

EJEMPLAR DE
CORTESIA

000167

008215

Manual de técnicas de análisis de suelos

Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados

Luis Carlos Fernández Linares•Norma Gabriela Rojas Avelizapa•
Teresa Guadalupe Roldán Carrillo•Martha Elena Ramírez Islas•
Héctor Gustavo Zegarra Martínez•Raúl Uribe Hernández•Romeo Jesús Reyes Ávila•
David Flores Hernández•Juan Manuel Arce Ortega



Instituto Mexicano del Petróleo
Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
Instituto Nacional de Ecología
México, D. F.

Instituto Mexicano del Petróleo
Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
Instituto Nacional de Ecología

Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación
de sitios contaminados

D. R. ©2006, Instituto Mexicano del Petróleo
Eje Central Lázaro Cárdenas Norte 152
Col. San Bartolo Atepehuacan
Delegación Gustavo A. Madero, 07730
México, D.F.

D. R. ©2006, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales,
Instituto Nacional de Ecología
Periférico Sur 5000
Col. Insurgentes Cuicuilco
Delegación Coyoacán, 04530
México, D.F.

ISBN 968-489-039-7

Todos los derechos reservados. Queda prohibida la reproducción
total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento,
comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, la fotocopia
o la grabación, sin la previa autorización por escrito del Instituto
Mexicano del Petróleo y el Instituto Nacional de Ecología.

"Impreso y hecho en México/Printed and made in Mexico".

Índice

1. Presentación	11
2. Introducción	13
3. Manejo y almacenamiento del suelo	15
4. Análisis físicos y químicos en suelo	19
4.1 pH	19
4.2 Humedad	21
4.3 Conductividad eléctrica	22
4.4 Carbónico orgánico total	27
4.5 Fósforo soluble	30
4.6 Nitrógeno total	35
4.7 Amonio intercambiable	40
4.8 Nitritos y nitratos intercambiables	44
4.9 Sulfato	47
4.10 Fe ⁺² y Fe ⁺³	51
4.11 Sulfuro de hidrógeno y metano	55
4.12 Potencial óxido-reducción. Determinación en laboratorio y campo	57
4.13 Determinación de textura (tamaño de las partículas de los suelos)	65
4.14 Determinación de la capacidad de intercambio catiónico y bases intercambiables	69
4.15 Determinación de la capacidad de intercambio catiónico en suelos ácidos y calcáreos y bases intercambiables	76
4.16 Determinación de la acidez y el aluminio intercambiables	80
5. Hidrocarburos del petróleo en suelo	89
5.1 Preparación de muestras de suelo para extracción	90
5.2 Extracción de hidrocarburos	91
5.2.1 Extracción por reflujo (Soxhlet)	91
5.2.2 Extracción agitación-centrifugación	94

5.3 Fraccionamiento de hidrocarburos	95
5.4 Cuantificación de hidrocarburos	98
5.4.1 Método gravimétrico para la cuantificación de hidrocarburos totales del petróleo	99
5.4.1.1 Hidrocarburos totales del petróleo (HTPs)	100
5.4.1.2 Asfaltenos insolubles en hexano	101
5.4.2 Cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo por espectroscopia de infrarrojo (IR)	104
5.4.3 Cuantificación de hidrocarburos del petróleo por cromatografía de gases	108
5.5 Identificación de hidrocarburos por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG/EM)	112
6. Análisis microbiológicos	117
6.1 Microorganismos aerobios	118
6.1.1 Cuenta de microorganismos viables por dilución en placa	118
6.1.2 Bacterias totales por dilución en placa	121
6.1.3 Hongos totales por dilución en placa	123
6.1.4 Bacterias hidrocarbonoclastas por dilución en placa	126
6.1.5 Hongos hidrocarbonoclastas por dilución en placa	129
6.2 Microorganismos anaerobios	131
6.2.1 Fundamentos de la técnica del número más probable	131
6.2.2 Método de NMP para la cuantificación de microorganismos anaerobios en suelos	132
6.2.3 Preparación de tubos con medio base para el cultivo de bacterias anaerobias	137
6.2.4 Bacterias fermentativas	141
6.2.5 Bacterias anaerobias sulfato reductoras	144
6.2.6 Bacterias anaerobias reductoras de hierro	146
6.2.7 Bacterias nitrato reductoras	148
6.2.8 Bacterias anaerobias metanogénicas	151

6.3 Cuantificación de la producción de CO ₂ en suelo	153
7. Análisis toxicológicos de muestras de suelos	161
7.1 Prueba de germinación de semillas	162
7.2 Prueba de crecimiento de plantas terrestres y de alargamiento radicular	166
7.3 Prueba de toxicidad aguda con lombriz de tierra (<i>Eisenia foetida</i>)	170
Anexo	175
Siglas y abreviaturas	179

1. Presentación

El presente manual fue elaborado con la finalidad de compilar algunas técnicas de análisis de suelos, necesarias para el seguimiento de la remediación y caracterización de sitios contaminados. Algunas han sido modificadas, para adaptarlas a suelos contaminados y optimizar recursos y tiempos de análisis. Esta compilación permitirá a personal técnico, estudiantes e investigadores contar con las metodologías descritas de manera sencilla para su realización.

El contenido se encuentra dividido en cuatro secciones: 1) Pruebas físicas y químicas de suelos, que incluyen parámetros importantes por considerar en la remediación de suelos contaminados como pH, humedad, salinidad, conductividad eléctrica, fósforo, nitrógeno, sulfatos, potencial de oxido-reducción e intercambio catiónico, entre otros; 2) Análisis de hidrocarburos del petróleo, principalmente hidrocarburos totales de petróleo; 3) Análisis microbiológicos que incluyen hongos y bacterias aerobias y anaerobias; y 4) Ensayos toxicológicos para suelos contaminados, que incluyen pruebas de germinación, crecimiento de plantas y toxicidad aguda con lombrices de tierra.

Cada una de esas secciones contiene una breve introducción, fundamentos, materiales, equipo y reactivos necesarios, procedimiento y forma de analizar los resultados de la técnica, así como los criterios para su interpretación.

