



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
INGENIERÍA AMBIENTAL – SUELOS y AGUAS SUBTERRÁNEAS

BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON BENZO[A]PIRENO  
EMPLEANDO *Pleurotus ostreatus*

TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:  
ING. AGR. JUAN JOSÉ VILLACÍS FAJARDO

**TUTOR PRINCIPAL:**  
M. en C. ROLANDO SALVADOR GARCÍA GÓMEZ  
**COMITÉ TUTORAL:**  
DRA. GEORGINA FERNÁNDEZ VILLAGÓMEZ  
DRA. ROSARIO ITURBE ARGÜELLES

**MÉXICO, D.F., OCTUBRE, 2013**

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: DRA. ROSARIO ITURBE ARGÜELLES  
Secretario: DRA. SUSANA SAVAL BOHÓRQUEZ  
Vocal: M.C. ROLANDO SALVADOR GARCÍA GÓMEZ  
1<sup>er</sup>. Suplente: DRA. GEORGINA FERNÁNDEZ VILLAGÓMEZ  
2<sup>d</sup> o. Suplente: DRA. MARISELA BERNAL GONZÁLEZ

Lugar donde se realizó la tesis: LABORATORIOS 301, 302 Y 303 DEL CONJUNTO "E" DE QUÍMICA, UNAM.

**TUTOR DE TESIS:**

M. en C. ROLANDO SALVADOR GARCÍA GÓMEZ

-----  
**FIRMA**

## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de posgrado recibida para la realización de estos estudios de Posgrado.

A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de realizar el posgrado.

Un reconocimiento especial al tutor de esta tesis: M. en C. Rolando Salvador García Gómez, por todo su apoyo y confianza durante la realización de este trabajo experimental y por su amistad.

Al cuerpo académico y el jurado ampliado de esta investigación por todos los comentarios y sugerencias recibidas durante la realización de este trabajo:

Dra. Rosario Iturbe Argüelles  
Dra. Susana Saval Bohórquez  
M.C. Rolando Salvador García Gómez  
Dra. Georgina Fernández Villagómez  
Dra. Marisela Bernal González

A la Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por su confianza y por sus acertados comentarios durante la revisión de este trabajo.

A la Dra. Refugio Rodríguez Vázquez del CINVESTAV por sus valiosos consejos y ayuda para la realización de este trabajo. También al Maestro Wilberth Chan Cupul por su asesoría en la realización de las pruebas toxicológicas con el micelio.

Al Maestro Sergio Adrián García González por su valiosa ayuda en la utilización e interpretación en el Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

A los compañeros de laboratorio 301, 302 y 303 del LIQAYQA y al Laboratorista Benjamín Castillo Ramírez por estar siempre al pendiente de todo el material requerido.

A la M. en C. Sandra Pérez Munguía del Departamento de Alimentos y Biotecnología por el apoyo brindado en la parte técnica de este trabajo.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>GLOSARIO</b>	10
<b>RESUMEN</b>	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	12
<b>2. OBJETIVOS Y ALCANCES</b>	13
2.1. OBJETIVO GENERAL	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
2.3. ALCANCES DE LA INVESTIGACIÓN	13
<b>3. MARCO TEÓRICO</b>	14
3.1. El suelo	15
3.1.1. Papel que desempeñan los suelos en el ecosistema	15
3.2. Contaminación de los suelos	16
3.2.1. Principales contaminantes del suelo	17
3.2.1.1. Contaminantes metálicos	18
3.2.1.2. Contaminantes orgánicos	18
3.2.1.2.1. Contaminantes derivados del petróleo	19
3.3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)	20
3.3.1. Estructura y propiedades de los HAP	20
3.3.2. Origen y fuentes de los HAP	22
3.3.2.1. Fuentes naturales de los HAP	22
3.3.2.2. Fuentes antropogénicas de los HAP	22
3.3.2.2.1. Otras fuentes antropogénicas: el tabaco y los alimentos	23
3.3.3. Problemas ambientales relacionados con los HAP	23
3.3.4. Dinámica de los HAP en el suelo	25
3.3.5. Biodegradación de los HAP	26
3.3.5.1. Rutas de degradación biológica de los HAP	27
3.3.5.2. Factores limitantes en la degradación biológica de los HAP	28
3.3.5.3.1. Biodisponibilidad	28
3.3.5.3.2. Temperatura	28
3.3.5.3.3. Oxígeno	28

		Pag.
3.3.5.3.4.	Acidez y alcalinidad	28
3.3.5.3.5.	Humedad	29
3.3.6.	Isotermas de adsorción	29
3.3.6.1.	Modelos de adsorción	30
3.3.6.1.1.	Modelo lineal	30
3.3.6.1.2.	Modelo de Freundlich	30
3.3.6.1.3.	Modelo de Langmuir	30
3.3.7.	Técnicas analíticas empleadas para la determinación de HAP	31
3.3.7.1.	Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	31
3.3.7.2.	Cromatografía de gases. Espectrometría de masas	32
3.4.	Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos	33
3.4.1.	Experiencias de remediación de suelos en México	33
3.4.2.	Biorremediación	35
3.4.2.1.	Ventajas de la biorremediación	35
3.4.2.2.	Desventajas de la biorremediación	35
3.4.2.3.	Biorremediación en México	36
3.5.	La micorremediación	37
3.5.1.	<i>Pleurotus ostreatus</i> como hongo degradador de hidrocarburos	39
3.5.1.1.	Biología y cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	39
3.5.1.1.1.	Reproducción	41
3.5.1.1.2.	Crecimiento	41
3.5.1.1.3.	Fructificación	42
3.5.1.1.4.	La fase de declinación	42
3.5.1.1.5.	La fase estacionaria y la muerte	43
3.5.1.2.	<i>Pleurotus ostreatus</i> en México	43
<b>4.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>44</b>
4.1.	Diseño experimental	44
4.2.	Materiales y métodos	45
4.2.1.	ETAPA 1: Estudios sobre el suelo a analizar	45
4.2.1.1.	Obtención del suelo	45

	Pag.	
4.2.1.1.1.	Caracterización del suelo <i>in situ</i>	46
4.2.1.2.	Caracterización del suelo	46
4.2.1.2.1.	Humedad	47
4.2.1.2.2.	Capacidad de campo	47
4.2.1.2.3.	Textura	47
4.2.1.2.4.	Densidad aparente	49
4.2.1.2.5.	Densidad real	49
4.2.1.2.6.	Porosidad del suelo	50
4.2.1.2.7.	pH	51
4.2.1.2.8.	Contenido de materia orgánica	51
4.2.1.2.9.	Conductividad eléctrica	52
4.2.1.2.10.	Capacidad de intercambio catiónico	53
4.2.1.2.11.	Nitrógeno total	53
4.2.1.2.12.	Fósforo disponible	53
4.2.1.2.13.	Elementos menores biodisponibles	53
4.2.1.3.	Isotermas de adsorción	53
4.2.2.	ETAPA II: Estudios sobre el hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	55
4.2.2.1.	Obtención del cultivo puro de <i>Pleurotus ostreatus</i>	55
4.2.2.2.	Pruebas de dosis-respuesta (tolerancia del micelio)	56
4.2.3.	ETAPA III: Análisis del suelo contaminado en los reactores	57
4.2.3.1.	Construcción de los reactores con el suelo	57
4.2.3.2.	Análisis de los tratamientos	58
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>60</b>
5.1.	Etapa 1: Estudios sobre el suelo a analizar	60
5.1.1.	Caracterización del suelo “ <i>in situ</i> ”	60
5.1.1.1.	Clima y estado del tiempo	60
5.1.1.2.	Uso del suelo y vegetación	60
5.1.1.3.	Descripción del relieve	60
5.1.1.4.	Forma de la vertiente	60
5.1.1.5.	Posición fisiográfica	61

		Pag.
5.1.1.6.	Evidencias de erosión	61
5.1.1.7.	Material parental	61
5.1.1.8.	Estructura	61
5.1.2.	Caracterización fisicoquímica del suelo	61
5.1.3.	Isotermas de adsorción	64
5.2.	Etapas II: Estudios sobre el hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	66
5.2.1.	Medición de la tolerancia del micelio de <i>Pleurotus ostreatus</i> bajo distintas concentraciones de benzo(a)pireno	66
5.3.	Etapas III: Análisis del suelo contaminado en los reactores	68
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>74</b>
6.1.	Conclusiones	74
6.2.	Recomendaciones	74
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS</b>		<b>82</b>
Anexo 1.	Ficha de seguridad del benzo(a)pireno	82
Anexo 2.	Modelación de la prueba de isotermas de adsorción	84
A.2.1.	Modelo lineal	84
A.2.2.	Modelo de Langmuir	85
A.2.3.	Modelo de Freundlich	85
Anexo 3.	Análisis estadísticos de las pruebas dosis-respuesta	86
A.3.1.	Resumen estadístico del crecimiento del micelio	86
A.3.2.	ANOVA del crecimiento del micelio	86
A.3.3.	Prueba estadística de rangos múltiples con 95.0% de intervalos LSD	87
Anexo 4.	Determinación de la dosis efectiva media (CE50) a partir de las pruebas dosis-respuesta	87
Anexo 5.	Análisis estadístico de los resultados finales de los reactores con suelo contaminado	89
Anexo 6.	Manejo de los residuos generados a lo largo de la experimentación	90
A.6.1.	Tratamiento y destino final de los residuos generados	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 3.1.	Pasos iniciales de la ruta de degradación de HAP por hongos y bacterias	27
Figura 3.2.	Tecnologías autorizadas de remediación para suelos utilizadas en México por empresas	37
Figura 3.3.	Ciclo de vida de los hongos	40
Figura 3.4.	Crecimiento del <i>Pleurotus ostreatus</i> ECS-0110 en medio líquido	42
Figura 4.1.	Sitio de toma de la muestra	45
Figura 4.2.	Triángulo de texturas	48
Figura 4.3.	Esquema de la prueba de isotermas de adsorción	54
Figura 4.4.	Esquema de lavado del material de vidrio para el análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	55
Figura 4.5.	Esquema de las pruebas de dosis-respuesta	56
Figura 5.1.	Gráfica de las curvas de calibración	64
Figura 5.2.	Gráfica del modelo de Freundlich	66
Figura 5.3.	Pruebas dosis-respuesta	67
Figura 5.4.	Balance de masas en los reactores con suelo contaminado	71
Figura 5.5.	Gráfica de superficie de respuesta 3D de las condiciones de crecimiento del suelo en los reactores	72
Figura A.1.	Hoja de seguridad del benzo[a]pireno	82
Figura A.2.	Modelo de adsorción lineal	84
Figura A.3.	Modelo de adsorción de Langmuir	85
Figura A.4.	Modelo de adsorción de Freundlich	85
Figura A.6.1.	Diagrama de flujo de la generación y tratamiento de los residuos generados en la experimentación	90

## ÍNDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla 3.1.	Potenciales del suelo, las funciones ecológicas y los criterios de cuantificación	16
Tabla 3.2.	Algunos HAP de importancia ambiental y sus propiedades físicas	21
Tabla 3.3.	Vida media de algunos hidrocarburos en agua y en sedimentos	25
Tabla 3.4.	Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo	25
Tabla 3.5.	Hongos utilizados para la biorremediación de contaminantes	38
Tabla 4.1.	Diseño experimental factorial 2 <sup>2</sup>	44
Tabla 4.2.	Parámetros determinados y metodología empleada para la caracterización del suelo bajo estudio	46
Tabla 4.3.	Relación de la densidad del agua con la temperatura	50
Tabla 4.4.	Clasificación de suelos de acuerdo al pH según la NOM-021	51
Tabla 4.5.	Clasificación de suelos de acuerdo al contenido de materia orgánica	52
Tabla 4.6.	Condiciones cromatográficas para la detección del benzo[a]pireno empleando cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	54
Tabla 4.7.	Distribución de reactores experimentales según el diseño experimental empleado	57
Tabla 5.1.	Resultados de los parámetros obtenidos en la caracterización física del suelo	62
Tabla 5.2.	Parámetros de la caracterización química del suelo: pH, contenido de materia y carbono orgánico total	62
Tabla 5.3.	Parámetros de la caracterización química del suelo: Conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico	63
Tabla 5.4.	Parámetros de la caracterización química del suelo: Elementos menores biodisponibles, fósforo disponible y nitrógeno total	63
Tabla 5.5.	Parámetros de la caracterización química del suelo: Elementos menores biodisponibles, fósforo disponible y nitrógeno total	63
Tabla 5.6.	Datos de los análisis empleando Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) la determinación de las isothermas de adsorción	65
Tabla 5.7.	Resultados de las pruebas de dosis-respuesta	67

		Pag.
Tabla 5.8.	Concentración efectiva media (CE50) para <i>Pleurotus ostreatus</i> con respecto al benzo[a]pireno	67
Tabla 5.9.	Pruebas de eficiencia de extracción empleando tres diferentes tipos de cartuchos comerciales	68
Tabla 5.10.	Parámetros iniciales de los reactores con suelo contaminado	69
Tabla 5.11.	Concentraciones iniciales y finales de benzo[a]pireno obtenidas en los reactores empleando cromatografía líquida de alta resolución	70
Tabla 5.12.	Datos promedio de la remoción de benzo(a)pireno con suelo contaminado	72
Tabla A.2.1.	Condiciones cromatográficas para la detección del benzo[a]pireno empleando cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	84
Tabla A.3.1.	Resumen estadístico del crecimiento del micelio	86
Tabla A.3.2.	ANOVA del crecimiento del micelio	86
Tabla A.3.3.	Prueba de rangos múltiples con 95% en intervalos LSD (least significant difference)	87
Tabla A.4.1.	Análisis de parámetros estadísticos para el análisis Probit (Probability unit)	88
Tabla A.4.2.	Análisis Probit sobre la “concentración” de la dosis efectiva media (CE <sub>50</sub> )	88
Tabla A.5.1.	ANOVA degradación del benzo[a]pireno	89
Tabla A.5.2	Prueba de rango múltiple debido a la variable humedad (95%LSD)	89

## ÍNDICE DE ECUACIONES

		Pág.
Ecuación 3.1.	Coefficiente de reparto octanol/agua ( $K_{ow}$ )	24
Ecuación 3.2.	Relación del valor de $K_{ow}$ con el valor de bioconcentración ( $K_b$ o $CB$ )	24
Ecuación 3.3.	Cálculo de la concentración adsorbida en cada vial	29
Ecuación 3.4.	Modelo de adsorción lineal	30
Ecuación 3.5.	Modelo de Freundlich	30
Ecuación 3.6.	Modelo de Langmuir	31
Ecuación 3.7.	Eficiencia Biológica (EB) de hongos	42
Ecuación 3.8.	Tasa de Producción (TP) de hongos	42
Ecuación 4.1.	Cálculo del porcentaje de humedad del suelo	47
Ecuación 4.2.	Cálculo de la densidad aparente del suelo	49
Ecuación 4.3.	Cálculo del volumen de las partículas del suelo	49
Ecuación 4.4.	Cálculo de la densidad real del suelo	50
Ecuación 4.5.	Cálculo de la porosidad del suelo	50
Ecuación 4.6.	Cálculo del porcentaje de carbono orgánico del suelo	52
Ecuación 4.7.	Porcentaje de materia orgánica	52
Ecuación 4.8.	Cálculo de la concentración adsorbida ( $C_s$ )	55
Ecuación 4.9.	Cálculo del Porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo	57

## GLOSARIO

**Benzo[a]pireno:** Hidrocarburo aromático policíclico formado por 5 anillos aromáticos. De acuerdo con Orozco *et al.* (2003) el mayor peligro por la vía de exposición de inhalación asociado con los efectos del benzo[a]pireno en organismos vivos es la capacidad para producir efectos mutagénico y carcinogénicos

**Biorremediación:** Se define como biorremediación a cualquier proceso que utilice microorganismos, hongos, plantas vivas o las enzimas derivadas de ellos para retornar un suelo alterado por contaminantes a su condición natural o lo más cercano a ella. La biorremediación puede ser empleada para eliminar contaminantes específicos del suelo, por ejemplo en la degradación bacteriana de compuestos organoclorados o de hidrocarburos

**HAP:** Dentro del grupo de los contaminantes orgánicos derivados del petróleo se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) los cuales forman una familia particular de hidrocarburos correspondiente a compuestos que contienen un cierto número de anillos bencénicos condensados a través de dos o más átomos de carbono (Straalen y Lokke, 1997). Debido a su estructura singular, origen y comportamiento ambiental han sido estudiados de forma diferenciada del conjunto de hidrocarburos. Es un grupo de contaminantes cuyo estudio se ha incrementado en las últimas décadas por la evidencia del carácter cancerígeno de diversos compuestos de la familia

**ISRIC:** International Soil Reference and Information Center

**LAU:** Licencia Ambiental Única

**Micorremediación:** Es una forma de biorremediación en la cual se usan hongos para degradar o retener los contaminantes en el suelo. Estimulando la actividad enzimática y microbiana, el micelio reduce las toxinas in-situ. Algunos hongos son hiperacumuladores, capaces de absorber y concentrar metales pesados en el esporocarpo

***Pleurotus ostreatus:*** Es un hongo comestible que se consume ampliamente por su sabor y la facilidad de su identificación. Este hongo ha sido ampliamente utilizado para remover contaminantes del suelo

## RESUMEN

En este trabajo se determinó el nivel de remoción que produce *Pleurotus ostreatus* sobre el benzo[a]pireno expresamente adicionado a un suelo, empleando para ello cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), buscando una alternativa de remediación de suelos para aminorar su impacto ambiental. Por ello, como primer punto se realizó una caracterización fisicoquímica del suelo, a nivel de laboratorio, para que al momento de contaminarlo fuera posible evaluar el comportamiento del contaminante, determinando la efectividad de la técnica de biorremediación a evaluar. Para determinar la capacidad del suelo de adsorber el contaminante se realizó una prueba de isotermas de adsorción (concentración inicial de benzo(a)pireno de 4, 6, 8, 10 y 12 ppm) comparándose tres modelos: lineal, de Langmuir y de Freundlich, siendo este último el que otorgó mejores resultados en la linealidad del método, obteniéndose una constante de distribución (Kd) de 0.724 mg/kg. Adicionalmente, se realizaron pruebas de adsorción empleando 3 tipos de cartuchos comerciales (Chromabond® easy de 6 mL/200mg, Cromafix® SA (M) y Cromafix® C-18 ec.) resultando el Cromafix® SA (M) el que obtuvo los mejores resultados en cuanto a los porcentajes de recuperación (88%). Por otra parte, se evaluó el crecimiento del micelio de *Pleurotus ostreatus* en un medio de cultivo contaminado con benzo[a]pireno bajo diferentes concentraciones (4, 6, 8, 10 y 12 ppm) verificando la tolerancia del crecimiento del micelio por medio de la prueba de dosis-respuesta. Por último se hicieron estudios en reactores de vidrio con el suelo previamente caracterizado y contaminado de manera artificial con la concentración determinada en la prueba de dosis-respuesta de benzo[a]pireno, para la posterior medición del contaminante residual a lo largo del tiempo conforme proliferó el micelio. Lo anterior se realizó con un diseño experimental factorial 2<sup>2</sup>, es decir con dos niveles y dos variables independientes (cantidad del micelio, 2.5, 5% y humedad en los reactores, 50,70%), siendo la variable dependiente la concentración de benzo[a]pireno degradada por el micelio. En cuanto a la comparación con la caracterización fisicoquímica que se realizó antes y al finalizar el estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). A partir de las pruebas de dosis respuesta se determinó la concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) para *Pleurotus ostreatus* con respecto al benzo[a]pireno, que fue de 1.21 ppm. Ésta fue la concentración utilizada en los reactores en donde la remoción mayor del contaminante fue de 58.41% la cual se dio con un 70% de humedad y con 5% de inóculo de micelio. Con base en este estudio se puede asegurar que es posible utilizar este hongo como agente para la biorremediación de suelos contaminados con benzo[a]pireno, siendo necesario continuar con este estudio para otros hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), separados y en su conjunto, para evaluar el nivel de degradación que puedan alcanzar en estos tipos de contaminantes.

**Palabras clave:** Biorremediación, suelos contaminados, benzo[a]pireno, *Pleurotus ostreatus*

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la contaminación ambiental ha llegado a un punto en el que los recursos naturales se encuentran amenazados. Particularmente los suelos se han visto afectados por la disposición directa –voluntaria o involuntaria– de residuos y contaminantes, afectando sus funciones en el ecosistema. El origen de las alteraciones que se producen en el suelo no puede atribuirse a una sola causa. La contaminación puede aparecer como resultado de actividades industriales, agrícolas o de servicios, aunque es el sector industrial el principal agente contaminante (Orozco *et al.*, 2003). La sociedad industrializada ha sintetizado miles de compuestos orgánicos para un sin número de usos. Una enorme cantidad de compuestos químicos orgánicos se fabrican cada año—más de 60 millones Megagramos (toneladas métricas) en los Estados Unidos solamente, incluyendo plásticos y plastificantes, lubricantes y refrigerantes, combustibles y disolventes, plaguicidas y fertilizantes (Brady y Weil, 2008).

Al referirse a la contaminación del suelo por parte de contaminantes orgánicos, se refiere fundamentalmente a la producida por productos derivados del petróleo. La sociedad, a través del tiempo ha logrado convertir el petróleo en combustible y otros productos que son la base del desarrollo actual (Hernández *et al.*, 2004). Dentro del grupo de los contaminantes orgánicos derivados del petróleo se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), los cuales forman una familia particular de compuestos formados por un cierto número de anillos bencénicos condensados a través de dos o más átomos de carbono (Straalen y Lokke, 1997). De acuerdo con Orozco *et al.* (2003) el mayor peligro asociado con los efectos de los HAP en organismos vivos es la capacidad para producir efectos mutagénicos y carcinogénicos. Casi todos los hidrocarburos aromáticos policíclicos son sospechosos carcinogénicos en algún grado en peces y animales; en concreto, se ha demostrado la capacidad de producir cáncer en humanos el benzo[a]pireno y el benzo[a]antraceno.

La micorremediación es una técnica de biorremediación basada en el uso de hongos para degradar y remover toxinas del suelo. Los hongos en general son organismos eficientes que fragmentan moléculas rompiendo largas cadenas en otras más simples con una menor toxicidad. Se ha calculado que la micorremediación tiene un costo, por tonelada de suelo contaminado con hidrocarburos, de alrededor de \$50 dólares americanos, representando en la actualidad la tecnología de remediación más barata (Stamets, 2005).

Dada la problemática planteada, en este trabajo se determinó el nivel de remoción que produce *Pleurotus ostreatus* sobre uno de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) o *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* (PAH, por sus siglas en inglés), específicamente del benzo[a]pireno por ser considerado uno de los 16 HAP de mayor recalcitrancia establecidos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), empleando técnicas cromatográficas para su cuantificación, desarrollando una alternativa de remediación de suelos con menor impacto ambiental. Al mismo tiempo, se evaluó la tolerancia de este hongo en presencia del contaminante y bajo las condiciones de humedad y temperatura a las cuales se ve favorecida la mayor remoción de éste.

## **2. OBJETIVOS Y ALCANCES**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el nivel de biorremediación que produce *Pleurotus ostreatus* sobre un suelo contaminado *ex-profeso* con benzo[a]pireno a nivel laboratorio

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- \*Realizar la caracterización fisicoquímica del suelo a nivel laboratorio determinando el posible comportamiento del contaminante
- \*Determinar el crecimiento del micelio de *Pleurotus ostreatus* en un medio de cultivo contaminado con benzo[a]pireno bajo diferentes concentraciones verificando la tolerancia del crecimiento del micelio
- \*Realizar estudios en reactores con el suelo previamente caracterizado y contaminado de manera artificial con benzo[a]pireno, para la posterior medición del contaminante residual a lo largo del tiempo conforme prolifera el micelio

### **2.3. ALCANCES DE LA INVESTIGACIÓN**

- Se contrastarán las características fisicoquímicas del suelo al inicio y al final de la experimentación
- Se evaluará la tolerancia del *Pleurotus ostreatus* con respecto a 5 concentraciones de benzo[a]pireno (2, 4, 6, 8, 10 ppm)
- Se determinará el grado de biorremediación del suelo contaminado con benzo[a]pireno en reactores a nivel laboratorio con respecto a tres controles
- Se evaluará a *Pleurotus ostreatus* como biodegradador de benzo[a]pireno con respecto a la concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>)

### 3. MARCO TEÓRICO

Para el año 2050 se proyecta que la población mundial alcanzará los 9 mil millones de habitantes. Por esto el suelo se ha convertido en un recurso fundamental que debe ser protegido y recuperado urgentemente ya que provee a todos los seres vivos de comida, materia prima y combustible. También mantiene las actividades rurales y urbanas así como los procesos naturales (FAO, 2003).

Durante la última mitad de siglo XX, el uso del suelo, las actividades y estilo de vida del ser humano, han degradado 5 mil millones de hectáreas (alrededor del 43%) de suelo con vegetación sobre la superficie de la tierra. Según el *ISRIC (International Soil Reference and Information Center)*, el 46.4% de los suelos han sufrido una importante disminución en cuanto a su productividad y se ha destruido parcialmente su actividad biológica. El 15.1% de los suelos no pueden ser usados para la producción de alimentos y su actividad biológica ha sido severamente destruida, lo cual conllevaría una inversión bastante alta para su recuperación. Cerca de 9.3 millones de hectáreas (0.5%) de los suelos tiene un daño irreparable y no posee ningún tipo de actividad biológica. Aunque naturalmente existe el proceso de degradación geológica, actividades humanas como la deforestación, los incendios forestales, el mal manejo de residuos urbanos e industriales, entre otros, degradan al suelo de manera química, física y biológica en una tasa mucho más acelerada que la capacidad de depuración del mismo.

Otra de las principales causas de la degradación del suelo son las prácticas utilizadas en la agricultura y ganadería convencionales, tales como el sobrepastoreo animal, el mal manejo de los residuos y el uso descontrolado de agroquímicos. Este tipo de actividades resultan en un aumento de la vulnerabilidad del suelo tanto a la erosión hídrica (56% de los suelos mundiales) como a la eólica (28% de los suelos mundiales) (ISRIC, 2009).

Debido a las prácticas actuales de producción, el suelo es degradado físicamente causando la compactación, por el uso de maquinaria pesada, y la pérdida de estructura del mismo disminuyendo los potenciales de uso del terreno. El riego excesivo y con agua de baja calidad resulta en la pérdida de nutrimentos y disminución del contenido de la materia orgánica desatando procesos como la salinización, sodificación y acidificación, dejando al suelo en condiciones desfavorables de poder llevar a cabo los distintos roles que cumple en el ecosistema (Siebe *et al.*, 2006).

La biota del suelo también se ve severamente afectada por las actividades antes mencionadas, disminuyendo la diversidad y actividad de los microorganismos, un componente fundamental para mantener las condiciones de productividad (Orozco *et al.*, 2003).

La mayor parte de la degradación (alrededor de 3.6 mil millones de hectáreas) está vinculada con el proceso de la desertificación. De igual manera, la tala indiscriminada de bosques ha degradado cerca de 0.5 mil millones de hectáreas en el trópico húmedo (Brady y Weil, 2008). Los procesos de degradación descritos resultan en una reducción en el potencial de productividad así como la disminución de la capacidad de proveer beneficios a la humanidad. Tanto la erosión hídrica como la eólica resultan en la pérdida de área productiva y en muchos casos en la contaminación de cuerpos de agua superficiales debido al arrastre de sedimentos y de contaminantes.

Además de los procesos de degradación por el mal uso y manejo de los suelos se presenta la contaminación de los mismos dada principalmente por actividades antropogénicas. Muchos de los procesos industriales y urbanos generan ciertos tipos de contaminantes que afectan de manera directa a las funciones del suelo en el ecosistema. A medida que se tengan que enfrentar los desafíos de este siglo, el desarrollo y comprensión de nuevas tecnologías serán fundamentales para proteger el ambiente, y al mismo tiempo, producir alimento y biomasa para mantener a la población. Bajo este contexto el estudio del suelo nunca había sido tan importante y esencial (Cookson, 1995).

### **3.1. El suelo**

El planeta Tierra provee gracias a sus esferas ambientales (atmósfera, antroposfera, biosfera, geosfera e hidrosfera) la posibilidad de que se lleve a cabo la vida. La parte de la Química Ambiental que incluye la porción sólida de la tierra es la geosfera, en donde se incluye todas las rocas y minerales. Una parte particularmente importante de la geosfera es el suelo, que sostiene el crecimiento de las plantas, base del alimento para todos los organismos vivos (Manahan, 2007).

En vista de que existen procesos de degradación naturales, el suelo cuenta con la habilidad de recuperación de su capacidad funcional después de un disturbio, buscando regresar a su estado de equilibrio natural. A esta capacidad se la conoce como resiliencia (Brady y Weil, 2008). Según Siebe (2012)<sup>1</sup>, los factores que determinan la resiliencia del suelo son, el primero: La resistencia del suelo, la cual es la capacidad del suelo de mantener su capacidad funcional durante o después de un disturbio. El segundo, el tipo de suelo (incluyendo el componente biológico) y el tercero, la vegetación, ya que la dinámica que se desarrolla en el suelo puede protegerlo contra la erosión y contra las propiedades intrínsecas de los suelos como son la textura, la estabilidad de los agregados, etc.

