McGraw-Hill/Interamericana.

Mills S. A. y Frankenberger W. T. 1994. Evaluation of phosphorus source promoting bioremediation of diesel fuel in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 53: 280-284.

Mizari-Hiriart, H. 1997. Caracterización de sitios de canal en la zona industrial de la subcuenca de Chalco. *Memorias del X Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, Toluca, Edo. de México, México.

Monticello D.J. The molecular biology of dibenzothiophene desulphurization. *The Seven International IGT Symposium of Gas, Oil and Environmental Microbiology*. Pp.1-15, 1994.

NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. “Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación”. *Diario Oficial*, 30 de Marzo de 2005.

- Neidhardt F. C., Ingrahm J. L. y Schaechter 1993. *Physiology of bacterial*. Sinaver Associates, Inc. Sunderland.
- Nogales, B., E. R. B. Moore, E. Llobet-Brossa, R. Rossello-Mora, R. Amann y K. N. Timmis. 2001. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S RNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1874- 1884.
- Parales R., Yu C., Parales J., Gibson D.T. Expanding the limits of naphthalene Dioxigenase as a biocatalyst. *ASM Conference of Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3)*. Puerto Rico, pp. 6, 2001.
- Park K. S., Sims R. C., DuPont R., *Transformation of PAHs in soil systems*, 1990, *Journal of Environmental Engineering*, 116(3), 632–640, 1990.
- Primo Y. E. 1981. *Química agrícola I. Suelos y fertilizantes*. Ed Alambra. España.
- Right to know Program, New Jersey Department of Health and Senior Services, Po Box 368, Treton, NJ 08625-0368, (609)988-2002).
- Robinson, J.B., Tuovinen, O.H., 1984, Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds—Physiological, biochemical, and genetic analyses: *Microbiology*, v. 48, 95-142 p.
- Rodríguez V. R., Cruz C. T., Fernández S. J. M., Roldán C. T., Mendoza C. A., Saucedo C. G. y Tomasini C. A. 1999. Use of Sugarcane bagasse pith as solid substrate for *P. Chrysosporium* growth. *Folia Microbiol.* 44(2): 213-218.
- Rogers S.W. [et al.], *Natural Attenuation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Sites: Review, Practice Periodical Of*
- Rojas A. N. G., Rodríguez V. R., Saval B. S. y Alvarez P. J. J. 2000. Effect of C/N/P/ ratio and nonionic surfactans on polychlorated biphenyls biodegradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Rosenberg E. y E.Z. Ron. 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiol Biotechnol*, 52:154-162
- Roy J. Irwin. *Environmental contaminants encyclopaedia PAHs entry*. Water resources divisions, water operations branch. Colorado, National Park Service 1997.
- Sabaté, J., M. Viñas y A. M. Solanas. 2004 Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *Int. Biodet. Biodegrad.* 54:19-25.

- Samanta, S. K., O. V. Singh y R. K. Jain. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20:243-247.
- Saval, S. 1997. Biorregeneración de suelos. Manejo y disposición de lodos. Manejo y disposición de residuos sólidos, contaminación de aguas superficiales y subterráneas. 279-298. Memorias técnicas, XI Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y ciencias Ambientales tomo II, del 4 al 7 de noviembre de 1997, Zacatecas, México.
- Savas Ü., Carstens C. P. y Jefcoate C. R. 1997. Biological oxidations and p 450 reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 347: 181-192.
- Schirmer M., Butler B.J., Transport behaviour and natural attenuation of organic contaminants at spill sites, 2004, *Toxicology* 205, p. 173–179.
- Seagren E.A., A. M. Asce, Becker J.G., *Review of Natural Attenuation of BTEX and MTBE in Groundwater*, Practice Periodical Of Hazardous, Toxic, And Radioactive Waste Management, Volume 6, Issue 3, pp. 156-172 (July 2002)
- Shankar, K. S., H.. Haraday T.Viraraghavan.1996. Low-Strength wastewater treatment by a UASB reactor. *Bioresourse Technology*, 55:187-194.
- Shneider J., Grosser R., Jayasimhulu K., Xue W. y Warshawsky D. 1996. Degradation of pyrene, benz(a)anthracene, and benzo(a)pyrene by mycobacterium sp., insolated from former coal gasification site. *Appl. Environ Microbiol.* 62: 13-19.
- Siebe S. 1997. Química del suelo. Memorias del curso “Biorremediación de suelos y acuíferos”. Programa universitario del medio ambiente. UNAM México.
- Singh, B. K., A. Walker, J. A. Morgan y D. J. Wright. 2003. Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium *Appl. Environ. Microbiol.* 69:5198-5206.
- Soeder C. J. Papaderos A., Kleespies M., Kneifel H., Haegel F. y Webb L. 1996. Influence of phytogetic surfactants on bio-elimination of phenantrene and fluoranthene by three bacteria. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 44: 654-659.
- Stanley D. 1986. Biochemistry of aromatic hydrocarbon degradation in pseudomonades, Department of biochemistry University of Minnesota. 10(15): 527-555.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Sutherland J.B. 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi, *J. Industrial. Microbiology.* 9: 53-62.
- Sutherland J.B. 1995. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi, *J. Industrial. Microbiology.* 9: 53-62. Van Hammer, J. D., A. Singh y O. P.
- Tissot B., Welte D.H. *Petroleum formation and occurrence*, Springer-Verlag, New York (USA), pp. 699, 1984.
- Van Hamm J., Sing A., Ward O. *Appl Environ Microbiol* 67:503-549, 2003.
- Vogel, T. M. 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:311-316.
- Ward. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:503-549.
- Weber J. B., and Miller C.T. (1989) Organic chemical movement over and through soil. *Reactions and movement of organic chemicals in soils*. No.22 Soil Science Society of America and American Society of Agronomy
- Wick L., Pasche N., Bernasconi S., Pelz O., Harms, H. *Appl Environ Microbiol* 69: 6133-6142, 2003.
- Wilson, S., and K. Jones. 1993. Bioremediation of Soil Contaminated with Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review, *Environmental Pollution*, 81: 229-249.
- Watanabe, K., and Baker, P. W. Environmentally relevant microorganisms. *J Biosci and Bioeng.* 2000. 89: 1-11
- Wise, S. A., B. A. Benner, G. D. Burd, S. N. Chester, R. E. Rebbert y M. M. Schantz. 1988. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in a coal standard reference material. *Anal. Chem.* 60:887-894.
- Whischman H. y Steinhart H. 1997. The formation of oxidation products in soil and soil/compost mixtures. *Chemosphere.* 35 (8: 1681-1698.

8 GLOSARIO

Algas. Organismos uni o pluricelulares, en este último caso de organización talofítica, autótrofos fotosintéticos, casi en su totalidad acuáticos de agua dulce y marino. Algunas algas unicelulares son simbioses de hongos en una organización llamada liquen. Entre los principales grupos de algas se encuentran las diatomeas, las clorofíceas o algas verdes, las rodofíceas o algas rojas y las feofíceas o algas pardas. Las tradicionalmente llamadas algas azules, verdeazuladas o cianofíceas son procariontes y deben ser consideradas como cianobacterias. Las algas son responsables del grueso de la productividad primaria en los ecosistemas acuáticos y del aporte de oxígeno al agua y a la atmósfera.

Anión fosfato. Numerosas moléculas orgánicas contienen grupos fosfato. El fosfato de calcio es muy insoluble y es el constituyente principal de la fracción mineral del hueso. Los fosfatos son uno de los principales abonos minerales. Los vertidos pueden favorecer la eutrofización de las aguas. Fórmula PO_4^{3-} .

Anión nitrato. Alguna de las sales que forma, como el nitrato de amonio se usa como fertilizante. Los vertidos con nitratos favorecen la eutrofización de las aguas. Fórmula NO_3^- .

Abono. Adición al suelo agrícola de sustancias que aumentan la fertilidad y el rendimiento de las cosechas. Los abonos pueden ser orgánicos o inorgánicos . (abonos minerales). El abonado representa la incorporación al suelo de las sustancias empleadas en el crecimiento vegetal. Un abonado armónico debe tener en cuenta la ley del mínimo, según la cual el crecimiento viene limitado por el nutriente presente en menor concentración (factor limitante). Por extensión el término abonado se cumple también para el aporte de nutrientes a medios acuáticos.

Aguas residuales. Aguas que se producen como resultado de actividades industriales, agrícolas o urbanas. Tales aguas portan sustancias o materiales indeseables de muy distinta naturaleza, según su origen (compuestos orgánicos, metales, microorganismos residuos).

Arcilla. Roca sedimentaria detrítica de grano fino, formada a partir de sedimentos marinos y lacustres de partículas de tamaño muy pequeño. Es una roca blanda que se endurece por acción del calor. En su composición intervienen, entre otros, minerales arcillosos y cuarzo. Las arcillas tienen la propiedad de absorber agua hasta un cierto límite, aumentando su volumen y haciéndose impermeables. La presencia de una capa de arcilla en el subsuelo detiene la infiltración de agua y puede permitir la acumulación de agua subterránea. En los terrenos arcillosos, las variaciones de volumen de las arcillas por pérdida y ganancia de agua pueden producir deformaciones (arcillas de bujeo).

Bacterias. Microorganismos unicelulares procariontes, que se multiplican por división simple. Por su forma se clasifican en esféricas (cocos y micrococos), en bastoncillos (bacilos) y en espirales (espirilos). Muchas son heterótrofas, responsables de la putrefacción de la materia orgánica y de las fermentaciones.

Otras son autótrofas fotosintéticas o quimiosintéticas. Pueden ser de vida libre, simbióticas o patógenas responsables de enfermedades en el hombre y otros seres vivos.

Bicarbonatos. Anión HCO_3^- y sus sales o sales ácidas del ácido carbónico. Fórmula H_2CO_3 .

