

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**IZTAPALAPA**



*Casa abierta al tiempo*  
*División de Ciencias Biológicas y de la Salud*

**Ecotoxicidad y biodisponibilidad de los productos de oxidación avanzada en  
suelos intemperizados con hidrocarburos.**

**T E S I S**

Para obtener el grado de Maestra en Biotecnología.

**PRESENTADA POR**

Ing. Sara Lena Jiménez Tenorio

**Director de Tesis:** Dr. Mariano Gutiérrez-Rojas.

**México D. F.    Abril 2010.**

**La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad del CONACyT y además contó con apoyo del mismo consejo, con el No. de Registro 142331.**

México D.F. a \_\_\_\_\_

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa  
aprobó la tesis

**Ecotoxicidad y biodisponibilidad de los productos de oxidación avanzada en suelos  
intemperizados con hidrocarburos.**

Que presentó

Ing. Sara Lena Jiménez Tenorio.

Comité tutorial:

**Director:** Dr. Mariano Gutiérrez Rojas. Dpto. de Biotecnología UAM-I.

**Asesor:** Dr. Alberto Soria López. Dpto. de IPH UAM-I.

**Asesor:** Dr. Francisco Cruz Sosa. Dpto. de Biotecnología UAM-I.

Jurado:

Presidente: Dr. Francisco Cruz Sosa

\_\_\_\_\_

Secretario: Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda

\_\_\_\_\_

Vocal: Dr. Alberto Soria López

\_\_\_\_\_

Vocal: Dra. Mayola García Rivero

\_\_\_\_\_

---

## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS.**

---

Esta tesis esta dedicada a mi familia. Especialmente a mi esposo y a mi hijo. Con todo mi amor a: **Arturo y Rodrigo**, por darme las fuerzas y motivación para lograr mis metas.

Agradezco a mi esposo creer en mí, brindándome todas las facilidades para continuar. A mis asesores y maestros, así como a todas las personas que han contribuido en este trabajo con su apoyo, consejos y orientación.

Al **Dr. Mariano Gutiérrez Rojas**, por su paciencia y buenos consejos en la realización de esta tesis. A la **Dra. Tania Volke Sepúlveda**, por su enseñanza y disponibilidad. Al **Dr. Francisco José Fernández Perrino**, por su gran apoyo.

A mis ex-compañeros del W-108, por: compartir su experiencia, motivar mi superación y brindarme su amistad. Un agradecimiento muy especial a todo el personal del CENICA, que durante el tiempo en que realicé el trabajo experimental de esta tesis, me abrieron las puertas de sus instalaciones y de sus vidas haciéndome sentir en familia, en especial a la **Dra. Laura Franco**, y a mi querida amiga **Diana Flor**, donde quiera que estén.

A **Violeta Luna**, por su excelencia e incansable lucha por buscar soluciones y motivarnos a todos en el posgrado para seguir adelante.

A todos y cada uno de mis nuevos y viejos amigos, que a través del tiempo me regalaron: sonrisas, momentos amenos, palabras de aliento y apoyo incondicional.

Y a todos los que de alguna forma, hicieron posible la realización de este proyecto.

## RESUMEN.

El impacto ambiental que genera el derrame de hidrocarburos en el suelo ha impulsado diferentes temas de investigación en torno a la solución del problema, que radica principalmente en la baja eficiencia de la biorremediación de suelos intemperizados debido a que los contaminantes, entre otros factores, no se encuentran lo suficientemente biodisponibles. Se ha encontrado que algunos tratamientos de remediación pueden generar intermediarios más ecotóxicos que los contaminantes originales, por esta razón la degradación de compuestos intermedios debe ser evaluada utilizando bioensayos que permitan poner en evidencia los cambios de la toxicidad de los sistemas de remediación. Esta tesis aborda una exploración de la ecotoxicidad de los productos de diversas oxidaciones avanzadas (fotólisis, fotocátalisis y peroxidación) en suelo contaminado con hidrocarburos, como una opción para la remediación e incremento de la biodisponibilidad de los hidrocarburos en suelos intemperizados. Como unidad experimental se utilizaron muestras de 5 g de suelo intemperizado con hidrocarburos en cajas de Petri, los tratamientos fotoquímicos se hicieron usando una lámpara de mercurio dentro de un sistema cerrado con aireación y agitación angular, en los ensayos de peroxidación se omitió tanto la agitación como la aireación. Se realizaron varios diseños factoriales, con diferentes variables: la humedad del suelo (0 y 30% v/p), el tiempo de exposición a la radiación Ultra Violeta (UV) (3, 8, 24 y 40 h), cantidad de fotocatalizador (0, 0.3 y 0.6 g de  $\text{TiO}_2$ ) y la presencia y ausencia del  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se encontró que la irradiación fotolítica, durante 24 h en 3 fotoperíodos de 8 h en suelo intemperizado con hidrocarburos, genera un incremento significativo de 1:7 en la solubilidad de los productos de la reacción respecto al control. Se encontró que utilizando 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 10%, en ausencia de irradiación UV, se produce en el suelo intemperizado con hidrocarburos el mejor tratamiento de entre los probados, generando un incremento de hasta de 33 veces en la solubilidad de los productos respecto al control. El mejor tratamiento aquí probado se magnificó para obtener cantidades suficientes de suelo tratado para realizar bioensayos ecotoxicológicos con *Eisenia foetida*, *Daphnia magna* y un consorcio nativo proveniente de una zona de derrame de petróleo. En la sección de resultados se muestran y discuten datos alentadores para continuar con la exploración de las oxidaciones avanzadas en suelos intemperizados con hidrocarburos como tratamiento previo o complementario a la biorremediación.

---

## ABSTRACT.

---

The environmental impact produced by hydrocarbon spills to the soil has impelled different research subjects. In order to solution the problem, this is mainly the low efficiency of the bioremediation of aged soils, because the polluting agents low bioavailability. It has been occurred that some remediation treatments can generate intermediaries more toxics to the environment, than those originally polluting agents; therefore, intermediate compounds degradation must be evaluated using bio-assays that allow to put in evidence the changes of toxicity of the remediation systems. This thesis approaches to an exploration of the ecotoxicity of products of diverse advanced oxidations (photolysis, photocatalysis and peroxidation) in aged hydrocarbon contaminated soils as an important option to remediate by increasing the bioavailability of contaminating hydrocarbons. Our experimental unit was constituted of samples of 5 g of dry hydrocarbon contaminated aged soils in Petri dishes. The photochemical treatments were done using a mercury side lamp within a closed system provided with ventilation and angular agitation. During the peroxidation tests agitation and ventilation were omitted. Several factorial designs were performed, with different variables: the soil moisture (0 and 30% v/w), the exposure time to Ultra Violet radiation (UV) (3, 8, 24 and 40 h), the amount of photocatalysts (0, 0.3 and 0.6 g of TiO<sub>2</sub>) and the presence and absence of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. We found that the photolytic irradiation, during 24 h in 3 photoperiods of 8 h in aged hydrocarbons soils, generates a significant increase of 1:7 in the solubility of reaction products with respect to the control. We also found that using 10 mL of 10% diluted H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the absence of UV irradiation was the best treatment among those assayed in our experimental units, generating an increase up to 33 times the product solubility with respect to the control. Once found the best treatment, the experiment was scaled-up to obtain enough amounts of treated soil to perform the respective ecotoxicological bio-assays with *Eisenia foetida*, *Daphnia magna* and a native mixed microorganism consortium coming from the petroleum spill site. In results section we show and discuss encouraging data to continue with the exploration of the advanced oxidations techniques in hydrocarbon contaminated aged soils probably able to previous or complementary treatment to bioremediation.

## ÍNDICE GENERAL.

TÍTULO	Página
RESUMEN-----	3
ABSTRACT-----	4
ÍNDICE GENERAL-----	5
ÍNDICE DE TABLAS-----	8
ÍNDICE DE FIGURAS-----	9
1.-INTRODUCCIÓN-----	10
2.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA-----	11
2.1.- Características del suelo.-----	11
2.2 .- Intemperización y biodisponibilidad.-----	12
2.3.- Composición de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP).-----	13
2.4- Toxicidad de los HTP y HAP.-----	14
2.5.- Biorremediación de suelos-----	14
2.5.1.- Ventajas-----	16
2.5.2.- Desventajas-----	16
2.6.- Procesos de oxidación avanzada para el tratamiento de suelos.-----	17
2.6.1.- Fotólisis directa.-----	20
2.6.2.- Fotosensibilización.-----	21
2.6.3.- Fotocatálisis con dióxido de titanio (TiO <sub>2</sub> ).-----	22
2.6.4.- Peroxidación y reacción de Fenton.-----	23
2.7.- Ecotoxicología.-----	24
2.7.1.- Bioensayos.-----	25
2.7.2.- <i>Daphnia magna</i> .-----	26
2.7.3.- <i>Eisenia foetida</i> .-----	27
2.7.4.- Bioensayos con microorganismos.-----	28
3.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.-----	29
3.1.- Hipótesis-----	29

3.2.- Objetivos.....	29
3.2.1.- General.....	29
3.2.2.- Específicos.....	29
4.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
4.1.- Estrategia de trabajo.....	30
4.2.- Suelo problema.....	32
4.2.1.- Capacidad de campo.....	32
4.2.2.- pH.....	32
4.2.3.- Hidrocarburos totales del petróleo (HTP).....	32
4.3.- Sistema de irradiación y condiciones de operación.....	33
4.3.1- Temperatura de irradiación. ....	34
4.3.2.- Fotólisis directa y fotocátalisis sin agua.....	34
4.3.3.- Fotólisis directa y fotocátalisis con agua.....	35
4.3.4.- Fotosensibilización y peroxidación.....	36
4.4.- Análisis por espectrofotometría infrarroja (IR).....	38
4.5.- Lixiviación.....	39
4.6.- Análisis del carbono orgánico total (COT) soluble.....	39
4.7.- Bioensayos.....	40
4.7.1.- <i>Daphnia magna</i> .....	40
4.7.2.- <i>Eisenia foetida</i> .....	41
4.7.3.- Microorganismos.....	41
4.8.- Análisis de HTP por cromatografía de gases.....	43
4.9.- Análisis estadísticos.....	43
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
5.1.- Caracterización del suelo en estudio.....	44
5.1.1.- Capacidad de campo y pH.....	44
5.1.2.- Cuantificación de HTP.....	44
5.2.- Determinación de las condiciones de reacción.....	45
5.2.1.- Temperatura de irradiación.....	46

5.2.2.- Cinéticas de evaporación.-----	47
5.3.- Evaluación de los tratamientos de oxidación abiótica.-----	47
5.3.1.-Fotólisis y fotocátalisis sin agua.-----	47
5.3.2.-Fotólisis y fotocátalisis con agua.-----	49
5.3.2.1.- Resultados en índice de carbonilos y en solubilidad.-----	50
5.3.3.- Fotosensibilización y peroxidación.-----	51
5.3.3.1.- Cinética de reacción del peróxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).-----	52
5.3.3.2.- Índice carbonilo y carbono soluble.-----	53
5.4.- Evaluación ecotoxicológica.-----	56
5.4.1.- Bioensayo con <i>Daphnia magna</i> .-----	56
5.4.2.- Bioensayo con <i>Eisenia foetida</i> .-----	58
5.4.3.- Bioensayo con microorganismos.-----	60
6.- CONCLUSIONES.-----	65
7.- RECOMENDACIONES.-----	66
9.- REFERENCIAS.-----	67

## ÍNDICE DE TABLAS.

1.- Longitudes de onda de disociación en los hidrocarburos aromáticos polinucleados (HAP) y algunos enlaces frecuentes en hidrocarburos.-----	18
2.- Reacciones de oxidación avanzada, que ocurren durante la etapa de iniciación.-----	19
3.- Matriz factorial de fotólisis y fotocátalisis en ausencia de agua.-----	35
4.- Diseño experimental de de fotólisis y fotocátalisis variando la humedad y TiO <sub>2</sub> .-----	35
5.- Diseño experimental de tratamientos de fotosensibilización (con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y 3 h de irradiación) y peroxidación.-----	38
6.- Formulación del agua reconstituida.-----	40
7.- Composición del suelo artificial.-----	41
8.- Composición del medio nutritivo.-----	42
9.- Comparación de medias estadísticas (Tukey) de Índices carbonilo (IC) obtenidos por fotólisis y fotocátalisis en muestras de suelo seco Intemperizado con HTP. -----	48
10.- Comparación de medias estadísticas (Tukey) de IC de fotólisis y fotocátalisis en suelo a la humedad de campo después de 3 horas de tratamiento.-----	49
11.- Comparación entre medias estadísticas (Tukey) de carbono soluble (ppm) en muestras de suelo intemperizado con HTP, tratadas por fotólisis y fotocátalisis, a la humedad de campo después de 3 h de irradiación.-----	50
12.- Comparación de medias estadísticas (Tukey), del efecto de los fototratamientos, en suelo seco y a humedad de campo, sobre la producción de carbono soluble.-----	51
13.- Comparación (Tukey) del efecto de tratamientos de peroxidación y fotosensibilización, sobre el IC en muestras de un suelo contaminado con hidrocarburos.-----	53
14.- Análisis estadístico (Tukey) del contenido de carbono orgánico total soluble (COT) de los productos de los diferentes tratamientos de peroxidación, fotosensibilización y sus controles.-----	54

## ÍNDICE DE FIGURAS.

1.- Representación esquemática de la sorción de hidrocarburos en la matriz del suelo.-----	12
2.- Energía de disociación de fuerzas intermoleculares y ruptura de enlaces.-----	20
3.- Ejemplar de <i>Daphnia magna</i> , observado al microscopio.-----	27
4.- Ejemplar de <i>Eisenia foetida</i> .-----	27
5.- Estrategia general de trabajo.-----	31
6.- Fotografía del sistema de irradiación utilizado para tratar muestras de suelo.-----	33
7.- Longitud de onda que recibe la muestra con y sin filtración Pyrex.-----	36
8.- Termoestabilidad de las reacciones fotoquímicas en el tiempo.-----	46
9.- Cinética de evaporación de agua en los sistemas fotocatalíticos abiertos y cerrados.-----	47
10.- Cinética del peróxido de hidrógeno activo en contacto con los HTP del suelo.-----	52
11.- Porcentaje de sobrevivencia de <i>D. magna</i> en lixiviados de suelo contaminado con HTP sin tratar.-----	57
12.- Porcentaje de sobrevivencia de <i>D. magna</i> en lixiviados de productos de la peroxidación de un suelo contaminado con hidrocarburos.-----	58
13.- Porcentaje de sobrevivencia de <i>E. foetida</i> en suelo intemperizado con HTP sin tratamiento.-----	59
14.- Porcentaje de sobrevivencia de <i>E. foetida</i> en función de la porción de suelo peroxidado.-----	59
15.- Cinética de consumo de glucosa.-----	60
16.- Cinética de coeficientes respiratorios (CR) de diferentes mezclas de suelo contaminado con hidrocarburos, inoculadas con un consorcio microbiano.-----	62
17.- Cinética de CO <sub>2</sub> de diferentes mezclas de suelo contaminado con hidrocarburos, inoculadas con un consorcio microbiano.-----	63
18.- Cinética de O <sub>2</sub> de diferentes mezclas de suelo contaminadas con hidrocarburos, inoculadas con un consorcio microbiano.-----	64

## 1 INTRODUCCIÓN.

La explosión demográfica mundial de los últimos 200 años se ha incrementado exponencialmente (Semple y col. 2001) y con ella el consumo *per-capita* promedio de recursos naturales y de los combustibles fósiles (Petróleo) (Ogunseitan, 2003). Esto último se ha convertido en una de las mayores amenazas para el ambiente por el severo daño que generan los derrames de hidrocarburos del petróleo a los ecosistemas (Barathi y Vasudevan, 2003). La economía mexicana depende fuertemente de la industria petrolera (PEMEX), que abarca la exploración, producción, transformación, almacenamiento y distribución de petróleo crudo y sus fracciones (Iturbe y col. 2007). Más del 30% de los oleoductos mexicanos han operado por más de 30 años y se estima que el tiempo de vida útil de un oleoducto está entre 25 y 30 años (Iturbe y col. 2007). Es sabido que aún con el manejo adecuado de los oleoductos, éstos son susceptibles a dañarse por la corrosión, interna y externa, que provocan filtraciones de hidrocarburos, que no siempre son detectadas rápidamente (Reid y col. 2001). Se estima que en México, el 80% de los derrames que ocurren cerca de oleoductos están relacionados con perforaciones clandestinas (Iturbe y col. 2007) que ocasionan la contaminación directa de suelos y mantos acuíferos como consecuencia de la lixiviación de los hidrocarburos (Barathi y Vasudevan, 2003). Con base en la gravedad de los efectos ecológicos provocados por la contaminación de suelos con hidrocarburos a nivel mundial, incluido nuestro país, se ha incrementado el interés por encontrar e implementar tecnologías innovadoras de remediación que permitan limpiar los suelos contaminados con hidrocarburos y reestablecer los ecosistemas terrestres que se están perdiendo (Ripley y col. 2002).

En esta tesis se hicieron ensayos con varias técnicas de oxidación avanzada en suelos intemperizados con hidrocarburos, proponiendo estos tratamientos como una alternativa previa a la biorremediación. Se propiciaron reacciones fotoquímicas (fotólisis, fotocátalisis y fotosensibilización), y peroxidación. Los resultados de los éstos tratamientos se analizaron a través de las variaciones en los estados de oxidación y solubilidad de los contaminantes y se evaluó el impacto ecotoxicológico de la propuesta de oxidación abiótica, mediante bioensayos con *Daphnia magna*, *Eisenia foetida*, y un consorcio microbiano adaptado al consumo de hidrocarburos (por respirometría).

## **2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.**

### **2.1 Características del suelo.**

Baker y Herson (1994) describen el suelo como un recurso natural que reside en la superficie terrestre. El suelo se clasifica por su tamaño de partícula o textura en arenoso, limoso y arcilloso. Las partículas de arena tienen un tamaño de 0.005 a 2 mm, las de limo van de 0.002 a 0.05 mm y las de arcilla se encuentran en un rango menor a 0.002 mm. Los suelos con mayor capacidad de retención de agua son los suelos arcillosos, los suelos limosos tienen una gran capacidad para retener agua disponible y los suelos arenosos, dado su tamaño de partícula, facilitan el movimiento del aire y del agua libre (Baker y Herson, 1994).

El agua en un suelo, se puede encontrar en tres formas: libre, ligada y capilar. El agua libre se refiere al agua que se mueve a través de los macroporos del suelo por fuerzas gravitacionales (lixiviación) hasta mantos acuíferos. El agua capilar es el agua que se encuentra en los microporos, ésta depende de la textura del suelo y determina la capacidad de campo en el suelo, que es la humedad que se retiene establemente en el suelo después de dos o tres días de lluvia o riego intenso (Ortiz y Ortiz, 1990). El agua ligada, es el agua que está enlazada a la matriz del suelo por puentes de hidrógeno o interacciones dipolo y no está disponible biológicamente (Baker y Herson, 1994).

