

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

CBS



CASA ABIERTA AL TIEMPO

**BIODISPONIBILIDAD Y BIODEGRADACION DE
NAFTALENO EN SUELO**

TESIS

PRESENTADA POR

ING. MARTHA ELENA RAMIREZ ISLAS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

Director de Tesis:

DR. MARIANO GUTIERREZ ROJAS

Asesor:

DR. SERGIO REVAH MOISEEV

MEXICO, D. F.

1998

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mis padres por el apoyo y la confianza que tuvieron en mi.

A ti amor por estar conmigo en todos los momentos más especiales de mi vida.

A Marianito por su apoyo y buenos consejos durante toda la Maestría que ayudaron a mi formación profesional y a la terminación de este trabajo de tesis.

A Neto por su gran ayuda y buenos comentarios durante toda mi tesis.

Al Dr. Sergio Revah por sus asesorías y comentarios.

Agradezco al Ing. Alejandro Montes de Oca y al Q. Juan Antonio Zermeño por su ayuda y al Instituto Mexicano del Petróleo por la beca que me otorgó, ya que este trabajo forma parte del proyecto FIES-46F-48-VI.

Agradezco sinceramente a la Güera, a Luchi, a Romis y a Oscarín por sus buenos consejos y por su amistad. Y a todos los integrantes de la Planta Piloto por hacer mi estancia en el laboratorio muy agradable.

RESUMEN

El gran impacto que ha generado la contaminación del medio ambiente ha incrementado notablemente el estudio sobre las tecnologías de biorremediación, existen en todo el mundo muchos lugares contaminados con residuos peligrosos. Los hidrocarburos poliaromáticos (HPA) son de gran interés ya que algunos son recalcitrantes y pueden ser tóxicos y potencialmente mutagénicos y cancerígenos. Un factor que limita la degradación de los HPA en el suelo es su baja biodisponibilidad, ya que son fuertemente sorbidos por la materia orgánica. Existen diferentes mecanismos para aumentar la biodisponibilidad y biodegradación de estos compuestos, dentro de los cuales se encuentran el uso de surfactantes y de solventes orgánicos. En este trabajo se determinó el efecto de la adición de Tritón X-100 como surfactante y tolueno como solvente en la biodisponibilidad y biodegradación de naftaleno en un suelo contaminado artificialmente. Para el suelo utilizado se obtuvo una máxima concentración de naftaleno sorbido de 0.3 mg de naftaleno/g de suelo seco. Los microorganismos de este suelo presentaron una buena capacidad para degradar compuestos de fácil asimilación como glucosa y glicerol, pero una baja capacidad para degradar naftaleno, por lo que fueron aislados microorganismos degradadores de naftaleno de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, estos microorganismos fueron utilizados como inóculo en los experimentos de biodegradación. La adición de Tritón X-100 a una concentración de 20 veces la concentración crítica micelar (CMC) aumentó significativamente hasta un 38% la desorción abiótica de naftaleno en el suelo, mientras que a concentraciones de 10 y 0.5 CMC no se presentó ningún efecto positivo. El fenómeno de desorción fue el proceso que limitó la biodisponibilidad y la biodegradación del naftaleno en el suelo. Los experimentos de biodegradación se realizaron bajo tres condiciones: en medio líquido (sin suelo), con suelo en suspensión en una relación suelo:agua de 1:8, con suelo con 24 h y 4 meses de contaminado. La presencia de Tritón X-100 a concentraciones igual o por debajo de 20 CMC no aumentó significativamente la biodisponibilidad ni la degradación de naftaleno en el suelo. A concentraciones mayores de 15 CMC se presentó un retardo en la degradación de naftaleno, ya que el surfactante fue utilizado como fuente preferencial de carbono por el consorcio microbiano. La adición de tolueno a concentraciones igual o menores de 60 ppm aumentó la biodisponibilidad y la biodegradación de naftaleno sorbido en el suelo, a concentraciones mayores no se presentó ningún efecto positivo. Mientras que en medio líquido (sin suelo) la presencia de tolueno disminuyó la biodegradación de naftaleno.

20/10/2001

ÍNDICE

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Biorremediación	1
1.1.1. Tecnologías	2
1.1.2. Características del suelo	4
1.1.3. Características de los contaminantes	6
1.2. Hidrocarburos del petróleo	8
1.2.1. Composición del petróleo	9
1.2.2. Distribución en suelos intemperizados	10
1.3. Hidrocarburos poliaromáticos	11
1.3.1. Composición y propiedades	11
1.3.2. Biodegradación	13
1.4. Biodisponibilidad	16
1.4.1. Actividad microbiana	17
1.4.2. Mecanismos de transferencia de masa	18
1.5. Alternativas para aumentar la biodisponibilidad	20
1.5.1. Surfactantes	20
1.5.2. Solventes orgánicos	26

2. OBJETIVOS

2.1. General	27
2.2. Específicos	27

3. METODOLOGÍA

3.1. Reactivos	28
3.2. Medios de cultivo	28
3.3. Caracterización del suelo	29
3.3.1. Muestreo	29
3.3.2. Análisis fisicoquímico	31
3.4. Aislamiento de microorganismos	32
3.4.1. Método de dilución en placa	32
3.4.2. Método de enriquecimiento	33
3.4.3. Inóculo	34
3.5. Estudios de disolución, sorción y desorción	34
3.5.1. Cinética de disolución	34
3.5.2. Cinética de sorción	35
3.5.3. Isoterma de sorción	35
3.5.4. Cinética de desorción	35
3.6. Cinéticas de biodegradación	36
3.6.1. Cinéticas de producción de CO ₂ con suelo insaturado.....	36
3.6.2. Cinéticas de producción de CO ₂ con suelo en suspensión	37
3.6.3. Cinéticas de producción de CO ₂ en medio líquido	38

3.7. Técnicas analíticas	39
3.7.1. Respirometría	39
3.7.2. Espectrofotometría	41
3.7.3. HPLC	41
3.7.4. Extracción por Soxhlet	41
3.7.5. Humedad	42
3.7.6. Actividad de agua	42
3.7.7. pH	42
3.7.8. Valoración de soluciones	42
3.8 Cálculos	43
3.8.1. Valores de CO ₂ graficado	43
3.8.2. Porcentajes de mineralización	43
3.8.3. Velocidades de producción de CO ₂	44
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Estudios de disolución, sorción y desorción	45
4.1.1. Parámetros teóricos	45
4.1.2. Cinética de disolución	46
4.1.3. Cinética de sorción	48
4.1.4. Isoterma de sorción	49
4.1.5. Cinética de desorción	51
4.2. Capacidad degradativa del suelo	54
4.3. Aislamiento de microorganismos	58
4.3.1. Método de dilución en placa	58
4.3.2. Método de enriquecimiento	58
4.4. Efecto de Tritón X-100 en la degradación de naftaleno	65
4.4.1. Cinéticas en medio líquido	65
4.4.2. Cinéticas con suelo con 24 h de contaminado	68
4.4.3. Cinéticas con suelo con 4 meses de contaminado	72
4.5. Efecto de tolueno en la degradación de naftaleno	78
4.5.1. Cinéticas en medio líquido	78
4.5.2. Cinéticas con suelo con 24 h de contaminado	81
4.5.3. Cinéticas con suelo con 4 meses de contaminado	84
5. CONCLUSIONES.	90
6. SUGERENCIAS	91
7. BIBLIOGRAFÍA	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Ventajas y desventajas de la biorremediación	2
Tabla 1.2. Composición volumétrica del suelo	4
Tabla 1.3. Propiedades fisicoquímicas que definen un tipo de suelo	6
Tabla 1.4. Residuos peligrosos mas frecuentes en suelos contaminados	7
Tabla 1.5. Composición promedio de la fracción aromática de los aceites crudos	9
Tabla 1.6. Propiedades físicas de los hidrocarburos poliaromáticos	13
Tabla 1.7. Clasificación y características de los surfactantes	21
Tabla 1.8. Revisión del efecto de surfactantes en la biodegradación de compuestos hidrofóbicos en diferentes condiciones de cultivo	22
Tabla 3.1. Composición del medio mineral utilizado en este trabajo	28
Tabla 3.2. Composición del medio mínimo utilizado en este trabajo	29
Tabla 3.3. Propiedades fisicoquímicas de un suelo contaminado con petróleo y un suelo no contaminado, muestreados en Cactus en el Estado de Chiapas	31
Tabla 3.4. Composición de hidrocarburos presentes en el suelo contaminado proveniente de Cactus, Chiapas	32
Tabla 4.1. Parámetros fisicoquímicos de naftaleno y Tritón X-100	45
Tabla 4.2. Velocidades de producción de CO ₂ (mmol CO ₂ /día) debido a la degradación de naftaleno en medio líquido, suelo con 24 h y 4 meses de contaminado en presencia y ausencia de Tritón X-100	74
Tabla 4.3. Velocidades de producción de CO ₂ (mmol CO ₂ /día) por la degradación de naftaleno en medio líquido, suelo con 24 h y 4 meses de contaminado en presencia y ausencia de tolueno	86
Tabla 4.4. Velocidades de producción de CO ₂ (mmol CO ₂ /día) por la degradación de tolueno en medio líquido, suelo con 24 h y 4 meses de contaminado	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	Estructuras químicas de hidrocarburos aromáticos y poliaromáticos	12
Figura 1.2.	Vía de degradación de naftaleno	14
Figura 1.3.	Esquema de disponibilidad en un proceso abiótico de un compuesto orgánico hidrofóbico (COH) y un surfactante no-iónico en un suelo con un contenido moderado de materia orgánica	25
Figura 3.1.	Fórmula estructural de Tritón X-100	28
Figura 3.2.	Mapa de localización del lugar de muestreo del suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo	30
Figura 3.3.	Esquema de un respirómetro para determinar la producción de CO ₂ por volumetría	39
Figura 4.1.	Cinética de disolución de naftaleno en agua en la presencia de Tritón X-100 a una concentración de 10 y 20 veces la concentración crítica micelar (CMC) comparada con el control (sin surfactante)	47
Figura 4.2.	Cinética de sorción de naftaleno en el suelo no contaminado estéril	48
Figura 4.3.	Isoterma de sorción de naftaleno en el suelo no contaminado con un contenido de materia orgánica del 3.64%	50
Figura 4.4.	Efecto de la adición de Tritón X-100 a diferentes concentraciones en la desorción de naftaleno del suelo contaminado artificialmente durante 24 h	52
Figura 4.5.	Cinética de producción de CO ₂ proveniente de la degradación de la materia orgánica del suelo correspondiente a los controles empleados.....	54
Figura 4.6.	Cinética de producción de CO ₂ del suelo no contaminado suplementado con diferentes fuentes de carbono, durante 30 días de cultivo a 30°C	56
Figura 4.7.	Bacterias degradadoras de naftaleno aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo por el método de dilución en placa	61
Figura 4.8.	Hongos degradadores de naftaleno aislados de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo por el método de dilución en placa	62

Figura 4.9.	Microorganismos degradadores de naftaleno aislados de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo por el método de enriquecimiento a pH 7	63
Figura 4.10.	Microorganismos degradadores de naftaleno aislados de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo por el método de enriquecimiento a pH 5.5	64
Figura 4.11.	Cinética de producción de CO ₂ a partir de la degradación de Tritón X-100 a una concentración de 20 CMC en medio líquido	66
Figura 4.12.	Cinética de producción de CO ₂ por la degradación de naftaleno en medio líquido en la ausencia y presencia de Tritón X-100 a una concentración de 20 CMC	67
Figura 4.13.	Cinética de producción de CO ₂ a partir de la degradación de Tritón X-100 a una concentración de 0.5 y 20 CMC, en la presencia de suelo no contaminado en suspensión	69
Figura 4.14.	Cinética de producción de CO ₂ a partir de la degradación de naftaleno sorbido en suelo en la ausencia y presencia de Tritón X-100 a una concentración de 0.5 y 20 CMC. Las cinéticas fueron realizadas con suelo en suspensión con 24 h de contaminado	70
Figura 4.15.	Cinética de producción de CO ₂ a partir de la degradación de naftaleno sorbido al suelo en la ausencia y presencia de Tritón X-100 a una concentración de 5 y 15 CMC. Las cinéticas fueron realizadas con suelo en suspensión con 4 meses de contaminado	73
Figura 4.16.	Fenómenos que intervienen en el proceso de biodegradación de naftaleno sorbido en suelo. Velocidades (mg naftaleno/día) en la presencia y ausencia de Tritón X-100 a una concentración de 20 CMC ..	75
Figura 4.17.	Cinética de producción de CO ₂ a partir de la degradación de tolueno a una concentración de 60 y 90 ppm en medio líquido	78
Figura 4.18.	Cinética de producción de CO ₂ a partir de la degradación de naftaleno en medio líquido en ausencia y presencia de tolueno, a una concentración de 60 y 90 ppm	79
Figura 4.19.	Cinética de producción de CO ₂ a partir de la degradación de tolueno a una concentración de 60 ppm, en la presencia de suelo no contaminado en suspensión	80

Figura 4.20. Cinética de producción de CO ₂ a partir de la degradación de naftaleno sorbido al suelo en la ausencia y presencia de tolueno a una concentración de 60 ppm. Las cinéticas fueron realizadas con suelo en suspensión con 24 h de contaminado.....	82
Figura 4.21. Cinética de producción de CO ₂ a partir de la degradación de tolueno a una concentración de 30, 60 y 90 ppm, en la presencia de suelo no contaminado en suspensión	83
Figura 4.22. Cinética de producción de CO ₂ a partir de la degradación de naftaleno sorbido al suelo en la ausencia y presencia de tolueno a una concentración de 30, 60 y 90 ppm. Las cinéticas fueron realizadas con suelo en suspensión con 4 meses de contaminado	84

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. BIORREMEDIACIÓN

En los últimos años los estudios sobre biorremediación han aumentado considerablemente ya que existen en todo el mundo suelos y acuíferos contaminados. Desde 1980 la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (USEPA) ha identificado 31,000 sitios contaminados abandonados, mas aquellos miles de sitios industriales que no se tienen registrados (19,000) (Cookson, 1995). Estos suelos contaminados generan problemas de tipo ecológico, social y económico, ya que el suelo es para el ser humano el medio natural donde se realizan todas sus actividades. Desde el punto de vista económico, es un recurso productivo y en lo social es el soporte y ámbito de las interrelaciones humanas (INEGI, 1994).

La degradación de contaminantes en suelos, sedimentos y acuíferos frecuentemente es muy lenta, generalmente se necesitan años para que los contaminantes sean degradados por los microorganismos nativos. Desde la década pasada, la biorremediación ha pasado de ser una tecnología desconocida a una de las mejores tecnologías consideradas para el control de la contaminación ambiental.

La biorremediación se define como la aplicación de tratamientos biológicos para la limpieza de sitios contaminados con residuos peligrosos (Cookson, 1995).

La ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en el artículo 3ro, define como residuos peligrosos a todos aquellos residuos en cualquier estado físico que por sus características corrosivas, tóxicas, venenosas, reactivas, explosivas, inflamables, biológicas infecciosas o irritantes representen un peligro para el equilibrio ecológico o al ambiente.

Dentro de la biorremediación existen diferentes tipos de tecnologías que pueden utilizarse para tratar los suelos contaminados. En la Tabla 1.1 se presentan algunas ventajas y desventajas que deberían considerarse cuando se selecciona una tecnología, una de las principales ventajas es que estos sistemas son menos costosos comparados con otras tecnologías como la incineración.

Tabla 1.1. Ventajas y desventajas de la biorremediación

<p>VENTAJAS</p> <ul style="list-style-type: none">-Se pueden llevar a cabo en el mismo sitio contaminado-Los sistemas biológicos son menos costosos-Aceptación pública positiva-Destrucción mínima del sitio remediado-En algunos casos se pueden eliminar los costos de transporte-Se puede acoplar con otras técnicas de tratamiento
<p>DESVENTAJAS</p> <ul style="list-style-type: none">-Algunos compuestos químicos no se pueden biodegradar-Pueden generarse subproductos mas tóxicos-Se requieren mayores tiempos de proceso

Fuente: Cookson, 1995

1.1.1. TECNOLOGÍAS

Las tecnologías de biorremediación pueden clasificarse como *in-situ* o *ex-situ*. Las técnicas *in-situ* incluyen el tratamiento de los contaminantes en el lugar, elimina la necesidad de excavaciones y transportación que generan costos elevados. En el caso de tecnologías *ex-situ* el suelo es removido antes de ser tratado (Cacciatore y McNeil, 1995).

Las siguientes tecnologías son las mas comúnmente utilizadas en biorremediación (Cookson, 1995; Baker y Herson, 1994; Saval, 1995):

Tecnologías *ex-situ*

Biofiltros

Uso de columnas con microorganismos para emisiones gaseosas.

Biorreactores

Biodegradación de residuos contaminantes en un reactor ya sea en fase sólida o semi-sólida.

Composteo

Proceso termofílico aerobio o anaerobio en el cual el material contaminado es mezclado con un agente de volumen; se puede llevar a cabo en biopilas con o sin aireación o en reactores.

Tecnologías *in-situ*

Bioaumentación

Adición de microorganismos exógenos al sitio contaminado cuando la población nativa carece de capacidad degradadora. Frecuentemente se utilizan biorreactores.

Bioestimulación

Estimulación de la población microbiana nativa del suelo y/o mantos freáticos contaminados, mediante la adición de nutrientes u otros agentes que puedan facilitar la degradación del contaminante.

Bioventeo

Este proceso se utiliza tanto en la zona superficial del suelo como en la zona saturada. Se realiza inyectando aire a través del suelo para estimular el crecimiento y la actividad microbiana. Aumenta la remoción de compuestos orgánicos volátiles por volatilización. Es aplicable a contaminantes que son degradados mediante metabolismo aerobio y con presiones de vapor menores de 1 atm.

Labranza (Landfarming)

Este proceso consiste en la degradación del material contaminado con tratamientos *in-situ* en la superficie del suelo. Los suelos son labrados para aumentar su aireación, irrigados para optimizar los niveles de humedad y si es necesario suplementados con nutrientes inorgánicos, la degradación del material orgánico es el resultado de la actividad microbiana de los microorganismos nativos. También se lleva a cabo con tratamientos *ex-situ* construyendo celdas de biotratamientos las cuales se controlan para prevenir la migración del material contaminante a los suelos circundantes.

A pesar de la gran diversidad de tecnologías de biorremediación disponibles no es fácil decidir cuales son las opciones mas adecuadas. Esto es debido a que cada sitio constituye una problemática muy particular, por lo que para seleccionar la mejor técnica, es importante conocer las características fisicoquímicas y biológicas del suelo, las características del contaminante y la interacción entre ellos (Saval, 1995).

1.1.2. CARACTERÍSTICAS DEL SUELO

Suelo es un termino que se emplea para describir un recurso natural que reside en la superficie terrestre constituida por diferentes fases (Baker y Herson, 1994).

El suelo es un sistema complejo heterogéneo que consta de cuatro fases: fase gaseosa, fase liquida, sólidos inorgánicos y sólidos orgánicos. En la Tabla 1.2 se observa que las fases acuosa y gaseosa comprenden alrededor del 50% del volumen total del suelo, el 50% restante es fase sólida de la cual la materia inorgánica se encuentra en mayor porcentaje que la materia orgánica o humus (Cacciatore y McNeil, 1995).

Tabla 1.2. Composición volumétrica del suelo

Fases del Suelo	%
Gas	15 -35
Acuosa	15 -35
Sólida	38 -55
Inorgánica	38 -45
Orgánica	5 -12

Fuente: Cacciatore y McNeil, 1995

Un contaminante orgánico se distribuye entre las cuatro fases del suelo dependiendo de su solubilidad, volatilidad y fuerza iónica. Por lo que la interacción del contaminante con las fases del suelo pueden hacer a un compuesto orgánico mas o menos susceptible al tratamiento biológico.

La clasificación del suelo por su textura esta basada en el tamaño y forma de las partículas. Un esquema de clasificación comúnmente usado es el del Departamento de Agricultura de USA. El tamaño relativo de las partículas se expresa con el término textura, este se refiere a la finura del suelo que depende de la proporción relativa de arena, limo y arcilla. Las partículas de arena tienen un tamaño de 0.05 a 2 mm, las partículas de limo son de 0.002 a 0.05 mm y las de arcilla se encuentran en un rango menor de 0.002 mm. Los suelos con mayor capacidad de retención de agua son los suelos arcillosos, los suelos limosos tienen gran capacidad para retener agua disponible y los suelos arenosos facilitan el movimiento del aire y del agua libre (Baker y Herson, 1994; Foth, 1985).

En la mayoría de los suelos las partículas no existen como entidades individuales sino que están agrupadas en agregados de formas y tamaños característicos, a esto se le conoce como estructura del suelo. La estructura del suelo determina la aireación, disponibilidad de nutrientes, la acción de los microorganismos y la permeabilidad y por lo tanto la capacidad de infiltración y de movimiento del agua (Foth, 1985; FitzPatrick; 1985).

En el suelo el agua esta relacionada de tres formas: libre (gravitacional), capilar y ligada (higroscópica). El agua libre se refiere al agua que se mueve a través de los macroporos en el suelo o rocas (matriz) por fuerzas gravitacionales, fluye a través de la zona insaturada hacia el manto freático y una vez que alcanza la zona saturada esta se puede mover mucho mas rápido y libremente. El agua capilar es el agua que se encuentra en los microporos, la cual depende de la textura del suelo, esta agua determina la capacidad de campo del suelo. El agua ligada es el agua que está enlazada a la matriz del suelo por puentes de hidrógeno o interacciones dipolo y no está disponible biológicamente (Baker y Herson, 1994).

En el suelo se pueden distinguir principalmente dos zonas. La zona insaturada es aquella donde el suelo tiene una humedad menor o igual a su capacidad de campo. Mientras que en la zona saturada el suelo esta por arriba de su capacidad de campo y hay una gran cantidad de agua libre.

Las propiedades del suelo pueden variar ampliamente de una región a otra, también pueden variar en la misma región con la profundidad. En la Tabla 1.3 se presentan algunas propiedades fisicoquímicas que definen el tipo de suelo según Baker y Herson (1994).

Tabla 1.3. Propiedades fisicoquímicas que definen un tipo de suelo.

-Capacidad de intercambio catiónico
-Textura.
-Gradación
-Permeabilidad intrínseca
-Contenido de materia orgánica
-Tamaño de partícula
-pH
-Porosidad

Además de estas propiedades existen otros factores que pueden limitar la velocidad de biodegradación en el suelo, los más frecuentes son la humedad y temperatura del suelo; la concentración y disponibilidad de oxígeno y nutrientes; los tipos, concentraciones y biodisponibilidad de sustratos de carbono y la capacidad degradadora de los microorganismos (Baker y Herson, 1994). Una de las características más sobresalientes es el contenido de materia orgánica, ya que es directamente la responsable de la sorción de los contaminantes en el suelo, así también como la textura por el contenido de arcillas.

El cambio de alguna de estas propiedades puede influir en la interacción del contaminante con el suelo y alterar su disponibilidad y degradación por los microorganismos nativos

1.1.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS CONTAMINANTES

La remediación de suelos contaminados requiere una completa caracterización y evaluación del contaminante, su movilidad y el mecanismo potencial de remoción.

Cuando un compuesto entra a la matriz del suelo se puede dar una gran variedad de transformaciones bióticas y abióticas en el compuesto. El contaminante puede distribuirse como un gas en la fase gaseosa y liberarse a la atmósfera (volatilización), estar disuelto en la fase acuosa y lixiviarse, podría estar asociado con las partículas del suelo (sorción) o estar en la forma de un producto libre, dependiendo de sus características y de la interacción suelo-agua-gas (Cookson, 1995).

Para evaluar el potencial de degradación de un contaminante es necesario conocer su reactividad, toxicidad, concentración y distribución en el suelo. Aunque la sorción de un contaminante al suelo reduce su disponibilidad para la degradación, también reduce su toxicidad.

Tabla 1.4. Residuos peligrosos mas frecuentes en suelos contaminados.