Biocida. Agente que mata organismos vivos. Suele aplicarse a los plaguicidas agrícolas.

Biodiversidad. Diversidad de seres vivos en un ecosistema. La diversidad mide la riqueza en especies mediante un índice que refleja la relación entre el número de individuos de cada especie y el número total de individuos de todas las especies presentes. Existen varios índices de diversidad, pero tienden a preferirse los basados en la teoría de la información cuyo valor puede expresarse en bits.

Bioindicadores. Organismos cuya presencia, ausencia o distribución está asociada a un factor o a una combinación de factores ambientales particularmente significativa o relevante. Los organismos bioindicadores

tienen interés científico en la investigación ecológica y aplicación en el análisis ambiental, por ejemplo en estudios de contaminación.

Biomasa. Masa de organismos en cualquier nivel trófico, área o volumen de un ecosistema. La biomasa se mide en cantidad de materia por unidad de superficie o de volumen. Los valores de biomasa y sus variaciones son magnitudes muy importantes en ecología. La biomasa vegetal es susceptible de utilización industrial para la producción de energía por combustión o para la producción de otras sustancias de interés mediante procesos de fermentación.

Biotecnología. Conjunto de técnicas desarrolladas en los últimos años, en que se aplican los avances en genética y fisiología para nuevas aplicaciones industriales, agrícolas, clínicas o de tratamiento de residuos (producción de insulina y hormona del crecimiento humanos por bacterias, obtención de cepas o de organismos transgénicos de mayor crecimiento o resistencia a stress ambientales, etc.).

Carcinogénico. Agente del que se ha probado experimentalmente su capacidad para inducir o producir cáncer en humanos o animales. Los agentes carcinogénicos pueden ser físicos (ciertos tipos de radiación) o químicos, entre los que existen numerosas sustancias.

Carga orgánica biodegradable. Cantidad de materia orgánica contenida en un agua residual que puede ser degradada por acción biológica.

Cloruros. Ión Cl^- y sus sales (cloruros de sodio, potasio, etc.) o sales del ácido clorhídrico HCl , que en forma anhidra gaseosa se considera un cloruro, el cloruro de hidrógeno.

Coliformes. Grupo de bacterias aerobias y facultativamente anaerobias, Gram-negativas, no esporulantes, fermentadoras de lactosa y habitantes típicos del intestino grueso humano y animal. Muchas de ellas no son capaces de reproducirse fuera del intestino, por lo que sirven de indicadores de la contaminación por aguas fecales. Algunos organismos coliformes son patógenos.

Combustibles fósiles. Carbón, petróleo y gas natural. Son materiales de origen orgánico, producidos a partir de restos de seres vivos en épocas geológicas anteriores. Constituyen la mayor parte de las fuentes de energía consumidas en los países industriales. Son recursos no renovables y su utilización es la principal responsable de las emisiones contaminantes a la atmósfera.

Conductividad eléctrica. Inversa de la resistividad específica. Se mide en $\text{ohm}^{-1} \text{m}^{-1}$ o Siemens/m. La conductividad depende de la migración de cargas eléctricas (electrones o iones). El agua pura no es buena conductora, pero sí lo es el agua con sustancias iónicas disueltas, por lo que la medida de la conductividad del agua sirve para medir la salinidad.

Contaminación atmosférica. Se suele definir como la presencia en el aire de materias o formas de energía que impliquen riesgo, daño o molestia grave para las personas, la fauna, la flora o bienes de cualquier naturaleza.

Delito ecológico. Vulneración de normas ambientales sancionadas en el Código Penal.

Demanda bioquímica de oxígeno. Oxígeno consumido en la degradación de sustancias oxidables del agua por la acción microbiológica, medido en condiciones estandarizadas. Se expresa en mg de oxígeno por litro. Un valor DBO elevado indica un agua con mucha materia orgánica. El subíndice cinco indica el número de días en los que se ha realizado la medida. (DBO).

Demanda química de oxígeno. Cantidad de oxidante enérgico (dicromato o permanganato) consumido en la oxidación de todas las sustancias reducidas presentes en una muestra de agua, medido en condiciones estandarizadas. Se expresa en mg por litro de oxígeno equivalente a la cantidad de oxidante empleado. Un valor DQO elevado indica un agua con muchas sustancias oxidables. (DQO).

Depuración de aguas residuales. Eliminación de contaminantes de las aguas residuales. Los materiales sólidos y las partículas en suspensión pueden separarse por medios mecánicos y sedimentación. La materia orgánica es metabolizada por microorganismos en un tratamiento

biológico, y otras sustancias pueden eliminarse por tratamientos físico y químicos.

Depuración natural del agua. Las masas de agua pueden autodepurarse dentro de ciertos límites, por medio de procesos físicos, químicos y biológicos. Los contaminantes orgánicos son degradados por la acción microbiana, lo que va asociado a un aumento del consumo de oxígeno, por lo que los niveles de oxígeno disuelto en el agua disminuyen como resultado de la contaminación orgánica.

Detergentes. Sustancias utilizadas en limpieza por sus propiedades tensoactivas y emulsionantes (pueden solubilizar sustancias insolubles en agua como grasas y aceites). Los vertidos de detergentes a las aguas pueden producir problemas ambientales debido a que algunos no son biodegradables, y otros, que pueden ser degradados, incluyen en su composición fósforo en forma de fosfato, lo que puede producir eutrofización.

Dióxido de azufre. Anhídrido sulfuroso. Gas incoloro, irritante para los ojos, las mucosas y las vías respiratorias. Es una sustancia con aplicaciones en la industria química, pero además es un contaminante que se produce en procesos industriales de combustión. En la atmósfera es capaz de oxidarse a SO_3 (trióxido de azufre o anhídrido sulfúrico) que a su vez puede reaccionar con el agua para dar ácido sulfúrico (H_2SO_4), uno de los componentes de la lluvia ácida. Fórmula SO_2

Dióxido de carbono. Anhídrido carbónico. Gas incoloro e incombustible. Es un componente normal de la atmósfera (0.03%). Las plantas verdes utilizan el dióxido de carbono de la atmósfera en la fotosíntesis como fuente de carbono. Tanto plantas como animales y microorganismos lo liberan a la atmósfera como resultado de la respiración y las fermentaciones. Es también un contaminante atmosférico producido por las combustiones. Es uno de los gases responsables del efecto invernadero. Fórmula CO_2

Eliminación de residuos tóxicos y peligrosos. Todo procedimiento que como el vertido controlado, la incineración sin recuperación de energía, la inyección en el subsuelo y el vertido al mar, no implique aprovechamiento alguno de los recursos.

Energía de la biomasa. La que puede obtenerse de compuestos orgánicos combustibles obtenidos a partir de materia vegetal.

Energía. Es la capacidad de producir trabajo. En un sistema cerrado no existen pérdidas ni ganancias energéticas, tan sólo transformaciones. La materia se considera una forma condensada de energía. La equivalencia

masa-energía sigue la ecuación einsteniana ($E=mc^2$, donde E es la energía, m es la masa y c la velocidad de la luz en el vacío).

Erosión. Destrucción de los materiales de la superficie terrestre (rocas y suelo) por separación física de partículas de cualquier tamaño debido a la acción de los agentes externos (viento, agua, hielo). La intensidad de la erosión depende de la energía del agente erosivo, la naturaleza de los materiales (litología), el grado de meteorización, la pendiente del terreno, y en el caso del suelo, del grado de cobertura vegetal y del enraizamiento, por lo que las acciones humanas sobre la vegetación y el suelo pueden favorecer la erosión.

Especie. Grupo de organismos formado por poblaciones de individuos que ocupan un hábitat y que se reproducen entre sí. Este concepto de especie, que es el biológico (bioespecie), resulta inservible en aquellos organismos cuya reproducción es totalmente asexual, en cuyo caso depende únicamente de criterios morfológicos (morfoespecie), que pueden ser completados con criterios ecológicos.

Especies endémicas. Una especie endémica es aquella que sólo existe en una zona geográfica determinada, de extensión variable, pero generalmente restringida respecto al tamaño de las áreas de las especies con las que se compara.

Estreptococos fecales. Bacterias del grupo de los estreptococos que viven en el intestino grueso y cuya presencia en el agua indica contaminación por vertido de aguas fecales.

Eutrofización. Proceso natural en ecosistemas acuáticos, especialmente en lagos, caracterizado por un aumento en la concentración de nutrientes como nitratos y fosfatos, con los consiguientes cambios en la composición

de la comunidad de seres vivos. Las aguas eutróficas en contraste con las oligotróficas son más productivas. Sin embargo, más allá de ciertos límites, el proceso reviste características negativas al aparecer grandes cantidades de materia orgánica cuya descomposición microbiana ocasiona un descenso en los niveles de oxígeno. La eutrofización se produce en muchas masas de agua como resultado de los vertidos agrícolas, urbanos e industriales.

Fenol. Compuesto orgánico aromático muy tóxico e irritante. Tiene numerosas aplicaciones en la industria química (elaboración de resinas sintéticas, desinfectantes, etc.). Fórmula C_6H_5OH .

Fenoles. Compuestos orgánicos derivados del benceno (C_6H_6) en que uno, dos o tres hidrógenos del núcleo bencénico están sustituidos por radicales $-OH$. Los fenoles tienen aplicaciones en la industria química y como plaguicidas y son tóxicos.

Fermentación. Degradación biológica de compuestos orgánicos a compuestos más sencillos, generalmente en ausencia de oxígeno, como la fermentación alcohólica, láctica o acética. La mayoría de las fermentaciones las realizan los microorganismos, pero las células de organismos superiores pueden fermentar compuestos durante períodos cortos de tiempo, por ejemplo, el músculo en déficit de oxígeno transforma glucosa en láctico por vía fermentativa.