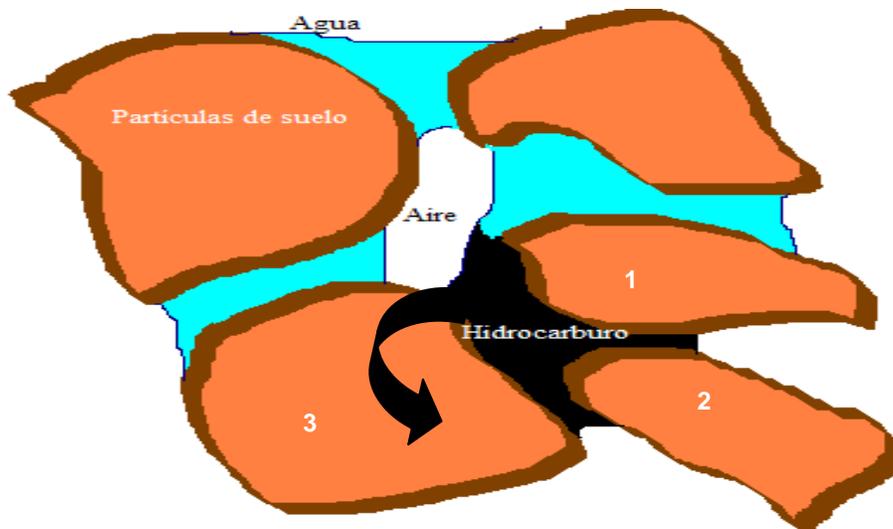
El suelo es un recurso no ilimitado y su contaminación genera impactos negativos a nivel ecológico y económico (Ortiz y Ortiz, 1990). Técnicamente el suelo es un sistema complejo heterogéneo que consta de cuatro fases: (i) gaseosa, (ii) líquida, (iii) fase formada por sólidos inorgánicos y (iv) fase formada por sólidos orgánicos. Un contaminante orgánico se distribuye entre las cuatro fases del suelo dependiendo de su solubilidad, volatilidad y fuerza iónica, por lo que la interacción del contaminante con las fases del suelo puede hacer a un compuesto orgánico más o menos biodisponible (susceptible al tratamiento biológico) (Mougin, 2002).

En México existe actualmente una gran cantidad de sitios contaminados por industrias como la petroquímica (Volke y Velasco, 2002). La contaminación de suelos con hidrocarburos se genera por diversas causas: como la ruptura de oleoductos, almacenamiento, accidentes en el transporte y por trabajos de perforación (Barathi y Vasudevan, 2003). En el siguiente

párrafo se explican los efectos de la intemperización del suelo contaminado con hidrocarburos y la biodisponibilidad de los contaminantes.

## 2.2 Intemperización y biodisponibilidad.

En suelos contaminados por largos períodos, es decir intemperizados, los contaminantes tienden a ser menos biodisponibles para los microorganismos que se desarrollan entre los contaminantes y la materia orgánica del suelo (García y col. 2002). El fenómeno de intemperización, producido por el paso del tiempo, en el caso de los hidrocarburos, favorece la volatilización de las fracciones más ligeras y la lixiviación de los compuestos solubles, además de que los compuestos que forman parte de los hidrocarburos presentan cambios físicos y químicos. Entre los cambios físicos se encuentran los fenómenos de sorción de los hidrocarburos en la matriz del suelo (Huey-Min y col. 2007). Los mecanismos de sorción (Figura 1) incluyen la adsorción, que es la atracción de un compuesto hacia una superficie sólida, y la absorción, que es la penetración de un contaminante en un sólido (Volke y Velasco, 2002).



**Figura 1.** Representación esquemática de la sorción de hidrocarburos en la matriz del suelo. En las partículas 1 y 2 se observa el fenómeno de adsorción; en la partícula 3 se muestra un ejemplo de absorción y adsorción.

La sorción es producida por la afinidad entre los suelos y compuestos primordialmente no polares (Huey-Min y col. 2007). Entre los cambios químicos generados por intemperización, de los hidrocarburos, se encuentran los producidos por el metabolismo microbiano, que dependen tanto de factores ambientales como de la resistencia de los contaminantes al ataque microbiano.

Los hidrocarburos como contaminantes de un suelo pueden encontrarse sorbidos, pero también pueden formar parte de líquidos inmiscibles en agua llamados “líquidos de fase líquida no acuosa”; en esta fase, la capacidad para la biodegradación de los contaminantes puede ser drásticamente reducida (Mougin, 2002). En la Figura 1 se muestra esquemáticamente el fenómeno de sorción que, como explica Gutiérrez-Rojas (2000), origina que los contaminantes sean físicamente menos accesibles a la degradación microbiana, es decir, menos biodisponibles debido a un fenómeno llamado “secuestro”. Así cuando la tasa de degradación de un contaminante es lenta, éstos son llamados “recalcitrantes” o “persistentes” (Mougin, 2002).

El comportamiento de un contaminante en el suelo, así como la efectividad de una tecnología de remediación, están determinadas por una variedad de factores que interactúan de manera compleja y que dependen de las características propias del contaminante (Volke y Velasco, 2002). Por esta razón es importante conocer la composición de los hidrocarburos totales del petróleo que se detalla a continuación.

### **2.3 Composición de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP).**

El petróleo crudo es una mezcla compleja que contiene cientos de hidrocarburos diferentes y su composición relativa generalmente se clasifica en cuatro fracciones: asfaltenos, alifáticos, aromáticos y polares (Díaz-Ramírez y col. 2008), que en su conjunto, se conocen como hidrocarburos totales del petróleo (HTP). Estos compuestos se formaron a partir de biomasa bajo la superficie geológica en condiciones altas de temperatura y presión (Reid y col. 2001). Los asfaltenos son la fracción más pesada del petróleo crudo y la más recalcitrante (Johansson y col. 2008) e incluso se pueden considerar no biodegradables (Díaz-Ramírez y col. 2008). Los hidrocarburos alifáticos o saturados son los alcanos lineales, ramificados y cíclicos. De acuerdo con los trabajos realizados por D’Auria y col. (2009), los hidrocarburos alifáticos son más susceptibles a la degradación que los compuestos aromáticos. Estos últimos contienen uno o más anillos aromáticos fusionados, que pueden formar compuestos

monoaromáticos simples, tales como el benceno y tolueno, o hidrocarburos aromáticos polinucleados (HAP), como el naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno (Mougin, 2002). Los hidrocarburos polinucleados son termodinámicamente estables y altamente hidrofóbicos (Negri y col. 2004), muchos de ellos presentan una baja volatilización y sensibilidad a la fotólisis, lo que los hace persistentes a la mayoría de las condiciones naturales (Mougin, 2002). La fracción polar está formada por compuestos que contienen algún hetero-ión polar como el nitrógeno, azufre y oxígeno (Reid y col. 2001); esta fracción se caracteriza por tener un bajo peso molecular y se volatiliza cuando el suelo es intemperizado (García y col. 2002).

#### **2.4 Toxicidad de los HTP y HAP.**

Los HTP se han encontrado como contaminantes en el suelo, aire, agua e, incluso, en alimentos expuestos. Éstos se absorben en el cuerpo humano cuando entran en contacto con la piel, por inhalación o por ingestión. De las fracciones de los HTP, los HAP son los contaminantes más ampliamente estudiados por su potencial toxicidad y son los de mayor prioridad para la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) (Mougin, 2002), ya que tienen efectos de toxicidad aguda y crónica (Negri y col. 2004). Se sabe que estos compuestos son potencialmente carcinogénicos para los mamíferos, y mutagénicos o teratogénicos en bacterias y células animales, pueden también inducir inmunodepresión y un alto potencial de biomagnificación (Mougin, 2002) por su persistencia en el ambiente (Negri y col. 2004). Una vía ampliamente abordada para solucionar el grave impacto que estos contaminantes generan al ambiente es la biorremediación, que se explica a continuación.

#### **2.5 Biorremediación de suelos.**

El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (principalmente plantas, hongos y bacterias) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos (Volke y Velasco, 2003). A continuación se describen algunas estrategias de biorremediación aplicables a suelos contaminados con hidrocarburos:

**1) El sistema de remediación de biolodos.** Es un proceso ex-situ que se realiza en un biorreactor, mezclando el suelo húmedo contaminado (10 o 50%) con microorganismos. Así se favorece el contacto entre la biomasa microbiana y los contaminantes, acelerando su

degradación. Los biorreactores pueden usarse para tratar suelos heterogéneos y poco permeables, o cuando es necesario disminuir el tiempo de tratamiento (Volke y Velasco, 2002).

**2) Composteo.** En este proceso generalmente participan microorganismos que son parte de la flora natural de los sustratos orgánicos así como del suelo; se pueden adicionar compuestos orgánicos como desechos domésticos, agrícolas, lodos industriales y estiércol (Volke y Velasco, 2003). Cuando los microorganismos degradan la materia orgánica producen una elevación de la temperatura, por que el calor metabólico que generan se atrapa en la matriz de la composta. Se controlan las condiciones de: aerobiosis, humedad (40 y el 75%) y temperatura (Semple y col. 2001). El composteo es un proceso biológico controlado, por el cual pueden tratarse suelos y sedimentos contaminados con compuestos orgánicos biodegradables, como los hidrocarburos del petróleo, para obtener subproductos inocuos estables (Volke y Velasco, 2002).

**3) Bioaugmentación.** La bioaugmentación consiste en la adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante en cuestión, para promover su degradación o su biotransformación (Volke y Velasco, 2002). Muchos microorganismos que forman parte de la microflora de suelos contaminados con hidrocarburos (nativos o endémicos), son capaces de utilizarlos como fuente de carbono. Pueden aplicarse como cultivos puros, y adicionarse a suelos contaminados; algunas cepas microbianas pueden cometabolizar varios hidrocarburos. Este mecanismo de remoción de hidrocarburos en suelo es uno de los más importantes (Negri y col. 2004) por que pueden degradarse diversos hidrocarburos (Barathi y Vasudevan, 2003).

**4) Bioestimulación.** Los tratamientos de biorremediación pueden volverse más eficientes mediante la implementación reestrategias como la bioestimulación, que consiste en la adición de factores limitantes para el crecimiento microbiano, como nutrientes y aceptores de electrones que estimulan el metabolismo y la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores, acelerando las tasas de biodegradación en condiciones ambientales favorables (Vallejo y col. 2005).

### 2.5.1 **Ventajas**

Generalmente se considera a las tecnologías de biorremediación para el tratamiento de sitios contaminados, más efectivas que los métodos fisicoquímicos, por ser más económicas (Semple y col. 2001); además de otras ventajas como las siguientes: (i) sencillas de implementar; (ii) ambientalmente seguras; (iii) los contaminantes se destruyen o transforman; (iv) generalmente no se requieren tratamientos adicionales (VolKe y Velasco, 2003); (V) son efectivos en cuanto a costos y (VI) puede aplicarse tanto *in situ* como *ex situ* (VolKe y Velasco, 2002). Sin embargo, la biorremediación tiene algunas desventajas que se explican a continuación.

### 2.5.2 **Desventajas**

La biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos también presenta algunas desventajas. Una de ellas es que estos procesos no solo reducen la concentración inicial de los contaminantes, si no que también pueden formar productos intermediarios más ecotóxicos que los originales, afectando la eficiencia de la biorremediación (Barathi y Vasudevan, 2003). Un ejemplo de lo anterior es la activación de algunos hidrocarburos aromáticos por acción de reacciones enzimáticas, produciendo epóxidos dióxicos y radicales libres catiónicos que dañan el ADN; estas reacciones pueden provocar mutagénesis, carcinogénesis y/o toxicidad (Huey-Min y col. 2007). Además, la tasa de biorremediación en ocasiones es limitada por la dificultad para controlar algunos factores ambientales, tales como (Mouguin, 2002): la disponibilidad de oxígeno molecular, la temperatura ambiental, disponibilidad de agua, disponibilidad de nutrientes, pH del suelo y la biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo (Ripley y col. 2002). Es por esta razón que cobra importancia la investigación acerca de técnicas alternativas a la biorremediación para mitigar de forma efectiva el problema de la contaminación de suelos con hidrocarburos, con el fin de reducir no solo su concentración sino también el efecto ecotóxico de los productos (Dagnino y col. 2008).

En esta tesis se aborda el efecto de procesos fisicoquímicos de oxidación avanzada (fotoquímica y peroxidación) sobre la mitigación de HTP en el suelo y se correlaciona con la ecotoxicidad. En los siguientes capítulos se explican algunos de los tratamientos

fisicoquímicos que pueden implementarse como una alternativa de pretratamiento para la biorremediación.

## 2.6 **Procesos de oxidación avanzada para el tratamiento de suelos.**

Las opciones abióticas para la remediación de suelos son tratamientos fisicoquímicos, generalmente más caros que los biotratamientos. Estas técnicas incluyen: la remoción de contaminantes del suelo, el lavado, la extracción con solventes y la incineración. Generalmente estas técnicas se basan en la dispersión, colección, remoción, dilución y/o secuestro de los contaminantes, limitándose a un cambio en su ubicación en el medio ambiente (Semple y col. 2001). Sin embargo, entre las ventajas del uso de tratamientos fisicoquímicos destacan los siguientes: (i) son efectivos en cuanto a costos; (ii) pueden realizarse en periodos cortos; (iii) el equipo que generalmente se utiliza, es accesible y no necesita de mucha energía ni ingeniería (Volke y Velasco, 2002). La característica común de los procesos de oxidación avanzada es la ventajosa propiedad de oxidar compuestos orgánicos con radicales libres, principalmente el hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ), producidos por diferentes vías. En solución acuosa y presencia de oxígeno, los radicales hidroxilo participan en cadenas de reacción no selectivas.

Las reacciones fotoquímicas forman parte de los procesos de oxidación avanzada y ocurren a través de la pérdida de uno o más electrones ( $e^-$ ) de una especie química, como resultado de la fotoexcitación y las reacciones de una molécula con el oxígeno, bajo la influencia de la luz; a este tipo de reacciones se les denomina fotooxidación (Kaneko y Okura, 2002). En años recientes la fotooxidación ha sido estudiada como una tecnología de remediación alternativa, ya que ofrece ciertas ventajas como: (1) trabajar a temperatura y presión ambiental; y (2) se logra la disociación de enlaces, produciendo desorción e incluso ruptura de las moléculas, hasta llegar incluso a la destrucción total de contaminantes transformándolos hasta  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y/o  $\text{HCl}$  (Lee y col. 2004).

En el caso de los HTP, éstos pueden unirse entre sí, e interactuar con las partículas del suelo mediante diferentes tipos de enlaces: (I) **covalente**, enlace formado cuando un átomo comparte electrones con otro átomo y mantiene las uniones entre sí de todos los grupos funcionales mostrados en la Tabla 1; (II) **no covalente** o iónico, se forma por la atracción de dos grupos de cargas opuestas que interactúan entre sí, por ejemplo entre un ácido carboxílico y un grupo amino; (III) **puentes de hidrógeno**, se forman cuando el protón de un

átomo de hidrógeno ( $H^+$ ) unido covalentemente a un átomo electronegativo, es atraído hacia un segundo átomo electronegativo; (IV) **atracciones de Van der Waals**, ocurren entre átomos que forman parte de moléculas de hidrocarburos que se encuentran en contacto directo; la atracción se debe a la fuerza electrostática del núcleo positivo de un átomo por la nube de electrones negativos de un átomo vecino.

La Tabla 1 muestra la energía de disociación de los HAP y algunos de los enlaces más frecuentes en hidrocarburos (Borel, 1980; Huey-Min y col. 2007). Se observa que todas las longitudes de onda se encuentran dentro del rango de la luz ultravioleta (UV), que va desde 280 a 400 nm (Huey-Min y col. 2007). Se ha encontrado que el material Pyrex, permite el paso de la región UV de los 320 a los 600 nm (Potter y Hotchkiss, 1995), reduciendo el espectro al generar un efecto de filtro.

**Tabla 1.** Longitudes de onda de disociación en los hidrocarburos aromáticos polinucleados (HAP) y algunos enlaces frecuentes en hidrocarburos.

Enlace	Longitud de onda (nm)
HAP	280 y 360
C - H	290
C - C	340
C - Cl	355
O - O	400

En la Tabla 2, se presentan algunas reacciones que forman parte de un grupo de modernas tecnologías para la remediación de contaminantes orgánicos, llamadas procesos de oxidación avanzada (Kos y col. 2007). Todas las reacciones mostradas generan radicales libres ( $\bullet O$ ,  $\bullet OH$ ,  $\bullet HO_2^{-3}$ ), que poseen un electrón desapareado y por eso son agentes oxidantes poderosos, dentro de los cuales, el principal es el radical hidroxilo que en teoría reacciona rápidamente con todos los compuestos orgánicos (Kaise y col. 1994).

La Reacción 1 es una etapa de la fotólisis del agua, las Reacciones 2, 3, 4 y 5 son reacciones fotoquímicas porque interviene la energía de la luz ( $h\nu$ ) (Kaise y col. 1994). Las Reacciones 3 y 4, son ejemplos de fotosensibilización en las que interviene el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) como fotosensibilizante (ASTM-F1524-95, 1995).

**Tabla 2.-** Reacciones de oxidación avanzada, que ocurren durante la etapa de iniciación.

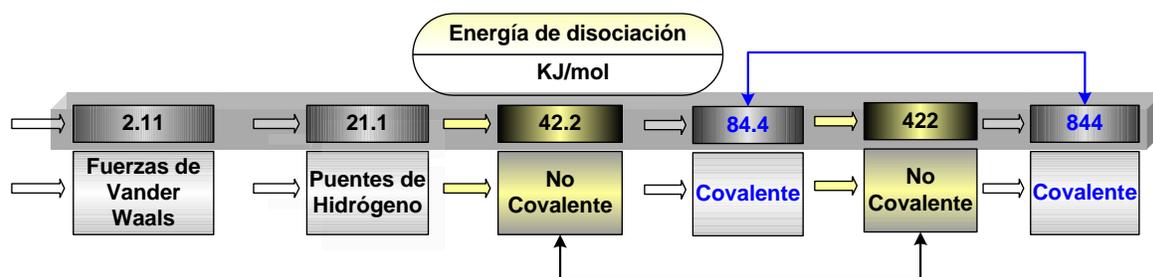
<p>1. Fotólisis del agua.</p> $\bullet \text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \bullet \text{OH}$
<p>2. Reacción fotoquímica del oxígeno molecular.</p> $2\text{O}_2 + h\nu \rightarrow 2 \bullet \text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_3 + \bullet \text{O}$
<p>3. Fotosensibilización.</p> $\text{H}_2\text{O}_2 + h\nu \rightarrow 2 \bullet \text{OH}$
<p>4. Fotosensibilización.</p> $2\text{H}_2\text{O}_2 + h\nu \rightarrow 2 \bullet \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$
<p>5. Fotocatálisis.</p> $\text{TiO}_2 + h\nu + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \bullet \text{OH} + \text{H}^+ + \text{e}^-$
<p>6. Peroxidación en presencia de ozono.</p> $2\text{O}_3 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \bullet \text{OH} + 3\text{O}_2$
<p>7. Reacción de Fenton.</p> $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \bullet \text{OH}$
<p>8. Reacción de Fenton.</p> $\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{H}^+ + \bullet \text{HO}_2$

En la Reacción 5 (ASTM-F1524-95, 1995), se muestra una reacción de fotocatálisis en presencia de dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) (ASTM-F1524-95, 1995). Las Reacciones 6 a 8 son ejemplos de reacciones de peroxidación, específicamente las Reacciones 7 y 8 son llamadas reacciones de Fenton porque interviene un metal de transición (Fe) (Mecozzi y col. 2006).

