

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

**ESTUDIO DE ECOTOXICIDAD DE UN SUELO CONTAMINADO
CON HIDROCARBUROS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A :

Q.F.B. ERIKA ESCALANTE ESPINOSA

ASESORES:

DRA. MARGARITA GALLEGO MARTÍNEZ

DR. MARIANO GUTIÉRREZ ROJAS

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

MÉXICO, D. F.

2000

Este trabajo está dedicado especialmente para:

Las familias Escalante Espinosa: Silvia, Luis Felipe, Tania, Sheila y Gerardo;
y Díaz Ramírez: Adela, Ildefonso, José, David y Adelita; por su apoyo y cariño
incondicional, por estar conmigo en los momentos buenos y malos.

Ilde, por caminar siempre a mi lado.

Todos aquellos a quienes la vida les ha negado la oportunidad de estudiar.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Instituto Mexicano del Petróleo (Proyecto FIES-96F-48-VI) por las becas otorgadas durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato y a la M. en C. María del Carmen González Macías por sus valiosos comentarios durante la revisión de la tesis.

A la Biól. Lucía Salazar Coria por el apoyo recibido para el uso del sistema Microtox en el Instituto Mexicano del Petróleo.

A la Universidad Autónoma de Chapingo por la donación de semillas y lombrices utilizadas en este estudio.

A todos los compañeros y profesores de la Planta Piloto 4 y del Laboratorio de Residuos Sólidos en especial a Rosario, Tania, Angélica y Alex; porque con su amistad han logrado que el laboratorio no sólo sea un lugar de trabajo sino un segundo hogar.

A la Dra. Margarita Gallegos, al Dr. Mariano Gutiérrez y al Dr. Ernesto Favela, con especial cariño; por todo su apoyo, confianza, sugerencias y consejos durante la parte experimental y la escritura de la tesis; pero sobre todo, por dejarme formar parte de este gran equipo de trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 Ecotoxicología	1
1.1.1 Bioensayos	2
1.1.2 Aplicación de la Ecotoxicología	4
1.2 Hidrocarburos	6
1.2.1 Composición	6
1.2.2 Destino de los hidrocarburos en el suelo	7
1.3 Bioensayos	12
1.3.1 Bioensayo de germinación de semillas, crecimiento de plantas	12
1.3.2 Bioensayo con lombrices	15
1.3.3 Bioensayo con microorganismos	17
1.4 Legislación en México	21
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
3. OBJETIVOS	24
4. MÉTODOS Y MATERIALES	25
4.1 Preparación de las mezclas de suelo	25
4.2 Determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP)	26
4.3 pH	27
4.4 Actividad de agua (a_w)	28
4.5 Humedad crítica	28
4.6 Textura	28
4.7 Bioensayo de germinación de semillas, crecimiento de plantas	28
4.8 Actividad Fotosintética	31
4.9 Bioensayo con lombrices <i>Eisenia foetida</i> L.(Annelida)	35
4.10 Bioensayo con microorganismos (sistema Microtox®)	37
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS	40
5.1 Determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP)	40
5.2 Caracterización de las mezclas de suelo	41
5.3 Bioensayo de germinación de semillas, crecimiento de plantas	45

5.3.1	Actividad Fotosintética	56
5.3.2	Determinación de hidrocarburos en suelo	65
5.4	Bioensayo con lombrices <i>Eisenia foetida</i> L (Annelida)	67
5.5	Bioensayo con microorganismos (sistema Microtox®)	73
5.6	Comparación entre bioensayos	76
6.	CONCLUSIONES	78
7.	RECOMENDACIONES	80
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

RESUMEN

La Ecotoxicología es un término usado para describir el estudio de los efectos adversos, sobre los organismos de un ecosistema, que las sustancias químicas pueden ocasionar cuando son liberadas en el ambiente. Dentro de los estudios de ecotoxicidad se realizan las *pruebas de toxicidad biológica o bioensayos*, en las cuales se exponen los organismos a diferentes matrices ambientales conteniendo la(s) sustancia(s) a probar y se evalúan los efectos del medio sobre la sobrevivencia, crecimiento, reproducción, comportamiento y otros atributos del organismo ensayado.

En este trabajo se evaluó la ecotoxicidad de un suelo contaminado con hidrocarburos, obtenido de un sitio localizado al sur del estado de Veracruz en México; este lugar tiene una historia de contaminación de más de 20 años por lo que el suelo contaminado se considera intemperizado. El estudio de ecotoxicidad se realizó mediante el uso de bioensayos con organismos representantes de diferentes niveles tróficos (germinación de semillas y crecimiento de las plantas, lombrices y microorganismos).

En el bioensayo de germinación de semillas y crecimiento de plantas se trataron mezclas de suelo contaminado con hidrocarburos totales de petróleo (HTP) a diferentes concentraciones: 0, 2.5, 5, 10, 15 y 20% de HTP en semilleros y se adicionaron las semillas de: *Zea mays* L., *Triticum aestivum* L. y una planta nativa del pantano, *Cyperus laxus* Lam. Las semillas se germinaron en un invernadero. Se determinó el porcentaje de germinación máximo y el crecimiento (peso seco y altura) a los 21 días. También se midió la actividad fotosintética (fluorescencia de clorofila *a*) de las plantas. En cuanto al porcentaje de germinación máximo no se observó efecto de los hidrocarburos sobre esta variable en las tres especies debido probablemente a que el suelo ensayado es intemperizado (más de 20 años de historia de contaminación); en el crecimiento se presentó el efecto fitotóxico a una concentración de 2.5% de HTP para la planta nativa (especie más sensible) y de 10% de HTP para maíz y

trigo. En la actividad fotosintética, evaluada por la variable eficiencia del Fotosistema II, no se observó efecto por los hidrocarburos en las tres especies.

En el bioensayo con lombrices se colocaron 10 lombrices de *Eisenia foetida* L. previamente pesadas en los recipientes de prueba conteniendo suelo humectado. Se determinó el número de lombrices sobrevivientes y el peso. Se encontró una LC_{50} de 11.9% de HTP a los 14 días de exposición.

En el bioensayo con microorganismos se utilizó el sistema Microtox® y como organismo de prueba a la bacteria *Vibrio fischeri*. La EC_{50} calculada fue de 1.27% de HTP. Este fue el bioensayo más sensible.

Los bioensayos desarrollados y probados pueden utilizarse para plantear normas para la valoración ecotoxicológica de suelos contaminados con hidrocarburos ya que evalúan organismos representantes de diferentes niveles tróficos que permiten valorar, de forma completa, un ecosistema contaminado. Así mismo mediante los bioensayos realizados puede sugerirse un intervalo de concentración (0.156 a 2.5% de HTP) de hidrocarburos a alcanzarse como punto final después de que se aplique un proceso de remediación a este sitio contaminado

Palabras clave: ecotoxicidad, bioensayos con suelo, HTP.

INTRODUCCIÓN

El avance tecnológico y el crecimiento de las grandes ciudades han provocado el uso indiscriminado de combustibles derivados del petróleo. A su vez, la explotación de este recurso natural no renovable ha generado graves problemas de contaminación a escala mundial, afectando tanto al ser humano como a los integrantes de diferentes ecosistemas. La disciplina que permite valorar el riesgo de las poblaciones de organismos nativos cuando son expuestas a un estrés ambiental, tal como la presencia de un contaminante a niveles críticos o potencialmente tóxicos, es la *Ecotoxicología* (Sköt, 1997). La Ecotoxicología y la valoración del riesgo ecológico para las sustancias tóxicas se encuentran en un estado temprano de desarrollo, particularmente para los ecosistemas terrestres. Se requiere todavía de varios estudios para estandarizar las pruebas, validar los métodos e incrementar las bases de datos. Una de las principales metas de la Ecotoxicología es producir datos que puedan usarse para predecir la respuesta probable de un estrés ambiental (Holloway y col., 1997).

En el presente trabajo se aborda el estudio ecotoxicológico realizado a muestras de suelo contaminado con hidrocarburos, obtenido de un sitio localizado al sur del estado de Veracruz en México. El ecosistema afectado es un pantano con una historia de contaminación de más de 20 años por lo que el suelo contaminado ha estado expuesto al proceso de intemperización.

En el primer capítulo se desarrolla una revisión bibliográfica del trabajo, que incluye desde los conceptos básicos en Ecotoxicología y los bioensayos más utilizados para la valoración del ambiente terrestre, hasta un breve panorama de la legislación en materia de impacto ambiental en México. Posteriormente, se plantea el problema y los objetivos a cumplir durante el desarrollo experimental.

En el capítulo cuatro se explica con detalle los métodos y materiales utilizados para la caracterización de las mezclas de suelo con diferentes concentraciones de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) así como los bioensayos realizados:

el de germinación de semillas, crecimiento de la planta (evaluando tres especies: maíz, trigo y una planta nativa del sitio contaminado, *Cyperus laxus* Lam.), el de lombrices usando *Eisenia foetida* L., y el de microorganismos (*Vibrio fischeri*, sistema Microtox®).

Los resultados y análisis integran el capítulo cinco. Primero se presentan los resultados correspondientes al bioensayo con plantas incluyendo la evaluación de la actividad fotosintética de las mismas; para el bioensayo con lombrices *Eisenia foetida* L. se muestran los datos de mortalidad y crecimiento (curva dosis-respuesta), se analizan los valores de bioluminiscencia obtenidos con *Vibrio fischeri* durante el bioensayo con microorganismos y se muestra un resumen de los parámetros toxicológicos obtenidos de los tres bioensayos. En los últimos capítulos se presentan las conclusiones del trabajo y recomendaciones para la realización de estudios posteriores.

El estudio realizado permitirá establecer métodos (bioensayos) para plantear normas para la valoración ecotoxicológica de suelos contaminados con hidrocarburos ya que evalúan organismos representantes de diferentes niveles tróficos además de sugerir intervalos de concentración de HTP a alcanzarse como punto final después de un proceso de remediación.

La finalidad de la vida es el desenvolvimiento de la personalidad. Realizar nuestro propio ser a perfección es para lo que estamos aquí. Los hombres tienen miedo de sí mismos. Han olvidado el más elevado de todos los deberes: el deber para consigo mismos.

Oscar Wilde

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

1.1 ECOTOXICOLOGÍA.

Las pruebas utilizadas para determinar el efecto tóxico de las sustancias químicas se han enfocado tradicionalmente en el aspecto de la seguridad hacia el ser humano. Tales pruebas son llevadas a cabo, invariablemente, usando especies sucedáneas que se supone se aproximan a la respuesta humana. A través de varios años se ha acumulado suficiente información confiable que provee datos que pueden ser extrapolados a la protección de la salud humana. Esta información se basa en estudios que utilizan diferentes especies, tales como ratones, ratas, conejos, perros y ocasionalmente primates (Menzer y col, 1994).

Recientemente ha surgido una importante consideración en Toxicología que demanda una extensión de los limitados protocolos del pasado: se reconoce que hay implicaciones importantes para la salud humana en la respuesta de los animales a los xenobióticos en su propio ambiente así como su relación con las vías y procesos de incorporación de éstos. Es entonces que surgen las subdisciplinas *Toxicología ambiental* y *Ecotoxicología* (Menzer y col, 1994). Éstos son términos usados para describir el estudio científico de los efectos adversos sobre los organismos que pueden ocasionar las sustancias químicas cuando son liberadas en el ambiente. La *Toxicología ambiental* se aplica solamente al estudio de los efectos directos de las sustancias en el ser humano mientras que la *Ecotoxicología* provee un significado de la valoración del riesgo de las poblaciones naturales de organismos cuando son expuestas a un estrés ambiental tal como la presencia de un contaminante o la mezcla de ellos y la influencia que las condiciones ambientales tienen sobre el comportamiento del tóxico (Holloway y col., 1997; Sköt, 1997).

La tendencia en Ecotoxicología es la prueba de una batería de organismos a partir de diferentes niveles tróficos: descomponedores (microorganismos), productores primarios (algas y plantas), productores secundarios y consumidores (invertebrados y vertebrados). Esta consideración es particularmente útil para valorar contaminantes desconocidos, mezclas complejas y residuos peligrosos, debido a que alguno de sus componentes puede afectar solamente a un nivel trófico o puede biomagnificarse (Wang y Freemark, 1994).

Los estudios de ecotoxicidad de los sistemas terrestres pertenecen frecuentemente a una de las siguientes categorías:

- ♣ Pruebas de toxicidad *a priori* de sustancias únicas para su uso o disposición en los sistemas terrestres.
- ♣ Valoraciones específicas de la extensión del contaminante en el sitio de interés.

Estas categorías utilizan la misma serie de pruebas de toxicidad o bioensayos para determinar la toxicidad hacia plantas y fauna.

1.1.1 BIOENSAYOS.

En Ecotoxicología, un *bioensayo* o *prueba de toxicidad* es una técnica empleada para determinar si un residuo químico presente en el ambiente está en cantidades suficientemente altas para afectar adversamente algunos aspectos del espectro normal de actividades de animales y plantas. Los bioensayos en Ecotoxicología se realizan con el supuesto de que los organismos probados son “sucedáneos” o “claves” de organismos “superiores” presentes en su ambiente natural (Colin, 1993). La Ecotoxicología está basada en el principio de que hay una relación directa entre la reacción tóxica (la respuesta) y la cantidad de sustancia recibida (la dosis). Un supuesto importante de esta relación es que

existe una dosis a la cual no ocurre respuesta, el segundo supuesto es que una vez que la dosis máxima ha sido alcanzada cualquier incremento en ésta no resultará en un incremento del efecto (USEPA, 1998).

El término *toxicidad* se refiere al potencial inherente de una sustancia para causar daño sistémico a los organismos. Los efectos tóxicos se clasifican en agudos y crónicos. Los efectos agudos suceden inmediatamente después de una sola exposición a la sustancia a concentraciones generalmente altas (muerte, parálisis, inhibición de crecimiento); los efectos crónicos se presentan después de un largo tiempo de exposición y proporcionan una respuesta subletal (cáncer, daño a los órganos, dificultad en la reproducción). Las *pruebas de toxicidad aguda* son relativamente simples, son de corta duración y de bajo costo, además de que se cuenta con bases de datos para muchas sustancias y efluentes. Estas pruebas usadas con frecuencia para una valoración de toxicidad rápida o para determinar la sensibilidad relativa de diferentes especies. Las *pruebas de toxicidad crónica* son más complejas y requieren más tiempo que las de toxicidad aguda; éstas son diseñadas para ciclos de vida de especies particulares con la finalidad de obtener información de teratogenicidad (capacidad de la sustancia para producir malformaciones en el organismo) (Menzer y col, 1994). Si la valoración de toxicidad está basada en estudios en animales, el grado de daño a los humanos pueden extrapolarse usando modelos matemáticos basados en una gran variedad de supuestos. Entonces la valoración de toxicidad provee solamente un estimado del daño al ser humano (USEPA, 1998).

Las normas de regulación ambiental se basan en resultados obtenidos mediante bioensayos, los cuales, para considerarse válidos deben ser evaluados en base a las siguientes preguntas sugeridas por Tebo (citado por Colin, 1993):

- ♣ ¿Qué significa la respuesta del bioensayo en términos de daño ambiental?
- ♣ ¿La respuesta del laboratorio puede extrapolarse al sistema receptor (ecosistema)?
- ♣ ¿El bioensayo es suficientemente sensible?
- ♣ ¿La precisión de la prueba es conocida?
- ♣ ¿El bioensayo es simple y reproducible?.

Con la inclusión de especies adicionales en los bioensayos se ha visto la necesidad de desarrollar nuevos protocolos estandarizados. Cuando se aumenta el número de especies probadas en la valoración de la toxicidad de una sustancia, se es capaz de formar una idea de su mecanismo de acción, biodegradabilidad, toxicidad específica para cada órgano y efectos potenciales tanto agudos como crónicos (Menzer y col, 1994). Sabiendo que los estudios de ecotoxicidad se realizan usando los bioensayos, entonces se puede definir el papel de la Ecotoxicología en la valoración del riesgo ambiental.

1.1.2 APLICACIÓN DE LA ECOTOXICOLOGÍA.

Un objetivo importante de los bioensayos es valorar el impacto sobre los ecosistemas naturales y calcular los factores de riesgo. Las poblaciones naturales de animales y plantas son todas, sin excepción, expuestas frecuentemente a residuos tóxicos derivados de las actividades humanas tales como pesticidas, detergentes, metales pesados y de la transformación del petróleo. Una consideración importante para evaluar el riesgo al que un organismo puede estar bajo exposición de un tóxico es valorar la concentración letal 50 que se define como la concentración a la cual muere el 50% de la población (LC_{50}) o la concentración efectiva media que es la concentración a la que disminuye en un 50% el efecto observado (EC_{50}) bajo las condiciones de laboratorio (USEPA, 1998). Un simple análisis de riesgo ecotoxicológico puede realizarse por extrapolación de datos de toxicidad aguda o crónica de pruebas con varias especies utilizando técnicas estadísticas de regresión.

Alternativamente, los procedimientos de extrapolación del laboratorio al campo pueden usar modelos de distribución para conjuntos de datos de pruebas de toxicidad aguda o crónica. En estos métodos se asume que los valores de LC_{50} o de la concentración a la cual no se observa el efecto (NOEC) para una sola especie y para todas las especies en una comunidad son variables estocásticamente independientes (seleccionadas al azar) con la misma distribución normal. (Wagner y Lockke, 1991). Una de las principales metas de la Ecotoxicología es producir datos que puedan usarse para predecir la respuesta probable a un estrés ambiental (Holloway y col., 1997).

Otra aplicación de la Ecotoxicología es como herramienta en el seguimiento de los procesos de remediación y restauración de los sitios contaminados. Particularmente, la aceptación de la biorremediación como un tratamiento ambiental adecuado requiere la demostración de su eficacia, confiabilidad y predictibilidad. El diseño de un seguimiento efectivo incluye protocolos para el control y registro continuo tomando en cuenta el destino abiótico y biótico de los contaminantes. Estos protocolos se basan en los siguientes criterios y preguntas relevantes (Tabla 1.1):

Tabla 1.1 Criterios para los protocolos de seguimiento de procesos de biorremediación

CRITERIOS	PREGUNTAS
Químicos y de Ingeniería	¿Hasta dónde debe alcanzarse la limpieza del contaminante?
Económicos:	¿Pueden establecerse modelos predictivos? ¿El tratamiento es económicamente competitivo?
Ecotoxicológicos	¿Se han considerado los recursos naturales del ambiente en la evaluación global? ¿Fue el contaminante totalmente detoxificado?
Naturaleza biológica	¿El tratamiento posee algún riesgo ecológico o humano? ¿Se presenta atenuación natural? ¿Se demostró la naturaleza biológica del proceso?
Estéticos	¿Cuál fue la contribución del proceso abiótico? ¿El tratamiento provocó una mejora visual o sensorial del sitio contaminado?

Fuente: Heitzer y Sayler, 1993.

Los sitios a los cuales se aplican los procesos de remediación pueden estar contaminados por compuestos inorgánicos (metales) y orgánicos como herbicidas, pesticidas, compuestos clorados, detergentes e hidrocarburos.

1.2 HIDROCARBUROS.

Los hidrocarburos derivados de las actividades petroleras se encuentran en todo el mundo. Su presencia ha sido detectada en componentes vivos e inertes de los ecosistemas. La composición de productos del petróleo liberados en el ambiente varía significativamente dependiendo de la fuente, intemperización y movimiento diferencial de los componentes en el medio. (Koblis y col., 1993). Heath y col. (1993) recopilaron información acerca de la composición de varios productos del petróleo, así como las propiedades químicas y físicas, incluyendo valores de toxicidad; sin embargo, para muchos sitios no hay información detallada disponible acerca de la composición de hidrocarburos totales de petróleo (HTP). Los HTP son referidos como aceite mineral, hidrocarburos extraíbles, aceites y grasas. Existen técnicas analíticas disponibles que miden concentraciones de HTP en el ambiente. Un solo método no mide el intervalo completo de hidrocarburos derivados del petróleo ya que las técnicas varían en la forma en que los hidrocarburos son extraídos y detectados, cada medición determina diferentes subgrupos de hidrocarburos presentes en una muestra. La definición de HTP depende del método analítico usado debido a que los HTP cuantificados son la concentración total de hidrocarburos extraídos y medidos por un método particular. La misma muestra analizada por los diferentes métodos de cuantificación puede producir diferentes valores de TPH (Weissman, 1998).

1.2.1 COMPOSICIÓN

El petróleo es una mezcla compleja de cientos de hidrocarburos y otros compuestos. Un hidrocarburo es una molécula consistente solamente de

hidrógeno y carbono. Los hidrocarburos en el petróleo se agrupan generalmente en cuatro clases de acuerdo a su solubilidad en diferentes solventes orgánicos:

- ♣ *Saturados*: alcanos lineales y ramificados y cicloparafinas.
- ♣ *Aromáticos*: compuestos aromáticos mono, di y polinucleares que contienen cadenas alquílicas y/o cicloparafinas fusionadas.
- ♣ *Resinas*: piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas.
- ♣ *Asfaltenos*: agregados de poliaromáticos, ácidos nafténicos, fenoles polihídricos, ácidos grasos y metaloporfirinas (Sugiura y col., 1997).

Los alquenos se encuentran poco en el petróleo crudo. En el grupo de los aromáticos se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), moléculas formadas por dos o más anillos fusionados y éstos pueden representar del 0.2 a 7% del crudo, sin embargo, su contenido puede incrementar con la gravedad específica del aceite (Albers, 1995). Los HAP están presentes en el petróleo pesado particularmente en alquitrán, sustancias para tratar madera y desechos de refinerías. Estos poseen una limitada solubilidad en agua, se absorben fuertemente al suelo y se degradan a velocidades menores que los hidrocarburos monoaromáticos (Sugiura y col., 1997).

Debido a las actividades petroleras, el derrame accidental del petróleo afecta diferentes nichos ecológicos ya sea aire, agua, suelo o sedimentos. El destino y la distribución del contaminante en cada uno de estos sistemas dependerá de las características propias de cada uno.