Fertilizante. Sustancia que se añade a los suelos agrícolas para mejorar el rendimiento de los cultivos y la calidad de la producción. Existen fertilizantes orgánicos, como el estiércol o el composteo, y fertilizantes inorgánicos o minerales, que se utilizan para suministrar al suelo nitrógeno, potasio y calcio en forma de sales.

Fitosanitarios. Sustancias que se añaden a los cultivos agrícolas para tratar enfermedades de las plantas, modificar su fisiología, eliminar especies de plantas competidoras o parásitas o especies animales dañinas.

Fosfatos. Ión PO_4^{3-} y sus sales o sales del ácido fosfórico, H_3PO_4 . Los fosfatos son componentes esenciales de los seres vivos y además son nutrientes para las plantas. Tienen aplicaciones industriales diversas y como

fertilizantes. Los vertidos de fosfatos a las aguas naturales pueden causar eutrofización.

Gasolina. Mezcla de hidrocarburos ligeros. Volátil, inflamable, de olor característico, se utiliza como combustible en motores de explosión y tiene aplicaciones industriales como desengrasante, disolvente y materia prima de síntesis. Se obtiene por destilación del petróleo, por hidrogenación de carbón o dióxido de carbono, por cracking o rotura de compuestos hidrocarbonados de cadena larga y por polimerización e hidrogenación de hidrocarburos de cadena corta.

Gestión de residuos tóxicos y peligrosos. El conjunto de actividades encaminadas a dar a los residuos tóxicos y peligrosos el destino final más adecuado de acuerdo con sus características. Comprende las operaciones de recogida, almacenamiento, transporte, tratamiento, recuperación y eliminación de los mismos.

Grasa. Triglicérido o triéster de glicerol y ácidos grasos. Las grasas son sustancias lipófilas e hidrófobas, esto es, insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos. Las grasas animales suelen contener ácidos grasos saturados y ser sólidas a temperatura ambiente. Las grasas vegetales suelen contener ácidos grasos insaturados y tener menor punto de fusión, por lo que son líquidas a temperatura ambiente, en cuyo caso se les acostumbra a denominar aceites. En los seres vivos, las grasas son sustancias energéticas y de reserva. Son un componente importante de la dieta.

Hábitat. Lugar y tipo de ambiente en que viven los organismos.

Herbicidas. Plaguicidas utilizados en agricultura para eliminar plantas indeseables. Como otros plaguicidas, su uso puede producir problemas ambientales por toxicidad o acumulación a través de las redes tróficas.

Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Hidrocarburos aromáticos con dos o más anillos bencénicos (ciclos con dobles enlaces conjugados). Entre ellos se encuentran cancerígenos como el benzopireno y la dibenzocridina.

Hidrocarburos aromáticos. Hidrocarburos cíclicos con dobles enlaces conjugados, como el benceno, C_6H_6 .

Hidrocarburos. Compuestos orgánicos formados por carbono e hidrógeno. Pueden estar formados por cadenas hidrocarbonadas abiertas (hidrocarburos alifáticos, por ejemplo el propano), o cerradas formando ciclos o anillos (hidrocarburos cíclicos, por el ejemplo el ciclohexano). Los hidrocarburos cuyos anillos contienen dobles enlaces conjugados son los hidrocarburos aromáticos, por ejemplo, el benceno. Existen numerosos derivados de los hidrocarburos, por ejemplo los clorados y fluorados. Tanto entre los hidrocarburos como entre sus derivados existen numerosas sustancias de importancia industrial, agrícola, médica y ambiental (combustibles, plaguicidas, tóxicos, etc.).

Hongos. Organismo del Reino Fungi. Considerados antes como vegetales, en la actualidad (sistema de los cinco reinos) se tratan como un reino aparte, el de los hongos. Son organismos eucarióticos no fotosintéticos, heterótrofos (saprófitos o parásitos), unicelulares o pluricelulares. Estos últimos están formados por un micelio, que es un conjunto de hifas o filamentos celulares tabicados o no.

Humedad relativa. Relación, expresada en tanto por ciento, entre la cantidad de vapor de agua existente en el aire y la cantidad que saturaría este aire a una temperatura y presión dadas.

Impacto ambiental. Alteración del medio ambiente debida a la intervención humana. En la actualidad determinadas actuaciones requieren la elaboración previa de un estudio sobre su impacto ambiental.

Metales pesados. Elementos químicos del grupo de los metales, con densidad superior a 4.5 g/cm³ y masa atómica alta, como cadmio, cobre, cromo, mercurio, plomo, etc. Como contaminantes, son un grupo de sustancias que se metabolizan mal y que presentan toxicidad para los seres vivos, incluido el hombre.

Metano. Es el hidrocarburo más simple, producto de la descomposición anaeróbica. Componente, entre otros, del gas natural y del biogás. Es junto con el dióxido de carbono y los óxidos de nitrógeno el principal causante del efecto invernadero. Fórmula CH₄.

Monóxido de nitrógeno. Gas incoloro, algo soluble en agua, muy irritante y tóxico. Fórmula NO.

Nitratos. Ión NO_3^- y sus sales o sales del ácido nítrico, HNO_3 . Son nutrientes fácilmente asimilables por las plantas, por lo que son utilizadas como fertilizantes. Los aportes de nitratos al mar y al agua de ríos y lagos favorecen el crecimiento de algas (eutrofización).

Nitrito. Ión NO_2^- y sus sales o sales del ácido nitroso, HNO_2 . Tienen aplicaciones industriales. Son sustancias tóxicas a partir de las cuales pueden formarse nitrosaminas, que son cancerígenas.

Nitrógeno amoniacal. Nitrógeno combinado en forma de amoniaco (NH_3) o amonio (NH_4^+). El amoniaco y el amonio son gases que se producen de forma natural por fermentaciones microbianas de productos nitrogenados, por ejemplo en la descomposición de proteínas o urea.

Nitrógeno Kjeldahl. Cantidad de nitrógeno determinada por el método Kjeldahl. Incluye el nitrógeno de compuestos orgánicos y el nitrógeno amoniacal.

Nitrógeno total. En una muestra orgánica, el contenido en nitrógeno medido como la diferencia entre el nitrógeno Kjeldahl y el nitrógeno amoniacal.

Nitrógeno. Elemento químico del grupo V de la tabla periódica de número atómico 7 y masa atómica 14.007. Su molécula diatómica es un gas químicamente inerte que constituye el 80% en peso de la atmósfera. Es uno de los cinco macroelementos que se encuentran en la materia orgánica. Es un componente esencial en los fertilizantes nitrogenados. Hay que destacar la capacidad de las plantas leguminosas de fijar el nitrógeno atmosférico gracias a la simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*. Símbolo N.

Oxígeno disuelto. Oxígeno molecular incorporado al agua en fase líquida. La solubilidad del oxígeno en agua depende, además de su presión parcial, de la temperatura. La concentración de oxígeno disuelto en las aguas naturales es crucial para los animales acuáticos que lo utilizan en la respiración.

Oxígeno molecular. Es un gas que se encuentra entre los componentes mayoritarios de la atmósfera (21% en peso). Tiene carácter oxidante,

interviene en las combustiones y es esencial en los procesos de producción de energía de las células aerobias en las que funciona como aceptor de electrones. Símbolo O₂.

Partícula. Materia sólida o líquida dispersa en el aire, de diámetro inferior a 500 micras. Puede proceder de fuentes naturales (erupciones volcánicas, por ejemplo) o artificiales. Dependiendo de su tamaño, pueden permanecer en suspensión en la atmósfera desde unos segundos a varios meses.

Partículas en suspensión en la atmósfera. Materia sólida o líquida dispersa en el aire, de diámetro inferior a 10 micras. Puede proceder de fuentes naturales (erupciones volcánicas, por ejemplo) o artificiales. Dependiendo de su tamaño, pueden permanecer en suspensión en la atmósfera desde unos segundos a varios meses. (SPM)

Partículas en suspensión. Partículas con un diámetro comprendido entre 0.1 y 1 micras.

Partículas sedimentables. Partículas con diámetro superior a 10 micras.

Policlorobifenilos. PCB's. Compuestos orgánicos aromáticos que incorporan átomos de cloro. Son contaminantes que pueden acumularse en las cadenas tróficas.

Productor de residuos tóxicos y peligrosos. El titular de la industria o actividad generadora o importadora de residuos tóxicos y peligrosos.

Recarga de acuíferos. Aporte de agua a los acuíferos. La recarga natural procede del agua de infiltración o agua superficial de las precipitaciones que se infiltra en el terreno, del agua de ríos y lagos, y en acuíferos litorales, incluso del agua del mar.

Recuperación de residuos tóxicos y peligrosos. Todo proceso industrial cuyo objeto es el aprovechamiento de los recursos contenidos en los residuos tóxicos y peligrosos ya sea en forma de materias primas o de energía.

Roca. Agregado natural de individuos minerales. Por su origen se clasifican en rocas magmáticas, originadas por la consolidación de un magma en el interior

de la corteza (plutónicas) o en el exterior (volcánicas); sedimentarias, originadas por la diagénesis de sedimentos que resultan de los procesos de meteorización, transporte y depósito; y metamórficas, que resultan de la acción de los factores presión, temperatura y acción de fluidos (procesos metamórficos) sobre cualquier tipo de roca preexistente.

Salmonella. Género de bacterias Gram negativas capaces de producir infecciones intestinales (salmonelosis). Son eliminadas en las heces fecales, por lo que pueden aparecer en aguas residuales. Las personas portadoras pueden fácilmente contaminar alimentos, lo que puede originar infecciones alimentarias.

Saneamiento. Evacuación de aguas residuales y pluviales mediante una red de alcantarillado. Se distinguen tres diferentes situaciones, Evacuación individual (pozo negro, fosa séptica); Red de alcantarillado propia sin conexión a la red general, y Red de alcantarillado conectada a la red general. Asimismo, en los casos en que existe, se señala la dotación de depuradoras propias para el tratamiento de los residuos del área industrial.