Para que la oxidación de los hidrocarburos sea favorecida a través de reacciones fotoquímicas, es necesaria cierta longitud de onda y energía. La longitud de onda genera transiciones entre los estados de los enlaces moleculares y la adecuada continuidad (tiempo

de irradiación), hace que las moléculas absorban la suficiente energía de disociación para que se dividan en dos o más fracciones (Huey-Min y col. 2007). En el caso de la Reacción 5 (Tabla 2), los reactivos deben irradiarse a 400 nm, porque es la longitud de onda a la que se excita el fotocatalizador, el TiO<sub>2</sub> (Kaneko y Okura, 2002).

En la Figura 2 se muestran esquemáticamente las regiones energéticas (KJ/ mol) que se requieren para disociar fuerzas intermoleculares (Chang, 2007) y romper diversos tipos de enlaces de acuerdo con su naturaleza química (Colby, 1996). Se puede observar que los rangos energéticos necesarios para romper enlaces covalentes y no covalentes se traslapan, y que además son los que requieren mayor cantidad de energía para romperse.



**Figura 2.-** Energía de disociación de fuerzas intermoleculares y ruptura de enlaces. En los enlaces covalente y no covalente, se indica el rango energético que se requiere para romper este tipo de enlaces mediante unas flechas que ligan el inicio y el final del rango.

En esta tesis se trabajó con reacciones fotoquímicas (fotólisis directa, fotosensibilización y fotocatalisis) y de oxidación, utilizando peróxido de hidrógeno, con el objeto de favorecer la degradación o transformación de moléculas de HTP en fragmentos de peso molecular más bajo. Cada uno de estos procesos se describe a continuación.

### 2.6.1 Fotólisis directa.

La fotólisis se define como la ruptura de un enlace inducida por la luz, ésta requiere una sobreposición entre el espectro que necesita la molécula para reaccionar y la emisión del espectro de la fuente de luz. Se dice que la fotólisis es directa cuando no se añaden materiales secundarios (catalizadores y/o sensibilizantes) para modificar el estado de excitación de las especies reactivas. El proceso fotolítico ocurre de la siguiente manera:

cuando un fotón con energía igual o mayor que la banda gap (brecha energética ubicada entre la banda de valencia y la de conducción), es absorbido sobre la superficie de la molécula irradiada. Se provoca así, la excitación de un electrón de la banda de valencia (última capa de electrones que intervienen en los enlaces), y pasa a la banda de conducción (donde los electrones se mueven en las corrientes eléctricas) formando un “hueco positivo” en la banda de valencia; tanto el “hueco” como el electrón son energéticos y por tanto reactivos e inestables (Huey-Min y col. 2007).

En el medio ambiente los hidrocarburos volátiles están sujetos a reacciones de fotólisis directa cuando se encuentran en la atmósfera al ser irradiados por la luz que proviene del sol (Huey-Min y col. 2007). Por ejemplo, Lee y col. (2004), construyeron un reactor fotoquímico a escala piloto capaz de degradar hasta el 99% de tetracloroetileno en el aire.

La fotólisis ocurre mediante dos vías alternas de oxidación:

(i) **Fotólisis del agua** que es la ruptura del agua en contacto por la energía de la luz. Esta a su vez puede ocurrir por dos vías:

- La ruptura del agua en contacto con átomos del radical oxígeno obtenidos al fotolizar el ozono, produciendo dos radicales hidroxilo (Tabla 2, Reacción 1).
- La disociación fotoquímica, que produce átomos de hidrógeno y radicales hidroxilo (hidrolización).

(ii) **Fotólisis del oxígeno molecular** en donde a partir de dos moléculas de oxígeno se produce ozono y un radical oxígeno (Tabla 2, Reacción 2).

### 2.6.2 **Fotosensibilización.**

La fotosensibilización es un proceso fotoquímico de transformación de una molécula, como resultado de la absorción previa de radiación por otra entidad molecular denominada sensibilizante que requiere, a su vez, absorber energía de excitación, para formar radicales e incrementar el potencial de oxidación de las especies contaminantes. En las Reacciones 3 y 4 (Tabla 2) se observan los mecanismos de iniciación de la fotosensibilización.

La fotosensibilización utiliza, adicional a la energía de la luz, un oxidante como por ejemplo  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ , y/o un fotocatalizador, como el  $\text{TiO}_2$ , que favorezcan la destrucción parcial o total de los contaminantes (Huey-Min y col. 2007). Kleindienst y col. (2004), obtuvieron múltiples ácidos y alcoholes a partir de la fotooxidación del tolueno en el aire. Ellos irradiaron y propileno (este se adicionó a la mezcla de reacción para incrementar el nivel de radicales

durante la reacción) con una humedad relativa constante (43%) durante el curso de la irradiación, manteniendo una temperatura de 32 °C. La reacción se realizó con tiempos de residencia de 4 horas. Los productos de la fotooxidación se atraparon en un filtro, se recuperaron por Soxhlet y se midieron por cromatografía de gases. La molécula más pequeña encontrada tenía un grupo carbonilo y dos grupos hidroxilo, uno de ellos era un grupo ácido y el otro una molécula de tres átomos de carbono. Estos resultados indican que la fotooxidación bajo estas condiciones lleva a la ruptura de los enlaces carbono-carbono. En esta tesis se realizaron reacciones de fotosensibilización agregando peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a los tratamientos fotoquímicos y también se ensayaron reacciones de fotocatalisis con dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>), ambos procesos que se explican a continuación.

### **2.6.3 Fotocatálisis con dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>).**

En la Reacción 5 (Tabla 2) se observa como el dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) cataliza la ruptura del agua al excitarse con la energía de la luz; a este tipo de reacciones se les llama fotocatalisis. La fotocatalisis históricamente se ha utilizado con TiO<sub>2</sub>, desde la década de los setentas, se colocaban electrodos de TiO<sub>2</sub> en agua para catalizar la degradación de diferentes compuestos tóxicos de origen orgánico (Kos y col. 2007). El TiO<sub>2</sub> es un óxido semiconductor capaz de generar un “hueco” de energía por la deslocalización electrónica ocasionada por la energía de la luz, a este fenómeno se le denomina generación de la banda gap. El TiO<sub>2</sub> es un catalizador muy utilizado tanto en investigación como en la industria, debido a que su banda gap es de 3 eV, además de que es relativamente barato, químicamente muy estable y la energía que se genera en la banda gap lo hace un poderoso oxidante de compuestos orgánicos (Kaneko y Okura, 2002).

Desde hace dos décadas, estudios de laboratorio han conducido a la identificación de los productos de oxidación de hidrocarburos aromáticos mediante la fotooxidación. En estudios recientes de fotooxidación del tolueno, se han encontrado como productos algunas policetonas e hidroxipolicetonas (Kaneko y Okura, 2002). Los experimentos fotoquímicos mencionados en las secciones anteriores (2.6.1 y 2.6.2), sugieren que la fotooxidación de hidrocarburos intemperizados en un suelo puede ser viable. Otro proceso de oxidación avanzada que se aborda en esta tesis es la peroxidación y la reacción de Fenton que se explican a continuación.

#### **2.6.4 Peroxidación y reacción de Fenton.**

Un oxidante fuerte comúnmente usado en catálisis es el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Huey-Min y col. 2007). En la Reacción 6 (Tabla 2), se observa que cuando el  $H_2O_2$  entra en contacto con el ozono, se producen radicales hidroxilo. Cuando el  $H_2O_2$  entra en contacto con un metal de transición como catalizador, la reacción es llamada “reacción de Fenton”, y consiste en la descomposición del  $H_2O_2$  mediante la adición de sales de hierro, para formar un radical hidroxilo (Navarro-Aviñó y col. 2007), como se muestra en las Reacciones 7 y 8 (Tabla 2). En el suelo generalmente hay metales en diferentes formas y, tanto el Fe como el Mn, tienen una fuerte influencia en este tipo de reacciones. Cuando no se adiciona Fe(II), la reacción puede ser catalizada por minerales naturales del suelo; sin embargo, se puede esperar que las concentraciones de Fe en el suelo sean bajas. La Reacción 7 (Tabla 2) muestra la participación del Fe(II) como un reactivo que disocia la molécula del peróxido para generar el radical hidroxilo. En la Reacción 8 se observa como el Fe(III) regresa de forma cíclica a Fe(II). Las reacciones de Fenton son altamente exotérmicas y pueden provocar un incremento significativo en la temperatura (hasta 70 °C) del suelo. Un calentamiento excesivo y la formación de gas, son peligrosos porque pueden provocar la esterilización de la zona del suelo donde se genere la reacción e, incluso, puede ocasionar explosiones. La presencia de materia orgánica natural en el suelo y de algunas sustancias reducidas requeriría de mayores cantidades de reactivo para un tratamiento de oxidación (Mecozzi y col. 2006). Mecozzi y col. (2006) realizaron una peroxidación ( $H_2O_2$ , 30% v/v) a nivel laboratorio en un suelo contaminado con atrazina, un plaguicida persistente, adicionando sulfato de fierro en diferentes concentraciones. El pH se ajustó a 1 con  $H_2SO_4$ . La reacción se llevó a cabo homogeneizando en una centrifuga, en tubos abiertos para prevenir posibles explosiones por la acumulación de gases. La reacción se dejó proceder durante 24 h y se estabilizó con  $KH_2PO_4$  (un acomplejante de metales), posteriormente el plaguicida residual se extrajo del sobrenadante para su análisis. Entre otros parámetros, este grupo evaluó el pH y el carbono orgánico total (COT). En este estudio se concluyó que la reacción de Fenton es fuertemente influenciada por las características específicas del suelo y que disminuye tanto el pH como la hidrofobicidad de la materia orgánica contenida en el suelo. Por otro lado, Huey-Min y col. (2007), afirman que generalmente la solubilidad en agua de los hidrocarburos poliaromáticos incrementa después de realizar tratamientos fotoquímicos.

Para medir la eficiencia de los tratamientos de remediación de hidrocarburos en un suelo, además de la biodisponibilidad y degradabilidad, es de gran relevancia realizar pruebas ecotóxicas (Semple y col. 2001) y estudios del impacto en los sitios, sobre los productos del tratamiento aplicado (Mougin, 2002). A continuación se explican los aspectos generales de la ecotoxicología.

## **2.7 Ecotoxicología.**

La ecotoxicología es una disciplina científica que evalúa los efectos de la exposición de un organismo a químicos que no pertenecen al sistema ecológico; se dirige a grupos de poblaciones que interactúan con el ambiente físico y correlaciona los componentes de la biosfera y agentes potencialmente dañinos. Además, estudia lo concerniente a la protección de los ecosistemas a través de pruebas ecotóxicas que se desarrollan en diferentes niveles jerárquicos del ecosistema (Dagnino y col. 2008). Esta disciplina se sustenta en ciencias como la química, toxicología, farmacología, epidemiología y ecología, para correlacionar las fuentes, el destino y el efecto de las sustancias en el ambiente (Connell y col. 1999).

La ecotoxicología comprende el estudio de los siguientes puntos: las características químicas y fisicoquímicas del contaminante en cuestión, los fenómenos de bioacumulación/ biotransformación/ biodegradación, el sitio de acción del contaminante, el monitoreo de funciones y/o productos, la fisiología y el comportamiento de los microorganismos de estudio, así como los efectos en poblaciones del ecosistema (Dagnino y col. 2008). Gracias a estudios ecotóxicos se sabe que los HAP inducen varios efectos adversos en los organismos vivos. Dagnino y col. (2008), propusieron un sistema de decisión confiable para cuantificar el riesgo ambiental, que consiste en realizar de manera integral un análisis de datos para los estudios de riesgo ambiental y vulnerabilidad biológica en los sitios contaminados, empleando los resultados de tres disciplinas, la química, la ecotoxicología y la ecología, de la siguiente forma:

- 1) un análisis químico del suelo que revele el potencial tóxico de las sustancias,
- 2) bioensayos ecotoxicológicos,
- 3) biomarcadores que muestran el efecto subletal de los contaminantes y
- 4) parámetros ecológicos que miden cambios en la estructura y función de las comunidades de los organismos estudiados.

Los paradigmas que entablan estos ensayos integrales son: los efectos potencialmente peligrosos en los ecosistemas por la consideración simultánea de la naturaleza del químico, la concentración, y biodisponibilidad de los contaminantes y el perfil ecotoxicológico de la matriz ambiental observada.

En esta tesis se utilizó una estrategia similar a la descrita en el párrafo anterior, utilizando un contaminante de toxicidad subletal (a largo plazo) conocida, se realizaron pruebas de ecotoxicidad antes y después de un tratamiento fisicoquímico, se determinaron algunos de los cambios en las características fisicoquímicas de los contaminantes y se estudió la biodisponibilidad del contaminante antes y después del tratamiento estudiado. Las herramientas de la ecotoxicología son los bioensayos, que se describen a continuación.

### 2.7.1 **Bioensayos.**

Los bioensayos son los métodos ecotóxicos que permiten evaluar la calidad ambiental, y que utilizan organismos vivos para medir los efectos de compuestos tóxicos y evaluar el daño que éstos ocasionan en un organismo. Estas evaluaciones se realizan, generalmente a través de la simulación de un ecosistema a nivel laboratorio, sometiendo a un organismo de prueba a la exposición del agente contaminante de interés que se dosifica en una concentración conocida, un tiempo determinado y se observa el(los) efecto(s) que produce. Regularmente, estas evaluaciones tienen dos objetivos: (i) anticipar el impacto toxicológico de una sustancia al ambiente y (ii) encontrar las concentraciones de seguridad, o bien calcular los cambios que tendrán lugar en los ecosistemas debido a la influencia de estas sustancias tóxicas (Tapia, 2001). Los resultados regularmente se expresan como concentración en alguna de las siguientes formas (Quintero y col. 2009; Arellano y col. 2003):

- EC<sub>50</sub> Concentración que causa algún efecto al 50% de los organismos de la población experimental.
- CL<sub>50</sub> Concentración letal para el 50% de la población.
- NOEC: (No Observed Effect Concentration), concentración a la que no se observa el efecto estudiado.

En esta tesis se realizaron bioensayos con *Daphnia magna*, *Eisenia foetida* y con un consorcio microbiano endémico de una zona contaminada con hidrocarburos. A continuación

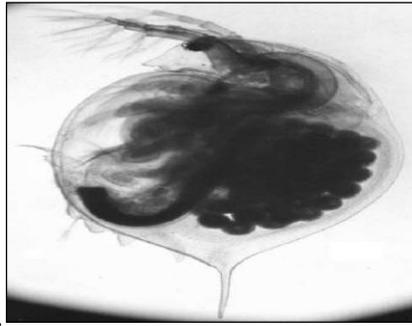
se explican los dos primeros organismos, y la importancia de los bioensayos con microorganismos.

### **2.7.2 *Daphnia magna*.**

*Daphnia magna* se clasifica taxonómicamente dentro del orden *Cladocera* y género *Daphnia*, es un crustáceo invertebrado que forma parte del zooplancton de agua dulce (Núñez y Hurtado, 2005), y mide entre 0.5 y 5 mm de longitud (Tapia, 2001). La reproducción en los Dáfnidos consta de dos fases: una sexual (por huevos) y otra asexual (partenogénesis). La reproducción partenogénica mantiene una población compuesta íntegramente por hembras con un mismo genotipo (Núñez y Hurtado, 2005).

*D. magna* es un organismo muy sensible a cambios en el medio ambiente, tales como el fotoperíodo, la alimentación y la exposición a contaminantes en dosis de toxicidad crónica; cualquier variante fuera de los rangos óptimos ocasiona que en las poblaciones aparezcan machos, a este fenómeno se le llama “determinación ambiental del sexo”. La aparición de machos inicia la reproducción sexual, generando huevos encapsulados en una capa quitinosa oscura denominada ehipio (ephippia), que es altamente resistente a condiciones ambientales adversas (Olmstead y Le Blanc, 2003).

El éxito del bioensayo con este crustáceo depende de la estandarización de las condiciones de cultivo en los laboratorios (Baer y Goulden, 1998). Por ejemplo, la edad óptima para realizar bioensayos son los clones jóvenes porque los adultos presentan mayor variabilidad en los resultados (Gerritsen y col. 1998), entre otros factores porque *D. magna* muda constantemente el exoesqueleto para permitir el crecimiento y la reproducción asexual (Olmstead y Le Blanc, 2003), obstruyendo la observación de resultados. En la Figura 3 se muestra un ejemplar expuesto al microscopio; para evitar confundir al organismo con desechos de las mudas del exoesqueleto, al observar a *D. magna*, es necesario detectar los órganos en el interior.



**Figura 3.-** Ejemplar de *Daphnia magna* observado al microscopio. Se observa el exoesqueleto, que es una capa quitinosa transparente.

### 2.7.3 *Eisenia foetida*.

*Eisenia foetida* es un organismo muy utilizado en bioensayos por su gran sensibilidad a sustancias químicas; tiene un ciclo de vida corto y una alta tasa de reproducción (Calow, 1993). Se clasifica taxonómicamente dentro del phylum *Anélida*, la clase *Oligochaeta*, es del orden *Opisthokonta* y de la familia *Lumbricidae*. Se le conoce comúnmente como lombriz roja californiana y se caracteriza por una segmentación interna y externa en el cuerpo, semejante a un anillo, característica base de su clasificación como anélido (Martínez, 1999). Esta lombriz es hermafrodita y deposita huevos protegidos en una cápsula llamada capullo, que contiene los huevecillos. Las hembras en estado adulto miden entre 3.5 y 8.5 cm de largo y, en raros casos, llega hasta 13 cm, su peso oscila entre 0.4 y 0.6 g, y pueden llegar a pesar hasta 1.0 g (Figura 4).



**Figura 4.-** Ejemplar de *Eisenia foetida*.

*E. foetida* se alimenta de estiércol y cualquier deshecho orgánico en descomposición, excretando humus. Las lombrices son los invertebrados de mayor biomasa que se encuentran en el suelo y son una de las primeras especies afectadas cuando se contamina el suelo, debido a su modo de alimentación y por su capacidad para absorber los contaminantes por la piel (Nadeau, 2001).

#### **2.7.4 Bioensayos con microorganismos.**

El uso de diversas bacterias en los bioensayos que engloban diferentes especies bioindicadoras y distintos niveles tróficos es una forma eficiente y esencial para detectar sustancias peligrosas en los ecosistemas (Tothill y Turner, 1996). Lo anterior se debe a que los microorganismos son los principales organismos de los ecosistemas, destacándose su participación en el ciclo de los nutrientes y su capacidad de biotransformar algunas sustancias. Los microorganismos pueden servir como bioindicadores de efectos potenciales de un tóxico de tal forma que los resultados obtenidos pueden extrapolarse a organismos superiores del ecosistema.

Los bioensayos con microorganismos, poseen numerosas ventajas con respecto a otros bioensayos, debido al corto ciclo de vida de la mayoría de las bacterias, estas pruebas son rápidas y fáciles de realizar, miden la toxicidad por los efectos sobre las células vivas con bajo costo económico. Por lo anterior, en los últimos años, algunos ensayos utilizados comúnmente se han sustituido por bioensayos con microorganismos (Velasco-Alvarez, 2006; Tothill y Turner, 1996).