1.2.2 DESTINO DE LOS HIDROCARBUROS EN EL SUELO.

La distribución física de petróleo derramado en el suelo afecta su impacto y remoción en el ambiente contaminado. La propagación a lo largo de la

superficie incrementa el área contaminada, pero al mismo tiempo facilita la remoción por evaporación de hidrocarburos de bajo peso molecular. La penetración mediada por la fuerza de gravedad y capilaridad disminuye la evaporación, reduce la disponibilidad de O_2 para la biodegradación y permite la contaminación de mantos freáticos (Atlas, 1984). En la Figura 1.1 se muestran los diferentes procesos que influyen en el destino de los hidrocarburos cuando ocurre un derrame de petróleo en el suelo.

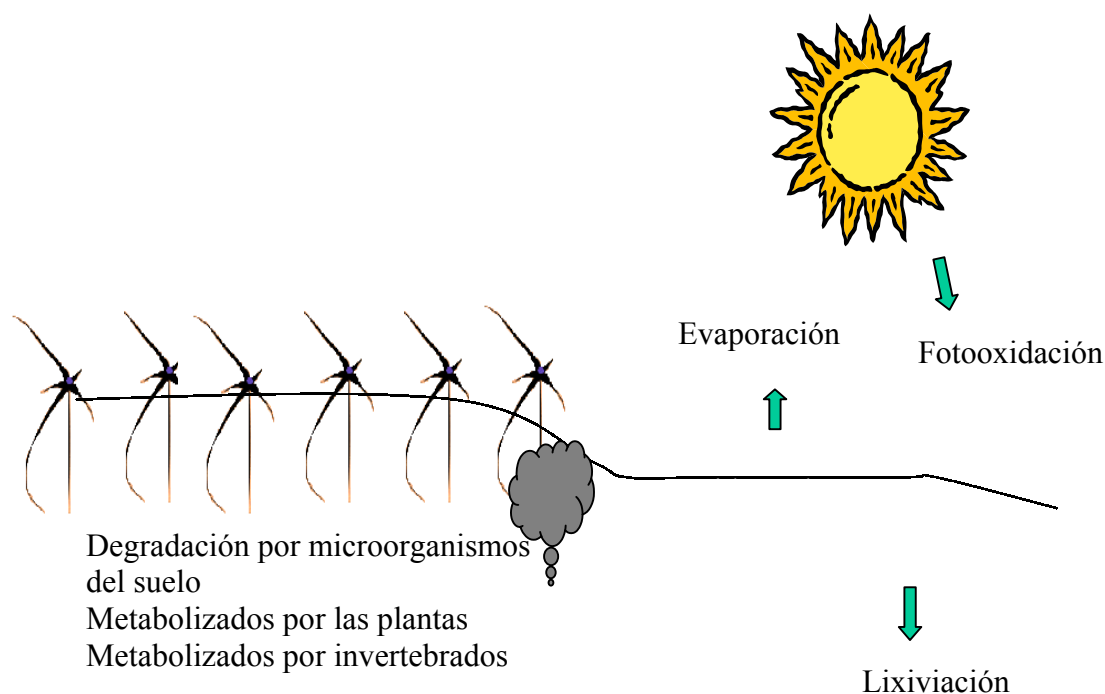


Figura 1.1 Destino de los hidrocarburos en el suelo.

En un derrame accidental, la *distribución* en el área de suelo contaminado está determinada por numerosos factores: volumen del derrame, viscosidad del petróleo a la temperatura prevaleciente en el ambiente, nivel de la tierra y porosidad del suelo, entre otros. El crudo y los productos refinados cambian su composición cuando se exponen al aire, agua o luz solar. Los hidrocarburos expuestos a la luz solar pueden ser oxidados a compuestos polares (*fotooxidación*) y convertirse en compuestos más tóxicos que los originales

(Albers, 1995). El crudo pesado y algunos combustibles, debido a su alta viscosidad, tienden a moverse horizontalmente; mientras que la gasolina y aceites de baja viscosidad penetran fácilmente en el suelo (Kostecki, 1989). Otro proceso que determina la distribución de los hidrocarburos en el suelo es la velocidad de evaporación o *volatilización* de los hidrocarburos que está en función de la temperatura, composición del petróleo, velocidad del viento, radiación solar y grosor de la capa contaminante. La infiltración dentro de los poros del suelo limita y disminuye la velocidad de evaporación de hidrocarburos volátiles (Atlas, 1984). Generalmente n-alcanos mayores de C₁₈ no exhiben volatilización significativa a temperatura ambiente, y el petróleo ligero, menos viscoso, conteniendo alto porcentaje de hidrocarburos volátiles penetra rápidamente en el suelo donde la volatilización es despreciable (Kostecki, 1989).

Otro factor que influye en el destino de los hidrocarburos en el suelo es la *lixiviación* (paso de los hidrocarburos a través de la matriz del suelo); ésta depende de la solubilidad de hidrocarburos individuales en agua, textura del suelo y cantidad e intensidad de lluvia. Menos del 5% de los compuestos del crudo o productos refinados (principalmente aromáticos de bajo peso molecular e hidrocarburos polares) son solubles en agua. Se ha demostrado que la solubilización y lixiviación de hidrocarburos en el suelo son promovidas por la actividad microbiana, ya que los metabolitos son más solubles y por lo tanto, más móviles en el suelo (Atlas, 1984).

Cuando ocurre un derrame de petróleo en el suelo inevitablemente entra en contacto con la biota del ecosistema y su biodisponibilidad está determinada principalmente por su solubilidad en agua. En general, sustancias altamente solubles se transportan en grandes cantidades a través del ciclo hidrológico y se encontrarán distribuidas a grandes distancias del lugar de introducción en el ambiente. Contrariamente, los compuestos hidrofóbicos tienden a permanecer en el sitio del derrame. Las sustancias más solubles entonces son menos adsorbidas en suelos y sedimentos y por lo tanto, serán menos

bioconcentradas; esto es, pasarán a los mantos freáticos por el proceso de lixiviación y no serán absorbidas por la biota del suelo (Menzer y col., 1994). De tal forma que la toxicidad de los contaminantes hacia los organismos dependerá de su biodisponibilidad en el ambiente. El petróleo puede afectar adversamente los organismos vivientes ya sea alterando su hábitat (modificando el pH, disminuyendo el oxígeno disuelto, la disponibilidad de alimento) o por toxicidad directa. Los hidrocarburos en el ambiente están en contacto con microorganismos y plantas, los cuales pueden metabolizarlos o no; o bien, ser ingeridos por vertebrados o invertebrados. La acumulación de la sustancia en el organismo (bioacumulación) está inversamente relacionada con la habilidad del organismo que lo metaboliza. Los HAP antropogénicos son los más tóxicos hacia mamíferos, el mecanismo de toxicidad parece ser la interferencia con las funciones de la membrana celular y sistemas enzimáticos asociados con la membrana o bien se metabolizan en compuestos más reactivos que pueden enlazarse a proteínas o al ADN; el resultado de éstos trastornos bioquímicos y daño celular son mutaciones, desarrollo de malformaciones, tumores y cáncer. Los HAP de 4, 5 y 6 anillos son potencialmente más carcinógenos que los de 2 y 3 anillos. Sin embargo, la sensibilidad de los HAP inductores de carcinógenesis varía con la especie. Hasta la fecha se cuenta con pocos datos de ecotoxicidad de este tipo de hidrocarburos (Albers, 1995).

Para carcinógenos potenciales las guías de la EPA usan el supuesto en el que se asume que cualquier nivel de exposición a un carcinógeno puede hipotéticamente causar cáncer. La identificación de los compuestos como conocidos, probables o posibles carcinógenos humanos está basado en un esquema de clasificación en donde las sustancias son sistemáticamente evaluadas en su capacidad para causar cáncer en especies de mamíferos y los resultados se extrapolan a su potencial para causar cáncer en humanos. La

clasificación de la EPA contiene seis clases basados en evidencia disponible y son las siguientes (Heat y col., 1993):

- ♣ A: conocido carcinógeno humano.
- ♣ B1: probable carcinógeno humano, evidencia limitada en humanos.
- ♣ B2: probable carcinógeno humano, evidencia suficiente en animales y datos inadecuados en humanos.
- ♣ C: posible carcinógeno humano, evidencia limitada en animales.
- ♣ D: evidencia inadecuada para clasificar.
- ♣ E: evidencia de no carcinogenicidad.

En la Tabla 1.2 se presenta algunos componentes de los HTP y su clasificación.

Tabla 1.2 Componentes de los HTP y su clasificación como posibles carcinógeno.

Componente	RfDo (mg/kg/d)		Clasificación
	Subcrónico	Crónico	
Benceno	1.0	0.1	D
Etilbenceno	1.0	0.1	D
Tolueno	2.0	0.2	D
Benzo[a]pireno	-	-	B1

RfDo: dosis de referencia oral.

Fuente: Heath y col., 1993

Actualmente no existen estándares de limpieza universales de HTP que hayan sido establecidos por agencias regulatorias ambientales para suelos contaminados con derrames de hidrocarburos recientes o intemperizados, los puntos finales de remediación pueden variar desde 10 a 10 000 ppm de HTP o de 0.1 a 500 ppm para BTEX (benceno, tolueno y xileno). Se ha sugerido basar estos criterios en los BTEX ya que son los compuestos más lixiviables de algunos productos del petróleo; sin embargo, también se deben considerar otros criterios ecológicos relevantes (Salanitro y col., 1997).

1.3 BIOENSAYOS.

Los bioensayos más utilizados en los estudios de ecotoxicidad para la valoración de la calidad del suelo son: el de germinación de semillas, crecimiento de plantas, el de lombrices y el de microorganismos (Jennings y col., 1996; Salanitro y col., 1997, Marwood y col., 1998). Existen otros bioensayos como: de elongación de la raíz, el Toxscreen, el de nemátodos y de moluscos terrestres entre otros; los cuales son poco utilizados (Kapustka y Reporter, 1993; van Straalen y van Gestel, 1993).

1.3.1 BIOENSAYO DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS, CRECIMIENTO DE PLANTAS.

Propósito

Este bioensayo ha sido diseñado para evaluar la fitotoxicidad de una sustancia en los estadios tempranos críticos del crecimiento de una planta. Se refiere a la estimación de una respuesta desfavorable a una sustancia en donde se evalúa la toxicidad aguda (Wang y Freemark, 1994).

Papel del organismo en el ecosistema.

Las plantas verdes son pioneras y productores primarios de todos los ecosistemas. El proceso fotosintético de las plantas y un grupo restringido de microorganismos produce oxígeno del cual dependen otros integrantes del ecosistema. Además de este papel, las plantas desempeñan otras funciones ecológicas importantes tales como:

- ♣ La estructura de las plantas individuales y de grupos de plantas define el hábitat para la fauna.
- ♣ El sistema de raíces protege al suelo contra la erosión.

- ♣ Las plantas están involucradas con la dinámica de nutrientes del suelo (rizósfera).
- ♣ Pueden representar una vía de exposición de contaminantes hacia animales y humanos.
- ♣ Las plantas, en general, pueden utilizarse como sujetos experimentales más fácilmente que cualquier otro componente de la biota (Kapustka y Reporter, 1993).

Puntos finales de medición o variables de respuesta

Con este bioensayo pueden medirse puntos finales como mortalidad, germinación, crecimiento o cualquier característica fisiológica relevante. Estos puntos finales abarcan desde mediciones puntuales como la mortalidad hasta mediciones continuas como el crecimiento, reportándose como cambios en la altura o longitud, y biomasa. Aunque en los protocolos oficiales de las agencias internacionales de regulación ambiental no se incorporan determinaciones del estado fisiológico de la planta, se pueden realizar mediciones de la tasa fotosintética (intercambio gaseoso) o condición fotosintética (fluorescencia), actividad enzimática, respiración total y respiración oscura (Kapustka y Reporter, 1993).

Legislación.

Durante los últimos 15 años se desarrollaron varias legislaciones ambientales internacionales y guías importantes incluyendo pruebas de fitotoxicidad como parte de la valoración y seguimiento ambiental de diversos contaminantes. Algunos de los bioensayos para evaluar la fitotoxicidad de diferentes tipos de sustancias (tales como los de algas, germinación de semillas, elongación de la raíz, y crecimiento vegetativo de plantas superiores) se sugieren por varias agencias de regulación ambiental. En los Estados Unidos de América los estudios de fitotoxicidad son más amplios en el Acta Federal de Insecticidas,

Fungicidas y Rodenticidas, mientras que en la Agencia de Protección Ambiental (EPA) se requiere un sistema de tres pruebas incluyendo pesticidas o cualquier sustancia contaminante. En Canadá, los datos requeridos sobre fitotoxicidad a plantas no-objetivo no son formalmente dirigidos por el Acta de Control de Productos Pesticidas y son manejados, en su mayoría, caso por caso. La Organización de Cooperación Económica y Desarrollo (OECD) recomienda al menos tres sistemas que incluye pruebas básicas, confirmatorias y definitivas con plantas acuáticas y terrestres. La Comunidad Económica Europea (CEE) estipuló que los países miembros incluyan al menos una prueba de inhibición de crecimiento de algas y plantas superiores como parte de los requerimientos para registro de sustancia químicas (Wang y Freemark, 1994).

Alcances y limitaciones

Las pruebas de fitotoxicidad deben incluirse como parte de una batería de pruebas utilizadas con la finalidad de desarrollar el perfil de toxicidad de una sustancia, pesticida, hidrocarburos, efluente o un sitio contaminado. Comparadas con pruebas de toxicidad a animales, tienen la ventaja de que puede usarse cualquier medio (agua, aire, lixiviados, suelo y sedimento), tienen múltiples puntos finales de medición, los especímenes de prueba pueden almacenarse por largos periodos de tiempo y requieren bajo costo de mantenimiento; las desventajas son que se requieren largos períodos de exposición a la sustancia en cuestión, los efectos pueden ser estimulatorios o inhibitorios dependiendo de la concentración, además los factores ambientales tienen efectos importantes sobre las plantas y los tóxicos, incluso la sensibilidad de las plantas varía sustancialmente con condiciones tales como el pH, temperatura, interacciones entre sustancias y cantidad de materia orgánica del suelo. Algunos estudios han demostrado que la sensibilidad de plantas y otros grupos de organismos depende del tipo de sustancia tóxica a la que se expone, del grupo taxonómico y la especie a la que pertenece (Wang y Freemark, 1994).

1.3.2 BIOENSAYO CON LOMBRICES

Propósito

Este bioensayo provee datos acerca de la toxicidad aguda de una sustancia a las lombrices ya sea por ingestión de partículas de suelo contaminado o por exposición dérmica (a través de la mucosa).

Papel del organismo en el ecosistema

La vida en el suelo es muy diversa en términos de taxonomía y nichos ecológicos, en un suelo saludable existe una gran variedad de organismos desde virus y bacterias hasta especies de anélidos (lombrices) y moluscos terrestres (caracoles y babosas). Los animales del suelo frecuentemente se clasifican de acuerdo a su tamaño:

- a. Microfauna: protozoos y nemátodos.
- b. Mesofauna: aquellos que miden entre 200 μm y 10 mm.
- c. Macrofauna: aquellos que miden más de 10 mm.

Sin embargo, dentro de dichos grupos no existe una correlación entre el tamaño y su función ecológica, más bien, los atributos fisiológicos se correlacionan mejor con la posición de los animales en el perfil del suelo. Cuando se consideran pruebas ecotoxicológicas para valorar el riesgo de suelo contaminado, las especies deben seleccionarse con base en su representatividad de la comunidad del suelo. Existen al menos tres criterios para seleccionar las especies:

- ♣ Debe haber similitudes toxicológicas entre las especies relacionadas taxonómicamente. En un estudio de cuatro especies de lombrices se observó que la correlación entre los valores de LC_{50} entre especies era alta, lo cual demuestra que son equivalentemente sensibles a la sustancia probada.

- ♣ El papel ecológico debe ser tomado en consideración (funciones tales como conversión de nutrientes y formación de humus).
- ♣ La especie debe incluir las formas por las cuales los organismos del suelo puedan estar en contacto con el contaminante. Estas son dos rutas: ingestión de las partículas del suelo contaminado y absorción dérmica. Otra ruta posible es la inhalación del contaminante presente en la fase gaseosa del suelo (van Straalen y van Gestel, 1993)

Dentro de las consideraciones anteriores, las lombrices son uno de los más grandes y más fácilmente cuantificables componentes de la biota del suelo, juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura y fertilidad del mismo (Edwards y Lofty, 1977). Las lombrices son funcionalmente importantes en los ecosistemas terrestres como alimento de aves y mamíferos y como intermediarios en los procesos del ciclo de nutrientes. El potencial de bioacumulación de un tóxico en las lombrices provee un parámetro útil para que se deriven criterios adecuados de calidad del suelo para la valoración del riesgo ecológico de áreas contaminadas (Neuhauser y col., 1985).

Puntos finales de medición o variables de respuesta

Al igual que otros bioensayos que proveen datos de toxicidad aguda, en el bioensayo con lombrices se determinan puntos finales tanto de mediciones puntuales como mortalidad y comportamiento, así como el crecimiento de los organismos reportado como la ganancia o pérdida de peso a través del tiempo de exposición (Neuhauser y col., 1985).

Legislación

En los últimos años, se han descrito varios métodos para determinar la toxicidad de las sustancias químicas a las lombrices. La Comunidad Económica Europea considera tres diferentes métodos para determinar la ecotoxicidad de las sustancias a las lombrices: la *prueba de contacto de papel filtro* en la cual

los organismos son expuestos a la sustancia sobre una pieza de papel filtro humedecido y se usa solamente para obtener información de la toxicidad por contacto a través de la mucosa; la *prueba de suelo artificial* que es más representativa del ambiente natural de las lombrices en donde se mezcla arena, turba y arcilla con la sustancia en cuestión; y finalmente la *prueba Artisol* donde el substrato es completamente artificial (mezcla de sílica con esferas de vidrio y agua). En éstos últimos los organismos no solo se exponen por contacto al tóxico sino también ingieren el material. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos de América considera únicamente la Prueba de Suelo Artificial (van Straalen y van Gestel, 1993)

En un estudio (Heimbach, 1984) se determinó la correlación entre los tres métodos descritos anteriormente encontrando una correlación de 0.91 entre las pruebas con suelo artificial y una de 0.48 entre éstas con la prueba de contacto, esta baja correlación probablemente se debe al tiempo de exposición a la sustancia y a la vía de asimilación del tóxico.

Alcances y limitaciones.

De las tres pruebas para evaluar la toxicidad a las lombrices, la prueba de suelo artificial posee mayores ventajas ya que además de proporcionar datos a través de las dos vías de exposición se cuenta con un sistema de prueba representativo de lo que sucede en el suelo. El inconveniente de esta prueba y la de Artisol es incorporar de manera homogénea la sustancia a evaluar.

1.3.3 BIOENSAYO CON MICROORGANISMOS.

Propósito

El bioensayo con microorganismos tiene como objetivo principal proporcionar datos de toxicidad hacia los integrantes del nivel trófico más bajo que constituye cualquier ecosistema debido a que muchas sustancias tóxicas ejercen su efecto interfiriendo con procesos celulares comunes (Colin, 1993).

Papel del organismo en el ecosistema

Los microorganismos son miembros principales de los ecosistemas destacándose su participación en el ciclo de los nutrientes, su capacidad de biotransformar algunas sustancias y, seleccionándose adecuadamente, pueden servir como indicadores de efectos potenciales de un tóxico de tal forma que los resultados obtenidos pueden extrapolarse a organismos superiores del ecosistema (Cronin y Shultz, 1998).

Puntos finales de medición o variables de respuesta

Los bioensayos con microorganismos evalúan la toxicidad aguda de las sustancias obteniéndose datos acerca de alguna de las siguientes variables: crecimiento de la población, utilización de energía, consumo de sustrato, respiración y bioluminiscencia (Cronin y Shultz, 1998).

Las principales pruebas realizadas son:

- ♣ *Medición de la toxicidad por determinación de la velocidad de crecimiento poblacional y viabilidad celular.* Los cambios en la velocidad de crecimiento debido a la adición de sustancias en el medio de cultivo pueden medirse por métodos turbidimétricos, espectrofotométricos, sistemas de conteo electrónico de células, técnicas de conteo en placa ó número más probable. Estos cambios en la velocidad de crecimiento permiten el cálculo de EC_{50} y otros parámetros toxicológicos.
- ♣ *Medición de la inhibición o letalidad usando propiedades químicas de la célula.*

Actividades enzimáticas. Esta puede ser valorada *in vivo* o *in vitro*; se usa para medir la biomasa y actividad microbiana en suelo, sedimento o agua. La actividad enzimática puede asociarse a un grupo conocido de microorganismos (nitrato reductasa) o a todos los organismos en el sistema (ATPasa). Entre las pruebas se

encuentran: actividad de ATPasa *in vitro*, el Sistema Microtox® y la actividad deshidrogenasa.

Prueba respirométrica. La modificación de la velocidad de consumo de oxígeno en microorganismos aerobios como indicio de su actividad metabólica es un indicador del efecto tóxico de la adición de sustancias en el medio de cultivo.

Prueba microcalorimétrica. Esta prueba mide cambios en el flujo de calor en el rango de microwatts y puede aplicarse a sistemas microbianos donde la evolución de calor durante el metabolismo o crecimiento es muy pequeña. Cualquier cambio en el flujo de calor debida a la adición de una sustancia puede ser indicio de toxicidad.

♣ *Mediciones usando propiedades de hongos filamentosos y levaduras.*

Los bioensayos que usan hongos filamentosos o levaduras son menos comunes que los que utilizan bacterias. También pueden medirse velocidades de crecimiento para estimar valores de EC₅₀. Una medida directa de la toxicidad de una sustancia, en el caso de hongos filamentosos, es estimar la germinación de esporas después de un tiempo dado de exposición.

♣ *Mediciones en microcosmos, mesocosmos o sistemas in situ.* Las mediciones en cualquiera de estos sistemas se usan para determinar el destino de tóxicos particulares en los componentes del sistema. Se han aplicado principalmente a ecosistemas acuáticos (Colin, 1993).

Legislación

En cuanto a los bioensayos con microorganismos, el más utilizado para evaluar la toxicidad en agua, suelo y sedimento además de sugerirse en diversas guías de las agencias de regulación ambiental (EPA, OECD, CEE) incluyendo la Norma Mexicana NMX-AA-112-1995-SCFI de la Secretaria de Comercio y Fomento Industrial es el sistema Microtox®.