<p>1. Hidrocarburos de petróleo</p> <ul style="list-style-type: none">Compuestos BTEX<ul style="list-style-type: none">BencenoToluenoEtilbencenoXilenoCompuestos poliaromáticosCompuestos aromáticos heterocíclicos
<p>2. Compuestos alifáticos halogenados</p> <ul style="list-style-type: none">Tricloroetileno1,1,1-TricloroetanoTetracloroetilenocis-trans-1,2-Dicloroetileno1,1-Dicloroetano
<p>3. Residuos industriales y de preservación de la madera</p> <ul style="list-style-type: none">CreosotaCompuestos poliaromáticosPentaclorofenolAromáticos heterocíclicos nitrogenadosAromáticos

Fuente: Cookson, 1995

La contaminación del suelo y subsuelo se debe en gran parte a derrames de combustibles y a derrames de compuestos almacenados en tanques subterráneos (gasolina). Gran número de contaminantes químicos han sido eliminados por técnicas de biorremediación. Cookson (1995) clasifica en tres grupos a los residuos peligrosos que se encuentran con mas frecuencia en los suelos contaminados: hidrocarburos del petróleo, compuestos halogenados y residuos industriales y de preservación de la madera (ver Tabla 1.4). Las especies particulares encontradas de cada grupo se muestran en la Tabla 1.4. Muchos de estos compuestos contaminantes pueden ser resistentes a la biodegradación y presentar graves problemas para el ambiente.

Uno de los principales contaminantes encontrados son los hidrocarburos derivados del petróleo por lo que este trabajo tiene un especial interés sobre estos compuestos los cuales son detallados en el siguiente capítulo.

1.2. HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO

Existen en el mundo muchos lugares contaminados por derrames accidentales de petróleo, uno de los mas sobresalientes por su impacto ecológico fue el accidente del “Exxon Valdez” en las costas de Alaska, también la mayoría de los suelos circundantes de las Bases de la Fuerza Aérea de los USA se encuentran contaminados como resultado de los derrames de tanques subterráneos (Fordham, 1995). En nuestro país, que es uno de los principales países productores de petróleo también existen grandes problemas de contaminación generados por el derrame de estos productos.

Recientemente en el Estado de Tabasco, uno de los Estados de México mas importante en la industria petroquímica, se han generado fuertes problemas políticos socioeconómicos, resultado de los altos índices de contaminación en este lugar. En los últimos años se han registrado numerosos accidentes como resultado de la peligrosidad de la industria petrolera en este Estado (Delgado y col., 1996).

Por todos estos problemas generados en nuestro país y en todo el mundo es importante poner una solución inmediata, por lo que es necesario aumentar los estudios e investigaciones relacionados con los derrames de este producto en el medio ambiente.

1.2.1. COMPOSICIÓN DEL PETRÓLEO

La industria petrolera genera mezclas de hidrocarburos con una gran variedad de características químicas. Los combustibles del petróleo pueden contener miles de hidrocarburos en diferentes proporciones. La proporción y composición varían de acuerdo a su origen, almacenamiento, refinación y su alteración por las condiciones ambientales.

Los compuestos que se obtienen al fraccionar el petróleo crudo pueden clasificarse en tres principales compuestos de acuerdo a su solubilidad en solventes orgánicos: hidrocarburos saturados, hidrocarburos aromáticos, resinas y asfaltenos (Tissot y Welte, 1982).

Los **Hidrocarburos Saturados** están compuestos por alcanos normales, alcanos ramificados (parafinas), y cicloalcanos (naftenos). Son los compuestos predominantes (40-60%) de la fracción pesada del petróleo.

Los **Hidrocarburos Aromáticos** incluyen los aromáticos simples, los hidrocarburos poliaromáticos (HPA), naftenoaromáticos, y normalmente los compuestos cíclicos de azufre, en total representan del 20 al 45% del total de los hidrocarburos.

La distribución de la fracción aromática y naftenoaromática de acuerdo con el número de ciclos aromáticos en toda la molécula se puede observar en la Tabla 1.5. Los mono y diaromáticos son especialmente abundantes comparados con los poliaromáticos en los aceites crudos.

Tabla 1.5. Composición promedio de la fracción aromática de los aceites crudos.

Compuestos	%*
Monoaromáticos	33.0
Diaromáticos	23.4
Triaromáticos	12.9
Tetra y Poliaromáticos	7.3
Total de Aromáticos + Naftenoaromáticos	76.6
Derivados de Tiofeno	23.4
Total	100

* (% en peso del total de la fracción aromática, con punto de ebullición mayor de 210°C).

Fuente: Tissot y Welte, 1982

Las **Resinas y Asfaltenos**, formados por la fracción policíclica, de alto peso molecular de los crudos en los que se incluyen átomos de N, S y O constituyen los extremos pesados del petróleo y deben considerarse como los miembros extremos naturales de alto peso molecular de las series aromáticas y naftenoaromáticas. Representan del 10 al 30% de los hidrocarburos.

1.2.2. DISTRIBUCIÓN EN SUELOS INTEMPERIZADOS

Un suelo contaminado por derrames de petróleo cambia en composición con el tiempo, dependiendo de varios factores como volatilidad, solubilidad y reacciones bióticas y abióticas de los contaminantes. Dependiendo de los factores ambientales y de la resistencia de los contaminantes al ataque microbiano, con el paso del tiempo muchos compuestos permanecen en mayor o menor proporción en el suelo, por lo que se les conoce como suelos intemperizados.

Inicialmente los compuestos mas solubles son lixiviados pasando a los mantos freáticos, también se pierden aquellos compuestos que presentan volatilidad. Con el tiempo los n-alcenos son generalmente los compuestos degradados mas rápidamente de todos los compuestos del petróleo. En algunos estudios se ha observado que la secuencia de susceptibilidad a la biodegradación entre clases de hidrocarburos es n-alcenos > alcenos ramificados > alquenos ramificados > compuestos cíclicos de bajo peso molecular > monoaromáticos > poliaromáticos >> asfaltenos (Pollard y col., 1994; Sugiura y col., 1997), por lo que los últimos compuestos son los mas persistentes en el suelo.

Los hidrocarburos poliaromáticos (HPA) son de gran interés ya que son parte de los compuestos mas persistentes y se encuentran en altas concentraciones en los suelos intemperizados.

Los HPA son altamente tóxicos para el ser humano, algunos compuestos pueden ser potencialmente mutagénicos y cancerígenos (Tiehm, 1994; Thibault y col., 1996). Este es un factor muy importante ya que con el tiempo en suelos contaminados estos compuestos pueden lixivarse a los mantos freáticos y provocar graves problemas de salud.

En las tecnologías de biorremediación, la toxicidad de los contaminantes hacia los microorganismos puede ser un factor que limite la degradación de estos compuestos, ya que pueden llegar a ser inhibitorios para el crecimiento.

El uso de suelos contaminados artificialmente con compuestos hidrofóbicos modelo pueden ser una alternativa para estudiar los procesos de disponibilidad y biodegradación (Thibault y col., 1996). De esta manera se facilita el estudio, evitando la interferencia de una gran variedad de compuestos que se encuentran en los suelos intemperizados.

1.3. HIDROCARBUROS POLIAROMÁTICOS

Los HPA además de ser constituyentes del petróleo y estar relacionados con su refinación, son generados y liberados al ambiente durante la oxidación incompleta de materiales orgánicos como la hulla, el petróleo y la madera (Kirk y Othmer, 1961). También son liberados en la industria del carbón (Tiehm, 1994). La contaminación de HPA por esta industria también es de gran interés ya que las concentraciones son tan altas como las encontradas en suelos contaminados por derrames de petróleo.

1.3.1. COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES

Los HPA son compuestos derivados del benceno, generalmente contienen de dos a cinco anillos aromáticos condensados, también lo constituyen aquellos compuestos que tienen en su molécula otros anillos cíclicos como cicloalcanos. La estructura química de los compuestos mas comunes se muestran en la Figura 1.1, también se incluyen los compuestos más frecuentes como el naftaleno y antraceno y los compuestos mas complejos como el pireno y benzo(a) pireno (Cookson, 1995).

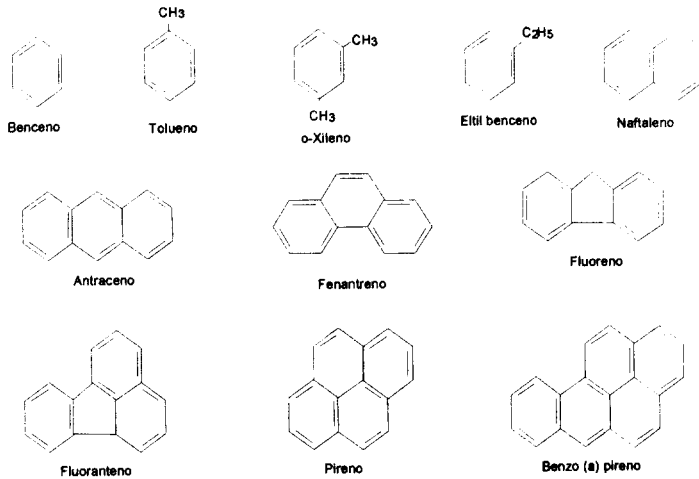


Figura 1.1. Estructuras químicas de hidrocarburos aromáticos y poliaromáticos

Estos compuestos son parcialmente solubles en agua, su poca solubilidad disminuye conforme aumenta el número de anillos en la molécula. En la Tabla 1.6 se muestran algunas de las propiedades de los compuestos más comunes, se puede observar que el naftaleno es el compuesto más simple, más soluble y más volátil de todos los HPA. Aún con estas propiedades el naftaleno se ha encontrado fuertemente sorbido en suelos intemperizados. Deschênes y col (1996) encontraron naftaleno a una concentración de 114 mg/kg en un suelo contaminado con creosota con una edad de 20 años, esta concentración se encuentra por arriba de lo permitido por la ley Canadiense.

Tabla 1.6. Propiedades físicas de algunos hidrocarburos poliaromáticos.

Compuesto	Solubilidad en agua (ppm)	Solubilidad en tolueno (g/ml)	Punto de fusión (°C)	Punto de eb. (°C)
Naftaleno	31.7	0.28	80.2	218
Fenantreno	1.29	0.41	100.0	340
Antraceno	0.073	0.008	218.0	342
Pireno	0.135	-	149.5	260

Fuente: Merck Index, 1989

1.3.2. BIODEGRADACIÓN

La biodegradación de los HPA, ya sea por metabolismo aerobio o anaerobio varía en función de su estructura química, esto es por el número de anillos fusionados, el número, tipo y posición de sustituciones en los anillos. La posibilidad de ataque biológico además de la estructura, también está en función de su solubilidad, toxicidad y reactividad. Esto es, conforme aumenta el número de anillos fusionados en los HPA, disminuye la susceptibilidad a su degradación. En general los HPA que contienen 2 o 3 anillos aromáticos son fácilmente degradables, mientras que los que contienen 4 o más anillos son significativamente más difíciles de degradar y algunos pueden ser no biodegradables. De acuerdo a su estructura química, el naftaleno es más fácilmente degradable que el antraceno o el fenantreno (Cookson, 1995).

Se han realizado muchos estudios acerca de la degradación aerobia de hidrocarburos poliaromáticos. La oxidación aerobia de los compuestos con 2 o 3 anillos (naftaleno, fenantreno y antraceno) se lleva a cabo por un gran número de bacterias del suelo, las más estudiadas son del género de *Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium* (Ryuichiro y Montes de Oca, 1993; Mueller y col., 1990; Bouchez y col., 1995; Volkering y col., 1995; Grimberg y col., 1996). Se ha demostrado que la degradación de estos compuestos por consorcios microbianos disminuye la formación de intermediarios tóxicos comparada con la degradación con cepas puras (Bouchez y col., 1995)

La reacción inicial de la degradación de los HPA es la introducción de oxígeno molecular al anillo aromático, con la subsecuente producción de intermediarios que alimentan el ciclo de Krebs. En la Figura 1.2 se muestra la vía de degradación de naftaleno propuesta por Gibson y Subramanian (1984) y se puede observar que la oxidación del naftaleno, antraceno y fenantreno puede generar la formación de intermediarios dihidrodiol, por ejemplo el catecol.

El naftaleno es el compuesto mas fácilmente degradable de todos los HPA (Volkering y col., 1995; Efrogmson y Alexander, 1991; Liu y col., 1995). Guerin y Boyd (1992) observaron la mineralización de naftaleno a CO₂ sorbido a dos diferentes tipos de suelo.

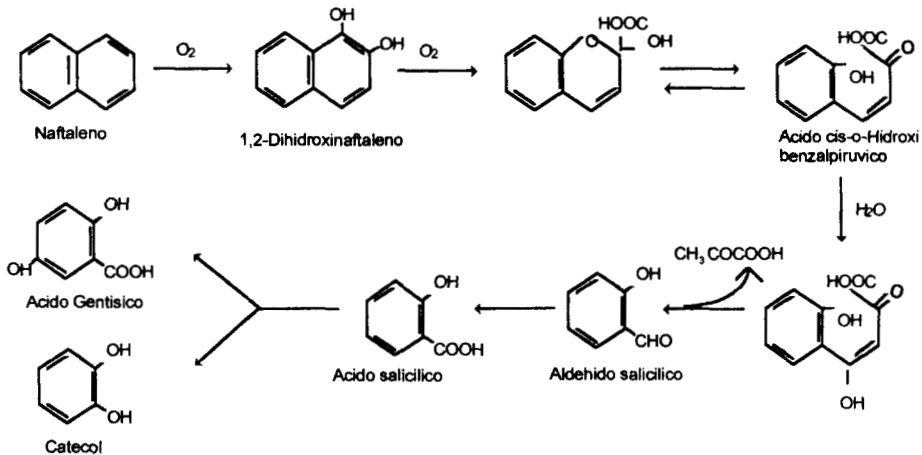


Figura 1.2. Vía de degradación de naftaleno

También existen estudios sobre la degradación de HPA por hongos filamentosos. *Phanerochaete chrysosporium*, un hongo de la pudrición blanca tiene la capacidad de degradar muchos HPA incluyendo pireno, fluoreno, fenantreno y otros compuestos halogenados. Este hongo produce, bajo condiciones limitadas de nitrógeno, enzimas inespecíficas como la lignina peroxidasa que puede ser una de las responsables de la degradación de estos compuestos (Cookson, 1995).

El metabolismo anaerobio de los HPA ha sido estudiado de manera limitada. Los HPA pueden ser transformados anaeróbicamente bajo condiciones de desnitrificación, sulfato reducción y metanogénesis (Coates y col., 1997).

Existe poca información sobre la degradación bacteriana de HPA que contienen mas de tres anillos. Sin embargo, se ha reportado la oxidación microbiana de compuestos como fluoreno, fluoranteno, pireno, benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno (Grifoll y col., 1992; Mueller y col., 1990; Ryuichiro y Montes de Oca, 1993). En general este tipo de compuestos son susceptibles a ser degradados por cometabolismo (Bouchez y col., 1995).

El cometabolismo microbiano puede definirse como la transformación de un sustrato que no se utiliza como fuente de carbono y energía, en presencia obligada de otro sustrato que sirve para crecimiento. Es un fenómeno basado fisiológicamente en el acoplamiento de diferentes rutas catabólicas a nivel celular (Janke y Fritsche, 1985).

Bouchez y col., (1995) demostraron la capacidad de seis cepas bacterianas puras del genero *Pseudomonas* y *Rhodococcus* para degradar por cometabolismo HPA de alto peso molecular como el fluoranteno. La velocidad de degradación de estos HPA aumenta cuando algunos HPA análogos de bajo peso molecular como el antraceno están presentes como principal fuente de carbono. La presencia de estos compuestos induce la producción de enzimas que son utilizadas para degradar los HPA de alto peso molecular. Mueller y col., (1990) observaron que cuando fluoreno y antraceno son utilizados como cometabolitos se producen compuestos intermediarios y cuando son utilizados como sustratos principales se mineralizan completamente.

También se ha encontrado que algunos HPA como naftaleno, fluoreno y fenantreno pueden actuar como compuestos inhibitorios, ya que existe una gran relación entre la capacidad inhibitoria de estos compuestos con su solubilidad en agua, lo cual incrementa su toxicidad frente a los microorganismos (Bouchez y col., 1995).

Por todos estos factores es difícil desarrollar conclusiones generalizadas sobre la biodegradación de estos compuestos, pero bajo condiciones adecuadas los HPA pueden ser degradados a diferentes tasas de reacción. Sin embargo uno de los principales factores que limitan la biodegradación de estos compuestos en el suelo es su baja disponibilidad, por lo que este proyecto tiene un gran interés en el estudio de este proceso para disminuir su efecto en la degradación de HPA en el suelo.

1.4. BIODISPONIBILIDAD

Biodisponibilidad puede ser definida como la accesibilidad de un compuesto químico a la degradación microbiana (Gutiérrez, 1998). En el contexto de tratamiento de suelos el término de biodisponibilidad se usa para describir la propiedad general de un suelo contaminado para liberar sus contaminantes de tal forma que los microorganismos puedan captarlo y metabolizarlo (Blackburn y Hafker, 1993)

La baja biodisponibilidad de un contaminante en el suelo puede atribuirse a diferentes factores, los compuestos hidrofóbicos son fuertemente absorbidos por la materia orgánica ya que puede actuar como un solvente, quedando de esta manera poco accesibles a la degradación microbiana (Guerin y Boyd, 1992), los contaminantes pueden quedar atrapados en los pequeños poros intrapartícula de las arcillas quedando inaccesibles a los microorganismos (Huesemann, 1997), la aglomeración de las partículas del suelo contaminado debido a su naturaleza hidrofóbica puede separar físicamente las partículas contaminadas de la fase acuosa donde se lleva a cabo la actividad biológica.

Particularmente, en los suelos contaminados por largos periodos y que permanecen a la intemperie (suelo intemperizados) los compuestos llegan a ser inaccesibles para los microorganismos por las fuertes interacciones que se producen entre los compuestos y el suelo. La disponibilidad de los contaminantes disminuye conforme aumenta el tiempo de permanencia de estos compuestos en el suelo. Kelsey y col., (1997) observaron que aumentando el tiempo de permanencia el fenantreno llega a estar progresivamente menos disponible a las bacterias del suelo.

Las interacciones del contaminante con el suelo pueden ser el resultado de diferentes procesos, entre ellos se encuentran (i) la adsorción de los compuestos en la materia orgánica, (ii) la difusión lenta de estos compuestos en los microporos del suelo y (iii) la formación de una película semirrígida alrededor de la fase líquida no acuosa con una alta resistencia a la transferencia de masa a la fase acuosa (Luthy y col., 1997).

Para los compuestos fuertemente sorbidos, la biodisponibilidad y por lo tanto la velocidad de degradación está controlada por varios procesos fisicoquímicos como son sorción y desorción, difusión y disolución (Bosma y col., 1997) y un proceso bioquímico: la reacción.

Para aumentar la biodisponibilidad de los compuestos en el suelo se puede tratar de aumentar la actividad de los microorganismos o se puede aumentar la transferencia de masa.

1.4.1. ACTIVIDAD MICROBIANA

Se han encontrado pocos casos con limitaciones por actividad microbiana. Guerin y Boyd (1992) observaron que la degradación y biodisponibilidad de naftaleno sorbido en suelo es dependiente del tipo de microorganismos utilizados. Harms y Zehnder (1995) encontraron que la aplicación de un inóculo grande acelera la velocidad de desorción considerablemente, ya que las bacterias tienden a adherirse a la materia orgánica que contiene al compuesto sorbido.

Para aumentar la actividad microbiana se pueden mejorar las condiciones de degradación por técnicas de bioestimulación (adicionando nutrientes o aceptores de electrones) o se pueden adicionar microorganismos específicos mediante técnicas de bioaumentación.

A partir de los estudios cinéticos de degradación se han generado diversos modelos matemáticos que tratan de explicar y determinar el efecto de cada uno de los parámetros que controlan el proceso de biodisponibilidad.

Bosma y col., (1997) plantearon un esquema de biodisponibilidad en el cual en un sistema suelo:agua las bacterias se encuentran principalmente en poros con tamaños entre 0.8-3 μm donde están protegidas contra la predación, mientras que los contaminantes se encuentran en poros extremadamente pequeños o en forma pura como sólido o líquido.

Ellos establecieron un modelo matemático basados en las cinéticas microbianas de Michaelis-Menten y en los problemas de transferencia de masa. La biodisponibilidad la representan con un número adimensional "Bn" el cual relaciona la constante de transferencia de masa con la afinidad específica microbiana.

1.4.2. MECANISMOS DE TRANSFERENCIA DE MASA

Existen estudios que demuestran que las limitaciones por transferencia de masa son las más importantes. Jonge y col., (1997) encontraron que la degradación de n-alcenos está limitada por su baja biodisponibilidad, la cual está controlada por los procesos de desorción y difusión a concentraciones menores de 4.0 g/kg, mientras que a concentraciones mayores la biodisponibilidad está limitada por el proceso de solubilización. También en la mineralización de naftaleno se ha demostrado que la velocidad de desorción limita la velocidad de biodegradación (Guerin y Boyd, 1992).

Los procesos de difusión juegan un papel importante, Wu y Gschwend (1986) plantean la teoría de que una cinética de sorción está controlada por la difusión intrapartícula de los agregados del suelo, sus resultados demuestran que los agregados más grandes tienen velocidades de sorción más lentas comparada con agregados similares más pequeños. La velocidad de biodegradación disminuye debido a que los contaminantes difunden lentamente desde el interior de las partículas del suelo a las áreas superficiales que son colonizadas por los microorganismos capaces de degradar los compuestos (Huesemann, 1997).

La sorción de un compuesto se lleva a cabo cuando se enlaza reversiblemente a un sorbente sólido, el fenómeno ocurre por sorción física en una superficie o por disolución del compuesto en una fase, como por ejemplo en la materia orgánica natural. Las interacciones intermoleculares entre los compuestos orgánicos se lleva a cabo por fuerzas de Van der Waals, fuerzas dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido y puentes de hidrógeno. Las interacciones de los contaminantes con la superficie son por lo general debidas a fuerzas dipolares y de dispersión (Pignatello y Xing, 1996).

Los análisis de sorción entre un compuesto y una matriz sólida están basados en un equilibrio y en un balance de materia. El equilibrio se estudia a través de isothermas de sorción, las isothermas típicas son las de Freudlich, de Langmuir y las lineales (ideales). Cada tipo de isoterma presenta un comportamiento distintivo y por lo tanto una constante de equilibrio. El equilibrio se puede alcanzar en pocas horas o en pocos días, aunque la etapa lenta puede requerir de mucho mas tiempo (Belter y col., 1988).

El proceso de sorción y desorción se realiza en tres etapas: i) el soluto se pone en contacto con el sorbente, ii) la sorción se lleva a cabo, la cual puede ser muy selectiva y lenta, y iii) el soluto sorbido se eluye usando métodos químicos o físicos. En muchos casos la sorción y liberación de compuestos orgánicos de partículas naturales es bimodal ya que puede ocurrir en una etapa rápida y otra etapa lenta (Pignatello y Xing, 1996).

Se ha encontrado que la velocidad de desorción (principalmente en la etapa lenta) disminuye conforme aumenta el tiempo de contacto del compuesto con el sorbente (suelo), por lo que también disminuye su biodisponibilidad. Tal influencia fue observada para la desorción y transformación de 3-clorodibenzofurano (Harms y Zehnder, 1995).

Para aumentar la transferencia de masa, Pignatello y Xing (1996) sugieren las siguientes alternativas:

- 1) Aplicar calor. La desorción térmica se utiliza en varias tecnologías de remediación para la extracción de contaminantes que son suficientemente volátiles.
- 2) Aplicar métodos físicos que alteren la estructura química del suelo contaminado. Acidificando el suelo se promueve la desorción de algunos compuestos iónicos.
- 3) Adicionar aditivos químicos que desplacen los contaminantes o alteren la estructura del suelo como surfactantes o solventes. En la presencia de surfactantes la concentración de los compuestos en la fase acuosa aumenta, potencialmente también aumenta su disponibilidad para el ataque microbiano o para su remoción por algún otro tratamientos de remediación. La biodegradación aumenta siempre y cuando la concentración de los compuestos orgánicos no llegue a ser tóxica (Thibault y col., 1996).

1.5. ALTERNATIVAS PARA AUMENTAR LA BIODISPONIBILIDAD

Como se mencionó anteriormente existen diferentes alternativas para aumentar la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos en el suelo. En este trabajo se tiene un gran interés en el estudio de surfactantes y solventes como alternativas para aumentar la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos como el naftaleno.

1.5.1. SURFACTANTES

Los surfactantes pueden ser sintéticos o biológicos (biosurfactantes), son moléculas que presentan una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica, debido a esta propiedad estos compuestos son emulsificantes ya que disminuyen la tensión superficial e interfacial. Una molécula de surfactante puede disolverse en agua en forma de monómero, sorberse a una superficie o formar agregados de 10 a 200 moléculas, las cuales son conocidas como micelas. El número de moléculas de surfactante en una micela se le conoce como número de agregación. La concentración de un surfactante a la cual los monómeros comienzan a ensamblarse para formar micelas se le conoce como concentración crítica micelar (CMC) (Thibault y col., 1996). En solución la CMC se aproxima a la solubilidad monomérica.