Algunas variables que son importantes de cuantificar después de un tratamiento son la biodegradabilidad y la toxicidad de los contaminantes residuales en el medio (Poirrier y Schiappacasse, 2007). La toxicidad de los contaminantes sobre los microorganismos generalmente es medida en parámetros de: bioluminiscencia, inhibición del crecimiento, movilidad, actividad fotosintética, crecimiento y estado metabólico (Candela, 2007). Una respuesta metabólica que permite relacionar la degradación de hidrocarburos con la actividad microbiana y con la generación de productos tóxicos es la evaluación del coeficiente respiratorio (CR), que es el cociente del CO<sub>2</sub> producido entre el O<sub>2</sub> consumido (Acosta, 2008).

### **3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**

#### **3.1 Hipótesis**

Al menos un tratamiento de oxidación avanzada en un suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos, genera productos que favorecen su biodisponibilidad en el suelo y que son menos ecotóxicos.

#### **3.2 Objetivos.**

##### **3.2.1 General.**

Encontrar al menos un proceso de oxidación avanzada que genere un incremento en la oxidación y solubilidad de los productos de hidrocarburos en un suelo intemperizado, y correlacionarlos con la ecotoxicidad y la biodisponibilidad de los hidrocarburos modificados.

##### **3.2.2 Específicos.**

- Evaluar el efecto de algunas reacciones de fotólisis y fotocatalisis en un suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos, sobre los niveles de oxidación de los productos, variando las condiciones de humedad, concentración del catalizador y tiempo.
- Comparar los efectos de las reacciones de fotosensibilización con  $H_2O_2$ , respecto a la peroxidación, en ausencia de irradiación UV, en un suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos sobre los niveles de oxidación y solubilidad de los productos.
- Analizar los cambios en la ecotoxicidad y la biodisponibilidad de los productos de oxidaciones avanzadas de los hidrocarburos presentes en un suelo intemperizado.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1 Estrategia de trabajo.

En la Figura 5 se resume la estrategia general de trabajo utilizada en esta tesis. Las unidades experimentales, muestras de 5 g de suelo intemperizado con hidrocarburos, se sometieron a diferentes procesos de oxidación avanzada. Los productos se analizaron por espectrofotometría infrarroja, para detectar cambios en los grupos carbonilo y se determinó el carbono orgánico soluble por COT, buscando cambios en la solubilidad de los HTP. Los resultados se analizaron estadísticamente con el paquete SPSS, para encontrar el (los) tratamiento(s) que generara(n) diferencia significativa en los productos obtenidos. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado.

Se realizó una correlación con los efectos ecotóxicos en *Daphnia magna* y *Eisenia foetida*, mediante determinación de la CL<sub>50</sub> y en un consorcio microbiano endémico de un sitio contaminado con hidrocarburos para comparar los cambios en la biodisponibilidad de estos productos. Esto último se realizó mediante pruebas indirectas de sobrevivencia y metabolismo a través de la cuantificación de la tasa de consumo de glucosa y O<sub>2</sub> y la producción de CO<sub>2</sub> (respirometría).

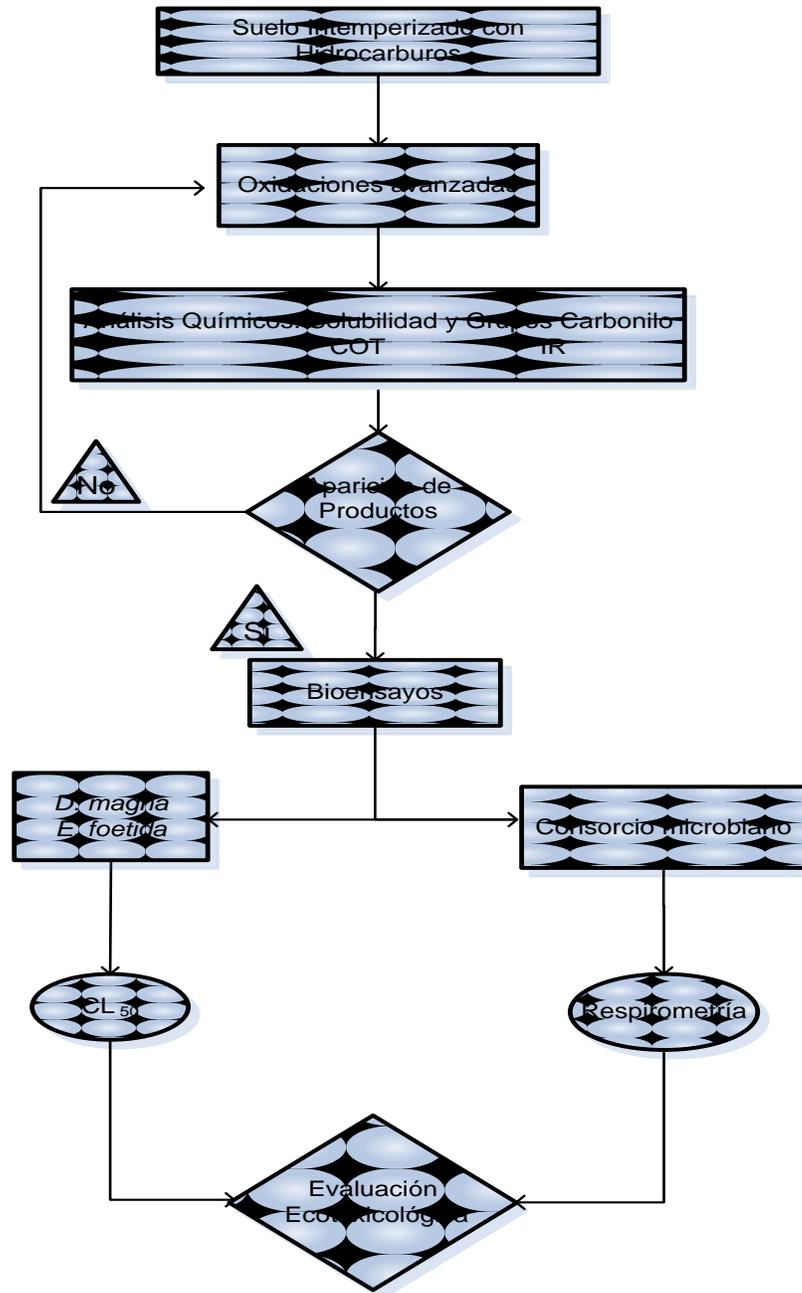


Figura 5.- Estrategia general de trabajo.

## **4.2 Suelo problema.**

El suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos fue obtenido de una zona pantanosa del sureste de la República Mexicana, en las inmediaciones de una refinería petrolera que continúa en operación. El sitio está contaminado con hidrocarburos derivados de actividades petroleras que se remontan a más de 50 años. El suelo muestreado fue caracterizado como suelo arenoso, intemperizado con una mezcla compleja de hidrocarburos del petróleo. Para completar la caracterización del suelo, éste se tamizó con malla No. 20 y se analizó la capacidad de campo, pH y concentración inicial de HTP.

### **4.2.1 Capacidad de campo.**

Para determinar la capacidad de campo que se definió en la Sección 2.1, se colocaron 150 g (base seca) del suelo problema en una franela, acomodándola en forma de bolsa sobre una tarja y se le dejó caer agua durante 1 h. El suelo húmedo se colocó en vasos de precipitado de 500 ml sobre una capa de algodón, compactada hasta la altura del vaso graduada en 350 ml. Al cabo de 3 días se midió la humedad remanente con una termo-balanza (OHAUS<sup>R</sup>). La humedad resultante fue definida en esta tesis, como la capacidad de campo para el suelo en estudio.

### **4.2.2 pH**

Para determinar el pH se pesó 1 g de muestra sólida seca y se suspendió en 10 ml de agua destilada, se agitó durante 10 min. Se midió el pH del sobrenadante con un potenciómetro digital (Conductronic pH 20).

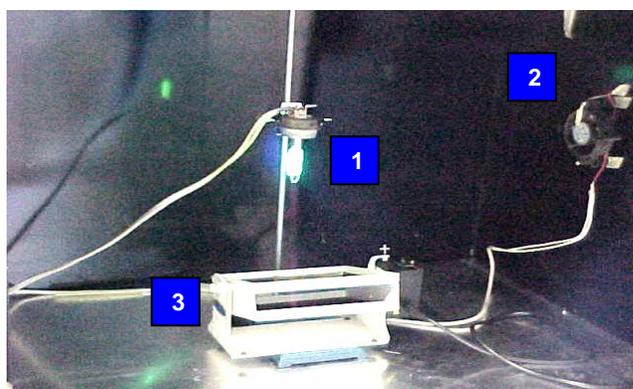
### **4.2.3 Hidrocarburos totales del petróleo (HTP).**

Los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) contenidos en las muestras de suelo, se extrajeron por el método US EPA 3540 C (1996), de la siguiente forma: muestras de 5 g de suelo homogenizado con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro (1:1 p/p), se colocaron en cartuchos de celulosa en un equipo Soxhlet. Las muestras se mantuvieron en reflujo durante 24 h a 70 °C con una

mezcla de hexano-acetona (1:1 v/v), como solvente de extracción. Finalmente, las muestras se secaron a temperatura ambiente y los HTP se cuantificaron gravimétricamente. Esta técnica fue utilizada para la extracción de hidrocarburos de las muestras de suelo tratado y sin tratar. El análisis de las muestras se realizó por cuadruplicado.

#### 4.3 Sistema de irradiación y condiciones de operación.

Las muestras homogéneas de suelo contaminado con hidrocarburos (5 g), se colocaron sobre cajas de Petri, en un sistema de irradiación como el que se muestra en la Figura 6.



**Figura 6.-** Fotografía del sistema de irradiación utilizado para tratar muestras de suelo.  
(1) Fuente luminosa, (2) ventilador, (3) balancín.

Las muestras se fijaron sobre la superficie de un balancín provisto de agitación angular con un ángulo máximo de agitación de 45°, en el caso de los ensayos de peroxidación la muestra se mantuvo estática. La agitación en las reacciones fotoquímicas se realizó de manera que el suelo contaminado exhibiera la mayor superficie de contacto con la radiación UV emitida por una lámpara de mercurio de alta presión (Phillips, HPK) de 125 W, en un rango de 220 a 600 nm (región UV y parte de visible). La lámpara de mercurio se fijó a 17 cm sobre la parte central del balancín para que la energía irradiada sobre las muestras fuera siempre constante. El sistema de irradiación se mantuvo siempre dentro de una campana de seguridad (30 X 40 X 50 cm), para evitar pérdidas de irradiación. La campana de seguridad estaba provista de un sistema de aireación generado por un par de ventiladores fijos a los lados de la lámpara, y el recambio de aire se logró mediante un hueco de 10 cm de diámetro en la parte superior de la campana, que permitió atenuar la luz natural en el sistema.

En este sistema de irradiación se realizaron las siguientes reacciones:

A) fotólisis directa (sin catalizador ni sensibilizante), variando:

- (i) el tiempo de exposición, que en todos los casos se fraccionó en periodos de exposición a la irradiación UV de 8 h, como máximo al día, y
- (ii) humedad, comparando la ausencia y presencia de agua, utilizando para este último, el valor de la capacidad de campo de las muestras de suelo;

B) fotocatalisis, variando las concentraciones de catalizador ( $\text{TiO}_2$ ), de humedad y del tiempo;

C) fotosensibilización, irradiando en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y

D) peroxidación, manteniendo las muestras en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sin irradiación. Para las reacciones de fotosensibilización y peroxidación se evaluó el efecto de la presencia y ausencia de luz natural.

#### **4.3.1 Temperatura de irradiación.**

Con el sistema de irradiación descrito en el punto anterior, se realizó una cinética de la variación de la temperatura al nivel de la muestra irradiada con ayuda de tres termopares, colocados como sigue: uno en contacto con la muestra (T int. 1), otro en la base del balancín (T int. 2) y otro fuera de la cámara de irradiación (T ext.), correspondiente a la temperatura ambiente.

#### **4.3.2 Fotólisis directa y fotocatalisis sin agua.**

Se realizaron 9 tratamientos fotoquímicos en ausencia de agua (Tabla 3), correspondientes a las reacciones (A) y (B), descritas en la Sección 4.3. En la matriz se manejan como variables el tiempo (8, 24 y 40 h, en fotoperiodos de 8 h) y la cantidad de catalizador (0, 0.3 y 0.6 g). Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado y se etiquetó con una letra y un subíndice. Las letras señalan el número de columna de acuerdo al orden alfabético y el subíndice corresponde al número de fila.

**Tabla 3.-** Matriz factorial de fotólisis y fotocatalisis en ausencia de agua. Todas las muestras tratadas fueron de 5 g de suelo. En todos los casos el número de repeticiones (n) fue de 4.

	8 h	24 h	40 h
<b>0 g de TiO<sub>2</sub></b>	a <sub>1</sub>	b <sub>1</sub>	c <sub>1</sub>
<b>0.3 g de TiO<sub>2</sub></b>	a <sub>2</sub>	b <sub>2</sub>	c <sub>2</sub>
<b>0.6 g de TiO<sub>2</sub></b>	a <sub>3</sub>	b <sub>3</sub>	c <sub>3</sub>

Los productos de los HTP fototratados fueron extraídos del suelo por el método de Soxhlet, (Sección 4.2.3) y los extractos fueron disueltos en C<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub> para su análisis por espectrofotometría infrarroja (FTIR), método que se detalla en la Sección 4.4.

#### 4.3.3 Fotólisis directa y fotocatalisis con agua.

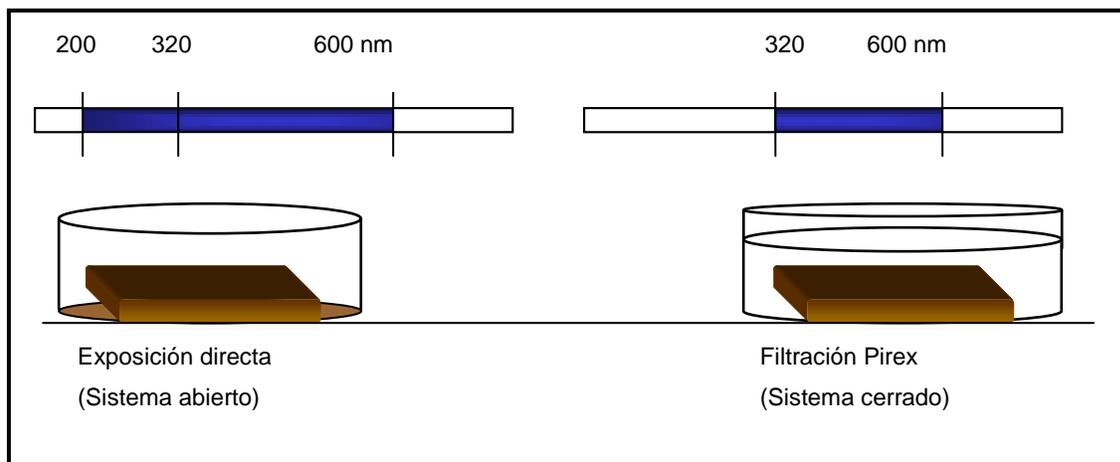
En congruencia con las reacciones (A) y (B), (Sección 4.3), se hizo una nueva búsqueda de condiciones de oxidación, tomando en cuenta que de acuerdo con las Reacciones 1 y 5 (Tabla 2), el agua incrementa el poder oxidante en las mismas. Se utilizaron dos variantes experimentales: un sistema abierto y otro cerrado. En los sistemas abiertos se rehidrataron las muestras cada hora, con la misma cantidad de agua que perdían por evaporación natural. La humedad inicial en las muestras de todos los experimentos fue la capacidad de campo (30% v/p) medida en las muestras. La lógica de identificación de muestras en esta etapa experimental es la misma que la descrita en la Sección 4.3.2.

Con el diseño experimental mostrado en la Tabla 4 se evalúan los efectos de la presencia y ausencia de catalizador; así mismo, la presencia de agua, a humedad constante y variable.

**Tabla 4.-** Diseño experimental de fotólisis y fotocatalisis variando la humedad y el TiO<sub>2</sub>. Todas las muestras tratadas fueron de 5 g de suelo. En todos los casos el número de repeticiones (n) fue de 2.

	<b>Sistema abierto (Humedad variable)</b>	<b>Sistema cerrado (Humedad constante)</b>
<b>0 g de TiO<sub>2</sub></b>	a <sub>1</sub>	b <sub>1</sub>
<b>0.3 g de TiO<sub>2</sub></b>	a <sub>2</sub>	b <sub>2</sub>

En el sistema abierto se suspendió la irradiación cada hora para rehidratar las muestras y compensar el agua perdida por evaporación. En la Figura 7 se muestra esquemáticamente el efecto de filtro óptico que se produce con el material Pyrex de la caja Petri.



**Figura 7.-** Longitud de onda que recibe la muestra con y sin filtración Pyrex.

Al tapar la caja se reduce el intervalo espectral, causando interferencia entre la longitud de onda que emite la lámpara de UV y la que recibe la muestra; es decir, la tapa de vidrio Pyrex sólo permite el paso de luz UV en la región que va de los 320 a los 600 nm (Potter y Hotchkiss, 1995). La importancia de este sistema con filtro radica en el efecto hermético de las fronteras del sistema que mantiene prácticamente constante la humedad.

#### **4.3.4 Fotosensibilización y peroxidación.**

Con la finalidad de estimar el tiempo de reacción más conveniente para la peroxidación de los HTP (reacción D, Sección 4.3), se realizó una cinética de reacción del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en presencia del suelo problema de la siguiente forma: se colocaron muestras de 5 g de suelo con  $H_2O_2$  (1:1 p/v), homogeneizando las muestras manualmente en cajas Petri; se mantuvieron en ausencia de luz natural, cubiertas con papel aluminio. Se recuperó el sobrenadante, por medio de centrifugación y éste se tituló con tiosulfato de sodio, de acuerdo al método reportado en la Farmacopea MGA 0681 (1998). Para determinar el índice de peróxido (miliequivalentes de oxígeno activo), el sobrenadante se colocó en un matraz iodométrico con 30 ml de una solución (3:2) de ácido acético glacial en cloroformo,

más 0.5 ml de solución saturada de KCl, el matraz se tapó y se dejó reposar 1 min. Se adicionaron 30 ml de agua destilada y se tituló con tiosulfato de sodio (0.01 M) hasta aparecer un color amarillo paja; en ese momento se adicionó 0.05 ml de una solución decantada de almidón (50 ml de agua destilada caliente que, antes de la ebullición, se adicionó 0.5 g de almidón, se agitó fuertemente y se dejó reposar hasta enfriar y se decantó). Los resultados se reportaron como índice de peróxido, que se calculó como sigue:

$$\text{índice de peróxido} = 1000M \left[ \frac{(A - B)}{m} \right]$$

Donde:

A= ml de solución de tiosulfato de sodio gastado en la titulación de la muestra.

B= ml de solución de tiosulfato de sodio gastado en el blanco.

M= molaridad de la solución del tiosulfato de sodio.

m= peso en gramos de la muestra.

Con base en los resultados, se fijó el tiempo de reacción en 24 h, de tal modo que la peroxidación del suelo problema se realizó con 5 g, sobre cajas de Petri de vidrio con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1:1 (v/p). La actividad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se ajustó por titulación al 10%, adicionando al sistema de irradiación el agua necesaria (dilución 1:1 v/v). Para realizar la peroxidación, se adicionó 10 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% por cada 5 g de suelo, en la fotosensibilización se utilizó la misma proporción de peróxido de hidrógeno y las muestras se irradiaron 3 h con luz UV. En los controles, se sustituyó el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por agua (10 ml). En la Tabla 5 se muestra el diseño experimental utilizado para evaluar los efectos de 3 variables: el catalizador (3 concentraciones), el tipo de oxidación (peroxidación, fotosensibilización y fotocátalisis) la influencia de la luz natural (luz parcial dentro de la campana de irradiación y ausencia de luz natural, cubriendo el sistema con papel aluminio).