Saprofitos. También llamados saprobios. Son aquellos organismos que obtienen alimento disuelto a partir de los cuerpos muertos o en descomposición de otros organismos. Ejemplos de éstos son muchos hongos, bacterias y algunas orquídeas. Los saprobios ponen a disposición de las especies autótrofas, los elementos contenidos en la materia muerta.

Sedimentación. Depósito de partículas previamente erosionadas y transportadas por los agentes geológicos externos desde un área madre generadora a un área receptora o cuenca sedimentaria. La sedimentación de partículas puede obedecer a causas mecánicas como el depósito por gravedad o el depósito de las partículas de mayor tamaño cuando el agente de transporte sufre una disminución de velocidad y por tanto de energía cinética; químicas en el caso de formación de depósitos por precipitación a partir de soluciones coloidales o iónicas; biológicas en el caso de los sedimentos orgánicos de origen bioquímico. El producto final de los procesos sedimentarios es en general un acumulo de partículas no cementadas llamado sedimento.

Sedimentos. Materiales procedentes de la destrucción de las rocas de la superficie terrestre por la meteorización, la erosión, o ambos y que son

depositados a veces in situ o, más frecuentemente, a distancia, después de ser transportados por un agente geológico externo como el viento, el hielo o el agua. La sedimentación puede consistir en el simple depósito de partículas por gravedad, o pueden intervenir procesos químicos como la precipitación de sustancias a partir de disoluciones o, incluso biológicos como en los sedimentos de origen orgánico.

Sobreexplotación de acuíferos. Extracción de agua de un acuífero a una tasa mayor que la de recarga natural.

Sobreexplotación. Extracción de un recurso natural a una tasa superior a la de regeneración, lo que puede conducir al agotamiento del recurso.

Sólidos decantables o sedimentables. Fracción del total de sólidos en el agua que se separan de la misma por acción de la gravedad, durante un periodo determinado (generalmente 30 minutos) y en unas condiciones preestablecidas.

Suelo. Capa superficial de espesor variable, no compactada, originada por la acción de la atmósfera (meteorización) y de los seres vivos sobre la roca madre. En la composición del suelo se distingue un componente vivo (microorganismos, animales y vegetales) y uno no vivo con una fracción orgánica (humus) y una inorgánica o mineral (agua, sales, silicatos, etc.). En un corte vertical o perfil del suelo se distinguen, ordenadas en profundidad, capas u horizontes del suelo (A, B, C, etc.) caracterizados por su composición y por los procesos que tienen lugar en ellos. Existen numerosos tipos de suelos, con distintas aptitudes para la vegetación.

Sulfatos. Ión SO_4^{2-} y sus sales o sales del ácido sulfúrico (H_2SO_4). Los distintos sulfatos tienen numerosas aplicaciones industriales.

Sulfitos. Ión SO_3^{2-} y sus sales o sales del ácido sulfuroso (H_2SO_3). Algunas de sus aplicaciones son como agentes blanqueadores y conservadores, en la industria de la celulosa y en los revelados fotográficos.

Sulfuro de hidrógeno. En solución ácido sulfhídrico. Es un gas tóxico de olor inconfundible a huevos podridos. Se origina en la descomposición bacteriana de la materia orgánica. Fórmula H_2S .

Sulfuros. Ión S^{2-} y sus sales o sales del ácido sulfhídrico (H_2S). Los distintos sulfuros tienen numerosas aplicaciones industriales. En la naturaleza se presentan en forma de sales de metales como el plomo (galena), arsénico (rejalgar), antimonio (estibina), zinc (blenda), hierro (pirita), entre otros.

Superficie. Magnitud de extensión bidimensional. La unidad de medida es el metro cuadrado.

Sustancias tensoactivas. Sustancias que disminuyen la tensión superficial de los líquidos, normalmente el agua. La distribución de las fuerzas de atracción entre las moléculas que forman un líquido, dan como resultado que las moléculas situadas en la superficie están más atraídas que las que se encuentran en el seno del líquido, por lo tanto aparece una fuerza (tensión superficial, que se mide en dinas/cm) que tiende a mantener al líquido con una superficie mínima, y que se opone a que las moléculas escapen del líquido. Al disminuir la tensión superficial, los agentes tensoactivos aumentan la capacidad de unión del líquido con otras superficies, es decir, aumentan la capacidad de mojar.

9 ANEXOS

A 1. Determinación de pH (Standard Methods 423)

El pH es uno de los parámetros más importantes y frecuentemente utilizados en análisis químicos para determinar el carácter ácido o básico de una sustancia. La medición del pH se basa en determinar la actividad de los iones hidrógeno por medio de una medición potenciométrica utilizando un electrodo de vidrio y un electrodo de referencia. Se midió el pH de cada una de las muestras con un potenciómetro Beckman a 25°C, calibrado con una solución buffer a pH 7, 4 y 10

Lenore S. Clesceri, Arnold E. Greenberg y Andrew D. Eaton. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20ª. Edition, 1998, E.U. Editorial APHA, AWWA y WEF

A 2. Determinación del coeficiente alfa (Standard Methods 403)

El coeficiente alfa es un parámetro que se determina en los reactores anaerobios debido a que puede indicar si el sistema está funcionando adecuadamente. El coeficiente alfa relaciona la alcalinidad intermedia con la alcalinidad parcial del medio, así cuando el valor alfa es menor a 0.5, indica que el reactor tiene buen régimen y que la capacidad buffer del sistema es la adecuada. Se utilizó 25 ml de muestra previamente centrifugada a 5000 rpm durante 15 minutos. Esta muestra se tituló con H₂SO₄ 0.1N, hasta que se alcanzó un pH de 5.75, en ese momento se registró el gasto después, se continuó valorando hasta alcanzar un pH de 4.3 y se anotó el gasto final. Posteriormente se realizaron los cálculos para determinar la alcalinidad parcial, intermedia y total. Una vez obtenidos estos valores se determinó el factor alfa que es el cociente entre la alcalinidad intermedia y la alcalinidad parcial.

Lenores. Clesceri, Arnold E. Greenberg y Andrew D. Eaton. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20ª. Edition, 1998, E.U. Editorial APHA, AWWA y WEF

A 3. Determinación de Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) (Standard Methods 403)

La determinación de sólidos suspendidos es extremadamente valiosa en análisis de aguas contaminadas y de aguas residuales, es uno de los mejores parámetros usados para valorar y determinar la concertación de materia orgánica presente en las muestras. Esta prueba consiste en un procedimiento de combustión en el cual la materia orgánica se convierte en CO_2 Y H_2O . La temperatura se controla para prevenir la descomposición y volatilización de las sustancias inorgánicas. La pérdida de peso se interpreta en términos de materia orgánica. Se utilizaron 20 ml de muestra, la cual se colocó en un crisol con papel filtro (los cuales son previamente secados en la estufa a 100°C durante 1 hora y posteriormente pesados) y por último se filtro a vacío. En seguida se calcinó la muestra en la mufla a 550°C por 15 minutos y se peso.

Lenores. Clesceri, Arnold E. Greenberg y Andrew D. Eaton. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20^a. Edition, 1998, E.U. Editorial APHA, AWWA y WEF

A 4. Determinación de Sulfatos (Standard Methods 426 C)

El método turbidimétrico para determinación de sulfatos se basa en una técnica en donde el ión sulfato se precipita en un medio ácido que contenga BaCl_2 , formando de esta manera cristales de sulfato de bario de medida uniforme. La absorbancia de la suspensión de BaSO_4 puede ser medida por medio de un fotocolorímetro y la concentración del ión sulfato puede ser determinado interpolando en una curva de calibración con estándares de concentración conocida. Para llevar a cabo esta determinación, se preparó una solución acondicionadora que contenía 50 ml de glicerol, 30 ml de agua destilada, 100 ml de alcohol etílico al 95 % y 75 g de NaCl . Se utilizó 100 ml de muestra a la cual se le adicionó 5 ml de la solución acondicionadora y 0.5 g de BaCl_2 , posteriormente se agito durante 1 minuto. Después se colocó la muestra en un fotocolorímetro (Spectronic 20, Bausch & Lomb) a 420 nm y se anoto el valor de absorbancia detectado por este aparato.

Lenore S. Clesceri, Arnold E.Greenberg y Andrew D. Eaton. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20^a. Edition, 1998, E.U. Editorial APHA, AWWA y WEF

A 5. Determinación de Metano (Poggi-Varaldo et al, 1987)

Se utilizó un cromatógrafo de gases GOW-MAC serie 350 con las siguientes características: detector de conductividad térmica, integrador HP3395, con una columna Carbosphere 80/100, 6' x 1/8 "x/0.085" s. Se trabajó a una temperatura del detector de 200°C. Además se utilizó como gas acarreador al helio, con un flujo de 60 ml/minuto. Se obtuvo la curva de calibración a partir de un estándar con 50 % CO₂ y 50 % CH₄. El tamaño de la muestra utilizada fue de 1 ml.

Poggi -Varaldo H.M. Rinderknecht-Seijas N., and Caffarel-Mendez S. (1987) Irreversibilidad en el comportamiento adsorbtivo-desorbtivo de contaminantes en suelos y sedimentos: evaluación cuantitativa por medio de un coeficiente de histéresis diferencial. INTERCIENCIA 27(4):180-185.