El clima también mantiene una estrecha relación con la resiliencia del suelo ya que la cantidad de precipitación, su distribución y la temperatura, determinan muchos de los procesos biológicos que ayudan a proteger y autorregenerar a los suelos. El uso del suelo es otro factor que determinará la resistencia del suelo a la degradación o disturbio. La intensidad, régimen y duración del disturbio será el factor que determinará qué tan resistente tiene que ser un suelo a la degradación (Gimsing *et al.*, 2009).

#### **3.1.1. Papel que desempeñan los suelos en el ecosistema**

El suelo representa un papel determinante para el desarrollo de la vida en la Tierra. Dentro de este papel cumple con diferentes funciones según sus características. Según Siebe (2012), los potenciales del suelo se resumen en la Tabla 3.1.

---

<sup>1</sup> Comunicación personal

**Tabla 3.1 Potenciales del suelo, las funciones ecológicas y los criterios de cuantificación**

Potenciales	Funciones ecológicas	Criterios
Documental	Cuerpo natural	Perfil del suelo
Biótico	Localidad para el desarrollo de las plantas	Diversidad de especies, rendimientos, calidad, pedregosidad, porosidad, capacidad de intercambio catiónico (CIC), pH, etc.
Abiótico	Filtro, amortiguador ( <i>buffer</i> ), sumidero, transformación, regulador del ciclo hidrológico	Cantidad y calidad de la recarga de acuíferos, calidad de aire, escorrentía
De área	Depósito, construcción	Extensión, capacidad de carga, resistencia a la penetración

*Fuente: Siebe (2012)*

En cualquier ecosistema, según Brady y Weil (2008), se puede afirmar que los suelos desempeñan seis puntos clave, los cuales se citan a continuación:

Como primer punto, el suelo provee un medio en el que pueden crecer las plantas, poniendo al alcance de las raíces nutrientes esenciales para el crecimiento vegetal. Como segundo punto, las propiedades de los suelos son el factor principal en la regulación del ciclo hidrológico. Tanto la pérdida, utilización, contaminación y purificación del agua son procesos que ocurren en el suelo. En tercer lugar el suelo funciona como sistema de reciclaje. En el suelo desechos de vegetales, de animales y de restos humanos son asimilados y sus componentes básicos pasan a disposición para su reutilización por las siguientes generaciones. Como cuarto punto el suelo proporciona un hábitat para un sin número de microorganismos, insectos, reptiles, entre otros. El quinto punto está relacionado con los procesos de regulación atmosférica que ocurren en el suelo ya que se capta y libera grandes cantidades de dióxido de carbono, oxígeno, metano y otros gases. Finalmente, como sexto punto, en ecosistemas construidos por los seres humanos el suelo juega un papel básico como medio ingenieril. No solamente es importante como material para construir ladrillos, etc., sino para proporcionar una base para cada camino, casa o cualquier construcción.

### **3.2. Contaminación de los suelos**

Según Velazco y Volke (2002) el suelo está definido como un cuerpo natural dinámico constituido por sólidos minerales y orgánicos, gases, líquidos y organismos vivos que sirven a su vez como medio para el crecimiento de plantas. A partir de este concepto se define la calidad del suelo como la capacidad de éste de funcionar en límites naturales o ecosistemas manejados, para mantener la productividad de plantas y animales, mantener o mejorar la calidad de agua y aire y mantener la salud y habitación humanas. La degradación de los suelos es la disminución del funcionamiento óptimo de las actividades y procesos ya descritos. La degradación es generalmente producto de los cambios provocados por el mal uso y manejo del hombre.

El impacto ambiental que el hombre está ejerciendo sobre el suelo ha originado que la contaminación del mismo sea uno de los problemas ambientales que está recibiendo atención especial y que va en aumento en los últimos años. Esto es debido a los riesgos directos que los suelos contaminados pueden ejercer sobre la salud humana y, a razones económicas derivadas de su limitación de uso y a la devaluación de los terrenos contaminados (Jackson, 2007).

Como se describió anteriormente, el suelo posee una enorme capacidad de asimilar compuestos orgánicos e inorgánicos añadidos. Toneladas de residuos orgánicos se descomponen por acción de los microorganismos cada año y grandes cantidades de compuestos inorgánicos se fijan o se adsorben por los minerales del suelo. No obstante, los suelos tienen un límite en su capacidad de asimilar estos contaminantes y es el ambiente quien sufre los efectos cuando estos límites son excedidos (Gimsing *et al.*, 2009).

Según Orozco *et al.* (2003) se denomina suelo contaminado a una porción de terreno, superficial o subterránea, cuya calidad ha sido alterada como consecuencia del vertido, directo o indirecto, de residuos o productos peligrosos. El origen de las alteraciones que se producen en el suelo no puede atribuirse a una sola causa. La contaminación puede aparecer como resultado de actividades industriales, agrícolas o de servicios, aunque es el sector industrial el principal agente contaminante. La sociedad industrializada ha sintetizado miles de compuestos orgánicos para un sin número de usos. Una enorme cantidad de compuestos químicos orgánicos se fabrican cada año. Como ya se mencionó, más de 60 millones de Megagramos (toneladas métricas) en los Estados Unidos solamente, incluyendo plásticos y plastificantes, lubricantes y refrigerantes, combustibles y disolventes, plaguicidas y fertilizantes (Brady y Weil, 2008). Algunos de estos son extremadamente tóxicos para los humanos y otras formas de vida. A través de fugas o derrames accidentales o aplicaciones planeadas, compuestos químicos orgánicos sintéticos pueden ser encontrados virtualmente en cada rincón del ambiente en el suelo, agua subterránea, en las plantas y en nuestros cuerpos.

Según la Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades o *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, por sus siglas en inglés (*ATSDR*, 1995), los contaminantes en los suelos pueden producir los siguientes efectos perjudiciales:

- Contaminación de las aguas subterráneas a través de lixiviados
- Contaminación de las aguas superficiales a través de la escorrentía
- Contaminación del aire por combustión, evaporación, sublimación o arrastre por el viento
- Intoxicación por contacto directo
- Intoxicación a través de la cadena alimentaria
- Fuego y explosión

### **3.2.1. Principales contaminantes del suelo**

Existen compuestos sintetizados artificialmente. Estos compuestos son conocidos como xenobióticos y la mayoría de ellos son tóxicos para los organismos vivos y son resistentes a la descomposición biológica. Algunos de estos compuestos pueden ser inofensivos e inertes; sin embargo, otros son biológicamente muy dañinos en muy bajas concentraciones (EPA, 2006).

Los compuestos que de una manera u otra llegan al suelo, pueden llegar a inhibir o matar a los microorganismos, socavando así el balance de la comunidad taxonómica. Otros compuestos pueden transportarse del suelo, al aire, al agua o a la vegetación donde pueden entrar en contacto con otros organismos vivos a través de la cadena trófica, incluyendo los seres humanos. Por lo tanto, es imperativo que el control de la disposición de estos compuestos se realice de manera estricta y que el desarrollo de tecnologías de limpieza sobre estos suelos se realice empleando metodologías amigables con el ambiente. Los contaminantes encontrados en los suelos pueden ser muy diversos y de distintas fuentes. A continuación se describen los más comunes.

### **3.2.1.1. Contaminantes metálicos**

Se refiere en especial al grupo de los llamados “metales pesados”, que se encuentran naturalmente en concentraciones entre 0.1 y 0.001 mg/litro en la disolución del suelo y se comportan como micronutrientes (Orozco *et al.*, 2003). Las principales fuentes de estos contaminantes son los vertidos industriales, actividades mineras, residuos, plaguicidas, tráfico, etc. Los metales vertidos en mayor cantidad son: Mn, Zn, Cu, Cr, Pb, Ni, V, Mo, mientras que entre los minoritarios se destacan al Cd, Hg y Sb (metaloides), que son altamente tóxicos (EPA, 2006).

Según Orozco *et al.* (2003), la concentración de los metales en los suelos se ve influenciada por los procesos de adsorción, intercambio iónico, pH y por las distintas reacciones en las que pueden intervenir. Las tres vías principales de retención de metales en el suelo son:

- Procesos de adsorción en la superficie de partículas coloidales minerales u orgánicas
- Formación de complejos con las sustancias húmicas del suelo
- Reacciones de precipitación en forma de sales insolubles

Cuando los contaminantes llegan al suelo, son adsorbidos por las partículas coloidales que existen en el mismo o son arrastrados hacia las capas más profundas por efecto de las lluvias. Los contaminantes solubles se infiltrarán en la capa superficial del suelo, donde tiene lugar la mayor adsorción; a pesar de esto también existe adsorción a profundidades mayores, inclusive en la zona saturada del suelo. Los compuestos insolubles se acumulan en la superficie de las moléculas orgánicas hidrófobas, enlazándose a través de la materia orgánica presente en el suelo (Straalen y Lokke, 1997).

En algunas ocasiones puede producirse un fenómeno denominado «*biometalación*», que consiste en la movilización de metales pesados, al formarse un enlace entre un catión metálico y el grupo metilo, dando lugar a compuestos liposolubles y su incorporación a la cadena trófica. Se puede producir también contaminación por metales en los acuíferos por el fenómeno de percolación (Brady y Weil, 2008).

### **3.2.1.2. Contaminantes orgánicos**

La contaminación del suelo por contaminantes orgánicos tiene como principal característica su gran complejidad, debido a la gran diversidad de compuestos orgánicos existentes y a su gran reactividad. Al hablar de contaminación por este tipo de compuestos, se refiere fundamentalmente a la producida por derivados del petróleo. Los contaminantes orgánicos industriales que generalmente terminan contaminando suelos por accidente o negligencia incluyen derivados del

petróleo usados como combustibles (componentes de la gasolina como benceno y otros con mayor complejidad como los hidrocarburos aromáticos policíclicos –HAP-), disolventes usados en procesos de producción -como el tricloroetileno (TCE)-, y explosivos militares como el trinitotolueno (TNT) (Dubois, 2008).

Estos compuestos pueden llegar a interrumpir la reproducción en aves y causar cáncer y efectos hormonales en los humanos. Muchos de los cientos de tipos que existen fueron creados entre 1930 y 1980 y usados especialmente como lubricantes, fluidos hidráulicos, aislantes eléctricos, así como ciertos tipos de pinturas y otro sinnúmero de aplicaciones industriales y comerciales. Dada su extrema resistencia a la degradación y su habilidad para entrar en la cadena alimenticia, incluso el día de hoy es común encontrar residuos de estos compuestos (EPA, 2006).

La movilidad de este grupo de contaminantes depende del tipo de suelo (contenido de materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, pH, etc.) y de la composición química y propiedades de los compuestos (solubilidad en medio acuoso, presión de vapor, constante de Henry, etc.). El desplazamiento de este tipo de contaminantes se puede producir por tres mecanismo diferentes: difusión, dispersión mecánica y convección (Orozco *et al.*, 2003).

Otros procesos que hay que considerar adicionalmente son la degradación química y biológica que pueden sufrir estos compuestos, así como sus posibilidades de volatilización. También son de gran importancia en los fenómenos de adsorción-complejación de metales (Dubois, 2008).

#### **3.2.1.2.1. Contaminantes derivados del petróleo**

La contaminación del suelo por contaminantes orgánicos se refiere fundamentalmente a la generada por productos derivados del petróleo. La humanidad a través del tiempo ha logrado convertir el petróleo en combustible y otros productos que son la base del desarrollo actual. Existen varias hipótesis acerca del origen del petróleo que tratan de explicar la formación del crudo, sin embargo la teoría más aceptada es la de origen orgánico, la cual supone que se originó por la descomposición de los restos de animales y plantas y organismos microscópicas acumulados debajo de materiales sólidos y en el fondo de las lagunas, mares y océanos y en el curso inferior de los ríos. La materia orgánica de estos seres vivos se cubrió paulatinamente con capas cada vez más gruesas de sólidos y sedimentos, al abrigo de las cuales, en determinadas condiciones de presión, temperatura y tiempo, se transformaron lentamente en hidrocarburos (Hernández *et al.*, 2004; Reyes-Calzada, 2012).

Las principales fuentes de contaminación por hidrocarburos fósiles en los suelos son las fosas de pozos petroleros y las deficiencias en su mantenimiento, la descarga de instalaciones de procesamiento y petroquímicas, la rotura de oleoductos y accidentes durante la transportación. En menor cantidad, existe la contaminación del suelo por desechos municipales, partículas transportadas por vía atmosférica y sustancias producidas por organismos. En las zonas donde las lluvias son frecuentes e intensas ocurre la contaminación por acarreo de los hidrocarburos (Dubois, 2008).

El destino de los hidrocarburos en el suelo fue descrito por McGill *et al* (1981). Ellos explicaron que los hidrocarburos pasan primero por dos procesos: la volatilización y la fotooxidación. Posteriormente, atraviesan por un proceso de descomposición biológica, donde los

microorganismos, los nutrientes, el oxígeno, la textura y el pH son fundamentales. Como resultado de este último proceso, se generan productos intermedios, células microbianas y CO<sub>2</sub>, el cual se va a la atmósfera. Por último, los productos derivados de la descomposición biológica siguen dos caminos: 1) la incorporación de humus al suelo o 2) lixiviación.

Existen muchos suelos potencialmente contaminados que a simple vista no son visibles. Por ejemplo, los suelos cercanos a fugas de tanque de almacenamiento de diesel y de gasolina presentes en las gasolineras, las cuales representan un peligro latente de contaminación del subsuelo y del manto freático. En México, existen pocos estudios sobre las diferentes clases de hidrocarburos y su concentración en las áreas contaminadas (Saval, 1999). Sin embargo, en los estados de Tabasco, Veracruz, Sonora y Oaxaca, algunos investigadores han iniciado la caracterización de suelos y sedimentos contaminados por hidrocarburos en las zonas petroleras (Hernández *et al.*, 2004).

El Instituto Mexicano del Petróleo (Informe Técnico, 1999a,b) realizó un estudio para determinar la concentración de cada uno de los hidrocarburos poliaromáticos presentes en los suelos y en subsuelos contaminados con diesel ubicados cerca de tanques de almacenamiento, en dos terminales de distribución y almacenamiento de Pemex (Petróleos Mexicanos), mismas que se encuentran en Hermosillo, Sonora y Salina Cruz, Oaxaca. De los resultados de dicho trabajo se observó que el subsuelo aledaño a dichas terminales de almacenamiento se encontraba contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), lo cual representaba un grave problema al ambiente, dado que algunos compuestos son tóxicos para el hombre, los animales y las plantas. Se encontraron 16 HAP en concentraciones de 1.5 a 23.5 partes por billón (ppb) en la terminal de Salina Cruz y de 13.5 a 623.8 ppb en la terminal de Hermosillo.

### **3.3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)**

Dentro del grupo de los contaminantes orgánicos derivados del petróleo se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) los cuales forman una familia particular de hidrocarburos correspondiente a compuestos que contienen un cierto número de anillos bencénicos condensados a través de dos o más átomos de carbono (Straalen y Lokke, 1997). Debido a su estructura singular, origen y comportamiento ambiental han sido estudiados de forma diferenciada del conjunto de hidrocarburos. Es un grupo de contaminantes cuyo estudio se ha incrementado en las últimas décadas, por la certificación del carácter cancerígeno de diversos compuestos de la familia.

#### **3.3.1. Estructura y propiedades de los HAP**

Los HAP se caracterizan por estar formados por átomos de carbono e hidrógeno, agrupados en anillos que contienen cinco o seis átomos de carbono. El naftaleno (dos anillos bencénicos) se considera el compuesto más sencillo y el coroneno (siete anillos bencénicos), el de mayor número de anillos condensados dentro de los HAP de importancia ambiental (McGill *et al.*, 1981).

Los HAP se forman durante la combustión incompleta del carbón, aceites, gases, madera, residuos domésticos, y en general sustancias de origen orgánico. Se encuentran de forma natural en el petróleo, el carbón, depósitos de alquitrán y como productos de la utilización de combustibles, ya sean fósiles o biomasa. Como contaminantes, tanto en el ambiente como en el entorno laboral, han

despertado preocupación debido a que algunos compuestos han sido identificados como cancerígenos (Cortés, 2011).

Existen también compuestos en los que uno o varios átomos de carbono han sido substituidos por otros átomos o grupos de átomos, como nitrógeno, flúor, cloro, o grupos más complejos. Estos HAP se conocen como HAP substituidos, mientras que los formados por carbono e hidrogeno exclusivamente son los HAP no substituidos. Por lo expuesto anteriormente se deduce que el número posible de HAP es enorme; sin embargo, hay una serie de miembros de la familia que aparecen en el ambiente de forma más generalizada (Straalen y Lokke, 1997).

Orozco *et al.* (2003) resume los HAP de importancia ambiental más frecuentes y algunas de sus propiedades importantes en relación a su comportamiento en las aguas se aprecian en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2 Algunos HAP de importancia ambiental y sus propiedades físicas**  
**Orozco *et al.* (2003)**

Compuesto	Fórmula molecular (Mm)	Solubilidad en agua (ppm), 25°C	Presión de vapor (kPa) a 25°C	T de ebullición (°C)	Toxicidad relativa
<b>Antraceno</b>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> (178.2)	0.07	1.9 x10 <sup>-4</sup>	342	desconocida
<b>Fenantreno</b>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> (178.2)	1.29	6.8 x10 <sup>-4</sup>	340	Desconocida
<b>Fluoranteno</b>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> (202.2)	0.26	1.9 x10 <sup>-3</sup>	384	Nula
<b>Pireno</b>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> (202.2)	0.135	2.5 x10 <sup>-6</sup>	404	Nula
<b>Benzo(a)antraceno</b>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> (228.3)	9.4 x10 <sup>-3</sup>	1.0 x10 <sup>-8</sup>	438	Débil
<b>Benzo(a)pireno</b>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> (252.3)	1.2 x10 <sup>-3</sup>	5.6 x10 <sup>-9</sup>	495	Fuerte
<b>Perileno</b>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> (252.3)	4.01 x10 <sup>-5</sup>	N.r.	503	Nula
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> (252.3)	N.r.	N.r.	N.r.	Moderada
<b>Benzo(g,h,i)perileno</b>	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub> (276.3)	7.0 x10 <sup>-4</sup>	1.0 x10 <sup>-10</sup>	N.r.	Nula

N.r.= No reportado; Mm=Masa molecular; ppm=partes por millón

En general, los hidrocarburos aromáticos policíclicos son lipofílicos, es decir que tienden a unirse a sustancias grasas, y a disolverse en ellas. Este carácter lipofílico de los HAP se incrementa con la complejidad de los compuestos y la masa molecular, es decir, cuanto más átomos y más anillos forman la molécula del HAP mayor es su afinidad por las grasas. Son inestables fotoquímicamente, es decir, que se degradan por la luz (Agudo, 2010).

Son compuestos sólidos en condiciones ambientales, con puntos de fusión superiores a los 100°C (salvo los menores de la serie naftaleno y acenafteno). Como se puede observar en la Tabla 3.2, se trata de compuestos de muy baja solubilidad en agua, a la vez que elevada en disolventes orgánicos no polares, lo que los clasifica como microcontaminantes orgánicos y con capacidad bioacumulativa. Por lo general, un incremento en la masa molecular y en el número de anillos en su estructura disminuyen la solubilidad en agua y su volatilidad (Dubois, 2008).

### **3.3.2. Origen y fuentes**

De acuerdo con Agudo (2010), los HAP se forman durante la combustión incompleta de materia orgánica en general. En el proceso de combustión de la materia orgánica, formada por carbono e hidrógeno, esta reacciona con el oxígeno, formándose dióxido de carbono y agua. Sin embargo, si no hay suficiente oxígeno, la combustión es incompleta; parte del combustible no reacciona completamente con el oxígeno y se forman otros subproductos tales como monóxido de carbono y HAP. Este proceso también es conocido como pirolisis.

La combustión de hidrocarburos a temperaturas relativamente elevadas (superiores a 500°C) y con insuficiente oxígeno para combustión completa, son condiciones propicias para la formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. El proceso transcurre a través de la formación de radicales libres, producidos por la ruptura de enlaces C-C y C-H, que reaccionan entre sí (Schneider *et al.*, 1996).

Las cantidades de HAP formadas dependen de la temperatura de combustión y de la naturaleza de los compuestos orgánicos implicados en el proceso. También en la formación geológica de combustibles fósiles se pueden formar HAP por procesos algo diferentes. De acuerdo con Wiesel *et al.* (1993) el material biológico que da origen al carbón y petróleo evoluciona en este caso bajo presión y a temperaturas relativamente bajas (menos de 200°C), condiciones en las que pueden formarse ciertas cantidades de HAP.

Como resultado de este origen natural y antropogénico que se ha citado, las principales fuentes de HAP en el ambiente son los procesos de combustión de materiales orgánicos y el uso de combustibles fósiles y sus derivados. La emisión a la atmósfera de estos hidrocarburos y su posterior deposición en aguas y suelo, junto a la presencia en determinadas aguas residuales industriales y procesos de lixiviación de materiales asfálticos y bituminosos, son los principales focos de contaminación (Mihelcic y Zimmerman, 2010).

Dada la amplia distribución de materia orgánica (carbón, madera, vegetación en general, combustibles fósiles, tabaco, alimentos), así como los procesos de combustión de la misma, los HAP son ubicuos, es decir se encuentran de forma generalizada en el ambiente. En general se distinguen dos tipos de fuentes como responsables de la presencia de HAP en el ambiente: 1) fuentes naturales y 2) fuentes antropogénicas las cuales se citan en el inciso 3.3.2.1

#### **3.3.2.1. Fuentes naturales**

Algunas formas de combustión natural de materia orgánica que comportan emisión al aire de HAP son las erupciones de los volcanes y los incendios forestales debidos a causas naturales. El petróleo y en general los combustibles fósiles contienen de forma natural HAP en bajas concentraciones (alrededor del 1%), dependiendo en gran medida del origen del crudo (Mihelcic y Zimmerman, 2010).

#### **3.3.2.2. Fuentes antropogénicas**

Este término hace referencia a todas las formas en las que se originan HAP que sean dependientes de la actividad humana. La amplia utilización de procesos de combustión de materia orgánica

durante el último siglo ha hecho que la producción de HAP sea un fenómeno habitual en nuestra sociedad.

Según Straalen y Lokke (1997), las principales actividades que emiten HAP al ambiente son:

- Procesos industriales: fabricación de coque, asfalto, negro de humo, ferroaleaciones, craqueo de petróleo, etc.
- Fuentes móviles: automóviles de gasolina y diesel, tráfico aéreo.
- Procesos de combustión: calefacciones, incineración de residuos, incendios forestales y agrícolas, etc.
- Generación de energía.

#### **3.3.2.2.1. Otras fuentes antropogénicas: el tabaco y los alimentos**

Una de las formas de combustión incompleta de materia orgánica de origen antropogénico es la que conlleva el hábito de fumar. Entre los muchos productos que se originan en la combustión, el humo del tabaco contiene cantidades importantes de HAP. Los HAP formados en la combustión del tabaco se encuentran, tanto en el humo directamente inhalado por el fumador, como en el que se exhala después de la combustión del cigarrillo (Mihelcic y Zimmerman, 2010).

Algunos HAP pueden formarse también como productos de la pirólisis de los carbohidratos, aminoácidos, y ácidos grasos. Así pues, muchos alimentos, especialmente carnes elaboradas a la parrilla o la barbacoa, en que la cocción se produce a elevadas temperaturas y en contacto directo con la llama, se forman HAP en la superficie del alimento. Lo mismo ocurre en los procesos de tostado a elevada temperatura de productos derivados de cereales, como el pan y la pizza. Finalmente también se absorben HAP en los procesos de ahumado de pescado o carnes (ATSDR, 1995; Tirado-Arreola *et al.*, 2010).

#### **3.3.3. Problemas ambientales relacionados con los HAP**

Los HAP se encuentran fundamentalmente como contaminantes atmosféricos. En el aire se encuentran presentes como vapores o gases o bien se encuentran adheridas a la superficie de pequeñas partículas sólidas. En general, esta contaminación consiste en mezclas de HAP, nunca de compuestos aislados; la composición específica de cada emisión depende de varios factores, tales como el tipo de combustible utilizado, de sus propiedades, y del tipo de tecnología utilizada para su combustión. Por otra parte, los HAP en general se emiten unidos a otras partículas, y una vez en el aire pueden sufrir rápidamente procesos de oxidación o degradación, favorecidos por la presencia de otros contaminantes y de la radiación solar UV (Hernández *et al.*, 2004).

Por otro lado, los HAP pueden entrar a las aguas superficiales a través de las descargas de plantas industriales y de tratamiento de aguas residuales y pueden ser liberados a los suelos a partir de desechos peligrosos si estos se escapan de los contenedores de almacenamiento. En el suelo, los HAP se unen a otras partículas y algunos pueden contaminar los acuíferos. La degradación de los HAP en el suelo y en el agua puede llevar semanas y meses y es causada principalmente por la acción de microorganismos (Weissenfels *et al.*, 1992).

De acuerdo con Orozco *et al.* (2003), el mayor peligro asociado con los efectos de los HAP en organismos vivos es la capacidad para producir efectos mutagénicos y carcinogénicos. Casi todos los hidrocarburos aromáticos policíclicos son sospechosos carcinogénicos en algún grado en peces y animales; en concreto, se ha demostrado la capacidad de producir cáncer en humanos el benzo[a]pireno y el benzo[a]antraceno (Anexo 1).

La elevada aromaticidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos les proporciona una alta resistencia química, por lo que su evolución en el ambiente está asociada a procesos con intervención de microorganismos. La vida media de la mayoría de los HAP, en aguas claras expuestas a fuerte radiación y con suficiente oxígeno disuelto, es inferior a una hora, pero al encontrarse adsorbidos en partículas o sedimentos, la velocidad de degradación se reduce, aumentando los valores de la vida media a semanas e incluso a años (Mihelcic y Zimmerman, 2010). Los valores promedios obtenidos por Orozco *et al.* (2003) se exponen en la Tabla 3.3.

De acuerdo con la Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades o *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, por su nombre en inglés (ATSDR, 1995), como regla general, según la persistencia en el ambiente se incrementa con el tamaño molecular de hidrocarburos. Los hidrocarburos más persistentes también son los que tienen, en general, una mayor capacidad de bioacumulación. La capacidad de solución en grasas de algunos contaminantes, frente al carácter hidrofílico y, por lo tanto, su carácter bioacumulativo puede medirse mediante la Ecuación 3.1:

$$K_{ow} = \frac{\text{concentración del hidrocarburo en octanol}}{\text{concentración del hidrocarburo en agua}} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

donde el coeficiente de reparto octanol/agua es  $K_{ow}$ .

Para la mayor parte de los HAP los valores de este coeficiente son altos, como se puede apreciar en la Tabla 3.3. Oscilan en el rango de 3 a 6.5 para el  $\log K_{ow}$ , lo que supone un elevado potencial bioacumulativo para los HAP de mayor masa molecular. De hecho, de acuerdo con la Ecuación 3.2, la relación del valor de  $K_{ow}$  con el valor de bioconcentración ( $K_b$  o CB) es directa:

$$K_b = f_{lip} \cdot K_{ow} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

donde  $f_{lip}$  es la fracción de grasas (lípidos) presente en el ser vivo.

Como se puede apreciar en la Tabla 3.3, los valores de vida media varían según el medio en el que se encuentren; pasado este tiempo inicia la degradación. Debido a estos problemas ambientales ocasionados por los HAP, las diferentes legislaciones limitan su presencia en cuerpos de agua y suelos. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (DOF, 2003), los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación son los que se resumen en la Tabla 3.4.

**Tabla 3.3. Vida media de algunos hidrocarburos en agua y en sedimentos (Orozco *et al.*, 2003)**

HAP	Vida media		Capacidad de bioacumulación log K <sub>ow</sub>
	Agua clara y luz solar (horas)	Sedimento acuoso (semanas)	
Naftaleno	-	2.4 - 4.4	3.36
Fenantreno	-	4 - 18	4.57
Pireno	0.75	34 - 90	5.18
Benzo(a)antraceno	0.54	-	5.61
Benzo(a)pireno	0.034	200 - 300	6.04

**Tabla 3.4. Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo según la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (DOF, 2003)**

Hidrocarburos específicos	Uso de suelo predominante (mg/kg masa seca)		
	Agrícola	Residencial	Industrial
Benceno	6	6	15
Tolueno	40	40	100
Etilbenceno	10	10	25
Xilenos	40	40	100
Benzo(a)pireno	2	2	10
Dibenzo(a, h)antraceno	2	2	10
Benzo(a)antraceno	2	2	10
Benzo(b)fluoranteno	2	2	10
Benzo(k)fluoranteno	8	8	80
Indeno(1,2,3-cd)pireno	2	2	10

### 3.3.4. Dinámica de los HAP en el suelo

Según Brady y Weil (2008), una vez que los contaminantes llegan al suelo, los contaminantes orgánicos, tales como plaguicidas e hidrocarburos (incluyendo a los HAP), se mueven en una o más de las siguientes siete rutas: (1) se pueden volatilizar a la atmósfera sin ningún tipo de cambio químico; (2) pueden ser adsorbidos al suelo; (3) se pueden mover hacia abajo a través del suelo en formas líquidas o en solución y podrían lixiviarse; (4) podrían sufrir reacciones químicas sobre la superficie del suelo o dentro de éste; (5) pueden ser degradados por acción biológica; (6) pueden ser lavados hacia ríos o lagunas por la escorrentía superficial; y (7) pueden ser absorbidos por plantas o animales terrestres ingresando así a la cadena trófica.