La identificación de las muestras sigue las mismas reglas descritas en la Sección 4.3. Las muestras a y c fueron tratadas por fotosensibilización y las muestras b y d se sometieron a peroxidación en ausencia de luz UV. Las muestras e y f no se expusieron al peróxido. Todas las muestras se expusieron a la luz natural parcial, excepto las muestras a y b, que fueron tratadas en ausencia de luz natural. Para obtener la luz natural parcial se colocaron las muestras dentro de la campana de irradiación que aparece en la Figura 6 (Sección 4.3). Las irradiaciones se realizaron por 3 h. Las muestras se trataron por cuadruplicado. Luego de los

respectivos tratamientos, se extrajeron los HTP de las muestras y se analizaron por IR y COT como se detalla más adelante.

**Tabla 5.-** Diseño experimental de tratamientos de fotosensibilización (con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 3 h de irradiación) y peroxidación. Todas las muestras tratadas fueron de 5 g de suelo. En todos los casos el número de repeticiones (n) fue de 4.

	Con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				Sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
	Sin luz natural.		Con luz natural parcial.		Controles, con luz natural parcial	
TiO <sub>2</sub> (g)	Fotosensibilización	Peroxidación	Fotosensibilización	Peroxidación	Fotocatálisis	No irradiado
0			c <sub>1</sub>	d <sub>1</sub>		
0.3	a <sub>2</sub>	b <sub>2</sub>	c <sub>2</sub>	d <sub>2</sub>	e <sub>2</sub>	f <sub>2</sub>
0.6			c <sub>3</sub>	d <sub>3</sub>		

#### 4.4 Análisis de HTP por espectrofotometría infrarroja (IR).

El incremento de los grupos carbonilo en los HTP extraídos del suelo se cuantificó mediante espectrofotometría infrarroja a diferentes longitudes de onda. A 2930 cm<sup>-1</sup> se registran los grupos -CH<sub>2</sub>-, y a 1700 cm<sup>-1</sup> los grupos carbonilo (cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos). Para el análisis de los HTP extraídos del suelo por Soxhlet, éstos se resuspendieron en tetracloruro de etileno (C<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>) hasta una concentración final de hidrocarburos de 15000 ppm y se leyeron en un espectrómetro de IR (Perkin Elmer) de acuerdo al método US EPA 8440 (1986). Las muestras se analizaron en un rango de longitud de onda de 3700-700 cm<sup>-1</sup>, usando una celda de BaF<sub>2</sub>, con 0.025 mm de espesor. El equipo fue programado para realizar 16 lecturas por muestra.

Los resultados se reportan adimensionales con un cociente de áreas para incrementar la representabilidad de los cambios en la concentración de grupos carbonilo, respecto al total de grupos  $-CH_2-$ , dando lugar al índice carbonilo (IC), que es una relación relativa a las modificaciones del nivel de oxidación de las moléculas de HTP como sigue:

$$IC = \frac{\text{Área (cm}^2\text{) de bandas de absorción de grupos CO } 1800 - 1600 \text{ cm}^{-1}}{\text{Área (cm}^2\text{) de las bandas de los grupos } CH_2 \text{ } 3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}}$$

#### **4.5 Lixiviación.**

Se realizó una simulación del efecto natural de la lixiviación de la materia orgánica en el suelo provocada por las lluvias, que arrastra por gravedad a la fracción soluble en agua. La fracción polar de HTP se disolvió como se describe a continuación. El suelo problema se suspendió en matraces Erlenmeyer con agua, en una relación 1:4 (p/v) y se agitó a 200 rpm a  $30 \pm 2$  °C durante 24 h, las fases se separaron por centrifugación (10000 rpm, 15 min), después por decantación y finalmente por filtración. De esta manera, se obtuvo fracción polar de los hidrocarburos solubles en agua (US EPA 8440, 1986). En los extractos de hidrocarburos solubles en agua, se analizó el contenido de carbono orgánico total como se explica enseguida.

#### **4.6 Análisis del carbono orgánico total (COT) soluble.**

La fracción polar, solubilizada por lixiviación, se cuantificó con un analizador de carbono orgánico total (TOC-5000 A, Shimadzu Corporation), con un detector de combustión, inyector automático y aire de alta pureza como gas acarreador. La concentración de la fracción soluble de hidrocarburos fue calculada automáticamente por el equipo, interpolando los datos muestreados en una curva de calibración en un rango de 4 ppb hasta 4000 ppm. Las fracciones líquidas obtenidas por lixiviación, después del COT, se conservaron para su evaluación en los bioensayos.

#### 4.7 Bioensayos.

Para realizar los bioensayos con *D. magna* y el consorcio microbiano, se utilizaron los lixiviados obtenidos de acuerdo a lo descrito en la Sección 4.5, y se les ajustó el pH a 7 y 6 respectivamente. El bioensayo con *E. foetida* se realizó directamente sobre el suelo intemperizado con y sin tratamiento abiótico sin ajustar el pH. En seguida se explica la metodología utilizada en cada caso.

##### 4.7.1 *Daphnia magna*.

Los lixiviados obtenidos conforme se describe en la Sección 4.5, se diluyeron con agua reconstituida (Tabla 6) (NMX-AA-1995-SCFI, 1995), en proporciones de 0, 6.25, 12.5, 50 y 100%. Las muestras (50 ml) de cada concentración se colocaron, por triplicado, en vasos de precipitado de 100 ml; en cada recipiente se colocaron 10 organismos de menos de 24 h de nacidos. Las muestras se taparon y se dejaron durante 24 h, registrando la sobrevivencia, que se determinó con ayuda de un microscopio óptico y se consideró muerto un individuo al carecer de movilidad en las antenas. Los resultados se expresan como la concentración en la que muere el 50% de la población, como CL<sub>50</sub> (NMX-AA-1995-SCFI, 1995).

**Tabla 6.-** Formulación del agua reconstituida.

Componente	(ppm)
CaSO <sub>4</sub>	120
NaHCO <sub>3</sub>	174
MgSO <sub>4</sub>	120
KCl	8
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	1

Se utilizó como bioensayo control la medición del porcentaje de sobrevivencia de *D. magna* en lixiviados del suelo problema sin tratar.

#### 4.7.2 *Eisenia foetida*.

A diferencia del bioensayo con *D. magna*, donde los organismos se exponen a la fracción soluble de (i) los HTP del suelo sin tratamiento y (ii) de los productos generados por efecto del tratamiento de peroxidación; en el bioensayo con *E. foetida* se realizó directamente en el suelo. Como bioensayo control se midió la sobrevivencia de *E. foetida* en el suelo estudiado sin tratar. La metodología se basó en el método US EPA 7104, determinando la toxicidad por contacto con piel del organismo o por ingesta del contaminante. Para lo anterior el suelo problema se mezcló y homogeneizó con un suelo artificial (Tabla 7), para obtener proporciones de 0, 6.25, 12.5, 50 y 100% del suelo contaminado.

**Tabla 7.-** Composición del suelo artificial.

Componente	Porcentaje
Sílica malla 70	68
Kaolín	20
Turba	10
CaCO <sub>3</sub>	2
pH	6.5

El ensayo se realizó, por duplicado con 200 g de cada mezcla. Las mezclas se colocaron en frascos de vidrio de 6.5 cm de diámetro y 16 cm de altura, se humedecieron hasta la capacidad de campo con agua destilada y se les colocaron 10 organismos adultos (entre 0.3 y 0.6 g de peso). Los frascos se mantuvieron con humedad (35% v/p) y temperatura controlada (30 °C) durante 14 días, evaluando al final del periodo la mortalidad de los individuos. Se consideraron muertos los organismos desaparecidos, ya que el proceso de descomposición de éstos es muy rápido. Con esta información se calculó la CL<sub>50</sub>.

#### 4.7.3 *Microorganismos*.

Para el bioensayo con microorganismos se utilizó un consorcio microbiano, se usaron como unidades experimentales botellas serológicas de 165 ml con 30 ml de medio mineral (Tabla 8). Cada botella se inoculó con un consorcio microbiano adaptado al consumo de

hidrocarburos (Escalante y col. 2005), conservado en el laboratorio W-108. Para la propagación del inóculo se utilizó el mismo medio mineral.

**Tabla 8.-** Composición del medio nutritivo.

Componente	g/L
NaNO <sub>3</sub>	3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.15
KCl	0.5
Glucosa	15
Solución de oligoelementos	2 ml/L
pH	6

\*Composición (% p/v): Fe SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.015; ZnSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O, 0.161 y MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.008.

La respuesta metabólica del consorcio del tratamiento evaluado se determinó por respirometría, midiendo la concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en el espacio gaseoso durante 9 días. Se realizaron dos cinéticas por duplicado identificadas como **A** y **B**. La serie **A** contenía suelo intemperizado con HTP sin tratamiento y la serie **B** contenía suelo peroxidado. Se adicionó agrolita a todas las muestras con la finalidad de incrementar los espacios intersticiales y facilitar la difusión tanto de los contaminantes como de los nutrientes. La serie A fue un control para determinar el efecto de los productos de la peroxidación de los HTP en suelo, sobre el comportamiento de los microorganismos. En cada unidad experimental se colocaron de 9 g del suelo problema más 1 g de agrolita. Cada unidad experimental se inoculó (10% v/v) con una suspensión del consorcio se sellaron con válvulas Mininert y se agitaron a 150 rpm y 30 °C. Se tomaron muestras al azar, por duplicado, a los tiempos 0, 3, 6 y 9 días, para analizar y calcular indirectamente la respuesta metabólica mediante la determinación del coeficiente respiratorio (CR), la concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, y el consumo de glucosa. La glucosa se midió utilizando un Kit comercial (Spinreact), con el método enzimático glucosa oxidasa (GOD). La lectura se realizó en un espectrofotómetro a 510 nm.

#### **4.8 Análisis de HTP por cromatografía de gases.**

Con el fin de cuantificar el CO<sub>2</sub> y el O<sub>2</sub>, se utilizó en un cromatógrafo de gases GOW-MAC 580, con un detector de conductividad térmica, una columna CTR1 (Alltech). Se utilizó helio (He) como gas acarreador, con un flujo de 40 cm<sup>3</sup>/min. La concentración de los gases generados y consumidos durante la cinética metabólica del consorcio microbiano, se calcularon utilizando curvas de calibración para gas. La composición del gas en las unidades experimentales, se analizó por duplicado y se reporta como la variación en el CR respecto al tiempo. El CR es la relación entre el CO<sub>2</sub> producido con respecto a la concentración del O<sub>2</sub> que consume, como sigue (Acosta, 2008):

$$\text{Coeficiente respiratorio} = \frac{\text{mol CO}_2 \text{ producido}}{\text{mol O}_2 \text{ consumido}}$$

#### **4.9 Análisis estadísticos.**

Todos los resultados de índices de carbonilo y carbono soluble, se analizaron estadísticamente por el método de varianza, para comparar los grupos de medias, utilizando el programa estadístico SPSS 8.0 para Windows. En todos los casos se usó la prueba de Tukey con un  $\alpha = 0.05$ . Este análisis estadístico agrupa en columnas, las medias que son estadísticamente iguales. Cuando alguna de las medias aparece en más de un grupo, indica que ésta no difiere estadísticamente de ninguna de las medias que pertenecen a éstos grupos, por que la varianza entre estos grupos hace que las medias se traslapen. Los grupos se etiquetaron con letras mayúsculas, en orden alfabético y aparecen en el siguiente Capítulo (5), en las tablas de resultados frente a las medias estadísticas.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1 Caracterización del suelo en estudio.

#### 5.1.1 Capacidad de campo y pH.

La capacidad de campo de las muestras de suelo fue de  $30 \pm 1\%$  (v/p) de humedad. Este valor se utilizó como referencia para humectar las muestras para los tratamientos fotoquímicos.

El pH del suelo utilizado para la evaluación ecotoxicológica fue de  $4.6 \pm 0.5$ , a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Después del tratamiento fisicoquímico, el pH en las muestras de suelo peroxidado disminuyó hasta  $3 \pm 0.5$ . Esta disminución es esperada de acuerdo a los resultados de Kos y col. (2007), quienes encontraron que en todas las reacciones de oxidación avanzada que ellos probaron, la suspensión tratada se acidificó por la aparición de ácidos carboxílicos generados por efecto de los tratamientos.

#### 5.1.2 Cuantificación de HTP.

Se encontró que la concentración inicial de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) en el suelo utilizado en los experimentos de oxidación avanzada fue de  $70200 \pm 6124\text{ mg/Kg}$  de suelo. La concentración inicial de HTP en una muestra de suelo o agua es esencial para realizar los ensayos ecotoxicológicos debido a que, con base en dicho dato fue posible calcular la  $CL_{50}$  en los bioensayos con *D. magna* y *E. foetida*.

Tomando en cuenta que altas concentraciones de hidrocarburos en un suelo pueden incrementar la toxicidad y disminuir la degradabilidad de los contaminantes (Huey-Min y col. 2007), la evaluación ecotoxicológica del suelo se llevó a cabo con un suelo intemperizado de la misma zona que el ensayado en las oxidaciones avanzadas, pero proveniente de un punto más alejado de la zona del derrame de petróleo. Así, el suelo utilizado para los bioensayos tenía una concentración de HTP en suelo (sin tratar) de  $32375 \pm 3712\text{ mg/Kg}$ , la concentración de los HTP producto del suelo tratado fue de  $24906 \pm 660\text{ mg/Kg}$ . Estos resultados permiten suponer que el tratamiento de oxidación avanzada probado para la evaluación ecotoxicológica provocó una disminución de aproximadamente 23% en la concentración de HTP en el suelo en estudio. Este resultado puede deberse a la

mineralización de los contaminantes tratados o bien al incremento de la hidrofiliad de los productos del tratamiento aplicado (Mecozzi y col. 2006). La degradación de HTP obtenida en nuestro estudio es baja en comparación con los rendimientos que encontraron Mecozzi y col. (2006) (Sección 2.6.4), quienes al generar diferentes condiciones experimentales de reacciones de Fenton en un suelo contaminado con atrazina (100 mg/Kg), lograron reducir éste contaminante entre 40 y 89% con respecto a la concentración inicial.

La concentración inicial de la fracción polar extraída por la simulación de lixiviación (HTP solubles), a partir del suelo sin tratamiento fue de  $24.96 \pm 0.29$  mg/L, mientras que la concentración inicial de HTP solubles en agua del suelo obtenido del tratamiento de oxidación, que se encontró con la simulación de la lixiviación fue de  $316.26 \pm 10.8$  mg/L. Aquí se observó un incremento de la solubilidad de los contaminantes, de aproximadamente 13 veces con relación al suelo sin tratamiento. Al respecto, Huey-Min y col. (2007), explican que usualmente la solubilidad de los hidrocarburos en agua incrementa después de un tratamiento de oxidación fisicoquímica, por que los contaminantes originales se pueden transformar en productos intermediarios de cadenas más cortas. Otra posible explicación es que la generación de grupos carbonilo (ácidos carboxílicos) producidos por el tratamiento de oxidación, aumente la polaridad de dichos intermediarios (Kos y col. 2007). Esta última explicación coincide con la disminución del pH (Sección 5.1.1) por efecto del tratamiento de peroxidación.

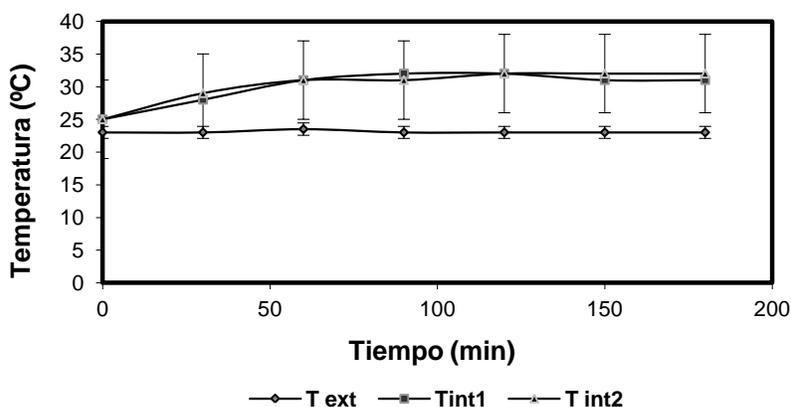
## **5.2 Determinación de las condiciones de reacción.**

La determinación de las condiciones de reacción, temperatura y tasa de evaporación del agua en las unidades experimentales utilizadas en los tratamientos fotoquímicos, es muy importante. En el caso de la temperatura se obtiene información para: (i) inferir posibles incrementos en la temperatura de la muestra debidos, al calor desprendido de la lámpara de irradiación UV o al calor generado como producto de las reacciones fotoquímicas ensayadas, (ii) saber si la temperatura de trabajo es constante o variable; y (iii) para fijar el tiempo mínimo de exposición de las muestras a la irradiación, de acuerdo al tiempo que le tome a la lámpara llegar al máximo de calor emitido y estabilizarse. Tomando en cuenta que, cuando se lleva a cabo un tratamiento fotocatalítico es indispensable agregar agua al sistema, la humedad ambiental es insuficiente y se convierte en el reactivo limitante para la reacción, lo que puede disminuir el poder oxidante del tratamiento (Kaneko y Okura, 2002). Así las

cinéticas de evaporación de agua en las unidades experimentales, muestran si las condiciones de trabajo permiten mantener estable la humedad en el suelo problema. A continuación se presentan los resultados.

### 5.2.1 Temperatura de irradiación.

En la Figura 8 se muestra la cinética de la termo-estabilidad del sistema de irradiación bajo las condiciones establecidas. Se encontró que la temperatura que emite la lámpara UV se estabiliza en  $30 \pm 1$  °C, después de 30 min. No se encontró diferencia significativa entre la temperatura de la muestra (Tint 1) y la temperatura registrada sobre el balancín (Tint 2). Este resultado sugiere que el incremento de temperatura en la muestra se debió al calor desprendido por la lámpara de irradiación UV.

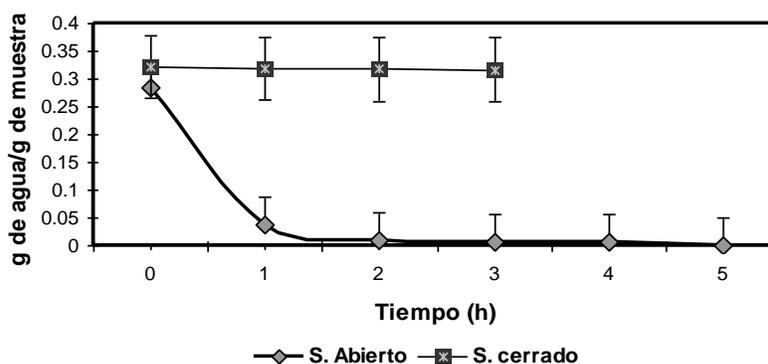


**Figura 8.** Termoestabilidad de las reacciones fotoquímicas en el tiempo. En cada punto el número de muestras (n), fue de 2.