2. Introducción

En México, las actividades industriales han provocado serios daños al medio ambiente afectando casi a la totalidad de los ecosistemas. El suelo representa un ecosistema donde, actualmente, se puede encontrar una gran variedad de compuestos tóxicos, entre los cuales se incluyen los hidrocarburos derivados de las actividades petroleras.

El suelo es un cuerpo natural que conforma el hábitat de bacterias, hongos, levaduras, virus y plantas superiores, entre otros, que sirve para la alimentación de los animales y del hombre a través de los ciclos tróficos. El suelo y los microorganismos mantienen los sistemas ecológicos, ya que le aportan componentes químicos y minerales (como resultado de la biodegradación); y complejos orgánicos como ácidos húmicos y fúlvicos, enzimas, vitaminas, hormonas y antibióticos; además, albergan una rica reserva genética.

Por la gran importancia que representa el suelo para la vida del hombre y de todos los seres vivos, este recurso se debe conservar. Sin embargo, en la actualidad está seriamente amenazado por la práctica de sistemas de producción inadecuados o mal aplicados, que incluso han acelerado los procesos de erosión y desertificación de grandes zonas. De igual forma, la industrialización y urbanización han generado una gran cantidad de desechos que son incorporados al suelo, lo cual ocasiona tanto la reducción de su fertilidad como la modificación de sus procesos naturales. Por lo anterior, es necesario estudiar las características particulares del suelo para determinar su grado de contaminación y, consecuentemente, aplicar alguna de las tecnologías de remediación existentes.

Para elegir la tecnología adecuada es necesario considerar una serie de procesos y fenómenos fisicoquímicos y microbiológicos que ocurren en el suelo. Por esta razón, la evaluación o determinación de las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de un suelo contaminado contribuye al seguimiento del proceso de remediación; además

de ser útil para tomar acciones pertinentes en el mejoramiento de dichos procesos.

En este manual se recopilan técnicas para determinar los principales parámetros de caracterización de suelos, y para dar seguimiento a un proceso de remediación de suelos contaminados. Se realizaron modificaciones en algunas técnicas, con el fin de mejorar su efectividad, optimización de tiempos y recursos.

3. Manejo y almacenamiento del suelo

Las muestras de suelo por analizar deben ser recolectadas del sitio contaminado, mediante el diseño de muestreo de las guías y métodos estándares de la ASTM (D5730-95a, 1995; E1219-98, 1998; E1391-94, 1994) y US EPA (1994a; 1994b; 540/R-95/141PB96-963207, 1995; 600/R-92/128, 1992; 625/4-91/026, 1991; 160014-891034, 1991) orientados a suelos contaminados con hidrocarburos (Profepa, 2000; API, 1996), y conforme a la norma ambiental vigente.

Para tomar una muestra representativa de suelos de un sitio contaminado, el proyecto de norma NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 propone una caracterización que debe considerar por lo menos los siguientes elementos:

- Descripción del sitio.
- Estrategia de muestreo.
- Plan de muestreo.
- Informe.

Para lo cual se deben determinar las características mínimas del sitio que permitan evaluar la distribución del contaminante. En el caso de derrames o fugas recientes, en los que el contaminante sea visible en superficie, se podrá realizar un muestreo dirigido tomando como mínimo el número de puntos de muestreo ya establecidos en dicha norma, de acuerdo con la superficie contaminada. Si la contaminación no es visible, homogénea y reciente, se debe aplicar una estrategia de muestreo que considere métodos estadísticos. Cabe mencionar que la selección de puntos de muestreo debe abarcar vertical y horizontalmente la distribución del contaminante en el suelo; asimismo, se debe considerar la topografía y dirección del flujo del manto freático.

Como parte de la experiencia adquirida en 10 años de trabajo, se han adaptado técnicas basadas en métodos geoestadísticos utilizados y aprobados por la EPA. Para ubicar los puntos de muestreo se llevan a cabo sondeos de gases del subsuelo, por medio de una retícula, que variará su arreglo en distancia dependiendo de la textura del suelo. Los resultados de gases se analizan mediante un programa geoestadístico, de preferencia con modalidad de Krigging; a partir de este análisis de datos se obtienen mapas de isovalores, los cuales de una manera rápida y económica permiten de forma preliminar establecer los núcleos de contaminación y los gradientes de concentración del contaminante.

Con base en esta información se seleccionan los mejores puntos de muestreo o perforación, así como las profundidades en las que se tomarán muestras, dependiendo de los cambios en los horizontes del suelo. Sin embargo, muchas veces estos cambios no están relacionados con las diferentes concentraciones del contaminante, por lo que con el fin de hacer un muestreo representativo se toman muestras de los primeros 30 cm de suelo, que representan el estrato superficial; otra muestra se toma a una profundidad media entre el manto freático y la superficie, y la última muestra se toma inmediatamente antes del manto freático. Este arreglo de muestreo permite delimitar la contaminación en superficie, los lixiviados y/o percolación a profundidad media y las condiciones del subsuelo directamente relacionado con el manto freático, el cual pudiera provocar el transporte del contaminante.

Material y equipo

- ♦ Frascos de vidrio color ámbar de 40, 450 y 990 ml.
- ♦ Jeringas de plástico de 20 ml acondicionadas: recortadas en la punta hasta la parte volumétrica de la jeringa, dejando libre el émbolo.
- ♦ Espátulas.
- ♦ Hielera.
- ♦ Tapas con una contratapa de teflón del mismo diámetro que la tapa del frasco.
- ♦ Tapón de hule estéril del diámetro de la abertura de la jeringa.
- ♦ Parafilm.
- ♦ Hielo.