Sistema Microtox®

El sistema Microtox® mide efectos tóxicos de manera rápida y reproducible. Se usa *Vibrio fischeri* antes *Photobacterium phosphoreum*, una bacteria marina gram negativa, que durante su actividad metabólica normal produce bioluminiscencia por lo que cualquier cambio en esta función se relaciona con el impacto del tóxico sobre el microorganismo. Los efectos han resultado comparables con otras pruebas de toxicidad aguda de organismos acuáticos para un gran número de sustancias cuando son expuestas en forma disuelta en el medio circundante (Svenson y Zhang, 1995). El uso de *Vibrio fischeri* en pruebas de toxicidad se reporta desde 1942, cuando se descubrió que la bacteria era sensible a una amplia variedad de metales pesados, compuestos clorados y narcóticos además de que su capacidad bioluminiscente servía como indicador del daño causado por la sustancia. Este bioensayo ha sido utilizado para reportar valores de EC₅₀ de cientos de sustancias orgánicas e inorgánicas integrando así una base de datos confiable. En sus inicios, el sistema Microtox® se diseñó únicamente para la evaluación de la toxicidad en el medio acuático con una buena correlación con los típicos bioensayos en peces (Colin, 1993). Recientemente, se desarrolló el sistema Microtox® fase sólida el cual elimina la necesidad de extractos del suelo o sedimento ya que utiliza como tal la matriz sólida. La mayor diferencia con el método de Brouwer es que éste utiliza la centrifugación del lixiviado mientras que en el sistema Microtox® la bacteria y la muestra se filtran después del tiempo de exposición (Rönnpapel y col., 1995). Un bioensayo con microorganismos en contacto directo con los sólidos, puede integrar la situación real en un sistema más complejo y mejor que los extractos. Respondiendo al creciente interés en el uso de este sistema, se formó un grupo auspiciado por la ASTM (American Society for Testing and Materials) con la finalidad de desarrollar la guía estándar para este procedimiento iniciando con pruebas interlaboratorios para valorar la precisión del sistema Microtox® (Ross, 1999).

Alcances y limitaciones.

Las pruebas de toxicidad deben ser métodos rápidos ya que se utilizan para caracterizar la extensión de la contaminación. Los microorganismos tienen ventajas en este tipo de ensayos debido a que requieren cortos tiempos de exposición y se ha comprobado que son indicadores sensibles de una gran variedad de contaminantes (compuestos orgánicos e inorgánicos). Los parámetros de toxicidad como velocidad de crecimiento, viabilidad celular o inhibición de propiedades bioquímicas de las células pueden medirse con mayor rapidez que en otros organismos. La mayor desventaja de estos bioensayos es que su sensibilidad varía con la especie y con el sistema de exposición que se utilice (Rönnpagel y col., 1995).

1.4 LEGISLACIÓN AMBIENTAL EN MÉXICO.

Con el propósito de conocer cuál ha sido el desarrollo de la regulación ambiental en México, a continuación se presenta un breve resumen de la historia de la legislación en materia de impacto ambiental. El inicio de las leyes y regulaciones de contaminación ambiental en México, data desde 1940 cuando se planteó la primera Regulación de Contaminación Industrial. Sin embargo, los estudios de impacto ambiental empezaron a mitad de la década de los 70s, cuando el país aún estaba implementando el marco legal requerido para éste tipo de estudios. En años subsecuentes, se aplicaron varias regulaciones concernientes a la emisión de humo y polvo, ruido y a la prevención y control de contaminación del agua así como leyes sobre la conservación de la tierra, agua, bosques y pesca. No fue hasta 1980 cuando el Acta de Trabajo Pública y sus regulaciones, establecieron por primera vez que en los trabajos públicos deben tomarse todas las medidas necesarias para evitar el daño ambiental. La Ley Federal de Protección al Ambiente en 1982 estableció la necesidad de presentar a las autoridades responsables una Declaración del Impacto

Ambiental en el cual se identifique el impacto potencial y se propongan las posibles mediciones para atenuarlo o evitarlo. Finalmente, la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección Ambiental y su Regulación en la Valoración del Impacto Ambiental se establecieron en 1988 (aún vigentes). Estas especifican los tipos de proyectos y actividades para los cuales la valoración del impacto ambiental debe presentarse por los autores del proyecto. Debe enfatizarse que aún con los avances realizados en años recientes en impacto ambiental en México, aún hay mucho por hacer. Por ejemplo, la existencia de leyes y regulaciones no necesariamente garantiza el cumplimiento o la efectividad de los procedimientos. A nivel federal, los procedimientos de impacto ambiental están siendo aplicados a proyectos de hidroeléctricas y termoeléctricas, comunicaciones, minería, exploración y explotación de petróleo, desarrollo industrial y turístico, entre otro (SEDUE, 1988; Pisanty-Levy, 1993). Actualmente, el Instituto Nacional de Ecología (INE), órgano desconcentrado de la Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP), tiene a su cargo el diseño de la política ecológica general y la aplicación de sus diversos instrumentos de regulación y gestión ambiental. No obstante, en las normas mexicanas existentes todavía no se cuenta con protocolos definidos y estandarizados para la valoración de los ecosistemas, excepto para aguas, en donde se cuenta con tres normas mexicanas para la valoración de toxicidad: NMX-AA-112-1995-SCFI, NMX-AA-087-SCFI y NOM-053-ECOL; y aunque existe una norma oficial mexicana NOM-115-ECOL-1998, que establece las especificaciones de protección ambiental que deben observarse en las actividades de perforación de pozos petroleros terrestres para exploración y producción en zonas agrícolas, ganaderas y eriales no se establecen concentraciones de HTP o cualquier hidrocarburo permisibles en el suelo.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

México presenta problemas de contaminación con hidrocarburos tanto en agua como en aire y suelo. Este problema se concentra en los estados de Veracruz, Tabasco, Campeche y Chiapas afectando diversos ecosistemas. Estos contaminantes derivados del petróleo son considerados residuos peligrosos con características CRETIB (pueden ser corrosivos, reactivos, explosivos, tóxicos, inflamables o biológico infecciosos); tales características han provocado una fuerte preocupación por establecer una legislación acerca de su manejo, disposición y criterios de remoción de los sitios ya contaminados basados en la toxicidad de los hidrocarburos. En nuestro país, desafortunadamente, no existen protocolos establecidos y estandarizados para valorar y dar seguimiento a la ecotoxicidad de los contaminantes en el suelo, particularmente los hidrocarburos; además tampoco se cuenta con puntos finales de concentración basados en estudios ecotoxicológicos, a los cuales se deba llegar después de un proceso de remediación. Por lo anterior, se considera de gran importancia valorar la calidad de un suelo contaminado y poder contar con una serie de protocolos (bioensayos) con organismos que representen diferentes niveles tróficos. Estos estudios permitirán evaluar de una forma global el riesgo de un suelo contaminado con hidrocarburos.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la ecotoxicidad de suelo contaminado con hidrocarburos mediante el uso de bioensayos representantes de diferentes niveles tróficos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Evaluar el efecto de los hidrocarburos en la germinación, crecimiento y actividad fotosintética de las especies: *Triticum aestivum* L. , *Zea mays* L. y *Cyperus laxus* Lam. (productores primarios).

3.2.2 Evaluar el efecto de los hidrocarburos en la mortalidad y crecimiento de las lombrices *Eisenia foetida* L. (descomponedores)

3.2.3 Evaluar el efecto de los hidrocarburos en la función bioluminiscente de *Vibrio fischeri* (descomponedores).

.

4. MÉTODOS Y MATERIALES

4. MÉTODOS Y MATERIALES

4.1 Preparación de las mezclas de suelo.

El suelo se muestreó en un sitio contaminado en una región pantanosa (Santa Alejandrina, Minatitlán, Veracruz) en la siguiente ubicación: N 17° 58' 12.7" y W 94° 30' 52.2" con precisión de 62m (Sistema GPS). Se recolectó suelo contaminado superficial (0-15 cm de profundidad) y suelo contaminado profundo (15-30 cm de profundidad) así como suelo limpio sin hidrocarburos del mismo lugar.

A cada suelo se le determinó la concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) mediante el método EPA 3540 y 8440 (USEPA, 1995). Las concentraciones de HTP utilizadas se seleccionaron de acuerdo a un muestreo previo en la zona.

Para los estudios de ecotoxicidad se mezcló el suelo del pantano con turba y tezontle. La composición de las mezclas se presenta en la Tabla 4.1:

Tabla 4.1. Composición de las mezclas de suelo.

HTP (%)	s. c. sup. (%)	s. c. prof. (%)	s.l. (%)	turba+tezontle^a (%)
20	68	17	0	15
15	49	36	0	15
10	28	57	0	15
5	5	80	0	15
2.5	0	64	21	15
0	0	0	85	15

s. c. sup.: suelo contaminado superficial (26.8% HTP)

s. c. prof.: suelo contaminado profundo(4.3% HTP)

s. l.. suelo limpio

^a: turba+tezontle (1:5 p/p)

Cada una de las mezclas se preparó con diferentes proporciones de suelo contaminado superficial y suelo contaminado profundo con base a la

concentración de HTP inicial de cada suelo para obtener la concentración de hidrocarburos requerida. Estas concentraciones se seleccionaron de acuerdo a un muestreo previo de la zona. Para preparar las mezclas se secó al aire cada uno de los componentes y se homogeneizó el tamaño de partícula tamizando el suelo a través de malla #4 y el tezontle entre mallas #4 y #20.

4.2 Determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP)

4.2.1 Método EPA 3540

Este es un método aplicable al aislamiento y concentración de compuestos orgánicos insolubles o poco solubles en agua. Se basa en la extracción de componentes no volátiles y volátiles de sólidos como suelo y sedimentos. El procedimiento fue el siguiente: se pesaron 10 g de suelo (peso seco) y 10 g de sulfato de sodio anhidro (Baker Analyzed, grado reactivo) en un cartucho de celulosa (Wahman 33 x 80 mm), este se colocó en el sistema Soxhlet y se adicionaron 160 mL de mezcla acetona:hexano (1:1) (Baker, grado reactivo) dejándose en reflujo de 18 a 20 horas. Posteriormente el solvente se evaporó en una charola de aluminio (a peso constante) y se determinó la concentración de HTP por diferencia de peso.

4.2.2 Método EPA 8440

Este método es usado para la cuantificación de HTP presentes en suelo o sedimento en donde la extracción se realiza con tetracloroetileno y se cuantifican por medio de la absorción que presentan en el infrarrojo en la zona de 2930 cm^{-1} . Se aplica a un amplio intervalo de concentraciones seleccionando curvas de calibración y/o longitud de celdas adecuadas para cada muestra, el procedimiento se detalla a continuación:

Preparación de la muestra

Se pesaron aproximadamente 2g de suelo y 2g de sulfato de sodio anhidro en un matraz Erlenmeyer, se adicionaron 25 mL de tetracloroetileno y se dejó

agitando (con agitador magnético) por 1 hora. Se filtró a vacío, se lavó con solvente hasta que el filtrado fuera incoloro y se aforó en un matraz volumétrico a 50 mL.

Preparación de la curva estándar.

Se pesaron aproximadamente 200 mg de HTP (extraídos de suelo de la misma zona de muestreo) y se disolvieron en un matraz aforado con 10 mL de tetracloroetileno. Se hicieron diluciones de tal forma que las concentraciones de la curva fueron: 0.1, 0.2, 0.5, 1 y 2 % de HTP.

Condiciones de operación.

Se empleó un espectroscopio FTIR (Perkin Elmer 2000) con las siguientes condiciones:

Resolución: 4 cm^{-1}

Apodización: Kaiser-Bessel

Ganancia: 1

Velocidad OPD: 0.2 (cm/s)

Corrección de fase: auto

Tipo de interferograma: bi-direccional

J-stop: 4.080 cm^{-1}

Las lecturas se realizaron para la altura del pico en 2930 cm^{-1} y para el área entre 3035 y 2810 cm^{-1} , en todos los casos.

4.3 pH.

Se pesó 1 g de suelo seco y se adicionaron 10 mL de agua destilada. Se agitó la suspensión durante 10 minutos y se leyó inmediatamente en un potenciómetro (Conductronic pH 130) (Aguilar, 1987). La prueba se realizó por triplicado.

4.4 Actividad de agua (a_w)

Se tomaron muestras de cada mezcla con humedad entre 35-45% y se colocaron en la celda de determinación del Aqualab CX-2. Se realizó la determinación por duplicado.

4.5 Humedad crítica.

Para la determinación de la humedad crítica se realizaron curvas de secado con el siguiente procedimiento: se humectó el suelo hasta exceso de agua en la muestra y se colocaron aproximadamente 5g en la termobalanza (Ohaus). Se registró el peso hasta que se mantuviera constante durante 5 minutos, los datos se graficaron para obtener una gráfica de velocidad de secado contra contenido de agua. La humedad crítica se determinó gráficamente en la intersección de las tangentes correspondientes a la región de agua libre y de agua ligada.

4.6 Textura del suelo.

La determinación de la textura del suelo se realizó mediante el método del hidrómetro con escala de Bouyoucos, en el cual la cantidad de sólidos se determina midiendo la densidad de una suspensión de suelo, por medio del hidrómetro, en intervalos adecuados (40 segundos para arena y 7 horas para arcilla) a temperatura ambiente (Sheldrick y Wang, 1993). El análisis fue realizado por el Laboratorio Central Universitario del Departamento de Suelos de la Universidad Autónoma de Chapingo.

4.7. Bioensayo de germinación de semillas, crecimiento de plantas.

De acuerdo con la *Guía de Pruebas de Efectos Ecológicos* OPPTS 850.4100 de la EPA (USEPA, 1996a), el bioensayo de germinación de semillas y crecimiento de plantas se realiza en un invernadero o en cámaras de crecimiento. Los organismos requeridos son al menos de tres especies diferentes, entre las que

se sugieren están: maíz, trigo, avena, lechuga, cebolla, frijol, jitomate; también se recomienda el uso de plantas sensibles nativas. El suelo se trata con la sustancia a probar en la concentración a la que se encuentra en el ambiente. Los parámetros medidos durante al menos 14 días incluyen: altura de la planta, peso seco de la planta y observaciones durante el desarrollo que indiquen anormalidad o fitotoxicidad.

La metodología para el bioensayo de germinación de semillas, crecimiento de plantas se estableció de acuerdo a los lineamientos de la EPA (USEPA, 1996a) y a experimentos anteriores. A continuación se detalla el procedimiento.

Especies: Se seleccionaron las siguientes: maíz (*Zea mays* L., variedad HV Jornalero-2), trigo (*Triticum aestivum* L., variedad HV Romoga S-194) y una planta nativa del sitio contaminado (*Cyperus laxus* Lam.). Las semillas de las dos primeras especies se obtuvieron en la Universidad Autónoma de Chapingo mientras que las semillas de *Cyperus laxus* Lam. se colectaron de una planta madura del sitio contaminado.

Número de plantas: Se colocaron 100 semillas de cada especie por cada concentración de hidrocarburos. Estas se dividieron en 4 grupos para realizar el análisis estadístico (ANOVA y Prueba de Tuckey, realizados en el programa estadístico SPSS®).

Condiciones: El bioensayo se realizó en una cama de germinación en un invernadero con temperatura de 25-30 °C, humedad relativa de 70-95% (mantenida con un sistema de aspersion controlada de agua) y periodos de luz natural de 11 a 12 horas/día

Duración de la prueba: 21 días para maíz y trigo; 123 días para *Cyperus laxus* Lam.

Método: El suelo control y el contaminado con hidrocarburos se colocó en el semillero de plástico (Figura 4.1) y se humectó con agua (para mantener la humedad cada semillero se colocó adentro de una charola con agua). Se sembraron las semillas de cada una de las especies a una profundidad de 1 cm aproximadamente y se agregó una solución al 0.1% de fertilizante comercial Triple 20 (nitrato 6.2%, nitrógeno amoniacal 6.2%, urea, 7.6%, anhídrido fosfórico 20% y potasio soluble 20%), la cual fue adicionada cada 7 días. Las semillas de *Cyperus laxus* Lam. se humectaron previamente en agua durante 24 horas.



Figura 4.1. Cama de germinación del invernadero.

Variables de respuesta: Porcentaje máximo de germinación, altura y peso seco de la planta.

Porcentaje máximo de germinación: se determinó considerando a la germinación como el evento en que se observa la emergencia de la plántula. Se contó diariamente el número de semillas germinadas y cuando éste no varió durante 5 días se consideró como porcentaje máximo.

Altura de la planta: se midió con un vernier el tallo desde la superficie del suelo hasta el inicio de la última hoja de la planta (12 mediciones por cada grupo, en total cuatro grupos).

Peso seco: a los 21 días de iniciado el bioensayo se pesaron las plantas húmedas y se colocaron en la estufa (WTC Binder) a 70 °C durante 48 horas; posteriormente se volvieron a pesar y se calculó el peso seco (12 mediciones por cada grupo).

Parámetros toxicológicos: Concentración efectiva media (EC₅₀) y concentración a la que no se observa el efecto (NOEC) para cada variable, calculados con el Método Probit (Menzer, 1994).

4.8 Actividad fotosintética.

La determinación de la actividad fotosintética, que es un método rápido y sensible, se realizó con la finalidad de evaluar si la influencia de hidrocarburos sobre el crecimiento de las plantas se debe a que afectan el proceso fotosintético. En este caso se decidió evaluar dicha actividad mediante la medición de la fluorescencia de la clorofila *a*. Para medir la fluorescencia se utilizó un instrumento conocido como PEA (**P**lant **E**fficiency **A**nalyzer, Hansatech Ltd.). Este mide las señales de fluorescencia de la clorofila emitidas por las plantas verdes. El aparato tiene un arreglo de 6 diodos de emisión de luz (LEDs) los cuales proveen luz roja de longitud de onda de 650 nm (fácilmente absorbida por los cloroplastos de la hoja). El PEA se muestra en la Figura 4.2.



Figura 4.2 PEA (Plant Efficiency Analyzer, Hansatech, Ltd.).

Como resultado de la medición se obtiene una curva de inducción de fluorescencia de la clorofila *a* que se muestra en la Figura 4.3, en donde se localizan las variables: F_0 , F_m , F_v , F_v/F_m , T_m y ABC que se obtienen automáticamente del instrumento.

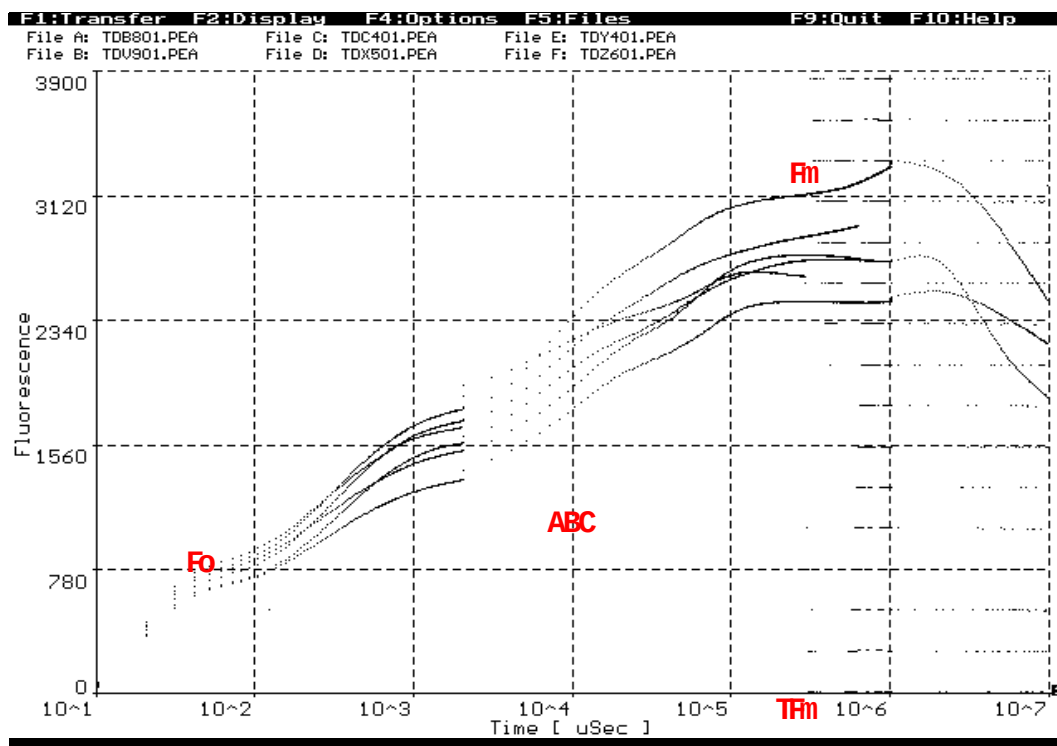


Figura 4.3 Curva típica de inducción de fluorescencia de clorofila *a*.

A continuación se define cada variable de respuesta:

F_o: el instrumento utiliza un algoritmo para determinar la mejor línea de ajuste a través de los datos iniciales (8-24 datos) registrados al arranque de la iluminación. Esta línea es extrapolada al tiempo cero para determinar F_o. El nivel de F_o representa la emisión de las moléculas de clorofila *a* excitadas en la antena del fotosistema II. El valor de F_o real se observa solamente cuando el primer aceptor de electrones del fotosistema II (Q_A) está totalmente oxidado.

F_m: es el valor máximo de fluorescencia obtenido a la misma intensidad de luz. Este solamente será alcanzado si la intensidad de luz está saturando la planta y el aceptor Q_A está totalmente reducido. Si el nivel de luz de los LEDs no es suficientemente alto la planta no estará completamente saturada en todas las circunstancias. Como la señal de fluorescencia es proporcional a la intensidad de la excitación es importante que las comparaciones sean solo hechas entre mediciones a la misma intensidad.

F_v: es el componente variable de la fluorescencia. Se obtiene de la resta del valor de F_o a F_m.

F_v/F_m: es la relación de la fluorescencia variable dividida entre la fluorescencia máxima. Se ha demostrado que esta relación es proporcional al rendimiento cuántico de la fotoquímica primaria y muestra un alto grado de correlación con el rendimiento cuántico neto de la fotosíntesis. Esta proporción es independiente del área de la hoja y por lo tanto su medición no requiere que el área de iluminación del clip esté totalmente llena con la muestra.