A 6. Aislamiento de bacterias aerobias degradadoras (Standard Methods 907, Alef y Nannipieri, 1995)

Es importante poder conocer la existencia de bacterias degradadoras del 2,4-D en el medio, uno de los métodos tradicionales es el vaciado en placa que nos permite determinar la densidad de bacterias aerobias en la muestra analizada. Esta es una forma empírica de medición, puesto que el número de colonias determinadas por este método pueden ser sustancialmente mas bajo que el número real de bacterias viables presentes en la muestra. Sin embargo este método puede facilitar la colección de datos y dar un parámetro cualitativo de análisis. Para esto, se preparo el medio de cultivo aerobio utilizando 30 g de agar bacteriológico por litro de agua destilada, posteriormente, se esterilizo en autoclave a 15 lb/in² por 15 minutos. Las cajas de petri y pipetas utilizadas se esterilizaron en horno a 160 °C por dos horas, así mismo, los tubos de ensaye con agua destilada y frascos de dilución se esterilizaron en autoclave a 15 kg/cm² por 15 minutos. La siembra de bacterias aerobias degradadoras del 2,4-D se realizó en un acampana de esterilización, las diluciones se realizaron por duplicado para tener una mayor confiabilidad en los datos obtenidos. Antes de vaciar en las cajas de petri, se adicionó al medio de crecimiento el 2,4-D a una concentración de 60mg/L para el RI-A (concentración del 2,4-D en la alimentación) y de 85mg 2,4-D/L para el RSA-A (concentración inicial del contaminante en este reactor). Una vez realizados los pasos señalados

anteriormente, se incubaron las cajas Petri a 37° C durante una semana. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el conteo de colonias en las cajas Petri, posteriormente se llevo a cabo el cálculo de las unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de muestra.

Lenore S. Clesceri, Arnold E. Greenberg y Andrew D. Eaton. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20ª. Edition, 1998, E.U. Editorial APHA, AWWA y WEF

Alef K. y Nannipieri P. (1995) Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry Academic Press Inc. San Diego, CA. USA.

A 7. Aislamiento de bacterias sulfato-reductoras degradadoras (Alef y Nannipieri, 1995; Hungate, 1969)

Las bacterias sulfato-reductoras son organismos anaerobios obligados, que pueden ser encontrados en suelos y aguas en condiciones de anaerobiosis. Estos microorganismos son heterotróficos y pueden usar hexosas, alcoholes y ácidos orgánicos como fuentes de carbono, además de reducir el sulfato, sulfito o tiosulfato (como aceptores de electrones) a H₂S, como se indica a continuación:



Las bacterias sulfato reductoras pueden ser aisladas en un medio lactato-sulfato al que se añade hierro ferroso y un agente reductor como tioglicolato. El sulfuro que se forma a partir de la reducción de sulfato se combina con el hierro ferroso para formar sulfuro ferroso insoluble de color negro. Esta coloración no solo sirve como indicador de la reducción del sulfato, sino que el hierro reacciona y destoxifica el sulfuro, haciendo posible el crecimiento de productos celulares mayores. Es recomendable añadir una pequeña cantidad de un complemento orgánico al medio, como extracto de levadura, para proporcionar los factores de crecimiento requeridos. Para llevar a cabo el aislamiento de bacterias sulfato reductoras es necesario llevarlo a cabo en condiciones anaerobias, debido a que el oxígeno inhibe su crecimiento. Se puede sembrar en cajas

Petri, en donde las colonias de bacterias sulfato reductoras se identifican por la formación de un halo negro a su alrededor.

Para obtener un litro de medio de crecimiento sulfato-reductor, se realizó lo siguiente: en 930 ml de agua destilada se disolvieron 10 g de agar bacteriológico, 0.5 g de K_2HPO_4 , 1 g de NH_4Cl , 1g de $CaSO_4$, 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 5g de lactato de sodio (60% w/w). Posteriormente se agregaron: 50 ml de solución de sulfato de hierro amoniacal [$FeSO_4 (NH_4)_2 \cdot 6H_2O$ 1 % (w/vol)]. 10 ml de solución de extracto de levadura (10%) y 10 ml de solución de tioglicolato de sodio (10%). Una vez preparado este medio de cultivo se ajustó a un pH final entre 7.2-7.6 y se esterilizó en autoclave a 15 lb/in² por 15 minutos. Las cajas Petri y pipetas empleadas se esterilizaron en horno a 160°C por dos horas. Así mismo los tubos de ensaye con agua destilada y frascos de dilución se esterilizaron en autoclave a 15 lb/in² por 15 minutos. La siembra de las bacterias sulfato-reductoras se lleva a cabo en una cabina anaerobia y las diluciones se realizaron por duplicado para tener una mayor confiabilidad en los datos obtenidos.

Alef K. y Nannipieri P. (1995) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* Academic Press Inc. San Diego, CA. USA.

Hungate R.E. (1969) *Roll tube method for cultivation of strict anaerobes*.p.117_132.In J.R. Norris and D.W. Ribbons (Ed) *Methods in microbiology*, vol. 3B.academic Press. Inc., New York.

A 8. Hidrocarburos totales del petróleo por CG EPA 8015

Cromatógrafo: Varian 3800 equipado con un detector de ionización de flama y un automuestreador 8200

Extracción de hidrocarburos.

- a. Colocar 30 g de suelo en un matraz Erlenmeyer o matraz de bola con entrada esmerilada, adicionar 50 ml de diclorometano (DCM) o cloruro de metileno (CM) y calentar aprox. a 40 °C (el solvente puede ser grado cromatógrafo aunque el grado reactor funciona bien).
- b. Separar el suelo del solvente por filtración.

- c. Medir el volumen de solvente residual.
- d. Adicionar a la muestra sulfato-Na anhidro para eliminar la humedad de las muestras.

Análisis de HTP por CG.

1. Abrir los tanques de gases y regular la presión de salida hidrogeno 40 psi (flujo 10 ml/min.), nitrógeno 80 psi, aire 60 psi.
2. Abrir las válvulas de los gases en el panel frontal del cromatógrafo (girar los botones en sentido contrario a las manecillas del reloj).
3. Encender el cromatógrafo y el automuestrador.

4. Encender la computadora: en inicio programas varian Start 4.5 sistem control. Esperar a que se establezca la conexión entre el automuestrador 8200 y cromatógrafo 3800.
5. Abrir el programa de análisis. Entrar a cualquier modulo en menú principal file Method file open archivo: antraceno. Aparecen ventanas de automuestrador, método de análisis y status del equipo.
6. Abrir el programa de toma de muestra automática. En la ventana del automuestrador Method active OK.

7. Dejar calentar el cromatógrafo 30 min. y checar que la flama este encendida.
8. Inyección de muestra. Manual: inject single simple, name, Data file. Automática: Windows sample list dar nombre, numero de vial para inyectar, volumen de inyección y numero de inyecciones begin(OK) folder(OK)
9. Resultados: Entrar a graphics elegir el archivo add to list(OK) regresar a graphics abrir el cuadro correspondiente active (aparece grafica) dar escala y ver datos(view data file report).

10. Apagado

- a. Bajar la temperatura del detector e inyector a 50 °C, cuando la temperatura de ambos este en 100 °C cerrar los gases.
- b. Cuando la temperatura este en 50 °C apagar el cromatógrafo.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

- ✓ Blanco columna: no deben aparecer picos.
- ✓ Blanco solvente: solo debe aparecer el pico de DCM al principio (aprox. 8 min.).
- ✓ Corrida de muestras: al área total de la muestra restarle los picos de solvente básicamente el que se registra a 1.8 min.
- ✓ Cálculos: curva estándar proporciona los datos de concentración de antraceno en mg/L de solvente, entonces la concentración de antraceno como HTP esta dada por: $HTP \text{ (mg/Kg. suelo)} = (\text{mg antraceno/L DCM}) \text{ (DCM-extracción/Kg. suelo seco)}$.

OBSERVACIONES.

1. Al final de los cromatogramas suele observar una “inflexión” de la línea base que es debido a la presencia de agua en las muestras. El agua debe eliminarse adicionando sulfato de sodio anhidro a las muestras.
2. Si se requiere acelerar el enfriamiento de la columna, la puerta del horno de la columna se puede abrir cuando la temperatura sea de aproximadamente 60 °C, no a temperaturas mayores por que la columna se puede dañar.
3. Si no se dispone de equipo “split/splitless” se requeriría ocupar menor cantidad de muestra (1 µL) o extracción (1 g suelo/ 50 ml DCM).
4. La curva estándar se prepara con concentraciones de 1000 a 10 000 ppm; aunque se pueden leer concentraciones mayores incrementando el tiempo de purga.
5. Si al correr el solvente se registran muchos picos, entonces limpiar la columna con solvente hasta que el perfil sea el esperado. Otras posibles fuentes de contaminación es la jeringa, viales o el solvente mismo.

A9. Técnica para la determinación de la adsorción de HPA'S en el suelo modelo (Fall, 2000)

Es necesario conocer el comportamiento adsorptivo del contaminante en el suelo, para de esta manera determinar el uso o no de un agente tensoactivo.

Esta técnica se lleva a cabo en ensayos batch, con una relación agua-suelo determinada y conociendo la cantidad de contaminante utilizado en cada experimento. Los resultados obtenidos pueden ser manejados utilizando algún modelo que se ajuste a ellos, para de esta manera determinar las isotermas de adsorción y características del contaminante en cuestión.

1. MATERIALES Y EQUIPOS.

2.1 MATERIALES

- 14 botellas de 100 ml serológicas.
- 14 tapones de isobutilo.
- 7 pipetas de 25 ml.
- 1 pipeta de 1 ml.
- 10 matraces aforados de 250 ml.
- 1 matraz aforado de 500 ml.

EQUIPOS.

- Balanza analítica.
- Incubadora.
- Autoclave.

2. REACTIVOS

- Suelo.
- Ácido (diclorofenoxi) acético.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- Azida de sodio.
- CaCl_2
- Agua destilada estéril.

3. PROCEDIMIENTO

4.1 Preparación del suelo modelo.

A 300 g de suelo seco, tamizado previamente utilizando malla 35, agregar 11.7 de composta seca, previamente molida en licuadora y mezclar homogéneamente.