Procedimiento

- 1) Una vez colectado el suelo, se homogeneiza; posteriormente, las muestras se transfieren a dos tipos de frascos, uno de vidrio color ámbar, limpio y con tapa cubierta de teflón (450 y 990 ml), para la determinación de hidrocarburos totales del petróleo (HTPs) e hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs), y otro de vidrio color ámbar, estéril (40 ml) para las muestras microbiológicas. Las muestras de microbiología anaerobia se toman con jeringas acondicionadas pues la punta es recortada, de tal manera que cuando se toman las muestras el émbolo se empuja hacia arriba y posteriormente es sellada con un tapón de hule para vial estéril del mismo diámetro que la abertura de la jeringa, con el fin de conservar la anaerobiosis o, en su defecto, en frasco ámbar estéril, llenando el frasco al máximo para evitar la presencia de aire.

Las muestras se conservan dentro de una hielera durante el transporte al laboratorio. Si la muestra no va a ser procesada de inmediato deberá almacenarse a 4°C hasta la realización del análisis. El tiempo máximo de almacenamiento en función del análisis por realizar se establece en la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003.

- 2) Según se indica en cada una de las técnicas descritas en el manual, algunos análisis se llevan a cabo con muestras húmedas, tal y como provienen del sitio, y otras requieren de una muestra seca, lo cual se puede realizar colocando la muestra de suelo a temperatura de 30°C durante 48 horas, considerando el peso inicial y el peso final de la muestra para determinar por diferencia el contenido de humedad. Después de 48 horas, a la muestra seca también se le debe realizar el análisis de humedad.

Referencias

- AAPI. 1996. A guide to the assessment and remediation of underground petroleum releases. API Publication 1628, Third edition.
- ASTM D5730-95a. 1995. Standard guide for site characteristics for environmental purposes with emphasis on soil, rock, the vadose zone and ground water.
- ASTM E1219-98. 1998. Standard guide for accelerated site characterization for confirmed or suspected petroleum release.
- ASTM E1391-94. 1994. Standard guide for collection, storage, characterization, and manipulation of sediments for toxicological testing.
- NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Diario Oficial, 30 marzo de 2005.
- Profepa. 2000. Disposiciones y procedimientos para la caracterización y restauración de suelos contaminados. Lista de criterios interinos para inorgánicos tóxicos. Profepa, México.
- US EPA. 1994a. Sampling equipment decontamination. Standard Operating Procedure 2006.
- US EPA. 1994b. Soil sampling. Standard Operating Procedure 2012.
- US EPA 540/R-95/141PB96-963207. 1995. Superfund Program Representative Sampling Guidance. OSWER directive 9360.4-10.
- US EPA 660/4-90/013. 1990. A rationale for the assessment of errors in the sampling of soils. Las Vegas.
- US EPA 600/R-92/128. 1992. Preparation of soil sampling protocols. Sampling techniques and strategies. Office of Research Development.
- US EPA 625/4-91/026. 1991. Seminar publication. Site characterization for subsurface remediation.
- US EPA 160014-891034. 1991. Handbook of suggested practices for the design and installation of ground-water monitoring wells.

4. Análisis físicos y químicos en suelo

4.1 pH

Introducción

El pH es una propiedad química del suelo que tiene un efecto importante en el desarrollo de los seres vivos (incluidos microorganismos y plantas). La lectura de pH se refiere a la concentración de iones hidrógeno activos (H^+) que se da en la interfase líquida del suelo, por la interacción de los componentes sólidos y líquidos. La concentración de iones hidrógeno es fundamental en los procesos físicos, químicos y biológicos del suelo. El grado de acidez o alcalinidad de un suelo es determinado por medio de un electrodo de vidrio en un contenido de humedad específico o relación de suelo-agua, y expresado en términos de la escala de pH. El valor de pH es el logaritmo del recíproco de la concentración de iones hidrógeno, que se expresa por números positivos del 0 al 14. Tres son las condiciones posibles del pH en el suelo: la acidez, la neutralidad y la alcalinidad.

Método

Para la determinación del pH se utiliza el método potenciométrico (Willard *et al.*, 1974; Bates, 1983).

Fundamento

El método potenciométrico o electroquímico para medir pH de un suelo es el más utilizado. Con este método se mide el potencial de un electrodo sensitivo a los iones H^+ (electrodo de vidrio) presentes en una solución problema; se usa como referencia un electrodo cuya solución problema no se modifica cuando cambia la concentración de los iones por medir, que es generalmente un electrodo de calomelano o de Ag/AgCl. El electrodo, a través de sus paredes, desarrolla un potencial eléctrico. En la práctica se utilizan soluciones amortiguadoras, de pH conocido, para

calibrar el instrumento y luego compararlo, ya sea el potencial eléctrico o el pH directamente de la solución por evaluar.

Interferencias

Debido a que el pH del suelo es medido en una matriz acuosa como agua o una solución de sales diluidas, es dependiente del grado de dilución (relación suelo-dilución). Cuando se mide en agua es importante controlar el agua adicionada, ya que un aumento causará un incremento en pH; por ello es necesario mantener la relación constante y tan baja como sea posible. Sin embargo, la solución sobrenadante puede no ser suficiente para sumergir el electrodo apropiadamente, sin causar mucho estrés cuando se inserta dentro del suelo. Los suelos con alta cantidad de materia orgánica tienden a formar una gruesa pasta seca, por lo que una relación menor de muestra en agua puede ser aceptable (1:5 o 1:10) (Karma A, 1993). En suelos contaminados con hidrocarburos la interferencia va a depender de la concentración y tipo de hidrocarburo, se puede producir desde una simple iridiscencia sin afectar la determinación, hasta un impedimento de la determinación por la alta concentración y viscosidad del contaminante.

Material y equipo

- Muestra de suelo.
- Balanza analítica.
- Vasos de precipitado de 25 ml.
- Pipeta de 10 ml.
- Piceta con agua destilada.
- Potenciómetro.
- Agua destilada.
- Solución amortiguadora de pH 7 y 4.
- Agitadores magnéticos.

Procedimiento

- 1) Pesar 1 g de suelo y colocarlo en un vaso de precipitado de 25 ml.
- 2) Agregar 10 ml de agua destilada.
- 3) Agitar y dejar reposar 10 minutos.
- 4) Ajustar el potenciómetro con las soluciones amortiguadoras.
- 5) Pasados los 10 minutos, medir el pH con el potenciómetro.