### 3.3.5. Biodegradación de los HAP

Los HAP de dos o tres anillos son más fáciles de biodegradar. Ejemplo de ello, es el trabajo reportado por Wiesel *et al.* (1993) en el que observaron que en una mezcla de naftaleno, fluoranteno y pireno (compuestos de dos, tres y cuatro anillos respectivamente), se presentó una secuencia progresiva de biodegradación comenzando por el naftaleno y continuando con el fluoranteno y finalmente el pireno.

Con el fin de profundizar en la relación que existe entre la biodegradación y el número de anillos aromáticos, se han realizado trabajos en los que se trabaja con una mezcla de compuestos de entre 2 y 6 anillos aromáticos en un medio líquido al cual se le adicionan microorganismos (Dreyer *et al.*, 1995).

Se debe tener en cuenta que para llevar a cabo la biodegradación deseada, es necesario controlar diversos factores, como por ejemplo oxígeno, nutrientes, humedad, temperatura y pH. Se sabe también que los HAP son compuestos químicos sumamente hidrófobos, como por ejemplo el benzo[a]pireno el cual tiene una solubilidad en agua de  $1.2 \times 10^{-3}$  ppm (Orozco *et al.*, 2003).

Según Arce (2000), los principales mecanismos que controlan la biodegradación de los HAP son:

- La absorción o bioabsorción
- La producción de metabolitos

La absorción de los HAP ocurre en la membrana celular y se plantea como primer paso en el proceso de degradación. Un concepto importante de este modelo es que en el interior de la membrana celular existe un micro-ambiente hidrófobo que facilita la absorción. De esta manera, pasa al citoplasma en donde se lleva a cabo la degradación de los HAP por acción enzimática (Peña, 1995).

Algunas propiedades importantes de la membrana celular son:

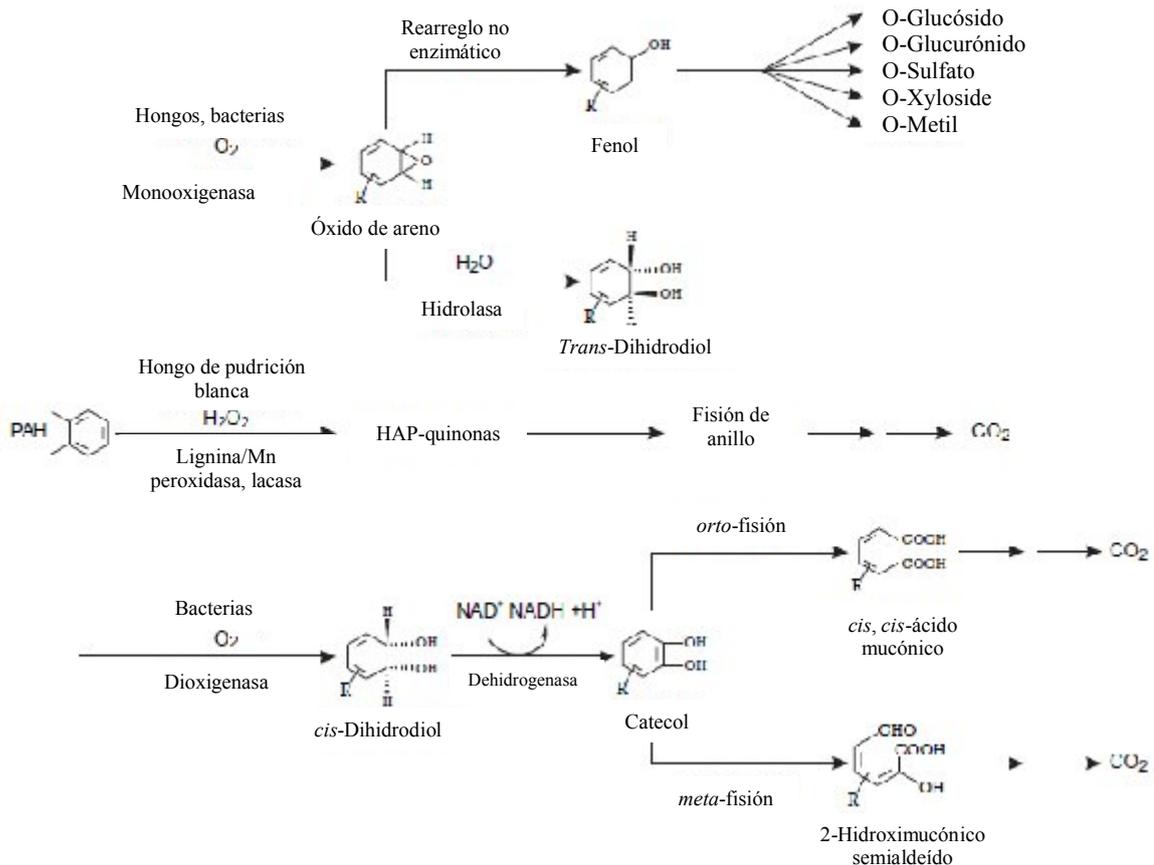
- Una bicapa lipídica
- Los fosfolípidos de la membrana se comportan como un mosaico fluido
- La membrana es selectivamente permeable
- El interior de la membrana es hidrófobo

Dadas las características hidrofóbicas de la membrana celular, los HAP pueden ingresar al interior de la célula, de tal manera que la proporción de degradación de éstos puede ser controlada a través de absorción de la membrana para lo cual se han desarrollado modelos de comportamiento que describe este proceso (Arce, 2000).

Cuando aumenta la hidrofobicidad del HAP hay una mayor bioabsorción en la membrana; sin embargo, la proporción de biodegradación disminuye ya que un menor contenido de HAP se encuentran biodisponibles en el líquido extracelular. Cuando la mayoría de los HAP están alejados de la célula, para poder llevar a cabo la bioabsorción, se obtiene una baja biodegradación del HAP (Chang y Bae, 1999).

### 3.3.5.1. Rutas de degradación biológica de los HAP

Se ha comprobado que la biodegradación de los HAP en condiciones aerobias produce una mayor remoción y en ella interviene el Citocromo P-450 como catalizador de la reacción de oxidación (Savas *et al.*, 1997). Los microorganismos que llevan a cabo este proceso pueden ser hongos o bacterias (Figura 3.1).



**Figura 3.1. Pasos iniciales de la ruta de degradación de HAP por hongos y bacterias (Singh, 2006)**

En general, el metabolismo de los hongos es más lento y menos eficiente que el de las bacterias en la degradación de los HAP. Sin embargo las bacterias no son capaces de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos que tienen más de cuatro anillos aromáticos, mientras que los hongos pueden degradar y mineralizar HAP con más de cuatro anillos aromáticos. Un grupo diverso de hongos han demostrado ser capaces de oxidar HAP de dos a seis anillos aromáticos (Singh, 2006).

Es importante tener en cuenta que algunos de los metabolitos que se forman durante la degradación llegan a ser más tóxicos que el HAP inicial. Por esto algunos compuestos con más de 4 anillos no se mineralizan completamente (Schneider *et al.*, 1996). También se sabe que el proceso de degradación es completo cuando se lleva a cabo por cepas puras (Bouchez, 1995).

### **3.3.5.2. Factores limitantes en la degradación biológica de los HAP**

Se han descrito en forma general los factores principales que se encuentran involucrados en la biodegradación de los HAP en un medio líquido donde los HAP están relativamente biodisponibles. A continuación se describen, con base en estudios de casos, factores que intervienen en la biodegradación de HAP en el suelo, principalmente aquellos que propician la biodisponibilidad del hidrocarburo.

#### **3.3.5.2.1. Biodisponibilidad**

En la biodegradación de HAP en el suelo, la biodisponibilidad del hidrocarburo puede llegar a ser el paso que determine la factibilidad de remoción (Chávez *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que al tratar de degradar una mezcla de de HAP con microorganismos autóctonos, sólo se logran degradar compuestos de dos a tres anillos aromáticos. Al hacer un extracto de los HAP del suelo y suspenderlos en un medio líquido que se inocula con microorganismos aislados del mismo suelo, se logra degradar una mayor proporción e incluso compuestos que anteriormente se creían recalcitrantes (Weissenfels *et al.*, 1992).

Como se mencionó anteriormente, el suelo es una matriz compleja, formada principalmente por arena, limo y arcilla, siendo la arcilla el factor más importante en la adsorción incluyendo a los HAP, de tal manera que un suelo con una gran cantidad de arcilla deja en menor biodisponibilidad a los HAP (Siebe, 1997). No obstante se ha observado que algunos microorganismos son capaces de generar compuestos extracelulares (enzimas) para desorber el HAP del suelo, tal como sucede con algunos hongos (Andersson y Henrysson, 1996).

#### **3.3.5.2.2. Temperatura**

La temperatura influye por su efecto en la naturaleza física y composición química de los HAP; en la actividad de los microorganismos y en la composición de la flora microbiana. La degradación generalmente disminuye cuando la temperatura desciende, lo que se relaciona con una reducción de la actividad enzimática (Gibbs *et al.*, 1975).

#### **3.3.5.2.3. Oxígeno**

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

#### **3.3.5.2.4. Acidez y alcalinidad**

Un suelo con valores de pH de 6 a 7 se considera neutro, con pH menor de 4.5 es muy ácido, y muy básico de 8 en adelante. El valor de pH del suelo se relaciona con la capacidad de intercambio catiónico del mismo (Primo, 1981). El pH afecta el comportamiento de las funciones celulares, transporte de la membrana celular y el equilibrio de las reacciones catalizadas de los microorganismos. La degradación de los hidrocarburos se reporta como muy rápida en valores de

pH cercano a 7. Para el caso de algunos hongos, su actividad aumenta a valores de 4.5 (Rodríguez *et al.*, 1999).

### 3.3.5.2.5. *Humedad*

Se considera que la humedad adecuada para la actividad microbiana es de 40 a 70% para sistemas aerobios. En suelos con humedad mayor, se reduce la disponibilidad de oxígeno y disminuye de manera significativa la actividad microbiana (Rodríguez *et al.*, 1999).

### 3.3.6. **Isotermas de adsorción**

La adsorción es un proceso en el que un compuesto soluble (adsorbato) se remueve de la solución por contacto con una superficie sólida (adsorbente) (Iturbe, 2012). La prueba de isoterma de adsorción describe el equilibrio de la adsorción de un material en una superficie. Según Iturbe (2012), los principales factores que afectan la adsorción en suelos son:

- Solubilidad: A mayor solubilidad menor adsorción
- Estructura molecular: Los compuestos de cadena ramificada se adsorben más que los de cadenas lineales
- Masa molecular: Las moléculas más grandes se adsorben mejor que las moléculas de menor tamaño
- Polaridad: A mayor polaridad menor adsorción

En la presente investigación se torna necesario detallar el proceso de adsorción que pudiese ocurrir en el suelo para que, al momento de la determinación, se cuente con un resultado preciso entre lo adsorbido y lo realmente removido del suelo.

Las isotermas de adsorción se usan con frecuencia como modelos experimentales. Para la prueba, se preparan viales, con al menos cinco concentraciones iniciales diferentes ( $C_0$ ) del compuesto problema por triplicado. Posteriormente se agrega a cada vial una cantidad conocida de suelo seco ( $M$ ), en donde se adiciona la solución en el volumen restante del vial ( $V$ ). Los viales se agitan entre 24 y 48 horas con la finalidad de dar oportunidad a que todas las partículas del suelo entren en contacto con la solución y obtener el equilibrio en un menor tiempo que lo que se da naturalmente. Posteriormente la muestra puede requerir centrifugación si el tipo de suelo presenta partículas coloidales o gran cantidad de materia orgánica. El siguiente paso es analizar el sobrenadante de las muestras para obtener la concentración en equilibrio ( $C_e$ ). Finalmente se aplica la Ecuación 3.3: Cálculo de la concentración adsorbida en cada vial (Weissenfels *et al.*, 1992).

$$C_s = \frac{(C_0 - C_e)V}{M} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

A partir de los valores obtenidos de  $C_s$  es posible dibujar la gráfica  $C_s - C_e$  y dependiendo del tipo de curva que se obtenga se aplicará el modelo que se ajuste más adecuadamente, de acuerdo con el coeficiente de correlación obtenido.

### 3.3.6.1. Modelos de adsorción

Existen varios modelos de adsorción pero, según Brady y Weil (2008) los tres de mayor aplicación son los descritos a continuación.

#### 3.3.6.1.1. Modelo lineal

La expresión más simple de la sorción en equilibrio se encuentra expuesta en la Ecuación 3.4: Modelo de adsorción lineal:

$$C_s = K_d C_e \quad \text{Ecuación 3.4}$$

donde:

**C<sub>s</sub>** = masa del compuesto adsorbido por la masa del suelo (mg/kg)

**K<sub>d</sub>** = coeficiente de distribución (mL/g)

**C<sub>e</sub>** = concentración del químico en la fase líquida (mg/L)

Esta ecuación considera que una gráfica en la que se represente C<sub>s</sub> en las ordenadas con C<sub>e</sub> en las abscisas resultará en una línea recta y la pendiente corresponderá al coeficiente de adsorción K<sub>d</sub>. Si la curva resulta curvilínea se deberá probar otro modelo.

#### 3.3.6.1.2. Modelo de Freundlich

Este método considera un comportamiento exponencial del proceso de adsorción. A continuación se expone la Ecuación 3.5: Modelo de Freundlich:

$$C_s = K_d C_e^N \quad \text{Ecuación 3.5}$$

donde:

**C<sub>s</sub>** = masa del compuesto adsorbido por la masa del suelo (mg/kg)

**K<sub>d</sub>** = coeficiente de distribución de Freundlich

**N** = coeficiente exponente de Freundlich

**C<sub>e</sub>** = concentración del químico en la fase líquida (mg/L)

#### 3.3.6.1.3. Modelo de Langmuir

El modelo de Langmuir considera que existe un número de sitios de adsorción disponibles y que la adsorción es reversible (Langmuir, 1918, citado por Leyva, 2010). A mayor número de sitios del sorbente que se ocupen, decrece la probabilidad de que el compuesto químico, aún en solución, encuentre un sitio para adsorberse. Esto considera que para altas concentraciones sólo quedan disponibles los sitios de adsorción menos favorables ya que los más adecuados se encuentran ocupados.

Esta aseveración se encuentra representada por la Ecuación 3.6: Modelo de Langmuir:

$$C_s = \frac{(aK_L C_e)}{(1 + K_L C_e)} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

donde:

**a** = masa del compuesto químico requerido para saturar una unidad de masa del suelo

**$K_L$**  = constante de Langmuir

**$C_e$**  = concentración del químico en la fase líquida (mg/L)

La ecuación de Langmuir corresponde a un modelo de crecimiento limitado, similar a los utilizados para representar una población microbiana dinámica (Leyva, 2010).

### 3.3.7. Técnicas analíticas empleadas para la determinación de HAP

Existen varias técnicas de análisis con las cuales se puede realizar la caracterización, separación y cuantificación de los analitos bajo estudio (derivados del petróleo), particularmente de los hidrocarburos aromáticos policíclicos. De acuerdo con la NOM 138-SEMARNAT/SS-2003 (DOF, 2003), la cual se basa en los métodos de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA por sus siglas en inglés), para la determinación cuantitativa de hidrocarburos aromáticos policíclicos se debe realizar en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución o por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

A continuación se describen, en los incisos 3.3.7.1 y 3.3.7.2, las técnicas recomendadas por las normas ambientales antes mencionadas para realizar la cuantificación de contaminantes orgánicos en suelos:

#### 3.3.7.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

De manera general, una cromatografía se realiza permitiendo que la mezcla de moléculas que se desea separar (muestra) interactúe con un medio o matriz de soporte que se denomina fase estacionaria. Un segundo medio (la fase móvil) que es inmiscible con la fase estacionaria se hace fluir a través de ésta para eluir a las moléculas en la muestra. En el caso particular de la cromatografía líquida de alta resolución, CLAR, una muestra en estado líquido es arrastrada por una corriente líquida llamada eluyente. Como fase estacionaria actúa un sólido finamente dividido (diámetro de partícula 3, 5, 10  $\mu\text{m}$ ). Los principales mecanismos de interacción de esta técnica son: adsorción superficial, partición, intercambio iónico y exclusión molecular (Fernández, 2009).

De acuerdo con Rosales (2008), como medio de detección para esta técnica se pueden utilizar cualquiera de las propiedades físicas o químicas que se puedan medir en la disolución. Generalmente, los detectores de la CLAR no son destructivos empleándose comúnmente:

- UV/Vis
- Fotodiodos
- Índice de refracción
- Fluorescencia

- Conductividad
- Dispersión de luz
- Espectrometría de masas

De los detectores antes mencionados el más utilizado es el de UV/Vis, el cual se emplea para sustancias que absorben radiación y utiliza lámparas de deuterio, xenón o wolframio (tungsteno). Las características que hacen que esta técnica analítica sea tan utilizada son: la selectividad, reproducibilidad, sensibilidad y la rapidez en los análisis. Según Lee *et al.* (2010), estas características proporcionan a la técnica con ciertas ventajas que se describen a continuación:

- Tiempo de análisis reducido
- Menor consumo de disolventes
- Menor dispersión de los solutos a analizar
- Ahorro de costos

### 3.3.7.2. Cromatografía de gases - Espectrometría de masas

El acoplamiento de la cromatografía de gases a la espectrometría de masas es una alternativa utilizada de manera generalizada para la separación, identificación y cuantificación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles en mezclas complejas. También se le utiliza para la determinación de masas moleculares y composiciones elementales de compuestos orgánicos desconocidos en mezclas complejas, así como la determinación estructural de compuestos orgánicos desconocidos en mezclas complejas tanto haciendo coincidir sus espectros de masas con espectros de referencia como por una interpretación espectral *a priori*. Sus aplicaciones son muy variadas tales como la cuantificación de contaminantes en agua potable y de desecho usando los métodos oficiales de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA), la cuantificación de drogas y sus metabolitos en sangre, tanto para aplicaciones farmacéuticas como forenses, la identificación de compuestos orgánicos desconocidos en vertederos de residuos peligrosos, la identificación de productos de reacciones de compuestos químicos orgánicos sintéticos y el análisis de productos industriales para el control de calidad.

Entre las condiciones que se deben de tener para poder ser analizados los compuestos mediante esta técnica se encuentran las siguientes:

- Estado:
  - Los compuestos orgánicos deben estar en solución para la inyección en el cromatógrafo de gases.
  - El disolvente deberá ser volátil y primordialmente de origen orgánico (hexano o diclorometano)
- Cantidad:
  - Depende del método de ionización, sensibilidad analítica de 1 a 100 ng por componentes
- Preparación:
  - Puede ser desde simplemente disolver la muestra en un solvente adecuado hasta extensos procesos de limpieza usando varias formas de cromatografía de líquidos

Aparte del tiempo empleado para la preparación de la muestra, la duración de la corrida y el análisis de los datos obtenidos pueden tomar entre 1 a 20 horas (o más) dependiendo del nivel de detalle necesario (Bouchonnet y Libong, 2004).

### **3.4. Remediación de suelos contaminados con hidrocarburos**

A escala mundial, se ha desarrollado un gran número de opciones de remediación para suelos contaminados con hidrocarburos, mismas que se pueden clasificar, según Saval (1999), de diferentes maneras. Una de las clasificaciones más comunes se realiza con base en el principio de su funcionamiento, teniendo así las técnicas biológicas, fisicoquímicas y térmicas. Otra clasificación se basa en el efecto sobre los contaminantes, de tal forma que se tienen técnicas de retención, extracción, separación y descomposición. En la práctica, las dos clasificaciones mencionadas son válidas e incluso complementarias, ya que generalmente necesitan combinarse.

El término “remediación”, aunque no está definido en México en algún documento oficial, actualmente es utilizado para referirse a todas aquellas acciones aplicadas a suelos y acuíferos que conduzcan a la reducción de niveles de contaminación (Arce, 2000).

De acuerdo con Saval (1999), al hablar de éxito de la remediación, pueden existir diversos enfoques, entre ellos:

- Alcanzar los niveles de limpieza, tomando normativas extranjeras como referencia
- Reducir el riesgo a la salud al disminuir la concentración de compuestos tóxicos
- Devolver al sitio una vista agradable en la superficie, sin importar lo que queda enterrado
- Reducir los niveles de contaminación, sin importar el efecto sobre el suelo mismo y los alrededores del sitio
- Alcanzar los objetivos en el mínimo tiempo posible
- Realizar los trabajos al menor costo posible

De estos enfoques, los más comunes son los dos primeros. Aspectos como el costo y el tiempo de ejecución, a pesar de que no son elementos técnicos, en la mayoría de los casos sirven como base para la toma de decisiones en trabajos de remediación, lo cual aumenta la probabilidad de fracaso. Según Chávez *et al.* (2003) los requisitos que deben cumplir las técnicas de remediación para ser considerada ambientalmente aceptable son los siguientes:

- Reducir la concentración de los contaminantes, como respuesta directa de su aplicación
- No transferir los contaminantes de una matriz a otra.
- Ser irreversible, esto es, no permitir que, después de cierto tiempo, los contaminantes vuelvan a reaparecer en el lugar, como si nada se hubiera hecho.
- No crear mayores disturbios ambientales que los propios de la contaminación
- Ser una tecnología integral que incluya el tratamiento de desechos en caso de generarlos.

#### **3.4.1. Experiencias de remediación de suelos en México**

La necesidad de sanear suelos contaminados ha promovido la creciente aparición de negocios, tanto nacionales como extranjeros, interesados en colocar sus productos o servicios de

remediación en México, muchas de ellas sin conocimientos o experiencias previas. Lo anterior ha dejado una mala imagen no solamente de las empresas que se han encargado de los trabajos, sino de las mismas técnicas que aplican, por lo que las empresas que actúan con responsabilidad han tenido que luchar contra esa mala imagen (Saval, 1999).

Las experiencias exitosas de remediación que hasta ahora se han registrado en las instancias gubernamentales encargadas, están referidas a situaciones en las que se alcanzaron los límites de limpieza establecidos para cada caso particular. Debido al desconocimiento de los aspectos técnicos involucrados en cada caso y a la necesidad de proteger el conocimiento en el uso específico de cada técnica, no se documenta con claridad la forma en que se llegó a los límites establecidos. En lo que se refiere a productos para la remediación de suelos, lo más común es encontrar formulaciones cuya descripción de contenido es mínima. El ejemplo típico lo constituyen aquellos que se venden bajo el nombre de “productos para biorremediación”, como son bacterias y agentes tensoactivos. Se ha tenido varias experiencias en México con los productos comerciales de origen microbiano. Algunos de ellos son efectivos, mientras que otros no lo son, ya sea porque no son bacterias degradadoras o porque no son viables. Lo anterior se ha descubierto mediante pruebas simultáneas en un mismo sitio: por un lado se deja actuar a la flora nativa, que se estimula solamente con nutrientes y oxigenación, y por el otro se aplican los productos comerciales bajo las especificaciones del proveedor. Los resultados indican que, por lo general, las bacterias nativas son mejores que las contenidas en los productos comerciales, porque las nativas son bacterias adaptadas a los contaminantes propios del lugar. También, conviene señalar que varios productos comerciales contienen bacterias que han sido manipuladas genéticamente (*GEM*, “*Genetically Engineered Microorganisms*”). La aplicación de éstas en el ambiente aún no ha sido aprobada a escala mundial, en virtud del riesgo que implica su manejo y dispersión en sitios abiertos (Cortés, 2011).

Por lo que respecta al uso de agentes tensoactivos (surfactantes) -el ingrediente activo de jabones y detergentes-, son de gran utilidad en remediación, ya que permiten desorber los contaminantes de la fase sólida del suelo, para ponerlos en la fase acuosa. Su uso se está intensificando en México, pero es importante tener en cuenta el riesgo que implica su aplicación en suelos y cuerpos de agua sin una dosificación y control adecuados, ya que pueden generar problemas ambientales secundarios, como la disolución de los hidrocarburos en el agua. Entre otras experiencias negativas ocurridas en México, se ha observado que un suelo contaminado se mezcla con suelo limpio, como una forma de “dilución”, para reducir la concentración de contaminantes y, con ello, facilitar la aplicación de otras técnicas de remediación. Otros ejemplos más graves, presentados por Paredes (2008), han sido la aplicación de fuertes oxidantes químicos al suelo para transformar los contaminantes en bióxido de carbono; el simple movimiento del suelo para ventilar y transferir a la atmósfera contaminantes volátiles adsorbidos en el suelo o incluso la generación de lixiviados que alcanzan el manto freático por la adición de reactivos químicos que, se dice, son estabilizadores. Desafortunadamente, estas actividades son llevadas a la práctica bajo el nombre de “tecnologías de remediación” y, aunque en algunos casos se logra la reducción de los contaminantes, es un hecho que las condiciones del sitio se deterioran de manera importante (Leyva, 2010).

### 3.4.2. Biorremediación

La biorremediación, de acuerdo con Cookson (1995), se define como el proceso mediante el cual los desechos orgánicos son biológicamente degradados bajo condiciones controladas en un estado inocuo o niveles por debajo de los límites de concentración establecidos por autoridades reguladoras. La biorremediación es una opción que ofrece la posibilidad de destruir o neutralizar contaminantes diferentes con actividad biológica natural. Como tal, se utiliza relativamente de bajo costo y tecnologías técnicas sencillas, que generalmente tienen una alta aceptación por el público y con frecuencia se pueden realizar en el sitio (IUPAC, 2001).

La biorremediación puede emplear organismos propios del sitio (autóctonos) o ajenos a éste (exógenos), y llevarse a cabo en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno molecular). Al igual que otras tecnologías de remediación, la biorremediación puede realizarse en el mismo sitio sin necesidad de excavar el material contaminado (*in situ*), o bien excavando el material para tratarlo en el sitio "*in situ*" o fuera de él, "*ex situ*". Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados por hidrocarburos totales del petróleo (HTP), solventes, explosivos, clorofenoles, plaguicidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Velazco y Volke, 2002).

#### 3.4.2.1. Ventajas de la biorremediación

- La biorremediación es un proceso natural y, por lo tanto, la percepción del público es la de un proceso de tratamiento de residuos aceptable para el material contaminado del suelo. Los residuos para el tratamiento son, por lo general, productos inocuos como dióxido de carbono, agua y biomasa celular.
- En teoría, la biorremediación es útil para la completa descomposición de una gran variedad de contaminantes. Muchos compuestos que son legalmente considerados como peligrosos se pueden transformar en productos inofensivos. Esto elimina la posibilidad de futura responsabilidad asociada con el tratamiento y eliminación de material contaminado.
- En lugar de la transferencia de contaminantes de un medio ambiental a otro, por ejemplo, de la tierra al agua o aire, la descomposición completa de los contaminantes del interés es posible.
- A menudo se puede realizar en el lugar sin causar una interrupción importante de las actividades normales. Esto también elimina la necesidad de transportar cantidades de residuos fuera del sitio y las posibles amenazas para la salud humana y el ambiente que pueden ocurrir durante el transporte.
- La biorremediación puede resultar menos costosa que otras tecnologías que se utilizan para la limpieza de residuos peligrosos (Arce, 2000).

#### 3.4.2.2. Desventajas de la biorremediación

- La biorremediación se limita a aquellos compuestos que son biodegradables. No todos los compuestos son susceptibles a la degradación rápida y completa.
- Existe la preocupación de que los productos de biodegradación pueden ser más persistentes y tóxicos que el compuesto original.

- Los procesos biológicos son a menudo muy específicos. Entre los factores importantes del sitio necesario para el éxito incluyen la presencia de poblaciones microbianas capaces metabólicamente, las condiciones adecuadas de crecimiento medio ambiente, y los niveles adecuados de nutrientes y contaminantes.
- Es difícil extrapolar a partir de experimentos a escala de banco y los estudios a nivel piloto para las operaciones de campo a gran escala.
- La biorremediación a menudo toma más tiempo que otras opciones de tratamiento, tales como la excavación y remoción del suelo o la incineración.
- La incertidumbre sobre los criterios de regulación sigue siendo un rendimiento aceptable para la biorremediación. No existe una definición aceptada de "limpio", por lo que evaluar el desempeño de la biorremediación es difícil y no hay criterios de valoración aceptables para tratamientos de biorremediación (Gimsing *et al.*, 2009).