T_m: es el tiempo al cual se alcanza la fluorescencia máxima.

Area (ABC): el área bajo la curva de fluorescencia entre F_o y F_m y es proporcional al tamaño de la reserva de aceptores de electrones Q_A del lado reducido del fotosistema II. (PEA, 1998).

Medición de la fluorescencia de la clorofila a.

Para realizar la medición de la fluorescencia, primeramente fue necesario seleccionar los parámetros de operación del PEA y condiciones de trabajo para las especies ensayadas (PEA, 1998).

Como condiciones de trabajo se establecieron las siguientes:

- ♣ Se colocaron las plantas a una luz ambiental de 20-40 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (fotómetro Li-Cor modelo LI-190SB, sensor Quantum) durante 15 minutos antes de realizar la medición
- ♣ Para la medición se tomó la segunda hoja (contando de abajo hacia arriba).
- ♣ Se colocó el clip en el centro y a la mitad de la longitud de la hoja.

Los parámetros de operación del PEA a establecer fueron: tiempo de exposición a la luz, intensidad de luz y tiempo de adaptación a la obscuridad.

Tiempo de exposición a la luz.

Se determinó en una hoja de trigo y maíz de 14 días de germinación crecidas en turba. Se probaron 1, 3, 5 y 10 segundos. El criterio de selección fue el mayor valor de F_v/F_m obtenido.

Intensidad de luz.

Se midió en una hoja de trigo y maíz de 14 días de germinación crecidas en turba. Se probaron 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70% de intensidad. El criterio de selección fue el mayor valor de F_v/F_m obtenido.

Tiempo de adaptación a la oscuridad.

Se determinó en una hoja de trigo y maíz de 14 días de germinación crecidas en turba. Se probaron 0, 3, 5, 10 y 15 minutos. El criterio de selección fue el mayor valor de Fv/Fm obtenido.

En todas las determinaciones la metodología utilizada para la medición de la fluorescencia de la clorofila *a* fue la siguiente:

1. Las plantas se colocaron 15 minutos antes de la medición a condiciones de luz de 20-40 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$.
2. Las condiciones de operación fueron: tiempo de exposición a la luz de 10 s con una intensidad de luz del 50% y sin tiempo de adaptación a la oscuridad.
3. Se realizaron 24 mediciones por especie por concentración de hidrocarburos a diferentes tiempos de cultivo.

4.9 Bioensayo con lombrices *Eisenia foetida* L. (Annelida)

El bioensayo se realizó de acuerdo con la *Guía de Pruebas de Efectos Ecológicos* OPPTS 850.4100 de la EPA (UESPA, 1996b) y Neuhauser y col. (1985). El método se conoce como Método de Suelo Artificial y se basa en la determinación de la toxicidad por contacto (a través de la mucosa de la lombriz) o por ingesta (partículas de suelo contaminadas), utilizando suelo contaminado o suelo artificial al cual se le agrega la sustancia a estudiar.

Especie: Se seleccionó *Eisenia foetida* L., organismos adultos de 150-300 mg de peso. Estas se mantuvieron en las condiciones de la prueba 7 días antes de iniciado el bioensayo alimentándose con excremento de caballo. Se utilizaron 10 individuos por recipiente de prueba (50 lombrices por cada concentración de hidrocarburos ensayada).

Condiciones: Los recipientes de prueba (metacrilato de 12x12x10 cm) se colocaron en una cámara de temperatura y humedad controladas. La temperatura de la cámara durante el bioensayo fue de 23-28°C, la humedad relativa de 85-95% e intensidad de luz de 400 lux (día y noche). En la Figura 4.4 se muestran los recipientes de prueba utilizados.

Duración de la prueba: 14 días.

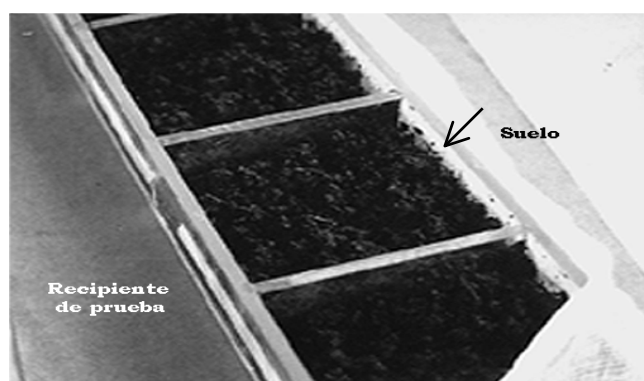


Figura 4.4. Recipientes utilizados en el bioensayo con lombrices.

Método: El suelo control y el contaminado con hidrocarburos se colocó en los recipientes de prueba (200 g peso seco por recipiente). Se humectó con agua destilada hasta alcanzar 35-40% de humedad. Las lombrices (previamente pesadas) se colocaron en la superficie y se taparon con tela de gasa para evitar que se salieran. No se alimentaron durante el bioensayo.

Variables de respuesta: Número de lombrices sobrevivientes, peso y comportamiento.

Número de lombrices sobrevivientes: se determinó considerando a una lombriz muerta cuando ésta no respondía al estímulo táctil (Neuhauser y col., 1985) Se extraían las lombrices del recipiente y se contaban tanto vivas como muertas. El conteo se realizó a los 2, 4, 7, 10 y 14 días de exposición.

Peso: las lombrices vivas se lavaron con agua y se pesaron en conjunto. Se pesaron a los 2, 4, 7, 10 y 14 días de exposición.

Comportamiento: se registró considerando un comportamiento normal como aquel en donde las lombrices se mantuvieran en la parte profunda del recipiente y respondieran rápidamente al estímulo táctil.

Parámetros toxicológicos: EC₅₀ para peso y Concentración letal 50 (LC₅₀) para mortalidad, NOEC para ambas variables; se determinaron por el Método Probit (Menzer y col., 1994).

4.10 Bioensayo con microorganismos (sistema Microtox®)

Se realizó de acuerdo a lo establecido en la Norma Mexicana NMX-AA-112-1995-SCFI llamada “Análisis de agua y sedimentos - evaluación de toxicidad aguda con *Photobacterium phosphoreum* - Método de prueba” y el método IMP MPE-LAA-436. Este método se basa en la evaluación del efecto que sustancias puras, combinadas, cuerpos receptores, lixiviados y sedimentos puedan tener sobre la intensidad de luz emitida por *Vibrio fischeri* (antes *Photobacterium phosphoreum*) en condiciones controladas de exposición. La prueba fue realizada por el Departamento de Ecología del Instituto Mexicano del Petróleo en el Laboratorio de Análisis Ambiental. Este método utiliza el sistema conocido como MICROTOX® el cual es una prueba fotométrica de evaluación de toxicidad basado en la medición de la luz que naturalmente emite la bacteria *Vibrio fischeri*.

Especie: Se utilizó una suspensión bacteriana de *Vibrio fischeri* la cual proviene de un cultivo liofilizado conservado a -18 °C.

Condiciones: Las muestras se colocan en las celdillas del luminómetro Microbics modelo M500 con el cual se lee a una longitud de onda de 490 nm además consta con temperatura controlada (15 ± 0.5 °C) tanto en las celdas como en el puerto de lectura.

Duración: 15 minutos de exposición.

Método: La muestra de suelo se homogenizó con una varilla de vidrio y se pesaron 0.3 g en un tubo de vidrio de borosilicato desechable. Se agregaron 3000 μ L de medio de dilución para fase sólida (solución de agua bidestilada de cloruro de sodio al 3.5%, Azur Enviromental). A los tubos control sólo se les adicionó 1500 μ L del medio de dilución para fase sólida. En la prueba se realizaron 8 diluciones seriadas (1:2) de la mezcla de suelo: del tubo 1 se resuspendió la muestra y se tomaron 1500 μ L para el tubo 2 y así sucesivamente hasta la última dilución obteniéndose un volumen final por celdilla de 1500 μ L. Los tubos se colocaron en un sonicador por 2 minutos y posteriormente en un baño de temperatura controlada a 15 °C durante 10 minutos.

Por otra parte, se reconstituyó el cultivo de bacterias adicionando 1 mL de la solución de reconstitución al liofilizado y colocándolo en la celdilla de reconstitución del M500 (5.5 °C). El tiempo de viabilidad de la suspensión bacteriana es de aproximadamente 2 horas.

Se puso en marcha un cronómetro de cuenta regresiva ajustado a 20 minutos, e inmediatamente se agregaron 20 μ L de la suspensión bacteriana a cada uno de los tubos correspondiente a una densidad bacteriana de 1×10^8 células/mL, en la misma dirección en que se hicieron las diluciones, y se agitó cuidadosamente. Tres minutos antes de que terminara la cuenta regresiva se insertaron las columnas filtradoras a cada tubo, cuidando que no tocaran el sobrenadante. Transcurridos los 20 minutos se filtraron las muestras y se

transfirieron 500 μ L del filtrado a la celdilla correspondiente en el luminómetro, dejándose 10 minutos más de incubación en el luminómetro. Transcurrido el tiempo y al sonar la alarma del programa, se calibró el luminómetro con el blanco y se realizaron las lecturas de las demás muestras.

Variables de respuesta: el programa Microbics® muestra la gráfica de intensidad de bioluminiscencia (corregida) a las diferentes concentraciones.

Parámetros toxicológicos: el programa Microbics calcula automáticamente el valor de EC_{50} por el Método Probit.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Con la finalidad de caracterizar las mezclas de suelo se realizaron análisis de hidrocarburos y de variables como pH, actividad de agua y humedad crítica para asegurar que éstas no incidieran sobre los resultados de los bioensayos y así la respuesta se debiera únicamente a la presencia de hidrocarburos.

5.1 Determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP).

Los métodos más usados para la cuantificación de HTP son: cromatografía de gases, por inmunoensayos, espectroscopía infrarroja y gravimetría, los dos últimos métodos tienen la ventaja de ser sencillos, rápidos y baratos; sin embargo, no proporcionan información acerca del origen de los hidrocarburos y la presencia o ausencia de moléculas tóxicas. La definición de HTP depende del método analítico usado ya que los HTP son la concentración total de hidrocarburos extraídos de una muestra y medidos por un método particular (Weisman, 1998). En la Tabla 5.1 se presentan los resultados correspondientes a la determinación de HTP por el método EPA 3540 (método gravimétrico) de cada una de las mezclas de suelo preparadas.

Tabla 5.1 Determinación de HTP de las mezclas de suelo por el método EPA 3540.

Mezcla (% HTP)	HTP real (%)	DE*	CV** (%)
2.5	2.6	0.31	11.92
5.0	4.6	0.58	12.6
10.0	10.49	0.82	7.81
15.0	16.02	2.42	15.1
20.0	20.62	1.45	7.03

* Desviación estándar.

** Coeficiente de Variación.

La determinación inicial de HTP muestra que las mezclas contienen una concentración de hidrocarburos similar a la teórica, por lo que en los

resultados posteriores las mezclas de suelo se denominarán con la concentración teórica. Los altos valores del coeficiente de variación no sorprenden ya que además de ser un método gravimétrico reflejan la heterogeneidad de las mezclas de suelo.

5.2 Caracterización de las mezclas de suelo.

De acuerdo con Kellog (1941) y la USDA Soil Survey Staff (1990), citados por Tan (1994), los suelos son considerados cuerpos naturales que cubren parte de la superficie de la Tierra, que soportan el crecimiento de plantas y que tienen propiedades debidas a los efectos integrados de clima y organismos que actúan sobre ellos.

El suelo consiste de cuatro componentes mayoritarios: materiales minerales, materia orgánica, agua y aire. Un suelo que está en condiciones adecuadas para el crecimiento de una planta tiene la siguiente composición:

- ❖ Materia inorgánica: 45%
- ❖ Materia orgánica: 5%
- ❖ Agua: 25%
- ❖ Aire: 25%

El agua constituye la mayor parte de la fase líquida del suelo; contiene sales en solución, sólidos orgánicos en suspensión y es afectada por los coloides del suelo. La cantidad de agua o solución que un suelo puede retener depende de las propiedades individuales de éste, especialmente del área superficial de sus partículas, de su volumen y distribución del tamaño de poros. El agua del suelo generalmente se encuentra alojada en los poros cuyo diámetro es menor a 10 micras, puesto que los poros de mayor tamaño drenan fácilmente el agua y permanecen ocupados por aire, excepto cuando las condiciones del suelo impiden el libre drenaje (Narro, 1994).

El aprovechamiento del agua del suelo por las plantas depende de la capacidad de éste para almacenarla, asimismo, de un alto potencial hídrico; del crecimiento y actividad de las raíces y su capacidad para extenderse en un gran volumen de suelo; de aireación y temperatura apropiadas y del adecuado suministro de agua (Tan, 1994; Narro, 1994).

En la Tabla 5.2 se presentan los resultados correspondientes al análisis de actividad de agua, humedad crítica y pH de las mezclas.

Tabla 5.2. Valores de actividad de agua (a_w), humedad crítica y pH.

HTP (%)	a_w^*	Humedad crítica (%)	pH
0	1.00	16	4.36
2.5	0.99	14.5	4.41
5.0	0.99	16	4.41
10.0	0.99	14	4.49
15.0	0.99	13	4.57
20.0	1.00	11	4.53

* a_w determinada a 35-45% de humedad.

Considerando que la actividad de agua está relacionada con el agua disponible para un crecimiento adecuado y que los valores más apropiados se encuentran por encima de 0.9, se puede observar que las mezclas de suelo no presentan problemas de disponibilidad de agua y que ésta no se ve afectada por la concentración de hidrocarburos presentes en el suelo. Para confirmar que la humedad del suelo era adecuada para el crecimiento de las plantas, se determinó la humedad crítica; para esto se realizaron curvas de secado de cada mezcla las cuales siguieron el comportamiento típico del secado: una primera fase donde la temperatura del suelo aumenta gradualmente hasta que empieza a perder agua, la segunda fase donde la muestra pierde agua a una velocidad de secado constante que corresponde al agua libre y la última etapa de

velocidad de secado decreciente en la que el agua perdida corresponde al agua ligada a la fase sólida.

En cada gráfica de las diferentes concentraciones de hidrocarburos se trazó la tangente correspondiente a las dos etapas finales, y el punto de intersección es el valor de la humedad crítica, es decir, el punto en donde el agua presente en el suelo corresponde a agua ligada. En la Figura 5.1 se muestra la gráfica obtenida de la mezcla con 0% de HTP.

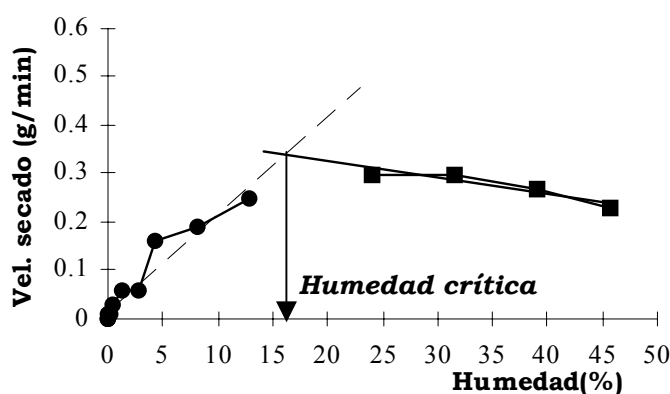


Figura 5.1. Determinación gráfica de la humedad crítica. Los puntos circulares (●) corresponden al agua ligada y los cuadrados (■) al agua libre.

Los valores obtenidos (Tabla 5.2) muestran que la humedad crítica disminuye ligeramente al incrementarse la concentración de hidrocarburos (a mayor cantidad de hidrocarburos en suelo el agua ligada es menor) lo cual puede explicarse si se considera que en la mezcla con 20% de HTP, la cantidad de partículas de suelo que están cubiertas por una capa de hidrocarburos (capa hidrofóbica debido a las propiedades de los HTP) es mayor que en la mezcla con 2.5% de HTP. Dentro de la clasificación de agua del suelo, el agua no disponible o ligada es la que está unida firmemente a las partículas del suelo por fuerzas de absorción y no puede ser extraída por la planta (Bolen, 1996).

Durante su crecimiento natural, la planta está sometida a pérdida de agua por transpiración, cuya magnitud depende a su vez del grado de saturación hídrica del aire circundante y del contenido de agua del suelo en que penetran las

raíces (en plantas superiores el suplemento de agua y nutrientes se lleva a cabo mediante éstas) (Medina, 1977). Es importante mencionar que no se alcanzaron los valores de humedad crítica de cada una de las mezclas ya que en el bioensayo de germinación de semillas, crecimiento de plantas se colocó un recipiente con agua debajo de cada semillero lo que permitió mantener una humedad arriba del 35%.

Relacionado con el agua, se encuentra el pH o reacción del suelo, el cual es un parámetro que está estrechamente controlado por las propiedades electroquímicas de los coloides; éste término se usa para indicar la acidez o alcalinidad del suelo (Tan, 1994). El pH de las mezclas no varía significativamente al incrementar la concentración de hidrocarburos y se puede definir como suelo ácido, lo cual coincide con lo reportado por Sánchez (1976) ya que el pH del suelo es más alcalino en zonas secas y más ácido en zonas de alta precipitación pluvial como es el caso del pantano.

Los cationes disueltos son más asequibles a las raíces de las plantas y los aniones son más fácilmente lavables del suelo ya que no son retenidos por los coloides. En suelos ácidos, la capacidad de intercambio catiónico depende de los iones H_3O^+ y Al^{3+} , o sea, que el grado de saturación de los cationes nutrientes es bajo. A pH bajo, la fracción mayor de los cationes metálicos se encuentra libre en la disolución del suelo y es más fácilmente lixiviable (Medina, 1977).

El suelo contaminado se analizó en la Universidad Autónoma de Chapingo para determinar la clasificación textural y la actividad de intercambio de aluminio; en cuanto a la composición el resultado fue: 81% de arena, 11.12% de limo y 7.2% de arcilla clasificado así como un suelo franco-arenoso y no presenta actividad de intercambio de aluminio. Este suelo se considera como intemperizado (más de 20 años de contaminación) y su composición de hidrocarburos es de: 30% de alifáticos, 24% de aromáticos, 13% de polares y 33% de asfaltenos.

Con los resultados anteriores se puede decir que todas las mezclas a utilizar en los bioensayos tienen las mismas características y por lo tanto se consideró la concentración de hidrocarburos como la única variable independiente en el estudio.

5.3 Bioensayo de germinación de semillas, crecimiento de plantas.

Este experimento se realizó con la finalidad de determinar el efecto fitotóxico de las concentraciones de HTP sobre diferentes especies de plantas. En este caso se utilizaron trigo (*Triticum aestivum* L.), maíz (*Zea mays* L.) y una planta nativa del pantano *Cyperus laxus* Lam. Las dos primeras se sugieren en las Guías de Efectos Ecotoxicológicos de la EPA (1996) y han sido usadas por varios autores para evaluar la toxicidad de suelo contaminado con hidrocarburos (Udo y Fayemi, 1977; Bossert y Bartha, 1993, Salanitro y col., 1997). La planta nativa se seleccionó por tres razones: i) su predominancia en la zona, ii) se encuentra en sitios con alta concentración de HTP (aproximadamente 260,000 ppm) y iii) que puede ser utilizada como bioindicador del ecosistema. Las especies propias de los ecosistemas dañados pueden ser utilizadas como bioindicadores del mismo, es decir, servir como especies centinela de la salud del ecosistema (Siciliano y col., 1997).

A continuación se presentan los resultados de las tres variables evaluadas (porcentaje máximo de germinación, altura y peso seco de la planta) para cada una de las especies, posteriormente con la finalidad de comparar, se muestran tablas que resumen los datos obtenidos y se explica de manera general el comportamiento observado.

A. Trigo (*Triticum aestivum* L.)

En la Figura 5.2 se presentan los resultados de porcentaje máximo de germinación, altura y peso seco de trigo.

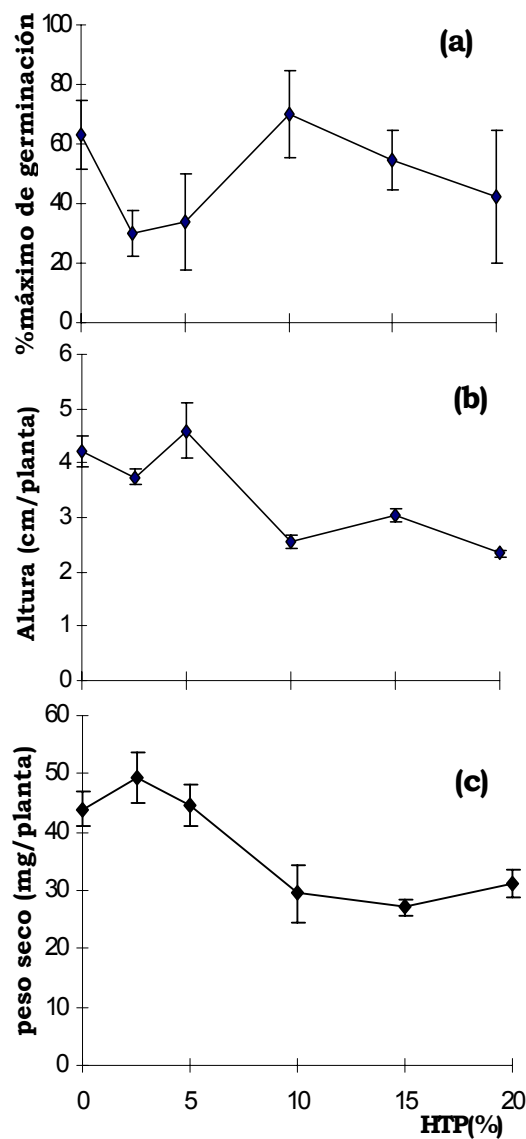


Figura 5.2. Porcentaje máximo de germinación (a), altura del tallo (b) y peso seco (c) de trigo a los 21 días de iniciado el bioensayo.