Criterios de evaluación

Tabla 4.1 Criterios de evaluación de un suelo con respecto a su pH (NOM-021-REC-NAT-2000).

Categoría	Valor de pH
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1 - 6.5
Neutro	6.6 - 7.3
Medianamente alcalino	7.4 - 8.5
Fuertemente alcalino	8.5

4.2 Humedad**Introducción**

El agua es esencial para todos los seres vivos porque en forma molecular participa en varias reacciones metabólicas celulares, actúa como un solvente y portador de nutrimentos desde el suelo hasta las plantas y dentro de ellas. Además, intemperiza las rocas y los minerales, ioniza los macro y micronutrientes que las plantas toman del suelo, y permite que la materia orgánica sea fácilmente biodegradable. El contenido de agua en el suelo puede ser benéfico, pero en algunos casos también perjudicial. El exceso de agua en los suelos favorece la lixiviación de sales y de algunos otros compuestos; por lo tanto, el agua es un regulador importante de las actividades físicas, químicas y biológicas en el suelo (Topp, 1993).

Aunque es recomendable determinar la humedad a la capacidad de campo de los suelos, es decir, la cantidad de humedad que un suelo retiene contra la gravedad, cuando se deja drenar libremente; en algunas ocasiones, cuando se trata de suelos contaminados, por ejemplo con hidrocarburos del petróleo, es difícil llevar a cabo esta medición por la dificultad de rehidratar suelos secos con estas características. Por lo que la medición de humedad se realiza sólo en función del porcentaje de agua que retiene este tipo de suelos.

Método

El método utilizado para esta medición es el gravimétrico, para determinar únicamente la cantidad de agua de los suelos.

Fundamento

La humedad del suelo se calcula por la diferencia de peso entre una misma muestra húmeda, y después de haberse secado en la estufa hasta obtener un peso constante.

Material y equipo

- Muestras de suelo.
- Balanza analítica.
- Espátula.
- Charolas o papel aluminio a peso constante.
- Estufa.

Procedimiento

- 1) Pesar 1 g de muestra sobre un papel o charola de aluminio a peso constante.
- 2) Colocar la muestra dentro de la estufa a 80°C de 12 a 24 horas.
- 3) Sacar la muestra de la estufa y colocarla dentro de un desecador para que se enfríe.
- 4) Pesar la muestra con todo y papel.
- 5) Calcular los porcentajes de humedad en el suelo por la diferencia de pesos.

$$\% \text{ Humedad del suelo} = (\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) / \text{Peso inicial} * 100$$

4.3 Conductividad eléctrica**Introducción**

La conductividad eléctrica es la capacidad de una solución acuosa para transportar una corriente eléctrica, que generalmente se expresa en mmhos/cm o en mSiemens/m; la NOM-021-REC/NAT-2000 establece dSiemens/m a 25°C. Es una propiedad de las soluciones que se encuentra muy relacionada con el tipo y valencia de los iones presentes, sus concentraciones total y relativa, su movilidad, la temperatura del líquido y su contenido de sólidos disueltos. La determinación de la conduc-

tividad eléctrica es por lo tanto una forma indirecta de medir la salinidad del agua o extractos de suelo.

De acuerdo con los valores de conductividad eléctrica, pH y porcentaje de sodio intercambiable, los suelos se pueden clasificar en las siguientes categorías:

a) Suelos salinos. Se caracterizan porque su extracto de saturación tiene un valor de conductividad eléctrica igual o superior que 4 mmhos/cm a 25°C y la cantidad de sodio intercambiable es menor de 15%. Por lo general tienen una costra de sales blancas, que pueden ser cloruros, sulfatos y carbonatos de calcio, magnesio y sodio.

b) Suelos sódicos. Presentan un color negro debido a su contenido elevado de sodio. Su porcentaje de sodio intercambiable es mayor que 15, el pH se encuentra entre 8.5 y 10.0, y la conductividad eléctrica está por debajo de 4 mmhos/cm a 25°C.

c) Suelos salino-sódicos. Poseen una conductividad eléctrica de 4 mmhos/cm a 25°C, una concentración de sodio intercambiable de 15% y el pH es variable, comúnmente superior a 8.5 (Muñoz *et al.*, 2000).

La conductividad eléctrica se puede complementar con la determinación de Na^+ o bases intercambiables (K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+). Principalmente si los suelos fueron contaminados con aguas congénitas.

Método

El método de la conductividad eléctrica se realiza por medio de un conductímetro sobre una muestra de agua o extracto de suelo.

Fundamento

Este método se basa en la teoría de la disociación electrolítica. Es aplicable a aguas o extractos de suelo. El equipo para medir la conductividad eléctrica es un conductímetro, que consiste en dos electrodos colocados a una distancia fija y con líquido entre ellos. Los electrodos son de platino y en ocasiones pueden llevar un recubrimiento de platino negro o grafito; estos se encuentran sellados dentro de un tubo de plástico o vidrio (celda), de tal manera que este aparato

puede ser sumergido en el líquido por medir. La resistencia eléctrica a través de los electrodos se registra a una temperatura estándar, generalmente 25°C.

Interferencias

La temperatura afecta la conductividad y varía alrededor de 2% por cada grado Celsius. Para esta determinación no se permite la preservación química de las muestras.

Material y equipo

- ♦ Muestra de suelo seco y molida en un mortero.
- ♦ Balanza analítica.
- ♦ Frascos de plástico de boca ancha de 250 ml.
- ♦ Vaso de precipitado de 100 ml.
- ♦ Bureta.
- ♦ Espátula.
- ♦ Papel filtro.
- ♦ Embudo Buchner.
- ♦ Pipeta de 10 ml.
- ♦ Matraz Kitazato.
- ♦ Piceta con agua destilada.
- ♦ Bomba de vacío.
- ♦ Probeta.
- ♦ Conductímetro.
- ♦ Frascos.
- ♦ Agua destilada.
- ♦ Matraz aforado de 100 ml.