Con base en éstos resultados y para asegurar que la energía que emitía la lámpara fuera estable, se decidió que los tiempos de irradiación para los diseños experimentales fueran mayores a 30 min.

### 5.2.2 Cinéticas de evaporación.

En la Figura 9 se compara la evaporación del agua en los sistemas abiertos y en los sistemas cerrados, (sin rehidratar las muestras) realizando cada cinética por duplicado, se encontró que durante la primera hora de irradiación hubo una pérdida de aproximadamente 87% del agua inicial en los sistemas abiertos. Este resultado se tomó como referencia para los experimentos descritos en la Sección 5.3.2, para rehidratar sistemas abiertos reintegrando la humedad perdida cada hora. La rápida evaporación se atribuye a diferentes factores, como la temperatura interna de la cámara de irradiación, la aireación producida por la ventilación constante, la agitación angular y la gran superficie de contacto de la muestra con el aire. En el sistema cerrado se encontró que las pérdidas de agua son prácticamente despreciables, pues en 3 horas se perdió menos del 2% del agua inicial, generando un sistema de irradiación experimental de humedad prácticamente constante.



**Figura 9.-** Cinética de evaporación de agua en los sistemas fotocatalíticos abiertos y cerrados. El número de muestras (n) utilizado para cada punto fue de 2.

### 5.3 Evaluación de los tratamientos de oxidación abiótica.

#### 5.3.1 Fotólisis y fotocatalisis sin agua.

El primer diseño experimental de oxidación abiótica se realizó mediante la combinación de reacciones de fotólisis y fotocatalisis, en ausencia de agua, para determinar el efecto de las condiciones de menor capacidad oxidativa. En la Tabla 9 se muestran los resultados del análisis estadístico. En éstos experimentos, las medias estadísticas se registraron en cuatro

grupos (A, B, C y D), el control se agrupa en las tres primeras columnas, indicando que todas las medias que aparecen en estas columnas no difieren del control, en el cuarto grupo aparecen los experimentos irradiados durante tres periodos de 8 h sumando un total de 24 h, en los diferentes niveles de TiO<sub>2</sub>, éstos registraron los mayores índices de oxidación.

**Tabla 9.-** Comparación de medias estadísticas (Tukey) de Índices carbonilo (IC) obtenidos por fotólisis y fotocátalisis en muestras de suelo seco intemperizado con HTP. En todos los casos el número de muestras (n) fue de 4. Las letras mayúsculas indican el grupo al que pertenece cada resultado.

Muestra	T (h)	TiO <sub>2</sub> (g)	IC
c <sub>1</sub>	40	0	0.21 A
c <sub>2</sub>	40	0.3	0.26 A, B
c <sub>3</sub>	40	0.6	0.29 A, B
a <sub>1</sub>	8	0	0.30 A, B
a <sub>3</sub>	8	0.6	0.42 A, B, C
Control	No irradiado	0	<b>0.55</b> A, B, C
a <sub>2</sub>	8	0.3	0.56 A, B, C
b <sub>3</sub>	24	0.6	0.62 B, C, D
b <sub>2</sub>	24	0.3	0.74 C, D
b <sub>1</sub>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>0.99 D</b>

El análisis estadístico indicó un incremento significativo en el IC en las muestras fototratadas en los experimentos irradiados durante tres periodos de 8 h (24 h), en los diferentes niveles de TiO<sub>2</sub> probados (0, 0.3 y 0.6 g TiO<sub>2</sub>). Lo anterior permite suponer que bajo éstas condiciones se producen reacciones de disociación de enlaces e incluso ruptura de las moléculas contaminantes, como describen Lee y col. (2004); asimismo, el aumento en el IC indica un aumento en el grado de oxidación de las muestras. Con base en estos resultados, en las condiciones ensayadas en esta tesis, no hubo efecto del catalizador sobre la oxidación de los HTP intemperizados en el suelo. Nuestros resultados coinciden con los de Kos y col. (2007), quienes realizaron reacciones de fotocátalisis con TiO<sub>2</sub> en agua jabonosa proveniente de auto-lavados usando una lámpara UV de 125 W a 20 °C, variando el tiempo (5 y 8 h), y la cantidad de TiO<sub>2</sub>. (0.5, 1.0, 1.5 y 2 g/dm<sup>3</sup>). Este grupo no observó diferencias significativas por efecto del catalizador, respecto a los porcentajes de la degradación del contaminante.

De acuerdo con Kos y col. (2007), las altas concentraciones de un catalizador durante un proceso fotoquímico, disminuyen la humedad natural del suelo, haciendo que el agua sea menos disponible para las reacciones. Así un exceso de fotocatalizador, en lugar de catalizar las reacciones las obstruye. Lo anterior permite suponer que, bajo las condiciones aquí probadas, el catalizador no reaccionó por la falta de agua (Reacción 5, Tabla 2).

### 5.3.2 Fotólisis y fotocatalisis con agua.

De acuerdo con los resultados encontrados al irradiar el suelo en estudio en ausencia de agua se consideró en lugar de agregar mayor cantidad de catalizador, trabajar a la humedad de capacidad de campo del suelo. Lo anterior se debe a que la capacidad de campo es la cantidad mínima de agua que se retiene de manera estable en un suelo (Ortiz y Ortiz, 1990). Con estos experimentos se buscó que el agua estuviera disponible para favorecer las reacciones de fotooxidación. En la Tabla 10 se muestran los resultados del IC medidos por espectrofotometría IR, correspondientes a los experimentos de fotólisis y fotocatalisis (en presencia y ausencia de catalizador), con una humedad correspondiente a la capacidad de campo en sistemas a humedad constante y variable, después de 3 h de irradiación de cada muestra.

**Tabla 10.-** Comparación de medias estadísticas (Tukey) de IC de fotólisis y fotocatalisis en suelo a la humedad de campo después de 3 horas de tratamiento. En todos los casos n fue de 2.

Muestra	Sistema	TiO <sub>2</sub> (g)	IC
<b>Control 2</b>	<b>No irradiado</b>	<b>0.3</b>	<b>0.21 A</b>
b <sub>2</sub>	Cerrado	0.3	0.26 A, B
b <sub>1</sub>	Cerrado	0	0.34 A, B
a <sub>1</sub>	Abierto	0	0.34 A, B
Control 1	No irradiado	0	0.35 B
<b>a<sub>2</sub></b>	<b>Abierto</b>	<b>0.3</b>	<b>0.39 B</b>

En esta Tabla se observa que el tratamiento realizado en el sistema abierto (cajas de Petri destapadas), con 0.3 g de catalizador se encontraron valores del IC diferentes al control; sin catalizador, sin embargo, dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por lo

tanto no se encontró evidencia significativa de que el IC se incremente por efecto de los tratamientos probados.

En la Tabla 11 se muestran los resultados del efecto de los tratamientos fotoquímicos, sobre el carbono soluble extraído de las muestras a humedad constante (sistema cerrado) y variable (sistema abierto), en ausencia y presencia de catalizador. No se encontraron variaciones significativas en la solubilidad del carbono orgánico en agua por efecto de, ninguno de los tratamientos probados.

**Tabla 11.-** Comparación entre medias estadísticas (Tukey) de carbono soluble (ppm) en muestras de suelo intemperizado con TPH, tratadas por fotólisis y fotocátalisis, a la humedad de campo después de 3 h de irradiación. En todos los casos n fue de 2.

Muestra	Sistema	TiO <sub>2</sub> (g)	COT (ppm C)
Control 2	No irradiado	0.3	18.42 A
b <sub>2</sub>	Cerrado	0.3	24.33 A
a <sub>1</sub>	Abierto	0	27.39 A
Control 1	No irradiado	0	29.02 A
a <sub>2</sub>	Abierto	0.3	49.81 A

Kos y col. (2007), realizaron reacciones de fotocátalisis usando TiO<sub>2</sub>, con una lámpara de 125 W a 20 °C, variando el tiempo de exposición (5 y 8 h) y las concentraciones de catalizador en cuatro dosis (0.5, 1. 1.5, y 2 g/dm<sup>3</sup>), en un medio acuoso. Ellos analizaron los productos de la fotooxidación generados. Comparando los resultados de Kos y col. (2007) con los obtenidos en esta tesis, donde se utilizó una lámpara de mayor potencia (150 W) en un lodo, con menor humedad (30% v/p) y menor tiempo de irradiación (3 h), se puede deducir que posiblemente, la cantidad de agua disponible para la reacción, así como el tiempo de la misma, fueron insuficientes; pero que la concentración del catalizador que fue excesiva. Se puede suponer que el rango de exploración de las variables independientes fue inadecuado y que, por esa razón, no se encontraron productos oxidados generados por efecto de los tratamientos probados. Otros factores que pudieron afectar fueron la rápida evaporación del agua presente en el suelo que, en los casos de los sistemas abiertos y la filtración de la energía absorbida por la cobertura Pyrex (rango de emisión reducido) en los sistemas cerrados (Figura 7, Sección 4.3.3), generó una baja eficiencia en las reacciones de fotooxidación (Potter y Hotchkiss, 1995).

De acuerdo con los resultados, se comparó la solubilidad de los hidrocarburos producida por estos tratamientos contra el mejor tratamiento obtenido en irradiación de suelo seco para generar un punto de comparación más claro y que se evidencie la eficiencia del tratamiento realizado en suelo seco.

En la Tabla 12 se muestran los resultados del carbono soluble en las muestras de suelo fototratado, analizado por la técnica de COT, comparado con los resultados de las muestras que se irradiaron durante tres foto-periodos de 8 h, con 0.3 g de TiO<sub>2</sub>, en ausencia de agua.

**Tabla 12.-** Comparación de medias estadísticas (Tukey), del efecto de los fototratamientos, en suelo seco y a humedad de campo, sobre la producción de carbono soluble. En todos los casos n fue de 2.

Muestra	Sistema	TiO <sub>2</sub> (g)	COT (ppm C)
<b>Control 2</b>	<b>No irradiado</b>	<b>0.3</b>	<b>18.42 A</b>
b <sub>2</sub>	Cerrado	0.3	24.33 A
a <sub>1</sub>	Abierto	0	27.39 A
Control 1	No irradiado	0	29.02 A
a <sub>2</sub>	Abierto	0.3	49.81 A
<b>Seco</b>	<b>24 h</b>	<b>0.3</b>	<b>127.6 B</b>

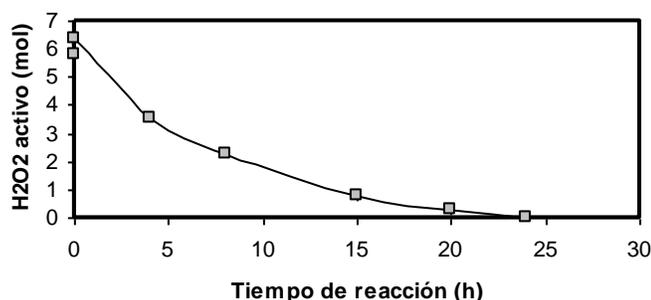
Se encontró un aumento significativo de siete veces en la solubilidad de los hidrocarburos por efecto del tiempo de irradiación, con respecto al control con la misma cantidad de catalizador. Estos resultados sugieren que la variable dominante, bajo las condiciones ensayadas fue el tiempo.

### 5.3.3 Fotosensibilización y peroxidación.

La ineficiencia oxidativa de las reacciones probadas en el suelo húmedo (capacidad de campo), generó la necesidad de adicionar al sistema de reacción un sensibilizante (peróxido de hidrógeno) para incrementar el poder oxidante de las reacciones efectuadas en los HTP. A continuación se presentan los resultados de la cinética del peróxido de hidrógeno.

### 5.3.3.1 Cinética de reacción del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

Para establecer las condiciones de reacción de la peroxidación, se realizó una cinética de la reacción del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) con el suelo intemperizado con HTP, midiendo como variable de respuesta, los miliequivalentes de oxígeno activo, equivalente a la cantidad de  $H_2O_2$  en 1kg de muestra (Farmacopea MGA 0681, 1998). La Figura 10 muestra la pérdida de actividad del  $H_2O_2$ , debida probablemente a su reacción con los hidrocarburos y la materia orgánica del suelo en estudio.



**Figura 10.** Cinética del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) activo en contacto con los HTP del suelo en estudio, en función del tiempo. Para cada punto n fue de 2.

Se encontró que la tendencia de la disminución de la actividad del  $H_2O_2$  fue una curva de tipo asintótica que se acerca al cero, alcanzando este punto después de las 20 horas, originando un comportamiento semi-parabólico con respecto al tiempo. Aproximadamente después de un día, el poder oxidante del  $H_2O_2$  desaparece casi en su totalidad. Esta respuesta sugiere que hay un tiempo al cual la desaparición (o pérdida de actividad del  $H_2O_2$ ) ya no es significativa y se puede considerar que la oxidación de los HTP habrá sido completa. Este resultado es congruente al trabajo de Mecozzi y col. (2006), que fijaron el tiempo de reacción del  $H_2O_2$  con suelo contaminado con HTP, en 24 h. Este grupo menciona que en el suelo, la descomposición del  $H_2O_2$  se puede dar parcialmente por la actividad de enzimas como la catalasa y la peroxidada. De esa manera Mecozzi y col. (2006) explican el rápido decremento del  $H_2O_2$  sin la adición del hierro. Con base en nuestros resultados, se fijó el tiempo de reacción en 24 h para realizar los siguientes experimentos de esta tesis.

### 5.3.3.2 Índice carbonilo y carbono soluble.

En la Tabla 13 se muestra el análisis estadístico del IC, correspondiente a los tratamientos de peroxidación y fotosensibilización (irradiación) y se observa que todas las muestras que estuvieron en contacto con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mostraron un incremento significativo en el IC con respecto a los controles y a las muestras que no fueron expuestas al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Tabla 13.** Comparación (Tukey) del efecto de los tratamientos de peroxidación y fotosensibilización, sobre el IC en muestras de un suelo contaminado con HTP. En todos los casos n fue de 4.

Muestra	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Luz natural	Irradiación (3 h)	TiO <sub>2</sub> (g)	IC
d <sub>2</sub>	Si	Si	No	0.3	0.31 A
c <sub>1</sub>	Si	Si	Si	0	0.34 A
<b>f<sub>2</sub></b>	<b>No</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>0.3</b>	<b>0.35 A</b>
b <sub>2</sub>	Si	No	No	0.3	0.50 A, B
<b>e<sub>2</sub></b>	<b>No</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>0.3</b>	<b>0.53 A, B</b>
c <sub>2</sub>	Si	Si	Si	0.3	0.54 A, B
c <sub>3</sub>	Si	Si	Si	0.6	0.77 B, C
d <sub>1</sub>	Si	Si	No	0	0.77 B, C
a <sub>2</sub>	Si	No	Si	0.3	0.81 B, C
<b>d<sub>3</sub></b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>0.6</b>	<b>1 C</b>

Estos resultados indican que los tratamientos a<sub>2</sub>, c<sub>2</sub>, c<sub>3</sub>, d<sub>1</sub>, y d<sub>3</sub> incrementaron los niveles de oxidación en los HTP de las muestras de suelo. A continuación se muestra la relación de las claves de los tratamientos:

- > (a<sub>2</sub>) irradiado durante 3 h, con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 0.3 g de TiO<sub>2</sub> sin luz natural.
- > (c<sub>2</sub>) irradiado durante 3 h con 0.3 g de TiO<sub>2</sub> y en presencia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de luz natural.
- > (c<sub>3</sub>) irradiado durante 3 h con 0.6 g de TiO<sub>2</sub> y en presencia H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de luz natural.
- > (d<sub>1</sub>) peroxidado durante 24 h en presencia de luz natural sin fotocatalizador,
- > (d<sub>3</sub>) peroxidado durante 24 h en presencia de luz natural con 0.6 g de TiO<sub>2</sub>.
- > (e<sub>2</sub> y f<sub>2</sub>) controles.

Se observó que al poner en contacto el suelo en estudio con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el IC de los hidrocarburos contenidos en las muestras incrementó como efecto de la peroxidación, aún

más que con cualquier tratamiento fotoquímico aquí ensayado. Lo anterior indica que se obtuvo la misma respuesta en el nivel de oxidación al irradiar en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que simplemente no irradiar y mantener las muestras en oscuridad parcial evaporando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hasta sequedad.

Los resultados del IC se reafirman y se hacen más evidentes al hacer un análisis del carbono orgánico soluble, dando evidencias claras de que los mejores resultados se obtuvieron en las muestras no irradiadas, oxidadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en oscuridad parcial, con los tres niveles de catalizador. Esto último indica que no hubo ningún efecto del catalizador sobre las reacciones de oxidación abiótica ensayadas, como se puede observar en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Análisis estadístico (Tukey) del contenido de carbono orgánico total soluble (COT) de los productos de los diferentes tratamientos de peroxidación, fotosensibilización y sus controles. El tiempo de irradiación fue de 3 h. En todos los casos n fue de 4.

Muestra	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Luz natural	Irradiado	TiO <sub>2</sub> (g)	COT (ppm C)
f <sub>2</sub>	No	Si	Si	0.3	23.19 A
e <sub>2</sub>	No	Si	Si	0.3	24.46 A
c <sub>3</sub>	Si	Si	Si	0.6	514.87 B
a <sub>2</sub>	Si	No	Si	0.3	613.62 B, C
c <sub>1</sub>	Si	Si	Si	0	623.12 B, C
b <sub>2</sub>	Si	Si	No	0.3	659.00 B, C
c <sub>2</sub>	Si	Si	Si	0.3	688.40 B, C
<b>d<sub>3</sub></b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>0.6</b>	<b>692.45 B, C, D</b>
<b>d<sub>1</sub></b>	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>No</b>	<b>0</b>	<b>796.25 C, D</b>
<b>d<sub>2</sub></b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>0.3</b>	<b>876.15 D</b>

Las comparaciones entre las medias estadísticas del incremento en el contenido de COT, una medida del aumento de la solubilidad de los HTP, entre todos los tratamientos de oxidación abiótica y tomando en cuenta que no hubo efecto del catalizador, se observó que el mejor resultado se obtuvo al exponer el suelo contaminado al efecto oxidante del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en oscuridad parcial y ausencia de luz UV y de TiO<sub>2</sub>. Nuestros resultados indicaron que en las reacciones efectuadas en ausencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con 0 y 0.3 g de catalizador y condiciones de inundación (2 volúmenes de agua por una parte de suelo), no se generó una oxidación

significativa. Sin embargo, bajo las mismas condiciones de humedad, pero en presencia de  $H_2O_2$  al 10%, se obtuvo indistintamente de la cantidad de catalizador (Tabla 14), un incremento significativo del nivel de oxidación de los HTP encontrando un incremento de la solubilidad en promedio 33 veces mayor en los tratamientos con  $H_2O_2$  que en los tratamientos sin  $H_2O_2$ . En el tratamiento de fotosensibilización se encontró que la oxidación estuvo influenciada principalmente por efecto del  $H_2O_2$  y que ni la luz, ni el catalizador tuvieron efecto sobre la oxidación de las muestras.

La luz UV excita al  $H_2O_2$  para que reaccione con la materia orgánica, tal como lo muestran las Reacciones 3, 4, y 5 (Tabla 2), de tal forma que las reacciones realizadas en oscuridad total son menos eficientes que las llevadas a cabo en presencia de luz natural. Lo anterior explica la influencia de la luz en los resultados, además de que probablemente bajo las condiciones de oxidación probadas, el rango de sensibilidad del efecto de la luz UV era poco o nulo, por lo que no se encontró el efecto potenciado que se buscaba de tal forma que, el cooxidante se convirtió en el oxidante principal.