### 3.4.2.3. Biorremediación en México

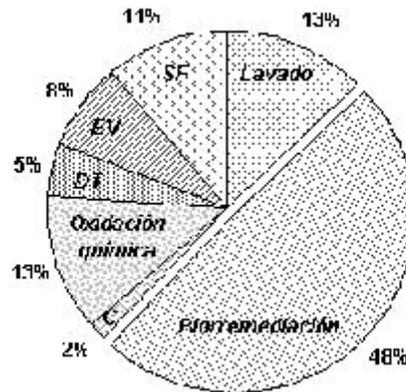
En el mercado ambiental mexicano, actualmente existe una cantidad considerable de empresas nacionales e internacionales que ofrecen diferentes tipos de tecnologías para la remediación de sitios contaminados. Asimismo, con el propósito de establecer un control acerca de las tecnologías que se ofrecen y conocer sus posibilidades reales de éxito, se inició en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México el 18 de agosto de 1997 la aplicación obligatoria de la Licencia Ambiental Única (LAU), para todas aquellas empresas que realizan trabajos de remediación de suelos. Ello, de conformidad con el acuerdo sectorial publicado en el Diario Oficial de la Federación (DOF) del 11 de abril de 1997. Posteriormente, se publicó el acuerdo delegatorio respectivo en el DOF del 3 de diciembre de 1998 y, a partir del 4 de enero de 1999, la LAU es emitida por las delegaciones federales de la SEMARNAP en los estados de Aguascalientes, Baja California, Coahuila, Chihuahua, México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz. Para el resto de los estados, el trámite de la licencia está centralizado (Semarnat, 2013).

De las tecnologías que ofrecen las empresas que cuentan con permisos para remediar suelos contaminados, todas están enfocadas exclusivamente a la remediación de sitios contaminados por compuestos orgánicos. Dentro de los contaminantes tratados con mayor frecuencia, se encuentran los HTP y los HAP, lodos aceitosos, lodos de perforación y recortes de perforación. De un total de 57 empresas autorizadas, ninguna ofrece servicios para la restauración de suelos contaminados por metales (Velazco y Volke, 2002).

De acuerdo con datos proporcionados por 40 empresas autorizadas para remediar suelos contaminados por diferentes tipos de contaminantes, dentro de las tecnologías más empleadas se encuentran las biológicas (biorremediación, con 48%), siendo las más utilizadas el compostaje y la biolabranza. El lavado de suelos, la oxidación química y la separación física constituyen otra parte importante de las tecnologías más empleadas en México (Figura 3.2).

A pesar de que existe información acerca de las tecnologías de biorremediación que se emplean en México, se aprecian ciertas deficiencias sobre el manejo y conocimiento de estos procesos por algunas de las empresas dedicadas a esta actividad. Este hecho se debe, en parte, a que muchas de estas empresas no cuentan con profesionales en microbiología y/o biotecnología, debido a que su principal actividad para realizar los trabajos de biorremediación consiste en importar

formulaciones (concentrados bacterianos o enzimáticos, agentes tenso activos y mezclas de nutrientes, entre otros) para venderlas en México. Muchos de estos productos, además, carecen de información acerca del contenido y su eficacia no se ha demostrado para las condiciones climáticas de nuestro país (Paredes, 2008).



**Figura 3.2 Tecnologías de remediación para suelos utilizadas en México por empresas autorizadas (donde: SF: separación física; EV: extracción de vapores; DT: desorción térmica; C: centrifugación) (Fuente: Velazco y Volke, 2002)**

Algunas empresas venden el servicio de biorremediación completo, en el que se incluye la excavación del suelo contaminado, el suministro de productos y su aplicación. En estos casos, los contratistas siguen las instrucciones del fabricante para la aplicación de los productos, sin entender las bondades y limitaciones de estos procesos a los que llaman “tecnología”. Afortunadamente, no todo el panorama es negativo, ya que también existen empresas responsables que cuentan con personal calificado y capacitado para realizar trabajos de biorremediación (Saval, 1998).

En la actualidad existen muchos organismos utilizados para la biorremediación de suelos, entre ellos están las plantas (fitorremediación) y los microorganismos que intervienen en el proceso de compostaje. Recientemente se ha desarrollado el uso de hongos para la biorremediación con resultados muy interesantes. En la Tabla 3.5 se describen los hongos mayormente utilizados para la remediación de contaminantes.

### 3.5. La micorremediación

Los hongos han sido aprovechados por el ser humano en diversas aplicaciones por miles de años. En cualquier ecosistema, los hongos están entre los mayores degradadores de polímeros vegetales tales como la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. Los hongos poseen la habilidad de modificar la permeabilidad del suelo, su capacidad de intercambio iónico y desintoxicar suelos contaminados (Singh, 2006).

La micorremediación es el uso de hongos para degradar o remover contaminantes del ambiente. Los hongos tienen una gran capacidad para desarmar y romper largas y complejas cadenas de los contaminantes más recalcitrantes, convirtiéndolos en cadenas más simples y químicamente menos tóxicas (Stamets, 2005).

La mayoría de hongos son organismos robustos y, generalmente, poseen una mayor tolerancia a altas concentraciones de contaminantes químicos con relación a bacterias, lo cual explica por qué los hongos han sido investigados intensivamente desde mediados de los ochentas por su capacidad de biorremediación (Gadd, 2001).

La micorremediación emplea el micelio de hongos seleccionados para remover o degradar contaminantes del ambiente (Tabla 3.5). Ha sido demostrado, a escala de laboratorio, que la micorremediación opera en períodos de tiempo de semanas a meses y que es particularmente efectiva en la remoción de componentes recalcitrantes y tóxicos, con moléculas aromáticas de alta masa molecular de productos derivados del petróleo (hidrocarburos aromáticos policíclicos con más de 4 anillos) que son más difícilmente degradados por otros sistemas microbiológicos (Becker *et al.*, 1998).

Las prácticas de la micorremediación consisten en incorporar el micelio en el suelo contaminado, (Stamets, 2005). La poderosa enzima secretada por el micelio de ciertos hongos digiere lignina y celulosa, los principales componentes de la madera. Esta enzima digestiva también puede romper una amplia gama de contaminantes que, al igual que la lignina y celulosa, sus estructuras moleculares consisten en largas cadenas de carbono.

**Tabla 3.5. Hongos utilizados para la biorremediación de contaminantes (Stamets, 2005)**

Tipo de hongo (Género y especie)	Antracenos	Benzopirenos	Arseniato de cobre cromado	Cloro	Fosfonato dimetil metil	Dioxinas	Organo fosforados persistentes	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)	Bifenilos policlorados (PCB)	Pentaclorofenoles ("PENTAS")	Trinitotolueno (TNT)	Tipo de degradación [blanca(W), café (B)]
<i>Antrodia radiculosa</i>			x							x		W
<i>Armillaria ostoyae</i>					x							W
<i>Bjerkandera adusta</i>		x						X				W
<i>Gloeophyllum trabeum</i>			x			x						B
<i>Grifola frondosa</i>									x			W
<i>Irpex lacteus</i>								X				W
<i>Lentinula edodes</i>								X	x	x		W
<i>Meruliporia incrassata</i>			x							x		B
<i>Mycena alcalina</i>				x								-
<i>Naematoloma frowardii</i>								x			x	W
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>		x								x	x	W
<i>Pleurotus eryngii</i>						x						W
<i>Pleurotus ostreatus</i>		x			x	x		x	x		x	W

**Tabla 3.5 (Continuación). Hongos utilizados para la biorremediación de contaminantes (Stamets, 2005)**

Tipo de hongo (Género y especie)	Antracenos	Benzopirenos	Arseniato de cobre cromado	Cloro	Fosfonato dimetil metil	Dioxinas	Organo fosforados persistentes	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)	Bifenilos policlorados (PCB)	Pentaclorofenoles ("PENTAS")	Trinitotolueno (TNT)	Tipo de degradación [blanca(W), café (B)]
<i>Pleurotus pulmonarius</i>						x					x	W
<i>Psilocybe spp.</i>					x		x					W
<i>Serpula lacrymans</i>			x					x				B
<i>Trametes hirsuta</i>										x		W
<i>Trametes versicolor</i>	x		x		x	x	x			x	x	W

### 3.5.1. *Pleurotus ostreatus* como degradador de hidrocarburos

Los hongos son considerados como el segundo grupo más grande de organismos en la biosfera, después de los artrópodos. Basados en una relación estimada de especies de hongos a especies de plantas vasculares de 6:1, el número total de especies es estimado en alrededor de 1,500,000.00 en el mundo (Sánchez y Royse, 2001).

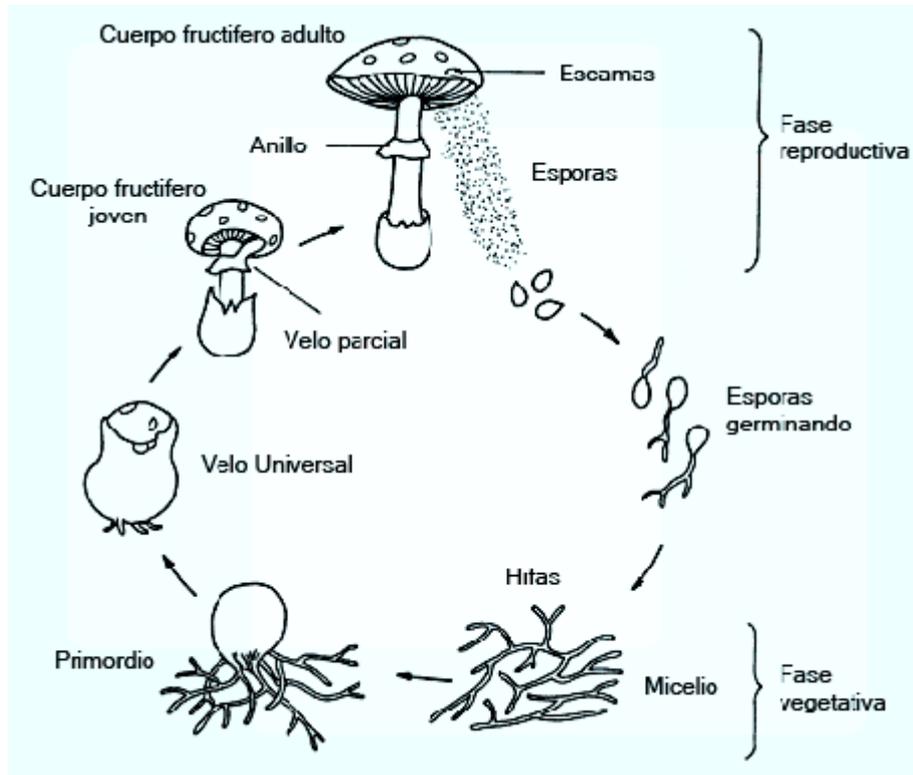
Según Stamets (2005), de todos los hongos cultivados en el mundo, *P. ostreatus* es el más fácil de cultivar. Esta especie se adapta a una amplia gama de sustratos. El micelio del hongo ostra, como también se conoce a *P. ostreatus*, es capaz de digerir 2.3 kg de madera, reduciendo su masa a menos del 50% en unos pocos meses.

Los recursos genéticos de *Pleurotus* spp. presentan un gran interés para la agricultura y la economía, ya que se pueden desarrollar sobre una gran cantidad de sustratos lignocelulósicos útiles no sólo para la alimentación humana, sino también para otros aspectos como la alimentación animal, la medicina, la farmacia, la industria química, el control biológico, la descontaminación de suelos, etcétera.

#### 3.5.1.1. Biología y cultivo de *Pleurotus* spp.

Los hongos constituyen un grupo muy variable y polimórfico difícil de caracterizar; sin embargo, cuando se hace referencia a ellos se habla de organismos que nacen de esporas, carecen de clorofila, se reproducen sexual o asexualmente y tienen un cuerpo generalmente formado por filamentos muy ramificados llamados hifas, los cuales en conjunto forman el micelio (Stamets, 2000).

El ciclo de vida de los hongos “inicia” con una espora (Figura 3.3). Cada espora contiene la mitad del material genético necesario para la propagación de la especie. A partir de cada espora crece una célula filamentosa llamada *hifa*. Esta célula filamentosa tiene un crecimiento mitótico hasta que se encuentra con una hifa compatible. En este punto se combina el material genético. El micelio resultante es binuclear y tendrá una tasa de crecimiento mayor (INBio, 2011).



**Figura 3.3 Ciclo de vida de los hongos (INBio, 2011)**

El micelio secreta enzimas y ácidos necesarios para degradar compuestos de lignina y celulosa convirtiéndolos en compuestos más simples. Este crecimiento vegetativo representa la etapa más prolongada en el ciclo de vida del hongo. El micelio crecerá hasta que se encuentre con una barrera física o una competencia con otro organismo en el sustrato. En esta etapa se libera calor y dióxido de carbono (Stamets, 2005).

El crecimiento del micelio sólo se da en las puntas, por lo que forman masas algodonosas o afelpadas de forma radial, que es común observar en la hojarasca, troncos caídos y en el suelo de bosques y praderas húmedas. Se distinguen de las plantas porque no almacenan su energía en forma de almidón, polisacárido insoluble que forma las reservas alimenticias de las plantas. En su lugar, almacenan otros polisacáridos como la trehalosa y el glucógeno, polímero de la glucosa que los animales utilizan para almacenar energía por corto tiempo (Sánchez y Royse, 2001).

Una vez que el micelio se encuentre desarrollado, entrará en una etapa estacionaria dentro del ciclo de vida. En esta etapa el hongo puede soportar la inclemencia del clima. La emisión de calor y CO<sub>2</sub>, en esta etapa, disminuye. Esta disminución natural de temperatura en el sustrato en conjunto con un estímulo ambiental (humedad, agua, temperatura, reducción de CO<sub>2</sub>) provocará la

acumulación de nutrientes en el micelio. Este punto de acumulación, conocido como *primordio*, es la siguiente etapa en el ciclo de vida (Stamets, 2000).

Cada primordio se convertirá en un cuerpo fructífero (hongo) por lo que esta etapa es crítica. Una vez que la formación de primordio inicia se ve influenciada por factores ambientales como:

- Humedad
- Aireación
- Temperatura
- Luz

Nuevas esporas se forman en el cuerpo fructífero, reiniciando el ciclo.

#### **3.5.1.1.1. Reproducción**

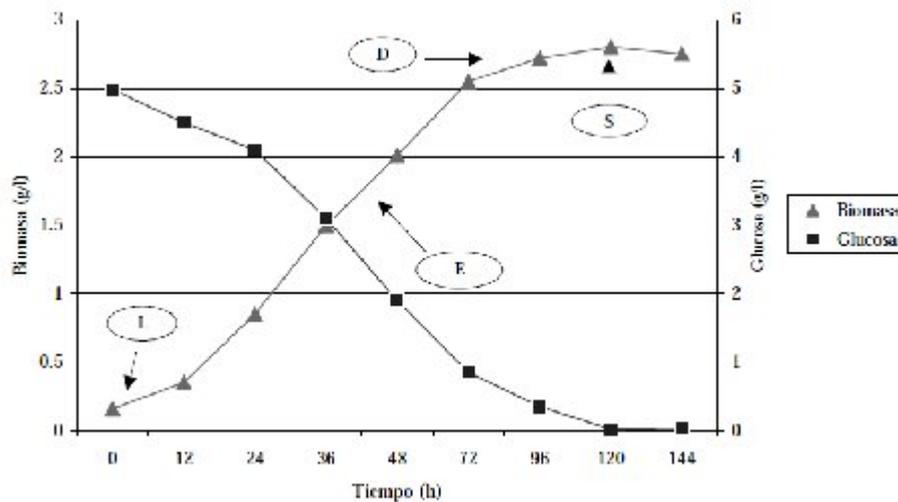
El crecimiento de un hongo puede iniciarse a partir de una spora o de una fracción viable de hifa. Dicho crecimiento se da en forma polarizada o apical porque la elongación de la superficie se da en un punto y no en toda la célula. Esta característica ocasiona que las células de los hongos (exceptuando las levaduras) tengan una estructura cilíndrica, denominada hifa, delimitada por una pared que se extienden de manera ramificada para formar un sistema de varias hifas conocido como micelio (Sánchez y Royse, 2001).

La semilla de los hongos comestibles se prepara a partir de micelio propagado en granos de cereal esterilizado con vapor. Esta mezcla grano/micelio, también denominada inóculo, es utilizada para sembrar sustratos para el cultivo de hongos. La totalidad de la semilla comercial se elabora con micelio proveniente de un cultivo almacenado, más que de esporas, porque cada spora es capaz de producir una nueva cepa y sus características son impredecibles (Sánchez y Royse, 2001).

#### **3.5.1.1.2. Crecimiento**

Este desarrollo se puede representar de manera gráfica mediante una curva como la que se muestra en la Figura 3.4. Cuando el crecimiento de un hongo se da en un medio sólido en lugar de fase exponencial se presenta una fase de crecimiento más o menos lineal (Márquez-Rocha *et al.*, 1999).

Hay muchas maneras de medir el crecimiento de un organismo (por el incremento en masa, por la variación en la concentración de algún componente celular, por la producción de CO<sub>2</sub>, etc.). La elección del método depende en gran medida del objetivo de la medición. Para el caso de estudios relacionados con el cultivo de hongos, es de particular interés el estudio de la velocidad de colonización del sustrato, por lo que es frecuente el análisis del crecimiento del micelio a través del incremento radial de la colonia. Ésta es una técnica sumamente sencilla y ampliamente utilizada para determinar la influencia de la temperatura, del pH, o de la composición química del medio de cultivo, sobre el crecimiento; pero ha demostrado poca utilidad para hacer inferencias sobre la producción en cuerpos fructíferos y la productividad de los hongos, entre otras cosas (Sánchez y Royse, 2001).



**Figura 3.4. Crecimiento del *Pleurotus ostreatus* ECS-0110 en medio líquido**  
 Se observan las diferentes fases de desarrollo: L=latencia; E=exponencial; D=declinación; S=estacionaria.  
 Condiciones de cultivo: caldo de glucosa-extracto de levadura, agitación 200 rpm, aireación 1 vvm y temperatura 26°C. Tasa de crecimiento=0.036 h<sup>-1</sup> (Márquez-Rocha *et al.*, 1999)

Esta determinación se puede hacer a través de la medición periódica del diámetro o radio de una colonia para después graficar los datos en función del tiempo y obtener la pendiente de la recta resultante. Una variación de este método es colocar en tubos estériles el sustrato inoculado y medir la extensión del crecimiento a intervalos periódicos (Singh, 2006).

Según el estudio realizado por Singh (2006), la tasa radial de crecimiento de *P. ostreatus* es de 11 mm día<sup>-1</sup>.

### 3.5.1.1.3. Fructificación

Resulta de gran interés práctico la definición de los términos expresados en la Ecuación 3.7: Eficiencia biológica (EB) de hongos y la Ecuación 3.8: Tasa de producción (TP) de hongos (Stamets, 2000), que son:

$$EB = (\text{Masa de los cuerpos fructíferos frescos} / \text{Masa seca del sustrato}) \times 100 \quad \text{Ecuación 3.7}$$

$$TP = EB / \text{días requeridos para cosecha} \quad \text{Ecuación 3.8}$$

### 3.5.1.1.4. La fase de declinación

Esta fase se presenta cuando la acumulación de los desechos del metabolismo del hongo alcanzan niveles que se vuelven limitantes para el crecimiento o porque alguno de los nutrientes escasea o se termina. En estas condiciones la tasa de crecimiento máxima no puede ser mantenida y empieza generalmente a disminuir de manera paulatina. La importancia de esta disminución depende de la importancia de los factores o nutrientes agotados o acumulados (Sánchez y Royse., 2001).

La declinación es una fase propicia para que aparezcan mutaciones celulares porque, sobre todo en cultivos puros, se disminuye la presión de selección. Dadas las condiciones adversas del medio durante la declinación, es relativamente frecuente que un organismo pierda algunas capacidades o modifique otras por mutación. Esto explica por qué la resiembra continua o sistemática de un organismo en un medio de cultivo, sobre todo sintético, puede conducir rápidamente al agotamiento de la cepa o a la pérdida de la misma (Stamets, 2005).

#### **3.5.1.1.5. La fase estacionaria y la fase de muerte**

La fase estacionaria es el punto en el cual el crecimiento cesa, aunque todavía prevalece un metabolismo celular de mantenimiento. Durante esta etapa aún hay consumo de glucosa y otros nutrientes. El hongo en esta fase es aún capaz de reiniciar crecimiento si es sembrado en un medio propicio, aunque tendrá un período de latencia más o menos largo según las condiciones. Durante la fase estacionaria empiezan a aparecer diversos tipos de enzimas autolíticas que conducen a la muerte del hongo (Márquez-Rocha *et al.*, 1999).

#### **3.5.1.2. *P. ostreatus* en México**

El cultivo de *P. ostreatus* inició en 1974 en la Delegación de Cuajimalpa, Edo de México. Actualmente, debido a diversas investigaciones y adaptaciones tecnológicas desarrolladas, el interés por cultivarlo se ha difundido en todos los ámbitos del país. Esto ha dado lugar a un innumerable grupo de pequeñas iniciativas de producción a baja escala, aún de economía familiar, las cuales comercializan el producto en fresco (Márquez-Rocha *et al.*, 1999).

Según Sánchez y Royse (2001), con este cultivo se observan dos tipos de tecnologías: una de tipo industrial que requiere de un compostaje aerobio con pasteurización por vapor en túnel; y otra más rústica, que se utiliza en pequeñas plantas de tipo familiar. Esta última, de producción limitada y no contabilizada en la economía regional, emplea la inmersión del sustrato en agua alcalina fría o en agua caliente para la eliminación de la microbiota concurrente. La mayoría de las empresas que usan esta tecnología enfrentan muchas dificultades tanto técnicas como financieras en su operación. Los sustratos utilizados en este país suelen variar, aunque los más frecuentes son el olote, el tamo y el rastrojo de maíz, las pajas, y la pulpa de café, entre otras. La elección depende de la disponibilidad (Stamets, 2005).

Las cepas utilizadas son principalmente de la especie *P. ostreatus*, las cuales pueden ser de origen nacional o extranjero. Entre los problemas de cultivo más frecuentes, están los daños causados por los deuteromicetos *Trichoderma*, *Monilia* y *Penicillium* en la fase de producción de semilla y de incubación del sustrato, y también por *Coprinus spp.* y *Poronia spp.* durante la fructificación (Sánchez y Royse, 2001).

Durante el periodo 1990-1997 se observó en México un incremento en la producción de dicha especie superior al 400%. En este último año se estimó una producción de 1825 toneladas, lo cual significó un nivel de producción comercial de unas 5 ton/día. Por esta razón se ha considerado a México como el principal productor de América (Sánchez y Royse, 2001).

## 4. METODOLOGÍA

Para la realización de los objetivos planteados en la presente investigación se dividió la metodología en tres etapas:

### *Etapa I Estudios sobre el suelo a analizar*

- Obtención y caracterización del suelo a estudiar
- Realización de isotermas de adsorción

### *Etapa II Estudios sobre el hongo *Pleurotus ostreatus**

- Obtención del cultivo puro de *Pleurotus ostreatus*
- Medición de la tolerancia del micelio de *P. ostreatus* a distintas concentraciones de benzo(a)pireno

### *Etapa III Análisis del suelo contaminado en los reactores*

- Construcción de los reactores que contienen al suelo contaminado
- Análisis de los tratamientos bajo estudio

## 4.1. Diseño experimental

Para llevar a cabo la parte experimental se partió de un diseño factorial  $2^2$  (Dzul-Puc *et al*, 2004; Gadd, 2001; Singh, 2006), es decir, con dos niveles y dos variables independientes, siendo la variable dependiente la concentración de benzo[a]pireno degradada por el micelio. En la Tabla 4.1 se describe el diseño experimental:

**Tabla 4.1. Diseño experimental factorial  $2^2$**

Unidades experimentales	Notación	Tratamiento		Variable dependiente
		Humedad del suelo (X <sub>1</sub> )	Cantidad del inóculo (X <sub>2</sub> )	Concentración de benzo[a]pireno (Y <sub>1</sub> )
1	50025	50% (-1)	0.25 g (-1)	ppm
2	70025	70% (+1)	0.25 g(-1)	ppm
3	5005	50% (-1)	0.5 g(+1)	ppm
4	7005	70% (+1)	0.5 g(+1)	ppm

Al mismo tiempo se contó con los siguientes controles:

- a) Benzo(a)pireno + suelo estéril + micelio de *P. ostreatus* estéril
- b) Benzo(a)pireno + suelo estéril
- c) Benzo(a)pireno + suelo sin esterilizar

Cada uno de los reactores se hizo por triplicado. De igual forma, todos los controles, se hicieron por triplicado y con los niveles de humedad establecidos.

Los valores de humedad escogidos (50% - 70%) representan el intervalo de crecimiento óptimo de *Pleurotus ostreatus*, mientras que los valores correspondientes a la cantidad de inóculo (2.5% – 5%) se determinaron en vista de que el 6% es el límite máximo de incorporación de materia orgánica para técnicas de biorremediación (DOF, 2003).

## 4.2. Materiales y métodos

A continuación se describen los materiales y métodos utilizados para cada una de las etapas antes mencionadas.

### 4.2.1. Etapa I: Estudios sobre el suelo a analizar

#### 4.2.1.1. Obtención del suelo

El suelo para el desarrollo de la presente investigación se obtuvo de un terreno ubicado en la carretera San Mateo Xalpa a 400 metros de la colonia San Mateo Xalpa, Pueblo, Xochimilco, Distrito Federal, México. Las coordenadas exactas de la posición de la toma del suelo fueron 19°12'32.11" N, 99°07'32.95" O. a 2527 m.s.n.m. (Google Image digital globe, 2012). La muestra fue tomada el 27 de abril del 2012 (Figura 4.1) y se consideró que no estaba contaminado.

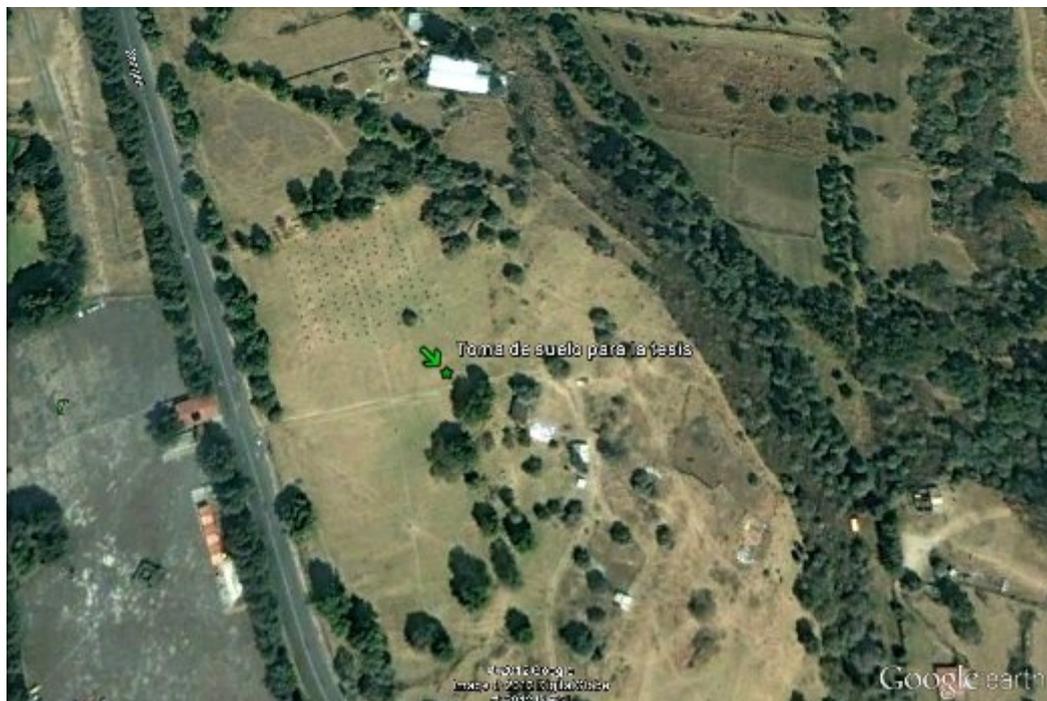


Figura 4.1 Sitio de toma de la muestra

#### 4.2.1.1.1. Caracterización del suelo *in situ*

La caracterización del suelo *in situ* se realizó con el objetivo de conocer el contexto de formación del sustrato en el que se va a realizar la experimentación en su totalidad. Por esto se realizó una descripción en campo de las características del suelo con la metodología propuesta por Siebe (2006).

#### 4.2.1.2. Caracterización del suelo

Las pruebas de caracterización del suelo se basaron en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2000), en el Laboratorio de Edafología Ambiental del Instituto de Geología de la UNAM (LEA, UNAM) y en la literatura consultada (Brady y Weil, 2008; Siebe *et al.*, 2006). Para las pruebas fisicoquímicas se acondicionaron las muestras de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2000). Para ello primero se prepararon las muestras iniciando con el secado de las mismas extendiendo la muestra de suelo sobre una superficie que no contamine, en este caso en particular se utilizó una charola metálica recubierta de papel de aluminio. Las muestras fueron extendidas logrando una profundidad inferior a 2.5 cm, colocándolas a la sombra a una temperatura no mayor a 35 °C y a una humedad relativa entre 30 y 40% durante 72 horas. Posteriormente, se procedió a realizar un tamizado haciendo pasar el suelo por un tamiz con aberturas de 2 mm de diámetro (Número de malla 10) de acero inoxidable. Cabe mencionar que este grado de fineza es conveniente para la mayoría de los análisis requeridos de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2000). Una vez tamizado, se separaron 2 kg de suelo, el cual fue material suficiente para las determinaciones físicas y químicas que permitieran caracterizar el suelo bajo estudio. Cabe mencionar que las pruebas fisicoquímicas efectuadas se seleccionaron tomando en consideración la relevancia en el presente estudio de investigación. Los parámetros tomados son los que se describen en la Tabla 4.2 y se detallan a continuación.