Para el porcentaje máximo de germinación (Figura 5.2a) se observa que no existen diferencias significativas (Tabla 5.3) al aumentar la concentración de hidrocarburos. En la altura del tallo (Figura 5.2b) se presenta disminución de la longitud al incrementar la concentración del contaminante, siendo éste

fenómeno más notorio a partir del 10% de HTP donde se forman dos grupos que son estadísticamente diferentes: de 0 a 5% de HTP y de 10 a 20% de HTP. En cuanto a la biomasa (Figura 5.2c) se observa un comportamiento similar al de la altura.

B. Maíz (*Zea mays* L.)

En la siguiente Figura se muestran los valores de porcentaje máximo de germinación, altura y peso seco de maíz.

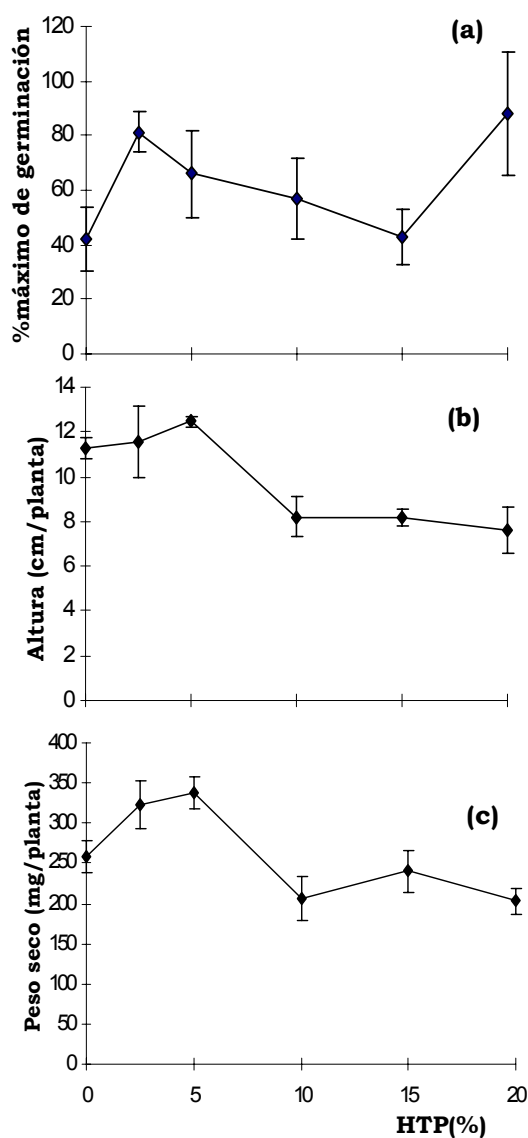


Figura 5.3. Porcentaje máximo de germinación (a), altura del tallo (b) y peso seco (c) de maíz a los 21 días de iniciado el bioensayo.

Para el caso del maíz el comportamiento de las variables de respuesta es el siguiente: no se presenta diferencia significativa en el porcentaje máximo de germinación con respecto a la concentración de hidrocarburos excepto para el control y el nivel del 15% (Figura 5.3a); en cuanto a la longitud del tallo (Figura 5.3b) y el peso seco (Figura 5.3c) de las plantas, los valores disminuyen al aumentar el nivel de contaminante y en ambos casos éste fenómeno se presenta a partir de la concentración del 10% donde se observa la diferencia significativa con respecto al control.

Es importante mencionar que para trigo y maíz no se puede calcular el parámetro EC_{50} (concentración efectiva media) ya que en ninguna variable se observa la disminución del 50% comparado con los valores obtenidos en el control, excepto para el porcentaje máximo de germinación de trigo en donde la EC_{50} es de 2.3% de HTP. Sin embargo, para ambas especies el efecto en el crecimiento debido a la concentración de hidrocarburos se presenta a partir de 10%, teniendo un valor de NOEC de 5% de HTP.

En experimentos realizados para determinar el efecto del petróleo en la germinación y crecimiento de maíz (Udo y Fayemi, 1975), se usó fertilizante y suelo contaminado con petróleo adicionándolo a diferentes concentraciones; como resultados se reporta que la germinación disminuye al aumentar el porcentaje de contaminante en el suelo al igual que el peso seco. Además se observó que las semillas se encontraban hinchadas y brillantes, indicando la absorción de petróleo así como clorosis en las hojas, tendiendo a la deshidratación (indicando deficiencia de agua). En otro experimento cuando se sembró maíz nuevamente en el mismo suelo aumentó ligeramente el rendimiento.

En un estudio acerca del efecto de residuos de la transformación del petróleo (Bossert y Bartha, 1987) después de un proceso de *landfarming* (sistema en donde el suelo contaminado se adiciona con fertilizantes y se permite la degradación aerobia) sobre el crecimiento de plantas, se utilizó maíz y frijol de

soya (*Glycine max* L). Se evaluó la germinación, altura y peso seco de las plantas, observando que los residuos presentes en el suelo tratado ejercieron un efecto severamente inhibitorio en el crecimiento del maíz y previnieron la emergencia del frijol de soya. De estos resultados la principal conclusión es que la sensibilidad a los residuos después del tratamiento de biorremediación varía con la planta.

En estudios recientes de Salanito y col. (1997) se determinó que para maíz, trigo y avena no hubo diferencia en el porcentaje de germinación entre el suelo con hidrocarburos (contaminado para el experimento) antes y después de un tratamiento de biorremediación pero el crecimiento disminuyó significativamente en las tres especies después de la biorremediación.

Los resultados encontrados en este estudio para maíz y trigo coinciden con los trabajos anteriormente mencionados en cuanto a la disminución del crecimiento, sin embargo, en el presente bioensayo la germinación no fue afectada por los hidrocarburos. Es importante considerar que en los estudios de otros autores se contaminó el suelo en el momento de realizar el experimento lo cual indica la presencia de mayor cantidad de sustancias volátiles y solubles en agua a diferencia del suelo utilizado en el bioensayo de este trabajo, considerado como suelo intemperizado con más de 20 años de contaminación en donde los compuestos presentes son de baja solubilidad en agua y poca disponibilidad hacia las plantas.

Se concluye que la presencia de hidrocarburos en un suelo intemperizado no afecta la germinación de maíz y trigo pero tiene un efecto fitotóxico en su crecimiento a partir de una concentración de 10% de HTP y un valor de NOEC de 5% de HTP.

C. *Cyperus laxus* Lam.

En la Figura 5.4 se presentan los resultados de porcentaje máximo de germinación, altura y peso seco correspondientes a la planta nativa.

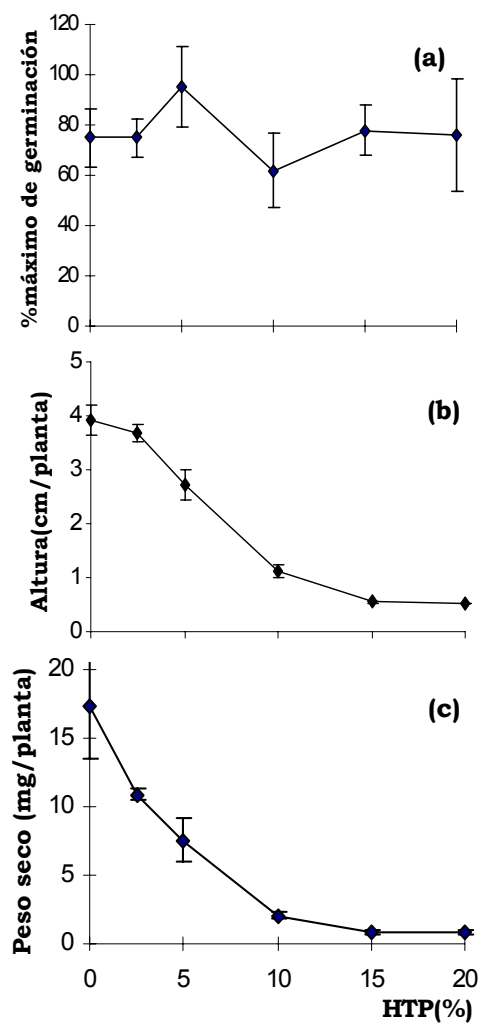


Figura 5.4. Porcentaje máximo de germinación (a), altura del tallo (b) y peso seco (c) de *Cyperus laxus* Lam.

Con respecto al porcentaje máximo de germinación (Figura 5.4a) éste se mantiene alrededor del 75% para todas las concentraciones de hidrocarburos, fenómeno semejante al observado en trigo y maíz, es decir, tampoco en este caso hay efecto sobre la germinación.

En el caso de la longitud del tallo (Figura 5.4b) ésta disminuye a partir del 5% de HTP mientras que en la biomasa (Figura 5.4c) es a partir del 2.5%. Los valores de EC_{50} para la altura y el peso seco son 7.42 y 3.63% de HTP respectivamente y el de NOEC para la altura es de 2.5% (Método Probit). Es importante mencionar que para la planta nativa se observó la floración, encontrando que la presencia de flores disminuía al incrementar la concentración de contaminante, lo que indica que las plantas crecidas en altas concentraciones de hidrocarburos no alcanzan su madurez sexual o que se altera su ciclo de vida durante el tiempo de estudio (4 meses).

En estudios de Peterson y col. (1998) realizados recientemente con dos especies de pastos usando trinitrotolueno como contaminante, se observó decremento en el crecimiento de las plantas sin afectar en la germinación de las semillas. El efecto en el crecimiento se atribuyó a que el contaminante dañó el tejido meristemático de la raíz impidiendo de esta forma el crecimiento normal de los pastos. En otro trabajo (Siciliano y col., 1997) probaron diferentes especies de pastos de pradera con el objetivo de seleccionar una especie como bioindicador; como compuesto modelo se usó ácido 2-clorobenzoico, un compuesto polar hidrofílico presente en las rutas de degradación de aromáticos halogenados, además de diferentes tipos de suelo; encontrando que la germinación disminuía, de manera general, al incrementar la concentración de tóxico y también influía el tipo de suelo. En un estudio (Walsh, 1991) se utilizaron plantas de pantano (*Echinocloa crusgalli* y *Spartina alterniflora*) para evaluar el efecto de herbicidas observaron que éstos no afectaron la velocidad de germinación pero sí inhibieron la velocidad de crecimiento.

Algunos de los resultados anteriores usando especies nativas de los sitios contaminados coinciden con los obtenidos para *Cyperus laxus* Lam.; es decir, no hay efecto sobre la germinación pero sí sobre el crecimiento, resaltándose

nuevamente la importancia de las características fisicoquímicas del tóxico evaluado así como del suelo.

Con la finalidad de realizar una comparación entre las tres especies ensayadas a continuación se presentan los resultados corregidos o normalizados (valor observado/valor del control) para cada una de las variables de respuesta, para cada grupo de experimentos: a) germinación y b) crecimiento (altura y peso seco).

a. Germinación.

El proceso de germinación se define como por el comienzo de la elongación de la radícula (Côme y Corbineau, 1989).

Los factores que intervienen en la germinación son:

- a. Factores externos: agua, oxígeno, temperatura, luz y sustancias químicas.
- b. Factores internos: inhibidores, ritmos endógenos de germinación y maduración de las unidades dispersantes (Medina, 1977).

En la Tabla 5.3 se muestran los valores corregidos del porcentaje de germinación para trigo, maíz y planta nativa.

Tabla 5.3. Valores normalizados del porcentaje de germinación de trigo, maíz y *Cyperus laxus* Lam.

Germinación relativa al control respectivo						
Especie	HTP(%)					
	0	2.5	5	10	15	20
Trigo	1.00	0.48 ^a	0.54 ^a	1.11	0.87	0.67
Maíz	1.00	1.93 ^a	1.57	1.36	1.02	2.10 ^a
<i>Cyperus laxus</i> Lam.	1.00	1.00	1.27	0.83	1.04	1.01

a. valores que son significativamente diferentes ($p < 0.5$) con respecto al 0% de HTP.

Se puede apreciar que la especie con mayor eficiencia para germinar fue *Cyperus laxus* Lam. (79%), seguida por maíz y trigo (63% y 49% respectivamente). En las tres especies no se observa efecto de los hidrocarburos sobre la germinación lo cual puede deberse a dos factores:

1. Muchas sustancias no pueden penetrar en la semilla debido a la cubierta protectora; Plice (citado por Udo y Fayemi, 1975) encontró que las fracciones volátiles tienen una alta capacidad de humectación y alto poder penetrante, de tal forma que en contacto con la semilla, el petróleo penetra en la cubierta matando rápidamente al embrión; sin embargo, como el suelo utilizado es intemperizado, en donde las fracciones volátiles no se encuentran presentes, éste factor no afecta la germinación.
2. El embrión obtiene sus requerimientos nutricionales internamente a partir de los materiales de reserva de la semilla; siendo generalmente las condiciones para la germinación las mencionadas anteriormente. En cuanto al agua disponible en el suelo, analizada en la parte correspondiente a la caracterización de las mezclas, se concluye que esta fue adecuada para la germinación. En este caso se considera que la germinación no es una variable de respuesta sensible a la presencia de hidrocarburos en este tipo de suelo.

b. Crecimiento.

El crecimiento es el incremento a través del tiempo de ciertos parámetros característicos como tamaño o peso. La distribución de recursos (nutrientes, agua) se estudia mediante el peso seco o el contenido de energía y su distribución en raíces, tallos, hojas, flores, frutos y semillas (Medina, 1977). Se ha visto que el crecimiento de plantas en suelos contaminados puede ser inhibido o mejorado dependiendo de los cambios en cuanto a toxicidad que hayan tenido lugar en el suelo después de un proceso de remediación. (Udo y Fayemi, 1975).

En la Tabla 5.4 se presentan los valores relativos para la altura del tallo con respecto a los controles de cada especie.

Tabla 5.4 Valores normalizados de la altura del tallo de trigo, maíz y planta nativa.

Especie	Altura relativa al control respectivo HTP(%)					
	0	2.5	5	10	15	20
Trigo	1.00	0.89	1.09	0.60 ^a	0.73 ^a	0.56 ^a
Maíz	1.00	1.02	1.11	0.73 ^a	0.72 ^a	0.68 ^a
<i>Cyperus laxus</i> Lam.	1.00	0.94	0.69 ^a	0.29 ^a	0.14 ^a	0.13 ^a

^a. valores que son significativamente diferentes ($p < 0.5$) al 0% de HTP.

En el caso de la longitud del tallo, la disminución con respecto al control se observa al 10% de HTP para maíz y trigo mientras que para *Cyperus laxus* Lam. se presenta al 5%. Este decremento en la mayor concentración de contaminante es del orden de 44 y 32% con respecto al control para las dos primeras especies y del 87% para *Cyperus laxus* Lam., lo cual indica que la planta nativa es más sensible a los hidrocarburos.

En la Tabla 5.5 se presentan los resultados correspondientes al peso seco de las plantas.

Tabla 5.5. Valores normalizados de peso seco de trigo, maíz y planta nativa.

Especie	Peso seco relativo al control respectivo HTP(%)					
	0	2.5	5	10	15	20
Trigo	1.00	1.12	1.02	0.67 ^a	0.62 ^a	0.71 ^a
Maíz	1.00	1.25	1.31	0.80 ^a	0.93 ^a	0.79 ^a
<i>Cyperus laxus</i> Lam.	1.00	0.63 ^a	0.44 ^a	0.12 ^a	0.05 ^a	0.05 ^a

^a. valores que son significativamente diferentes ($p < 0.5$) al 0% de HTP.

Con respecto a la biomasa se presenta un comportamiento similar al de la altura en cuanto al trigo y maíz. Para la planta nativa el efecto debido a los hidrocarburos es notorio a partir de la más baja concentración probada (2.5% de HTP) y la disminución en el peso seco es del 95% en la más alta concentración de HTP con respecto al control.

La disminución observada en el crecimiento de las tres especies se debe, en general, a la presencia de hidrocarburos, esto es, tienen un efecto fitotóxico siendo la especie nativa la más sensible al contaminante. Este resultado contrasta con lo observado en el pantano posiblemente debido a que en el invernadero no se permitió el desarrollo de una rizósfera adaptada a los hidrocarburos que permite la tolerancia de la planta a esas condiciones. Es importante notar que mediante este estudio no se puede precisar en particular a qué se debe el efecto observado (efecto directo o indirecto de los hidrocarburos). Se sabe que el crecimiento es la consecuencia del funcionamiento del tejido vegetal formado por células indiferenciadas en las que se producen divisiones rápidas y numerosas, es decir, el meristemo que está situado en las regiones de crecimiento de la planta, a su vez, la posición de éstos y su actividad específica determina la morfología de la planta y la velocidad de crecimiento. La velocidad a la cual se producen nuevas células en el tejido depende del número de células meristemáticas y la extensión del ciclo celular. El ciclo celular puede extenderse por el estrés ambiental, incrementándose de esta forma la proporción de células meristemáticas en estados no mitóticos. Así el tamaño y forma final de la planta está determinado por la actividad diferencial de los meristemas, los cuales controlan dónde, cuánto y qué clase de tejido se desarrolla (Körner, 1997). También es importante considerar la posible interacción de los hidrocarburos con micronutrientes esenciales para cada especie provocando baja disponibilidad de éstos hacia las plantas.

Aunados a los factores ambientales, los factores que determinan el crecimiento son: capacidad fotosintética de la hoja, área de la hoja por masa total de la planta, contenido de carbono y nutrientes de la hoja, pérdida respiratoria, posición de meristemas activos, respiración de las raíces, translocación de carbono a simbiontes y exudados y duración de la hoja. (Körner, 1997). Se ha encontrado que especies de plantas de ambientes contrastantes pueden diferir considerablemente en su potencial de crecimiento. Cuando crecen bajo

condiciones similares, cercano a condiciones óptimas, las especies que crecen en hábitats ricos en nutrientes crecen más rápido que aquellas en sitios pobres en nutrientes (Grime y Hunt, 1975; Poorter y Remkes, 1990). Estas diferencias en velocidad de crecimiento están asociadas con diferencias en biomasa, translocación, composición química y área de formación de la hoja (Poorter, 1989).

Con la finalidad de explicar si la disminución en el crecimiento de las plantas se debió a que los hidrocarburos interfirieron con el proceso de fotosíntesis, se ensayó la hipótesis de que la actividad fotosintética de las tres especies, durante los experimentos, se alteraba debido a la presencia de hidrocarburos.

5.3.1 Actividad fotosintética.

Un factor intrínseco indicador de estrés en una planta es la fluorescencia de la clorofila *a* (Osmond y col., 1987). Existen varios métodos confiables para medir el impacto sobre la fotosíntesis que incluyen: clorosis, fijación de carbono y transporte de electrones (Hall, 1994). En particular, las pruebas del transporte de electrones del fotosistema II (FSII) pueden ser mediciones extremadamente sensibles del daño de casi cualquier punto del aparato fotosintético (Hall, 1994; Krause y Weis, 1991). Esto se debe a que el FSII es el primer paso en la fotosíntesis y la inhibición de muchas actividades metabólicas en los cloroplastos corriente abajo del FSII conducirán a bloquear el transporte de electrones del FSII (Krause y Weis, 1991; Huang y col., 1997). Cuando el transporte de electrones es bloqueado, el FSII estará fotoinhibido debido a la presión de excitación sobre el FSII. Esto es, cuando el FSII no utiliza la energía que absorbe, esta energía se disipa dentro del fotosistema produciendo un daño oxidativo (Huang y col., 1997). Recientemente, la introducción de nuevos equipos portátiles (como el PEA) ha encaminado a la determinación de la fluorescencia de la clorofila *a* como una herramienta rápida y sensible para evaluar el impacto de tóxicos en las plantas (Strasser y col., 1995). Además

entendiendo el sitio de acción de los contaminantes en los sistemas biológicos permitirá el establecimiento de bioindicadores confiables y validados.

Para establecer entonces si la disminución en el crecimiento (altura y peso seco) observada en el bioensayo de germinación de semillas, crecimiento de plantas se debe a que los hidrocarburos afectan la actividad fotosintética se evaluó esta a través de la medición de la fluorescencia de la clorofila a .

A continuación se presentan los resultados de las variables evaluadas con el PEA para cada una de las especies a diferentes edades de las plantas. Siguiendo el esquema del bioensayo con plantas, primeramente se muestran los resultados para trigo y maíz, posteriormente los de la planta nativa y al final se pretende explicar el comportamiento general observado.

A. Trigo (*Triticum aestivum* L.)

En la Figura 5.5 se presentan los resultados de las variables de respuesta obtenidas con el PEA para el trigo a 14 y 21 días de iniciado el bioensayo.

La fluorescencia inicial (F_o) se observa que no varía al aumentar la concentración de hidrocarburos a los 14 y 21 días de cultivo. En cuanto a la fluorescencia máxima (F_m) tiene un comportamiento similar exceptuando la concentración del 15%.

El tiempo en que se alcanza la fluorescencia máxima permanece sin variación al aumentar la concentración de hidrocarburos a cualquier tiempo de medición; el área bajo la curva permanece prácticamente constante durante las dos mediciones.

La variable F_v/F_m , permanece sin variación significativa con respecto al nivel de hidrocarburos a los 14 días; a los 21 días se observa una ligera disminución a concentraciones mayores de 10% de HTP siendo significativamente diferente en la concentración más alta (0.79 a 0.76).