La reacción del  $H_2O_2$  con los HTP intemperizados en el suelo de estudio, se influenció por la excitación de la luz ambiental parcial, combinada con la reacción de Fenton (ASTM-F1524-95, 1995). Mecozzi y col. (2006), explican que cuando a un suelo no se le adiciona un metal de transición (como en el caso de las reacciones ensayadas en esta tesis), las reacciones de Fenton (Sección 2.6.4), se llevan a cabo al entrar en contacto los metales naturales del suelo con el  $H_2O_2$  que, al encontrarse en pequeñas concentraciones, generan reacciones de menor eficacia, por tener a los metales como reactivo limitante. Los procesos de oxidación liberan pequeñas cantidades de materia orgánica a partir de grandes moléculas y esos cambios en la materia orgánica natural, la hace menos hidrofóbica. Lo anterior se debe al mecanismo de reacción del radical hidroxilo que, generalmente, involucra una adición electrofílica a los alquenos o a los anillos aromáticos (Mecozzi y col. 2006).

Se encontró que la peroxidación por 24 h de HTP intemperizados en un suelo, en ausencia de irradiación y con luz parcial generó un incremento significativo en los niveles de oxidación (Tabla 13) y en la fracción soluble (Tabla 14) de los hidrocarburos, junto con una disminución del pH (Sección 5.1.1). Éstos resultados permiten suponer que se generó una nueva mezcla de hidrocarburos de composición química y, probablemente, de concentración diferente a la mezcla original de HTP en el suelo, debido a la ruptura de enlaces e incluso moléculas, derivados de mecanismos de oxidación (Lee y col. 2004) con características ecotoxicológicas desconocidas.

Con el fin de disponer de una mayor cantidad de material para evaluar el efecto ecotóxico del tratamiento de oxidación avanzada que generó los mayores cambios en las variables de respuesta, se incrementó el volumen de la unidad experimental cuarenta veces. Para lo anterior se utilizó un vaso de precipitado de 1L, conservando las condiciones de reacción (peroxidación, luz natural parcial, ausencia de luz UV, 24 h de reacción y 24 h de evaporación con luz natural total). Se compararon las variables de respuesta entre el tratamiento a nivel laboratorio (en muestras de 5 g) y el magnificado (en muestras de 200 g). Para conocer la reproducibilidad del tratamiento al magnificarlo se midieron, como variables de respuesta, el índice carbonilo y el carbono orgánico total (n= cuatro). No se encontraron diferencias significativas entre las variables de respuesta, en función del volumen de suelo tratado de acuerdo a las desviaciones estándar. Estos resultados sugieren que las condiciones de magnificación del tratamiento en los experimentos de esta tesis, no alteraron el nivel de contacto entre los reactivos respecto al tratamiento a nivel laboratorio.

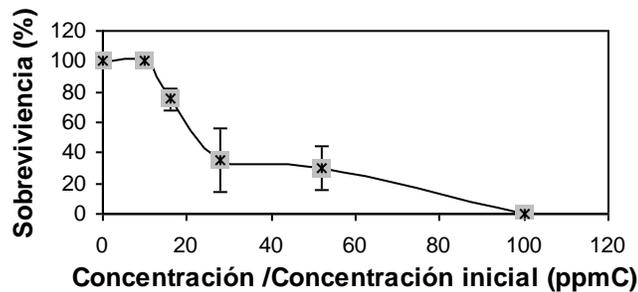
#### **5.4 Evaluación ecotoxicológica.**

##### **5.4.1 Bioensayo con *Daphnia magna*.**

El bioensayo con *D. magna* se realizó conforme a lo descrito en la Sección 4.7.1, utilizando los lixiviados del suelo tratado bajo las condiciones de oxidación avanzada especificadas en la Sección 5.3.3.2. Los resultados del bioensayo de *D. magna*, en suelo sin tratamiento se calcularon interpolando en la ecuación de la curva  $Y = 0.0199x^2 - 0.9156x + 10.611$ , ( $R^2 = 0.92$ ), obtenida a partir de los datos de la sobrevivencia de *D. magna* a diferentes concentraciones de lixiviados del suelo sin tratamiento. Se encontró que la **CL<sub>50</sub>** para este organismo, bajo las condiciones ensayadas fue de **7.5 mg C/L**. Los resultados del bioensayo de *D. magna* obtenida de forma similar a la ecuación anterior, pero en lixiviados de suelo peroxidado, se determinaron mediante la ecuación  $Y = 0.0002x^2 - 0.1059x + 11.644$ , ( $R^2 = 0.94$ ), y se encontró que la **CL<sub>50</sub>** fue de **72 mg C/L**. Estos resultados indican que los productos solubles en agua, derivados de la peroxidación de los HTP intemperizados en el suelo, incrementaron significativamente la CL<sub>50</sub> de la *D. magna*, respecto a su control, lo que sugiere que su toxicidad fue menor. Al comparar la dosis de HTP solubilizados en agua (7.5 mg C/L) con la nueva mezcla de hidrocarburos solubles que se generó después de la peroxidación (72 mg C/L), se encontró que se requiere una dosis aproximadamente 10 veces

más alta del contaminante para matar al 50% de la población de *D. magna*. Este resultado indica que los productos solubles y neutralizados generados por la peroxidación disminuyeron la toxicidad de la película acuosa del suelo problema para el caso de este organismo.

Huey-Min y col. (2007) afirman que, si la solubilidad de los hidrocarburos en agua aumenta después de un tratamiento de remediación, entonces, se puede considerar que la toxicidad también aumenta, por que los organismos acuáticos se exponen a concentraciones solubles más altas que los tóxicos originales. Para comprender este razonamiento, y facilitar la interpretación de nuestros resultados es conveniente cambiar las unidades de mg C/L, a porcentajes. En las Figuras 11 y 12 se muestran los resultados del bioensayo control (con lixiviados de suelo sin tratar) y el bioensayo realizado con lixiviados del suelo peroxidado, donde las abscisas corresponden al porcentaje de dilución que se relaciona con el porcentaje de sobrevivencia.



**Figura 11.-** Porcentaje de sobrevivencia de *D. magna* en lixiviados de suelo contaminado con HTP sin tratar. Para cada punto n fue de 2.

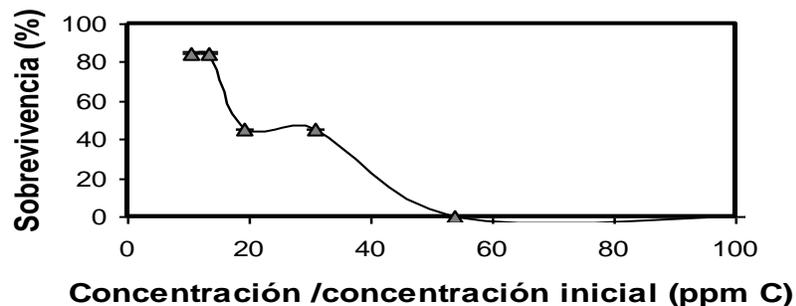
Mediante un ajuste estadístico de éstos resultados se obtuvieron las funciones:

(1)  $Y = 9.7653 X^3 - 13.269 X^2 + 2.5587 X + 0.9428$ ; ( $R^2 = 0.98$ ), para el bioensayo control y,

(2)  $y = 2.0429 x^2 - 3.2293 x + 1,1603$ ; ( $R^2 = 0.94$ ), para el bioensayo con lixiviados del suelo peroxidado.

Se encontró que, la  $CL_{50}$  en el bioensayo control fue del 39% de la dilución de la concentración original, y en los bioensayos en suelo peroxidado fue del 24%. En congruencia con el incremento (hasta 33 veces) en solubilidad de HTP que se encontró en el suelo intemperizado con una concentración inicial de  $24906 \pm 660$  mg/Kg de HTP, (Tabla 14,

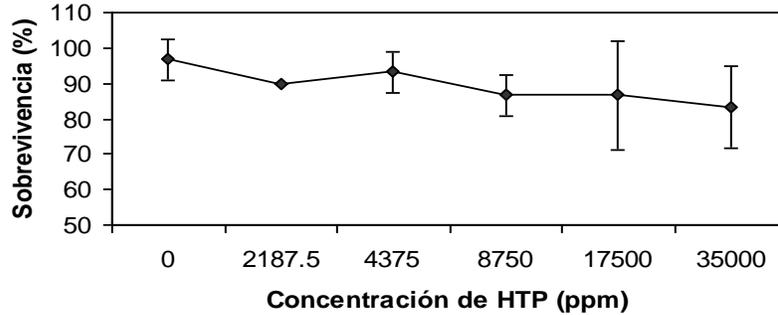
Sección 5.3.3.2), como efecto del tratamiento de peroxidación se observó que el mismo tratamiento sobre la matriz del suelo intemperizado con  $32375 \pm 3712$  mg/Kg, aumentó la solubilidad de los HTP en promedio 13 veces. Este último suelo es el que se utilizó en los bioensayos y se encontró que su toxicidad sobre *D. magna* disminuyó aproximadamente 10 veces. Estos resultados permiten suponer que, pese a la disminución aparente de la toxicidad de los productos del tratamiento de peroxidación, se podría esperar que si este tratamiento se realizara *in situ* los productos de la peroxidación realizada en las condiciones de este trabajo serían más ecotóxicos para los organismos acuáticos, en congruencia con lo que establecen Huey-Min y col. (2007).



**Figura 12.-** Porcentaje de supervivencia de *D. magna* en lixiviados de productos de la peroxidación de un suelo contaminado con HTP. Para cada punto n fue de 2.

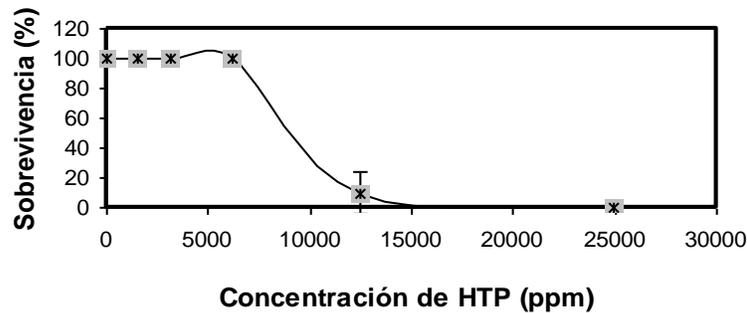
#### 5.4.2 Bioensayo con *Eisenia foetida*.

El bioensayo de *E. foetida* se realizó conforme a lo descrito en la Sección 4.7.2, utilizando el suelo tratado bajo las condiciones de magnificación de oxidación abiótica. En la Figura 13, se muestra la supervivencia de *E. foetida* en el suelo control, en donde no se encontró una concentración letal media en el rango explorado, encontrando que la mortandad de los organismos en el control, no rebasó en ninguno de los casos el 20%. Lo anterior se considera aceptable de acuerdo con los criterios de validez para el bioensayo de *D. magna* (NMX –AA-1995-SCFI, 1995), y se toma como parámetro para inferir que, con *E. foetida*, también se puede considerar aceptable.



**Figura 13.-** Porcentaje de sobrevivencia de *E. foetida* en suelo intemperizado con HTP sin tratamiento. Para cada punto n fue de 3.

Los resultados del bioensayo en el suelo peroxidado se muestran en la Figura 14, de donde se generó la ecuación:  $Y = 1 \times 10^{-8} X^2 - 0.0008 X + 11.47$ , ( $R^2 = 0.85$ ), a partir de la cual se encontró que la  $CL_{50}$  para *E. foetida* en presencia de las muestras oxidadas fue de 9375 ppm de hidrocarburos producto del tratamiento de oxidación avanzada en el suelo estudiado.



**Figura 14.-** Porcentaje de sobrevivencia de *E. foetida* en función de la porción de suelo peroxidado. Para cada punto n fue de 2.

Se observó que en las muestras con una proporción de 50 y 100% de suelo tratado, hubo una mortandad prácticamente total, mientras que el resto de las proporciones del suelo probadas, resultaron inocuas para *E. foetida*.

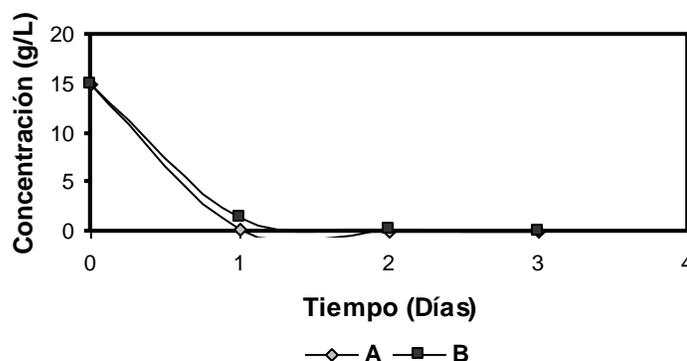
Lo anterior permite suponer que el contacto con pequeñas cantidades de los productos generados por la peroxidación de los componentes de los HTP contenidos en el suelo en estudio, provoca un daño ecotóxico importante para las poblaciones de la especie estudiada. Lo anterior indica que la oxidación del suelo contaminado con HTP incrementó la presencia

de compuestos tóxicos y corrobora el resultado obtenido para *D. magna*. Estos resultados pudieron estar influenciados por un efecto de la acidez del suelo que, después de la peroxidación, bajó hasta un pH de 3 (Sección 5.1.1), este efecto interfiere con los resultados de ecotoxicidad, de modo que éstos resultados no son concluyentes.

### 5.4.3 Bioensayo con microorganismos.

El bioensayo con microorganismos endémicos se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la Sección 4.7.3. Para lo anterior, se midió el consumo de glucosa y la respiración como variables de respuesta.

En la Figura 15, se muestra la cinética de consumo de glucosa por el consorcio, comparando el suelo peroxidado (B) con suelo sin tratamiento (A). La cinética de bioensayos con microorganismos inoculados en agrolita se omitió por que el soporte se contaminó.



**Figura 15.-** Cinética de consumo de glucosa. Donde A = agrolita con suelo intemperizado con HTP sin tratamiento y B = agrolita con productos de un tratamiento de peroxidación sobre un suelo intemperizado con HTP. En todos los casos n, para cada punto fue de 2.

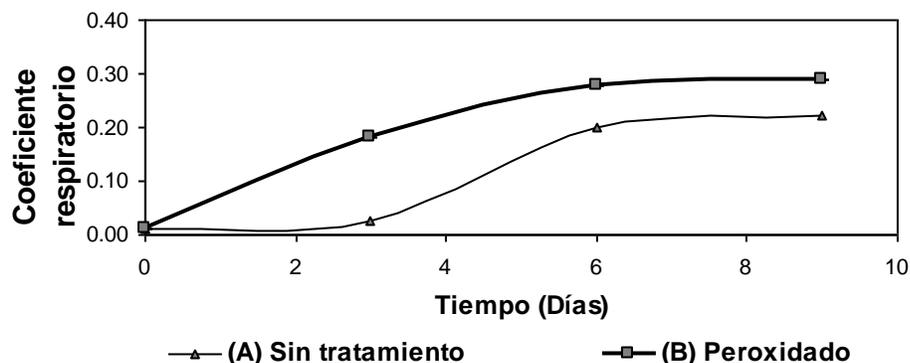
Se observó en ambos casos que la glucosa se consumió en su totalidad durante el primer día de incubación y no se observaron diferencias significativas en función del tratamiento de peroxidación del suelo. Lo anterior sugiere que la actividad metabólica no se afectó debido a la presencia de los productos derivados de la peroxidación de los HTP. Esto pudo deberse a que los productos que se generaron con la oxidación avanzada no tuvieron efecto en la toxicidad para el consorcio ensayado, al menos durante las primeras 24 h, que es el tiempo en el que se consumió la glucosa casi en su totalidad.

La fase lag puede durar entre 10 y 20 h, utilizando glucosa como única fuente de carbono en un cultivo de microorganismos, dependiendo de las condiciones del medio (Velasco-Alvarez,

2006). En el caso de los hidrocarburos alifáticos, la fase lag puede llegar a ser entre 7 y 9 días, utilizando cultivos mixtos con una concentración inicial de 10000 mg/L de hidrocarburos (Díaz-Ramírez, 2004). Lo anterior permite suponer que la adición de glucosa a los cultivos pudo disminuir la fase de adaptación (lag) para las muestras de suelo contaminado con HTP sin tratamiento y para el suelo contaminado con hidrocarburos producto de un tratamiento de peroxidación.

Por otra parte, el coeficiente respiratorio (CR) permite relacionar la degradación de hidrocarburos con la actividad microbiana y con la generación de subproductos tóxicos, e inferir si el compuesto se mineralizó hasta CO<sub>2</sub>. Un valor del CR entre 0.6 y 0.8, sugiere que los hidrocarburos degradados fueron principalmente mineralizados (Acosta, 2008). Si el valor del CR es igual o menor a 0.6, la mayor parte del O<sub>2</sub> consumido es utilizado para la formación de biomasa y/o producción de metabolitos y, en menor cantidad, para la producción de CO<sub>2</sub> como respuesta de la mineralización del hidrocarburo (Volke-Sepúlveda y col. 2006; Velasco-Alvarez, 2006). En la Figura 16 se muestran los resultados de la cinética del CR obtenido a partir de los hidrocarburos generados por el tratamiento abiótico (B), comparado con HTP intemperizados en suelo sin tratamiento (A).

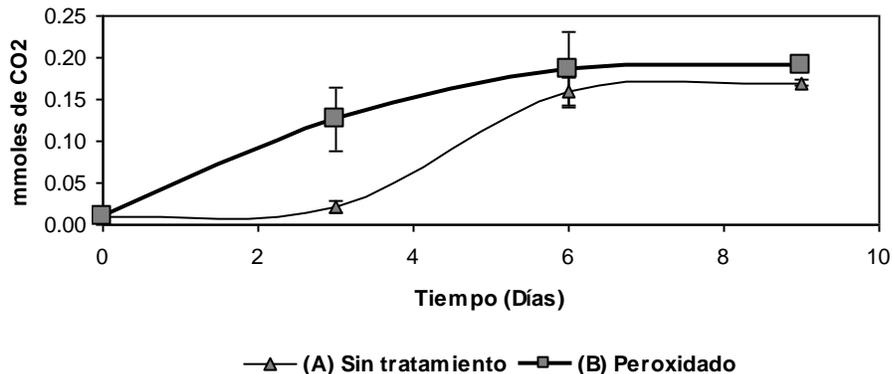
Los valores del CR del suelo intemperizado con HTP sin tratamiento (Figura 16), fueron menores que en la cinética del CR de muestras de un suelo peroxidado, aún cuando en el consumo de glucosa (Figura 15) no difieren, se esperaría entonces, que los valores de CR fueran similares.



**Figura 16.-** Cinética de coeficientes respiratorios (CR) de diferentes mezclas de suelo contaminado con HTP, inoculadas con un consorcio microbiano. Donde A = agrolita con suelo intemperizado con HTP sin tratamiento y B = agrolita con productos de un tratamiento de peroxidación sobre un suelo intemperizado con HTP. En todos los casos n, para cada medición fue de 2.