La CMC de un surfactante está en función de su estructura química, de la temperatura, fuerza iónica y la presencia y tipo de compuestos orgánicos. Cada micela puede incorporar en su centro una cierta cantidad de compuestos hidrofóbicos. La cantidad de compuestos incorporados depende de la estructura del surfactante, número de agregación, geometría, fuerza iónica y estructura de la micela, temperatura, estructura química y tamaño del compuesto hidrofóbico (Edwards y col., 1991).

En la Tabla 1.7 se presenta la clasificación de los surfactantes sintéticos. Los surfactantes no-iónicos son los mas utilizados en los procesos de biorremediación ya que son menos tóxicos a los microorganismos, mientras que los iónicos se ha demostrado que son mas tóxicos ya que pueden alterar las características fisiológicas de los microorganismos afectando la integridad de la membrana celular.

Tabla 1.7. Clasificación y características de los surfactantes.

Aniónicos	Contienen iones carboxilato, sulfonato y sulfato. El mas utilizado es el sulfato dodecil de sodio (SDS).
Catiónicos	Muchos son utilizados como conservadores antimicrobianos y no como agentes tensoactivos porque los cationes producen lisis celular. Por ejemplo sales de amonio cuaternarias.
No-iónicos	No presentan compuestos iónicos en su molécula por lo que se les considera neutros. Por ejemplo las series de Tritón, Tergitol, Brij, etc.

En la Tabla 1.8 se presenta un resumen del efecto que tienen algunos surfactantes en la degradación de contaminantes en diferentes condiciones de cultivo. Se puede observar que existe una gran controversia en cuanto al uso de los surfactantes como alternativa a la biorremediación, ya que algunos trabajos demuestran que su uso aumenta la degradación de los compuestos hidrofobicos, mientras otros demuestran que no tienen efecto sobre la degradación de los contaminantes y a ciertas concentraciones se ha comprobado que presentan un efecto inhibitorio. Guha y Jaffe (1996) realizaron experimentos de diferentes surfactantes con un consorcio microbiano y encontraron que Tritón X102, Tritón X100, Tritón N101, Tritón CF-21, Brij 35, Brij 30 y Tergitol 15-S-9 tuvieron un efecto igual o mayor sobre la degradación de fenantreno, mientras que Tergitol NP10, Tergitol 15-S-20 y Tergitol TMN-10 tuvieron un efecto inhibitorio, por lo que ellos concluyen que la inhibición de la degradación de fenantreno por surfactantes arriba de su CMC es dependiente del tipo de surfactante.

En la Tabla 1.8 se observa también que el surfactante que mas se ha utilizado para realizar este tipo de estudios es el Tritón X-100 por lo que en este trabajo de tesis se eligió este surfactante como modelo para estudiar su efecto en la biodegradación y biodisponibilidad de naftaleno.

Tabla 1.8. Revisión del efecto de surfactantes en la biodegradación de compuestos hidrofóbicos en diferentes condiciones de cultivo.

Surfactante	Compuesto	Condiciones de cultivo	Efecto	Referencia
Tritón X-100 (1-5 g/l)	fenantreno naftaleno	Degradación en medio líquido por cepas de <i>Pseudomonas</i> .	Estimuladorio	Volkering y col., 1995
Tritón X-100	naftaleno	Degradación en medio líquido	Estimuladorio	Efroymson y Alexander, 1991
Marlipal (10 mM)	fluoranteno	Degradación en medio líquido por un consorcio microbiano	Estimuladorio	Tiehm, 1994
Tergitol NP-10	fenantreno	Degradación en medio líquido por <i>P stutzeri</i>	Estimuladorio	Grimberg y col., 1996
Alfonic 810-60 Novelll 1412-56 (10 µg/g ss) (100 µg/g ss)	fenantreno bifenilo	Degradación en suelo insaturado	Estimuladorio Inhibitorio	Aronstein y col., 1991
Tritón X-100 (20 CMC ^a) Brij 30 (170 CMC)	naftaleno	Degradación en medio líquido por un consorcio microbiano	Sin efecto	Liu y col., 1995
Tritón X-100 (0.2%)	fenantreno	Degradación en un sistema suelo:agua (1:8) por un consorcio microbiano.	Inhibitorio	Laha y Luthy, 1992
SDS (10 µg/g ss) (100 y 500)	HPA	Degradación de suelo insaturado intemperizado con HPA	Sin efecto Inhibitorio	Deschênes y col., 1996

^a 20 veces la concentración crítica micelar.

SORCIÓN EN SUELO

En un proceso de biorremediación de suelos con surfactantes es muy importante considerar la cantidad de surfactante sorbido al suelo, esta cantidad depende tanto del surfactante utilizado como del suelo a descontaminar.

Se han realizado estudios sobre la sorción de surfactantes en el suelo, tanto de surfactantes iónicos como de no-iónicos. Urano y col., (1984) encontraron que la sorción de surfactantes es proporcional al contenido de materia orgánica en el suelo. Ellos encontraron que la sorción puede ser caracterizada por una isoterma de Freundlich a concentraciones de surfactante por arriba de su CMC.

La sorción de los surfactantes no-iónicos en el suelo puede incrementar la fracción orgánica del suelo además de disminuir la cantidad de surfactante disponible para la solubilización micelar de los compuestos orgánicos hidrofóbicos en el suelo. La sorción de los surfactantes puede también afectar su disponibilidad en la degradación microbiana (Liu y col., 1992).

MECANISMOS DE ACCIÓN

Actualmente no se conocen con precisión los mecanismos involucrados en el uso de surfactantes para aumentar la disponibilidad y la biodegradación de compuestos hidrofóbicos, sin embargo en algunas publicaciones se han propuesto algunos mecanismos de acción.

Volkering y col., (1995) propusieron tres principales mecanismos que explican el efecto de un surfactante en la biodisponibilidad de un compuesto orgánico.

1. Dispersión de la fase líquida no acuosa, permitiendo así un incremento en el área de contacto, la cual es causada por una reducción en la tensión interfacial entre la fase acuosa y la no acuosa.

2. Aumento de la solubilidad de los compuestos causada por la formación de micelas. Se ha demostrado que la presencia de micelas de surfactantes no iónicos en solución tiene un efecto positivo en la remoción de HPA sorbidos en el suelo mediante el proceso de solubilización.

3. Transporte facilitado del contaminante de la fase sólida a la fase acuosa, la cual puede ser causada por la disminución de la tensión superficial del agua contenida en los poros de las partículas del suelo, interacción del surfactante con la interface sólido-agua, alteración de las propiedades intrapartícula del suelo y la interacción del contaminante con monómeros de surfactante.

En la Figura 1.3 se presenta el esquema de disponibilidad propuesto por Edwards y col., (1994 a) de un compuesto orgánico hidrofóbico (COH) en la ausencia de microorganismos, con un surfactante no-iónico y un suelo con un contenido moderado de materia orgánica. El surfactante puede existir en un sistema suelo-agua en forma de monómeros disueltos, como moléculas sorbidas en el suelo o como micelas; las moléculas de COH pueden existir en varias formas, pueden ser solubilizadas en las micelas (K_m), pueden estar disueltas, sorbidas directamente en el suelo (K_d) o sorbidas en asociación con el surfactante sorbido al suelo. De tal manera que K_d y K_m son los coeficientes de partición del COH entre el suelo, la fase acuosa y la fase micelar.

Tiehm (1994) propone dos mecanismos de transferencia del compuesto desde la micela al microorganismo que podrían ser los responsables de su degradación:

1. El microorganismo degrada el contaminante desde la fase acuosa una vez que ha difundido fuera de la micela.
2. El microorganismo degrada el contaminante directamente de la fase micelar sin tener que difundir a la fase acuosa, por la fusión de la membrana celular con la micela.

Guha y Jaffe (1996) respaldan el segundo mecanismo, ellos postulan que las micelas formadas con fenantreno particionado o “micelas llenas” son transportadas a la proximidad de las células o enzimas por la agitación, formándose alrededor de la célula una película semi-micelar, esto permite la transferencia dinámica del contaminante de la fase micelar adyacente a la célula en la cual es biodegradado, después la “micela vacía” es intercambiada con una nueva “micela llena”.

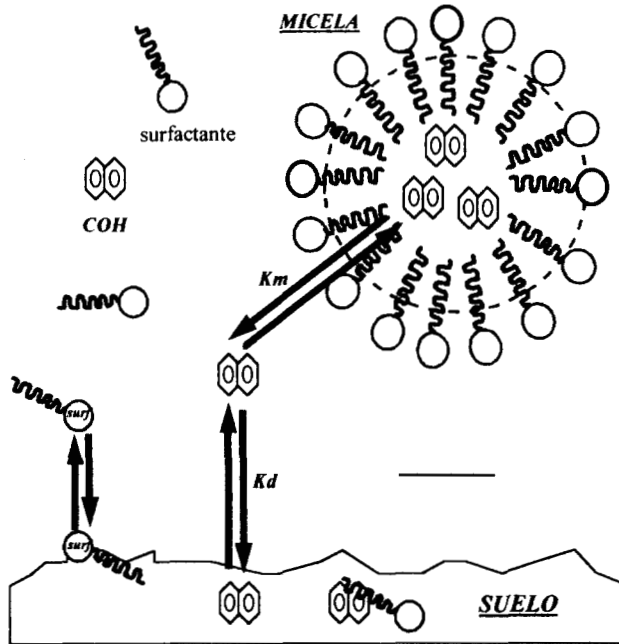


Figura 1.3. Esquema de disponibilidad en un proceso abiótico de un compuesto orgánico hidrofóbico (COH) y un surfactante no-iónico en un suelo con un contenido moderado de materia orgánica

Debido a la gran controversia generada sobre el efecto de los surfactantes en la biodisponibilidad y biodegradación de los compuestos hidrofóbicos sorbidos en los suelos, es necesario realizar estudios para contribuir de esta manera a determinar y entender el efecto de estos compuestos como una alternativa de biorremediación. Otra alternativa que se sugiere para aumentar la disponibilidad de estos compuestos es a través de solventes orgánicos (Pignatello y Xing, 1996).

1.5.2. SOLVENTES ORGÁNICOS.

Existen pocos estudios relacionados con el uso de solventes orgánicos para aumentar la degradación de compuestos hidrofóbicos. Los solventes orgánicos podrían ser usados para aumentar la desorción de compuestos recalcitrantes termodinámicamente (aumentando su solubilidad) y cinéticamente (ablandando la materia orgánica) (Pignatello y Xing, 1996).

Efroymsen y Alexander (1991) encontró que la adición de heptametilnonano a concentraciones de 1 hasta 250 $\mu\text{l/ml}$ aumenta la degradación de naftaleno y n-hexadecano. Recientemente, Jiménez y Bartha (1996) encontraron que el aceite de parafina aumenta la mineralización de pireno en medio líquido, mientras que otros solventes como heptametilnonano inhiben la mineralización de pireno y fenantreno por *Mycobacterium sp.*

Los compuestos aromáticos como benceno, tolueno y xileno son ampliamente utilizados como disolventes de sustancias no polares. Aprovechando esta propiedad estos solventes pueden ser utilizados para aumentar la biodisponibilidad de HPA sorbidos al suelo. Se han realizado muchos estudios sobre la degradación de estos compuestos y se ha demostrado que son degradados por una gran variedad de microorganismos bajo condiciones aerobias y anaerobias. Los microorganismos del suelo son capaces de metabolizar aeróbicamente los hidrocarburos monoaromáticos.

También se ha demostrado que el tolueno puede actuar como sustrato primario estimulando el crecimiento microbiano para aumentar el cometabolismo de otros compuestos monoaromáticos de más difícil degradación como el xileno, ya que inducen la producción de las enzimas catabólicas requeridas (Alvarez y Vogel, 1991).

En este trabajo se propone el uso de tolueno como solvente para aumentar la biodisponibilidad y biodegradación de HPA, ya que puede ser utilizado como sustrato para aumentar el cometabolismo de otros compuestos como es el caso del naftaleno o puede ser utilizado como solvente para aumentar su desorción.

2. OBJETIVOS

2.1. GENERAL

Determinar el efecto de la adición de surfactantes y de solventes orgánicos en la biodisponibilidad y biodegradación de naftaleno en un suelo contaminado artificialmente.

2.2. ESPECÍFICOS

1. Determinar la capacidad de adsorción de naftaleno en un suelo no contaminado.
2. Determinar la capacidad degradativa del suelo no contaminado.
3. Aislar de un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo cepas degradadoras de naftaleno.
4. Determinar el efecto de la adición del surfactante Tritón X-100 en la biodisponibilidad y biodegradación de naftaleno sorbido en el suelo.
5. Determinar el efecto de la adición del solvente orgánico tolueno en la biodisponibilidad y biodegradación de naftaleno sorbido en el suelo.

3. METODOLOGÍA

3.1. REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados en este trabajo de tesis fueron grado reactivo y, en su caso, grado HPLC. Naftaleno, tolueno, acetonitrilo, hexano y acetona fueron obtenidos de J.T. Baker y Tritón X-100 (t-octylphenoxypolyethoxyethanol) de Sigma Chemical Co, con un peso molecular de 625 g/mol, su fórmula estructural se presenta en la Figura 3.1.

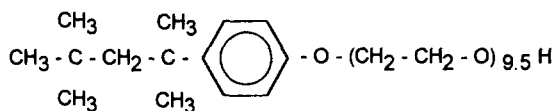


Figura 3.1. Fórmula estructural de Tritón X-100.

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

En todos los experimentos realizados se utilizó el medio mineral propuesto por Thibault y col., (1996) que se detalla en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Composición del medio mineral (mM) utilizado en este trabajo.

K ₂ HPO ₄	10	Sol. de Minerales Traza	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	3	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.001
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.001
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.001
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.1	NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.001
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.001
Sol. de min. traza	1 (ml/l)	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.001

Para el aislamiento de los microorganismos por dilución en placa inicialmente se utilizó el medio de cultivo que se detalla en la Tabla 3.2 propuesto por García (1981).

Tabla 3.2. Composición del medio mínimo (g/l) utilizado en este trabajo

Glucosa	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.35
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
Agar	18

La incorporación de naftaleno a los medios de cultivo a diferentes concentraciones se realizó con una solución concentrada de naftaleno en etanol (40 mg/ml).

3.3. CARACTERIZACIÓN DEL SUELO

3.3.1. MUESTREO

Se tomaron muestras de dos tipos de suelos, un suelo contaminado con petróleo y otro suelo no contaminado. El lugar donde se muestrearon los dos tipos de suelo se localiza al noroeste del poblado Reforma, en el Estado de Chiapas (Figura 3.2).

Suelo Contaminado

El suelo contaminado fue muestreado del pozo Cactus 61, el cual se encuentra a unos cuantos kilómetros de la zona industrial Cactus. Este pozo actualmente ya no se encuentra en operación. Las coordenadas geográficas del sitio, tomadas del plano INEGI escala 1:50,000 son:

Longitud oeste: 91° 10' 30''

Latitud norte: 17° 53'

El sitio de muestreo se encuentra a 20 metros de altura del nivel del mar.

Suelo No Contaminado

El suelo no contaminado fue muestreado en un campo de cultivo que se localiza a 1 km de distancia del pozo Cactus 61.

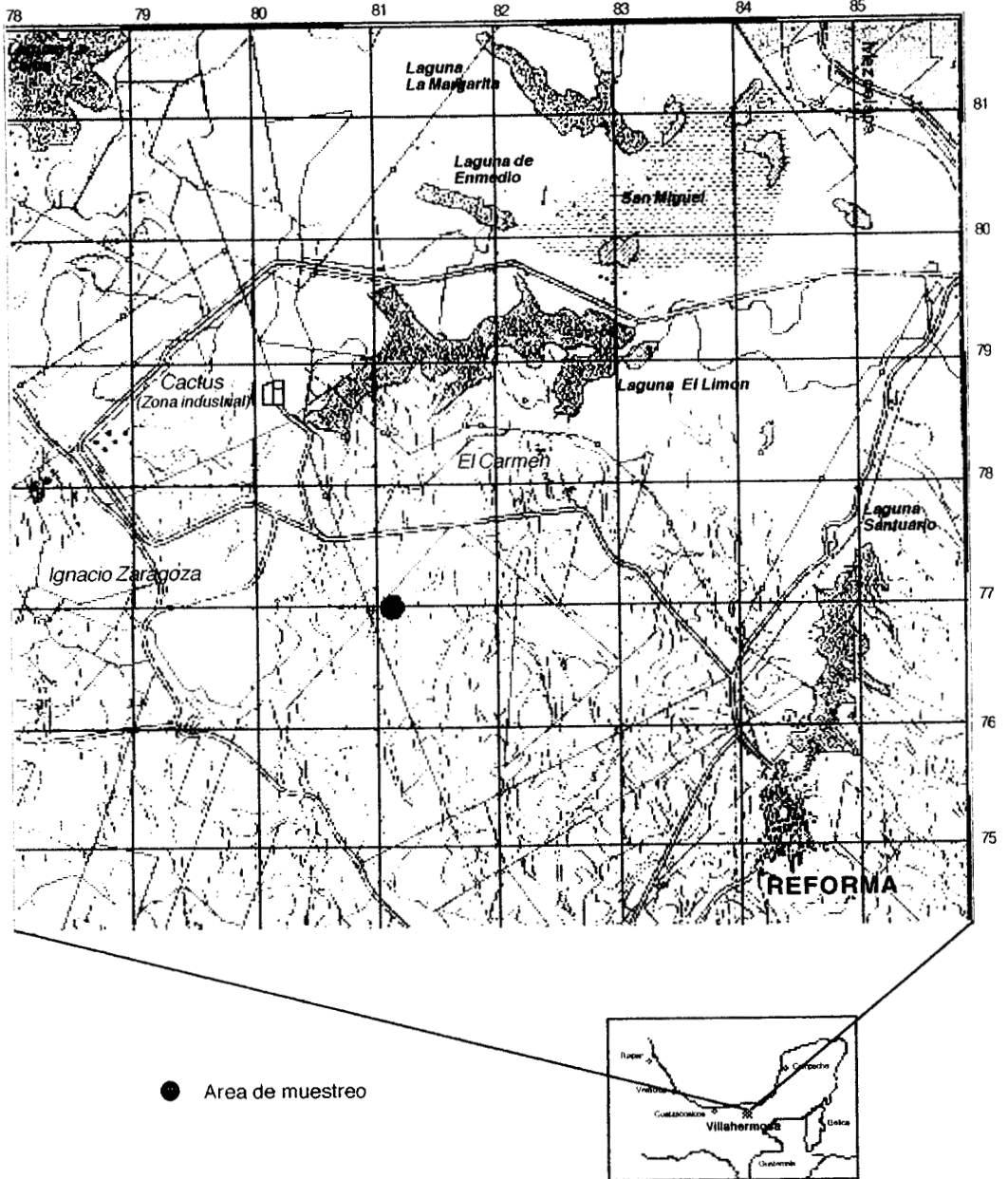


Figura 3.2. Mapa de localización del lugar de muestreo del suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo

3.3.2. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

Los dos suelos muestreados en Cactus, fueron analizados fisicoquímicamente en la Universidad Autónoma Chapingo, las características se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Propiedades fisicoquímicas de un suelo contaminado con petróleo y un suelo no contaminado, muestreados en Cactus en el Estado de Chiapas.

PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS	SUELO NO-CONT.	SUELO CONT.
pH	4.8	7.67
Humedad (%)	21.9	15.0
Capacidad de Retención de Agua (gH ₂ O/g ss ^a)	0.45	0.25
Densidad Aparente (g/ml)	0.97	1.106
Materia Orgánica (%)	3.64	11.77
Fósforo (ppm)	1.81	3.13
Metales (ppm)		
Cu	1.55	0.65
Zn	1.28	7.63
Pb	ND	14.05
Hg	ND	ND
Cr	ND	ND
Ni	ND	ND
Textura	Franca	Arcillosa
Arena (%)	39.28	23.28
Limo (%)	31.41	36.72
Arcilla (%)	29.31	40.00

^a suelo seco

ND: no se detecto

La determinación del tipo de hidrocarburos presentes en el suelo contaminado fue realizada en la Universidad Autónoma Metropolitana por Medina (1997). En la Tabla 3.4. se presenta el tipo y la concentración de hidrocarburos presentes.

Tabla 3.4. Composición de hidrocarburos presentes en el suelo contaminado proveniente de Cactus, Chiapas.

HIDROCARBUROS	%
Hidrocarburos totales del petróleo (HTP)	8
Alifáticos	63.64
Polares	14.61
Poliaromáticos	13.70
Asfaltenos	8.05

3.4. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

Los microorganismos fueron aislados del suelo contaminado con hidrocarburos utilizando dos metodologías diferentes, método de dilución en placa y método de enriquecimiento que se detallan a continuación.

Para los dos métodos el aislamiento se realizó a dos pH diferentes, a pH 7 para el aislamiento de bacterias y a pH 5.5. para el aislamiento de hongos.

3.4.1. MÉTODO DE DILUCIÓN EN PLACA

Se suspendieron en 100 ml de solución isotónica 5 g de suelo contaminado, esta suspensión se agitó durante 1 h a una velocidad de 150 rpm . De esta suspensión se hicieron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000.

El aislamiento se realizó en tres etapas, todas las placas se incubaron a 35 °C durante 4 días.

1er Etapa. De cada dilución se sembraron cajas por triplicado, para pH 7 se sembraron cajas con medio mínimo y para pH 5.5 con PDA.

2da Etapa. De las cajas anteriores se seleccionaron todas aquellas colonias morfológicamente diferentes y se aislaron resembrándolas al pH correspondiente en cajas con medio mínimo mas naftaleno (100 ppm).

3er Etapa. Las colonias con crecimiento apreciable fueron resembradas al pH correspondiente en cajas con medio mínimo sin glucosa mas naftaleno como única fuente de carbono (100 ppm).

Finalmente, las colonias con crecimiento apreciable se sembraron en tubos inclinados en medio mineral con agar (18 g/l) mas naftaleno (100 ppm). Los tubos se conservaron en refrigeración a 4 °C.

3.4.2. MÉTODO DE ENRIQUECIMIENTO

En matraces de 250 ml con medio mineral estéril (50 ml) se agregaron 250 µl de solución concentrada de naftaleno, hasta tener una concentración final de 100 ppm, posteriormente se resuspendió 1 g de suelo en el medio y finalmente los matraces fueron sellados con tapones de hule recubiertos con aluminio. Durante todo el experimento los tubos y matraces de cultivo se incubaron a 35°C con una velocidad de agitación de 150 rpm durante 48 h. Los cultivos se realizaron por triplicado.

Después de 48 h de cultivo se hizo una transferencia de 1 ml del medio anterior a 50 ml de medio mineral fresco con la misma concentración de naftaleno. Se incubaron a las mismas condiciones de cultivo. Posteriormente se realizaron otras cuatro transferencias sucesivas cada 48 h. En cada transferencia se sembraron placas con medio mínimo y placas con medio mínimo (sin glucosa) mas naftaleno. De las placas obtenidas en la quinta transferencia se seleccionaron todas aquellas colonias que presentaron diferencias morfológicas y se resembraron individualmente en placas con el medio opuesto (las que crecieron con glucosa se sembraron en medio con naftaleno y viceversa), con el fin de observar su comportamiento morfológico con diferentes fuentes de carbono.

Se compararon las morfologías obtenidas con los dos sustratos y se aislaron en tubos inclinados todas aquellas colonias diferentes. En la quinta transferencia los dos consorcios obtenidos se sembraron en matraces con medio mineral sólido (agar 18 g/l) con la misma concentración de naftaleno (100 ppm) para su conservación a corto plazo.

Tanto los tubos inclinados como los matraces se conservaron en refrigeración a 4 °C.

3.4.3. INÓCULO

Al consorcio obtenido a pH 5.5. se adicionaron mediante una asada los microorganismos aislados por el método de dilución en placa, se sembraron en 50 ml de medio mineral a pH 5.5 con naftaleno (100 ppm) como única fuente de carbono, se incubaron a 30°C con una velocidad de agitación de 150 rpm, diariamente fue adicionado naftaleno a la misma concentración inicial durante tres días consecutivos, finalmente se obtuvo un consorcio microbiano que fue utilizado como inóculo en los experimentos de degradación que se detallan mas adelante . El consorcio fue liofilizado para su conservación

Para cada experimento el inóculo fue preparado previamente adicionando naftaleno durante dos días consecutivos antes de su uso.

3.5. ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN, SORCIÓN Y DESORCIÓN

Los experimentos de sorción y desorción se realizaron con el suelo no contaminado previamente esterilizado en autoclave (1 h a 15 lb/in²), el suelo estéril se secó al aire en zona estéril y se almacenó en bolsas de plástico estériles.