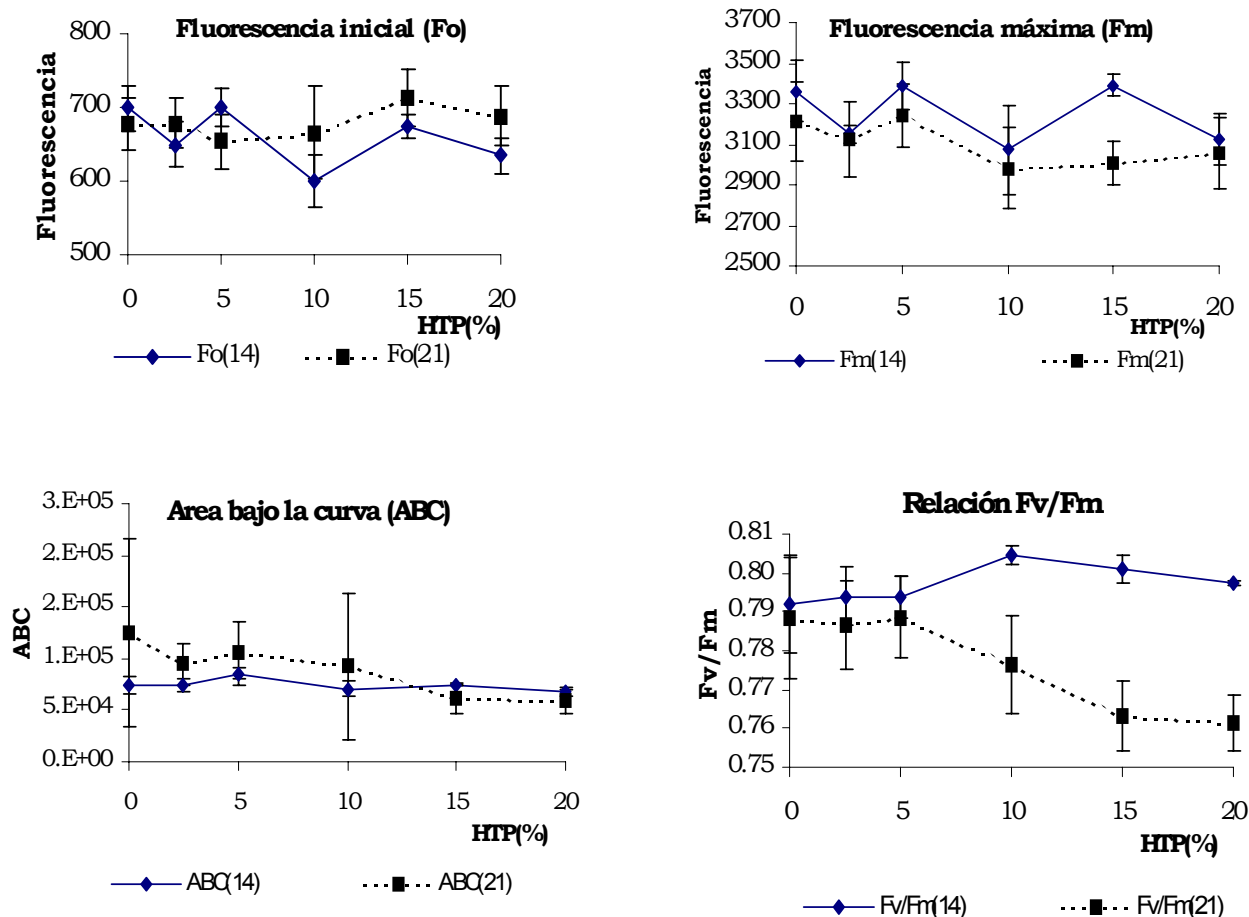


Figura 5.5 Variables correspondientes a la curva de inducción de fluorescencia de clorofila *a* de trigo a los 14 y 21 días de iniciado el bioensayo (los números en paréntesis se refieren a los días de muestreo).

B. Maíz (*Zea mays* L.)

En la Figura 5.6 se muestran los resultados de las variables de respuesta obtenidas con el PEA para maíz a 5, 10 y 20 días de iniciado el bioensayo.

Para las variables obtenidas del análisis de fluorescencia de clorofila *a* se observa lo siguiente: la fluorescencia inicial (Fo) disminuye en intensidad al aumentar la concentración de hidrocarburos con respecto al control a los 5 días, pero al realizar las mediciones posteriores se nota un ligero incremento, aunque no significativo, en las concentraciones altas. La fluorescencia máxima (Fm) no presenta diferencia significativa con respecto al nivel de contaminante

ni con el tiempo de medición excepto para las concentraciones de 0 a 5% a los 5 días donde ésta es mayor. En cuanto al tiempo de fluorescencia máxima éste no varía en todas las mediciones realizadas (no mostrado). Para el ABC se observa comportamiento similar al de F_o . Finalmente, en la relación F_v/F_m no se encuentra diferencia significativa a un tiempo dado con respecto al contenido de hidrocarburos, mientras que al aumentar el tiempo de cultivo ésta disminuye.

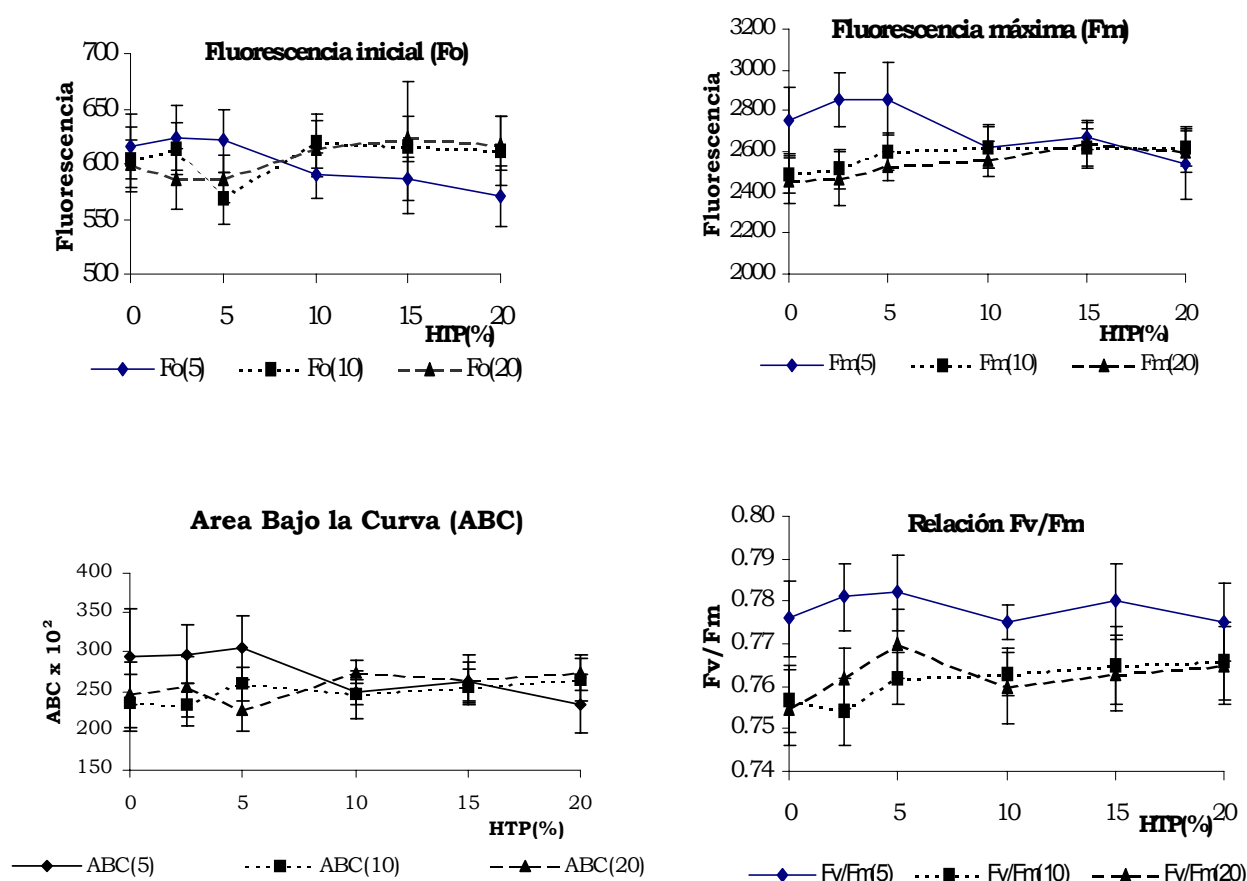


Figura 5.6. Variables de la curva de inducción de fluorescencia de clorofila a de maíz a los 5, 10 y 20 días de iniciado el bioensayo. (los números en paréntesis se refieren a los días de muestreo).

C. *Cyperus laxus* Lam.

En la Figura 5.7 se muestran los valores obtenidos con el PEA para la planta nativa. De manera general, se observa un comportamiento único en las

variables F_o , F_m y ABC para la planta nativa: en los primeros días de medición hay un decremento significativo en la intensidad de fluorescencia al incrementar la concentración de HTP, sin embargo, al aumentar el tiempo de cultivo la diferencia entre los valores para cada concentración se reduce llegando a un nivel máximo para cada variable.

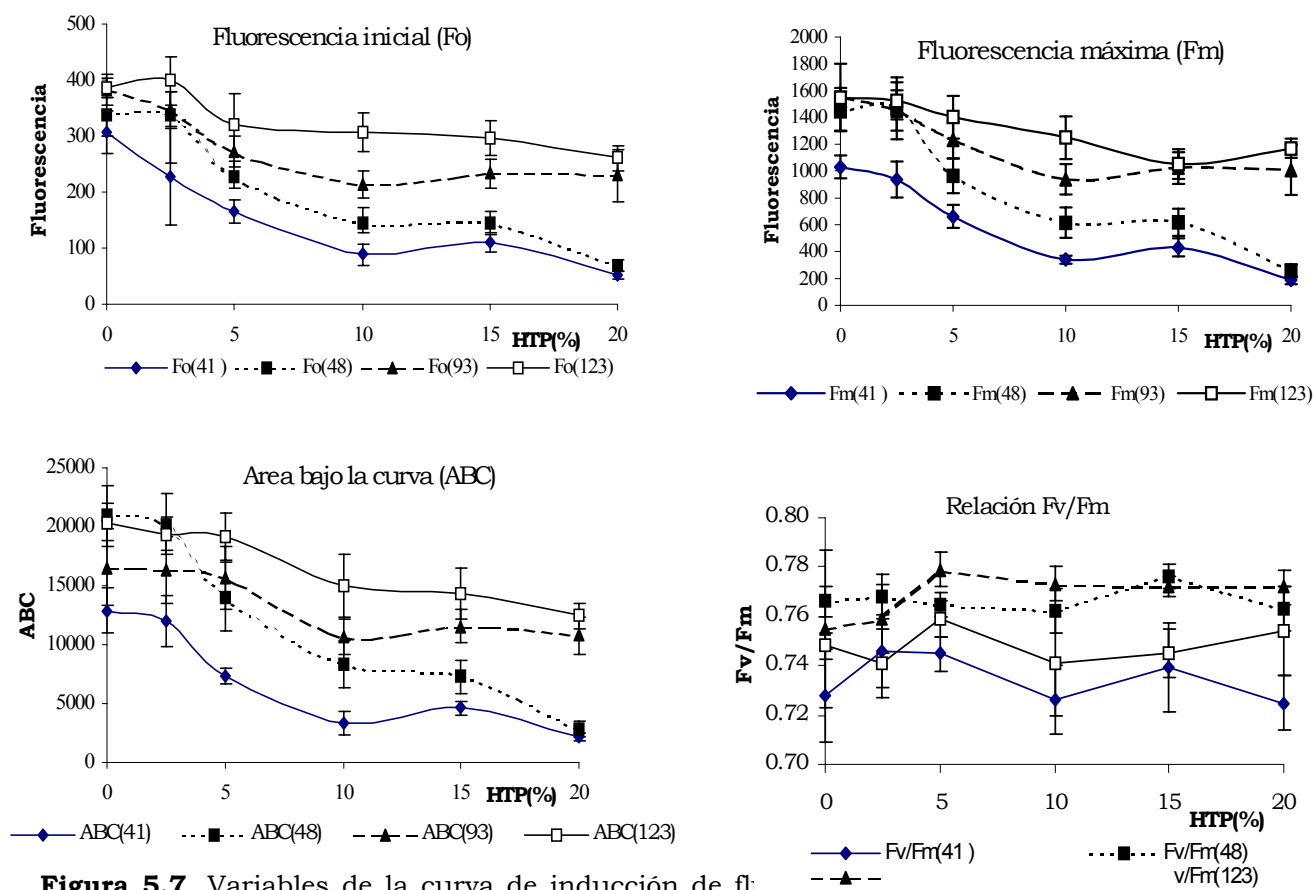


Figura 5.7. Variables de la curva de inducción de fl. *laxus* Lam. (los números en paréntesis se refieren a los días de muestreo).

En cuanto a F_v/F_m , ésta aumenta de los 41 a los 93 días, después disminuye a valores cercanos a la primera medición; y tampoco es notorio un efecto debido al incremento en el nivel de hidrocarburos a un tiempo dado.

Los resultados obtenidos para las tres especies se pueden explicar de la siguiente manera: la intensidad de la fluorescencia (F_o o F_m) emitida por la clorofila es proporcional a la cantidad de clorofila y a la intensidad de luz. En hojas pequeñas, que no ocupaban todo el orificio del clip, como el caso de la planta nativa en las concentraciones altas de hidrocarburos, la intensidad de fluorescencia es menor debido a que la cantidad de clorofila por área que es excitada es pequeña con respecto a hojas grandes; tal como las hojas de la planta nativa crecidas en el suelo control o en las hojas de maíz y trigo.

Recientemente se ha presentado un sostenido interés en estudiar la captura de luz por la clorofila a , como un aspecto fundamental de la producción de la planta, debido a que las plantas pueden incrementar la fracción de la luz incidente que ellas absorben incrementando su densidad de clorofila. La densidad de la clorofila en los tejidos fotosintéticos es, sin embargo, solamente indicio de su potencial para capturar la luz, la extensión de éste fenómeno parece depender de factores como grosor, concentración interna de clorofila a y complejidad de los tejidos fotosintéticos (Agustí y col., 1994). En otra prueba donde se midió la fluorescencia de clorofila a en plantas con hojas de diferente tamaño (misma edad pero diferente disponibilidad de nutrientes) se obtuvo la intensidad de fluorescencia más baja para las hojas más pequeñas pero valores iguales para la relación F_v/F_m . Con este ejemplo se puede decir que la diferencia entre la intensidad de fluorescencia, ya sea F_o o F_m , en la planta nativa no se debe al efecto directo de los hidrocarburos sobre el aparato fotosintético, por lo cual esta variable no puede ser utilizada como indicador del efecto del contaminante. El efecto observado es reflejo de la disminución en el crecimiento debida al efecto (directo o indirecto) de los hidrocarburos presentes en el suelo.

En cuanto a los valores del ABC, los cuales se obtienen matemáticamente a partir del transiente de fluorescencia, presentan el mismo comportamiento que la fluorescencia ya que dependen de la intensidad de la misma; esto es, mayor área bajo la curva a mayor intensidad de fluorescencia.

Para la variable eficiencia máxima del Fotosistema II (F_v/F_m), la cual está relacionada directamente con el proceso fotosintético, se observa que no hay efecto de los hidrocarburos sobre los valores de F_v/F_m , a un tiempo dado, en las tres especies estudiadas. Los valores encontrados oscilan entre 0.72 y 0.8, aún en trigo donde se observa una disminución significativa. Estos datos coinciden con lo reportado por Huang y colaboradores (1997), donde utilizan *Lemna gibba* y miden F_v/F_m a diferentes concentraciones de antraceno encontrando que una planta saludable tiene un valor de eficiencia del Fotosistema II de 0.7 a 0.8 mientras que las plantas afectadas por el antraceno tenían valores de F_v/F_m cercanos a 0.25 en la concentración más alta. Existen pocos compuestos xenobióticos que inhiben la actividad del FSI. Los inhibidores del transporte fotosintético de electrones usualmente actúan en el FSII como es el caso de la juglona (una naftoquinona natural), los herbicidas sintéticos atrazina y DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) y algunos metales. Generalmente, el FSII es más sensible al estrés que el FSI y los mecanismos de defensa que tienen las plantas pueden aminorar algunas formas de daño en el FSII (Huang y col., 1997; Strasser y col., 1995).

Finalmente, la tendencia observada tanto en trigo y maíz como en la planta nativa en cuanto al comportamiento de F_v/F_m a través del tiempo es un reflejo de la edad de la hoja. Cuando las hojas crecen, su habilidad para fotosintetizar incrementa hasta que alcanza un máximo, después del cual empieza a decrecer lentamente. Hojas viejas, senescentes, eventualmente se vuelven amarillas y entonces son incapaces de fotosintetizar debido a un rompimiento de la molécula de clorofila y pérdida de los cloroplastos funcionales (Salisbury, 1991). El desarrollo de las células de una hoja se ha estudiado más ampliamente en pastos tales como trigo y cebada; esto debido a que todas las hojas se originan a partir de una región meristemática simple en la base de la hoja (meristemo intercalario). De tal forma que el gradiente del desarrollo se

genera por las células más jóvenes que siempre están en la base incrementando la edad hacia la punta de la hoja (Tobin, 1992).

Varios autores han reportado cada una de las etapas de la curva típica de inducción de fluorescencia de clorofila *a*. Este transiente puede ser usado como una herramienta sensible para evaluar el aparato fotosintético in vivo bajo condiciones fisiológicas (Strasser y col., 1995). En la Figura 5.8 se muestra una curva de inducción de fluorescencia de clorofila *a* para la planta nativa.

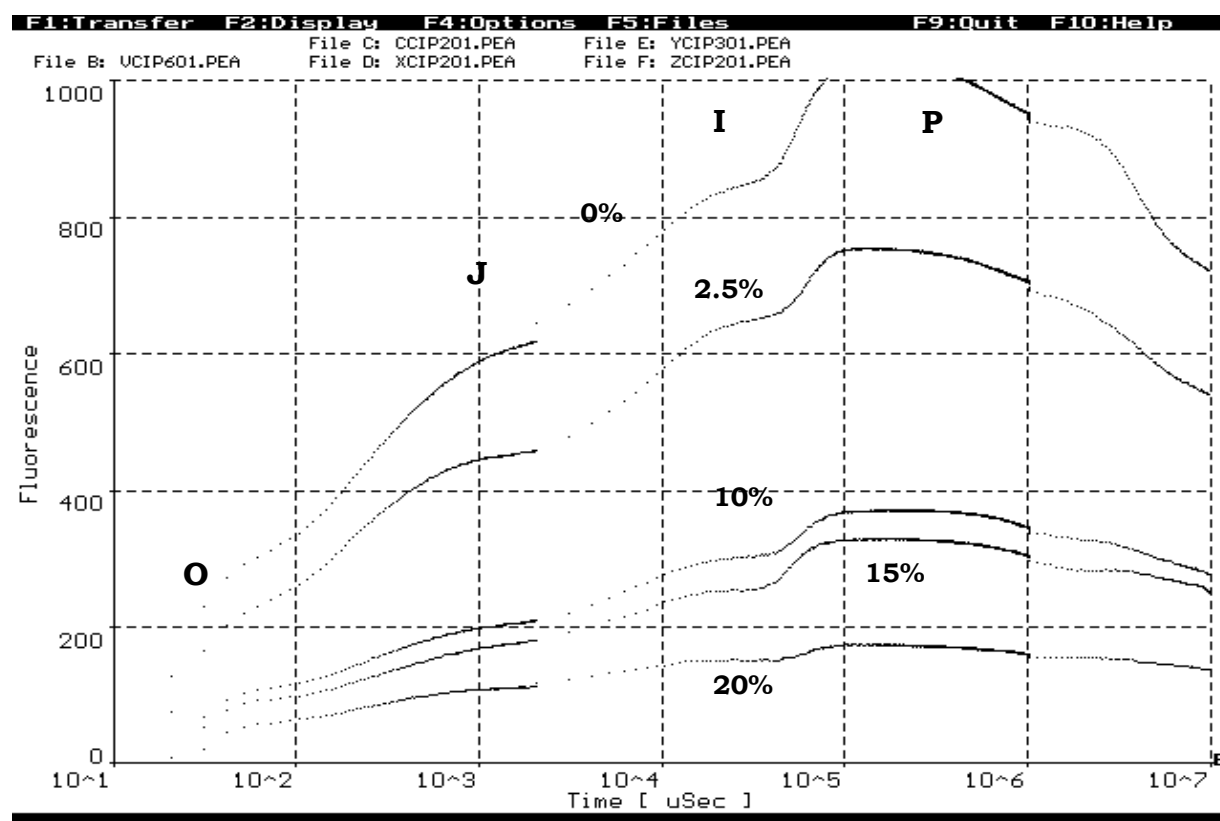


Figura 5.8. Curvas de inducción de fluorescencia de clorofila *a* de *Cyperus laxus* Lam. (41 días) a las diferentes concentraciones de HTP ensayadas.

Las curvas de inducción de fluorescencia de la clorofila *a* para las tres especies siguieron la forma típica, esta se observa en la Figura 5.7 donde cada curva corresponde a una concentración de HTP (0, 2.5, 10, 15 y 20%), presentándose las etapas características de la misma (O-J-I-P). La excitación de la clorofila *a* de una hoja resulta en una curva de inducción de fluorescencia característica.

A la exposición de la luz, la fluorescencia alcanza rápidamente (< 1 milisegundo) un nivel mínimo, llamado F_o (Etapa O). Este es el nivel de fluorescencia alcanzado cuando la quinona A (Q_A) en FSII es oxidada. Después que F_o se alcanza, la fluorescencia aumenta gradualmente (Etapas J-I) sobre un periodo de 2s a un nivel máximo F_m , al cual Q_A está completamente reducida (Etapa P). Bajo continua exposición de luz actínica, la fluorescencia decrece después de alcanzar F_m (Krause y Weis, 1984; Strasser y col., 1995; Huang y col., 1997). Bajo condiciones fisiológicas normales, el transiente de fluorescencia de la clorofila a de los organismos fotosintéticos sigue la secuencia O-J-I-P (Strasser y col., 1995).

Se considera entonces que la actividad fotosintética de trigo, maíz y *Cyperus laxus* Lam. evaluada como fluorescencia de la clorofila a , en particular la variable F_v/F_m no es afectada por la presencia de hidrocarburos bajo estas condiciones. La capacidad fotosintética de las hojas de muchas especies es muy plástica, dependiendo fuertemente de la disponibilidad de recursos (nutrientes, agua, luz) y está determinada primordialmente por la cantidad y actividad catalítica de las enzimas fotosintéticas (Pearcy y col., 1987). En el caso de *Cyperus laxus* Lam. el que no se altere la fotosíntesis puede explicar que esta especie se encuentre creciendo en el pantano aunado posiblemente a la presencia de microorganismos de la rizósfera que de alguna forma permitan a la planta sobrevivir bajo esas condiciones. Mediante estos estudios es posible sugerir a *Cyperus laxus* Lam. como un bioindicador del ecosistema debido a su alta sensibilidad a la presencia de hidrocarburos.