**Tabla 4.2 Parámetros determinados y metodología empleada para la caracterización del suelo bajo estudio**

Parámetro	Metodología	Referencia
<b>Físicos</b>		
Humedad	Gravimetría	NOM-021-AS-05-SEMARNAT-2000
Capacidad de campo	Columna	Brady y Weil, 2008
Textura	Bouyoucos	NOM-021-AS-09-SEMARNAT-2000
Densidad aparente	Cilindro	Siebe <i>et al.</i> , 2006
Densidad real	Picnómetro	NOM-021-AS-04-SEMARNAT-2000
Porosidad	Cálculo matemático	Brady y Weil, 2008
<b>Químicos</b>		
pH	Potenciómetro	NOM-021-AS-02-SEMARNAT-2000
Contenido de materia orgánica	Walkley y Black	NOM-021-AS-07-SEMARNAT-2000
Conductividad eléctrica	Conductímetro	LEA-UNAM

**Tabla 4.2 (Continuación). Parámetros determinados y metodología empleada para la caracterización del suelo bajo estudio**

CIC	Espectro de absorción atómica	LEA-UNAM
N disponible	Espectrofotometría	LEA-UNAM
P disponible	Espectrofotometría	LEA-UNAM
Micronutrientes	Espectro de absorción atómica	LEA-UNAM

**Donde:** NOM=Norma Oficial Mexicana y LEA-UNAM= Laboratorio de Edafología Ambiental del Instituto de Geología de la UNAM

#### 4.2.1.2.1. *Humedad*

Para la determinación de humedad se pesaron en un crisol 10 g de suelo húmedo. Posteriormente se secaron en la estufa a 105°C durante 24 horas. Luego se dejaron enfriar en un desecador a temperatura ambiente para finalmente pesar el crisol con la muestra seca hasta peso constante. Con los datos obtenidos en el procedimiento se aplicó la Ecuación 4.1: Cálculo del porcentaje de humedad del suelo

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(M_1 - M_2) \times 100}{M} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

donde:

**M<sub>1</sub>** = masa del crisol más muestra húmeda

**M<sub>2</sub>** = masa del crisol más muestra seca

**M** = masa de la muestra de suelo

#### 4.2.1.2.2. *Capacidad de campo*

La capacidad de campo representa el contenido de humedad del suelo cuando el agua contenida en éste deja de fluir por gravedad. Para esto se pesó una muestra de suelo, la cual se colocó en un embudo de masa conocida. Seguidamente se saturó el suelo, de manera uniforme, con agua hasta que ésta saliera por el extremo inferior del embudo de manera continua. Posteriormente se dejó de aplicar el agua y se esperó a que dejara de salir por el extremo inferior del embudo. Inmediatamente se pesó nuevamente el embudo con el suelo y por diferencia de masas se determinó la capacidad de campo del suelo.

#### 4.2.1.2.3. *Textura*

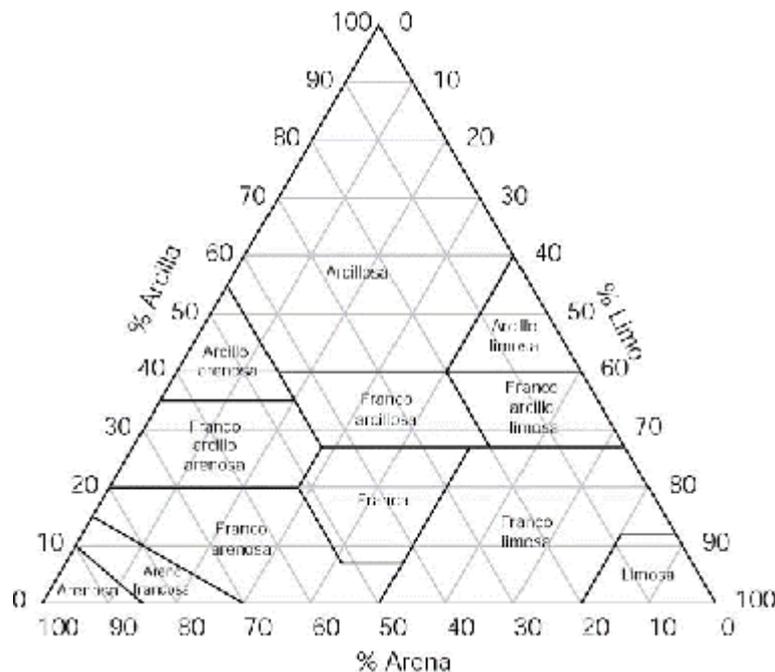
La textura del suelo se obtuvo mediante la aplicación del método de Bouyoucos para lo cual, primeramente, se pesaron 120 g de suelo en un vaso de precipitado de 500 mL. Posteriormente se agregaron 40 mL de agua oxigenada hasta su evaporación, a partir de lo cual se agregaron otros 40 mL y, nuevamente, se dejó evaporar hasta la sequedad. Este procedimiento se repitió hasta que no existiera una efervescencia al agua oxigenada. En este caso el procedimiento se repitió 2 veces. Posteriormente, se pesaron 100 g de suelo y se trasvasaron en un vaso de precipitado de 250 mL a los cuales se les adiciona agua hasta cubrir la superficie con una lámina de 2 cm. A esto se le

adicionan 5 mL de oxalato de sodio y 5 mL de metasilicato de sodio y se dejó reposar durante 1 hora.

Luego se pasó la muestra del vaso de precipitado a la copa del agitador mecánico, trasvasando todo el material con una piseta y se activó el agitador para proceder a dispersar durante 5 minutos. Al finalizar la agitación se pasó el contenido a una probeta de 1000 mL a lo cual se agregó agua destilada hasta completar 1 litro con un hidrómetro dentro de la suspensión. Inmediatamente se sacó el hidrómetro y se agitó manualmente con un agitador de mano durante 1 minuto.

Seguidamente se tomaron las lecturas con el hidrómetro a los 40 segundos y después a las 2 horas de terminada la dispersión con el agitador de mano. Para realizar la lectura se colocó el hidrómetro dentro de la probeta 20 segundos antes del momento de la determinación, cuidando de alterar lo menos posible la suspensión. Después de la medición se secó, lavó y secó nuevamente el hidrómetro para la siguiente lectura.

A continuación se corrigieron las lecturas del hidrómetro agregando 0.36 por cada grado centígrado arriba de 19.5°C restando la misma cantidad por cada grado debajo de dicha temperatura. La lectura a los 40 segundos es igual al porcentaje de arcilla más limo. Restando de 100 se obtiene el porcentaje de arena. La lectura obtenida a 2 horas es igual al porcentaje de arcilla. El porcentaje de limo se obtiene por diferencia. Con los porcentajes de limo, arena y arcilla se determinó la textura correspondiente con el triángulo de texturas (Figura 4.2).



**Figura 4.2. Triángulo de texturas**

#### 4.2.1.2.4. Densidad aparente

La determinación de la densidad aparente se realizó directamente en campo por el método del cilindro. Éste método consiste en la introducción de un cilindro metálico en el horizonte del suelo de interés, completando el volumen total del cilindro y teniendo el cuidado de disturbar lo menos posible el suelo. Posteriormente se sacó el suelo que quedó en el cilindro y se pesó. Seguidamente se lo introdujo en la estufa por 24 horas a 105°C para después ser pesado nuevamente.

Finalmente se empleó la Ecuación 4.2: Cálculo de la densidad aparente del suelo:

$$\text{Densidad aparente} = \frac{\text{masa del suelo seco}}{\text{volumen del cilindro}} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

#### 4.2.1.2.5. Densidad real

Para la determinación de la densidad real se aplicó la metodología del picnómetro o matraz descrita en la NOM-021-AS-04-SEMARNAT-2000 (DOF, 2000). El método del picnómetro o matraz consiste en el cálculo de la densidad real de una muestra de suelo a partir de dos parámetros: la masa y el volumen de la muestra de suelo. La masa se determinó pesando directamente el suelo y el volumen se calculó de manera indirecta por el cálculo de la masa y la densidad del agua desplazado por la muestra de suelo.

Es necesaria la destrucción de la materia orgánica de la muestra de suelo lo cual se logró por el método de ignición para lo cual se pesaron 5g de suelo en un crisol de peso conocido y se secaron en la estufa a 105°C por 2 horas. Luego se dejaron enfriar en un desecador a temperatura ambiente.

Seguidamente se pesó un matraz aforado de 25 mL limpio y se secó. Luego se colocaron 5 g de suelo usando un embudo de plástico. Consecutivamente se adicionó agua destilada hervida (fría) hasta la mitad del volumen de matraz y se lo colocó en el desecador de vacío. Se hizo vacío por 1 minuto para eliminar todo el aire contenido en el suelo; la succión de la bomba fue aumentada paulatinamente para evitar la pérdida de material por la formación de espuma.

Posteriormente, se dejó reposar por 30 minutos para eliminar el vacío del desecador. Se sacó el matraz y se llenó hasta aforo con agua destilada hervida (fría), se secó perfectamente el exterior y se pesó en una balanza analítica.

Se tomó la temperatura de la suspensión. Se vació el matraz, se enjuagó perfectamente y se llenó hasta aforo con agua destilada hervida (fría). Finalmente se pesó y se tomó la temperatura del matraz.

Para el cálculo de la masa de las partículas del suelo se realizó la diferencia de la masa del matraz con suelo y la del matraz sin suelo. Posteriormente se aplicó la Ecuación 4.3: cálculo del volumen de las partículas del suelo:

$$v_s = \frac{M_4 - M_1}{\rho_w} - \frac{M_3 - M_2}{\rho_w} = \frac{\text{Masa del agua desplazada por partículas del suelo}}{\text{Densidad del agua}} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

donde:

$M_1$  = masa del matraz seco

$M_2$  = masa del matraz con suelo

$M_3$  = masa del matraz con agua y suelo

$M_4$  = masa del matraz con agua

$\rho_w$  = densidad del agua

Posteriormente se calculó la densidad real con la siguiente Ecuación 4.4: cálculo de la densidad real del suelo:

$$\text{Densidad real } (\rho_s) = \frac{p_s}{v_s} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

donde:

$p_s$  = masa de las partículas del suelo

$v_s$  = volumen de las partículas del suelo

Cabe mencionar que los valores de densidad del agua fueron corregidos conforme a la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3. Relación de la densidad del agua con la temperatura**

Temperatura (°C)	Densidad del agua (g/cm <sup>3</sup> )
10	0.99970
12	0.99950
14	0.99924
16	0.99894
18	0.99860
20	0.99820
22	0.99770
24	0.99730
26	0.99678
28	0.99623
30	0.99565
32	0.99503
34	0.99437
36	0.99369

#### 4.2.1.2.6. Porosidad

El cálculo de la porosidad se realizó a partir de los datos obtenidos del volumen y densidad de partículas (Brady y Weil, 2008) mediante la aplicación de la Ecuación 4.5: cálculo de la porosidad del suelo:

$$\% \text{ porosidad} = \left\{ 1 - \frac{D_a}{D_r} \right\} \times 100 \quad \text{Ecuación 4.5}$$

donde:

$D_a$  = Densidad aparente

$D_r$  = Densidad real

#### 4.2.1.2.7. Valor de pH

Para la determinación del pH se procedió a pesar 10 g de suelo en un frasco de vidrio de boca ancha al cual se le adicionó 20 mL de agua destilada. Con una varilla se realizó la mezcla mediante la agitación de manual a intervalos de 5 minutos, durante 30 minutos y luego se dejó reposar por 15 minutos.

Al mismo tiempo se calibró el medidor de pH con las soluciones reguladoras pH 4.00 y 7.00, y 7.00 y 10.00, enjuagando con agua destilada los electrodos antes de iniciar las lecturas de las muestras.

Una vez registradas las lecturas del medidor de pH se interpretaron los resultados de acuerdo a la Tabla 4.4 expuesta en la NOM-021 (DOF, 2000).

**Tabla 4.4 Clasificación de suelos de acuerdo al pH según la NOM-021 (DOF, 2000)**

Clasificación	pH
Fuertemente ácido	<5.0
Moderadamente ácido	5.1 – 6.5
Neutro	6.6 – 7.3
Medianamente alcalino	7.4 – 8.5
Fuertemente alcalino	>8.5

#### 4.2.1.2.8. Contenido de materia orgánica

El contenido de materia orgánica se determinó a través del contenido de carbono orgánico con el método de Walkley y Black (DOF, 2000). Éste método se basa en la oxidación del carbono orgánico del suelo por medio de una disolución de dicromato de potasio y el calor de la reacción que se genera al mezclarla con ácido sulfúrico concentrado. Después, la mezcla se diluye, se agregó ácido fosfórico para evitar interferencias de  $Fe^{3+}$  y el dicromato de potasio residual es valorado con sulfato ferroso. Con este procedimiento se detecta entre un 70 y 84% del carbón orgánico total por lo que es necesario introducir un factor de corrección, el cual puede variar entre suelo y suelo. Según la NOM-021 (DOF, 2000), en los suelos de México se recomienda utilizar un factor de 1.298 (1/0.77).

Primeramente se pesaron 0.5 g de suelo pasado por un tamiz 0.5 mm (malla 10) y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Se le adicionaron 10 mL de dicromato de potasio 1 N girando el matraz cuidadosamente para que entre en contacto con todo el suelo. Seguidamente se agregaron con una bureta 20 mL de ácido sulfúrico concentrado a la suspensión haciendo girar el matraz de manera que la solución entre en contacto con todo el suelo durante 1 minuto. Se dejó reposar durante 30 minutos sobre una mesa.

Posteriormente se añadieron 200 mL de agua destilada, 5 mL de ácido fosfórico concentrado y 10 gotas de indicador difenilamina. Finalmente, se tituló con una disolución de sulfato ferroso 1M hasta un color verde claro.

La disolución de sulfato ferroso consistió en la mezcla de de 278 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en agua a la que previamente se le añadieron 80 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, la cual se dejó enfriar y diluyó a 1 litro. Esta solución fue valorada con  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  1N antes de realizar la determinación.

Para la determinación de carbono orgánico se empleó la Ecuación 4.6: cálculo del porcentaje de carbono orgánico:

$$\% \text{ C orgánico} = \left\{ \frac{\text{B}-\text{T}}{\text{g}} \right\} (\text{N}) (0.39) \text{ mcf} \quad \text{Ecuación 4.6}$$

donde:

**B** = Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar el blanco de reactivos (mL)

**T** = Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar la muestra (mL)

**N** = Normalidad del sulfato ferroso

**g** = Masa de la muestra empleada (g)

**mcf** = Factor de corrección de la humedad

Finalmente, se corrigió el valor del porcentaje de carbono orgánico con el factor recomendado para México y se calculó la materia orgánica con la Ecuación 4.7: Porcentaje de materia orgánica del suelo:

$$\% \text{ materia orgánica} = \% \text{ C orgánico} \times 1.724 \quad \text{Ecuación 4.7}$$

Los valores de referencia para clasificar la concentración de la materia orgánica en los suelos minerales y volcánicos se presenta en la Tabla 4.5.

**Tabla 4.5. Clasificación de suelos de acuerdo al contenido de materia orgánica**

Clase	Materia orgánica	
	Suelos volcánicos	Suelos no Volcánicos
Muy bajo	< 4.0	< 0.5
Bajo	4.1 – 6.0	0.6 – 1.5
Medio	6.1 – 10.9	1.6 – 3.5
Alto	11.0 – 16.0	3.6 – 6.0
Muy alto	> 16.1	> 6.0

#### 4.2.1.2.9. Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica (CE) fue analizada en una relación suelo solución 1:2,5 y determinados en un potenciómetro y conductímetro WTW (LEA, UNAM, 2012).

#### **4.2.1.2.10. Capacidad de intercambio catiónico**

Las bases intercambiables se determinaron en un extracto de cloruro de amonio a pH 7 y determinaron en un espectro de absorción atómica Perkin Elmer 3110 (LEA, UNAM, 2012).

#### **4.2.1.2.11. Nitrógeno total**

El nitrógeno total se obtuvo mediante el uso de un determinador elemental de CNSH, Perkin Elmer 2400 Serie II utilizando Helio como gas acarreador. La temperatura de combustión 925°C, temperatura de reducción 640°C (LEA, UNAM, 2012).

#### **4.2.1.2.12. Fósforo disponible**

El fósforo disponible se obtuvo de un extracto con bicarbonato de sodio y determinado en un espectrofotómetro CM-2600d (LEA, UNAM, 2012).

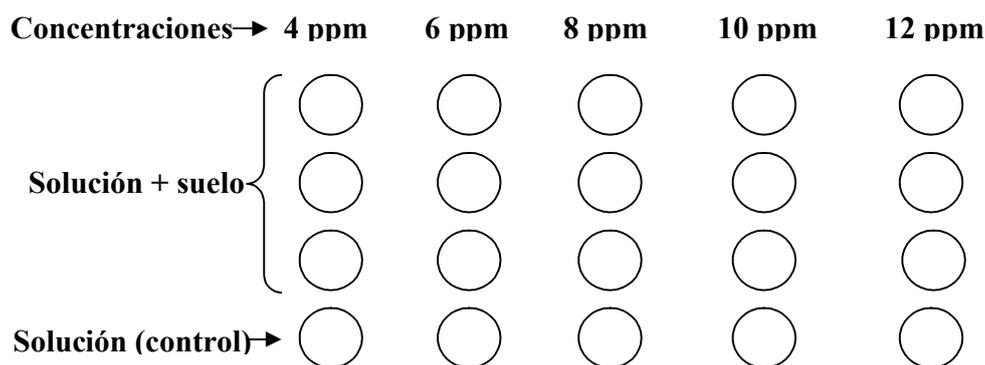
#### **4.2.1.2.13. Elementos menores biodisponibles**

Los elementos menores biodisponibles se obtuvieron de un extracto de DTPA (ácido dietilenti-triamín-penta-acético), en una concentración de 0.005 M. Posteriormente determinaron en un espectro de absorción atómica Perkin Elmer 3110 (LEA, UNAM, 2012).

### **4.2.2. Isotermas de adsorción**

La prueba de isotermas de adsorción se realizó con el objetivo de determinar la adsorción de benzo[a]pireno en el suelo. Para esto, se procedió a esterilizar el suelo para evitar la degradación biológica del compuesto por la fauna nativa del éste. Lo anterior se llevó a cabo en un autoclave horizontal Tuttnauer modelo MA-AU-03 a 121°C durante 20 minutos con un tiempo de secado de 5 minutos. Posteriormente, se preparó la solución problema la cual consiste en la dilución del benzo[a]pireno en acetonitrilo a 400 ppm. A partir de esta solución madre se obtuvieron las concentraciones para las pruebas mediante su dilución. A pesar de que de manera natural en la solución del suelo no hay acetonitrilo, en el caso de la presente investigación se buscó únicamente describir el proceso de adsorción y la capacidad de adsorción del suelo mas no del comportamiento natural del mismo en caso de que ocurriera un derrame accidental de benzo[a]pireno. Para ello, se determinó a partir de una experimentación de tolerancia del micelio de *P. ostreatus* (Dzul-Puc *et al.*, 2004; Gadd, 2001; Singh, 2006, Stamets, 2000, 2005). Las concentraciones a utilizar para las pruebas de isotermas de adsorción fueron: 4, 6, 8, 10, 12 ppm (mg/kg).

Para determinar la adsorción del benzo[a]pireno en el suelo, se instalaron un total de 20 viales acomodados de la siguiente manera: tres réplicas de cada una de las concentraciones con 20g de suelo en cada una, más un vial con solución sin suelo como testigo (controles) que se realizó para cuantificar las pérdidas que pudieran existir durante la experimentación, quedando cuatro viales por concentración (Figura 4.3).



**Figura 4.3. Esquema de la prueba de isotermas de adsorción**

Según la literatura (Iturbe, 2012), las pruebas de adsorción se suelen realizar para la zona saturada del suelo, por lo que la muestra fue saturada durante una semana con acetonitrilo. Una vez saturado el suelo de los viales se eliminó el exceso y se añadieron las soluciones “problema”, las cuales se agitaron durante 72 horas a 50 rpm en una incubadora orbital CEV modelo LNOR-01. Esto fue realizado para llegar al equilibrio de adsorción, es decir, que todas las partículas de suelo entraran en contacto con la solución problema. Seguidamente los viales fueron dejados en reposo durante 24 horas para conseguir la sedimentación del suelo.

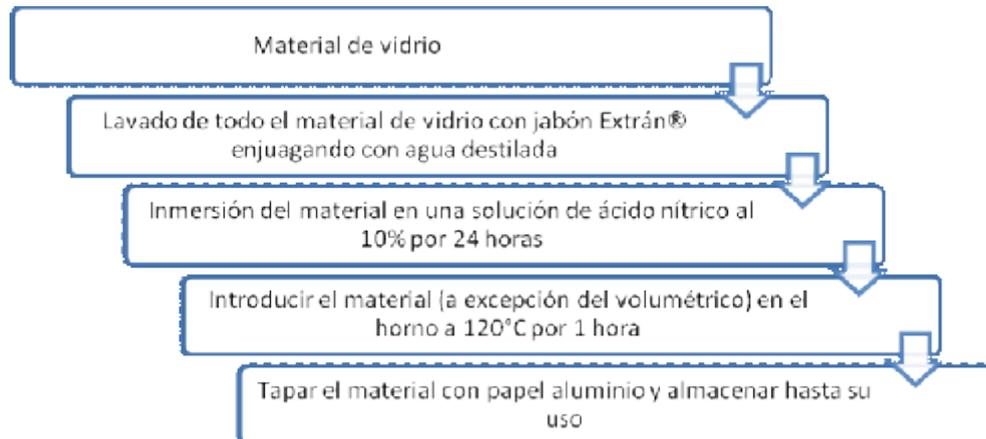
La toma de las muestras de los viales se realizó con una jeringa de 5 mL a través de un septo de teflón. Posteriormente, se extrajeron las muestras de las soluciones estándar previamente preparadas y se filtraron en acrodiscos de nylon de 45µm para su análisis. El análisis de las muestras para determinar su concentración se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en un equipo WATERS e2695 con un detector de arreglos de fotodiodos WATERS 2996 en el cual se efectuaron previamente las curvas de calibración correspondientes obteniendo un valor de  $R^2$  de 0.9948.

Las condiciones cromatográficas para la detección del benzo[a]pireno fueron las descritas en los métodos EPA 505, 560.1, 610 y 8310 las cuales se exponen en la Tabla 4.6.

**Tabla 4.6. Condiciones cromatográficas para la detección del benzo[a]pireno empleando cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)**

Componente	Condición
Columna	C18, 5 µL, 4.6 x 150 mm
Flujo	1.5 mL/minuto
Fase móvil	A:Acetonitrilo
Gradiente	100% A
Detector	UV a 296 nm

Cabe mencionar que todo el material de vidrio utilizado en el análisis de las muestras, mediante CLAR, fue lavado con el protocolo expuesto en la Figura 4.4.



**Figura 4.4. Esquema de lavado del material de vidrio para el análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)**

Posterior a la medición, se empleó la Ecuación 4.8: cálculo de la concentración adsorbida ( $C_s$ ) para la determinación de la capacidad de adsorción del suelo<sup>2</sup>:

$$C_s = (C_o - C_e) (V/m) \quad \text{Ecuación 4.8}$$

donde:

$C_s$  = concentración adsorbida  
 $C_o$  = concentración determinada inicialmente  
 $C_e$  = concentración determinada  
 $V$  = volumen de la solución  
 $m$  = masa del suelo

#### 4.2.3. Etapa II: Estudios sobre el hongo *Pleurotus ostreatus*

##### 4.2.3.1. Obtención del cultivo puro de *Pleurotus ostreatus*

La obtención del cultivo puro de *Pleurotus ostreatus* se alcanzó a partir de una cepa pura adquirida en el cepario de la Facultad de Química de la UNAM la cual posee los siguientes datos generales:

Género: *Pleurotus*  
 Especie: *ostreatus*  
 Aplicaciones determinadas: Actividad celulolítica

<sup>2</sup> Si durante la experimentación existieran disminuciones en los blancos (testigos) se registrarán como pérdidas atribuidas a posibles procesos de fotólisis y/o volatilización

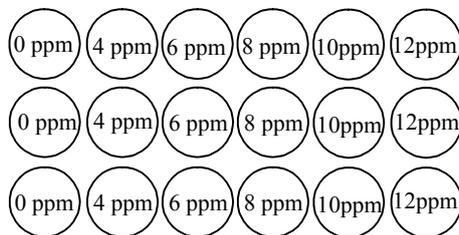
Para la propagación del *P. ostreatus* inicialmente se preparó como medio de cultivo 1L de agar Sabouraud. Seguidamente se esterilizó a 121°C durante 15 minutos y se vertió en 50 cajas Petri estériles. A continuación se procedió a propagar el micelio del cultivo puro pasando cortes de 1 cm x 1 cm a las cajas Petri con el medio preparado. Los cortes se realizaron manualmente con un bisturí estéril. El bisturí fue esterilizado para cada corte con alcohol y un mechero Bunsen, enfriándolo en una caja Petri con medio estéril. Todo el procedimiento de propagación fue efectuado en una campana de flujo laminar CFL 102, SEV.

Una vez colonizado el medio de cultivo preparado se procedió a la propagación exponencial del micelio. Esto tiene como objetivo principal impulsar el micelio a una etapa de mayor vigor (Stamets, 2005). El sustrato, en este caso aserrín de pino, desempeñó no solo el papel de vehículo de propagación sino también de suplemento nutricional.

Para realizar lo anterior, primeramente se colocó el aserrín en bolsas para autoclave, luego fueron esterilizadas en autoclave horizontal a 120°C a 103 kPa (15 psi, 1 kg<sub>f</sub> cm<sup>-2</sup>) durante 2 horas. Una vez realizado el proceso, las bolsas que contenían el aserrín, se dejaron enfriar en una campana de flujo laminar CFL 102, SEV hasta que la temperatura llegue hasta alrededor de 38°C. Posteriormente, se inició con la inoculación del aserrín con el micelio de *P. ostreatus* a partir de los cultivos puros obtenidos en las cajas Petri. Se cortaron, con un bisturí estéril, cuadros de 2 cm x 2 cm de micelio de las cajas Petri colonizadas y se colocaron en frascos de vidrio estériles que contenían el aserrín estéril. Estos fueron tapados con algodón saturado con alcohol etílico y se dejaron en una campana de flujo laminar CFL 102, SEV, para evitar su contaminación, hasta su colonización.

#### 4.2.3.2. Pruebas de dosis-respuesta (tolerancia del micelio)

Las pruebas de dosis-respuesta se efectuaron para determinar las tasas de crecimiento del micelio en presencia del contaminante. Para esto se preparó 1 litro de medio de cultivo de agar Sabouraud dispuesto en cajas Petri estériles. A éstas se les agregó una concentración conocida de benzo[a]pireno en el medio de cultivo de manera que quedaran al final con 6 concentraciones: 0, 4, 6, 8, 10 y 12 ppm. Estas concentraciones, como fue mencionado en el inciso 4.2.1.3, según la literatura es el intervalo de tolerancia del *Pleurotus ostreatus*. Cada una de estas concentraciones se hizo por triplicado quedando como se aprecia en la Figura 4.5.



**Figura 4.5. Esquema de las pruebas de dosis-respuesta**

Consecutivamente, las cajas Petri se inocularon con un corte de 1 x 1 cm de medio de cultivo colonizado por el micelio de *P. ostreatus* y, a partir de este momento se empezó a medir diariamente el área de crecimiento del micelio tomando una fotografía de cada una de las cajas

Petri y haciendo uso de las herramientas Selection Brush Tool y Measure del software Image J 1.45s (Rasband W. National Institutes of Health, EEUU). Con los datos obtenidos se obtuvo la tasa de crecimiento del micelio en unidades de área por unidad de tiempo ( $\text{cm}^2 \cdot \text{día}^{-1}$ ), por cada una de las concentraciones, el porcentaje de inhibición del crecimiento y, a través de un análisis *Probit*, la concentración efectiva media,  $CE_{50}$  (Vera *et al.*, 2009). Ésta concentración se seleccionó como la concentración a utilizar en los reactores con el suelo de la tercera etapa de la metodología. El análisis *Probit* se efectuó con el software SAS V8.1 (Statistic Analysis System).

El porcentaje de inhibición se obtuvo para cada concentración, a partir de la Ecuación 4.9: Cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo (Vera, *et al.*, 2009):

$$\% \text{ Inhibición} = (C_t - C_a) / C_t \quad \text{Ecuación 4.9}$$

donde:

**C<sub>t</sub>**= crecimiento del testigo

**C<sub>a</sub>**= crecimiento analizado

#### 4.2.4. Etapa III: *Análisis del suelo contaminado en los reactores*

##### 4.2.4.1. Construcción de los reactores con el suelo

Una vez realizadas las pruebas sobre el suelo y sobre el micelio se procedió a la construcción de reactores, los cuales constan de un frasco de vidrio color ámbar de 125 mL a los cuales se les agregó suelo contaminado y micelio como se muestra en la Tabla 4.7.