3.5.1. CINÉTICA DE DISOLUCIÓN

En un matraz de 125 ml se colocaron 100 ml de agua destilada o en su caso solución de Tritón X-100 a concentraciones de 1.1 g/l (10 CMC) y 2.2. g/l (20 CMC) y se agregaron cristales de naftaleno, el matraz se cerró con un tapón recubierto de papel aluminio, se puso en agitación a 150 rpm y a intervalos regulares de tiempo (aprox. cada 1 h) se tomó una alicuota y se determinó la concentración de naftaleno por HPLC.

3.5.2. CINÉTICA DE SORCIÓN

En frascos serológicos ámbar de 125 ml estériles se colocaron 40 g de suelo seco estéril y 80 ml de solución saturada de naftaleno (28 mg/l), los frascos se sellaron con septos de teflón y aros de aluminio y se pusieron en agitación a 150 rpm a una temperatura de 30°C. A intervalos de tiempo regulares se retiró una botella, se tomó una muestra y se centrifugó a 12000 rpm durante 3 min para determinar finalmente la concentración de naftaleno en la fase líquida por HPLC.

3.5.3. ISOTERMA DE SORCIÓN

En frascos serológicos estériles se adicionaron diferentes cantidades de suelo seco estéril desde 1g hasta 40 g y se agregaron 80 ml de solución saturada de naftaleno (28 mg/l), se sellaron los frascos con septos de teflón y aros de aluminio. Se colocaron en agitación durante 24 h a 150 rpm a una temperatura de 30°C. Para determinar la concentración de naftaleno en la fase acuosa por HPLC, las muestras (0.5 ml) fueron inicialmente centrifugadas a 12000 rpm durante 3 min.

3.5.4. CINÉTICA DE DESORCIÓN

Se adicionó suelo seco estéril a una solución saturada de naftaleno en una relación suelo:agua de 1:10 y se agitó durante 24 h para alcanzar la saturación (0.3 mg naftaleno/g suelo seco). Mediante una espátula se colocaron en frascos serológicos estériles 8 g (base seca) de lodo saturado con naftaleno y se agregaron 80 ml de agua estéril o de solución de surfactante a concentraciones de 0.055 g/l (0.5 CMC), 1.1 g/l (10 CMC) y 2.2 g/l (20 CMC), los frascos se sellaron con septos de teflón y aros de aluminio y se agitaron a 150 rpm a una temperatura de 30°C. A intervalos regulares se tomó una muestra (0.5 ml), se centrifugó a 12000 rpm durante 3 min para determinar la concentración de naftaleno en la fase acuosa por HPLC.

3.6. CINÉTICAS DE BIODEGRADACIÓN

Las cinéticas de degradación en todos los experimentos se determinaron por respirometría mediante la cuantificación de bióxido de carbono (CO_2) por volumetría en un respirómetro el cual se detalla mas adelante. En los experimentos en medio sólido y en suspensión se utilizó suelo no contaminado el cual fue previamente contaminado con naftaleno.

Para estos experimentos se prepararon las siguientes soluciones:

Solución saturada de naftaleno: se preparó la solución con agua estéril a una concentración de 28 ppm, se agitó durante 24 h para alcanzar la saturación y finalmente se determinó la concentración real por espectrofotometría a 276 nm.

Solución de surfactantes: Las soluciones se prepararon con agua destilada estéril y Tritón X-100 el cual fue previamente esterilizado por filtración (filtros de $0.45 \mu\text{m}$), las soluciones se agitaron durante 6 h. Se prepararon soluciones a diferentes concentraciones, 2.2 g/l (20 CMC), 1.1 g/l (10 CMC), 0.160 g/l (1.5 CMC) y 0.055 g/l (0.5 CMC).

3.6.1. CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE CO_2 CON SUELO INSATURADO

Para estos experimentos se utilizó suelo insaturado, esto es a la humedad natural del suelo, se probaron tres fuentes de carbono: glucosa, glicerol y naftaleno, las cuales fueron formuladas para tener la misma cantidad de carbono (0.33 mmol C/g ss). Se prepararon las siguientes soluciones concentradas: una solución de glucosa a una concentración de 250 g/l, una solución de glicerol a 257 g/l y una solución de naftaleno en acetona de 107 mg/ml.

En el caso de las cinéticas con glucosa y glicerol se utilizó la siguiente metodología: las fuentes de carbono fueron adicionadas como soluciones concentradas al suelo húmedo equivalente a 25 g de suelo seco (ss) para tener una concentración final de 10 mg/g ss en el caso de glucosa y 10.25 mg/g ss para glicerol, posteriormente se adicionó agua estéril para alcanzar una humedad final del 28% y todo se homogenizó manualmente.

Para la cinética de degradación de naftaleno se utilizó la siguiente metodología: se adicionó 1 ml de la solución concentrada de naftaleno a 1 g de suelo seco para tener una concentración final de 4.26 mg/g ss, una vez que se evaporó completamente la acetona (aprox. 30 min) el suelo se mezcló con una cantidad de suelo húmedo equivalente a 24 g de suelo seco y finalmente se adicionó agua estéril para alcanzar la humedad final de 28%. En el caso de la cinética de glucosa-naftaleno, se adicionó 0.5 ml de la solución concentrada de naftaleno a 1 g ss, una vez que se evaporó la acetona se mezcló con otra cantidad de suelo húmedo equivalente a 24 g ss, se adicionó 0.5 ml de solución concentrada de glucosa y se completo la humedad (28%) con agua estéril.

Se preparó un control con suelo estéril. Para cada una de las metodologías empleadas se prepararon bajo las mismas condiciones los testigos sin fuente de carbono adicional. Todos los experimentos se realizaron por duplicado a una temperatura de 30°C.

A cada muestra de suelo se le determinó actividad de agua (A_w) y pH al inicio y al final de la fermentación.

Para determinar la producción de CO_2 se utilizó una solución valorada de KOH 0.5N en el respirómetro.

3.6.2. CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE CO_2 CON SUELO EN SUSPENSIÓN

Con esta metodología se corrieron dos tipos de experimentos, uno con un suelo contaminado artificialmente con naftaleno con un día de contaminado y otro con 4 meses, los dos experimentos se realizaron con el suelo en suspensión en una relación suelo:agua de 1:8. La contaminación artificial del suelo de cada uno de los experimentos se realizó de la siguiente manera:

Suelo con un día de contaminado. Se adicionó suelo húmedo (27% de humedad) a una solución saturada de naftaleno en una relación de 1:20, se agitó durante 24 h a temperatura ambiente para alcanzar la saturación y finalmente se determinó la concentración de naftaleno residual por HPLC para calcular la cantidad de naftaleno absorbido al suelo (0.2 mg naftaleno/g suelo seco).

Suelo con cuatro meses de contaminado. Se adicionaron directamente pequeños cristales de naftaleno al suelo húmedo (27% de humedad), se mezcló todo y se almacenó en un recipiente de vidrio a una temperatura de 4°C durante cuatro meses. Al término del tiempo indicado se determinó la concentración de naftaleno sorbido en el suelo (0.8 mg/g ss) por extracción con solventes vía soxhlet (EPA 3540).

Los dos tipos de experimentos se realizaron de la siguiente manera. En el matraz del respirómetro se colocaron 8-9 g (base seca) de suelo contaminado artificialmente y 70 ml de medio mineral a pH 7 o en el caso medio mineral con Tritón X-100 y se inocularon al 5%. En el caso del tratamiento con tolueno este fue agregado directamente a la concentración correspondiente 30 (3 µl), 60 (5 µl) y 90 ppm (7 µl). Se incubaron a una temperatura de 30°C durante 10 días.

Para los testigos se utilizó suelo sin naftaleno y se prepararon en las mismas condiciones. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Para determinar la producción de CO₂ se utilizó en el respirómetro una solución valorada de KOH 0.1N.

3.6.3. CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE CO₂ EN MEDIO LÍQUIDO

En el matraz del respirómetro se colocaron 70 ml de medio mineral o medio mineral con Tritón X-100 a una concentración de 2.2 g/l (20 CMC) a pH 5.5, se adicionaron 7 mg de cristales de naftaleno para alcanzar una concentración final de 100 ppm y se inocularon al 5%. En el caso del tratamiento con tolueno este fue agregado directamente a una concentración de 60 (5 µl) y 90 ppm (7 µl). Se incubaron a 30 °C durante 10 días. Los testigos correspondientes se prepararon en las mismas condiciones sin la adición de naftaleno. Al final de la fermentación se determinó el pH.

Para determinar la producción de CO₂ en el respirómetro se utilizó una solución valorada de KOH 0.1N.

3.7. TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.7.1 RESPIROMETRÍA

En la Figura 3.3 se presenta el esquema del respirómetro utilizado para determinar CO_2 por volumetría propuesto por Bartha y Pramer (1965). Está constituido por un matraz Erlenmeyer de 250 ml fusionado a un tubo de ensaye de 20 ml, tanto el matraz como el tubo se sellaron con tapones de hule recubiertos de aluminio para tener un sistema cerrado, el tapón del matraz se perforó con una aguja de 7 mm de longitud en la cual se montó un filtro de ascarita (filtro para absorber CO_2 del aire a la entrada) y el tapón del tubo se perforó con una aguja de 12 mm.

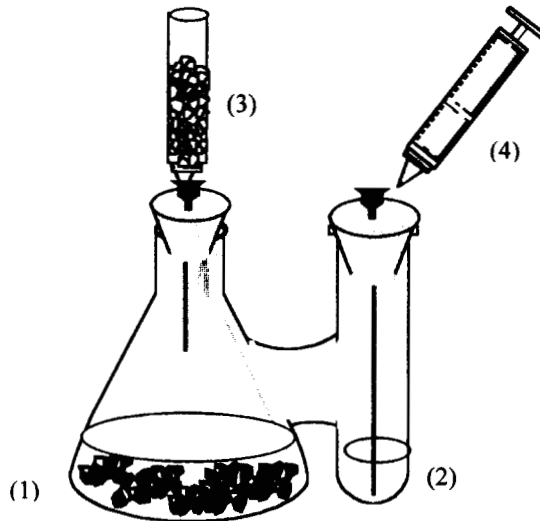


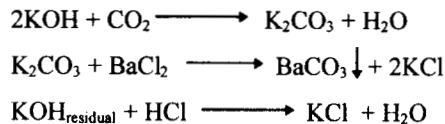
Figura 3.3. Esquema de un respirómetro para determinar la producción de CO_2 por volumetría. (1) Cámara de degradación, (2) Tubo para colocar la solución de KOH que absorbe el CO_2 producido por la actividad microbiana, (3) Filtro de Ascarita para absorber CO_2 del aire, (4) Jeringa para reemplazar la solución de KOH en el respirómetro.

El funcionamiento del respirómetro es el siguiente, la muestra se coloca en el matraz por lo que se le denominó cámara de degradación, una vez cerrado el respirómetro, mediante una jeringa, se adicionan al tubo de ensaye 10 ml de una solución valorada de KOH. El CO₂ producido por el metabolismo microbiano es absorbido por el KOH y el KOH residual se determina por volumetría. Para cada determinación de CO₂ la solución de KOH se extrae con una jeringa, una vez vacío el sistema se airea extrayendo aire desde el tubo con la jeringa (3 veces aproximadamente) y finalmente se recarga el tubo con 10 ml de solución nueva de KOH.

Del KOH extraído se toman 4 ml, se adicionan 0.5 ml de una solución de BaCl₂ 2N para precipitar CO₃⁻² formado, y finalmente se titula con una solución valorada de HCl utilizando fenolftaleína como indicador.

Determinación de CO₂

Las reacciones que se llevan a cabo durante la determinación de CO₂ son las siguientes:



Con las reacciones anteriores se obtuvo la siguiente ecuación que se utilizó para calcular la producción de CO₂.

$$\text{molCO}_2 = \left[\frac{(\text{N}_{\text{KOH}} * \text{V}_{\text{KOH}}) - (\text{N}_{\text{HCl}} * \text{V}_{\text{HCl}})}{2} \right] * 2.5$$

N_{KOH} = Normalidad de la solución valorada de KOH

V_{KOH} = Volumen de solución de KOH titulado (0.004 l).

N_{HCl} = Normalidad de la solución valorada de HCl.

V_{HCl} = Volumen de solución de HCl utilizado para titular (l).

3.7.2. ESPECTROFOTOMETRÍA.

Se utilizó un espectrofotómetro “Shimadzu-UV” a una longitud de onda de 276 nm. Con un coeficiente de absorción molar (ξ) para el naftaleno de 1.7×10^8 l/(mol. cm).

3.7.3. HPLC

La determinación de naftaleno se realizó por HPLC utilizando una bomba binaria LC 250 “Perkin Elmer”, una columna de fase inversa ODS2 “Spherisorb”, un detector de UV/VIS “Perkin Elmer” LC 290 y un integrador 1020 LC Plus “Pe Nelson”, bajo las siguientes condiciones de operación:

Longitud de Onda (λ): 276 nm
Flujo: 1.8 ml/min
Presión: 2800 psi
Temperatura: Ambiente
Fase Móvil: Agua : Acetonitrilo (1:1)
Tiempo de Retención: 10.24 min

3.7.4. EXTRACCIÓN POR SOXHLET (EPA, Método 3540)

Es un procedimiento para extraer componentes no volátiles y volátiles de sólidos como suelos, lodos y desechos. Inicialmente las muestras deben estar libres de objetos extraños (hojas, varillas, rocas, etc.). Posteriormente se mezcla una cantidad igual de la muestra con sulfato de sodio anhidro y se coloca en el dedal de extracción. Se colocan en el matraz de ebullición (250 ml) 140 ml de solvente de extracción (solución 1:1 hexano:acetona) y algunas perlas de ebullición. Se monta el soxhlet y la extracción se realiza de 16 a 24 h. Una vez finalizada la extracción, el solvente es analizado por HPLC.

3.7.5. HUMEDAD

La determinación de humedad del suelo se realizó por peso seco. En una charola de aluminio a peso constante se pesan de 1 a 3 g de muestra, todo se coloca en una estufa a 85°C durante 24 h, finalmente se pesa la charola con la muestra y la humedad se determina mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Humedad} = \left(\frac{\text{PMH} - \text{PMS}}{\text{PMH} - \text{PCh}} \right) * 100$$

PMH : Peso de muestra húmeda

PMS : Peso de muestra seca

Pch : Peso de la charola

3.7.6. ACTIVIDAD DE AGUA

La actividad de agua (A_w) se determinó mediante un equipo “Aqua Lab CX-2”.

3.7.7. pH

El pH se midió con un potenciómetro “Conductronic pH 20” utilizando un electrodo combinado sellado referencia plata cloruro de plata (Ag/AgCl).

3.7.8. VALORACIÓN DE SOLUCIONES

Valoración de KOH

La solución de KOH se valoró con biftalato de potasio (Christian, 1988). Se pesa con exactitud una porción de biftalato de potasio (BFP) seco de aproximadamente 300-900 mg y se transfiere a un matraz Erlenmeyer de 150 ml, se adicionan 50 ml de agua, se añaden de 2 a 3 gotas de indicador de fenolftaleína y se titula con la solución de KOH hasta el punto final color rosa pálido. Este color debe persistir por lo menos 30 seg. Se calcula la normalidad del KOH, basándose en el peso de BFP empleado (mg_{BFP}) y en el peso fórmula de BFP ($\text{pf}_{\text{BFP}} = 204.23$), utilizando la siguiente fórmula:

$$N_{\text{KOH}} = \left(\frac{\text{mg}_{\text{BFP}}}{\text{pf}_{\text{BFP}} * \text{ml}_{\text{KOH}}} \right)$$

Valoración de HCl

La valoración de la solución de HCl se realizó con la solución de KOH, la normalidad se calculó empleando la normalidad del KOH valorado (N_{KOH}), el volumen de KOH empleado para titular (V_{KOH}) y el volumen de HCl titulado (V_{HCl}), utilizando la siguiente fórmula:

$$N_{\text{HCl}} = \left(\frac{N_{\text{KOH}} * V_{\text{KOH}}}{V_{\text{HCl}}} \right)$$

3.8. CÁLCULOS

3.8.1. VALORES DE CO₂ GRAFICADOS

La producción neta de CO₂ que se grafica en todos los experimentos de biodegradación se calculó por la diferencia de producción de CO₂ de cada tratamiento (CO_{2FC}) menos la de su testigo (CO_{2T}), la cual corresponde al mismo tratamiento sin la adición del compuesto de interés, de esta manera solamente se grafica la producción de CO₂ proveniente de la degradación del compuesto a estudiar.

$$\text{CO}_2 = \text{CO}_2_{\text{FC}} - \text{CO}_2_{\text{T}}$$

3.8.2. PORCENTAJES DE MINERALIZACIÓN

Los porcentajes de mineralización se calcularon de la siguiente manera: con la cantidad de CO₂ producido se calculó el por ciento de compuesto degradado considerando la completa transformación del compuesto a CO₂.

3.8.3. VELOCIDADES DE PRODUCCIÓN DE CO₂

Las velocidades de producción de CO₂ (V) calculadas para cada una de las cinéticas se determinaron de la siguiente manera:

1. Los datos experimentales se ajustaron a un polinomio con un coeficiente de correlación (R^2) mayor de 0.92.
2. Se determinó teóricamente la cantidad de CO₂ producido considerando una degradación del 30% del compuesto, la cual corresponde en todas las cinéticas a la fase exponencial del cultivo.
3. El valor obtenido es evaluado en el polinomio para obtener el tiempo de degradación.
4. Se calcula la primera derivada del polinomio y se evalúa el tiempo calculado para obtener la velocidad puntual a la cual se degradó el 30% del compuesto inicial.

Para determinar las diferencias estadísticas entre las velocidades de cada tratamiento se utilizaron pruebas de t-Student con un nivel de significancia de 0.05. Se utilizó esta prueba debido a que se tenía la mínima cantidad de repeticiones ya que todos los experimentos se realizaron por duplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN, SORCIÓN Y DESORCIÓN

Estos estudios fisicoquímicos se realizaron con la finalidad de determinar el comportamiento del naftaleno en la presencia y ausencia del suelo, además determinar el efecto del Tritón X-100 en condiciones abióticas.

4.1.1. PARÁMETROS TEÓRICOS

Para realizar los estudios de disolución, sorción y desorción es necesario conocer algunos parámetros específicos. En la Tabla 4.1 se presentan algunos parámetros fisicoquímicos de naftaleno y de Tritón X-100 así como algunas características que describen su comportamiento en la presencia del surfactante.

Tabla 4.1. Parámetros fisicoquímicos de naftaleno y Tritón X-100.

	Naftaleno
^a Peso Molecular	128
^b Solubilidad (mg/l) ^{25°C}	30
¹ CMC (mol/l)	1.7×10^{-4}
² MSR (mol nf/mol Tritón X-100)	3.38×10^{-1}
	Tritón X-100
^c Peso Molecular	625
³ log Km	4.64
⁴ Q _{max} (mg/g suelo seco)	12.7

^a Concentración micelar crítica

² Coeficiente de solubilización molar

¹ Coeficiente de partición

⁴ Constante de sorción. Valor obtenido para el suelo no contaminado utilizado en esta tesis

^{a, b} Merck Index

^c Sigma Chemical

El coeficiente de solubilización molar (MSR) se define como el número de moles de un compuesto orgánico solubilizado por mol de surfactante adicionado en solución. El MSR es una medida de la efectividad de un surfactante para solubilizar un cierto compuesto (Edwards y col., 1991).

La CMC representa un pequeño rango de concentraciones sobre el cual la pendiente de la curva que se obtiene cuando se grafica la concentración de surfactante contra alguna de sus propiedades como tensión superficial, presenta un cambio significativo en su valor (Liu y col., 1992).

La cantidad de surfactante que es sorbido por el suelo se le conoce como Q_{max} , es definido como el número de moles de surfactante sorbido por gramo de suelo (base seca). El Q_{max} reportado en la Tabla 4.1 es específico para el tipo de suelo no contaminado utilizado en estos experimentos el cual fue obtenido por Medina (1997).

El parámetro K_m representa la partición del compuesto orgánico entre la pseudofase no-polar y polar, cuantifica la fracción mol del contaminante en la fase micelar por la fracción en la fase acuosa (Edwards y col., 1991).

4.1.2. CINÉTICA DE DISOLUCIÓN

Para determinar el efecto que tiene el surfactante (Tritón X-100) en la solubilización de naftaleno en agua se realizó una cinética de disolución. En la Figura 4.1 se presenta la cinética de disolución de naftaleno en la presencia de Tritón X-100 a una concentración de 20 y 10 CMC comparadas con el control (ausencia de surfactante).

En la presencia de Tritón X-100 a una concentración de 10 CMC se obtiene una velocidad de disolución de 9.32 mg/l h y para 20 CMC de 9.58 mg/l h, estas velocidades no presentan diferencias significativas entre ellas, sin embargo comparando estas velocidades con la obtenida en la ausencia de surfactante (4.4 mg/l h) si se observa una diferencia significativa, las velocidades con surfactante son dos veces más grande que la del control.

Las velocidades obtenidas en presencia de Tritón X-100 indican que la cantidad de surfactante es suficiente para solubilizar totalmente el naftaleno inicial adicionado (aprox. 35 ppm). El MSR para naftaleno en la presencia de Tritón X-100 es de 3.38×10^{-1} moles de naftaleno/moles de Tritón X-100 (Tabla 4.1) por lo que la cantidad necesaria para solubilizar 35 ppm es aproximadamente de 4 veces la CMC, lo cual indica que hay un exceso de surfactante con las dos concentraciones evaluadas y es de esperarse que no halla diferencias significativas entre ellas.

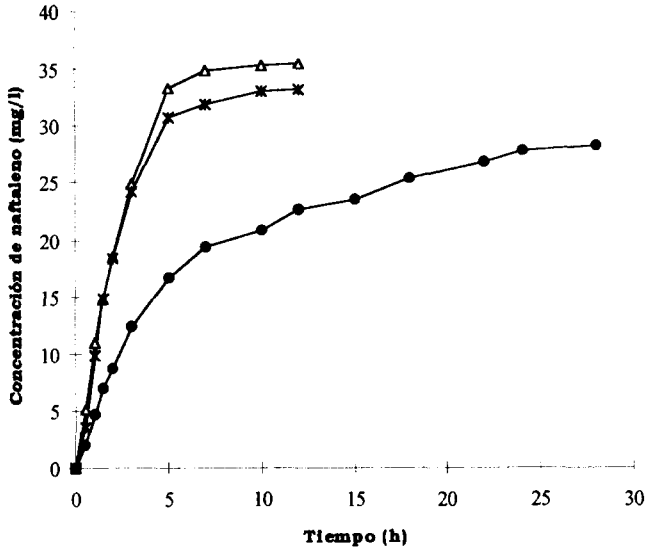


Figura 4.1. Cinética de disolución de naftaleno en agua en la presencia de Tritón X-100 a una concentración de 10 (–Δ–) y 20 (–*–) veces la concentración crítica micelar (CMC) comparada con el control sin surfactante(–●–).

Las diferencias de velocidad obtenidas en la presencia del surfactante indican que en este caso la solubilización de naftaleno es un fenómeno micelar, esto es, que el compuesto es atrapado en el interior de las micelas. Los resultados obtenidos son comparables con los de Volkering y col., (1995) ellos encontraron que a concentraciones por debajo de la CMC no hay ningún efecto en la disolución de naftaleno mientras que la presencia de micelas aumenta los niveles de solubilidad.

Con estos resultados se puede concluir que la adición de Tritón X-100 aumenta tanto la velocidad de solubilización de naftaleno como la cantidad solubilizada, mediante un fenómeno micelar.

Estos resultados fueron utilizados para determinar el tiempo de saturación de naftaleno en solución acuosa en la ausencia de Tritón X-100 (aproximadamente 24 h), para poner en marcha la metodología de experimentos posteriores.

4.1.3. CINÉTICA DE SORCIÓN

Para estudiar el comportamiento de un compuesto orgánico hidrofóbico en el suelo es necesario determinar ciertos parámetros como son el tiempo y la capacidad de saturación específicos para el tipo de suelo utilizado.

En la Figura 4.2 se presenta la cinética de sorción de naftaleno en el suelo no contaminado. Se puede observar que inicialmente la velocidad de sorción de naftaleno es muy rápida, después de 10 h la sorción se vuelve casi constante llegando a una concentración de saturación de 0.04 mg naftaleno/g suelo seco para la relación suelo:agua empleada (1:8). Con estos resultados se observa que es suficiente exponer el naftaleno con el suelo por lo menos 10 h para obtener un suelo contaminado artificialmente.