Es importante mencionar que son pocos los estudios existentes del efecto de hidrocarburos sobre la actividad fotosintética de las plantas. La mayoría de ellos se enfocan a factores como: agua, dióxido de carbono, intensidad de luz, nutrientes, temperatura, la edad de la planta, factores genéticos y presencia de contaminantes ambientales (gaseoso, metales pesados y herbicidas) (Salisbury, 1991).

5.3.2 Determinación de hidrocarburos en suelo.

A partir de los resultados obtenidos en el bioensayo de germinación de semillas, crecimiento de plantas surgió la pregunta ¿cuál es el destino de los hidrocarburos en el suelo?, ya que podían ser absorbidos por la planta y así causar el efecto fitotóxico. Para resolver esta duda se decidió determinar la concentración del contaminante en el suelo donde crecían las plantas de *Cyperus laxus* Lam. a los cuatro meses de cultivo. La cuantificación de hidrocarburos se realizó mediante análisis de espectrometría infrarroja ya que se sabe es una técnica analítica más sensible que la gravimétrica.

En la Figura 5.9 se muestran los resultados de la concentración de hidrocarburos para cada una de las mezclas de suelo al inicio y a 4 meses de cultivo de *Cyperus laxus* Lam. Se observa que no existe diferencia significativa en la concentración de hidrocarburos a través del tiempo, este resultado puede deberse a que no fue suficiente el tiempo de cultivo de la planta como para que se detectaran cambios apreciables de la concentración de HTP en el suelo.

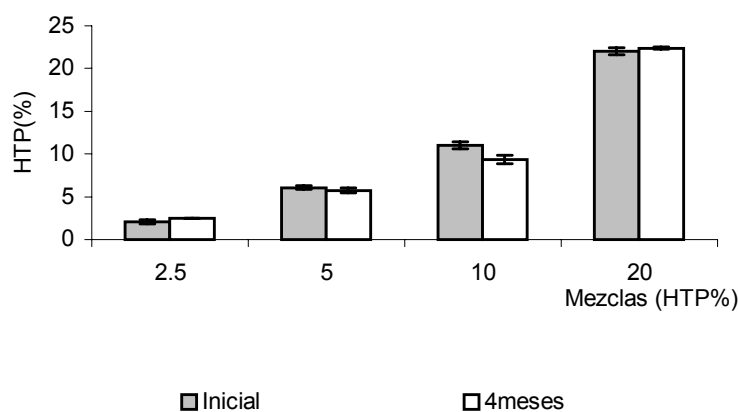


Figura 5.9 Hidrocarburos presentes en el suelo al inicio y después de 4 meses de cultivo de *Cyperus laxus* Lam

De acuerdo con dichos resultados aparentemente no hubo absorción del contaminante por parte de la planta, sin embargo, no se descarta la posibilidad

de que una pequeña cantidad (no detectable por esta técnica) de hidrocarburos pueda haber sido absorbida por las raíces y afectar el crecimiento de las mismas; o bien, que el efecto observado sea debido a la interacción de los hidrocarburos con micronutrientes de tal forma que éstos no se encuentren disponibles para la planta.

Se ha reportado (Wild y Jones, 1992) que la asimilación de compuestos orgánicos en plantas depende del contenido de materia orgánica del suelo, los valores de la constante de partición $K_{o/w}$, la naturaleza ácida o alcalina del suelo. En el caso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) se ha encontrado que los compuestos de alto peso molecular son más difíciles de asimilar por las plantas que los de bajo peso molecular. Además, ya que los PAH son compuestos lipofílicos tienden a asociarse más fuertemente a la materia orgánica del suelo y de esta forma están menos disponibles. Sin embargo, puede ocurrir adsorción de PAH sobre la superficie de las raíces pero éstos no pueden ser translocados debido a que no poseen las propiedades fisicoquímicas apropiadas (Ryan y col., 1988). Estudios realizados por Wild y Jones (1992) en cultivos de zanahoria en un suelo adicionado con lodo conteniendo PAH encontraron que en la piel de la raíz se absorbían compuestos de bajo peso molecular (acenafteno, fluoreno y fenantreno) ya que en el centro de la misma no detectaron PAH. Las concentraciones que detectaron por HPLC fueron menores a 4.2 mg/kg. En otro estudio (Webber y col., 1994) se analizó la asimilación de bifenilos policlorados (PCB) y otros contaminantes orgánicos (PAH, haloéteres, bencenos clorinados, compuestos de tolueno) por CG/EM en cultivos de zanahoria, col y maíz crecidos en suelo con lodo que contenía estos contaminantes; se encontró que la concentración de los compuestos orgánicos fueron menores al límite de detección (4 mg/kg de peso seco).

Se concluye que no hubo cambios detectables en la concentración de HTP en el suelo durante el tiempo de cultivo de *Cyperus laxus* Lam.

5.4 Bioensayo con lombrices *Eisenia foetida* L. (Annelida).

El efecto de los hidrocarburos sobre las poblaciones de lombrices como un organismo representante del suelo puede ser un centinela de efectos de procesos más destructivos al suelo (Neuhauser y Callahan, 1990). Para esta prueba se utilizó *Eisenia foetida* L., ya que de acuerdo con varios estudios es la especie recomendada para este tipo de ensayos. Un estudio de cuatro especies de lombrices realizado por Neuhauser sugirió que la correlación entre los valores de LC_{50} entre especies era alta, lo cual demuestra que son equivalentemente sensibles a la sustancia probada, de éste seleccionó a *Eisenia foetida* L. como la especie más representativa (van Straalen y van Gestel, 1993).

El parámetro toxicológico relevante de la prueba es la LC_{50} o concentración letal media que se define como la concentración a la cual muere el 50% de la población. La determinación de un valor de toxicidad de corto tiempo como LC_{50} de una sustancia química es un indicador útil del efecto biológico potencial de éste si se libera al ambiente. Sin embargo, es posible que los efectos adversos de la sustancia puedan ocurrir a concentraciones subletales, esto es, debajo de los valores de LC_{50} (Neuhauser y Callahan, 1990)

En la Figura 5.10 se presentan los resultados del porcentaje de mortalidad de las lombrices a los 7 y 14 días de exposición. Esta gráfica corresponde a una curva típica dosis-respuesta, donde se grafica cada concentración y el porcentaje o número de organismos respondiendo al efecto. La distribución resultante pertenece a una curva sigmoide. El origen de esta distribución es simple, si se grafica solamente la mortalidad adicional a cada concentración, la distribución resultante será una curva normal o con forma de campana, lo cual no es sorprendente ya que las respuestas de los organismos son controladas por conjuntos de genes que siguen curvas con distribución normal (Landis y Yu, 1995).

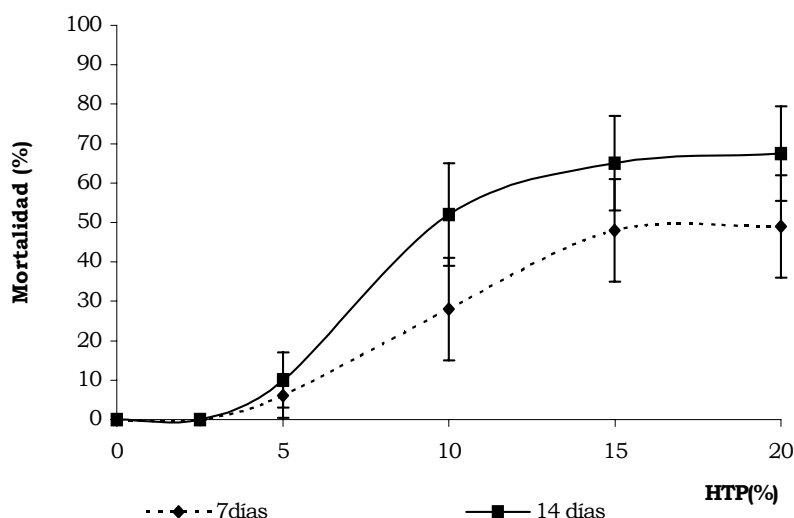


Figura 5.10 Mortalidad de *Eisenia foetida* L. a los 7 y 14 días de exposición a diferentes concentraciones iniciales de HTP. LC_{50} de 11.9% de HTP a los 14 días. (Método Probit).

A los 7 días de iniciado el bioensayo todavía no se presenta una mortalidad del 50% de los individuos, observándose que en la concentración más baja de contaminante (2.5% de HTP) no hay muerte de las lombrices. Este fenómeno se muestra también a los 14 días de exposición en la misma concentración. Sin embargo, en las muestras con 10% de HTP en adelante ya se encuentra más del 50% de muerte de las lombrices, calculándose la LC_{50} mediante el método Probit, resultando de 11.9% de HTP (119 mg/g de suelo) y el valor de NOEC de 2.5% de HTP (25 mg/g de suelo).

En un estudio (Neuhauser y col., 1985) se ha determinado los valores de LC_{50} en *Eisenia foetida* L. para varias sustancias. Se ensayaron dos tipos de pruebas: el de contacto y el de suelo artificial. Los autores probaron seis grupos de sustancias: fenoles, aminas, aromáticos sustituidos, alifáticos halogenados, ftalatos y Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP). Todos los HAP fueron de baja solubilidad en agua y baja presión de vapor (acenafteno, fluoreno, fluoranteno, naftaleno). Para la prueba de contacto dentro de las 10 sustancias

más tóxicas, 8 de éstas fueron fenoles seguido de las aminas. Entre las menos tóxicas se encuentran 2 alifáticos halogenados, un aromático sustituido, cinco ftalatos y 2 HAP. Estos datos sugieren que los compuestos que tienen la menor toxicidad a las lombrices son aquellos que no son muy solubles en agua o tienen una alta presión de vapor. Para entender mejor la toxicidad relativa de las sustancias, se compararon sus características físicas y químicas con la toxicidad en términos de los valores de LC_{50} . La sustitución de un grupo radical sobre la estructura básica de una molécula de hidrocarburos puede alterar la reacción de la molécula en los sistemas biológicos. Los fenoles y aromáticos que incluyen grupos nitro son más tóxicos que los no sustituidos. Los 4 HAP fueron relativamente poco tóxicos pero pueden presentar toxicidad si se ingieren. La toxicidad podría estar relacionada con la solubilidad, ya que los compuestos más solubles (los ftalatos) fueron los más tóxicos (Neuhauser y col., 1985).

Salanitro y col. (1997) utilizaron el bioensayo con lombrices (prueba de suelo artificial) para evaluar la biorremediación de un suelo contaminado con petróleo encontrando que el número de lombrices sobrevivientes aumentó al incrementar el tiempo del tratamiento, sin embargo, no reportan valores de LC_{50} . Tang y col. (1998) determinan la disponibilidad de HAP hacia *Eisenia foetida* L. observando que el proceso de envejecimiento (intemperización) del suelo disminuía la disponibilidad de los hidrocarburos hacia las lombrices comparado con un suelo contaminado recientemente.

De acuerdo a la teoría del equilibrio de partición (EqP) se calcula la asimilación de contaminantes por organismos presentes en el suelo o sedimento. Esta teoría predice que el factor de acumulación biota-suelo (BSAF) de sustancias orgánicas es independiente del coeficiente de partición octanol/agua. Una de los supuestos básicos de la teoría es que la asimilación de contaminantes tiene lugar a través de difusión pasiva de la fase libremente disuelta presente en el agua intersticial de los poros del suelo. Varios factores pueden intervenir con la

aplicabilidad de la teoría: primero, para compuestos orgánicos hidrofóbicos ($\log K_{ow} > 5$) la ingestión de partículas de suelo contaminadas provee una ruta adicional de asimilación y segundo, la capacidad de acumulación en los organismos permanece limitada en caso de una rápida biotransformación de los compuestos (Ma y col., 1998).

En este trabajo, ya que no se conoce la composición de la mezcla de hidrocarburos presente en el suelo, no puede establecerse a qué compuesto en particular se debe el efecto tóxico observado, sin embargo, debido al proceso de intemperización al que ha estado sometido el suelo utilizado es posible que el alto valor de LC_{50} obtenido (baja toxicidad) refleja la poca biodisponibilidad de los contaminantes a *Eisenia foetida* L.

Los organismos (y por extensión, comunidades y ecosistemas) pueden sufrir a partir de los efectos de contaminantes ambientales no sólo la muerte del individuo sino también efectos directos o indirectos sobre su reproducción y crecimiento. Los seres vivos pueden translocar energía para sobrevivir al estrés causado por los contaminantes, sacrificando energía que puede ser usada para soportar el crecimiento y la reproducción, disminuyendo así la competitividad entre los organismos (Gibbs y col, 1996).

En las lombrices, el crecimiento y la reproducción no solamente son de considerable relevancia ecológica sino que están fuertemente correlacionadas. Varios estudios han demostrado que ambas pueden disminuir significativamente por la presencia de sustancias tóxicas (Ma y col., 1998).

En la Figura 5.11 se muestran los resultados del peso de las lombrices durante el bioensayo. Al inicio del bioensayo las lombrices aumentaron significativamente de peso en todas las concentraciones de hidrocarburos. A medida que se incrementó el tiempo de exposición al contaminante solo los individuos mantenidos en el suelo control permanecieron con esa ganancia de peso mientras que las lombrices en presencia de hidrocarburos fueron disminuyendo de peso, observándose más drásticamente este efecto en el

mayor nivel de hidrocarburos (20%). Este comportamiento puede sugerir que las lombrices solamente "ingirieron" suelo contaminado, de manera apreciable, los primeros días del bioensayo (en todas las mezclas de suelo la proporción de la turba adicionada fue constante a un nivel del 15%).

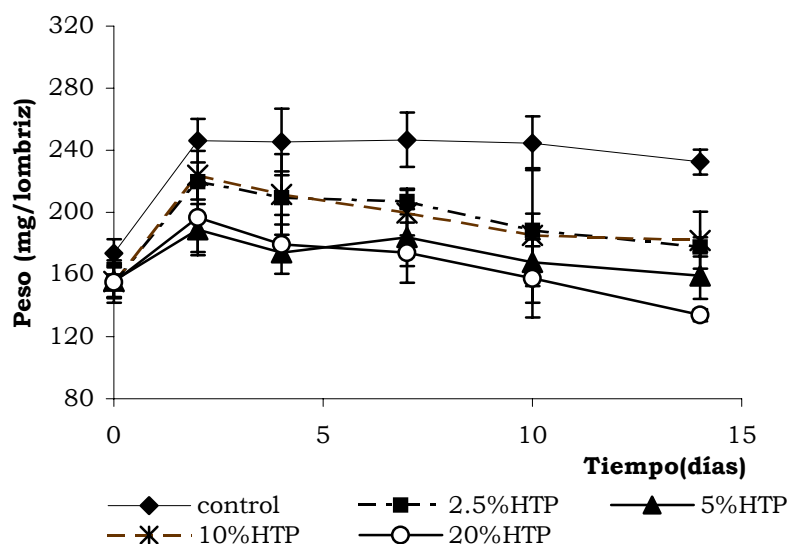


Figura 5.11 Peso de las lombrices a los diferentes días de exposición al suelo contaminado (Peso promedio de las lombrices sobrevivientes).

Estudios de Kaplan y col. (1980) sobre la supervivencia y crecimiento de *Eisenia foetida* L. para valorar las condiciones fisicoquímicas óptimas en el ambiente de la lombriz determinaron que la máxima ganancia de peso se observó a una temperatura entre 20-29 °C, una humedad entre 70-85% y todas las lombrices murieron a valores de pH menores a 5 o mayores a 9, teniendo su óptimo cercano a 7. También se ha reportado que *Eisenia foetida* L. almacenada en turba con pH ácido (3.6 a 4.3) pierden menos peso que en pH neutro (5.5 a 7) ya que la energía gastada en la alimentación excede la cantidad asimilada de tal forma que las lombrices pierden peso rápidamente (Satchell y Dottie, 1984). Con estos datos se confirma que las condiciones del bioensayo fueron las adecuadas para el mantenimiento de las lombrices (pH de 4.4 a 4.6 para todas

las mezclas y condiciones de humedad de 85-95% y temperatura de 23-28°C), por lo que los efectos observados se deben únicamente a la presencia de hidrocarburos.

En cuanto al comportamiento de las lombrices este fue normal hasta la concentración del 10% de HTP; en los niveles más altos de contaminante se observó que las lombrices permanecían en la superficie del suelo donde posteriormente se encontraban muertas, además las que sobrevivían en estas concentraciones (15 y 20%) tenían un color pálido y respondían lentamente al estímulo táctil comparadas con las del suelo control.

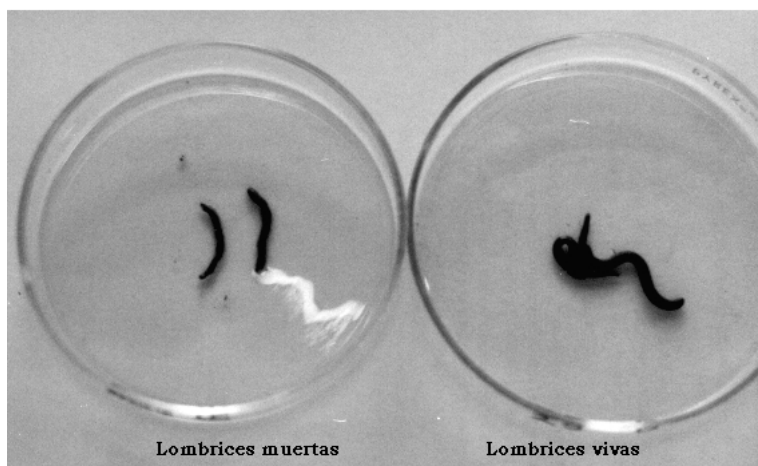


Figura 5.12 Lombrices muertas encontradas en la superficie del suelo con 20% de HTP y lombrices vivas encontradas en el suelo limpio (0% HTP).

Se concluye que los hidrocarburos presentes en el suelo utilizado tienen un efecto tóxico (provocan muerte y disminución en el crecimiento) sobre las lombrices *Eisenia foetida* L además de causar trastornos en su comportamiento. El alto valor de LC_{50} (11.9 % de HTP) puede deberse a la intemperización del suelo.

5.5 Bioensayo con microorganismos (sistema Microtox®)

El bioensayo con microorganismos más utilizado es el que usa a la bacteria marina bioluminiscente, gram negativa, *Vibrio fischeri*. La presencia de sustancias tóxicas o biorreactivas que interrumpen o inhiben el metabolismo celular afectan el sistema de transporte de electrones de la célula, y puede ser cuantificado midiendo el cambio en la bioluminiscencia de la suspensión de células (Rönnpapel y col., 1995; Ross y col., 1999).

Debido al efecto que los sedimentos o matrices sólidas tienen sobre la biodisponibilidad de los compuestos, se ha dificultado la valoración de tóxicos en sistemas terrestres. La mayoría de las pruebas de toxicidad de suelos y sedimentos se han desarrollado para extractos de agua o solventes de la matriz sólida. Este procedimiento puede subestimar o sobrestimar la toxicidad y rutas de exposición, consecuentemente tener efectos ambientales adversos. El sistema Microtox fase sólida elimina la necesidad de extractos del suelo o sedimento ya que utiliza tal cual la matriz sólida. (Rönnpapel y col., 1995). Un bioensayo con microorganismos en contacto directo con los sólidos puede integrar la situación real en un sistema más complejo y mejor que en los extractos.

McFarland expresó la toxicidad de una sustancia como una función de la capacidad del xenobiótico para alcanzar sitios activos y para interactuar con ellos, lo que fue expresado en una ecuación que refleja la penetración descrita por el término de hidrofobicidad y la interacción en el sitio de acción (Cronin, 1998).

A continuación se presenta la gráfica de intensidad de bioluminiscencia a las diferentes concentraciones de hidrocarburos.

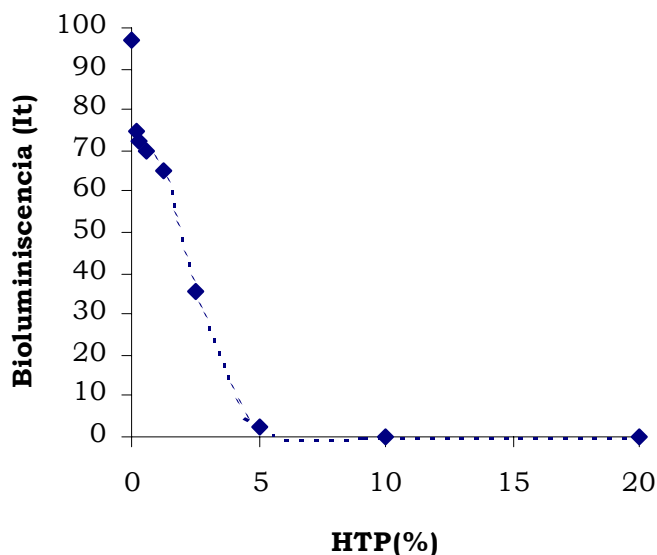


Figura 5.13. Efecto de la presencia de hidrocarburos sobre la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri*.

En esta gráfica puede observarse que se presenta efecto tóxico de los hidrocarburos ya que la intensidad de bioluminiscencia disminuye drásticamente al incrementar la concentración del contaminante. En este bioensayo el parámetro toxicológico relevante es la Concentración Efectiva Media o EC_{50} definida como la concentración a la cual disminuye en un 50% el efecto observado, en este caso, la bioluminiscencia. La EC_{50} calculada por el programa Microbics fue de 1.27% de HTP (10.27 mg/g de suelo).

En un estudio realizado con cuatro diferentes tipos de suelo (con altos contenidos de arena o arcilla) contaminados recientemente con diesel se valoró la toxicidad antes y después de un proceso de biorremediación por medio de diferentes bioensayos, entre ellos el sistema Microtox. Para el suelo arenoso (1.2% de HTP inicial) se reportó el valor de EC_{50} de 0.12% de HTP observando que este valor aumentó al término del proceso de biorremediación siendo de 0.3% de HTP lo que sugiere una disminución en la toxicidad (Marwood y col.,

1998). Concluyeron que la cantidad de arcilla presente en el suelo influye en el proceso de biorremediación.