**Tabla 4.7. Distribución de reactores experimentales según el diseño experimental empleado**

Unidad experimental*	Humedad		Inóculo	
	50%	70%	5%	2.5%
1	✓	✓	✓	✓
2	✓	✓	✓	✓
3	✓	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓	✓
Control 1	✓	✓	✓	
Control 2	✓	✓		
Control 3	✓	✓		

\*Todas las unidades experimentales fueron realizadas por triplicado

donde:

**Control 1** = Benzo(a)pireno + suelo estéril + micelio de *P. ostreatus* estéril

**Control 2** = Benzo(a)pireno + suelo estéril

**Control 3** = Benzo(a)pireno + suelo sin esterilizar

El suelo fue contaminado de manera artificial, lo cual fue conseguido mediante la aspersión de una solución de acetonitrilo con benzo[a]pireno de concentración conocida (la concentración de la solución aplicada al suelo fue la CE<sub>50</sub> determinada previamente) sobre el suelo, el cual se encontraba esparcido en una bandeja de aluminio formando una capa de alrededor de 1 cm. Se buscó una aspersión homogénea de la solución y se dejó evaporar el acetonitrilo en una campana de laboratorio de flujo ascendente. Cada reactor contuvo 10 gramos de suelo. Es importante mencionar que se seleccionó el acetonitrilo ya que posee las características necesarias para disolver el benzo[a]pireno ( $\log K_{ow} = -0.34$ ) y para la contaminación artificial del suelo.

La cantidad de micelio agregado a cada reactor representó el 5% (0.5 g) y 2.5% (0.25 g) de los 10 gramos de suelo, siendo el 6% de materia orgánica el límite máximo permisible en la NOM-138-SEMARNAT-2003 (DOF, 2003) para biorremediación de suelos. Esta norma fue utilizada ya que en ella se exponen los límites máximos permisibles, en la normativa mexicana, de hidrocarburos presentes en los suelos según sus usos. Seguidamente, se estableció la humedad del suelo en dos valores: 50 y 70%. Estos valores fueron escogidos debido a que, según Stamets (2000), son el rango óptimo para el desarrollo del micelio.

En cada reactor la temperatura y la humedad fueron controladas y monitoreadas en todo momento. La humedad se controló mediante la determinación del peso de los reactores. La temperatura fue medida y monitoreada en el laboratorio mediante el uso de un termómetro de pared.

La metodología de extracción se seleccionó a partir de pruebas de eficiencia de extracción. Estas pruebas de eficiencia se realizaron comparando tres cartuchos comerciales de extracción con la finalidad de corroborar en cuál de ellos era posible obtener la máxima recuperación del compuesto. Los cartuchos que se compararon fueron: Chromabond® easy de 6 mL/200mg, Cromafix® SA (M) y Cromafix® C-18 ec. Para las pruebas de eficiencia de extracción las muestras fueron secadas, tamizadas (<0.5 mm) y posteriormente homogeneizadas. Se pesaron 5 g de suelo, se añadieron 10 mL de acetonitrilo y se sometieron en un baño ultrasónico durante 1 hora. La solución obtenida se hizo pasar por los cartuchos y se eluyeron con 2 mL de metanol (Macherey-Nagel, 2012).

El seguimiento de los reactores fue realizado mediante el muestreo individual en 2 intervalos: al inicio, para determinar las condiciones iniciales de cada uno de los reactores y al final de la experimentación, para determinar el nivel de remoción. Cada muestra consistió en 5 g de suelo el cual fue extraído con la metodología seleccionada anteriormente y analizada mediante un cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca WATERS e2695 con detector de arreglos de fotodiodos WATERS 2996.

#### **4.2.4.2. Análisis de los tratamientos**

A partir de los tratamientos establecidos se obtuvo como resultado final la cantidad de benzo[a]pireno removida por el micelio de *P. ostreatus*. Se determinaron también las condiciones de humedad y cantidad del inóculo que dieron como resultado una mayor remoción del contaminante.

Con el primer control (Benzo[a]pireno + suelo estéril + micelio de *P. ostreatus* estéril) se determinó la fracción del contaminante adsorbido a la pared celular del micelio, el cual fue restado

de la cantidad de contaminante degradado por el micelio en suelo estéril obteniendo así un dato de remoción más preciso. Finalmente, se contó con dos tratamientos de referencia (Benzo[a]pireno + suelo estéril y Benzo[a]pireno + suelo sin esterilizar) con los cuales se determinó si existió algún tipo de pérdida de contaminante por fotólisis o evaporación así como la posible degradación biológica producida por la biota microbiana natural del suelo.

El análisis estadístico de los tratamientos fue realizado mediante el software STATSGRAPHICS Plus 5.1 (2013). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante pruebas de varianza (*ANOVA*), desviación estándar y media aritmética para determinar la validez estadística de los resultados.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1. Etapa I: Estudios sobre el suelo a analizar**

#### **5.1.1. Caracterización del suelo *in situ***

Para conocer ciertas características del suelo utilizado en la presente investigación fue necesario conocer el contexto en el cual se encontraba naturalmente, para esto se hizo un análisis de éste en el sitio de la toma del mismo.

##### **5.1.1.1. Clima y estado del tiempo**

La formación del suelo de cualquier sitio está determinada, entre otros factores, por el clima que prevalece localmente. De acuerdo con la Gaceta Oficial del Distrito Federal (2010), la zona posee un subtipo de clima templado subhúmedo con lluvias en verano de humedad media. Asimismo, se localizan tres estaciones meteorológicas cercanas, la estación San Francisco Tlalnepantla, la estación Ajusco y la estación El Guarda, siendo la de San Francisco Tlalnepantla la más cercana ubicada en la latitud 19°11'48" N y longitud 99°07'43" O (Servicio Meteorológico Nacional, 2012). Se localiza a una altitud de 2,830.90 m.s.n.m. La temperatura media mensual promedio que alcanzó la estación San Francisco Tlalnepantla en el periodo de 1971 a 2000 fue de 12.9 °C. La temperatura más alta registrada que se dio en este período fue de 27.7 °C en el mes de mayo. Respecto a la temperatura más fría, se registró en los meses de octubre y diciembre del 2000 con 0.0 °C. La precipitación pluvial promedio en esta región alcanza sus mayores índices en los meses de Junio a Septiembre siendo julio y agosto los meses con mayor precipitación (179.6mm.) (Servicio Meteorológico Nacional, 2010).

##### **1.1.1.1 Uso del suelo y vegetación**

El uso actual del suelo es un pastizal con ocasional pastoreo ovino. La selección del mismo se basó en el uso pasivo que ha predominado en este suelo en los últimos años, en términos de disturbios e intervenciones antropogénicas tales como labranza y aplicación de agroquímicos. Por otro lado el hecho de que predominen pastos sugiere que hay un relativamente alto contenido de materia orgánica, lo cual permite un cálculo de capacidad de adsorción apreciable. En vista de que el papel del suelo, en la presente investigación, es el de medio a través del cual se evaluará el comportamiento y posible degradación del benzo[a]pireno por el *P. ostreatus* se determinó que sus características cumplen con cabalidad dicho rol.

##### **5.1.1.2. Descripción del relieve**

El sitio de la toma del suelo se encuentra en la parte alta de una pendiente de longitud aproximada de 100 metros y de entre 2 y 4% de inclinación lo que, según Siebe *et al.* (2006), se categoriza como ligeramente inclinado.

##### **5.1.1.3. Forma de la vertiente**

La vertiente predominante en el sitio de la toma del suelo fue calificada como rectilínea cóncava.

### **5.1.1.3. Posición fisiográfica**

Para comprender la situación espacial de un sitio es necesario hacer una breve descripción de la geomorfología local. El sitio de la toma del suelo se encuentra en una ladera baja ondulada, cóncava extendida. De manera general se puede clasificar al sitio como un altiplano con una zona boscosa a aproximadamente 800 metros de distancia.

### **5.1.1.4. Evidencias de erosión**

Se observaron evidencias de erosión de clase 1, es decir una pérdida menor al 25% del espesor original del horizonte A. En la mayor parte del área, el espesor del horizonte superficial se encuentra dentro del intervalo normal de variabilidad de sitios no erosionados y sólo algunas zonas (menos del 20%) muestran diferencias apreciables en espesor.

### **5.1.1.5. Material parental**

Todos los materiales expuestos en la superficie terrestre se meteorizan, inicialmente, en función de las condiciones climáticas prevalecientes, generándose así los procesos pedogenéticos. En el sitio en estudio se encontró material uniformemente compacto y poco poroso. Se estima que el tipo de roca predominante es pedernal.

### **5.1.1.6. Estructura**

Este término se refiere a la agregación de las partículas primarias en partículas compuestas. En vista de que se realizó un análisis de campo, sólo fue posible describir la macroestructura. A partir de este análisis se obtuvo que se trató de un suelo estructura granular relativamente poroso con agregados de clase fina.

## **5.1.2. Caracterización fisicoquímica del suelo**

Los datos obtenidos en la caracterización física del suelo se resumen en la Tabla 5.1. A partir de estos datos se determinaron ciertas características del suelo que pudieran influir, tanto en el comportamiento del benzo[a]pireno así como el comportamiento de *P. ostreatus* en el suelo. Al mismo tiempo se establecieron algunos parámetros que determinan la calidad de un suelo tales como pH, contenido de materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico (CIC), entre otros. Todos los análisis fueron realizados al inicio y al final de la experimentación (30 días) determinando así el impacto de la técnica de biorremediación sobre el suelo sometido a biorremediación.

En la Tabla 5.1 se aprecia que, inicialmente, la humedad relativa del suelo fue baja, lo cual se atribuye a factores climáticos previos a la toma de la muestra. Se determinó también que la capacidad de campo fue de  $241.69^{\pm 80.360}$  g de agua por cada gramo de suelo seco, lo cual representa el 48.34%. La textura del suelo fue determinada como Franco-Arenosa obteniendo porcentajes de arena de 68.76%, de limo de 24.72%, y de 6.52% de arcillas. Los resultados obtenidos permiten aseverar que el suelo que se utilizó como matriz entra en el rango de un suelo promedio y con esto fue posible conocer con mayor detalle el comportamiento y dinámica entre el micelio y el contaminante en el suelo. Estas características no presentaron ningún cambio estadísticamente

significativo ( $p < 0.05$ ) durante el período experimental, por lo que se presenta un promedio y la respectiva desviación estándar. En cuanto a las densidades aparente y real encontradas al inicio y al final de la experimentación fueron de 1.65 y 2.75  $\text{g/cm}^3$ , respectivamente y una porosidad de alrededor del 60% lo cual indica que se encuentran dentro del rango de un suelo promedio. No se determinaron diferencias significativas entre las mediciones iniciales y finales.

**Tabla 5.1. Resultados de los parámetros obtenidos en la caracterización física del suelo**

Parámetro	Resultado*
<i>Físicos</i>	
Humedad	5.78 $^{\pm 0.345}$ %
Capacidad de campo	48.34%
Textura	Franco arenosa
Densidad aparente	1.65 $^{\pm 0.765}$ $\text{g/cm}^3$
Densidad real	2.78 $^{\pm 0.636}$ $\text{g/cm}^3$
Porosidad	59.3525 $^{\pm 0.423}$ %

\*Todos los resultados fueron el promedio de 3 repeticiones

Como se puede apreciar en la Tabla 5.2, inicialmente, el pH de 5.86, se encuentra de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2000) correspondiente a un suelo moderadamente ácido. Se encontró que el contenido de materia orgánica fue bajo (5.04%) tomando en consideración que se trata de un suelo de origen volcánico (6.1 – 10.9%). Este valor se obtuvo a partir del contenido de carbono orgánico total.

**Tabla 5.2. Parámetros de la caracterización química del suelo: pH, contenido de materia orgánica y carbono orgánico total**

Parámetro	Resultado	
<i>Químicos</i>		
	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>
Valor de pH	5.86 $^{\pm 0.035}$	5.58 $^{\pm 0.11}$
Contenido de materia orgánica	5.04 $^{\pm 0.623}$ %	6.93 $^{\pm 0.43}$ %
Carbono orgánico total	2.93 $^{\pm 0.078}$ %	4.03 $^{\pm 0.22}$ %

Al final de la experimentación se determinó un pH de 5.58, lo cual no presenta diferencias estadísticamente significativa a una  $\alpha = 0.05$  con respecto al pH inicial (5.86) y, asimismo, se mantiene dentro de la clasificación de moderadamente ácido según la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2000). Se presenta un incremento en el contenido de materia orgánica de 1.89 puntos porcentuales, lo cual se interpreta como la adición de la masa de micelio incorporado en los reactores, así como el sustrato de aserrín de pino el cual se utilizó como medio de crecimiento del micelio. El contenido final de carbono orgánico total también presenta un incremento con respecto al obtenido en los análisis iniciales del suelo. Este hecho se atribuye, además de la adición de materia orgánica, a la contaminación artificial que se realizó a inicios de la experimentación con una solución de benzo[a]pireno en acetonitrilo.

En la Tabla 5.3 se muestran la conductividad eléctrica y bases intercambiables iniciales, del suelo bajo estudio, las cuales fueron contrastadas con un análisis al final de la experimentación.

**Tabla 5.3. Parámetros de la caracterización química del suelo: Conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico**

C.E. 1:2.5 microS /cm		Capacidad de intercambio catiónico CIC (cmol/kg)							
		Bases intercambiables (cmol /kg)							
		Ca		Mg		Na		K	
<i>inicial</i>	<i>final</i>	<i>inicial</i>	<i>final</i>	<i>inicial</i>	<i>final</i>	<i>inicial</i>	<i>final</i>	<i>inicial</i>	<i>final</i>
220.5 <sup>±80.7</sup>	205 <sup>±80.6</sup>	6.46 <sup>±80.05</sup>	6.74 <sup>±80.5</sup>	2.63 <sup>±80.01</sup>	2.46 <sup>±80.01</sup>	1.68 <sup>±80.02</sup>	1.09 <sup>±80.01</sup>	0.04 <sup>±80.02</sup>	0.87 <sup>±80.04</sup>

Como se puede apreciar en la Tabla 5.3 los análisis químicos de conductividad eléctrica y bases intercambiables no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) al contrastar los resultados obtenidos al inicio y al final de la experimentación.

Finalmente, se determinó que el suelo en estudio posee 66.6 ppm de hierro, 3.84 ppm de manganeso, 8.16 ppm de cobre y 66.6 de zinc. Posee también 49.05 ppm de fósforo y un porcentaje de 0.27% de nitrógeno total (Tabla 5.4). Estos valores no presentaron variaciones ( $\alpha=0.05$ ) con respecto a los análisis realizados al final de la experimentación.

**Tabla 5.4. Parámetros de la caracterización química del suelo: Elementos menores biodisponibles, fósforo disponible y nitrógeno total**

Elementos menores biodisponibles DTPA							
Fe		Mn		Cu		Zn	
mg/kg							
<i>inicial</i>	<i>final</i>	<i>inicial</i>	<i>final</i>	<i>inicial</i>	<i>final</i>	<i>inicial</i>	<i>final</i>
66.6 <sup>±80.8</sup>	62.3 <sup>±80.7</sup>	3.84 <sup>±80.04</sup>	3.09 <sup>±80.1</sup>	8.16 <sup>±80.1</sup>	6.84 <sup>±80.1</sup>	66.6 <sup>±80.85</sup>	62.6 <sup>±80.3</sup>

Los valores expuestos en la Tabla 5.4 correspondientes a los elementos menores biodisponibles en el suelo en estudio no presentaron variaciones estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) después de la comparación de los análisis realizados al inicio y al final de la experimentación. En la Tabla 5.5 se presentan los parámetros de fósforo disponible y nitrógeno total

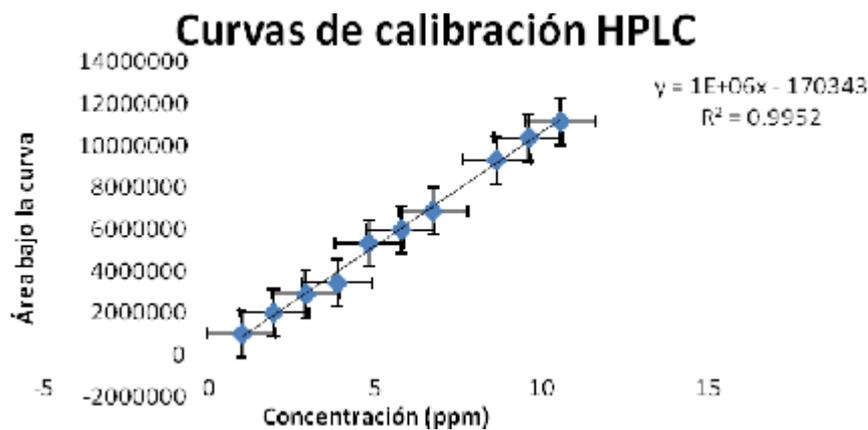
**Tabla 5.5. Parámetros de la caracterización química del suelo: Elementos menores biodisponibles, fósforo disponible y nitrógeno total**

Fósforo disponible mg/kg		Nitrógeno total %	
<i>Inicial</i>	<i>Final</i>	<i>Inicial</i>	<i>final</i>
49.05 <sup>±81.49</sup>	50.66 <sup>±80.14</sup>	0.265 <sup>±80.007</sup>	0.33 <sup>±80.01</sup>

Comparando los valores expuestos en la Tabla 5.5 correspondientes a fósforo disponible y nitrógeno total en el suelo en estudio no presentaron variaciones estadísticamente significativas ( $\alpha=0.05$ ) después de la comparación de los análisis realizados al inicio y al final de la experimentación. Después de las comparaciones de los análisis fisicoquímicos realizados (iniciales y finales) en el suelo, no se encontraron diferencias significativas lo cual indica que la técnica de remediación no tiene un impacto sobre las características fisicoquímicas del suelo.

### 5.1.3. Isotermas de adsorción

Para la realización de las isotermas de adsorción, se efectuaron pruebas preliminares de calibración del equipo analítico (cromatógrafo de líquidos de alta resolución, CLAR) las cuales permitieron establecer las condiciones de trabajo en el equipo y, una vez establecidas, se determinó la metodología a seguir lo largo del experimento. Las curvas de calibración consistieron en la inyección de 10 muestras de un estándar preparado en acetonitrilo de benzo[a]pireno bajo diferentes concentraciones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ppm) las cuales representan el rango de concentraciones en el que se llevó a cabo la experimentación y las cuales fueron graficadas (Figura 5.1). A partir de la gráfica se obtuvo el valor de la ordenada al origen, la pendiente y el coeficiente de regresión lineal, obteniéndose un valor de regresión lineal de 0.9952.



**Figura 5.1. Gráfica de las curvas de calibración**

El valor obtenido de regresión garantiza la repetitividad de la técnica metodológica empleada durante la experimentación. Esta prueba fue realizada por triplicado.

Una vez obtenida la curva de calibración, se procedió a realizar las pruebas de extracción del contaminante de la solución de los reactores donde se realizaron las isotermas de adsorción, obteniéndose de esta manera los resultados que permitieron conocer la capacidad de adsorción del suelo. En la Tabla 5.6 se exponen los resultados obtenidos a partir del análisis por medio de cromatografía líquida de alta resolución de las pruebas de isotermas de adsorción, así como los resultados obtenidos sobre la cantidad adsorbida del contaminante en el suelo.

En la Tabla 5.6 la notación indica la concentración teórica a la que se realizó la prueba (4, 6, 8, 10 y 12 ppm) seguida de un número o letra “c”; el número indica la repetición (1, 2 ó 3) y la letra “C”

corresponde al control. La concentración del control representa la concentración inicial de la solución que se utilizó cada una de las repeticiones y por ende la concentración referencia con la cual se compararon los demás reactores.

**Tabla 5.6. Datos de los análisis empleando cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para la determinación de las isotermas de adsorción**

Notación	Tiempo de retención	Área bajo la curva	Concentración (ppm)	Cantidad adsorbida (mg/kg de suelo)	prom Cs*	prom Ce**	log Cs	log Ce	Ce/Cs
<i>4-c</i>	<i>4.515</i>	<i>4,418,142</i>	<i>4.91</i>						
4-1	4.493	2,336,101	2.60	1.16	1.24	2.43	0.09	0.38	1.95
4-2	4.490	2,253,640	2.51	1.20					
4-3	4.491	1,953,680	2.17	1.37					
<i>6-c</i>	<i>4.513</i>	<i>8,152,357</i>	<i>7.84</i>						
6-1	4.490	3,515,941	3.38	2.23	2.11	3.61	0.32	0.56	1.71
6-2	4.393	3,505,074	3.37	2.23					
6-3	4.389	4,255,505	4.09	1.87					
<i>8-c</i>	<i>4.370</i>	<i>10,461,534</i>	<i>9.68</i>						
8-1	4.354	6,874,556	6.36	2.96	2.47	5.61	0.39	0.75	2.27
8-2	4.354	5,351,801	4.95	2.37					
8-3	4.354	5,951,335	5.51	2.09					
<i>10-c</i>	<i>4.357</i>	<i>11,350,567</i>	<i>10.49</i>						
10-1	4.360	8,741,624	8.08	3.21	2.61	6.61	0.42	0.82	2.54
10-2	4.347	6,538,826	6.04	2.22					
10-3	4.352	6,188,179	5.72	2.38					
<i>12-c</i>	<i>4.343</i>	<i>16,448,045</i>	<i>15.51</i>						
12-1	4.350	9,509,476	8.97	3.27	3.79	7.92	0.58	0.90	2.09
12-2	4.364	8,087,549	7.63	3.94					
12-3	4.351	7,606,053	7.17	4.17					

\*Cs: Concentración adsorbida; \*\* Ce: Concentración determinada en análisis cromatográfico. Los datos en color y cursivas muestran los controles (las concentraciones iniciales manejadas)

Para el cálculo de la concentración se empleó la ecuación 4.8 y se obtuvieron los mg de solución de benzo[a]pireno adsorbida por cada kg de suelo. Este cálculo se efectuó de manera individual para cada una de las concentraciones. Para la modelación de estos resultados se utilizaron los promedios de cada concentración.

Los resultados obtenidos en esta prueba fueron sometidos a los modelos de adsorción lineal, de Freundlich y de Langmuir. El modelo en el que se obtuvo un valor de regresión lineal mayor fue en el modelo de adsorción de Freundlich ( $R^2 = 0.9166$ ), el cual se expone en la Figura 5.2. Con los modelos matemáticos Lineal y de Langmuir se obtuvieron valores de regresión lineal de 0.898 y 0.364, respectivamente (Anexo 2).

A partir de la modelación se obtuvo el coeficiente de distribución (Kd) mediante la linearización de la ecuación 3.5 del modelo de Freundlich a través de la obtención de logaritmos quedando como se muestra a continuación:

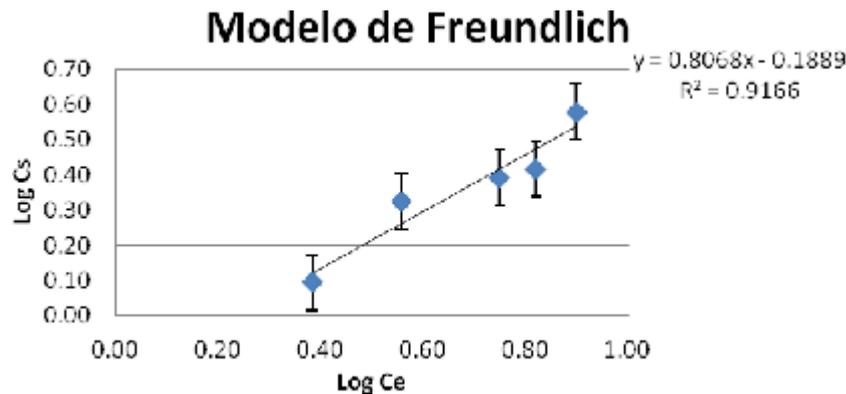
$$\text{Log Cs} = N \text{ Log Ce} + \text{Log Kd}$$

$$\text{Log Cs} = 0.8068 (\text{Log Ce}) - \text{Log } 0.1889$$

donde:

**N** = La pendiente de los puntos graficados

**Log Kd** = La ordenada al origen



**Figura 5.2. Gráfica del modelo de Freundlich**

Como se mencionó anteriormente, el valor de la constante de distribución ( $K_d$ ) está definido como la relación entre la concentración del contaminante asociado con el suelo y la concentración del contaminante en la solución acuosa del suelo, cuando el sistema se encuentra en equilibrio. A partir de la linearización de la ecuación se obtuvo como resultado de la constante de distribución ( $K_d$ ) un valor de 0.724 mg/kg, es decir que por cada kg de suelo se adsorben 0.724 mg de benzo[a]pireno. Cabe mencionar que el valor de la constante de distribución permitió que la contaminación artificial del suelo en la etapa III de la experimentación tuviera una mayor precisión al buscar la concentración efectiva media de *P. ostreatus* en la solución del suelo.

## 5.2. Etapa II Estudios sobre el hongo *Pleurotus ostreatus*

### 5.2.1. Medición de la tolerancia del micelio de *P. ostreatus* bajo distintas concentraciones de benzo[a]pireno

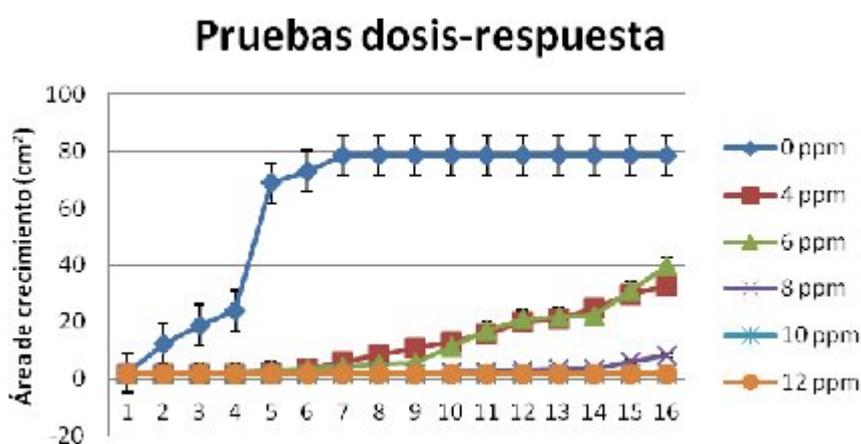
A partir de las pruebas de dosis-respuesta se obtuvo una tasa de crecimiento diario para cada concentración como se muestra en la Tabla 5.7.

Como se puede apreciar en la Figura 5.3, el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en el grupo control (0 ppm) obtuvo una tasa de crecimiento significativamente mayor a una  $\alpha=0.05$  que los demás tratamientos. En los tratamientos de 10 y 12 ppm se aprecia que no se obtuvo ningún tipo de crecimiento. De acuerdo con el análisis estadístico tipo ANOVA (Anexo 4), existe una diferencia significativa entre la media del crecimiento del micelio y cada uno de los niveles de concentración con un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 5.7. Resultados de las pruebas de dosis-respuesta**

Concentraciones (ppm)	Tasa de crecimiento diaria (cm <sup>2</sup> )	Porcentaje de inhibición (%)
0	11.198 <sup>±δ0.123</sup>	0
4	2.309 <sup>±δ 1.838</sup>	78.434
6	2.489 <sup>±δ 2.186</sup>	77.984
8	0.337 <sup>±δ0.583</sup>	90.074
10	0	91.180
12	0	90.549

De acuerdo con la prueba estadística de rango múltiple (*LSD*, en inglés, *Least Significant Difference*), los tratamientos de 8, 10 y 12 ppm no presentaron diferencias significativas a una  $p > 0.05$  con respecto a los demás tratamientos. Entre los tratamientos de 4 y 6 ppm tampoco hubo diferencias significativas; sin embargo, en todos los demás tratamientos sí se presentaron diferencias significativas entre sí (Anexo 3).



**Figura 5.3. Pruebas dosis-respuesta**

A partir de las pruebas de dosis respuesta se determinó una concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) para *Pleurotus ostreatus* con respecto al benzo[a]pireno de 1.21 ppm (Anexo 4). Para obtener el valor de la  $CE_{50}$  con respecto al benzo[a]pireno, se realizó un análisis *Probit* (Molina-Vargas y Melo, 2010; Salazar *et al.*, 2012; Vera *et al.*, 2009), presentándose los resultados de dicho análisis en la Tabla 5.8.

**Tabla 5.8. Concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ) para *Pleurotus ostreatus* con respecto al benzo[a]pireno**

Aislamiento	$CE_{50}$ (mg L <sup>-1</sup> )	Intervalo de confianza (mg L <sup>-1</sup> )	Pendiente <sup>±</sup> SEM	Ecuación <i>Probit</i>	X <sup>2</sup>	Pr > X <sup>2</sup>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1.21	0.49-1.90	1.38 <sup>±</sup> 0.23	Y=-0.11+1.38X	34.28	<0.0001

La concentración efectiva media establecida en la Tabla 5.8 indica que a 1.21 ppm la tasa de crecimiento del micelio, con respecto al control (0 ppm), se reduce al 50%. Cabe destacar que esta fue la concentración empleada en los reactores de la etapa III de la experimentación.