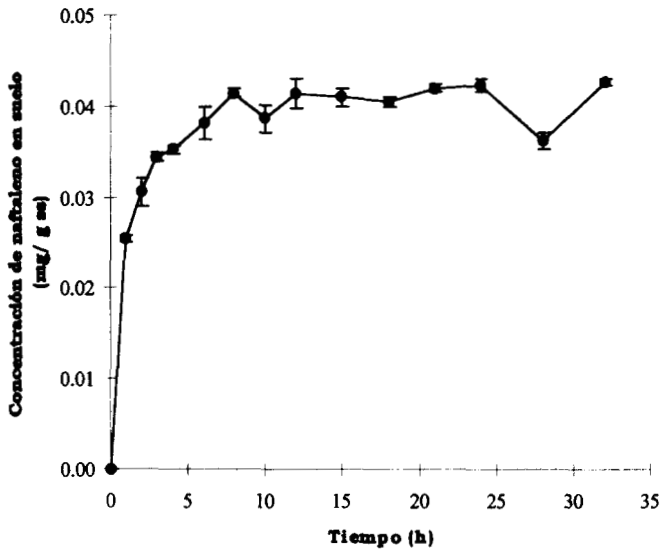


Figura 4.2. Cinética de sorción de naftaleno en el suelo no contaminado estéril.

El tiempo de sorción es muy importante ya que de él depende la naturaleza de las interacciones entre el compuesto con los agregados del suelo. En muchos casos los procesos de sorción y desorción de compuestos hidrofóbicos en partículas o agregados naturales son de tipo bimodal, ya que ocurren a diferentes velocidades, una velocidad inicial muy rápida y posteriormente una velocidad muy lenta que es la mas importante, ya que en esta etapa es donde se forman las interacciones mas fuertes entre el suelo y el contaminante (Pignatello y Xing, 1996).

En este experimento de la misma manera, inicialmente la sorción presenta una velocidad inicial muy rápida y al parecer es seguida de otra velocidad mucho mas lenta que puede confundirse con un estado de equilibrio. Muchas investigaciones han demostrado que las cinéticas de sorción son complejas y es poco probable encontrar el verdadero equilibrio (Pignatello y Xing, 1996).

Entre mayor tiempo de exposición del contaminante con el suelo mayor es la fuerza de sorción y por lo tanto mas difícil su remoción. Se ha demostrado que la fracción lenta en los procesos de sorción de algunos plaguicidas aumenta conforme aumentan los tiempos de contacto en el medio ambiente (Pignatello y Xing, 1996).

En el presente trabajo es importante disponer de un suelo contaminado artificialmente con tiempos de exposición prolongados y de esta manera poder comparar los resultados con aquellos suelos contaminados por periodos largos. Con estos resultados se prepararon dos tipos de suelo contaminado con naftaleno, uno con tiempo de exposición de 24 h y otro con un tiempo de 4 meses.

4.1.4. ISOTERMA DE SORCIÓN

La capacidad de saturación del suelo se obtiene mediante una isoterma de sorción. En la Figura 4.3 se presenta la isoterma de sorción, en la cual se puede observar que la curva obtenida es del tipo logarítmico, lo cual no es típico de este tipo de procesos de sorción de compuestos hidrofóbicos. En otros estudios se ha demostrado que la sorción de solutos hidrofóbicos orgánicos al suelo puede ser descrita por una isoterma de tipo lineal (Mihelcic y Luthy, 1988). En este experimento se obtuvo una isoterma no-lineal, el proceso de sorción

es descrito por una isoterma de tipo III, la cual es convexa al eje de las abscisas. Las isotermas del tipo III son de sorción en multicapa, este tipo de isotermas no muestran efectos de saturación, la sorción del compuesto ocurre en la parte superior de una capa químicamente ya sorbida (Adamson, 1960).

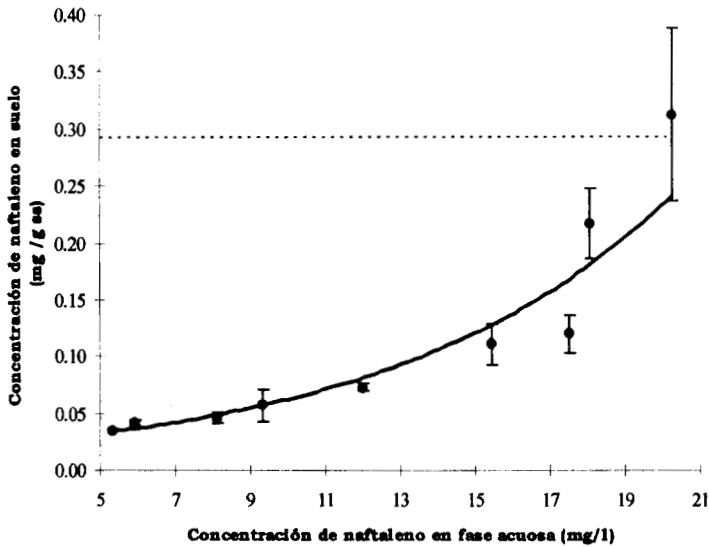


Figura 4.3. Isoterma de sorción de naftaleno en el suelo no contaminado con un contenido de materia orgánica del 3.64%.

Este comportamiento es atribuido al bajo contenido de materia orgánica (3.64%) que presenta este suelo, el cual es comparable con los resultados de Sheng y col., (1996) ellos obtuvieron isotermas de este tipo en la sorción de tricloroetileno y tetracloruro de carbono en tres tipos de arcillas orgánicas, las cuales contienen concentraciones similares de materia orgánica. Las isotermas son progresivamente más lineares con incrementos de la fracción orgánica (Nzungu y col., 1996).

Con este tipo de comportamiento no se puede obtener una constante de saturación pero como se observa en la Figura 4.3 la máxima concentración de naftaleno sorbido en el suelo obtenida en este experimento fue de aproximadamente 0.3 mg de naftaleno/g suelo seco.

Con estos resultados se obtuvo la relación agua:suelo necesaria para establecer la metodología de los experimentos de desorción y degradación.

4.1.5. CINÉTICA DE DESORCIÓN

Para determinar el efecto que tienen los surfactantes en la biodisponibilidad y biodegradación de naftaleno sorbido al suelo, es necesario conocer el efecto que tienen tanto en los procesos bióticos como en los abióticos y conocer de esta manera el proceso que controla la degradación.

En la Figura 4.4 se presenta el efecto de la adición de Tritón X-100 a diferentes concentraciones en el porcentaje de desorción de naftaleno inicial, previamente sorbido por 24 h al suelo. En todos los tratamientos durante las primeras 10 h se observa la mayor velocidad de desorción y posteriormente la velocidad disminuye hasta llegar a una concentración aparentemente constante. En el caso del control (sin surfactante) se observa inicialmente el mismo comportamiento pero después de las 10 h existe una readsorción del naftaleno en el suelo para posteriormente alcanzar el equilibrio, en tanto que los tratamientos con surfactantes la concentración en la fase acuosa tiende a aumentar lentamente. Esta concentración en la fase acuosa se debe a la solubilización de naftaleno mediante la formación de micelas las cuales son muy estables en solución y no permite la readsorción del contaminante al suelo.

En las curva de desorción obtenida en la presencia de Tritón X-100 a una concentración de 20 CMC al inicio se presenta una velocidad muy rápida (10 h) y posteriormente se observa otra pendiente que corresponde a una etapa de desorción lenta. Cornelissen y col., (1997) obtuvieron un comportamiento similar en la desorción de tricloroetileno. La desorción de un contaminante del suelo es típicamente bifásica, la mayoría de los contaminantes desorben en un corto tiempo y la remoción de la fracción restante es mucho mas lenta (Kan y col., 1997).

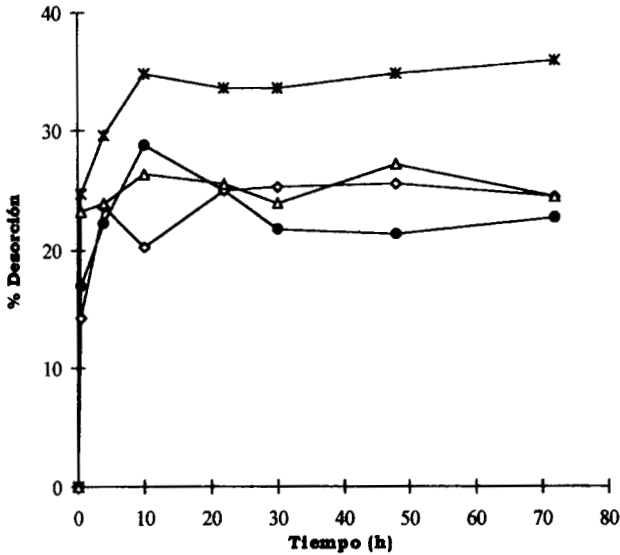


Figura 4.4. Efecto de la adición de Tritón X-100 a diferentes concentraciones en la desorción de naftaleno del suelo contaminado artificialmente durante 24 h. Control (sin surfactante) -●-; 20 CMC -*-; 10 CMC -Δ-; 0.5 CMC -○-.

Se observa en la Figura 4.4 que a concentraciones de 0.5 y 10 veces la CMC se obtiene una desorción del 25% la cual es similar a la obtenida con el control (21 %), por lo que no hay ningún efecto positivo a estas concentraciones. Estos resultados son explicados por la sorción del Tritón X-100 en el suelo, el cual disminuye notablemente la disponibilidad del surfactante. La capacidad de sorción (Q_{max}) de Tritón X-100 para este suelo fue de 12.7 mg/g ss (Tabla 4.1), lo cual indica que a estas concentraciones prácticamente todo el surfactante es sorbido por el suelo quedando en solución muy poco para ser utilizado en la desorción de naftaleno. Liu y col., (1992) demostraron que la sorción de los surfactantes al suelo disminuye la cantidad disponible para la solubilización micelar y aumenta el transporte de los compuestos orgánicos en los poros del suelo.

Para la concentración de 20 veces CMC (2.2 g/l) se obtiene un 38% de desorción de naftaleno, el cual es significativamente mayor que el control. Generalmente en la presencia de surfactantes solamente un pequeño porcentaje del compuesto sorbido al suelo se distribuye en la fase acuosa. Similarmente, Aronstein y col., (1991) obtuvieron únicamente una desorción del 20% del fenantreno inicialmente adicionado.

La adición de surfactantes al suelo en procesos en lote únicamente incrementa la desorción de los compuestos hidrofóbicos en un pequeño porcentaje y para obtener la desorción completa sería necesario realizar lavados sucesivos del suelo a esta concentración o realizar la desorción con lavados en continuo. Estas observaciones pueden ser respaldadas por los resultados obtenidos por Edwards y col., (1994 b) ellos encontraron que en la desorción de pireno con Tritón X-100 los lavados sucesivos con concentraciones pequeñas de surfactante remueven mas compuestos hidrofóbicos del suelo por unidad de surfactante que una sola lavada a concentraciones mayores. Aunque también se ha reportado que aproximadamente el 50 % del total de los contaminantes son sorbidos irreversiblemente en el suelo, por lo que nunca se obtendrá una desorción completa (Kan y col., 1997).

Debido a que el Tritón X-100 a una concentración de 20 CMC aumenta la desorción de naftaleno en el suelo mediante un fenómeno micelar se determinó su influencia en la biodegradación a esta misma concentración.

Conclusiones

La adición de Tritón X-100 a una concentración de 20 CMC aumenta 2 veces la velocidad de solubilización de naftaleno mediante un fenómeno micelar, también aumenta la cantidad solubilizada. La adición del surfactante a esta concentración aumenta significativamente la desorción abiótica de naftaleno en el suelo en un 38%, mientras que a concentraciones de 10 y 0.5 CMC se obtiene un 25%.

4.2. CAPACIDAD DEGRADATIVA DEL SUELO

Para realizar los experimentos de degradación en el suelo es necesario determinar inicialmente si el suelo por si mismo tiene la capacidad de degradar el compuesto contaminante (naftaleno) comparado con la degradación de otros sustratos conocidos. Los experimentos se realizaron con el suelo no contaminado en condiciones insaturadas (28% de humedad).

En la Figura 4.5 se presenta la producción de CO_2 proveniente de la degradación de la materia orgánica del suelo (controles sin fuente de carbono adicional) que corresponde a la respiración propia de este. Se grafica la evolución de CO_2 obtenida para los dos tipos de tratamientos utilizados, que corresponden a los dos diferentes métodos de adición de las fuentes de carbono.

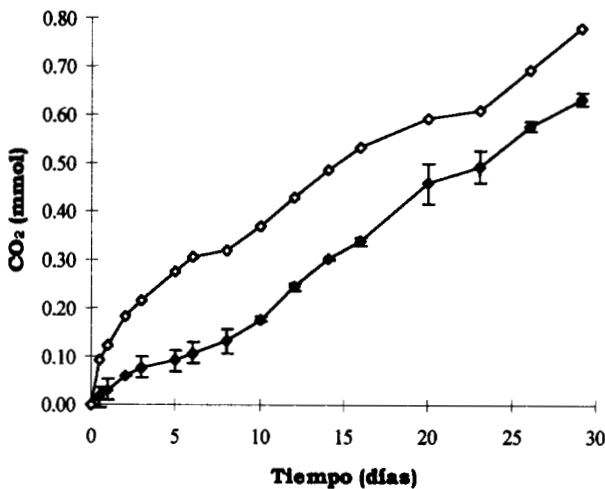


Figura 4.5. Cinética de producción de CO_2 proveniente de la degradación de la materia orgánica del suelo correspondiente a los controles empleados (sin fuente de carbono adicional). El símbolo \diamond corresponde al control de naftaleno (adicionando acetona en 1 g de suelo seco) y \blacktriangle corresponde al control de glucosa y glicerol.

Para el control de naftaleno que corresponde a la adición de acetona en 1 g de suelo seco hasta el día 30 se obtuvo una producción de 0.78 mmol de CO₂, esto equivaldría únicamente a la producción obtenida por 25 mg de glucosa, mientras que para el control de glucosa y glicerol se obtuvieron 0.63 mmol. La producción de CO₂ que se obtuvo se debe a la respiración propia del suelo, la cual es muy baja e indica que la mayor parte de la materia orgánica presente en el suelo (3.6%) es de difícil asimilación.

La diferencia de CO₂ obtenida por los dos controles (0.15 mmol) puede deberse a la heterogeneidad del suelo. Sharabi y Bartha (1993) obtuvieron los mismos resultados con los dos tratamientos, ellos atribuyen esta diferencia a la mineralización de la biomasa muerta generada en el proceso de secado y también a la disponibilidad de materia orgánica generada por algunos cambios físicos causados por el secado y el rehumedecimiento del suelo. Aún con las diferencias de CO₂ obtenidas se puede observar en la Figura 4.5 que la producción de CO₂ es similar para los dos tratamientos empleados.

En la Figura 4.6 se presenta la cinética de producción de CO₂ del suelo suplementado con diferentes fuentes de carbono de fácil (glucosa y glicerol) y difícil asimilación (naftaleno), el CO₂ graficado por la degradación de cada una de las fuentes de carbono se determinó restando los controles correspondientes que se presentaron en la Figura 4.5. También se presentan los porcentajes de degradación correspondientes para cada sustrato a los 10 días y al final del proceso.

La evolución de CO₂ que se obtuvo para cada una de las fuentes de carbono utilizadas varía de acuerdo a la complejidad y composición química de la molécula. En la Figura 4.6 se puede observar que en los primeros 10 días de cultivo la glucosa se consumió hasta un 56.8%, mientras que el glicerol solamente se consumió el 32%. Después de los 30 días de cultivo, el glicerol se degradó hasta un 83.2%, mientras que la glucosa hasta un 70%. La velocidad inicial de producción de CO₂ para la glucosa es mayor que la velocidad inicial del glicerol, en la cual la fase exponencial termina aproximadamente hasta el día 26.

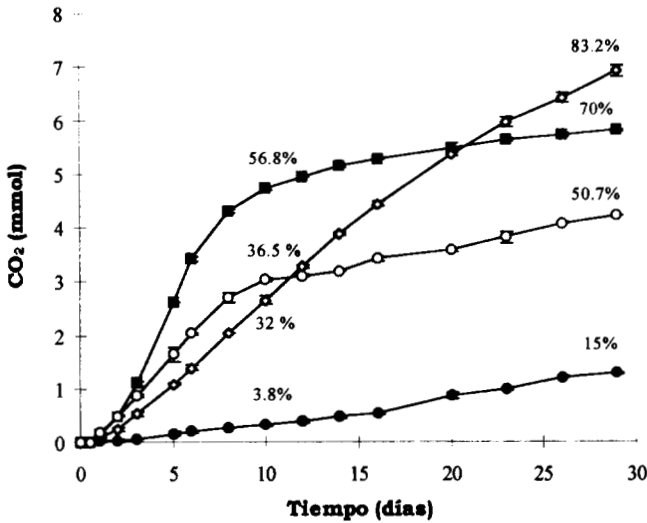


Figura 4.6. Cinética de producción de CO_2 del suelo no contaminado suplementado con diferentes fuentes de carbono, durante 30 días de cultivo a 30°C . Fuentes de carbono; glucosa (■), glicerol (△), naftaleno (●) y glucosa-naftaleno (▽).

Los porcentajes de degradación obtenidos para la glucosa y el glicerol son mayores que los coeficientes de rendimiento que se obtienen normalmente en el metabolismo aerobio (0.3-0.5), esto puede atribuirse a la mineralización gradual del carbono que se utiliza inicialmente para la formación de biomasa, lo cual sucede generalmente en experimentos prolongados de más de un mes de cultivo. También puede atribuirse a la mineralización de la materia orgánica del suelo, la cual es estimulada por la presencia de algunos sustratos exógenos (Sharabi y Bartha, 1993).

En la Figura 4.6 también se observa la cinética de producción de CO_2 debida a la degradación de naftaleno, la cual comparándola con las cinéticas anteriores hasta el día 10 solamente se había degradado un 3.8% del naftaleno inicial, del día 16 hasta el día 30 se observa un ligero aumento en la velocidad de producción de CO_2 , este aumento fue acompañado con la aparición gradual de un hongo de aspecto blanquecino, el cual tal vez sea el responsable del consumo del naftaleno. Finalmente en el día 30 se obtuvo solamente un 15% de degradación.

Estos resultados muestran que este tipo de suelo tiene una buena capacidad degradativa de sustratos de fácil asimilación, además también es un indicativo de que contiene una población microbiana activa, lo cual es típico de suelos agrícolas (Scrivasa y Loehr, 1991). Sin embargo también muestran que este suelo tiene una baja capacidad para degradar compuestos poliaromáticos de bajo peso molecular como es el caso del naftaleno.

La baja capacidad degradativa del suelo por el naftaleno puede atribuirse a diferentes aspectos: (i) el suelo presenta una baja población microbiana con la capacidad de degradar este tipo de compuestos aromáticos; (ii) la concentración empleada de 4.2 g/l resultó tóxica a los microorganismos; (iii) el naftaleno fue sorbido por la materia orgánica disminuyendo así su disponibilidad a los microorganismos y (iv) las condiciones de cultivo no fueron las favorables para la degradación de estos compuestos, como podría ser el pH (4.5) o la falta de algún tipo de nutriente.

Con glucosa y glicerol se obtuvieron cinéticas características de producción de CO₂ durante los 30 días de cultivo.

La cinética de producción de CO₂ debido a la mezcla glucosa-naftaleno presenta un perfil similar al obtenido con la cinética de glucosa (ver Figura 4.6), hasta el día 10 se obtuvo un 36.5% de degradación, el cual al parecer corresponde únicamente a la degradación de la glucosa, a partir del día 16 se observa otro ligero aumento de producción de CO₂ lo cual es similar a los resultados obtenidos en la cinética de naftaleno, este segundo aumento también corresponde con la aparición del hongo, finalmente se obtuvo en el día 30 de cultivo un 50.7% de degradación.

Conclusiones

El suelo presenta una buena capacidad degradativa de compuestos de fácil asimilación como glucosa o glicerol. Pero presenta una baja capacidad para degradar compuestos poliaromáticos de bajo peso molecular como es el caso de naftaleno, por lo que es necesario adicionar un inóculo externo en los experimentos posteriores de degradación para acelerar el proceso y de esta manera no tener limitaciones por la actividad microbiana.

4.3. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

Para aumentar la actividad microbiana del suelo hacia los compuestos poliaromáticos se aislaron de un suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos aquellos microorganismos capaces de degradar naftaleno como única fuente de carbono, el aislamiento se realizó mediante dos métodos para aumentar las probabilidades de obtención de un consorcio microbiano.

4.3.1. MÉTODO DE DILUCIÓN EN PLACA

En la primera etapa se seleccionaron y se aislaron quince tipos diferentes de microorganismos a pH 7 y quince tipos diferentes a pH 5.5. De estos microorganismos en la segunda etapa solamente crecieron diez a pH 7 y siete a pH 5.5.

Finalmente, en la tercera etapa solamente lograron crecer seis tipos de bacterias a pH 7 y cuatro tipos de hongos a pH 5.5. En la Figura 4.7 se presentan las fotografías de las bacterias aisladas por este método y en la Figura 4.8 las fotografías de los hongos.

Todos las bacterias aisladas presentaron diferencias morfológicas cuando crecieron con glucosa y cuando crecieron con naftaleno como única fuente de carbono.

4.3.2. MÉTODO DE ENRIQUECIMIENTO

La serie de transferencias continuas a intervalos frecuentes reduce la diversidad taxonómica de la comunidad microbiana degradadora de naftaleno, por lo que este es un buen método para obtener un consorcio microbiano específico.

Al final de cinco transferencias sucesivas se obtuvieron dos consorcios microbianos, uno a pH 7 y otro a pH 5.5 con un buen crecimiento celular.

Los cultivos del consorcio a pH 7 después de 48 h presentaban una consistencia viscosa, también después de este tiempo aún se podía percibir un fuerte olor a naftaleno, lo cual hacía suponer una alta concentración residual. En las primeras 12 h de cultivo el consorcio presentó una coloración amarilla, posteriormente a las 24 h una coloración verde

y finalmente a las 48 h una coloración café. En las diferentes etapas de coloración el pH final fue distinto. Cuando presentaron una coloración amarillo el pH fue de 6.33, con una coloración verde de 5.03 y con una coloración café de 5.62. La disminución del pH y la aparición del color puede atribuirse a la formación de intermediarios ácidos como el ácido salicílico. Mueller y col., (1990) encontraron en la degradación de fluoranteno por *Pseudomonas* cambios de color durante el cultivo lo cual corresponde a la aparición de intermediarios. En la Figura 4.9 se presentan las fotografías de las seis bacterias que se aislaron de este consorcio. Estas bacterias presentaron diferencias morfológicas cuando crecieron con naftaleno y cuando crecieron con glucosa.

El consorcio a pH 5.5 a las 24 h de cultivo presentó un aspecto turbio, durante el cultivo no presentó color alguno, al final del cultivo no se percibió ningún olor a naftaleno, lo cual hacía suponer que este consorcio podría tener una mayor capacidad para degradar el contaminante. El pH final fue de 3.52, lo cual también puede deberse a la formación de intermediarios ácidos.

En la Figura 4.10 se presentan las fotografías de los microorganismos aislados en este consorcio. Se pudieron aislar dos tipos diferentes de bacterias y un tipo de hongo. Las bacterias también presentaron diferencias morfológicas con naftaleno y con glucosa.

La cantidad de microorganismos aislados es el reflejo de la cantidad de hidrocarburos presentes en este suelo, en la Tabla 3.4 del capítulo 3 se puede observar que la cantidad de hidrocarburos aromáticos es considerable (13.7%) por lo que es de esperarse encontrar microorganismos con una gran capacidad para degradar este tipo de compuestos como el naftaleno.

No se realizó la identificación de cada uno de los microorganismos aislados. En muchos trabajos se ha publicado que el género de *Pseudomonas* y *Rhodococcus* son el tipo de bacterias que tienen la capacidad de degradar este tipo de compuestos (Mueller y col., 1990; Bouchez y col., 1995; Ryuichiro y Montes de Oca, 1993; Volkering y col., 1995; Grimberg y col., 1996). Es posible que alguno de los microorganismos aislados pertenezcan a alguno de estos géneros.

Para los experimentos posteriores de degradación se seleccionó el consorcio obtenido a pH 5.5 y fue suplementado con los microorganismos aislados por el método de dilución en placa. Este consorcio fue seleccionado debido a que el pH del suelo es ácido (4.5) y durante todo el proyecto se trabajó con las características originales del suelo.