Soluciones

- ♦ Solución estándar de cloruro de potasio (KCl) 0.1 N. Disolver 0.7455 g de KCl en agua destilada y aforar a 100 ml.
- ♦ Solución estándar de cloruro de potasio (KCl) 0.01 N. Tomar una alícuota de 10 ml de la solución estándar de KCl 0.1 N y aforar a 100 ml.

Procedimiento

A. Preparación de la pasta de saturación.

- 1) Pesar 40 g de suelo seco y colocarlo en un recipiente de plástico, si el suelo es arenoso o areno-migajoso pesar 600 g.

- 2) Agregar agua destilada con la bureta y mezclar con la espátula hasta saturación.
- 3) Golpear el recipiente con cuidado sobre la mesa de trabajo para asentar el suelo.
- 4) La pasta estará lista cuando se observe un brillo en su superficie (formación de un espejo), esto no sucede en el caso de suelos con alto contenido de arcilla.
- 5) Anotar el volumen de agua gastado (ml).
- 6) Dejar reposar la pasta durante una hora y comprobar a criterio su saturación.
- 7) Tapar el recipiente y dejarlo reposar por tres horas, excepto suelos arcillosos que deben dejarse reposar 24 horas.

B. Obtención del extracto del suelo.

- 1) Colocar papel filtro sobre el embudo, humedecerlo con agua destilada, dejando drenar el exceso. Conectar el sistema de filtración al vacío.
- 2) Mezclar nuevamente la pasta y colocarla en el embudo y aplicar vacío.
- 3) Obtener un extracto de aproximadamente 50 ml.

C. Determinación de la conductividad eléctrica.

- 1) Calibrar el conductímetro. Antes de usar el medidor de conductividad debe calibrarse con una solución estándar. Para esto se requiere de dos soluciones de KCl, 0.1 N y 0.01 N, con cada una se ajusta el equipo a la conductividad indicada en la tabla 4.2.

Tabla 4.2 Ajuste de conductividad en función de la solución de KCl.

Sol. estándar de KCl	Conductividad eléctrica a 25°C
0.1 N	12.9 dS/m
0.01 N	1.412 dS/m

Cuando no se sabe la conductividad de la muestra se recomienda calibrar primero con una de las dos soluciones y tomar la lectura de la muestra, después volver a calibrar con la segunda solución y tomar nuevamente la lectura. Para calibrar finalmente el equipo, se debe elegir la solución con la que se aproxime más la conductividad de la muestra.

- 2) Leer la conductividad eléctrica y la temperatura del extracto. Si la lectura se toma en μmhos , transformar los resultados a mmhos o dS dividiendo entre 1 000.
- 3) Si es necesario, hacer corrección consultando la tabla de factores de corrección para diferentes temperaturas (tabla 4.3), se multiplica el resultado de conductividad eléctrica por el valor correspondiente.

Tabla 4.3 Factores de corrección de la conductividad eléctrica en función de la temperatura del extracto de saturación.

Temperatura (°C)	Factor de corrección	Temperatura (°C)	Factor de corrección
8	1.499	22	1.067
10	1.421	23	1.044
12	1.350	24	1.021
14	1.284	25	1.000
16	1.224	26	0.979
18	1.168	28	0.941
19	1.142	30	0.906
20	1.128	32	0.873
21	1.092	34	0.843

Cálculos

La unidad estándar de conductividad eléctrica es el siemens/metro ($\text{S/m} = \text{Ohm/m}$), pero para evitar la expresión de resultados en pequeñas fracciones decimales se usa generalmente una unidad más pequeña: el miliSiemens/metro (mS/m). Aunque la conductividad generalmente es reportada en $\mu\text{mhos/cm}$.

$$1 \text{ mS/m} = 10 \mu\text{mhos/cm}.$$

Para convertir la conductividad eléctrica en unidades de salinidad (tabla 4.4), se toma el valor de referencia de una solución de NaCl 0.05 N con una conductancia de $604 \mu\text{mhos/cm}$ a 25°C como el factor, que al multiplicarlo por la conductividad expresa la salinidad.

$$\text{Salinidad} = \text{mhos / cm} \times 604.$$

En la tabla 4.4 se muestran los criterios para evaluar la salinidad de un suelo, con base en su conductividad.

Tabla 4.4 Criterios para evaluar la salinidad de un suelo, con base en su conductividad.

Categoría del suelo	Valor (mmhos/cm o dS/m)
No salino	0 - 2.0
Poco salino	2.1 - 4.0
Moderadamente salino	4.1 - 8.0
Muy salino	8.1 - 16.0
Extremadamente salino	> 16.0

Vazquez y Bautista (1993).

4.4 Carbono orgánico total

El carbono orgánico es uno de los principales componentes de los seres vivos: aproximadamente 50% del peso seco de la materia orgánica (m.o.) es carbono. En el medio ambiente su ciclo está estrechamente ligado al flujo de energía, debido a que las principales reservas de energía de los organismos son compuestos de carbono reducidos que han derivado de la fijación del CO₂ atmosférico, ya sea por medio de la fotosíntesis o, con menor frecuencia de la quimiosíntesis (Tiessen y Moir, 1993). Las plantas y los animales que mueren son desintegrados por los microorganismos, en particular bacterias y hongos, los cuales regresan el carbono al medio en forma de bióxido de carbono (Baker y Herson, 1994).

La m.o. del suelo es la fracción orgánica que incluye residuos vegetales y animales en diferentes estados de descomposición; tejidos y células de organismos que viven en el suelo; y sustancias producidas y vertidas por esos organismos. Esta definición es muy amplia pues incluye tanto a los materiales poco alterados como a aquellos que sí han experimentado cambios de descomposición, transformación y resíntesis dentro del suelo. Además se pueden incluir compuestos orgánicos tóxicos, provenientes de las actividades industriales del hombre, como la contaminación de suelos por hidrocarburos del petróleo, que también constituye parte de la materia orgánica del suelo (Etchevers, 1988).

Método

Para la cuantificación de carbono orgánico total se utiliza un analizador de carbono con una cámara de combustión y un detector de infrarrojo.