4.2 ESTERILIZACIÓN DEL SUELO

Esterilizar la muestra de suelo a 121 °C/15 lb durante 1 hora. Incubar a 35 °C durante 24 horas. Repetir esta operación tres veces.

4.3 Preparación de la solución buffer de fosfatos.

- Pesar 6.9 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y aforar a 250 ml.
- Pesar 17.91 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y aforar a 250 ml.
- Tomar 180 ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 70 ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ colocarlos en un matraz con agua destilada.

4.4 Preparación de la solución de CaCl_2 (0.01N)

Pesar 0.184 g de CaCl_2 y colocarlo en un matraz aforado de 250 ml, aforar con agua destilada.

4.5 Preparación de soluciones a diferentes concentraciones de antraceno.

Las soluciones de antraceno a distintas concentraciones se realizan pesando la cantidad del contaminante y de azida de sodio señalados en el cuadro de abajo, las cantidades respectivas de ambos reactivos se colocan en un matraz aforado de 250 ml, se le agrega la solución de fosfatos hasta alcanzar un pH neutro, posteriormente se afora con agua destilada hasta alcanzar la concentración deseada.

Concentración de antraceno (mg/L)	Concentración de azida de sodio (mg/L)	Cantidad de antraceno en 250 ml de solución (g)	Cantidad de azida de sodio en 250 ml de solución (g)
0	150	0	0.04
50	150	0.0125	0.04
100	150	0.0250	0.04
300	150	0.0750	0.04
600	150	0.1500	0.04
1000	150	0.2500	0.04

4.6 Ensayos de adsorción de antraceno en el suelo modelo.

Para cada nivel de concentración inicial de antraceno, colocar en una botella serológica estéril de 100 ml (por duplicado) lo siguiente:

5 g de suelo modelo estéril + 24.5 ml de la solución del contaminante + 0.5 ml de CaCl_2 .

Realizar los siguientes controles:

5 gramos de suelo modelo + 24.5 agua destilada con azida de sodio + 0.5 ml de CaCl_2 .

24.5 ml de la solución de 300 mg/L + 0.5 ml de CaCl_2

Colocar cada botella serológica en una incubadora a 60 rpm, en la oscuridad a 35 °C. Dejar incubar durante 4 días.

Al finalizar el periodo de contacto del suelo con la solución contaminante, decantar en cada una de las botellas el sobrenadante, cuidado de no arrastrar el suelo. Después de esto, centrifugar cada una de las soluciones a 5000 rpm por 10 min. Por último llevar a analizar por cromatografía de líquido cada una de las muestras.

4.6.1 Cálculos de la adsorción del contaminante en el suelo.

Medir por cromatografía de líquidos tanto la concentración inicial de cada una de las soluciones y la concentración de antraceno en el sobrenadante.

Calcular la cantidad total del contaminante absorbido en el suelo de la siguiente manera:

$$q = \frac{(C - C_1) * V}{S}$$

Donde:

q = concentración total del contaminante adsorbido por el suelo (mg antraceno/kg suelo).

C₁ = concentración inicial del antraceno (mg antraceno/L)

C = concentración residual del antraceno (mg antraceno/L)

S = suelo (kg suelo)

V = volumen de solución de antraceno utilizado en los ensayos (L)

Una vez obtenido el valor de q se escoge algún modelo que sea capaz de describir el comportamiento del hidrocarburo en el suelo y así obtener la isoterma de adsorción.

4.7 Ensayos de desorción del antraceno en el suelo modelo.

La botella serológica con suelo y con la solución de mayor concentración (1000 mg/L de antraceno), una vez decantada la solución, agregar:

49.5 ml de agua destilada estéril con azida de sodio (150 mg/L) + 0.5 ml CaCl₂.

Dejar incubar 4 días en la oscuridad a 60 rpm y a 35°C.

Al finalizar el periodo de contacto del suelo con la solución decantar el sobrenadante, cuidando de no arrastrar el suelo. Después de esto, centrifugar la solución a 5000 rpm por 10 min. Llevar a analizar por cromatografía de líquidos la muestra.

4.7.1 Cálculos de la desorción del contaminante en el suelo.

Teniendo la cantidad del contaminante adsorbido en el suelo (q) y conociendo la concentración del sobrenadante en el ensayo de desorción, calcular de la siguiente manera la concentración del contaminante desorbido del suelo:

$$q_d = q - \frac{C_d * V}{m} + \frac{C * V_1}{m}$$

Donde:

q_d = concentración del antraceno desorbido en el suelo (mg antraceno/kg de suelo)

q = concentración del antraceno adsorbido en el suelo (mg antraceno/kg de suelo)

V = volumen utilizado en el ensayo de desorción (L).

V_1 = volumen del licor intersticial (L).

m = cantidad de suelo utilizado (kg).

C_d = concentración del antraceno en el sobrenadante en el ensayo de desorción (mg antraceno/L).

C = concentración del antraceno en el sobrenadante en el ensayo de adsorción (mg antraceno/L).

Una vez obtenido q_d aplicar el modelo mas adecuado de desorción para obtener la isoterma de desorción mas adecuada para el comportamiento del contaminante en el suelo.

Fall C., Chaaki J., and Chavarie C. (2000). Desorptive Behaviour of Pentachlorophenol (PCP) and Phenanthrene in Soil-Water Systems. Water Environment Research. 72 (2). 162-169

A10. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios

1. PROPÓSITO

Proporcionar un procedimiento confiable que permita bajo las condiciones de la prueba determinar el contenido de microorganismos mesofílicos aerobios de diferentes tipos.

2. INFORMACIÓN GENERAL

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestras de prueba en un medio selectivo, acidificado a un pH de 7 ± 0.2 e incubado a una

una temperatura de 35°C, dando como resultado el crecimiento de colonias características de este tipo de microorganismos.

DEFINICIONES

MICROORGANISMOS MESOFILICOS AEROBIOS

El grupo esta conformado por una gran variedad de microorganismos que comparten el carácter de ser aerobios y la capacidad de proliferar entre los 20 y 37 °C, que son los extremos de las temperaturas a las cuales suele realizarse este recuento.

Agrupamiento de células en forma de masas visibles, sobre el agar de cultivo

3.1.3 UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC):

Termino que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o de un cúmulo de células.

4 PROCEDIMIENTO

4.1 REACTIVOS

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser de grado analítico y cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada.

4.1.1. MEDIO DE CULTIVO DE AGAR SOYA Y TRIPTICASEINA

- Para la preparación del medio de cultivo seguir las instrucciones del fabricante y después esterilizar, enfriar en baño a 50 °C.
- Esterilizar el medio a 121 °C por 15 minutos.

4.1.2. MEDIO DE CULTIVO DE AGAR PARA CUENTA ESTANDAR

- Para la preparación del medio de cultivo seguir las instrucciones del fabricante y después esterilizar, enfriar en baño a 50 °C.
- Esterilizar el medio a 121 °C por 15 minutos.

4.2 MATERIALES.

- Cajas de petri estériles de 15 x 100 mm.
- Pipetas bacteriológicas estériles de 1.0 ó 2.0 ml
- Frascos o matraces con 225 ml de diluyente estéril
- Frascos con agar papa dextrosa esterilizado y mantenido en baño de agua a $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$.

NOTA: Todo el material e instrumentos que entren en contacto con la muestra bajo estudio deberán esterilizarse, tal y como se describe en el procedimiento PEO 004-007 (limpieza y esterilización del material usado en el área de microbiología).

4.3 EQUIPO

- Balanza analítica
- Mechero
- Campana de flujo laminar
- Contador de colonias
- Potenciómetro
- Incubadora a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Autoclave u olla de presión con manómetro
- Baño de agua a $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

NOTA: Todo el equipo debe estar calificado y los instrumentos de medida calibrados.

4.4 MÉTODO

- La preparación de la muestra será de acuerdo a lo establecido en el procedimiento (Preparación y dilución de muestras para análisis microbiológico).

Con pipeta estéril depositar en una caja de Petri estéril 1.0 ml de la dilución principal (1:10) de la muestra (o de las diluciones que se hayan preparado).

- Utilizar una pipeta para cada dilución.
- Adicionar a cada caja entre 15 y 20 ml de Agar Papa Tripticaseina o

Agar para Cuenta Estándar, previamente esterilizado, fundido y mantenido en baño de agua a 45 °C. el tiempo que transcurra entre la inoculación de la muestra y la adición del medio de cultivo no debe ser mayor a 20 minutos.

- Mezclar la muestra con el medio de cultivo girando las placas hasta lograr una buena incorporación del producto con el medio de cultivo, correr una prueba en blanco utilizando una alícuota de diluyente en lugar de la muestra.
- Dejar solidificar e incubar a temperatura 35 ± 1 °C durante 48 horas; al abrigo de posible contaminación.
- Seleccionar aquellas placas que contengan entre 10 y 150 colonias y efectuar el recuento de las colonias desarrolladas en cada caja auxiliándose para ello del contador de colonias.
- Las cajas de la prueba blanco no deben presentar desarrollo de colonias, si esto ocurre procederá determinar el origen de la contaminación.
- Informar previo cálculo el número de U.F.C. por gramo o por mililitro de muestra indicando además el tipo de medio usado, la temperatura y el periodo de incubación.

4.5 RECOMENDACIONES

- Cuando el recuento de UFC sea menor de 10, por ejemplo: 4 colonias; informar 4 UFC en la dilución 1: 10 y no 40.
- Cuando el número de UFC en la última dilución sea muy elevada no es recomendable informar incontable "dado lo indefinido del termino, así por ejemplo: si contamos 80 UFC en los cuadros mayores del contador (aproximadamente 9 colonias en cada cuadro chico), equivalen aproximadamente a 5000 UFC en la placa por lo que se puede informar más de 5000 UFC por gramo o mililitro de muestra.
- En algunas ocasiones aparecen sobre las placas microorganismos que se extienden y dificultan o impiden el recuento, cuando esto ocurra informar "colonia extendida".