Jennings y col. (1996) determinaron la capacidad del sistema Microtox para dar seguimiento al progreso de la biorremediación de petróleo en suelo recientemente contaminado utilizando lisímetros. Se evaluaron tres muestras: suelo control, suelo contaminado (1.53% de HTP determinado por análisis infrarrojo) y suelo contaminado adicionado con fertilizante; los valores de EC_{50} después de la biorremediación incrementaron al aumentar el tiempo del proceso, siendo mayor el incremento para el suelo adicionado con fertilizante; lo que indica que la toxicidad disminuyó.

En estudios realizados en 18 laboratorios (143 bioensayos en total) se determinó la precisión del sistema Microtox Fase Sólida. Cada laboratorio evaluó ocho muestras obteniendo un coeficiente de variación de 35.8% a 78%. Los factores que pudieron afectar los resultados son: el almacenamiento de los cultivos de prueba y materiales, inconsistencia del operador, homogenización incompleta de las muestras y el contenido de humedad de las muestras; sin embargo, los coeficientes de variación son aceptables ya que son comparables con otros estudios de precisión interlaboratorios en ecotoxicología (de 18 a 129%). Se concluye que el sistema Microtox Fase Sólida, debido a que un número mínimo de resultados (2/143) se encuentran fuera del intervalo crítico de consistencia, puede ser desarrollado como método de prueba estandarizado. (Ross, 1999).

Se concluye que los hidrocarburos presentes en el suelo utilizado tienen un efecto tóxico (disminuyen la función bioluminiscente) en *Vibrio fischeri* con una EC_{50} de 1.27% de HTP.

5.6 Comparación entre bioensayos.

En las Tabla 5.6 y 5.7 se presentan los valores de los parámetros toxicológicos evaluados en los diferentes bioensayos.

Tabla 5.6 Valores de EC₅₀ (% de HTP) para cada una de las especies de los bioensayos.

PUNTO FINAL	ESPECIE				
	<i>T. aestivum</i> L.	<i>Z. mays</i> L.	<i>C. laxus</i> Lam	<i>E. foetida</i> L.	<i>V. fischeri</i>
Germinación	ND	ND	ND		
Altura del tallo	ND	ND	7.42		
Peso seco	ND	ND	3.63		
Mortalidad*				11.9*	
Bioluminiscencia					1.27

*LC₅₀ (% de HTP)

ND: no detectado.

Tabla 5.7 Valores de NOEC (% de HTP) para cada una de las especies de los bioensayos.

PUNTO FINAL	ESPECIE				
	<i>T. aestivum</i> L.	<i>Z. mays</i> L.	<i>C. laxus</i> Lam	<i>E. foetida</i> L.	<i>V. fischeri</i>
Germinación	2.3	ND	ND		
Altura del tallo	5	5	2.5		
Peso seco	5	5	0		
Mortalidad				2.5	
Bioluminiscencia					0.156

ND: no detectado

Comparando los valores de los parámetros toxicológicos (tanto EC₅₀ como NOEC) se puede observar que de los bioensayos realizados el más sensible fue el de microorganismos (*P. phosphoreum*). En cuanto a la rapidez de los análisis, el bioensayo con microorganismos es el más rápido pero también el más costoso. El bioensayo con lombrices es sencillo de realizar además de económico. Finalmente, el bioensayo de germinación de semillas, crecimiento de plantas tiene el inconveniente de la necesidad de contar con un invernadero.

En este caso la determinación de la actividad fotosintética (evaluando solamente la variable Fv/Fm) no puede ser usada como medida del efecto de los hidrocarburos pero no se descarta la posibilidad de que en otros estudios

pueda ser utilizada como un bioensayo de plantas más rápido que el de germinación de semillas y crecimiento.

En un estudio de comparación de la toxicidad de hidrocarburos en suelo detectada por cinco bioensayos (germinación de semillas, RBC, sistema Microtox, SOS-cromotest y Toxi-cromotest) se encontró que los resultados de esta batería de bioensayos no coinciden uno con otro para un suelo dado (en algunos casos disminuye la toxicidad y en otros aumenta), sin embargo, los bioensayos representan un amplio intervalo de organismos que pueden ser usados para evaluar la calidad del suelo. Finalmente se concluye que tres de los bioensayos: germinación de semillas, sistema Microtox y RBC hemólisis pueden ser utilizados para dar seguimiento a un proceso de biorremediación (Marwood y col., 1997). Estos resultados son semejantes con el trabajo realizado en cuanto al uso de un conjunto de bioensayos y a que los valores de los parámetros toxicológicos no coinciden entre los diferentes bioensayos.

Es importante mencionar que los altos valores de LC_{50} , EC_{50} y NOEC para los diferentes bioensayos son posiblemente el reflejo del alto grado de intemperización de los hidrocarburos del suelo estudiado (no se encuentran presentes la fracción volátil y la de solubles en agua además de que tampoco están biodisponibles); estos valores indican la baja toxicidad de este suelo a los diferentes organismos probados. Con los bioensayos realizados se determinó el efecto tóxico de la interacción del suelo con los hidrocarburos a las condiciones naturales de un ecosistema contaminado, de tal forma que los resultados obtenidos sólo son válidos para este tipo de suelo y composición de hidrocarburos, específicamente, para este sitio contaminado.

Con los resultados de los parámetros toxicológicos obtenidos en los bioensayos se recalca nuevamente la necesidad de usar organismos representantes de diferentes niveles tróficos para evaluar la toxicidad específica hacia cada uno de los componentes del ecosistema terrestre, y de esta forma, evaluar de forma global el ecosistema afectado.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se concluye lo siguiente:

a. Bioensayo de germinación de semillas, crecimiento de plantas.

No se observó efecto de los hidrocarburos sobre la germinación de las tres especies: *Triticum aestivum* L., *Zea mays* L. y *Cyperus laxus* Lam. El crecimiento de las plantas es afectado por la presencia de los contaminantes: disminuye la altura y el peso seco al aumentar la concentración de HTP. El efecto negativo más notorio se observó en el crecimiento de la planta nativa a partir de una concentración de 2.5% de HTP, es decir, *Cyperus laxus* Lam. fue la especie más sensible a la presencia de hidrocarburos. En cuanto a los valores de NOEC estos fueron de 5% de HTP para maíz y trigo y de 2.5 % de HTP para la especie nativa.

b. La actividad fotosintética en las tres especies ensayadas de plantas, evaluada como fluorescencia de la clorofila *a*, no es afectada por los hidrocarburos bajo estas condiciones.

c. Bioensayo con lombrices *Eisenia foetida* L.

La presencia de hidrocarburos produce un efecto tóxico en *Eisenia foetida* L. causando la muerte con una LC₅₀ de 11.9% de HTP a los 14 días de exposición. El crecimiento promedio de las lombrices disminuyó a partir de un nivel del 5% de HTP.

d. Bioensayo con microorganismos, sistema Microtox®.

Los hidrocarburos producen un efecto tóxico (disminuyen la actividad bioluminiscente de *Vibrio fischeri*) con una EC₅₀ de 1.27% de HTP. El bioensayo con microorganismos fue el más sensible.

- e. Los métodos desarrollados y probados pueden utilizarse para plantear normas para la valoración ecotoxicológica de suelos contaminados con hidrocarburos ya que evalúan organismos representantes de diferentes niveles tróficos que permiten valorar, de forma completa, un ecosistema contaminado.

- f. Mediante los bioensayos realizados puede sugerirse un intervalo de concentración de hidrocarburos a alcanzarse como punto final después de que se aplique un proceso de remediación a este sitio contaminado. En el caso de restaurar el pantano se propone una concentración de 2.5% de HTP (valor correspondiente a NOEC para *Cyperus laxus* Lam.). Si el lugar pretende utilizarse para actividades agrícolas, de ganadería o incluso para asentamientos humanos el valor sugerido es de 0.156% de HTP (corresponde al NOEC para el bioensayo con microorganismos, el más sensible).

7. RECOMENDACIONES

7. RECOMENDACIONES.

A continuación se describen algunas recomendaciones para trabajos posteriores a realizarse a partir de este estudio:

Para validar las técnicas propuestas (los bioensayos) evaluar otros tipos de suelos contaminados (no intemperizados) y diferentes composiciones de los HTP del suelo.

Con la finalidad de establecer límites seguros completar el estudio de ecotoxicidad con bioensayos que aporten datos de toxicidad crónica.

Caracterizar la mezcla de HTP por medio de Cromatografía de Gases/Espectrofotometría de Masas.

Evaluar la capacidad de *Cyperus laxus* Lam. para ser utilizada como bioindicador (centinela) del ecosistema del pantano.

Determinar la acumulación de HTP en las plantas y tejido de las lombrices por medio de Cromatografía de Gases/Espectrofotometría de Masas.

Evaluar el efecto de los hidrocarburos sobre el tejido meristemático de la raíz.

Para el bioensayo con lombrices se sugiere determinar la capacidad de reproducción (número de huevecillos en los recipientes de prueba) a concentraciones subletales así como efecto en la hemoglobina y daño en tejido.

Has que tu vida sea, campana que repique
o zurco en que florezca y fructifique,
el árbol luminoso de la idea.
Alza tu voz sobre la voz sin nombre de todos los demás,
y has que se vea junto al poeta, el hombre.
Llena todo tu espíritu de lumbre, busca el empinamiento de la cumbre,
y si el sostén nudoso de tu báculo, ofrece algún obstáculo a tu intento
¡sacude el ala del atrevimiento ante el atrevimiento del obstáculo!
Nicolás Guillén

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Aguilar, A., 1987. *Análisis químico para evaluar la fertilidad del suelo*, Ed. Sociedad Mexicana de la ciencia del suelo, México, pp.25-30.

Agustí, S., Enríquez, S., Frost-Christensen, H., Sand-Jensen, K., Duarte, C. 1994, Light harvesting among photosynthetic organisms, *Functional Ecology*, 8: 273-279.

Albers, P., 1995. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons en *Handbook of Ecotoxicology*, editado por Hoffman, D., Ed. Lewis Publishers, U.S.A., cap.15, pp.330-355.

Atlas, R., 1984. *Petroleum microbiology*, Ed. Macmillan Publishing Company, Nueva York, pp. 453-459.

Bolen, K., 1996. *Field crops*, Ed. John Wiley & Sons.

Bossert, I., Bartha, R., 1993. Plant growth in soils with a history of oily sludge disposal, *Soil Science*, 140: 1: 75-77.

Colin, I., Microorganism and their application to bioassay testing en *Handbook of Ecotoxicology*, 1993. editado por Peter Calow, Vol. I, Ed. Blackweel Scientific Publications, Gran Bretaña, pp. 315-330.

Côme, D., Corbineau, F., 1989. Some aspects of metabolic regulation of seed germination and dormancy en *Recent advances in the development and germination of seeds*, editado por Raymond Taylorson, ed. Plenum Press, U.S.A., pp. 127-135.

Cronin, M., Shultz, W., 1998. Structure-toxicity relationships for three mechanisms of action of toxicity to *Vibrio fischeri*, *Ecotox. Env. Saf.*, 39: 65-69

Edwards, C., Lofty, J., 1992. The biology of earthworms, Ed. Chapman and Hall, 2nda. ed., Londres.

Gibbs, M., Wicker, L., Stewart, A., 1996. A method for assessing sublethal effects of contaminants in soils to the earthworm, *Eisenia foetida*, *Env. Toxicol. Chem.*, 15:3:360-368.

Grime, J., Hunt, R., 1975. Relative growth rate; its range and adaptative signifacnce in a local flora, *J. Ecol.*, 63: 396-400.

Hall, D., Rao, K., 1994. Photoyntesis, 5ta.ed., Ed. Cambridge University Press, Gran Bretaña, pp. 1-19, 39-51, 79-94.

Heath, J., Koblis, K., Sager, S., 1993. Review of chemical, physical and toxicologic properties of components of total petroleum hydrocarbons, *J. Soil. Cont.*, 2:1:1-25

- Heimbach, F., 1984. Correlations between three methods for determining the toxicity of chemicals to earthworms, *Pestic. Sci.*, 15:605-611.
- Heitzer, A., Sayler, G., 1993. Monitoring the efficacy of bioremediation, *Trends in Biotechnology*, 11: 334-345.
- Holloway, G., Croker, H., Callaghan, A., 1997. The effects of novel and stressful environments on trait distribution, *Functional Ecology*, 11:579-584.
- Huang, X., McConkey, B., Babu, S., Greenberg, B., 1997. Mechanism of photoinduced toxicity of photomodified anthracene to plants: inhibition of photosynthesis in the aquatic higher plant *Lemna gibba* (duckweed), *Env. Toxicol. Chem.*, 16: 8: 1707-1715.
- IMP, Método IMP MPE-LAA-436, 1998, pp. 1-9.
- Jennings, E., Duncan, K., Buck, P., Lawlor, K., Sublette, K., Todd, T., Fisher, J., 1996. The long term effects of crude oil contamination and bioremediation, a study of soil toxicity, plant diversity and nematode communities, *Petroleum abstracts*, 38:15: 579-589.
- Kaplan, D., Hartenstein, R., Neuhauser, E., Malecki, M., 1980. Physicochemical requirements in the environment of the earthworm *Eisenia foetida*, *Soil. Biol. Biochem.*, 12: 347-352.
- Kapustka, I., Reporter, M., Terrestrial primary producers en *Handbook of Ecotoxicology*, 1993. editado por Peter Calow, Vol. I, Ed. Blackwell Scientific Publications, Gran Bretaña, pp. 278-298.
- Koblis, K., Day, C., Heath, J., 1993. Impact of surrogate selection on risk assessment for total petroleum hydrocarbons, *J. Soil. Contam.*, 2:2:1-12.
- Körner, Ch., 1991. Some often overlooked plant characteristics as determinants of plant growth: a reconsideration, *Functional Ecology*, 5: 162-173.
- Kostecki, P., 1989. *Petroleum contaminated soils*, Vol. I, Ed. Lewis Publishers, U.S.A., pp. 115-127, 163-175.
- Krause, G., Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics, *Ann., Rev., Plant Physiol., Mol., Biol.*, 42:313-349.
- Krause, H., Weis, E., 1984. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology II. Interpretation of fluorescence signals, *Photosynth. Res.*, 5: 139-157.
- Landis, W., Yu, M., 1995. *Introduction to environmental toxicology*, Ed. Lewis Publishers, U.S.A., pp. 7-30.
- Lee, K., 1985. *Earthworms*, Ed. Academic Press, Australia, pp. 3-18.

- Ma, W., van Kleunen, A., Immerzeel, J., Gert-Jan de Maagd, P., 1998. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by earthworms: assessment of equilibrium partitioning theory in situ studies and water experiments, *Env. Toxicol. Chem.*, 17: 9:1 730-1737.
- Marwood, T., Knoke, K., Yau, K., Lee, H., Trevors, J., Suchorski-Tremblay, A., Flemming, C., Hodge, V., Liu, D., Seech, A., 1998. Comparison of toxicity detected by five bioassays during bioremediation of diesel fuel-spiked soils, *Env. Toxicol. Water Qual.*, 13: 117-126.
- Medina, E., 1977. *Introducción a la ecofisiología vegetal*, Ed. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington, D.C.
- Menzer, R., Lewis, M., Fairbrother., 1994. Methods in environmental toxicology en *Principles and methods of toxicology*, Hayes, W., 3era ed., Ed. Haven Press Ltd., New York, pp.1391-1418.
- Narro, E., 1994. *Física de suelos*, Ed. Trillas, México, pp.15-30.
- Neuhauser, E., Callahan, C., 1990. Growth and reproduction of the earthworm *Eisenia foetida* exposed to sublethal concentrations of organic chemicals, *Soil. Biol. Biochem.*, 22:2:175-179.
- Neuhauser, E., Loehr, R., Malecki, M., Milligan, D., Durkin, P., 1985. The toxicity of selected organic chemicals to the earthworm *Eisenia fetida*, *J. Environ. Qual.*, 14:3:383-388.
- Norma Mexicana NMX-AA-112-1995-SCFI "Análisis de agua y sedimentos - evaluación de toxicidad aguda con *Photobacterium phosphoreum* - Método de prueba", Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, 1996.
- Osmond, C., Austin, M., Berry, J., Billings, W., Boyer, J., Dacey, J., Nobel, P., Smith, S., Winner, W., 1987. Stress physiology and the distribution of plants, *Bioscience*, 37:1: 38-48.
- PEA, 1998. Manual de Operaciones, Hansatech, Ltd., pp.1-55.
- Pearcy, R., Björkman, O., Caldwell, M., Keeley, J., Monson, R., Strain, B., 1987. Carbon gain by plants in natural environments, *Bioscience*, 37:1: 21-29.
- Peterson, M., Horst, G., Shea, P., Comfort, S., 1998. Germination and seedling development of switchgrass and smooth brome grass exposed to 2,4,6-trinitrotoluene, *Env. Pollution*, 99: 53-59.
- Pisanty-Levy, J., 1993. Mexico's environmental assesment experience, *Environ. Impact. Assess. Rev.*, 13:267-272.

- Poorter, H., 1989. Plant growth analyses: towards a synthesis of the classical and the functional approach, *Physiol. Plant.*, 75: 237-2444.
- Poorter, H., Remkes, C., 1990. Leaf area ratio and net assimilation rate of 24 wild species differing in relative growth rate, *Oecologia*, 83: 553-559.
- Rönnpapel, K., Lib, W., Ahlf, W., 1995. Microbial bioassays to assess the toxicity of soil-associated contaminants, *Ecotox. Env. Saf.*, 31: 99-103.
- Ross, P., Allen, G., Greene, M., 1999. Interlaboratory precision study of a whole sediment toxicity test with the bioluminiscent bacterium *Vibrio fischeri*, *Env. Toxicol.*, 14: 339-345.
- Ryan, J., Bell, R., Davidson, J., OConnor, 1988, Plant uptake of non-ionic organic chemicals from soils, *Chemosphere*, 17:12: 2299-2323.
- Salanitro, J., Huesemann, M., Moore, K., Rhodes, I., Rice Jackson, L., Vipond, T., Western, M., Wisniewski, H., 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment, *Environ. Sci. Technol.*, 31: 1769-1776.
- Salisbury, F., 1991. *Plant physiology*, 4ta. ed., Ed. Wadsworth Publishing Company, U.S.A., pp.297-330.
- Sánchez, P., 1976. *Properties and management of soils in tropics*, Ed. John Willey and Sons, Inc., U.S.A., pp.1-30
- Satchell, J., Dottie, D., 1984. Factors affecting the longevity of earthworms stored in peat, *J. Appl. Ecol.*, 21: 285-291.
- SEDUE, 1986. *La evaluación del impacto ambiental: Herramienta para prevenir el deterioro significativo del medio*, México.
- Sheldrick, B., Wang, C., 1993. Particle size distribution en Soil sampling and methods of analysis editado por Martin Carter, Ed. Lewis Publishers, U.S.A., pp. 507-510
- Siciliano, S., Germida, J., Headley, J., 1997, Evaluation of prairie grass species as bioindicators of halogenated aromatics in soil, *Env. Toxicol. Chem.*, 6: 3: 521-527.
- Sköt, M., 1995. Ecotoxicological testing, *Land contamination & reclamation*, 3 (4 special issue), 3-20.
- Strasser, R., Srivastava, A., Govindjee, 1995. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria, *Photochem. Photobiol.*, 61, 1, 32-42.
- Sugiura, K, Ishihara, M., Shimauchi, T., Harayama, S., 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil, *Environ. Sci. Technol.*, 31: 45-51.
- Svenson, A., Zhang, L., 1995. Acute aquatic toxicity of protolyzing substances studied as the microtox effect, *Ecotox. Env. Saf.*, 30: 283-288.

- Tan, K., 1994. *Enviromental soil science*, Ed. Marcel Dekker Inc., U.S.A., pp. 5-35.
- Tang, J., Carroquino, M., Robertson, B., Alexander, M., 1998. Combined effect of sequestration and bioremediation in reducing the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil, *Environ Sci, Technol.*, 32: 3586-3590.
- Tobin, A., 1992. *Plant organelles: compartmentation of metabolism in photosynthetic cells*, Ed. Cambridge University, Press, Gran Bretaña, pp. 300-303.
- Udo, E.J., Fayemi, A., 1975. The effect of oil pollution of soil on germination, growth and nutrient uptake of corn, *J. Environ. Qual.*, 4: 4: 537-539.
- USEPA, 1995. Method SW-846, Test Methods for evaluating solid waste.
- USEPA, 1996a. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101) EPA 712-C-153, *Ecological Effects Test Guidelines*, OPPTS850.4100, Terrestrial Plant Toxicity Tier I (seedling emergence).
- USEPA, 1996b. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7104) EPA C-96-167, *Ecological Effects Test Guidelines*, OPPTS850.6200, Earthworm Subchronic Toxicity Test.
- USEPA, 1998. Risk Handbook, pp.1-30.
- van Gestel, C., Wei-chun M., 1990. An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies, *Chemosphere*, 21:8: 1023-1033.
- van Straalen, N., van Gestel, C., 1993. Soil invertebrates and microorganisms en *Handbook of Ecotoxicology*, 1993, editado por Peter Calow, Vol. I, Ed. Blackweel Scientific Publications, Gran Bretaña, pp. 251-277.
- Wagner, C., Lockke, H., 1991. Estimation of ecotoxicological protection levels from NOEC toxicity data, *Wat. Res.*, 25:10:1237-1242.
- Walsh, G., 1991. Use of marsh plants for toxicity testing of water and sediment en *Plants for toxicity assesment*, Vol.II, ASTM STP 1115. EPA/600/a-92/121, Ed. ASTM, Filadelfia, pp. 341-354.
- Wang, W., Freemark, K., 1994. The use of plants for environmental monitoring and assessment, *Env. Toxicol. Saf.*, 36:289-301.
- Webber, M., Pietz, R., Granato, T., Svoboda, M., 1994. Plant uptake of PCBs and other organic contaminants from sludge-treated coal refuse, *J. Env. Qual.*, 23:1019-1026.
- Weisman, W., 1998. Analysis of petroleum hydrocarbons in environmental media, Vol. I, Ed. Amherst Scientific Publishers, pp.3-6,16-18.

Wild, S., Jones, K., 1992. Polynuclear aromatic hydrocarbons uptake by carrots grown in sludge-amended soil, *J. Env. Qual.*, 21:217-225.