Es bien documentado que los microorganismos puros aunque muestren capacidad degradativa, esta siempre será menor que la mostrada por un consorcio constituido por microorganismos nativos del hábitat modificado por la presencia de compuestos químicos extraños (Martínez, 1997)

Conclusiones

Del suelo contaminado se seleccionaron morfológicamente y se aislaron por el método de dilución en placa seis tipos de bacterias y cuatro tipos de hongos.

Por el método de enriquecimiento se obtuvieron dos consorcios microbianos, uno a pH 7 y otro a pH 5.5. Del consorcio a pH 7 se diferenciaron morfológicamente seis tipos de bacterias y del consorcio a pH 5.5 dos tipos de bacterias y un tipo de hongo. El consorcio a pH 5.5 se seleccionó para ser utilizado en los experimentos posteriores de degradación.

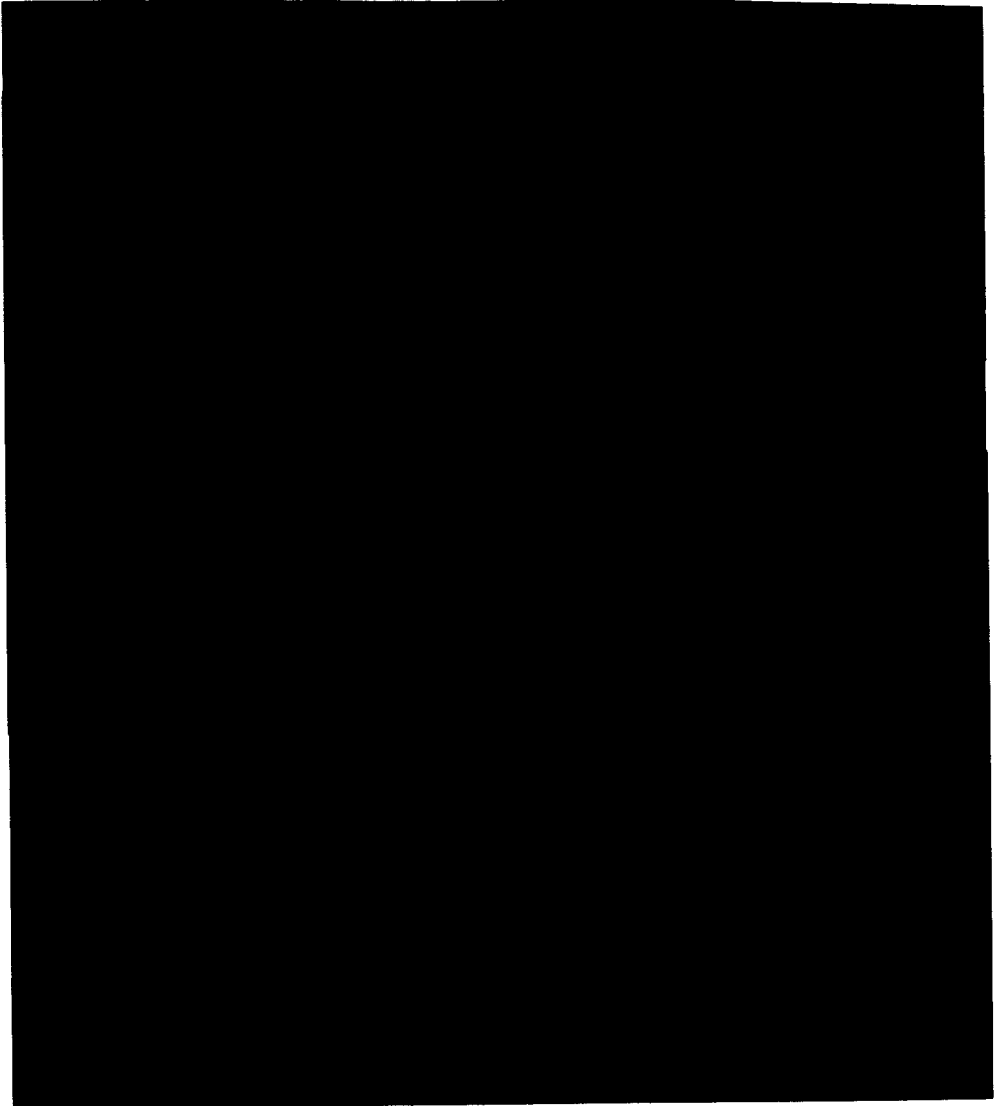


Figura 4.7. Bacterias degradadoras de naftaleno aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo por el método de dilución en placa.

225549



Figura 4.8. Hongos degradadores de naftaleno aislados de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo por el método de dilución en placa.

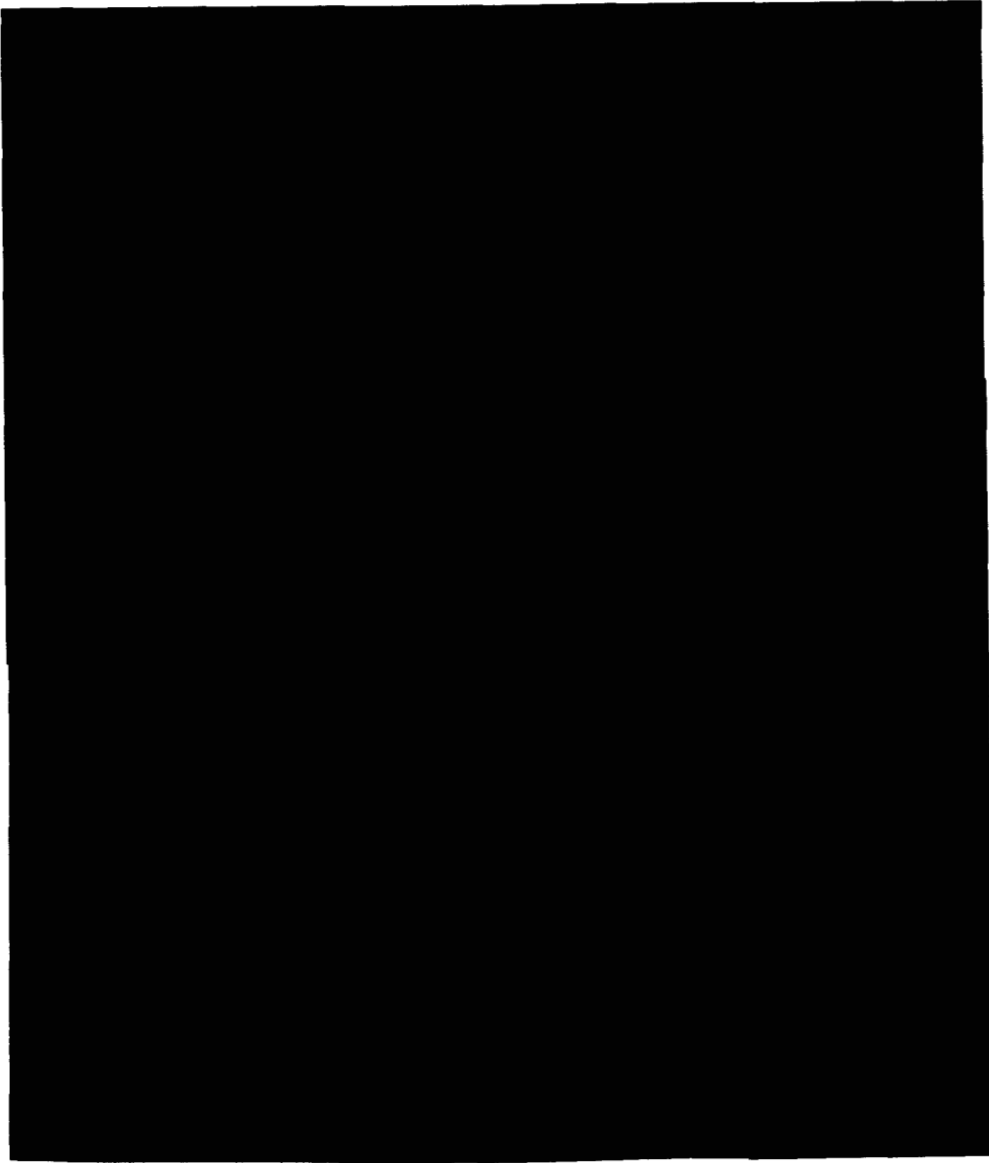


Figura 4.9. Microorganismos degradadores de naftaleno aislados de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo por el método de enriquecimiento a pH 7.

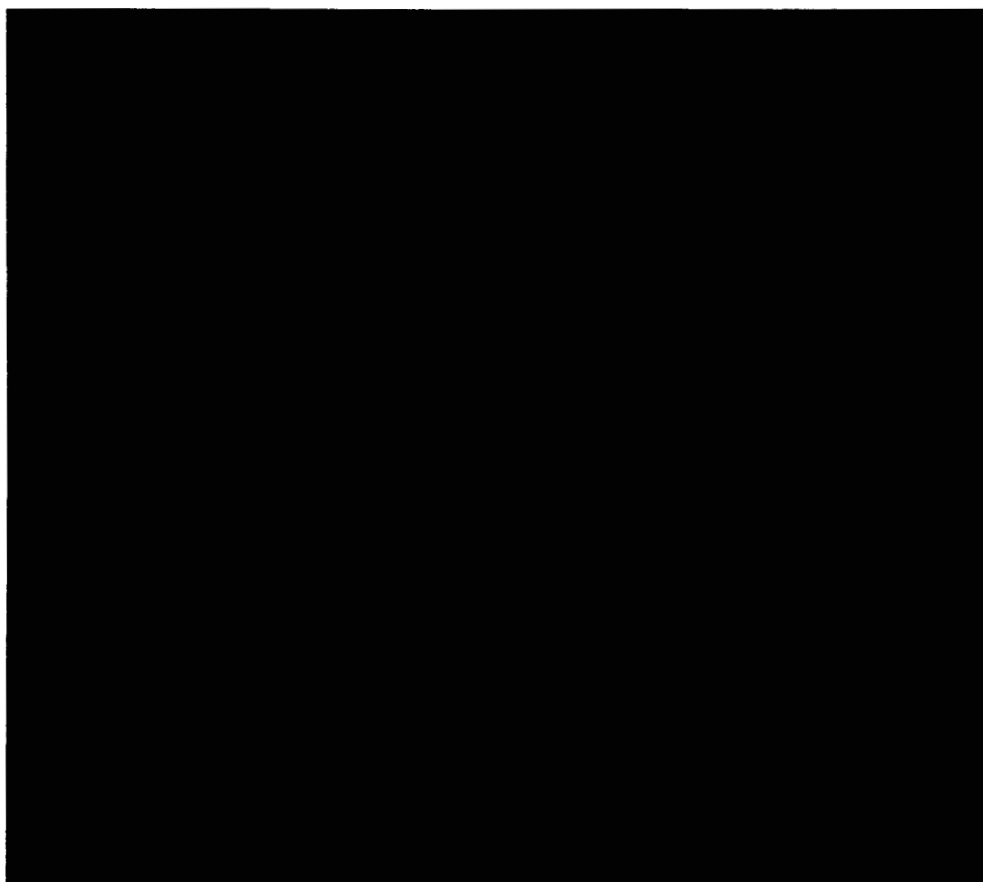


Figura 4.10. Microorganismos degradadores de naftaleno aislados de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo por el método de enriquecimiento a pH 5.5.

4.4. EFECTO DE TRITÓN X-100 EN LA DEGRADACIÓN DE NAFTALENO

Para determinar el efecto que tienen los surfactantes en la biodisponibilidad de los compuestos hidrofóbicos se realizaron tres experimentos de biodegradación de naftaleno, se obtuvieron cinéticas de producción de CO₂ en medio líquido sin suelo y cinéticas con suelo contaminado artificialmente en suspensión, con un tiempo de contaminación de 24 h y 4 meses.

4.4.1. CINÉTICAS EN MEDIO LÍQUIDO.

Para determinar el efecto del surfactante sobre la actividad microbiana se realizó una cinética de producción de CO₂ con Tritón X-100 como única fuente de carbono. En la Figura 4.11 se grafica la producción de CO₂ obtenida a partir de la degradación de Tritón X-100 a una concentración de 20 CMC, y se observa que hasta el día 10 de cultivo se obtiene una producción de 0.23 mmol de CO₂ que corresponde a la degradación del 2% del surfactante inicial, esto a su vez corresponde al 53% del surfactante que se encuentra soluble en forma de monómeros (0.110 g/l). Por lo que es posible que los microorganismos degraden únicamente al surfactante en forma de monómeros y no en la forma micelar. Otra alternativa es que el CO₂ producido provenga de la degradación parcial de las moléculas de Tritón X-100.

Se puede observar en la Figura 4.11 que la degradación del surfactante es lenta y la producción de CO₂ después de los 10 días de cultivo todavía no llega a su fase estacionaria por lo que es posible que continúe la producción en menor grado. Estos resultados muestran que la presencia de Tritón X-100 a esta concentración (20 CMC) no inhibe la actividad metabólica del consorcio utilizado, por lo que esta será la máxima concentración de surfactante que se probara en la degradación de naftaleno.

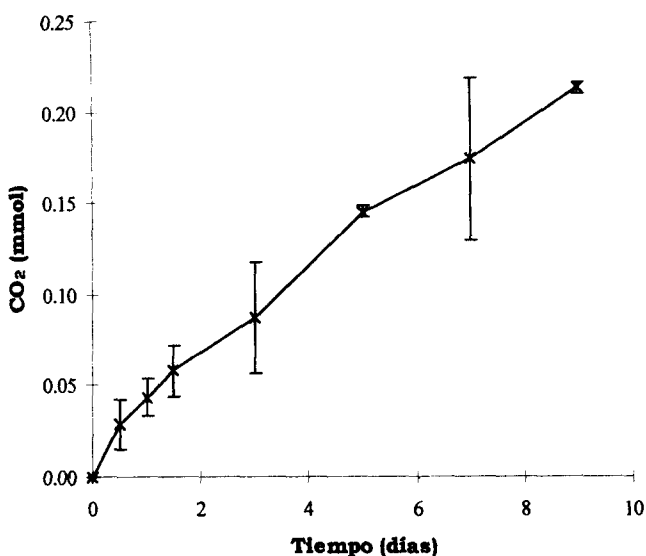


Figura 4.11. Cinética de producción de CO₂ a partir de la degradación de Tritón X-100 a una concentración de 20 CMC en medio líquido.

En la Figura 4.12 se presenta la cinética de producción de CO₂ a partir únicamente de la degradación de naftaleno en ausencia y en presencia de Tritón X-100 a una concentración de 20 CMC. Para determinar el CO₂ producido por la degradación de naftaleno en la presencia de Tritón se restó el control que corresponde a la degradación del surfactante presentado en la Figura 4.11. Se puede observar en la Figura 4.12 que inicialmente el naftaleno en la presencia de Tritón X-100 (20 CMC) es degradado a la misma velocidad que en la ausencia de surfactante, pero al final del proceso (10 días) en la ausencia del surfactante se observa una mayor producción de CO₂ que corresponde al 79% del naftaleno inicial, mientras que en la presencia de surfactante únicamente se llega a un 55% de degradación. Liu y col., (1995) obtuvieron un comportamiento cinético similar en medio líquido en la degradación de naftaleno con Tritón X-100.

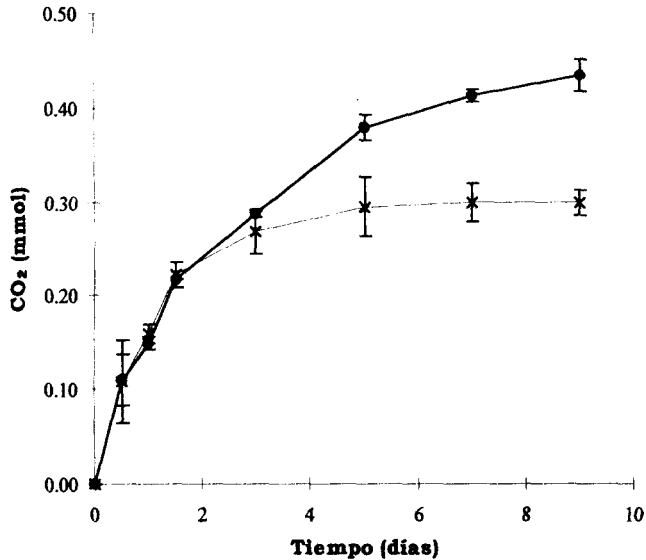


Figura 4.12. Cinética de producción de CO₂ por la degradación de naftaleno en medio líquido en la ausencia y presencia de Tritón X-100 a una concentración de 20 CMC. Sin surfactante (—●—) y 20 CMC (—*—). Los mmoles de CO₂ se obtuvieron de la diferencia del tratamiento menos el control (sin naftaleno).

La similitud en las velocidades de degradación con y sin surfactante se debe posiblemente a que al inicio del cultivo los microorganismos degradaron el naftaleno que quedó en solución, posteriormente la degradación se detiene debido a que el naftaleno en la fase micelar se encuentra menos disponible y por lo tanto comienza la degradación del mismo surfactante, lo cual explica las diferencias en cuanto al porcentaje de degradación obtenido.

La degradación de compuestos hidrofóbicos en la fase micelar todavía es objeto de estudio ya que no se sabe con exactitud el mecanismo de degradación. Volkering y col., (1995) mencionan que la presencia de micelas puede disminuir la concentración de los contaminantes en la fase acuosa y por ello reducir la tendencia a mineralizarlos. Aunque los HPA en las micelas son menos disponibles a los microorganismos la velocidad de salida y entrada son mucho más rápidas que la velocidad de degradación, por lo que no debería ser un factor limitante (Grimberg y col., 1996; Liu y col., 1995). Liu y col., (1995) sugieren que

ni las micelas del surfactante ni el naftaleno solubilizado en las micelas afecta la mineralización del contaminante.

La mayoría de los estudios de disponibilidad que se han publicado se han realizado en medio líquido por lo que es necesario determinar su efecto en presencia de barreras difusionales como en el suelo.

4.4.2. CINÉTICAS CON SUELO CON 24 h DE CONTAMINADO

Las siguientes cinéticas se realizaron con suelo contaminado artificialmente con un tiempo de contaminación con naftaleno de 24 h.

Inicialmente se determinó la degradación de Tritón X-100 en la presencia de suelo no contaminado (sin naftaleno). En la Figura 4.13 se presenta la producción de CO₂ a partir de la degradación del surfactante, la cual se determinó por la diferencia de la respiración del suelo mas el surfactante menos su control que corresponde a la respiración del suelo únicamente. Se observa que la presencia de Tritón X-100 a una concentración de 20 CMC no afecta la actividad microbiana al igual que en el caso de medio líquido. En los primeros tres días de cultivo hay una gran producción de CO₂ y posteriormente la velocidad disminuye notablemente.

De acuerdo con la Q_{max} (12.7 mg/g suelo seco) del surfactante para este suelo, el 74% del surfactante inicial es sorbido por el suelo, el 26% restante es utilizado para realizar el proceso de desorción y parte de esta fracción es utilizada como fuente de carbono para los microorganismos, de tal manera que los 0.4 mmol de CO₂ generados por la degradación del surfactante corresponden estequiométricamente al 5% de lo que se adicionó inicialmente (2.2. g/l). Este 5% corresponde a la cantidad de surfactante que se encuentra en forma de monómeros (1 CMC). Con estos resultados y los obtenidos en medio líquido se puede suponer que los microorganismos degradan únicamente al surfactante en forma de monómeros y no atacan al surfactante en forma micelar. Sin embargo no se descarta la segunda alternativa de que el CO₂ producido provenga de la degradación parcial de la molécula de Tritón X-100. Ya que con los resultados obtenidos solamente se pueden presentar posibles teorías que expliquen a nivel molecular la degradación del surfactante.

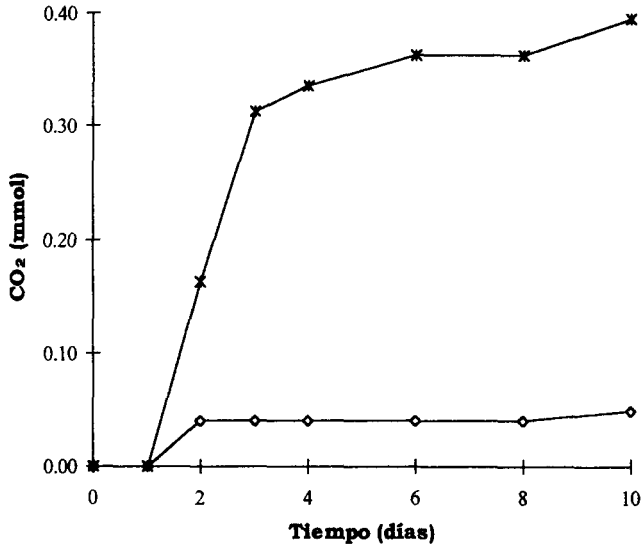


Figura 4.13. Cinética de producción de CO₂ a partir de la degradación de Tritón X-100 a una concentración de 0.5 (—◇—) y 20 CMC (—*—), en la presencia de suelo no contaminado en suspensión. Los mmoles de CO₂ se obtuvieron de la diferencia del tratamiento menos el control (suelo sin surfactante).

Comparando los porcentajes de CO₂ obtenidos por la degradación de Tritón X-100 en este experimento con los obtenidos en medio líquido se puede observar que en medio líquido se degradó únicamente el 2% del surfactante inicial, mientras que en la presencia del suelo se degrada un 5%. Esta diferencia indica que la presencia de barreras difusionales disminuyen la disponibilidad de estos compuestos disminuyendo también su toxicidad, ya que al ser sorbidos por el suelo disminuye su concentración en solución.

En la Figura 4.14 se presentan las cinéticas de producción de CO₂ a partir de la degradación de naftaleno con la adición de Tritón X-100 a una concentración de 20 y 0.5 CMC. El CO₂ graficado por la degradación de naftaleno se determinó restando los controles que se presentaron en la Figura 4.13, que corresponden a la respiración del suelo mas el surfactante, para el caso sin surfactante se resto el CO₂ proveniente de la respiración únicamente del suelo.

En la Figura 4.14 se puede observar que la presencia de Tritón a una concentración de 0.5 CMC aumenta ligeramente la producción de CO_2 comparada con el control, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa por lo que la presencia de Tritón a esta concentración no aumenta considerablemente la degradación de naftaleno.

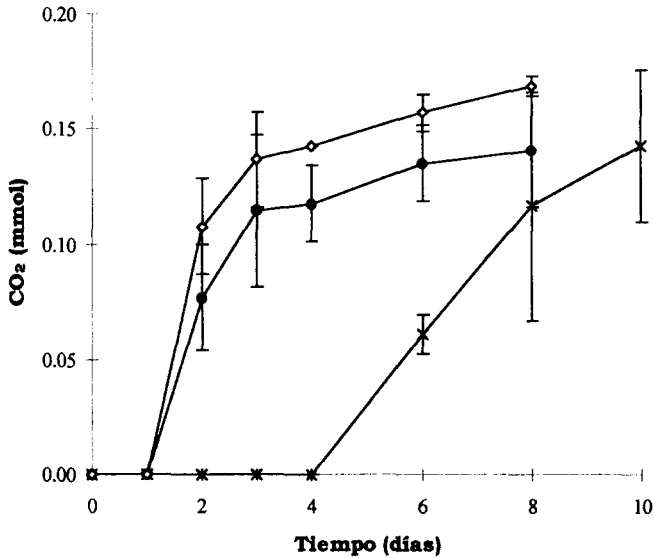


Figura 4.14. Cinética de producción de CO_2 a partir de la degradación de naftaleno sorbido en suelo en la ausencia y presencia de Tritón X-100. Las cinéticas fueron realizadas con suelo en suspensión con 24 h de contaminado. Sin surfactante (—●—), 0.5 (—◊—) y 20 CMC (—*—). Los mmoles de CO_2 se obtuvieron de la diferencia del tratamiento menos el control correspondiente.

La adición del surfactante a una concentración de 20 CMC retarda o inhibe inicialmente la degradación de naftaleno hasta el cuarto día del proceso, posteriormente comienza la degradación a una velocidad menor que la de los tratamientos anteriores. Pero finalmente se obtiene aproximadamente la misma producción de CO_2 que la del control que corresponde a una degradación del 87% de naftaleno inicial.

El inicio de la degradación de naftaleno en la presencia de Tritón a una concentración de 20 CMC corresponde aproximadamente al inicio de la fase estacionaria que se presentó en la Figura 4.13 por la degradación del surfactante a esta concentración, por lo que la fase de retardo en la degradación de naftaleno en la presencia del surfactante se puede atribuir a que los microorganismo utilizan preferencialmente al surfactante como fuente de carbono. Deschênes y col., (1996) obtuvieron resultados similares, ellos observaron que la degradación de fenantreno, en la presencia de sulfato dodecil de sodio (SDS), fue inhibida pero no completamente detenida, esto lo atribuyen a diferentes factores entre ellos que el surfactante compite con el fenantreno como sustrato y por lo tanto disminuye la velocidad de biodegradación del contaminante.