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 1988 5ª Ed. S.S. México, D.F.
The United Status Pharmacopoeia 22st. 1989.

Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

A11. Determinación de la demanda Química de Oxígeno (DQO) (Standard Methods 508)

El método de la demanda química de oxígeno determina la cantidad de oxígeno necesario para oxidar a la materia orgánica de un desecho, bajo condiciones específicas de un agente oxidante ($K_2Cr_2O_7$ 0.25N), en medio ácido y altas temperaturas, transformándola en bióxido de carbono y agua. Se prepararon tubos con 2.5 ml de muestra, 1.5 ml de solución oxidante, lentamente y con precaución se le adiciono 3.5 ml de H_2SO_4 concentrado. Se dejaron las muestras en reflujo por 2 horas a una temperatura entre 250 y 275 °C. Posteriormente, las muestras se dejaron enfriar y se titularon con sulfato ferroso amoniacal (0.05 N), utilizando como indicador la fenantrolina.

Determinación de la demanda química de oxígeno. Método del flujo cerrado.

1 Propósitos

Establecer el método para la determinación de la demanda química de oxígeno (DQO) en aguas naturales, potables y aguas residuales provenientes de la industria y de las actividades agroindustriales y del tratamiento de aguas residuales a los sistemas de drenaje y alcantarillado urbano o municipal.

2 Responsabilidades

- Es responsabilidad del supervisor y técnico del área de microbiología realizar correctamente ente procedimiento.
- El encargado del laboratorio deberá asegurarse de que los resultados obtenidos en esta determinación son confiables y únicamente del conocimiento del personal de laboratorio y del cliente.

3 Información general

3.1 fundamentos

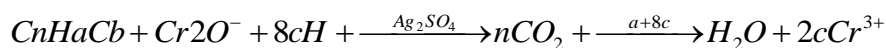
Muchos compuestos orgánicos e inorgánicos son oxidados por la mezcla en ebullición de dicromato de potasio y ácido sulfúrico.

La muestra es refluja en solución fuertemente ácida con un exceso conocido de dicromato de potasio. Después de la digestión el remanente no

reducido de dicromato de potasio es titulado con sulfato ferroso amoniacal para determinar la cantidad de dicromato consumido y la materia orgánica e inorgánica oxidable es calculada en términos de oxígeno equivalente.

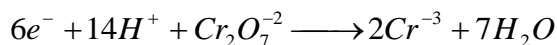
Esencialmente se lleva a cabo una oxidación completa (teórica) a CO_2 , H_2O , NH_4^+ , H_3PO_4 y SO_2 de muchos compuestos orgánicos en las condiciones de análisis.

La estequiometría de la reacción de oxidación de la materia orgánica en presencia del dicromato es como sigue:



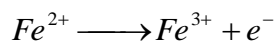
Donde:
$$c = \frac{2}{3}n + \frac{a}{6} - \frac{b}{3}$$

La oxidación se lleva a cabo a través de la reducción del dicromato (Cr^{+6}) a ion crómico (Cr^{+3}):



$$E_o = 133 \text{ volts}$$

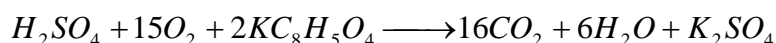
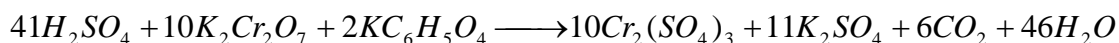
Después de la digestión de la materia orgánica con dicromato, es necesario determinar la concentración residual del dicromato. Para esto se utiliza un agente, en este caso el Fe^{+2} . La oxidación del Fe^{+2} se lleva a cabo de la siguiente forma:



El punto final de la titulación ferrosa del dicromato se determina colorimétricamente por medio del indicador ferroína. La ferroína contiene 1-10 fenantrolina que forma un complejo de color rojo con todos los iones ferrosos. En el punto final de la titulación después que se ha reducido todo el dicromato (naranja) a ion crómico (verde), los iones Fe^{+2} en exceso forman un complejo

con el indicador de ferroína y se observa un color pardo rojizo (5.6).

Un ejemplo de la reacción química que ocurre durante la oxidación de la materia orgánica e inorgánica por el dicromato de potasio y el oxígeno es ilustrado por la siguiente reacción con bifenato de potasio.



La cual significa que 10 moles de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) tienen un poder oxidante igual al de 15 moles de oxígeno (O_2). Así tenemos que estos 2 moles de bifenato de potasio consumen 15 moles de oxígeno. De tal forma que la DQO teórica del bifenato es:

$$DQO = 1.175(\text{g de } O_2/\text{g de } KC_8H_5O_4)$$

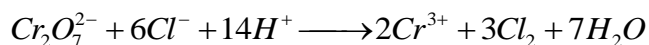
Interferencias

Este método es limitado por los reactivos empleados a DQO mayores de 800 mg/L. Muestras con altas concentraciones de DQO pueden ser procesadas por medio de diluciones. Sin embargo a concentraciones menores de 50 mg/L de DQO el procedimiento debe ser modificado para no perder precisión en las lecturas (5.1 y 5.5).

Este método no oxida uniformemente todos los materiales orgánicos, varios compuestos, tales como: compuestos alifáticos, hidrocarburos aromáticos y la piridina, son muy resistentes a la oxidación, mientras que otros, como los carbohidratos son fácilmente oxidables. La oxidación se facilita con la adición de sulfatos de plata, que actúa como catalizador de la reacción, sin embargo existen compuestos, como el benceno y la piridina, que aun bajo estas condiciones no son oxidados totalmente (5.1, 5.5 y 5.7).

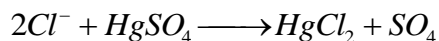
Los compuestos volátiles, tales como los aldehídos y cetonas son una dificultad en este método ya que estos se volatilizan antes de oxidarse completamente. Para evitar o disminuir esta interferencia hay que mantener la temperatura por debajo de los 40°C durante la adición de los reactivos y durante 15 minutos antes de iniciar el reflujo. Con esto se tiene una gran recuperación de la DQO teórica (5.1).

Cuando se utiliza sulfato de plata (Ag_2SO_4) como catalizador se precipita el ión cloruro (Cl^-) como $\text{AgCl}_{(s)}$ y este está sometido a una oxidación variable e impredecible. Cuando no se utiliza el sulfato de plata, el ión cloruro se oxida cuantitativamente a Cl_2 :



Nota: cada mg de Cl^- equivale a 0.226 mg/L de DQO.

La reacción del ión cloro puede ser parcialmente reducida por la adición de sulfato mercúrico a la muestra, ya que el sulfato mercúrico reacciona con el ión cloro para dar un complejo de cloruro mercúrico soluble en agua y resistente a la oxidación bajo las condiciones de la prueba (5.1 y 5.8).



Se recomienda utilizar 0.2 g de sulfato mercúrico para una muestra de 10 ml (para completar 20 mg de ión cloro en la muestra). Si se presenta una concentración mas alta del ión cloro se debe adicionar suficiente sulfato mercúrico para mantener una relación HgSO_4 : Cl^- de 10:1 (5.9). Si desarrolla un precipitado, este no afecta la determinación de la DQO. Se recomienda que el sulfato mercúrico se adicione a la solución estándar de dicromato de potasio, tomando en cuenta que por cada gramo de HgSO_4 se debe adicionar 5 ml de H_2SO_4 concentrado (5.3, 5.5 y 5.8).

El sulfato reacciona con los iones Cl^- , Br^- , I^- para producir precipitados que se oxidan solo parcialmente, bajo las condiciones de prueba.

En presencia de una alta concentración de amonio, de aminas orgánicas o de materia nitrogenada hay una reducción continua del dicromato por varias horas de digestión, sin sulfato de plata y parece que hay una serie de cambios cíclicos de cloro a cloruro a través de la formación del cloraminas (5.6).

Los iones oxidables, como el nitrito (NO_2^-), el hierro (Fe^{2+}) y los sulfitos (SO_3) son oxidados y cuantificados como constituyentes orgánicos.

Los nitritos (NO_2^-) presentes en la muestra causan interferencia en las lecturas ya que oxidan la forma reducida del indicador, cambiando de este modo el punto final de la titulación (1 mg de nitritos equivale a 1.14 mg de DQO) (5.5 y 5.8). Para eliminar esta interferencia tan significativa se adicionan a la muestra 10 mg de ácido sulfámico a la solución de dicromato de potasio para eliminar la interferencia de 3 mg/L de nitritos en una muestra de 10 ml (5.5).

4. PROCEDIMIENTO.

Material

- Estufa eléctrica, capaz de mantener 105°C y 15°C .
- Desecador con gel de sílice con indicador.
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 g.
- Parrilla eléctrica con agitación y calentamiento.
- Soporte universal.
- Material común de laboratorio.
- Agitadores magnéticos.

Reactivos.

Las soluciones que a continuación se describen presentan una preparación modificada con respecto a la NOM-AA-30-1981, debido a que en los métodos propuestos en este documento utilizan un tamaño de muestra menor (de 10 ml). Las soluciones se preparan de tal forma que no se pierde sensibilidad en la determinación, además, de inhibir las interferencias causadas por el ión cloro y los nitritos.

Sol. Estándar de dicromato de potasio 0.25 N.

En un matraz volumétrico de 1000 ml, disolver 12.259 g de dicromato de potasio (previamente secado a 103°C durante 2 h en 500 ml de agua), adicionar 40 g de sulfato mercúrico, 0.12 g de ácido sulfámico y 200 ml de ácido sulfúrico concentrado. Disolver lentamente y con agitación, enfriar a temperatura ambiente y diluir hasta 1000 ml.

Soln. Estándar de dicromato de potasio 0.025 N.