### 5.3. Etapa III *Análisis del suelo contaminado en los reactores*

Para la instalación de los reactores con suelo contaminado, se realizaron pruebas preliminares de eficiencia de extracción, comparando tres cartuchos de extracción de marca comercial. Estos cartuchos fueron comparados debido a la diferencia de las fases estacionarias que posee cada uno de ellos, determinando de esta manera la que obtuvo mayor eficiencia de extracción. El Chromabond Easy de 6 mL/200 mg tiene una fase estacionaria de copolímero polar modificado de poliestireno-divinilbenceno con un intercambiador aniónico débil, el Cromafix® SA (M) tiene una de material de base sílice modificada bencenosulfónica, que es un intercambiador de cationes fuertemente ácido y el Cromafix® C-18 ec que es un material con base de sílice muy polar. Los valores de recuperación obtenidos se presentan en la Tabla 5.9.

**Tabla 5.9. Pruebas de eficiencia de extracción empleando tres diferentes tipos de cartuchos comerciales**

Cartucho	Porcentaje teórico de recuperación (Macherey-Nagel, 2012)	Porcentaje de recuperación obtenido
<b>Chromabond® easy de 6 mL/200mg</b>	86%	72%
<b>Cromafix® SA (M)</b>	91%	88%
<b>Cromafix® C-18 ec</b>	92%	83%

Estas pruebas se realizaron por triplicado a partir de suelo contaminado artificialmente mediante la aspersión de 1 mL/g de suelo de una solución de 10 ppm de benzo[a]pireno. Según pruebas previas, ésta fue la proporción que permitió una distribución uniforme en el suelo para obtener la CE<sub>50</sub> en la solución del suelo. El 88% fue tomado en consideración al momento de la obtención de los resultados en todas las etapas de la experimentación, por lo que los resultados presentados representan el total real del contaminante determinado. Para la instalación de los reactores se procedió a adicionar un lote de 500 g de suelo con 1 mL/g de suelo de una solución de 10 ppm de benzo[a]pireno permitiendo también conservar suelo del mismo lote que permitiera realizar las pruebas fisicoquímicas al final del experimento.

En la Tabla 5.10 se exponen los parámetros iniciales y finales de humedad de los reactores así como también la variación de humedad a lo largo de la experimentación. La humedad de los reactores fue establecida a partir de su masa y se determinó el valor de pérdida de humedad ocurrida por evaporación la cual fue considerada despreciable. La notación expuesta en la Tabla 5.10 representa los valores de humedad establecidos (50% ó 70%) seguido por la cantidad de micelio agregada (0.25 ó 0.5 g de micelio como inóculo). El número después del guión (1, 2, ó 3) significa la repetición de cada unidad experimental. En el caso de los controles, la notación inicia con la letra “C” seguida del número de control (1, 2, y 3) y el valor de humedad de cada uno (50 ó 70%). Al igual que la notación anterior el número después del guión significa la repetición de

cada unidad experimental. Cabe indicar que el control 1 contiene suelo contaminado con micelio estéril, el control 2 contiene suelo estéril contaminado y el control 3 contiene suelo sin esterilizar.

**Tabla 5.10. Parámetros iniciales de los reactores con suelo contaminado**

<b>Reactor (Notación)</b>	<b>Masa inicial (suelo + agua) (g)</b>	<b>Masa final (30 días después) (g)</b>	<b>Pérdida de humedad (g)</b>	<b>Pérdida de humedad (%)</b>
50025-1	43.306	42.448	0.858	1.98%
50025-2	43.546	42.562	0.984	2.26%
50025-3	43.114	42.218	0.896	2.08%
70025-1	45.141	44.452	0.689	1.53%
70025-2	45.209	44.620	0.589	1.30%
70025-3	45.446	44.698	0.748	1.65%
5005-1	43.885	42.796	1.089	2.48%
5005-2	43.919	43.065	0.854	1.94%
5005-3	44.141	43.140	1.001	2.27%
7005-1	45.724	44.680	1.044	2.28%
7005-2	46.230	45.771	0.459	0.99%
7005-3	45.751	45.029	0.722	1.58%
C150-1	43.492	43.388	0.104	0.24%
C150-2	44.069	43.902	0.167	0.38%
C150-3	43.769	43.557	0.212	0.48%
C170-1	45.889	45.882	0.007	0.02%
C170-2	45.339	45.191	0.148	0.33%
C170-3	44.132	43.995	0.137	0.31%
C250-1	43.244	43.188	0.056	0.13%
C250-2	42.991	42.949	0.042	0.10%
C250-3	43.001	42.917	0.084	0.20%
C270-1	45.120	44.959	0.161	0.36%
C270-2	44.869	44.755	0.114	0.25%
C270-3	45.501	45.429	0.072	0.16%
C350-1	43.456	43.286	0.17	0.39%
C350-2	43.863	43.666	0.197	0.45%
C350-3	42.861	42.622	0.239	0.56%
C370-1	45.611	45.501	0.11	0.24%
C370-2	45.192	45.066	0.126	0.28%
C370-3	45.393	45.163	0.23	0.51%

Una vez establecidas las condiciones iniciales de humedad y añadido el inóculo en cada uno de los reactores, se evaluaron durante 30 días. La concentración inicial del benzo[a]pireno en el suelo contaminado se determinó como de 1.54 ppm. Esta concentración fue obtenida a partir de 5 muestras tomadas del lote de suelo contaminado y fue considerada la concentración inicial de todos los reactores. Posteriormente, se determinó la concentración final para cada uno de los reactores. En la Tabla 5.11 se muestran los resultados obtenidos en cuanto al comportamiento del contaminante en los reactores. La notación expuesta en la Tabla 5.11 representa el valor de humedad establecido (50 ó 70%) seguido por la cantidad de micelio agregada (0.25 ó 0.5 g de micelio). El número después del guión (1, 2, ó 3) significa la repetición de cada unidad experimental. En el caso de los controles, la notación inicia con la letra “C” seguida del número

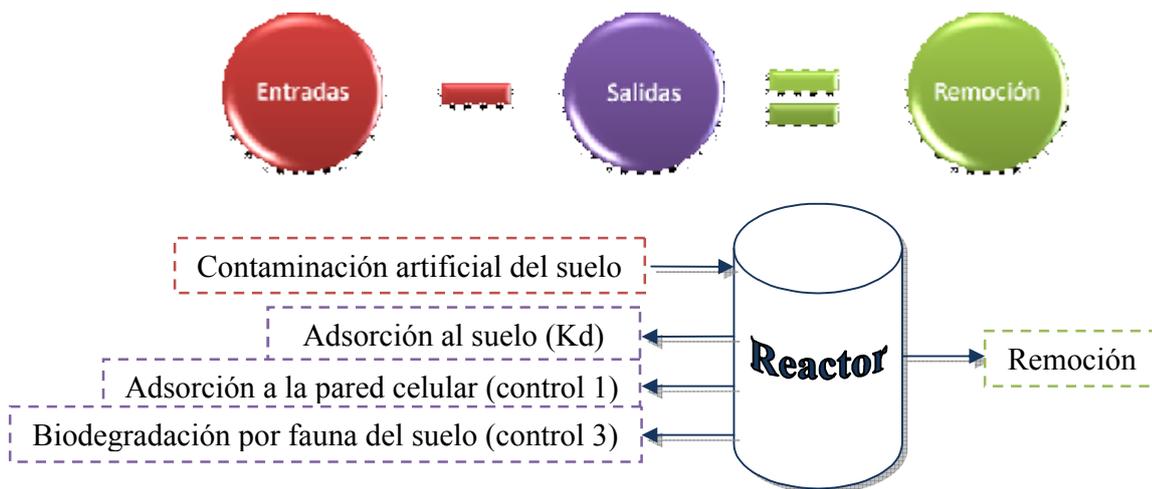
de control (1, 2, y 3) y el valor de humedad de cada uno (50 ó 70%). Al igual que la notación anterior el número después del guión significa la repetición de cada unidad experimental. Cabe indicar que el control 1 contiene suelo contaminado con micelio estéril, el control 2 contiene suelo estéril contaminado y el control 3 contiene suelo sin esterilizar.

**Tabla 5.11 Concentraciones iniciales y finales de benzo[a]pireno obtenidas en los reactores empleando cromatografía líquida de alta resolución.**

<b>Reactor</b>	<b>Concentración inicial (ppm)</b>	<b>Concentración final (ppm)</b>	<b>Diferencia (ppm)</b>
50025-1	1.54	0.649	0.891
50025-2	1.54	0.564	0.976
50025-3	1.54	0.544	0.996
70025-1	1.54	0.354	1.186
70025-2	1.54	0.555	0.985
70025-3	1.54	0.271	1.269
5005-1	1.54	0.363	1.177
5005-2	1.54	0.555	0.985
5005-3	1.54	0.469	1.071
7005-1	1.54	0.267	1.273
7005-2	1.54	0.325	1.215
7005-3	1.54	0.272	1.268
C150-1	1.54	1.506	0.034
C150-2	1.54	1.509	0.031
C150-3	1.54	1.429	0.111
C170-1	1.54	1.504	0.036
C170-2	1.54	1.448	0.092
C170-3	1.54	1.420	0.120
C250-1	1.54	1.514	0.026
C250-2	1.54	1.494	0.046
C250-3	1.54	1.500	0.040
C270-1	1.54	1.522	0.018
C270-2	1.54	1.536	0.004
C270-3	1.54	1.514	0.026
C350-1	1.54	1.420	0.120
C350-2	1.54	1.354	0.186
C350-3	1.54	1.269	0.271
C370-1	1.54	1.316	0.224
C370-2	1.54	1.167	0.373
C370-3	1.54	1.279	0.261

A partir de la comparación de las concentraciones determinadas en cada uno de los reactores y los datos correspondientes a los controles, se pudo determinar un valor preciso de remoción relacionada directamente a la presencia del micelio de *P. ostreatus* en los reactores. La diferencia entre el control 1 (suelo contaminado estéril + micelio estéril) y el control 2 (suelo contaminado estéril) dio como resultado la masa total de contaminante adsorbido a la pared celular del micelio lo cual fue sustraído del valor total de remoción. El control 3 (suelo contaminado sin esterilizar) representa la degradación generada por la biota microbiológica nativa del suelo, cuyo valor fue sustraído también del total de remoción. A continuación, en la Figura 5.4, se presenta el balance de masa realizado de manera esquemática explicando la determinación final de remoción del contaminante del suelo.

Después del período experimental (30 días) se restó de la cantidad de contaminante aplicado inicialmente al suelo la cantidad de contaminante que se adsorbió tanto al suelo como a la pared celular. También se restó la cantidad del contaminante biodegradado por la fauna nativa del suelo para obtener como resultado la remoción real del contaminante por efecto de *P. ostreatus*. Los resultados de obtenidos a partir del balance de masa presentado en la Figura 5.4 se exponen en la Tabla 5.12.



**Figura 5.4. Balance de masas en los reactores con suelo contaminado**

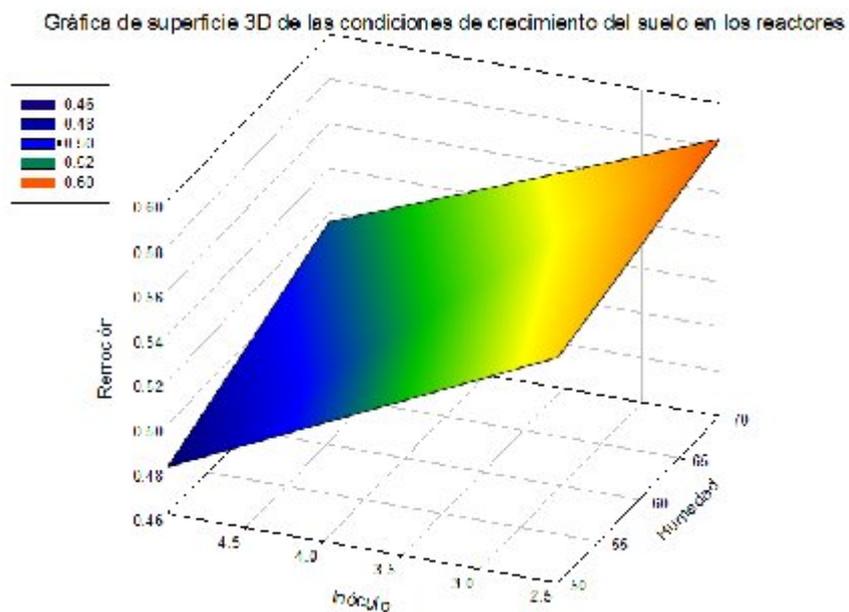
Los resultados presentados en la Tabla 5.12 presentan los promedios de la diferencia entre la medición inicial y final para cada una de las unidades experimentales. Se puede observar también el cálculo del porcentaje real de remoción del contaminante el cual representa el porcentaje preciso de remoción debido a la presencia de *P. ostreatus*. Los reactores con un 70% de humedad contaron con un porcentaje final de remoción del contaminante de 58.41%, siendo por esto el tratamiento con mayor porcentaje de remoción.

Se observó que los valores de remoción correspondientes a los reactores con una humedad del 70% fueron mayores en un 100% de los casos con respecto a aquellos con un contenido de humedad del 50%, con una diferencia estadísticamente significativa de  $\alpha < 0.05$  y un 95% de nivel de confianza (Anexo 5). Se pudo notar también que los reactores con un 5% de inóculo mostraron una mayor remoción del contaminante en todos los casos con respecto a los reactores que contenían un 2.5% de inóculo. Los reactores con 50% de humedad y 0.5 g de inóculo presentaron

un valor de remoción menor que los reactores con 70% de humedad y 0.25 g de inóculo. A partir de esta premisa se puede deducir que se consigue una mayor remoción efectiva del contaminante del suelo con un aumento de humedad del sustrato que con mayor adición de inóculo de micelio de *P. ostreatus* tal y como se expone en la Figura 5.5

**Tabla 5.12. Datos promedio de la remoción de benzo[a]pireno en los reactores con suelo contaminado**

Reactor (notación)	Promedio (ppm)	% de remoción	Masa degradada (ppm)	% real de remoción	Observaciones
50025	0.955	62.0	0.741	48.1	
70025	1.147	74.5	0.794	51.6	
5005	1.078	70.0	0.864	56.1	
7005	1.252	81.3	0.900	58.41	
C150	0.059	3.80	0.021		Adsorción a la pared celular del micelio
C170	0.083	5.40	0.067		
C250	0.037	2.40	0.024		Pérdidas por evaporación y/o fotólisis
C270	0.016	1.10	0.011		
C350	0.192	12.5	0.125		Degradación por la biota microbológica nativa del suelo
C370	0.286	18.6	0.186		



**Figura 5.5. Gráfica de superficie de respuesta 3D de las condiciones de crecimiento del micelio en el suelo en los reactores**

En la Figura 5.5 se puede apreciar que a medida que el color se intensifica (hacia la coloración anaranjada) la masa de contaminante removida del suelo en los reactores es mayor, y a medida que torna azul, la remoción del contaminante es menor. A pesar de que los resultados de remoción obtenidos en los reactores que contaban con un mayor contenido de inóculo (5%) fueron mayores con respecto a los que tenían 2.5% de inóculo, no demostraron ser estadísticamente significativos, con un  $\alpha < 0.05$  y un 95% de nivel de confianza (Anexo 5) por lo que no se puede suponer que la remoción fue mayor debido al incremento de la cantidad de micelio inoculado.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1. Conclusiones

De acuerdo con el objetivo general establecido al inicio de la investigación, en el cual se plantea evaluar el nivel de biorremediación a nivel laboratorio que produce *Pleurotus ostreatus* sobre un suelo contaminado *ex-profeso* con benzo[a]pireno se concluye que *P. ostreatus* consiguió un nivel de remediación de 58.41% en un período experimental de 30 días demostrando ser eficiente y efectivo en la biorremediación de suelos contaminados con benzo[a]pireno. A continuación se dan algunas conclusiones específicas:

- Las características del suelo determinadas mediante su caracterización física y química no mostraron cambios significativos en los análisis realizados al inicio y al final de la experimentación. A partir de esta premisa se puede concluir que la técnica de biorremediación empleada no parece poseer ningún efecto secundario sobre el suelo.
- La concentración efectiva media que se determinó (1.21 ppm) fue menor que el límite establecido en la NOM-138-SEMARNAT-2003 (DOF, 2003) para uso de suelo de tipo residencial y agrícola (2 ppm). A pesar de esto, el micelio de *Pleurotus ostreatus* presentó un crecimiento significativo con concentraciones de benzo(a)pireno de hasta 6 ppm durante el tiempo de duración de las pruebas dosis-respuesta. A partir de esto se puede concluir que el micelio de *P. ostreatus* puede ser empleado como agente para la biorremediación para suelos contaminados con benzo[a]pireno y que requieran tener un nivel máximo permisible de este contaminante menor a 2 ppm.
- El contaminante fue removido del suelo hasta en un 58.41% con el tratamiento con humedad del 70% y una cantidad de inóculo de 5% (0.5g). La remoción alcanzada fue en un período de 30 días a partir de la contaminación. Por tanto, se concluye que el micelio de *P. ostreatus* representa un agente viable para la biorremediación de suelos contaminados con benzo[a]pireno. Se concluye también que un mayor porcentaje de humedad en el suelo daría como resultado una mayor remoción del contaminante que la alcanzada con una mayor cantidad de inóculo. Esto significaría una reducción de costos ya que la adición de agua es menos costosa que la de inóculo.

### 6.2. Recomendaciones

A la luz de los resultados obtenidos en este estudio sería importante desarrollar investigación en la biorremediación de suelos reales contaminados con hidrocarburos usando la concentración del benzo[a]pireno como un indicador de viabilidad de la técnica.

A partir de la metodología propuesta en este trabajo se pueden determinar componentes de hidrocarburos como indicadores de viabilidad del micelio de *Pleurotus ostreatus* como ente de biorremediación.

Asimismo, se podría evaluar en la biomasa del micelio el destino final del contaminante (si es secuestrado o si es biodegradado y a qué compuestos). Esto permitiría evaluar el uso final del micelio pudiendo volverse a usar para continuar la biorremediación o buscarle otros usos.

También podría explorarse la utilización de otras especies de hongos de pudrición blanca para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agudo, A. 2010. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos. *Acercamiento a su problemática como riesgo laboral*. Secretaría de Salud Laboral y Medio Ambiente, MCA-UGT. 1º Edición. UGT Comisión Ejecutiva Federal. Cataluña, España. 130 págs.

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

Arce, J. 2000. Inducción de la biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en un suelo contaminado artificialmente. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. México 152 p.

ATSDR. 1995. Agencia para sustancias tóxica y el registro de enfermedades. Resumen de salud pública. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH). División de toxicología. [en línea]. [consultado 17 octubre 2011]. Disponible en el World Wide Web: [http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs69.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html)

Becker, P., Pinza, M., Thomas, S., Word, J. 1998. Mycoremediation of aged petroleum hydrocarbon contaminants in soils. Washington State Department of Transportation [en línea]. [consultado 18 abril 2011]. Disponible en el World Wide Web: <http://www.wsdot.wa.gov/research/reports/fullreports/464.1.pdf>

Bossert, I., Bartha, R. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystem. Ed. Atlas, R.M. Petroleum microbiology. MacMillan Publishing Co. Pp. 434-476. Nueva York, EEUU.

Bouchez, M. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by pure strain and by defined strain associations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:156-164.

Bouchonnet, S., Libong, D. 2004. Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse. Département de Chimie, Laboratoire des Mécanisme Réactionels. *L'Actualité Chimique.* 275:7-14

Brady, N., Weil, R. 2008. The nature and properties of soils. Pearson Prentice Hall. 14ª edición. 975 pags. ISBN-13: 978-0-13-513387-3. Nueva York, EEUU.

Chang, H., Bae, J. 1999. Modeling simultaneous biosorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon. Pub. Department of Chemical and Environmental Engineering, Illinois Institute of Technology. Illinois, EEUU.

Chávez, B., Quintero, R., Esparza, F., Mesta, A., Zavala-Días, F., Hernández, C., Gillén, T., Poggi, H., Barrera, J., Rodríguez, R. 2003. Removal of phenanthrene from soil by co-cultures of bacteria and fungi pregrown on sugarcane bagasse pith. *Bioresource Technology.* 89:177-183.

Cookson, J. 1995. Bioremediation engineering: Design and application. McGraw-Hill, Inc. 524 Pp. ISBN: 0-07-012614-3. Nueva York, EEUU.

Cortés, A. 2011. Evaluación del efecto de un nuevo biosurfactante en el proceso de remoción de diesel del suelo. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México. 109 págs.

DOF. 2000. NOM-021-SEMARNAT-2000. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación. 2ª edición. México, D.F. México.

DOF. 2003. NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Norma Oficial Mexicana. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Poder Ejecutivo Federal. Diario Oficial de la Federación. México, D.F. México.

Dreyer, G., König, J., Ringpfeil, M. 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a mixed bacterial culture. [en línea]. [Consultado 5 abril 2012]. Disponible en el World Wide Web: <http://www.biopract.de/presse03.htm>

Dubois, A. 2008. Soil contamination: New research. Nova Science Publishers. 215 págs. ISBN: 1604561440. Ciudad, país de edición.

Dzul-Puc, J., Esparza, F., Barajas, M., Rodríguez, R. 2004. Benzo(a)pyrene removal from soil by *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse and pine sawdust. *Chemosphere*. 58:1-7.

EPA. 2006. United States Environmental Protection Agency. EPA542/F-06/013. *In Situ* treatment technologies for contaminated soils. [en línea]. [consultado 17 abril 2011]. Disponible en el World Wide Web: [www.epa.gov/tio/tsp/download/542f06013.pdf](http://www.epa.gov/tio/tsp/download/542f06013.pdf)

FAO. 2003. Land and Water Development Division. Why should soil biodiversity be managed and conserved? [en línea]. [consultado 17 abril 2011]. Disponible en el World Wide Web: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/soilbiod/consetxt.stm>

Fernández, E., 2009. Fundamentos del análisis cromatográfico: Cromatografía de líquidos de alta resolución. Departamento de Ingeniería Química UPCT. [en línea]. [Consultado 6 octubre 2012]. Disponible en el World Wide Web: [http://www.upct.es/~minaecees/fundamentos\\_analisis\\_cromatografico.pdf](http://www.upct.es/~minaecees/fundamentos_analisis_cromatografico.pdf)

Gaceta Oficial del Distrito Federal, 2010. Decreto que Contiene el Programa Delegacional de Desarrollo Urbano para la Delegación Tlalpan del Distrito Federal. No. 904 Tomo 2. [en línea]. [Consultado 5 abril 2012]. Disponible en el World Wide Web: [http://www.seduvi.df.gob.mx/portal/files/articulo%2014/fraccion%20I/DECRETOS/PDDU\\_TLALPAN.pdf](http://www.seduvi.df.gob.mx/portal/files/articulo%2014/fraccion%20I/DECRETOS/PDDU_TLALPAN.pdf)

Gadd, G.M. 2001. Fungi in bioremediation. British Mycological Society. 1ª Edición. 483 pags. ISBN: 0 521 78119 1. United Kingdom.

Gibbs, C., Pugh, K., Andrews, A. 1975. Quantitative studies on marine degradation of oil. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 188:83-94.

Gimsing, A., Hansen, J., Permild, E., Schwarz, G., Hansen, E. 2009. *In-situ* bioremediation of oil contaminated soil - Practical experiences from Denmark. Gentofte, Denmark. [en línea]. [consultado 19 abril 2011]. Disponible en el World Wide Web: [http://www.eugris.info/newsdownloads/GreenRemediation/pdf/D05\\_AnneLouiseGimsing\\_Paper.pdf](http://www.eugris.info/newsdownloads/GreenRemediation/pdf/D05_AnneLouiseGimsing_Paper.pdf)

Hernández, E., Rubiños, J., Alvarado, J. 2004. Restauración de suelos contaminados con hidrocarburos: conceptos básicos. Colegio de Postgraduados. 1ª edición. 148 pags. ISBN: 968-839-447-5. México, D.F. México.

INBio. 2011. Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica. Ciclo de Vida de los hongos. [en línea]. [consultado 20 abril 2011]. Disponible en el World Wide Web: <http://www.inbio.ac.cr/component/search/?searchword=ciclo%20de%20vida%20hongos&searchphrase=all&Itemid=101>

Informe técnico. 1999a. Estudio de la distribución de la contaminación por hidrocarburos presentes en el subsuelo y manto freático de la superintendencia de ventas de Hermosillo, Sonora. Instituto Mexicano del Petróleo. México, D.F. México

Informe técnico. 1999b. Determinación del grado de contaminación por hidrocarburos en el subsuelo y efecto del potencial de migración así como la valoración de riesgo a la salud en la Termina de almacenamiento y Distribución de Salina Cruz, Oaxaca. Instituto Mexicano del Petróleo. México, D.F. México.

ISRIC. 2009. International Soil Reference and Information Centre. Combatting land degradation. [consultado 20 abril 2011]. Disponible en el World Wide Web: <http://www.isric.org/global-issues>

Iturbe, R. 2012. Comunicación personal: Curso de Caracterización y saneamiento de suelos y acuíferos. Programa de Maestría y Doctorado en Ingeniería Ambiental. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México D.F., México.

IUPAC. 2001. International Union of Pure and Applied Chemistry. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* 73(7):1163–1172. Padua, Italia.

Jackson, L. 2007. Soil, biodiversity and ecosystem services. Department of Land, Air, and Water Resources. University of California. EEUU. [en línea]. [consultado 17 abril 2011]. Disponible en el World Wide Web: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/foodclimate/presentations/biodiv/Soil\\_Jackson.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/foodclimate/presentations/biodiv/Soil_Jackson.pdf)

Laboratorio de Edafología Ambiental (LEA), del Instituto de Geología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Lee, W., Shin, H., Hong, J., Pyo, H., Kim, Y. 2010. Studies on the analysis of benzo(a)pyrene and its metabolites in biological samples by using high performance liquid chromatography/fluorescence detection and gas chromatography/mass spectrometry. *Bull. Korean Chem. Soc.* 24:1-7.

Leyva, R. 2010. Fundamentos de adsorción. Centro de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, México. [en línea]. [consultado 20 Junio 2012]. Disponible en el World Wide Web: <http://www.cnea.gov.ar/xxi/ambiental/iberoarsen/docs/taller08/Presentaciones/4c%20Fundamentos%20de%20Adsorcion%20Roberto%20Leyva.pdf>

Macherey-Nagel. 2012. Solid phase extraction application guide. [en línea]. [Consultado 3 octubre 2012]. Disponible en el World Wide Web: <http://www.mn-net.com>

Manahan, S. E. 2007. Introducción a la Química Ambiental. Editorial Reverté-UNAM. Pp. 4-5. México, D.F.-Barcelona, México-España.

Márquez-Rocha, F.J., G. K. Guillén-Navarro, J.E. Sánchez-Vázquez J.E y R. Vázquez-Duhalt. 1999. Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. *Biotechnology Techniques*. 13:29-32.

McGill, W., Rowell, M. J., Westlake, B. 1981. Biochemistry ecology and microbiology of petroleum components soil. En *Soil Biochemistry*. Eds. A.D. McLaren, J.N. Ladd, G.H. Peterson, E.A. Paul. Vol. 5. Pp. 229-296. Ed. Marcel Dekker. Nueva York, EEUU.

Mihelcic, J., Zimmerman, J. 2010. Environmental engineering: Fundamentals, sustainability, design. John Wiley & Sons, Inc. 1ª edición. 695 págs. ISBN-13: 978-0-470-16505-8. Nueva York, EEUU.

Molina-Vargas, L., Melo, S. 2010. Importancia del método estadístico para el cálculo de la CE50 y CE95 de algunos isotiocianatos evaluados contra *Rhizoctonia solani* Kühn. *Agronomía Colombiana*. 28(2):235-244.

Orozco, C., Pérez, A., González, M., Rodríguez, F., Alfayate, J. 2003. Contaminación ambiental: Una visión desde la química. Paraninfo S.A. 1ª edición, 3ª reimpresión. 682 pags. ISBN: 84-9732-178-2. Madrid, España.

Paredes, M. 2008. Evaluación de un biosurfactante producido por *Serratia marcescens* en la degradación de una mezcla de los plaguicidas DDT y DDE en un sistema de biorremediación por bioestimulación. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). 136 págs. México, D.F. México.

Peña, A. 1995. Cómo funciona la célula. La ciencia desde México, Fondo de Cultura Económica. México D.F., México.

Primo, Y. 1981. Química agrícola I. Suelos y fertilizantes. Ed. Alhambra. Barcelona, España.