Fundamento

La muestra de suelo es colocada dentro de la cámara de combustión a una temperatura de 900°C, proceso que provoca la liberación de CO₂ proveniente de todo el carbono presente en el suelo. El CO₂ es cuantificado con un detector de infrarrojo.

El límite de detección de la técnica va de 0 a 25 mg de C. Considerando que no todo el suelo es m.o., se recomienda utilizar muestras de 0.1 a 0.3 g, pero mientras más m.o. se tenga, se debe tomar menor cantidad de suelo para realizar esta técnica.

Material y equipo

- ♦ Muestra de suelo seco y molido en mortero.
- ♦ Cápsulas de porcelana especiales para el equipo de carbono total.
- ♦ Espátulas.
- ♦ Analizador de carbono con detector de infrarrojo y accesorio para muestras sólidas.
- ♦ Balanza analítica.
- ♦ Pinzas.

Reactivos

- ♦ Biftalato de potasio (C₆H₄(COOK)).

Procedimiento

Esta técnica puede realizarse con muestras de suelo húmedo, pero se recomienda utilizar suelo seco y molido para homogeneizar la muestra, ya que se utilizan cantidades muy pequeñas (menores que 0.3 g).

- 1) Pesar suelo seco (0.1 a 0.3g) dentro de una cápsula de porcelana.
- 2) Encender el analizador de carbono y esperar a que la temperatura del horno llegue a 900°C. Una vez que el equipo esté estabilizado a esta temperatura, se procede a analizar las muestras.
- 3) El método utilizado para hacer los análisis en este equipo debe indicar que se está utilizando el accesorio para muestras sólidas; y en caso

de contar con un software para la integración de los datos se debe incluir la curva patrón, para que el resultado de la medición se proporcione con base en ésta.

- 4) Colocar la muestra dentro de la cámara de sólidos y proceder a la medición.
- 5) El tiempo de corrida de cada muestra es aproximadamente de cinco minutos. Al final el software presenta la cantidad de carbono (mg kg^{-1} suelo o en porcentaje) contenido en el suelo.
- 6) El resultado debe ser ajustado por la humedad de la muestra, para indicarlo en mg de C/kg suelo completamente seco.

Curva patrón. Se realiza con biftalato de potasio ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{COOK})$) en un rango de concentraciones de 0 a 25 mg (0 a 0.025 g) de carbono contenido en este compuesto. El biftalato debe secarse en la estufa durante 12 horas a 60°C antes de ser analizado. Pesar la cantidad necesaria del reactivo para obtener la concentración deseada (de 0 a 25 mg de carbono en la muestra), como se indica en la tabla 4.5, y hacer la medición de carbono orgánico total en el analizador, como se indicó para las muestras.

Tabla 4.5 Concentración de biftalato para la curva patrón de carbón orgánico.

Biftalato de potasio (mg)	mg C contenidos en biftalato
0	0
12.15	5
24.31	10
36.46	15
48.62	20
60.77	25

Nota: en caso de que el equipo sólo proporcione el área del pico obtenido, proceder al cálculo del carbono orgánico total como se indica en el apartado correspondiente.

Cálculos

Calcular la cantidad de carbono orgánico total (COT) contenido en el suelo con la ecuación lineal de la curva estándar.

$$\text{CO (mg)} = (A - b) / m.$$

Donde:

CO = carbono orgánico (mg) contenido en el suelo.

A = área del pico obtenido.

b = ordenada al origen.

m = pendiente.

Calcular la concentración final de COT de la muestra de suelo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{COT (mg / kg de suelo seco)} = \text{CO (mg)} * 1\ 000 / P * \text{FH}$$

COT = carbono orgánico total (mg / kg de suelo seco).

CO = carbono orgánico (mg).

P = cantidad de suelo (0.1 g a 0.5 g).

1 000 = factor de corrección de concentración (1 000 g = 1 kg).

FH = factor de corrección de humedad = $(1 - (\% \text{humedad} / 100))$.

A partir del contenido total de carbono orgánico se puede estimar el contenido de materia orgánica (tabla 4.6); suponiendo de forma convencional que la materia orgánica contiene 58% de carbono. Así, el contenido de carbono orgánico se multiplica por el factor 1.724 para obtener el contenido de materia orgánica (León y Aguilar, 1987).

Tabla 4.6 Interpretación del contenido de materia orgánica en suelo.

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

4.5 Fósforo soluble

El fósforo elemental (P) no se encuentra en estado libre en la naturaleza porque se oxida muy fácilmente; sin embargo, son muy comunes los

compuestos orgánicos y principalmente minerales que contienen fósforo. En términos generales, el fósforo del suelo se clasifica en fósforo orgánico e inorgánico, dependiendo de la naturaleza de los compuestos que forme. La forma orgánica se encuentra en el humus y la materia orgánica, y sus niveles en el suelo pueden variar desde 0 hasta mayores que 0.2%. La fracción inorgánica está constituida por compuestos de hierro, aluminio, calcio y flúor, entre otros, y normalmente son más abundantes que los compuestos orgánicos. Solo una pequeña parte del P aparece en solución en suelo ($< 0.01\text{-}1 \text{ mg L}^{-1}$).

El P es un macronutriente esencial para las plantas y los microorganismos, junto con el nitrógeno y el potasio. Puede ser un nutriente limitante, ya que es un componente de los ácidos nucleicos y de los fosfolípidos. Los análisis de P sirven fundamentalmente para el control de la dosificación de productos químicos en tratamientos de agua o suelos, o como un medio para determinar que un sistema presenta contaminación por exceso de este compuesto (Muñoz *et al.*, 2000).

Método

Para la medición del P soluble se utiliza el método de Bray (desarrollado por Bray y Kurtz, 1945), el cual fue modificado en la parte de extracción del P. La cuantificación se lleva a cabo por colorimetría. Este método se emplea como índice del P aprovechable en suelos con pH neutro y ácido (NOM-021-RECNAT-2000). Para suelos neutros y alcalinos se utiliza el método Olsen.