En un matraz volumétrico de 1000 ml, disolver 1.226 g de dicromato de potasio (previamente secado a 103°C durante 2 h en 500 ml de agua), adicionar 40 g

de sulfato mercurico, 0.12 g de ácido sulfámico y 200 ml de ácido sulfúrico concentrado. Disolver lentamente y con agitación, enfriar a temperatura ambiente y diluir hasta 1000 ml. Esta solución es necesaria solo cuando la DQO de la muestra es menor a 50 mg/L.

Soln. Estándar de sulfato ferroso amoniacal 0.05 N.

En un matraz aforado de 1000 ml, disolver con agitación continua 1.96 g de sulfato ferroso amoniacal (FAS) en 800 ml de agua, agregar 20 ml de ácido sulfúrico concentrado, enfriar la solución, aforar a 1000 ml y homogeneizar.

Soln. estándar de sulfato ferroso amoniacal 0.005 N.

En un matraz aforado de 1000 ml, disolver con agitación continua 1.96 g de sulfato ferroso amoniacal (FAS) en 800 ml de agua, agregar 20 ml de ácido sulfúrico concentrado, enfriar la solución, aforar a 1000 ml y homogeneizar. Esta solución es necesaria solo cuando la DQO de la muestra es menor a 50 mg/L.

Soln. de sulfato de plata en ácido sulfúrico.

En un matraz volumétrico de 1000 ml, disolver 15 g de sulfato de plata en 500 ml de ácido sulfúrico concentrado, dejar reposar de 1 a 2 días para que el sulfato de plata se disuelva y después diluir a 1000 ml.

Soln. indicadora de o-fenantrolina.

En un matraz aforado de 100 ml disolver con agitación continua 1.485 g de o-fenantrolina monohidratada y 0.7 g de sulfato ferroso en 50 ml de agua y aforar a 100 ml con agua.

Soln. de ácido sulfúrico al 20% (v/v).

En un matraz volumétrico de 1000 ml agregar 200 ml de ácido sulfúrico concentrado y diluir a 1000 ml con agua. Se debe tener cuidado en dejar resbalar el agua por las paredes del matraz.

Soln. de ácido nítrico al 20 % (v/v)

En un matraz volumétrico de 1000 ml agregar 200 ml de ácido nítrico concentrado y diluir a 1000 ml con agua. Se debe tener cuidado en dejar resbalar el agua por las paredes del matraz.

Soln. estándar de bifalato de potasio.

En un matraz volumétrico de 1000 ml disolver 0.851 g de bifalato de potasio en 500 ml de agua y diluir a 1000 ml con agua destilada. Esta solución equivale a tener 1 g de DQO/L.

Preparación del material.

Todo el material que se encuentre en contacto con la muestra debe de ser lavado con la solución de ácido nítrico al 20% y posteriormente con el ácido sulfúrico al 20% para evitar contaminaciones por materia orgánica contenida en los materiales.

Estandarización del FAS.

- a) Transferir a un matraz erlenmeyer 50 ml de agua destilada. Agregar 5 ml de la solución de dicromato de potasio 0.25 N y mezclar. Agregar lentamente 15 ml de ácido sulfúrico concentrado y mezclar mediante movimientos circulares.
- b) Titular el dicromato con el sulfato ferroso amoniacal (FAS), usando 3 gotas de la solución de o-fenantrolina como indicador y agitación magnética durante la titulación. El punto final de la
- c) titulación es cuando la coloración de la solución cambia de azul-verdoso a café-rojizo.

Método.

- a) En un matraz erlenmeyer de 250 ml con tapón rosca, adicionar 10 ml de muestra, 5 ml de solución de dicromato de potasio 0.25 N y 15 ml de la solución de sulfato de plata en ácido sulfúrico. Todos los reactivos se adicionan lentamente y cuidando que se resbalen por las paredes del matraz.
- b) Tapar perfectamente el matraz y agitar vigorosamente para homogenizar la solución.

- c) Colocar los matraces en la estufa a 150 °C para reflejar durante 2 horas. Transcurrido este tiempo enfriar los matraces a temperatura ambiente.
- d) Titular el exceso de dicromato de potasio con FAS, usando 2 o 3 gotas de la solución de o-fenatrolina como indicador y agitación magnética durante la titulación. El punto final de la titulación es cuando la coloración de la solución cambia de azul-verdoso a café-rojizo.
- e) Correr simultáneamente un blanco con agua destilada en vez de la muestra y todos los reactivos empleados en el procedimiento.
- f) Para niveles menores de 50 mg/L de DQO se procede como se indica en los pasos anteriores, pero haciendo uso de las soluciones de dicromato de potasio 0.025 N y sulfato ferroso amoniacal 0.005 N.

Precauciones

- a) Se debe tener extremo cuidado en el manejo del ácido sulfúrico, sobre todo al comienzo del reflujo ya que la reacción entre el ácido sulfúrico y el agua es muy exotérmica, lo cual puede provocar un sobrecalentamiento que proyecte la muestra fuera del matraz u ocasionar una explosión de la misma.
- b) El sulfato mercúrico, el sulfato de plata, el ácido sulfámico y el dicromato de potasio son muy irritantes, evitar el contacto y/o la inhalación del reactivo y sus soluciones.
- c) En caso de caer en los ojos, lávese la parte afectada con agua en abundancia por lo menos 15 minutos. Conseguir atención medica inmediatamente.
- d) El sulfato de plata requiere de un tiempo aproximado de 2 días para completar su disolución. La solución obtenida debe mantenerse en la oscuridad para evitar su descomposición.
- e) La mezcla de digestión debe de agitarse perfectamente antes de llevarla a calentamiento; de no ser así ocurren sobrecalentamientos locales que proyectan las mezclas fuera del condensador.

- f) Para algunas muestras el periodo de reflujos de 2 horas resulta excesiva o insuficiente, para reducirlo o aumentarlo es necesario experimentar con un mismo tipo de muestras en diferentes tiempos de digestión, a fin de establecer con precisión el tiempo necesario para los diferentes tipos de muestra.
- g) El volumen de la muestra que se utilice para niveles inferiores de 50 mg/L debe ser tal, que la cantidad de dicromato de potasio reducido durante la digestión no exceda del 50 % del volumen adicionado al inicio de la prueba, en caso contrario se debe repetir la determinación con un volumen menor de muestra.
- h) Si la cantidad de DQO calculada excede los 800 mg/L se debe diluir la muestra de tal manera que la DQO determinada sea de 50 a 800 mg/L.

Cálculos

La demanda química de oxígeno (DQO), expresada en mg/L, se calcula con la siguiente ecuación:

$$DQO = \frac{(V_1 - V_2) \times NF \times 8}{V_3} \times 1000$$

En donde:

DQO = Demanda Química de Oxígeno (mg/L)

V_1 = Volumen de FAS requerido para la titulación del blanco o testigo (ml).

V_2 = Volumen de FAS requerido para la titulación de la muestra (ml).

V_3 = Volumen de la muestra (ml).

NF = Normalidad del FAS (eq/L)

8 = Equivalente del oxígeno (g/eq)

Adrián A. Gutiérrez Gutiérrez Y Alfonso Bautista Villareal (1992). Optimización y Generalización de los Métodos de Análisis de Aguas Residuales. Reporte de Servicio Social. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Dpto. de Biotecnología.

Annual Book of ASTM Standard, Vol. 11.01. March 1984. Designation D 1252-83.

Bauman. Dicromate Reflux Chemical Oxygen Demand. A proposed method for chloride correction in highly saline wastes. Analytical Chemistry, Vol. 46, No. 9, August 1974.

Demanda Química de Oxígeno. In: Química del agua. Manual de laboratorio David Jenkis; Vernon L. Snoeyink; John F. Ferguson; James O. Leckie. Limusa; México, 1992. pp: 85-92.

Dobbs and T. Williams Elimination of Chloride Interference in the Chemical Oxygen Demand Test. Analytical Chemistry, Vol. 35, No. 8, July 1963.

Moore, Corner and Ruchhft. Dicromate Reflux Method for Determination of Oxygen Consumed, Analytical Chemistry, Vol. 21, No. 8, August 1949.

Norma Oficial Mexicana (NOM-AA-30-1981) Para la Determinación de la Demanda Química de Oxígeno. Dirección General De Normas.

Olguín, Patricia. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno. In: Manual de Técnicas de Análisis Para Aguas Residuales. Patricia Olguín Lora y

Oscar Monroy Hermosillo (copiladores). Editorial UAM-ORSTOM. México, 1992. pp: 20-23.

Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. (1989). Clesceri. Leonore S, Breenberg Arnold E., Trussell R. Rhodes. 17ª Edición. Editorial APHA-AWWA-WPCF.

A12. Técnica de determinación de cloruros. (Standard Methods 508)

1. MATERIALES Y EQUIPOS.

1.1 MATERIALES

- Matraces erlenmeyer
- Pipetas
- Bureta
- Balanza analítica con sensibilidad de 0.0001 g.
- Soporte universal.
- Material común de laboratorio.

1.2 REACTIVOS

- cromato de potasio (K_2CrO_4)
- $AgNO_3$ 0.1 N.

PROCEDIMIENTO

Tomar 10 ml de muestra y agregarle 40 ml de agua desionizada o destilada y se adiciona 1 ml de cromato de potasio (K_2CrO_4) como solución indicadora. Titular con $AgNO_3$ 0.1 N. y titular hasta el cambio de color. El blanco tiene 50 ml de agua destilada y un 1 ml de cromato de potasio.

Cálculos:

$$mgCl/L = \frac{(A - B) \times N \times 35.450}{ml\ de\ la\ muestra}$$

donde:

A = ml gastados en la titulación en la muestra.

B = ml gastados en la titulación en el blanco.

N = normalidad del $AgNO_3$.

Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. (1989). Clesceri. Leonore S, Breenberg Arnold E., Trussell R. Rhodes. 17ª Edición. Editorial APHA-AWWA-WPCF.