Con la metodología de respiración empleada en estos experimentos solamente es posible presentar algunas teorías especulativas que traten de explicar la interacción que hay entre el suelo, los microorganismos, el surfactante y el contaminante, ya que no se realizó un seguimiento completo del naftaleno, ni del surfactante. Por lo que la degradación preferencial del Tritón X-100 sobre el naftaleno puede atribuirse a varios factores: (i) al inicio del proceso el único sustrato que se encuentra disponible en solución es el surfactante ya que la desorción y la solubilización del naftaleno son mas lentos, (ii) por las diferencias de concentración de carbono que existen entre los dos tipos de sustratos adicionados ya que la concentración de Tritón en la fase acuosa es mayor que la de naftaleno, (iii) una mayor disponibilidad de las moléculas de Tritón que de las moléculas de naftaleno las cuales se encuentran en el interior de las micelas disminuyendo su disponibilidad para la degradación microbiana.

Para evitar excesos de surfactante en el sistema en estudio y de esta manera evitar el consumo preferencial del surfactante es necesario probar concentraciones de Tritón X-100 menores a 20 CMC.

En la Figura 4.13 se observa que para la concentración de 0.5 CMC de Tritón X-100 en la ausencia de naftaleno únicamente se producen 0.05 mmol de CO₂ a partir de este sustrato, esto se debe a que prácticamente todo el surfactante adicionado fue sorbido por el suelo y por lo tanto como se observa en la Figura 4.14 no tuvo ningún efecto positivo en la degradación de naftaleno.

Si estos resultados de biodegradación se comparan con los obtenidos en la cinética de desorción, la adición de Tritón X-100 a una concentración de 20 CMC presenta un efecto de retardo sobre la degradación de naftaleno, mientras que presenta un efecto significativo en su desorción, por lo que los surfactantes pueden ser una buena alternativa para lavar los suelos contaminados pero no necesariamente para aumentar o acelerar la degradación de los contaminantes. Existe en el mercado una serie de tecnologías de biorremediación mediante el lavado de suelos con surfactantes, en las cuales se obtienen niveles de recuperación menores del 90%, aunque este tipo de tecnologías presenta el inconveniente de que los contaminantes son transferidos a la fase acuosa por lo que después tienen que ser eliminados del medio líquido.

4.4.3. CINÉTICAS CON SUELO CON 4 MESES DE CONTAMINADO

Para comparar los resultados anteriores con los de un suelo contaminado artificialmente durante un mayor tiempo de exposición se realizaron cinéticas de degradación del naftaleno utilizando un suelo contaminado artificialmente con un tiempo de contaminación de 4 meses.

En la Figura 4.15 se presenta la producción de CO_2 obtenido a partir únicamente de la degradación de naftaleno en presencia de Tritón X-100 a dos concentraciones 5 y 15 CMC. El CO_2 graficado por la degradación de naftaleno se determinó restando los controles, que corresponden a la respiración del suelo mas el surfactante, para el caso sin surfactante se resto el CO_2 proveniente de la respiración únicamente del suelo.

Se puede observar en la Figura 4.15 que a una concentración de 5 CMC la velocidad inicial de degradación es mayor que la del control (sin surfactante), pero finalmente se produce la misma cantidad de CO_2 la cual corresponde al 93% de degradación. A una concentración de 15 CMC se observa una fase de retardo más prolongada que la del control por lo que la velocidad de producción de CO_2 es mas lenta y también se produce menos CO_2 (69%) al final del proceso. Este comportamiento es similar al obtenido a una concentración de 20 CMC en el experimento anterior (ver Figura 4.14), en donde se presentó una fase de retardo de 3 días, lo cual indica que a una concentración de 15 CMC ya comienza a presentarse este efecto. A esta concentración de 15 CMC el surfactante tampoco presenta un efecto positivo en la degradación de naftaleno.

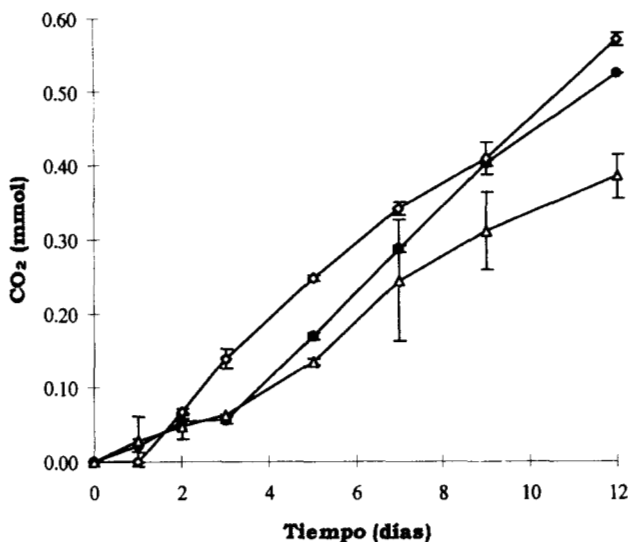


Figura 4.15. Cinética de producción de CO_2 a partir de la degradación de naftaleno sorbido al suelo en la ausencia y presencia de Tritón X-100. Las cinéticas fueron realizadas con suelo en suspensión con 4 meses de contaminado. Sin surfactante (●), 5 (○) y 15 CMC (△). Los mmoles de CO_2 se obtuvieron de la diferencia del tratamiento menos el control correspondiente.

De la misma manera que en la cinética con suelo con 24 h de contaminado a una concentración de 0.5 CMC (Figura 4.13) prácticamente todo el surfactante es sorbido al suelo tanto para 5 CMC como para 15 CMC por lo que no hay surfactante en exceso en forma de monómeros y no hubo producción de CO_2 a partir de este sustrato.

En la Tabla 4.2 se muestran las velocidades de producción de CO_2 a partir de naftaleno de los tres experimentos. Se puede observar que las velocidades de los controles (sin surfactante) en medio líquido como con suelo saturado presentan diferencias significativas. En medio líquido la velocidad de producción de CO_2 ($0.106 \text{ mmol CO}_2/\text{día}$) es dos veces mas grande que la velocidad obtenida en la presencia de suelo ($0.057 \text{ mmol CO}_2/\text{día}$). Esto indica que en la presencia de las barreras difusionales que impone el suelo, la biodisponibilidad de los compuestos hidrofóbicos como el naftaleno disminuye notablemente.

Tabla 4.2. Velocidades de producción de CO₂ (mmol CO₂/día) debido a la degradación de naftaleno en medio líquido, suelo con 24 h y 4 meses de contaminado en la presencia y ausencia de Tritón X-100.

	Control (sin surf)	Tritón X-100			
		0.5 CMC	5 CMC	15 CMC	20 CMC
Líquido	0.106	ND	ND	ND	0.105
Suelo cont. en 24 h	0.057	0.068	ND	ND	0.020
Suelo cont. en 4 meses	0.050	ND	0.050	0.045	ND

ND : no determinado

Esta diferencia de disponibilidad también se puede observar en el comportamiento cinético de producción de CO₂ por la degradación de naftaleno de las curvas obtenidas en la presencia y ausencia de suelo. Las curvas de degradación de naftaleno en la presencia de suelo con 4 meses de contaminado presentan un comportamiento lineal lo cual es típico de procesos limitados por la disponibilidad de los compuestos (Tiehm, 1994). En las cinéticas con suelo con 24 h de contaminado no se presenta el mismo comportamiento lineal debido a que la concentración de naftaleno en el sistema es mucho menor y el perfil de la degradación se acerca más al de la degradación en medio líquido ya que las fuerzas de sorción son débiles. En la ausencia de suelo el comportamiento de las curvas de degradación son de tipo exponencial, sugiriendo que la degradación de naftaleno no está limitada por la disponibilidad, ni por la velocidad de disolución, estos resultados son similares a los obtenidos por Tiehm (1994), ya que encontró comportamientos del tipo exponencial en las mismas condiciones de experimentación.

En la Tabla 4.2 se observa que la velocidad de degradación disminuye conforme aumenta el tiempo de contacto entre el suelo y el contaminante, ya que las interacciones entre la materia orgánica y los compuestos hidrofóbicos son más fuertes conforme pasa el tiempo y por lo tanto la desorción y la degradación del contaminante es más lenta. Estos resultados son similares a los obtenidos por Deschênes y col., (1996), ellos encontraron que la biodegradación de HPA intemperizados es más lenta que la degradación de fenantreno cuando se adiciona al suelo horas antes de la experimentación.

También se observa en la Tabla 4.2 que las velocidades de producción de CO₂ por la degradación de naftaleno en la presencia de Tritón X-100 disminuyen conforme aumenta la concentración del surfactante en la presencia de suelo. Este fenómeno es atribuido a que al aumentar la concentración de surfactante hay una mayor disponibilidad del surfactante mismo, por lo tanto es degradado preferencialmente por los microorganismos, disminuyendo la velocidad de degradación del naftaleno.

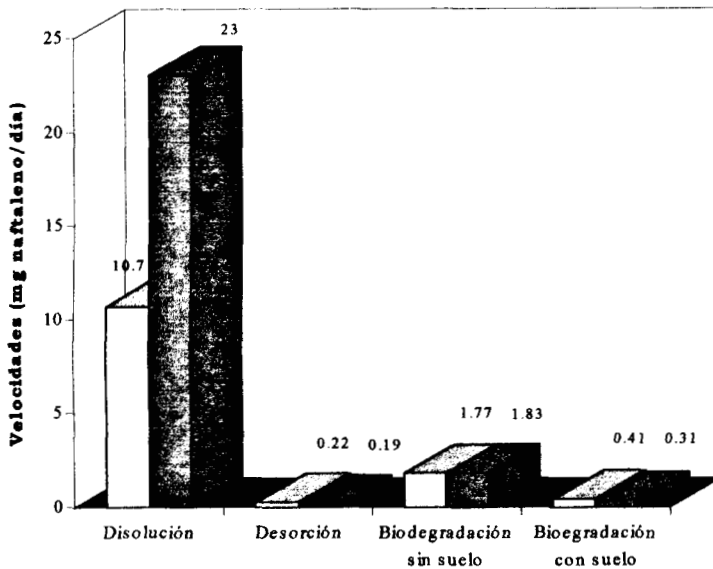


Figura 4.16 Fenómenos que intervienen en el proceso de biodegradación de naftaleno sorbido en suelo. Velocidades (mg naftaleno/día) en la presencia (□) y ausencia (■) de Tritón X-100 a una concentración de 20 CMC.

En la Figura 4.16 se presentan las velocidades que intervienen en el proceso de degradación de naftaleno en la ausencia y presencia de suelo con la adición de Tritón X-100. Se puede observar que tanto en la ausencia como en la presencia de surfactante el fenómeno de disolución es el más rápido, mientras que el fenómeno que presenta la velocidad más lenta, en ambos casos, es el de desorción, por lo que la biodegradación de naftaleno en el suelo no está limitado por el fenómeno de disolución y si está fuertemente limitado por el

fenómeno de desorción, lo cual produce una baja disponibilidad del naftaleno. Estos resultados muestran que la capacidad de los microorganismos utilizados en este trabajo no constituyen la etapa que limita la degradación ya que es mayor la velocidad de degradación (en ausencia y presencia de suelo) que la velocidad de desorción.

En presencia de suelo, la adición de Tritón X-100 no aumenta la disponibilidad ni la degradación de naftaleno. Existen pocos trabajos relacionados con la degradación y disponibilidad de compuestos hidrofóbicos en la presencia de barreras difusionales, ya que la mayoría se han realizado en medio líquido. Sin embargo, también se han encontrado resultados similares.

Las propiedades de los suelos en cierta medida dificulta la comparación de los resultados con los obtenidos en otros estudios. Las propiedades fisicoquímicas son uno de los principales factores que determinan el comportamiento de los contaminantes en el suelo. Influyen sobre los resultados finales del efecto del surfactante sobre la biodisponibilidad y biodegradación del compuesto contaminante. El contenido de materia orgánica de este suelo (3.64%) influyó sobre la acción del surfactante para desorber al naftaleno ya que estos compuestos también son sorbidos y disminuye su capacidad de desorción. Debido a que en cada estudio se utilizan suelos con propiedades diferentes es difícil la comparación de los resultados finales.

La adición de surfactantes aún sigue siendo objeto de estudio ya que no es claro el papel que desempeñan en los procesos de desorción y degradación. Con los resultados obtenidos en este trabajo y con los ya existentes es difícil generalizar y llegar a una conclusión definitiva en cuanto al uso de surfactantes como parte de una tecnología de biorremediación en la degradación de contaminantes hidrofóbicos. Para cada tipo de suelo contaminado habrá que evaluar específicamente que tipo de surfactante es el apropiado para su remediación ya que su selección y aplicación depende de varios factores como son el tipo de suelo, tipo y concentración de contaminantes y de las características de la población microbiana.

También existen otras alternativas para aumentar la biodisponibilidad y biodegradación de compuestos hidrofóbicos que podrían producir resultados mas claros como es el uso de solventes orgánicos

Conclusiones

La desorción es el fenómeno que limita la biodisponibilidad del naftaleno en el suelo.

La presencia de Tritón X-100 no inhibe el crecimiento microbiano del consorcio empleado.

La adición de Tritón X-100 a concentraciones menores de 20 CMC no aumenta significativamente la biodisponibilidad ni la degradación de naftaleno sorbido al suelo. A concentraciones mayores de 15 CMC se observa un proceso de retardo en la degradación, pero finalmente se producen aproximadamente las mismas cantidades de CO₂ que en la ausencia del surfactante.

En la presencia de naftaleno el Tritón X-100 es utilizado preferencialmente como fuente de carbono por el consorcio microbiano.

4.5. EFECTO DE TOLUENO EN LA DEGRADACIÓN DE NAFTALENO

Para determinar el efecto que tienen los solventes orgánicos en la biodisponibilidad de los compuestos hidrofóbicos se realizaron tres experimentos de biodegradación de naftaleno, se obtuvieron cinéticas de producción de CO₂ en medio líquido y cinéticas con suelo en suspensión contaminado artificialmente con naftaleno, con un tiempo de contaminación de 24 h y 4 meses.

4.5.1. CINÉTICAS EN MEDIO LÍQUIDO.

Se realizaron cinéticas en medio líquido para determinar el comportamiento en la ausencia de barreras difusionales como el suelo. Inicialmente se determinó el efecto del solvente sobre la actividad microbiana.

En la Figura 4.17 se presenta la producción de CO₂ por la degradación de tolueno a una concentración de 60 y 90 ppm. Se puede observar que la velocidad de producción de CO₂ a una concentración de 90 ppm es mayor que a una concentración de 60 ppm, finalmente con las dos concentraciones se llega a producciones similares de CO₂ (0.18 mmol) , que corresponden al 48% y al 55% del tolueno inicial respectivamente.

Estos niveles de mineralización corresponden a los obtenidos normalmente en medio líquido para este tipo de compuestos hidrofóbicos. En este caso por los porcentajes de mineralización se puede decir que el consorcio microbiano no presenta problemas de inhibición en la degradación de tolueno en medio líquido a estas concentraciones.

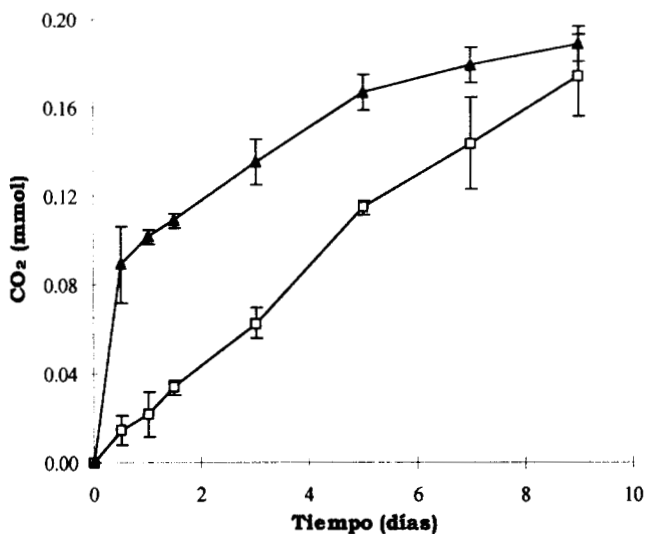


Figura 4.17. Cinética de producción de CO₂ a partir de la degradación de tolueno en medio líquido a una concentración de 60 (□) y 90 ppm (▲).

En la Figura 4.18 se presenta la cinética de producción de CO₂ proveniente de la degradación de naftaleno en la ausencia y presencia de tolueno a diferentes concentraciones. Para determinar el CO₂ producido por la degradación de naftaleno en la presencia de tolueno se restó el control que corresponde a la degradación de tolueno presentado en la Figura 4.16. En esta gráfica se puede observar que a una concentración de 60 ppm la velocidad de degradación es ligeramente mayor comparada con la velocidad del control (sin tolueno), mientras que a una concentración de 90 ppm no se observa diferencia significativa. Al final del proceso (10 días) en la presencia de tolueno se obtiene una menor producción de CO₂ que corresponde a la mineralización del 70% de naftaleno inicial, mientras que el control llega hasta un 79% de mineralización.

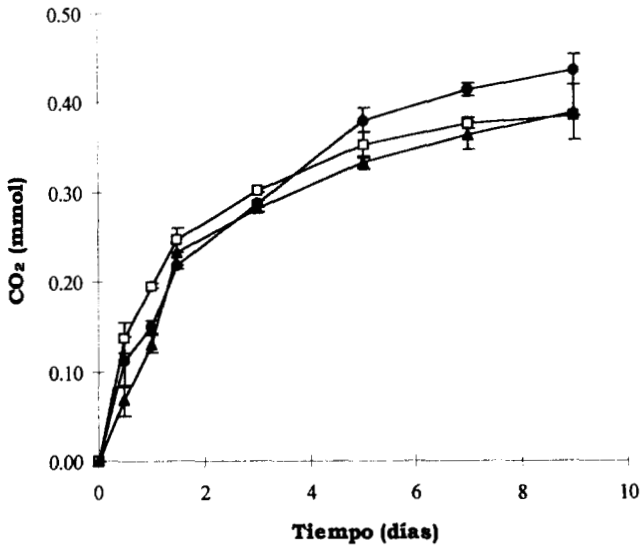


Figura 4.18. Cinética de producción de CO_2 a partir de la degradación de naftaleno en medio líquido en ausencia y presencia de tolueno. Sin tolueno (—●—), 60 (—□—) y 90 ppm (—▲—). Los mmoles de CO_2 se obtuvieron de la diferencia del tratamiento menos el control (sin naftaleno).

De la misma manera que en el capítulo anterior solamente es posible presentar algunas teorías especulativas que traten de explicar los procesos de biodegradación que se llevan a cabo entre los dos sustratos.

El aumento en la velocidad de degradación de naftaleno en la presencia de tolueno puede deberse a la estimulación o inducción de las enzimas responsables de su mineralización. Probablemente la degradación de tolueno induce más rápidamente la producción de enzimas que transforman y mineralizan al naftaleno. Alvarez y col., (1991) encontraron que la presencia de tolueno aumenta la velocidad de degradación de benceno y xileno por inducción enzimática.

También el tolueno puede actuar como solvente de extracción de tal manera que el naftaleno se distribuye parcialmente en el solvente y no en la fase acuosa, al ser degradado el tolueno, que es de mas fácil asimilación, simultáneamente el naftaleno también es degradado. Aunque todavía no se conoce con precisión el proceso de degradación, se ha encontrado que algunos microorganismos pueden degradar naftaleno de la fase orgánica ya que las bacterias pueden adherirse a la interfase agua-solvente y de esta manera mantener contacto con el contaminante para poder degradarlo (Efroymsen y Alexander, 1991). Jiménez y Bartha (1996) observaron que en la mineralización de pireno en presencia de solventes las células de *Mycobacterium* atacan gradualmente las gotas del solvente emulsificado y de esta manera se obtiene una mayor mineralización de pireno.

La degradación de naftaleno y de tolueno puede tener un comportamiento diferente en la presencia de barreras difusionales como el suelo, que es en donde se presentan realmente los problemas de disponibilidad, por lo que se determinó su degradación en la presencia de suelo.

4.5.2. CINÉTICAS DE SUELO CON 24 h DE CONTAMINADO.

Para determinar el efecto del tolueno en la disponibilidad y biodegradación de naftaleno se realizaron las siguientes cinéticas con suelo contaminado artificialmente con un tiempo de contaminación de 24 h.

Primeramente, se determinó la degradación de tolueno en la presencia de suelo no contaminado (sin naftaleno). En la Figura 4.19 se presenta la cinética de producción de CO₂ por la degradación de tolueno a una concentración de 60 ppm, la cual se determinó por la diferencia de la respiración del suelo mas tolueno menos su control que corresponde a la respiración del suelo únicamente. En esta gráfica se observa que el CO₂ producido corresponde a la mineralización del 100% de tolueno inicial.

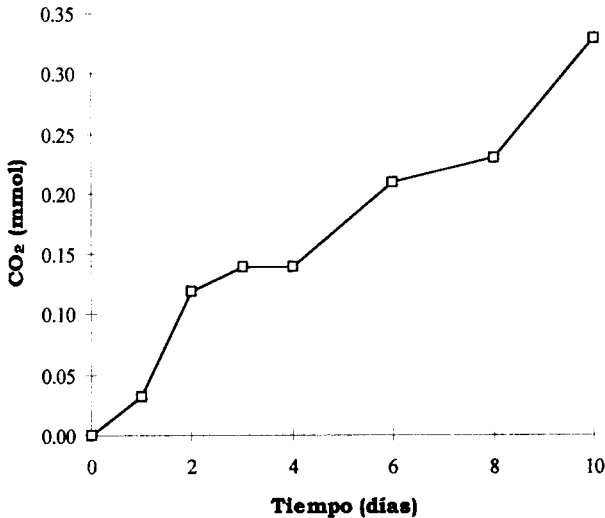


Figura 4.19. Cinética de producción de CO₂ a partir de la degradación de tolueno a una concentración de 60 ppm, en la presencia de suelo no contaminado en suspensión. Los mmoles de CO₂ se obtuvieron de la diferencia del tratamiento menos el control (suelo sin tolueno).

En la Figura 4.20, se presenta la producción de CO₂ proveniente de la degradación de naftaleno en la presencia y ausencia de tolueno a una concentración de 60 ppm. El CO₂ graficado por la degradación de naftaleno se determinó restando el control que se presentó en la Figura 4.19, que corresponde a la respiración del suelo más el solvente, para el caso sin tolueno se restó el CO₂ proveniente de la respiración únicamente del suelo.

Se observa en la Figura 4.20 que la presencia de tolueno aumenta ligeramente la velocidad de consumo de naftaleno comparada con el control (sin tolueno). Sin embargo estas diferencias no son estadísticamente diferentes. Después de 10 días de fermentación se obtiene una mineralización del 100% de naftaleno inicial en la presencia de tolueno mientras que el control llega solamente a un 87%. Estos resultados también sugieren estimulación enzimática por parte del tolueno lo cual se planteó en la degradación en medio líquido, Kim y col., (1995) observaron que la presencia de tolueno es necesaria para inducir la degradación de clorobenceno por la microflora del suelo.

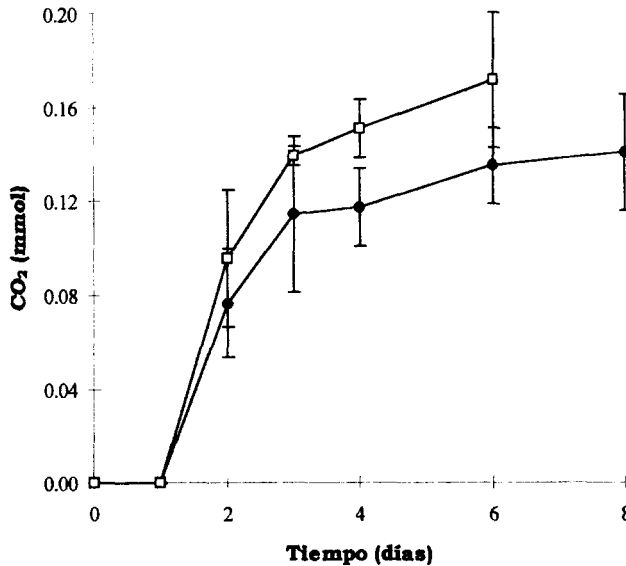


Figura 4.20. Cinética de producción de CO_2 a partir de la degradación de naftaleno sorbido al suelo en la ausencia y presencia de tolueno. Las cinéticas fueron realizadas con suelo en suspensión con 24 h de contaminado. Sin tolueno (●) y 60 ppm (□). Los mmoles de CO_2 se obtuvieron de la diferencia del tratamiento menos el control correspondiente.