Fundamento

Este método se basa en la extracción de las formas de fósforo fácilmente solubles, principalmente fosfatos de calcio y una fracción de los fosfatos de aluminio y hierro, con la combinación de ácido clorhídrico y fluoruro de amonio. El fluoruro de amonio disuelve los fosfatos debido a la formación de un ión complejo con estos compuestos, cuando se encuentran en solución ácida. Este método ha dado buenos resultados en suelos ácidos y aceptables en suelos con pH neutros.

El límite de detección de la técnica va de 1 a 10 ppm de P y en caso de tener extractos más concentrados se recomienda hacer las diluciones necesarias para obtener mediciones de absorbancia entre 0.02 y 0.5.

Interferencias

Los detergentes que contienen fosfatos pueden interferir en la cuantificación del P, por lo que se recomienda no utilizarlos para lavar el material.

Material y equipo

- Muestra de suelo (1 g) seco y molido en un mortero.
- Vasos de precipitado.
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml.
- Matraces aforados de 0.5 y 1 L.
- Espectrofotómetro visible.
- Probeta de 250 ml.
- Botellas de polipropileno 1 L.
- Tubos de ensayo de 10 ml.
- Tubos de plástico para centrifuga de 15 ml.
- Gradillas.
- Vórtex.
- Centrifuga.
- Matraz Erlenmeyer de 1 y 2 L.
- Frascos de vidrio ámbar con tapa esmerilada.

Nota: Para llevar a cabo esta determinación deberá utilizarse material de vidrio Pirex, y guardar el agua y los reactivos en frascos neutros o de Nalgene. El agua empleada deberá ser libre de fósforo, ya sea bidestilada o desmineralizada. Es recomendable vaciar el agua del garrafón a envases de Nalgene neutros. Previamente a la realización de esta técnica, todo el material que se utilice para preparar los reactivos y realizar los análisis deberá dejarse por lo menos cinco minutos en mezcla crómica y después enjuagar con agua bidestilada. No usar ningún tipo de detergente para el lavado del material de cristalería o bien utilizar jabón libre de fosfatos. En caso de usar éste último ya no es necesario lavar el material con mezcla crómica.

Soluciones y reactivos

- 1) Mezcla crómica: Pesar 100 g de dicromato de potasio ($2\text{Cr}_2\text{O}_7$) y disolver en 1 L de agua destilada. Calentar hasta la completa disolución del reactivo. Dejar enfriar la solución y agregar gota a gota 100 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).
- 2) Solución madre de fluoruro de amonio (NH_4F) 1 N: Pesar 37 g de

fluoruro de amonio, disolver en agua destilada y aforar a 1 L. Guardar en un recipiente de polipropileno.

- 3) Ácido clorhídrico (HCl) 0.5 N: Diluir 20.2 ml HCl concentrado hasta completar un volumen de 500 ml con agua destilada.
- 4) Solución extractora: Agregar 460 ml de agua destilada a 15 ml de solución madre de fluoruro de amonio y 25 ml de solución de ácido clorhídrico 0.5 N. Esto nos da una solución 0.03 N de fluoruro de amonio y 0.025 N de ácido clorhídrico. La solución final debe ser almacenada en un recipiente de polipropileno perfectamente tapado, de esta forma se conserva hasta un año.
- 5) Solución de ácido clorhídrico (HCl) 10 N: En un matraz aforado de 500 ml colocar 80 ml de agua destilada y adicionar lentamente y por las paredes del matraz 404 ml de ácido clorhídrico concentrado (HCl), al final completar un volumen de 500 ml con agua destilada.

Nota: tener mucho cuidado al preparar esta solución, se debe hacer en una campana de extracción y sobre un baño de hielo.

- 6) Solución de molibdato de amonio-ácido clorhídrico: Pesar 15 g de molibdato de amonio tetrahidratado $((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O})$ y disolver en 350 ml de agua destilada. Añadir lentamente y con agitación constante 300 ml de ácido clorhídrico 10 N. Enfriar a temperatura de laboratorio y aforar a 1 L con agua destilada. Mezclar bien y guardar en frasco ámbar con tapón esmerilado. Esta solución debe ser preparada cada dos meses.
- 7) Solución madre de cloruro estañoso: Pesar 5 g de cloruro estañoso dihidratado $(\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ y disolver en 12.5 ml de ácido clorhídrico concentrado (HCl). Calentar a baño María hasta que se disuelva bien. Guardar en el refrigerador en frasco ámbar con tapón esmerilado, pues de esta forma se conserva seis semanas máximo.
- 8) Solución de cloruro estañoso diluida: Agregar 33 ml de agua destilada a 0.1 ml de solución madre de cloruro estañoso o 0.3 por 99 ml de agua. Esta solución debe ser preparada cuatro horas antes de su uso.
- 9) Solución tipo de fosfato (100 mg/ml): Pesar 0.4389 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) , disolver en agua destilada y aforar a 1 L. Un mililitro de esta solución contiene 100 ppm de fósforo.
- 10) Agua bidestilada o desmineralizada.

Procedimiento

- 1) Pesar 1 g de suelo previamente seco y molido, y colocarlo en un tubo para centrifuga de 15 ml.
- 2) Agregar 7 ml de solución extractora, agitar con vórtex de tal manera que se mezcle bien el suelo y la solución extractora.
- 3) Centrifugar las muestras durante 10 minutos a 6 000 rpm.
- 4) Del sobrenadante tomar 1 ml y colocarlo en un tubo de vidrio, agregar 6 ml de agua destilada y 2 ml de la solución de molibdato y mezclar bien.
- 5) Agregar 1 ml de solución de cloruro estañoso diluido (que debe prepararse al momento) y nuevamente mezclar.
- 6) Pasados 10 minutos leer la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm. Todas las lecturas deberán terminarse antes de 20 minutos.

Nota: En caso de que las muestras tengan un alto contenido de fósforo deben hacerse las diluciones apropiadas con el extracto (sobrenadante), de tal manera que los valores de absorbancia estén dentro de la curva de calibración. O bien se puede iniciar la extracción con 0.5 g de suelo.