Negri y col. (2004), explican que la velocidad de degradación de los hidrocarburos se relaciona con su biodisponibilidad, en los casos en que se presentan fenómenos de sorción. Lo anterior permite suponer que, el tratamiento de peroxidación, logró desorber los hidrocarburos del suelo y, por tanto hacerlos más biodisponibles. Este resultado es congruente con el que se presenta en la Sección 5.3.3.2, donde se evidenció un incremento significativo en la solubilidad en agua de los productos de un tratamiento de peroxidación sobre un suelo intemperizado con HTP, como efecto del tratamiento de oxidación avanzada. Estos resultados permiten suponer que el tratamiento de oxidación avanzada sobre el suelo en estudio, además de favorecer la solubilidad en agua y por consiguiente, la biodisponibilidad de los HTP presentes, también pudo incrementar su desorción del suelo (Gutiérrez-Rojas, 2000).

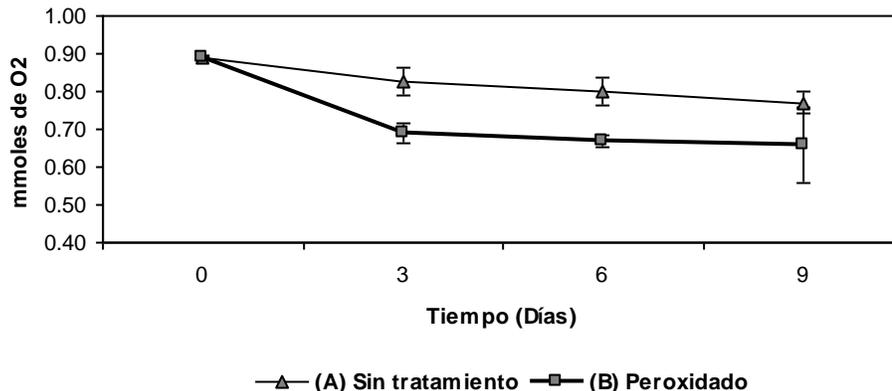
Díaz-Ramírez y col. (2008), encontraron que la actividad metabólica de un consorcio adaptado a la degradación de hidrocarburos, se reflejó en un CR global de 0.24 mol CO<sub>2</sub>/mol O<sub>2</sub>, durante la degradación de hidrocarburos alifáticos durante 18 días y de 0.26 mol CO<sub>2</sub>/mol O<sub>2</sub>, al degradar una mezcla de hidrocarburos aromáticos y polares durante 38 días de cultivo. Comparando los valores anteriores con los del presente estudio (Figura 16), se observó que los CR obtenidos a los 6 días de incubación de las muestras peroxidadas fueron similares. De acuerdo con estos resultados, se puede suponer que los productos de la peroxidación no se mineralizaron completamente ya que el CR está por debajo del rango asociado con la mineralización de los hidrocarburos (Acosta, 2008). La mineralización de un hidrocarburo se puede estimar con la cantidad de CO<sub>2</sub> producido en un medio con hidrocarburos como única fuente de carbono (Volke-Sepúlveda y col. 2006). En la Figura 17, se muestra la cinética de la producción de CO<sub>2</sub> durante los bioensayos.



**Figura 17.-** Cinética de CO<sub>2</sub> de diferentes mezclas de suelo contaminado con HTP, inoculadas con un consorcio microbiano. A= agrolita + suelo contaminado con HTP sin tratamiento, B= agrolita + suelo contaminado con HTP, luego de un tratamiento de peroxidación. En todos los casos n, para cada medición fue de 2.

Se observó una menor producción de CO<sub>2</sub> en la cinética del suelo intemperizado con HTP sin tratamiento, respecto a la cinética de las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos peroxidados. Este resultado sugiere que el tratamiento de oxidación abiótica hace más biodisponibles a los hidrocarburos del suelo, corroborando los resultados que se muestran en la Tabla 16.

Las etapas iniciales de la biodegradación de hidrocarburos dependen directamente del oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) disponible, debido a que las principales rutas degradativas involucran enzimas oxigenasas (Velasco-Alvarez, 2006). Cuando los hidrocarburos se usan como única fuente de carbono, el O<sub>2</sub> consumido es utilizado no solo para la producción de energía, si no que también se requiere para incrementar los niveles de oxidación del sustrato en las primeras etapas del metabolismo (Volke-Sepúlveda y col. 2006). En la Figura 18, se muestra la cinética del consumo de O<sub>2</sub> en el suelo peroxidado comparado con muestras de suelo intemperizado con HTP sin tratamiento.



**Figura 18.-** Cinética de O<sub>2</sub> de diferentes mezclas de suelo intemperizado con HTP, inoculadas con un consorcio microbiano. Donde A= agrolita + HTP en suelo sin tratamiento, B= agrolita + suelo contaminado con HTP, después de un tratamiento de peroxidación. En todos los casos n, para cada medición fue de 2.

Se observó un consumo de O<sub>2</sub> significativamente mayor en el suelo contaminado con HTP tratado por peroxidación respecto a las muestras de suelo intemperizado con HTP, sin tratamiento. Con base en lo anterior, es posible suponer que el bajo valor de la CR (Figura 16), pudo deberse a la presencia de especies tóxicas que pudieron ser generadas durante el tratamiento de la peroxidación o bien como producto de las rutas catabólicas aerobias que posiblemente biotransformaron los contaminantes, generando sustancias más tóxicas que las originales (Barathi y Vasudevan, 2003). El incremento en la toxicidad de los productos de la peroxidación, estimado mediante estudios respirométricos, es congruente con los resultados encontrados en los bioensayos con *D. magna* y *E. foetida*.

## CONCLUSIONES.

La irradiación de muestras de 5 g del suelo problema durante tres fotoperiodos de 8 horas en ausencia de agua y de fotocatalizador, incrementó significativamente el nivel de oxidación (dos veces) y la solubilidad (siete veces) de los HTP sorbidos en el suelo. Con base en dicha respuesta, se obtuvo evidencia suficiente para suponer que la reacción produjo una transformación y una eventual desorción de los contaminantes incrementando su biodisponibilidad.

Al evaluar el efecto de diferentes variables en reacciones de fotólisis y fotocátalisis sobre un suelo intemperizado contaminado con HTP, se encontró que la humedad (30% v/p) y el incremento en la concentración del catalizador disminuyeron la eficacia de las reacciones bajo las condiciones exploradas. La variable más significativa para el tratamiento de oxidación fue el tiempo, pero al superar las 24 horas de irradiación, la eficacia de las oxidaciones disminuyó, regresando los niveles de oxidación al estado basal cuando se irradió durante cinco foto periodos de 8 h.

Al comparar los efectos de la fotosensibilización con  $H_2O_2$ , con la peroxidación sin irradiación sobre el suelo intemperizado con HTP, la eficacia de la fotosensibilización fue superada por la peroxidación, evidenciado por un incremento significativo (hasta 33 veces) en la solubilidad de los hidrocarburos peroxidados.

De acuerdo con los bioensayos de ecotoxicidad realizados con tres tipos de organismos (*D. magna*, *E. foetida*, y microorganismos), la ecotoxicidad de los productos de la peroxidación de los HTP presentes en un suelo intemperizado aumentó con respecto al suelo sin tratar. Respecto a los resultados del bioensayo con microorganismos, se encontró evidencia suficiente para suponer que, el tratamiento de peroxidación en un suelo intemperizado con HTP, incrementó la biodisponibilidad de los productos de las reacciones.

## **6 RECOMENDACIONES.**

Se recomienda para futuros experimentos en esta línea de investigación, en cuanto a las oxidaciones avanzadas en suelos intemperizados con hidrocarburos:

- Explorar el efecto de la concentración del fotocatalizador en un rango menor al 6% (p/p), así mismo, explorar condiciones de reacción con una humedad mayor a 30% (v/p).
- Ampliar los rangos de tiempo en las reacciones fotolíticas y fotocatalíticas.
- Ensayar reacciones de Fenton, analizando el efecto de la concentración de metales en el suelo.
- Incluir como variable independiente, diversos tipos de agitación de la muestra durante los tratamientos.
- Incluir como variable la concentración inicial de HTP intemperizados en el suelo.

En materia de bioensayos:

- Realizar ensayos ecotoxicológicos que evidencien la influencia independiente del cambio del pH, que se genera como producto de la oxidación de hidrocarburos en suelo; trabajando con el pH ajustado y sin ajustar en cada uno de los bioensayos seleccionados.
- Incrementar la cantidad de muestras en el tiempo de evaluación por respirometría, para los bioensayos con el consorcio microbiano.

## 9.- REFERENCIAS.

1. Acosta G. 2008. Evaluación por respirometría de la bioestimulación con nutrientes y de la bioaumentación con *Acinetobacter sp.* en la biorremediación de suelos contaminados con diesel. Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
2. Arellano J., Moreno M., Sarasquete C., Arufe M. 2003. Efectos tóxicos del herbicida logran extra sobre la supervivencia y el crecimiento de larvas de dorada (*Sparus Aurata*). En XV Congreso Español de Toxicología. *Toxicology*. 20(5): 102-103.
3. ASTM – F1524-95. 1995. Standard Guide for Use of Advanced Oxidation Process for Mitigation of Chemical Spills. ASTM. International, Standards Worldwide – Home.
4. Baer K., y Goulden G. 1998. Evaluation of a High-Hardness COMBO Medium and Frozen Algae for *Daphnia magna*. *Toxicology and Environmental Safety*. 39: 201-206.
5. Baker K. y Herson, D. 1994. Bioremediation. McGraw-Hill, New York. 1-7 pp.
6. Barathi S., y Vasudevan N. 2003. Bioremediation of Crude Oil Contaminated Soil by Bioaugmentation of *Pseudomonas fluorescens* NS1. *Journal of Environmental Science and Health. Part A*. 38(9): 1857- 1866.
7. Borel P. 1980. Fotoquímica. El manual moderno S.A. México D. F. 144 pp.
8. Callow P. 1993. Handbook of ecotoxicology. Blackwell Scientific publications. Oxford: 251-277 pp.
9. Candela R. 2007. Evolución de la toxicidad y la biodegradabilidad de contaminantes persistentes en medios acuosos durante un proceso de fotocatalisis solar empleando diferentes técnicas analíticas. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. España.
10. Chang R. 2007. Química. 9ª edición. Mc Graw-Hill, México. 1063 pp.
11. Colby S. 1996. Compendio de Bioquímica. El manual moderno S.A. de C. V., México. 333 pp.
12. Connell D., Lam P., Richardson B. y Wu R. 1999. Introduction to Ecotoxicology. Blackwell Science. Ltd. Great Britain. 170 pp.
13. D'Auria M., Emanuele L., Racioppi R., y Velluzzi V. 2009. Photochemical degradation of crude oil: Comparison between direct irradiation, photocatalysis, and photocatalysis on zeolite. *Journal of Hazardous Materials*. 164: 32-38.
14. Dagnino A., Sforzini S., Donadero F., Fenoglio S., Bona E., Jensen J. y Viarengo A. 2008. A Weight-of-Evidence Approach for the integration of Environmental Triad Data to Assess Ecological Risk and Biological Vulnerability. *Integrated Environmental Assessment and Management*. 4(3): 314-326.
15. Díaz-Ramírez I. 2004. Biodegradación de hidrocarburos por cultivos mixtos definidos aislados de la rizósfera de *Cyperus Laxus Lam.* Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.
16. Díaz-Ramírez I., Escalante-Espinoza E., Favela-Torres E., Gutiérrez-Rojas M. y Ramírez Saad H. 2008. Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude

- oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 62(1): 21-30.
17. Escalante-Espinoza, E. Gallegos-Martínez M., Favela Torres E. y Gutiérrez Rojas M. 2005. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus*, Lam. Inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere*. 59: 405-413.
  18. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos MGA 0681. 1998. Secretaría de Salud. 5ª edición. México. 223 pp.
  19. Fiúza A. y Vila M. 2005. An insight into soil bioremediation through respirometry. *Environment International*. (31): 179-183.
  20. García R. Saucedo C. Flores H. y Gutiérrez R. 2002. Mass transfer and hydrocarbon biodegradation of aged soil in slurry phase. *Biotechnology Progress*. 18(4): 728-733.
  21. Gerritsen A., Van Der Hoeven N., y Pielaat A. 1998. The Acute Toxicity of Selected Alkylphenols to Young and Adult *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and environmental safety*. *Environmental Research*. Section B. 39: 227-232.
  22. Gutiérrez-Rojas. M. 2000. Strategies to increase bioavailability of recalcitrant molecules in contaminated soils. *Environmental Biotechnology and Cleaner Bioprocesses*. Chap. 13 (Olguín E., Sánchez G., Hernández E. Eds). Taylor and Francis, London. 167-177 pp.
  23. Huey-Min H., Xiaoke H., y Xueheng Z. 2007. Enhanced Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Environmentally Friendly Techniques. *Journal of Environmental Science and Health*. Part C, 25: 313-352.
  24. Iturbe R., Flores C., Castro A., y Torres L. 2007. Sub-soil contamination due to oil spills in six oil-pipeline pumping stations in northern Mexico. *Chemosphere*. 68: 893-906.
  25. Johansson B., Friman R., Hakanpaa-Latinen H., y Rosenholm J. 2009. Solubility and interaction parameters as references for solution properties II: Precipitation and aggregation of asphaltene in organic solvents. *Advances in Colloid and Interface Science*. 147 (148): 132-143.
  26. Kaise M., Nagai H., Tokuhashi K., Kondo S., Nimura S. y Kikuchi O. 1994. Electron Spin Resonance Studies of Photocatalytic Interface Reactions of Suspended M/TiO<sub>2</sub> (M=Pt, Pd, Ir, Rh, Os, or Ru) with Alcohol and Acetic Acid in Aqueous Media. *Langmuir*. 10(5): 1345-1347.
  27. Kaneko M. y Okura I. 2002. Photocatalysis: Science and Technology. Biological and medical physics series. Kodansha and Springer. Japan. 356 pp.
  28. Kleindienst T., Conner T., McIver C., y Edney E. 2004. Determination of Secondary Organic Aerosol Products from the Photooxidation of Toluene and their Implications in Ambient PM<sub>2.5</sub>. *Journal of Atmospheric Chemistry*. 47: 79-100.
  29. Kos L., Perkowski J, y Bzdon S. 2007. Application of Photocatalytic Oxidation in the Presence of TiO<sub>2</sub> in Small Sewage Treatment Plants. *Separation Science and Technology*. 42: 1553-1563.
  30. Lee K., Lee J. Khinast J., Stencel J., y Lavid M. 2004. Photochemical Remediation of Tetrachloroethylene: Reactor Design, construction, and Preliminary Results. *Journal of Environmental Engineering*. 130: 100-103.

31. Martínez M. 1999. Potencial de la lombricultura. Lombricultura Técnica Mexicana. 2ª edición. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 140 pp.
32. Mecozzi R., Di Palma L., y Merli C. 2006. Experimental in situ chemical peroxidation of atrazine in contaminated soil. *Chemosphere*. 62: 1481–1489.
33. Mougín C. 2002. Bioremediation and phytoremediation of industrial PAH-polluted soils. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 22:1011-1043.
34. Nadeau D., Corneau S., Plante I., Morrow G., y Tanguay R. 2001. Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cells Stress and Chaperones*. 6(2): 153-163.
35. Navarro-Aviñó J., Aguilar-Alonso I., López-Moya J. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas. Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*. 16 (2).
36. Negri M., Manfredini A., Saponaro S., Sorlini C., Bonomo L., Valle A. y Zanardini E. 2004. Solid Phase Treatment of an Aged Soil Contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of environmental Science and Health. Part A*. 39: 1-17.
37. Norma Oficial Mexicana. NMX-AA-087-1995-SCFI. 1995. Análisis de agua- Evaluación de toxicidad aguda con *Daphnia magna* Status (Crustácea-Cladocera)- Método de prueba.
38. Núñez M. y Hurtado J. 2005. Bioensayo de toxicidad aguda utilizando *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Daphniidae) desarrollada en medio de cultivo modificado. *Revista Peruana de Biología*. 12:165-170.
39. Ogunseitan O. 2003. Biotechnology and industrial ecology: new challenges. *African Journal of Biotechnology*. 2 (12): 596-601.
40. Olmstead. A. y Le Blanc G. 2003. Insecticidal Juvenile Hormone Analogs Stimulate the Production of Male Offspring in the Crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Health Perspectives*. 111(7): 919-924.
41. Ortiz V. y Ortiz S. 1990. Edafología. 7ª edición. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 393 pp.
42. Poirrier G. y Schiappacasse D. 2007. Determinación de biodegradabilidad aerobia por medio de un equipo automático de respirometría. En anuario 2006/ Dirección de investigación e innovación. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. 306 pp.
43. Potter N. y Hotchkiss J. 1995. Food Science. 5ª edición. Chapman y Hall. New York. 608 pp.
44. Quintero R., Albarracín I., Salomón R. 2009. Ensayo ecotoxicológico en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew utilizando microalgas como bioindicadoras. En Iº congreso internacional en ambiente y energías renovables. Córdoba, Argentina. Instituto de Ciencias Básicas y Aplicadas de la Universidad Nacional de Villa María. 6-11 pp.
45. Reid D., Wellman D., Ulery A. y Jones S. 2001. Variation in Petroleum Hydrocarbon Chain Lengths with Depth at Former Crude Oil and Natural Gas Production Facility. *Soil and Sediment Contamination*. 10(6):593-609.

46. Ripley M., Harrison A., Betts W. y Dart R. 2002. Mechanism for enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons by microbe-colonized gas-liquid foam. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 22-31.
47. Semple K., Reid B., y Fermor T. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution*. 112: 269-283.
48. Tapia-Enriquez J. G. 2001. Memorias del Curso de Toxicología Ambiental y Ecotoxicología. Área de Residuos Peligrosos. CENICA. 32 pp.
49. Tothill I., Turner A. 1996. Developments in bioassay methods for toxicity testing in water treatment. *Trends Analytical Chemistry*. 15: 178-188.
50. US EPA Environmental Protection Agency 3540 C, 1996. Soxhlet Extraction.
51. US EPA Environmental Protection Agency, 7104, 1996. Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Ecological Effects Test Guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test.
52. US EPA Environmental Protection Agency, 8440, 1986. Total Recoverable Petroleum Hydrocarbons by Infrared Spectrophotometry.
53. Vallejo V., Salgado L., Roldan F. 2005. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con Petróleo. *Revista colombiana de Biotecnología*. VII (2): 67-78.
54. Velasco-Alvarez N., 2006. Efecto de un campo eléctrico en la degradación de hexadecano por *Aspergillus niger* en un soporte inerte. Tesis de maestría. UAM-Iztapalapa. México.
55. Volke S. y Velasco T. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). 62pp.
56. Volke S. y Velasco T. 2003. Biodegradación de hidrocarburos del petróleo en suelos intemperizados mediante composteo. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT-CENICA). 34pp.
57. Volke-Sepúlveda T., Gutiérrez-Rojas M., Favela-Torres E. 2006. Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinetic analysis. *Bioresource Technology*. 97: 1583-1591.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
IZTAPALAPA



*Casa abierta al tiempo*  
*División de Ciencias Biológicas y de la Salud*

Ecotoxicidad y biodisponibilidad de los productos de oxidación  
avanzada en suelos intemperizados con hidrocarburos.

T E S I S

Para obtener el grado de Maestra en Biotecnología.

PRESENTADA POR

Ing. Sara Lena Jiménez Tenorio

Director de Tesis: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Mariano', is written over the text of the thesis director's name. The signature is stylized and somewhat abstract, with a large loop at the end.

México D.F. Abril 2010.