Si se compara esta cinética con la anterior (ver Figura 4.19) se observa que la degradación de tolueno es al parecer simultánea a la degradación de naftaleno, por lo que estos resultados respaldan la suposición de que el tolueno también puede actuar como un solvente para aumentar la degradación del naftaleno en el suelo.

La presencia de tolueno en este experimento no aumenta significativamente la biodisponibilidad de naftaleno pero sí aumenta su degradación.

Se ha demostrado que la degradación de los compuestos recalcitrantes en suelos intemperizados es más difícil de realizarse, ya que la interacción del contaminante con el suelo es más fuerte, por lo que también se determinó el efecto del tolueno en la degradación de naftaleno con un suelo contaminado artificialmente con un tiempo de sorción más prolongado.

4.5.3. CINÉTICAS CON SUELO CON 4 MESES DE CONTAMINADO

Se realizaron las siguientes cinéticas de degradación de naftaleno utilizando un suelo contaminado artificialmente con un tiempo de contaminación de 4 meses.

En la Figura 4.21 se presentan las cinéticas de CO_2 producido por la degradación de tolueno a una concentración de 30, 60 y 90 ppm. El CO_2 graficado se determinó por la diferencia de la respiración del suelo mas tolueno menos su control que corresponde a la respiración del suelo únicamente.

Se observa en la Figura 4.21 que para las tres concentraciones evaluadas la velocidad inicial de producción de CO_2 es la misma. Después de 12 días, para la concentración de 30 ppm se obtiene un total de 0.318 mmol de CO_2 lo cual es mas de lo esperado teóricamente (0.2 mmol). Con una concentración de 60 ppm se obtiene una producción de CO_2 correspondiente a una mineralización del 100%. A una concentración de 90 ppm se obtuvo una producción de 0.267 mmol de CO_2 lo cual corresponde al 55% del tolueno inicial, este porcentaje es similar al que se obtuvo en medio líquido (ver Figura 4.17).

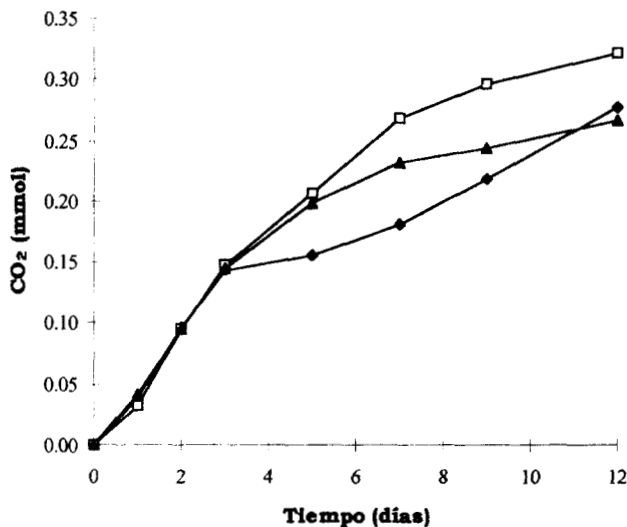


Figura 4.21. Cinética de producción de CO_2 a partir de la degradación de tolueno a una concentración de 30 (—◆—), 60 (—□—) y 90 ppm (—▲—), en la presencia de suelo no contaminado en suspensión. Los mmoles de CO_2 se obtuvieron de la diferencia del tratamiento menos el control (suelo sin tolueno).

En la Figura 4.22 se presenta la cinética de producción de CO_2 a partir de la degradación de naftaleno con la adición de diferentes concentraciones de tolueno, 30, 60 y 90 ppm. El CO_2 graficado por la degradación de naftaleno se determinó restando los controles que se presentaron en la Figura 4.21, que corresponden a la respiración del suelo mas el solvente, para el caso sin tolueno se resto el CO_2 proveniente de la respiración únicamente del suelo.

Se observa en la Figura 4.22 que la velocidad inicial de producción de CO_2 a una concentración de tolueno de 30 ppm es mayor que la obtenida en la ausencia de tolueno, al final (12 días) se obtiene una mayor producción de CO_2 correspondiente al 87% mientras que en el control se obtuvo solamente un 78%.

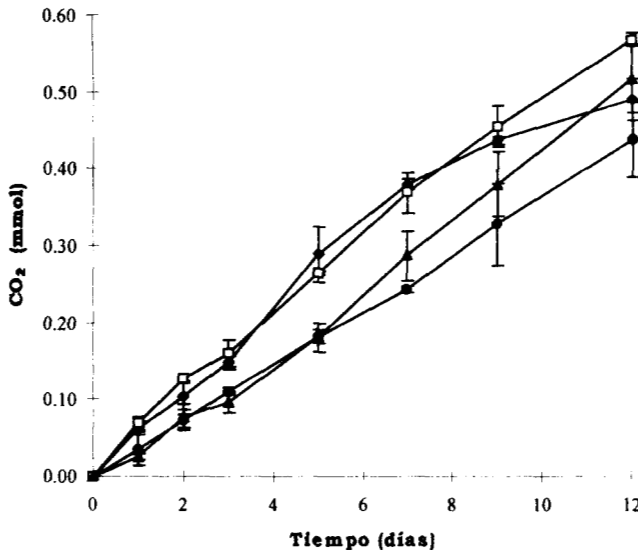


Figura 4.22. Cinética de producción de CO_2 a partir de la degradación de naftaleno sorbido al suelo en la ausencia y presencia de tolueno. Las cinéticas fueron realizadas con suelo en suspensión con 4 meses de contaminado. Sin tolueno (—●—), 30 (—◆—), 60 (—□—) y 90 ppm (—▲—). Los mmoles de CO_2 se obtuvieron de la diferencia del tratamiento menos el control correspondiente.

Con la adición de 60 ppm se obtiene un perfil similar al obtenido en la presencia de 30 ppm, hay una mayor velocidad de producción de CO_2 , esta velocidad es significativamente mayor, también se puede observar que al final se obtiene mayor producción de CO_2 , que corresponde al 100% de mineralización.

A una concentración de 90 ppm la cinética de CO_2 es similar a la obtenida por el control y no se observaron diferencias significativas.

De la misma manera que en el caso de la adición de Tritón X-100 en la presencia del suelo las cinéticas de degradación de naftaleno presentan un perfil de tipo lineal que es indicativo de problemas de biodisponibilidad mientras que en la ausencia su comportamiento es de tipo exponencial.

La presencia de tolueno a concentraciones menores de 60 ppm aumenta la biodisponibilidad de naftaleno así también como su biodegradación. Sin embargo, este aumento no fue el deseado ya que se esperaba obtener un comportamiento de tipo exponencial similar al obtenido en medio líquido, el cual es indicativo de un comportamiento en el cual se han superado completamente las barreras difusionales

En la Tabla 4.3 se tabulan las velocidades de producción de CO_2 a partir de la degradación de naftaleno de los tres experimentos en la presencia y ausencia de tolueno. Se puede observar que tanto en medio líquido como en la presencia de suelo el tolueno a concentraciones mayores de 60 ppm aumenta significativamente la biodisponibilidad del naftaleno ya que las velocidades de degradación son mayores comparadas con el control. También se puede observar que conforme aumenta el tiempo de exposición del suelo con el contaminante las velocidades disminuyen, tanto para el control como para la degradación de naftaleno en la presencia de tolueno a una concentración de 60 ppm.

Tabla 4.3. Velocidades de producción de CO_2 ($\text{mmol CO}_2/\text{día}$) por la degradación de naftaleno en medio líquido, suelo con 24 h y 4 meses de contaminado en la presencia y ausencia de tolueno. ND: no determinado

	Control (sin tolueno)	Tolueno		
		30 ppm	60 ppm	90 ppm
Líquido	0.106	ND	0.136	0.100
Suelo cont. en 24 h	0.057	ND	0.070	ND
Suelo cont. en 4 meses	0.037	0.057	0.052	0.042

En la Tabla 4.4 se presentan las velocidades de producción de CO₂ por la degradación de tolueno en ausencia de naftaleno en los tres tipos de experimentos evaluados. Se puede observar que en medio líquido la velocidad de degradación a una concentración de 60 ppm es menor que la obtenida en la presencia de suelo, este fenómeno también se presentó en el caso de la adición de Tritón. Por lo que también se concluye que la presencia de barreras difusionales aumenta la degradación de aquellos compuestos que presentan una mayor toxicidad en medio líquido.

Tabla 4.4. Velocidades de producción de CO₂ (mmol CO₂/día) por la degradación de tolueno en medio líquido, suelo con 24 h y 4 meses de contaminado.

	30 ppm	Tolueno 60 ppm	90 ppm
Líquido	ND	0.019	0.010
Suelo cont. en 24 h	ND	0.039	ND
Suelo cont. en 4 meses	0.032	0.046	0.032

ND: no determinado

De la misma manera si se compara el efecto del tolueno en las cinéticas de degradación de naftaleno en medio líquido con las cinéticas con suelo se puede observar que en medio líquido los niveles de mineralización son menores que los obtenidos en la presencia de suelo. En la presencia de suelo a una concentración de 60 ppm se obtiene una mineralización de naftaleno del 100% mientras que en la ausencia solamente se llega al 70%. Este comportamiento también muestra que para el caso de compuestos que presentan problemas de toxicidad por concentración en medio líquido, la adición de barreras difusionales o de un material adsorbente disminuye la concentración en la fase acuosa y por lo tanto disminuye su toxicidad. En el caso de la degradación de naftaleno ocurre lo contrario, la velocidad de degradación en la ausencia de suelo es mayor, ya que en este caso la solubilidad limita la degradación y por lo tanto no se presentan problemas de toxicidad, para aumentar su degradación, en este caso es necesario aumentar la solubilidad aparente en la fase acuosa sin llegar a ser tóxica.

En todos los experimentos de degradación en la presencia de suelo se puede observar que tanto con la adición de tolueno como con la adición de Tritón X-100 se obtienen porcentajes de mineralización del 100% mientras que en medio líquido los porcentajes son siempre menores.

Estos porcentajes de mineralización no son comunes ya que normalmente para este tipo de compuestos se deben obtener rendimientos mas bajos (50%). Deschênes y col., (1996) obtuvieron resultados similares, ellos observaron una completa degradación (100%) de fluoreno y fenantreno en dos semanas de incubación de un suelo contaminado con creosota. Coates y col., (1997) reportan porcentajes de mineralización de naftaleno y fenantreno marcados del 100% en condiciones sulfato reductoras.

Estos niveles de degradación tan elevados pueden deberse a que: (i) la presencia del suelo estimula la completa degradación de estos compuestos ya que parte de la materia orgánica es la que se utiliza como fuente de carbono y energía y el naftaleno es utilizado únicamente como fuente de energía, ya que se ha demostrado que algunos microorganismos tienen la habilidad de utilizar compuestos contaminantes simultáneamente con otros compuestos que soporten su crecimiento o suplementen energía para el mantenimiento (Egli, 1995), (ii) el carbono que se utiliza inicialmente para la formación de biomasa también es mineralizado gradualmente, lo cual sucede generalmente en experimentos prolongados, (iii) la presencia de algunos sustratos exógenos estimulan la mineralización de la materia orgánica del suelo (Sharabi y Bartha, 1993).

Comparando estos resultados con los obtenidos en la presencia de Tritón X-100 se puede decir que la adición de tolueno es una mejor alternativa para aumentar la biodisponibilidad y la biodegradación de naftaleno, ya que el tolueno es requerido a menores concentraciones y es biodegradado completamente por el consorcio microbiano. Mientras que la adición de Tritón X-100 tiene que ser a altas concentraciones y es degradado únicamente en un 5%.

El uso de estos solventes orgánicos puede ser una buena alternativa para degradar completamente aquellos contaminantes que son muy persistentes a la degradación microbiana y que se encuentran a bajas concentraciones. En muchos estudios de degradación de hidrocarburos utilizando técnicas de bioaumentación o bioestimulación se ha demostrado que siempre persiste una concentración residual de estos contaminantes en el suelo (Hausseman, 1997), por lo que en este caso puede ser una buena alternativa la adición de tolueno para estimular la completa degradación de estos compuestos recalcitrantes. Aunque tiene que tomarse muy en cuenta que también es un compuesto tóxico por lo que su aplicación a concentraciones altas puede provocar graves problemas de toxicidad a los microorganismos. El uso de este solvente como alternativa en las tecnologías de biorremediación tiene que ser aplicable en procesos cerrados como es el caso de biorreactores, para evitar de esta manera pérdidas por evaporación.

Conclusiones

La presencia de tolueno a las concentraciones empleadas no inhibe la actividad microbiana del consorcio empleado.

En medio líquido la presencia de tolueno a una concentración de 60 ppm aumenta ligeramente la velocidad inicial de degradación pero finalmente se obtiene una menor degradación de naftaleno.

La adición de tolueno a una concentración igual o menor de 60 ppm aumenta la biodisponibilidad y estimula la completa biodegradación de naftaleno sorbido en el suelo. Mientras que a concentraciones mayores (90 ppm) no se presenta ningún efecto positivo.

La velocidad de biodegradación de naftaleno disminuye conforme aumenta el tiempo de sorción del contaminante con el suelo.

La presencia de barreras difusionales (suelo) disminuye la biodisponibilidad y por lo tanto la biodegradación de compuestos orgánicos altamente hidrofóbicos (naftaleno). Sin embargo la presencia de estas barreras aumenta la biodegradación de aquellos compuestos orgánicos (tolueno) que por su solubilidad y concentración presentan efectos de toxicidad en medio líquido.

5. CONCLUSIONES

La adición de Tritón X-100 a una concentración de 20 CMC aumenta la desorción de naftaleno del suelo, sin embargo no aumenta su biodisponibilidad ni su biodegradación. A esta concentración el surfactante es utilizado preferencialmente como fuente de carbono por el consorcio microbiano.

Los surfactantes pueden ser una buena alternativa en las tecnologías de lavado de suelos contaminados, sin embargo con los resultados obtenidos es difícil llegar a una conclusión general sobre su aplicación en las tecnologías de biorremediación.

La adición de tolueno a concentraciones menores de 60 ppm aumenta significativamente la biodisponibilidad y estimula la completa biodegradación de naftaleno en el suelo.

La adición de tolueno es una mejor alternativa para aumentar la biodisponibilidad y biodegradación de naftaleno en el suelo que la adición de Tritón X-100.

6. RECOMENDACIONES

Para estudiar los procesos que intervienen en los problemas de biodisponibilidad sería conveniente con la metodología empleada en este trabajo, utilizar compuestos marcados, ya que de esta manera se puede seguir el destino de los contaminantes y aditivos para comprender y explicar con mayor exactitud los fenómenos que se llevan a cabo. De esta manera también se puede hacer el seguimiento de los intermediarios que se generan durante el proceso.

Para realizar estudios en los que interviene el suelo como soporte de estudio es conveniente tener en cuenta la complejidad y heterogeneidad del sistema, para poder de este modo entender y explicar los procesos de biodisponibilidad y biodegradación.

En los sistemas semi-acuosos, la homogenización es un factor que debe de tomarse en cuenta para aumentar la velocidad de biodegradación de los contaminantes, ya que de esta manera se aumenta el contacto de los microorganismos con los contaminantes y aditivos.

7. BIBLIOGRAFÍA

Adamson A.W. 1960. Physical chemistry of surfaces. 2da ed. Ed. Interscience Publishers. USA.

Alvarez J.J.P. y T.M. Vogel. 1991. Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2981-2985.

Aronstein B.N., Calvillo Y.M. y Alexander M. 1991. Effect of surfactants at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. *Environ. Sci. Technol.* 25:1728-1731.

Baker H.K. y Herson D.S. 1994. Bioremediation. Mc Graw-Hill, USA.

Bartha R. y Pramer D. 1965. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Sci.* 100:68-70.

Belter A.P., Cussler E.L. y Wei-Shou Hu. 1988. Bioseparations: downstream processing for biotechnology. Wiley-Interscience, USA.

Blackburn J.W. y Hafker W.R. 1993. The impact of biochemistry bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. *TIBTECH.* 11:328-333.

Bosma T.N.P., Middeldorp P.J.M., Schraa G. Y Zehnder A.J.B. 1997. Mass transfer limitation of biotransformation: quantifying bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* 31:248-252.

Bouchez M., Blanchet D. y Vandecasteele J-P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:156-164.

Cacciatore A.D. y McNeil M.A. 1995. Principles of soil bioremediation. *Biocycle.* Oct:61-64.

Christian D.G. 1988. Química Analítica. Ed. Limusa, ed. 1ra, México.

Coates J.D., Woodward J., Allen J., Philip P. y Lovley D.R. 1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine Harbor sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3589-3593.

Cookson T. J. 1995. Bioremediation engineering: design and application. Mc Graw-Hill, USA.

Cornelissen G., Van Noort P.C.M., Parsons J.R. y Govers H.A.J. 1997. Temperature dependence of slow adsorption and desorption kinetics of organic compounds in sediments. *Environ. Sci. Technol.* 31:454-460.

Delgado A., G. Albarran de Alba y A. Guzman. 1996. Explosiones, aguas infestadas, tierras ensalitradas, desaparición de cultivos, comunidades invadidas, costo del paso de Pemex por Tabasco. *Proceso*, México, 1007:6-13.

Deschênes L., Lafrance P., Villeneuve J.P. y Samson R. 1996. Adding sodium dedecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46:638-646.

Edwards D.A., Luthy R.G. y Liu Z. 1991. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. *Environ. Sci. Technol.* 29:127-133.

Edwards D.A., Adeel Z. y Luthy R.G. 1994. Distribution of nonionic surfactant and phenanthrene in a sediment/aqueous system. *Environ. Sci. Technol.* 28:1550-1560.

Edwards D.A., Liu Z. y Luthy R.G. 1994. Experimental data and modeling for surfactant micelles, HOCs, and soil. *J Environ Eng.* 120:23-41.

Efroymsen R.A. y Alexander M. 1991. Biodegradation by an *Arthrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1441-1447.

Egli T. 1995. The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganisms with mixtures of substrates. *Advances in Microbial Ecology.* 14:305-370. Ed. Gwynfryn Jones. Plenum Press, New York.

FitzPatrick A.E. 1985. Suelos: su formación, clasificación y distribución. CECSA, México.

Fordham W. 1995. Yard trimmings composting in the air force. *Biocycle*, Enero:44-46.

Foth D.H. 1985. Fundamentos de la ciencia del suelo. CECSA, México.

García T.A. 1981. Experimentos en microbiología del suelo. Ed. Continental S.A., México

Gibson S.A. y V. Subramanian. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. Marcel Dekker, New York.

Grifoll M., Casellas M., Bayona J.M. y Solanas A.M. 1992. Isolation and characterization of a Fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2910-2917.

- Grimberg S.J., Stringfellow W.T. y Aitken M.D.** 1996. Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of a nonionic surfactant. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2387-2392.
- Guerin F.W. y S.A. Boyd.** 1992. Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1142-1152.
- Guha S. y Jaffé P.R.** 1996. Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environ. Sci. Technol.* 30:605-611.
- Gutiérrez R.M.** 1998. Strategies to increase bioavailability of recalcitrant molecules in contaminated soils. En *Environmental Biotechnology and Cleaner Bioprocesses* (E. Olguín, G. Sánchez y E. Hernández, Eds) Taylor y Francis, London. En Prensa.
- Harms H. y Zehnder A.J.B.** 1995. Bioavailability of sorbed 3-chlorodibenzofuran. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:27-33.
- Huesemann H.M.** 1997. Incomplete hydrocarbon biodegradation in contaminated soils: limitations in bioavailability or inherent recalcitrance. *Bioremediation J.* 1:27-39.
- INEGI.** 1994. Estadísticas del medio ambiente, 1ra. ed., México.
- Janke D. y Fritsche W.** 1985. Review: Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics. *J Basic Microbiol.* 25(9):603-619.
- Jiménez I. y Bartha R.** 1996. Solvent augmented mineralization of pyrene by a *Mycobacterium sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2311-2316.
- Jonge de H, Freijer J.I., Verstraten J.M. y Westerveld J.** 1997. Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 31:771-775.
- Kan A.T., G. Fu, M.A. Hunter y M.B. Tomson.** 1997. Irreversible adsorption of naphthalene and tetrachlorobiphenyl to Lula and Surrogate sediments. *EST.* 31:2176-2185.
- Kelsey J.W., B.S. Kottler y M. Alexander.** 1997. Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 31:214-217.
- Kim H., H.F. Hemond, L.R. Krumholz y B.A. Cohen.** 1995. In-situ biodegradation of toluene in a contaminated stream. 1. Field studies. *Environ. Sci. Technol.* 29:108-116.
- Kirk E.R. y D.F. Othmer.** 1961. Enciclopedia de tecnología química. Hispano-Americana, México.
- Laha S. Y Luthy R.G.** 1992. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems. *Biotechnol. Bioeng.* 40:1367-1380.

- Liu Z., Edwards D.A. y Luthy R.G.** 1992. Sorption of non-ionic surfactants onto soil. *Wat. Res.* 26:1337-1345.
- Liu Z., Jacobson A.M. y Luthy R.G.** 1995. Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:145-151.
- Luthy R.G., Aiken G.R., Brusseau M.L., Cunningham S.D., Gschwend P.M., Pignatello J.J., Reinhard M., Traina S.J., Weber W.J. Jr. y Westall J.C.** 1997. Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. *Environ. Sci. Technol.* 31:3341-3347.
- Medina M.A.** 1997. Avances de tesis de Maestría en Biotecnología. UAM-I.
- Martínez C.J.** 1997. Importancia de la identificación de microorganismos que participan en la biodegradación de los compuestos xenobióticos. Simposio de Biorremediación de suelos y acuíferos. CINVESTAV-IPN. México D.F.
- Merck Index.** 1989. Merck y Co. Inc. USA.
- Mihelcic J.R. y Luthy R.G.** 1988. Microbial degradation of acenaphthene and naphthalene under denitrification conditions in soil-water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1188-1198.
- Mueller J.G., Chapman P.J., Blattmann B.O. y Pritchard P.H.** 1990. Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1079-1086.
- Nzungung A.V., E.A. Voudrias, P. Nked-Kizza, J.M. Wampler y Ch. E Weaver.** 1996. Organic cosolvent effects on sorption equilibrium of hydrophobic organic chemicals by organoclays. *Environ. Sci. Technol.* 20:717-725.
- Pignatello J.J. y B. Xing.** 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* 30:1-11.
- Pollard T.J.S., S.E. Hruday y P.M. Fedorak.** 1994. Bioremediation of petroleum and creosote-contaminated soils: a review of constraints. *Waste Management & Research.* 12:173-194.
- Ryuichiro K.D. y Montes de Oca G.M.A.** 1993. Biodegradacion de hidrocarburos lineales y aromaticos por *Rhodococcus erythropolis* y *Corynebacterium equi*. *Revista del Instituto Mexicano del Petroleo*, 25:38-45.
- Saval B.S.** 1995. Acciones para la remediacion de suelos en Mexico. Memorias del Segundo Minisimposio Internacional sobre Remocion de Contaminantes de Aguas y Suelos. Mexico, D.F., 168-173.

- Sharabi N. y R. Bartha.** 1993. Testing of some assumptions about biodegradability in soil as measured by carbon dioxide evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1201-1205.
- Sheng G., Xu S. y S.A. Boyd,** 1996. Mechanism(s) controlling sorption of neutral organic contaminants by surfactant-derived and natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 30:1553-1557.
- Sugiura K, M. Ishihara, T. Shimauchi y S Harayama.** 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Sci. Technol.* 31:45-51.
- Thibault L.S., M. Anderson y W.T. Frankenberger.** 1996. Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:283-287.
- Tiehm A.** 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:258-263.
- Tissot B.P. y D.H. Welte.** 1982. El petróleo su formación y localización: nuevas investigaciones para explotación de gas y petróleo. CONACYT, Mexico.
- Urano K., Saito M. y Murata C.** 1984. Adsorption on non-ionic surfactants on sediments. *Chemosphere.* 13:293-300
- Volkering F., A.M. Breure, J.G. van Andel y W.H. Rulkens.** 1995. Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1699-1705.
- Wu S y P.M. Gschwend.** 1986. Sorption kinetics of hydrophobic organic compounds to natural sediments and soils. *Environ. Sci. Technol.* 20:717-725.