- Reyes-Calzada, I. 2012. Teoría de la formación del petróleo a partir de animales marinos. Presentada en la LI Convención Nacional del Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos. Puebla, Pue., México.
- Rodríguez, R., Cruz, C., Fernández, S., Roldán, C., Mendoza, C., Saucedo, C., Tomasini, C. 1999. Use of sugarcane bagasse pith as solid substrate for *P. chrisosporium* growth. *Folia microbial.* 44(2):213-218.
- Rosales, L. 2008. Biorremediación de suelos contaminados con aceite usado de automóvil con el hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* en Durango. Tesis para obtener el grado de Maestro en Gestión Ambiental: CIIDIR-IPN, Laboratorio de Biotecnología y Alimentos. 107 págs. Victoria de Durango, México.
- Salazar, E., Hernández, R., Tapia, A., Gómez, L. 2012. Identificación molecular del hongo *Colletotrichum* spp., aislado de banano (*Musa* spp) de altura en la zona de Turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas poscosecha. *Agron. Costarricense.* Vol. 36 [en línea]. [Consultado 2 octubre 2012]. Disponible en el World Wide Web: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0377-94242012000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242012000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
- Sánchez, J., Royse, D. 2001. La biología y el cultivo de *Pleurotus* spp. UTEHA Noriega editores. 1ª edición. 290 págs. Chiapas, México.
- Saval, S. 1998. Biorremediación de suelos y acuíferos. Situación actual y perspectivas en México. *Biotecnología (SMBB, México)* 3:71-76.
- Saval, S. 1999. Éxitos y fracasos de la remediación de suelos en sitios contaminados con hidrocarburos. [en línea]. [consultado 1 noviembre 2011]. Disponible en el World Wide Web: <http://132.248.9.1:8991/hevila/pdf-ariel/Exitos%20y%20fracasos%20de%20la%20remediacion%20de%20suelos%20en%20sitios%20contaminados%20con%20hidrocarburos.pdf>
- Savas, U., Carstens, C., Jefcoat, C. 1997. Biological oxidations and p450 reactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 347:181-192.
- Schneider, J., Grosser, R., Jayasimhulu, K., Xue, W., Warshawsky, D. 1996. Degradation of pyrene, benzo(a)anthracene, and benzo(a)pyrene by mycobacterium sp., isolated from former coal gasification site. *Appl. Environ Microbiol.* 62:13-19.
- Semarnat. 2013. Página electrónica de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Poder Ejecutivo Federal. Disponible en el World Wide Web: <http://tramites.semarnat.gob.mx/index.php/atmosfera/autorizaciones-para-la-operacion/5-semarnat-05-002-licencia-ambiental-unica>
- Servicio Meteorológico Nacional, 2010. Normales Climatológicas, estación 00009041 San Francisco Tlalnepantla. [en línea]. [Consultado 5 abril 2012]. Disponible en el World Wide Web: <http://smn.cna.gob.mx/climatologia/normales/estacion/df/NORMAL09041.TXT>

Servicio Meteorológico Nacional. 2012. Normales climatológicas 1971-2000, México, Distrito Federal. [en línea]. [Consultado 5 Abril 2012]. Disponible en el World Wide Web: <http://smn.cna.gob.mx/climatologia/normales/estacion/df/NORMAL09041.TXT>

Siebe, C. 1997. Química del suelo. Memorias del curso Biorremediación de suelos y acuíferos. Programa Universitario de Medio Ambiente. UNAM. México D.F. México.

Siebe, C. 2012. Comunicación personal. Curso de Monitoreo Ambiental. Instituto de Geología de la UNAM, México. D.F. México.

Siebe, C., Jahn, R., Stahr, K. 2006. Manual para la descripción y evaluación ecológica de suelos en el campo. 2ª edición. UNAM, Instituto de Geología. México.

Singh, H. 2006. Mycoremediation: Fungal bioremediation. John Wiley & Sons, Inc. 1ª edición. 592 págs. ISBN-13: 978-0-471-75501-2. Nueva York, EEUU.

Stamets, P. 2000. Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten Speed Press. 3ª edición. 574 págs. ISBN-13: 978-1-58008-175-7. Berkeley, California, EEUU.

Stamets, P. 2005. Mycelium running. *How mushrooms can help save the world*. California. Ten Speed Press. 329 págs. ISBN-13: 978-1-58008-579-3. Berkeley, California, EEUU.

Straalen, N., Lokke, H. 1997. Ecological risk assessment of contaminants in soils. Chapman & Hall. 1ª edición. 331 pags. ISBN: 0 412 75900 4. Londres, Inglaterra.

Tirado-Arreola, L.G., González-Aragón, O.J., García-Gómez, R.S., Durán-Domínguez-de-Bazúa, C. 2010. Hidrocarburos aromáticos policíclicos: Una amenaza potencial para la salud. *Revista Latinoamericana El Ambiente y las Ciencias*. 1(1):50-69.

Velazco, J., Volke, T. 2002. El composteo: alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. Instituto Nacional de Ecología. [en línea]. [Consultado 5 octubre 2011]. Disponible en el World Wide Web: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/gacetas/381/volke.html#top>

Vera, G., Tam, J., Pinto, E. 2009. Efectos ecotoxicológicos del petróleo crudo, diesel 2 y kerosene sobre el crecimiento poblacional de la microalga *Chaetoceros gracilis* schutt. *Ecología Aplicada*. 8:1-7.

Weissenfels, W., Klewer, H., Langhoff, J. 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbon by soil particles; influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36:689-696.

Wiesel, I., Wubker, S., Rehm, H. 1993. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an immobilized mixed bacterial culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:110-116.

## ANEXOS

### Anexo 1. Ficha de seguridad del benzo[a]pireno (IPCS, 2006)<sup>3</sup>

#### Fichas Internacionales de Seguridad Química

<b>BENZO(a)PIRENO</b>		<b>ICSC: 0104</b> Octubre 2005	
Benzo[a]pireno 3,4-Benzopireno			
CAS:	50-32-8	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	
HTCS:	DJ36/5000	Masa molecular: 252,3	
CE (Índice Anexo I):	601-012-00-3		
CE / EINECS:	200-028-5		
TIPO DE PELIGRO / EXPOSICIÓN	PELIGROS AGUDOS / SINTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS / LUCHA CONTRA INCENDIOS
<b>INCENDIO</b>	Combustible.	Evitar las llamas.	Polve, agua pulverizada, espuma, dióxido de carbono.
<b>EXPLOSIÓN</b>			
EXPOSICIÓN	Ver EFECTOS DE EXPOSICIÓN PROLONGADA O REPETIDA	¡EVITAR TODO CONTACTO!	
Inhalación		Extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo.
Piel	¡PUEDE ABSORBERSE!	Guantes de protección. Traje de protección.	Quitar las ropas contaminadas. Aclarar y lavar la piel con agua y jabón.
Ojos		Gafas ajustadas de seguridad o protección ocular combinada con protección respiratoria.	Fajungar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después proporcionar asistencia médica.
Ingestión		No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo.	Provocar el vómito (¡ÚNICAMENTE EN PERSONAS CONSCIENTES!). Proporcionar asistencia médica.
DERRAMES Y FUGAS		ENVASADO Y ETIQUETADO	
¡Evacuar la zona de peligro! Protección personal: traje de protección completo incluyendo equipo autónomo de respiración. Bajar la sustancia derramada e introducirla en un recipiente precintado; si fuera necesario, humedecer el polvo para evitar su dispersión. Recoger cuidadosamente el residuo, trasladarlo a continuación a un lugar seguro. NO permitir que este producto químico se incorpore al ambiente.		<b>Clasificación UE</b> Símbolo: T, N R: 45-46-60-61-43-50/53 S: 53-45-60-61	
RESPUESTA DE EMERGENCIA		ALMACENAMIENTO	
		Separado de oxidantes fuertes. Almacenar en un área sin acceso a desagües o alcantarillas.	
 <p>Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión Europea © IPCS, CE 2006</p>			

VEASE INFORMACION IMPORTANTE AL DORSO

<sup>3</sup> IPCS. 2006. International Programme on Chemical Safety. Ficha internacional de seguridad química del benzo[a]pireno. [en línea]. [Consultado 5 octubre 2011]. Disponible en el World Wide Web: [http://www.sghn.org/Actuacions\\_Xeral/Contaminacion/Areas\\_asfalticas/Benzo%28a%29pireno.pdf](http://www.sghn.org/Actuacions_Xeral/Contaminacion/Areas_asfalticas/Benzo%28a%29pireno.pdf)

## Fichas Internacionales de Seguridad Química

<b>BENZO(a)PIRENO</b>		<b>ICSC: 0104</b>
<b>DATOS IMPORTANTES</b>		
<p><b>ESTADO FÍSICO; ASPECTO:</b> Cristales amarillo pálido.</p> <p><b>PELIGROS QUÍMICOS:</b> Reacciona con oxidantes fuertes, originando peligro de incendio y explosión.</p> <p><b>LÍMITES DE EXPOSICIÓN:</b> TLV: Los niveles de exposición por todas las vías deben mantenerse lo más bajos posible, A2 (sospechoso de ser cancerígeno humano); (ACGIH 2005). MAK: H (absorción dérmica); Cancerígeno: categoría 2; Mutágeno: categoría 2 (DFG 2007).</p>	<p><b>VÍAS DE EXPOSICIÓN:</b> La sustancia se puede absorber por inhalación del aerosol, a través de la piel y por ingestión.</p> <p><b>RIESGO DE INHALACIÓN:</b> La evaporación a 20°C es despreciable; sin embargo, se puede alcanzar rápidamente una concentración nociva de partículas en el aire cuando se dispersa.</p> <p><b>EFECTOS DE EXPOSICIÓN PROLONGADA O REPETIDA:</b> Esta sustancia es carcinógena para los seres humanos. Puede causar daño genético hereditario en células germinales humanas. La experimentación animal muestra que esta sustancia posiblemente cause efectos tóxicos en la reproducción humana.</p>	
<b>PROPIEDADES FÍSICAS</b>		
<p>Punto de ebullición: 496°C Punto de fusión: 178,1 °C Densidad: 1,4 g/cm<sup>3</sup> Solubilidad en agua: ninguna (&lt;0,1 g/100 ml) Presión de vapor, Pa: despreciable</p>	<p>Coefficiente de reparto octanolagua como log Pow: 6,04</p>	
<b>DATOS AMBIENTALES</b>		
<p>La sustancia es muy tóxica para los organismos acuáticos. Puede producirse una bioacumulación de esta sustancia en peces, plantas y moluscos. La sustancia puede causar efectos prolongados en el medio acuático.</p>		
<b>NOTAS</b>		
<p>NO llevar a casa la ropa de trabajo. El benzo(a)pireno está presente en el medioambiente como un componente de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, resultantes de la pirólisis o combustión incompleta de materias orgánicas, especialmente combustibles fósiles y tabaco. Esta ficha ha sido parcialmente actualizada en abril de 2010; ver Límites de exposición, Almacenamiento.</p>		
<b>INFORMACIÓN ADICIONAL</b>		
<p>Límites de exposición profesional (INSHT 2011): C1B (Sustancia carcinogénica de categoría 1B). M1B (Sustancia mutagénica de categoría 1B).</p> <p>Notas: Esta sustancia tiene establecidas restricciones a la fabricación, comercialización o al uso especificadas en el Reglamento REACH. Sustancia tóxica para la reproducción humana de categoría 1B.</p>		
<b>Nota legal</b>	<p>Esta ficha contiene la opinión colectiva del Comité Internacional de Expertos del IPCS y es independiente de requisitos legales. Su posible uso no es responsabilidad de la CE, el IPCS, sus representantes o el INSHT, autor de la versión española.</p>	
© IFCS, CE 2006		

**Figura A.1 Hoja de seguridad del benzo[a]pireno**

## Anexo 2. Modelación de la prueba de isotermas de adsorción

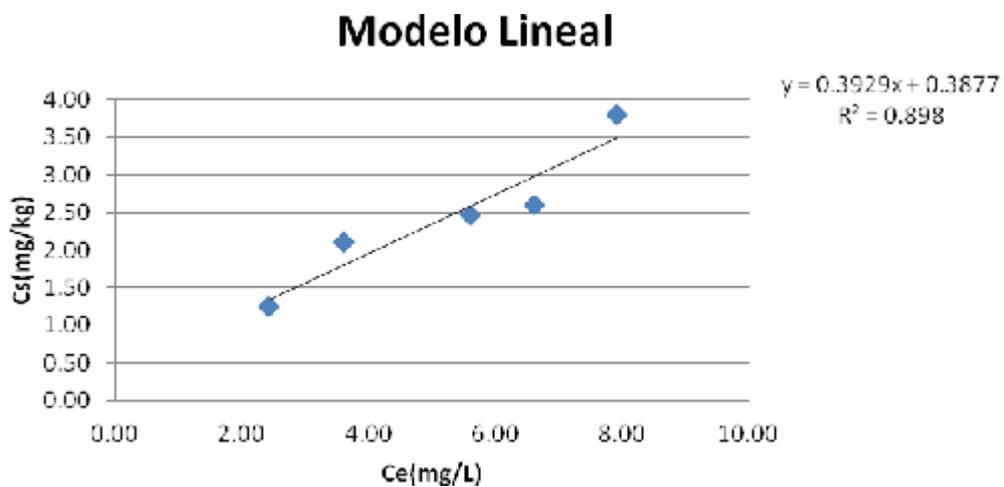
El análisis de las muestras para determinar su concentración se realizó mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) en un equipo WATERS e2695 con un detector de arreglos de fotodiodos WATERS 2996.

Las condiciones experimentales se detallan a continuación:

**Tabla A.2.1. Condiciones cromatográficas para la detección del benzo[a]pireno empleando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)**

Componente	Condición
Columna	C18, 5 $\mu$ L, 4.6 x 150 mm
Flujo	1.5 mL/minuto
Fase móvil	A:Acetonitrilo
Gradiente	100% A
Detector	UV a 296 nm

### A.2.1. Modelo lineal



**Figura A.2.1. Modelo de adsorción lineal**

### A.2.2. Modelo de Langmuir

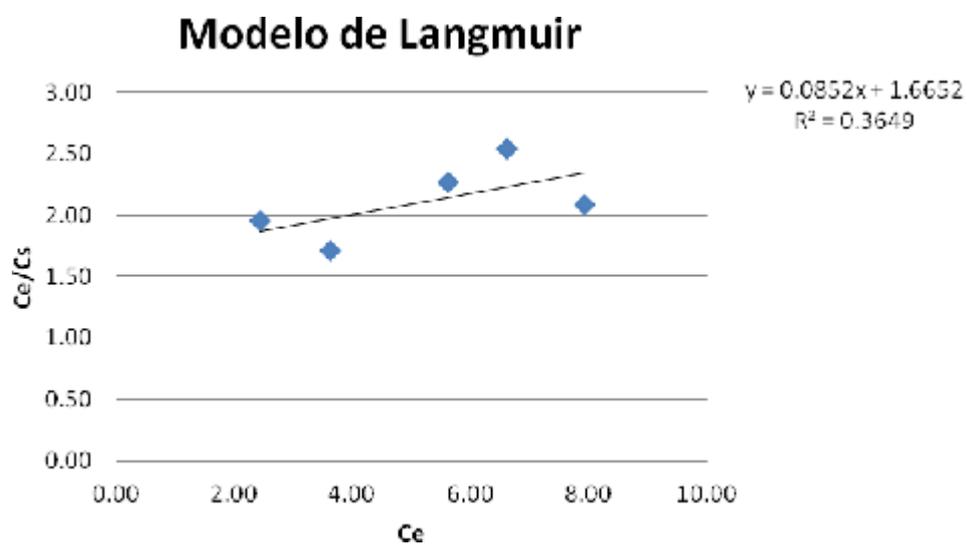


Figura A.2.2. Modelo de adsorción de Langmuir

### A.2.3. Modelo de Freundlich

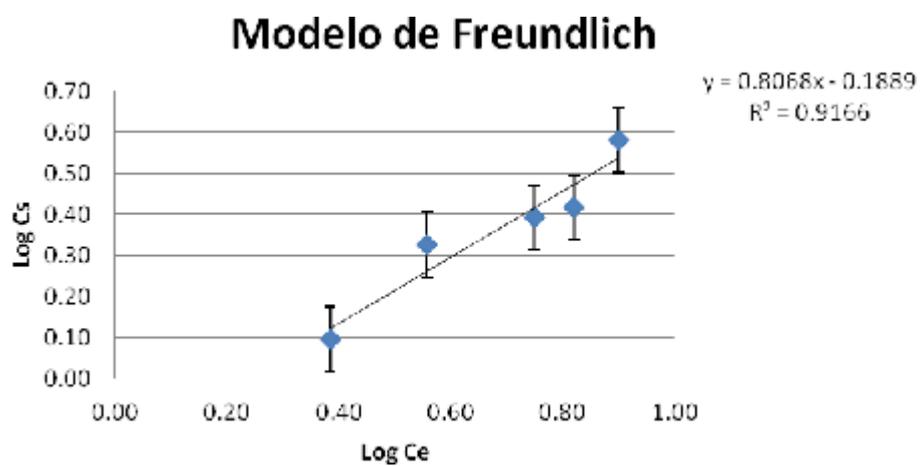


Figura A.2.3. Modelo de adsorción de Freundlich

### *Anexo 3. Análisis estadísticos de las pruebas dosis-respuesta*

Los análisis estadísticos de las pruebas dosis respuesta que se aplicaron son los siguientes:

#### **A.3.1. Resumen estadístico del crecimiento del micelio**

**Tabla A.3.1. Resumen estadístico del crecimiento del micelio**

<b>Concentración</b>	<b>Réplicas</b>	<b>Promedio</b>	<b>Varianza</b>	<b>Desviación Estándar.</b>
<b>0</b>	3	11.197	0.015	0.123
<b>4</b>	3	1.1602	3.377	1.838
<b>6</b>	3	2.5046	4.838	2.199
<b>8</b>	3	0.3367	0.340	0.583
<b>10</b>	3	0.0	0.0	0.0
<b>12</b>	3	0.0	0.0	0.0
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>2.6999</b>	<b>17.369</b>	<b>4.168</b>

#### **A.3.2. ANOVA del crecimiento del micelio**

**Tabla A.3.2. ANOVA del crecimiento del micelio**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de los cuadrados</b>	<b>Df</b>	<b>Media cuadrada</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>P-Value</b>
<b>Entre grupos</b>	278.129	5	55.6259	38.94	0.0000
<b>En los grupos</b>	17.1408	12	1.4284		
<b>Total (Corr)</b>	<b>295.27</b>	<b>17</b>			

**A.3.3. Prueba estadística de rangos múltiples con 95.0% de intervalos *LSD* (*Least Significant Difference*)**

**Tabla A.3.3. Prueba de rangos múltiples con 95% en intervalos *LSD* (*Least Significant Difference*)**

Contraste	Diferencia	Límite +/-
<b>0-10</b>	*11.1279	2.1262
<b>0-12</b>	*11.1279	2.1262
<b>0-4</b>	*9.0377	2.1262
<b>0-6</b>	*8.6933	2.1262
<b>0-8</b>	*10.8612	2.1262
<b>10-12</b>	0.0	2.1262
<b>10-4</b>	*-2.1603	2.1262
<b>10-6</b>	*-2.5047	2.1262
<b>10-8</b>	-0.3367	2.1262
<b>12-4</b>	*-2.1603	2.1262
<b>12-6</b>	*-2.5047	2.1262
<b>12-8</b>	-0.3367	2.1262
<b>4-6</b>	-0.3444	2.1262
<b>4-8</b>	1.8236	2.1262
<b>6-8</b>	*2.1679	2.1262

\* Denota una diferencia estadística significativa.

Esta Tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias son significativamente diferentes de las que otras. Estos contrastes muestran diferencias estadísticamente significativas en el 95,0% de nivel de confianza. El método utilizado para discriminar entre las medias es el de las Diferencias Significativa de Fisher (*LSD* en sus siglas en inglés).

**Anexo 4. Determinación de la dosis efectiva media (CE<sub>50</sub>) a partir de las pruebas dosis-respuesta**

**A.4.1. Análisis *Probit* (*Probability unit*)**

**Tabla A.4.1. Análisis de parámetros estadísticos para el análisis *Probit* (*Probability unit*)**

Variable	DF	Error estándar	Chi-cuadrada	Probabilidad
<b>Intercepción</b>	1	0.20307	0.3272	
<b>Log10 (concentración)</b>	1	0.23682	34.2819	<0.0001

**Tabla A.4.2. Análisis *Probit* sobre la “concentración” de la dosis efectiva media (CE<sub>50</sub>)**

Probabilidad	Concentración	Intervalos de confianza (95%)
0.01	0.02547	0.00151 - 0.10436
0.02	0.04005	0.00298 - 0.14656
0.03	0.05338	0.00459 - 0.18180
0.04	0.06625	0.00635 - 0.21380
0.05	0.07898	0.00827 - 0.24394
0.06	0.09173	0.01035 - 0.27292
0.07	0.10458	0.01261 - 0.30116
0.08	0.11762	0.01504 - 0.32891
0.09	0.13087	0.01765 - 0.35637
0.10	0.14439	0.02046 - 0.38368
0.15	0.21693	0.03770 - 0.52089
0.20	0.29979	0.06126 - 0.66426
0.25	0.39568	0.09290 - 0.81844
0.30	0.50768	0.13500 - 0.98731
0.35	0.63957	0.19085 - 1.17493
0.40	0.79628	0.26503 - 1.38609
0.45	0.98435	0.36405 - 1.62681
<b>0.50</b>	<b>1.21276</b>	<b>0.49741 - 1.90505</b>
0.55	1.49416	0.67935 - 2.23179
0.60	1.84707	0.93194 - 2.62283
0.65	2.29963	1.29082 - 3.10218
0.70	2.89708	1.81628 - 3.70910
0.75	3.71708	2.61535 - 4.51572
0.80	4.90607	3.88084 - 5.68612
0.85	6.77998	5.87672 - 7.78139
<b>0.90</b>	<b>10.18597</b>	<b>8.73758 - 13.09086</b>
0.91	11.23826	9.48968 - 15.04101
0.92	12.50497	10.35423 - 17.53420
0.93	14.06320	11.37304 - 20.79711
0.94	16.03411	12.60889 - 25.20583
0.95	18.62125	14.16311 - 31.42995
0.96	22.19898	16.21523 - 40.78423
0.97	27.55269	19.12704 - 56.24872
0.98	36.71942	23.7928 - 86.34973
0.99	57.74159	33.50724 - 169.97080

**Anexo 5. Análisis estadístico de los resultados finales de los reactores con suelo contaminado**

Se realizó un análisis multifactor de la varianza (*ANOVA* en inglés) de los datos de degradación (Tabla A.5.1). A partir de este análisis se determinaron cuáles de los valores obtenidos son estadísticamente significativos.

**Tabla A.5.1. Análisis multifactor de varianza (*ANOVA*) de la degradación del benzo[a]pireno**

Fuente	Suma de los cuadrados	Df	Media cuadrada	F-Ratio	P-Value
<b>Humedad</b>	0.100833	1	0.100833	13.03	0.0057
<b>Inóculo</b>	0.0392163	1	0.0392163	5.07	0.0509
<b>Residual</b>	0.069673	9			
<b>Total (Corr)</b>	<b>0.209723</b>	<b>11</b>			

También fue efectuado un análisis de rango múltiple debido a la variable humedad (Tabla 8.8):

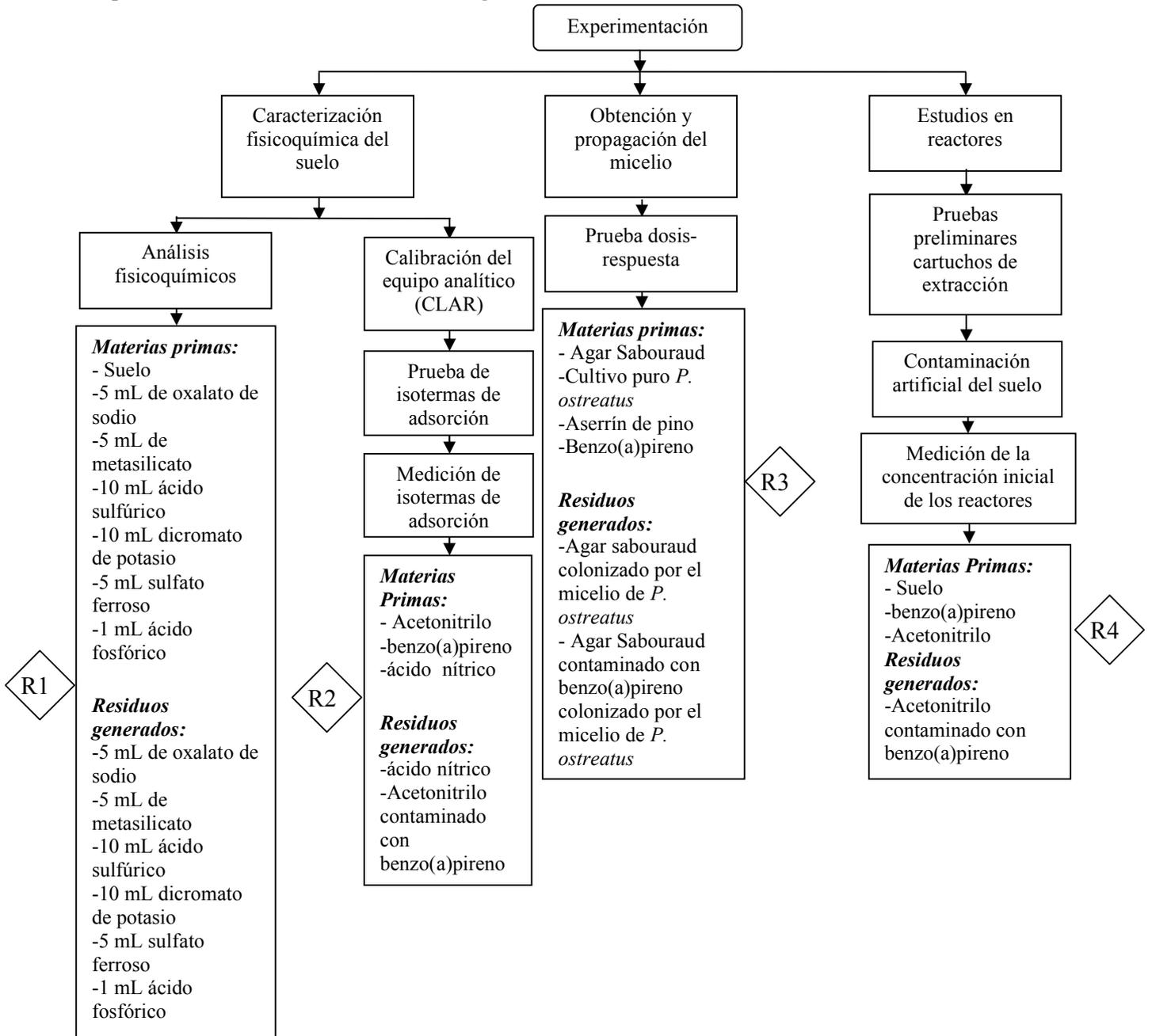
**Tabla A.5.2. Prueba de rango múltiple debido a la variable humedad (95%LSD)**

Humedad	Cuenta	LS media	LS sigma	Grupos homogéneos
<b>50%</b>	6	1.016	0.0359199	X
<b>70%</b>	6	1.19933	0.0359199	X
<b>Contraste</b>		<b>Diferencia</b>		<b>±Límites</b>
<b>50%-70%</b>		<b>*-0.183333</b>		<b>0.114914</b>

\*Denota diferencia significativa.

**Anexo 6. Manejo de los residuos generados a lo largo de la experimentación**

De acuerdo con el Programa de enseñanza integral del cuidado del ambiente en la Facultad de Química de la UNAM se desarrolló un diagrama ecológico con la finalidad de aplicar los procesos de eliminación de residuos y que estos sean manejados de forma adecuada para evitar reducir su impacto negativo al medio ambiente. A continuación, en la Figura A.6.1, se presenta un diagrama de flujo en el que se expone la secuencia de cada una de las actividades realizadas a lo largo de la experimentación así como los residuos generados en cada una de estas actividades.



**Figura A.6.1. Diagrama de flujo de la generación y tratamiento de los residuos generados en la experimentación**

### **A.6.1. Tratamiento y destino final del los residuos generados**

Con base en la identificación de las características químicas de cada uno de los residuos identificados, se definió el tratamiento y destino final a que serán sometidos.

**R1:** En el caso de los residuos de la caracterización fisicoquímica del suelo fueron estabilizados en el laboratorio. La estabilización se realizó "in situ" mediante la adición de una base (NaOH) hasta encontrar la neutralidad de pH en la solución.

**R2:** El ácido nítrico utilizado para el lavado de los utensilios de laboratorio usados para el análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), la estabilización se realizó "in situ" mediante la adición de una base (NaOH) hasta encontrar la neutralidad de pH en la solución. Cabe mencionar que el ácido nítrico fue reutilizado durante toda la experimentación.

**R2 y R4:** En el caso de la solución de acetonitrilo con benzo(a)pireno generada en los análisis cromatográficos, las muestras contaminadas fueron acondicionados para su envío a través de la colecta de residuos de la UGA (Unidad de Gestión Ambiental de la FQ-UNAM). El acondicionamiento de estos residuos consistió en el envasado de los mismos y el etiquetado en cual se especificó la naturaleza química del compuesto así como el nombre de la persona que lo generó. Esta Unidad los envía a una empresa cooperante que los incinera en condiciones seguras.

**R3:** Residuos orgánicos no peligrosos. Se sometieron a su disposición para producir composta o se desecharon en la basura orgánica.