- 7) Cada vez que se lea un lote de muestras realizar un blanco de la siguiente manera: Poner 1 ml de H₂O destilada y 1 ml de solución extractora, agregar 5 ml de agua destilada y 2 ml de solución de molibdato de amonio, mezclar bien y agregar 1 ml de la solución de cloruro estañoso, finalmente mezclar otra vez.
- 8) Para construir la curva patrón hacer las diluciones correspondientes de la solución tipo de fosfato, llevando el volumen a 100 ml, y considerar las proporciones de la tabla 4.7.

Curva patrón. Colocar 1 ml de cada una de las diluciones (ppm) de la solución tipo de fosfato en los tubos. Agregar 1 ml de la solución extractora, 5 ml de agua destilada y 2 ml de solución de molibdato de amonio. Posteriormente 1 ml de solución de cloruro estañoso diluido y mezclar bien.

Finalmente hacer las lecturas y terminarlas antes de 20 minutos.

Tabla 4.7 Concentración de fosfato para realizar la curva patrón de fósforo.

Concentración (ppm)	ml de solución tipo de fosfatos
10	10
9	9
8	8
7	7
6	6
5	5
4	4
3	3
2	2
1	1

En la tabla 4.8 se muestran valores de fósforo que determinan la calidad de un suelo.

Tabla 4.8 Criterios para determinar la calidad de un suelo en cuanto a su contenido de fósforo. (NOM-021-RECNAT-2000).

Categoría	Valor (mg kg ⁻¹)
Bajo	< 5.5
Medio	5.5 -11
Alto	> 11

4.6 Nitrógeno total

Introducción

El nitrógeno es un elemento indispensable para la vida, forma parte de las principales biomoléculas de todos los seres vivos. Es también uno de los elementos más abundantes de la Tierra, pues en su forma gaseosa (N₂) constituye 78% de la atmósfera. Sin embargo, la cantidad de nitrógeno presente en muchos suelos es escasa, debido a su propia dinámica y a su ciclo biogeoquímico. El nitrógeno puede llegar al suelo gracias a los

aportes de materia orgánica y a la fijación bacteriana a partir del aire. Dentro del suelo es aprovechado por las plantas, animales y microorganismos que lo incorporan a sus tejidos. Cuando dichos organismos se mueren, el nitrógeno reingresa al suelo completando el ciclo. Este ciclo es complejo e involucra una serie de reacciones y organismos con diferentes metabolismos. Siempre comienza con compuestos orgánicos sencillos (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , N_2 , NH_3) y termina con compuestos orgánicos complejos; que a través de la descomposición regresan a la etapa de compuestos sencillos.

En los microorganismos la carencia de nitrógeno puede afectar el crecimiento, por lo que la población microbiana no tendrá un desarrollo óptimo. En contraste, demasiado nitrógeno permite el crecimiento microbiano rápido y acelera la descomposición; pero puede crear problemas de olor en condiciones anaerobias. Además, el exceso de nitrógeno puede ser liberado como amoníaco; en tanto que el nitrógeno aprovechable escapará en forma de gas. Para la mayoría de los materiales una relación C/N cercana a 10:1 mantendrá estos elementos en equilibrio aproximado. En los suelos normalmente el contenido de nitrógeno varía de 0.05 a 2% en sus diferentes formas.

Método

La determinación de nitrógeno total se realiza con el método Micro-Kjeldahl (Modificado por Bremner, 1965).

Fundamento

El método Kjeldahl comprende tres fases fundamentales:

- 1) Digestión de la muestra. La muestra de suelo se somete a una digestión por calentamiento con ácido sulfúrico y por una mezcla de sales que aceleran y facilitan tanto la oxidación de la materia orgánica como la conversión de todas las formas de nitrógeno en N^{+3} , que en medio ácido se encuentran en forma de radical amonio (NH_4^+); es decir, se llevan las formas orgánicas a formas minerales de nitrógeno.
- 2) Destilación. Una vez transformado el nitrógeno en NH_4^+ , se expone a una base fuerte como el hidróxido de sodio para formar hidróxido de amonio, que por la acción del calor se descompone en amoníaco (NH_3) y agua.
- 3) Valoración. El amoníaco desprendido por la reacción se recoge en un

volumen conocido de solución valorada de ácido bórico y por comparación con un blanco se determina la cantidad de ácido que reaccionó con el NH_3 .

Material y equipo

- ♦ Muestra de suelo seco y molido con un mortero.
- ♦ Balanza analítica.
- ♦ Matraces Kjeldahl.
- ♦ Vasos de precipitados.
- ♦ Probetas.
- ♦ Digestor.
- ♦ Matraz aforado de 1 L.
- ♦ Matraces Erlenmeyer de 1 L.
- ♦ Perlas de ebullición.
- ♦ Pipeta.
- ♦ Destilador.
- ♦ Bureta.
- ♦ Soporte universal con pinza.

Soluciones y reactivos

- 1) Solución de ácido bórico con indicador. Pesar 20 g de ácido bórico (H_3BO_3) y disolver en 750 ml de agua destilada. Calentar para la completa disolución del ácido. Dejar enfriar y agregar 20 ml de la siguiente mezcla de indicadores: 0.099 g de verde de bromocresol y 0.066 g de rojo de metilo disueltos en 100 ml de alcohol etílico al 96%. El pH de la mezcla debe de ser de 5.0, si es más ácido agregar algunas gotas de solución de hidróxido de sodio 0.1 N, hasta que la solución adquiera una coloración púrpura o alcance el pH indicado. Completar el volumen a 1 L con agua destilada y mezclar.
- 2) Solución de hidróxido de sodio 0.1 N: Pesar 4 g de hidróxido de sodio (NaOH), disolver en agua destilada y aforar a 1 L.
- 3) Mezcla de catalizadores: pesar 62.5 g de sulfato de potasio (KSO_4) y 6.25 g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Homogeneizar la mezcla.
- 4) Solución de hidróxido de sodio 10 N: Pesar 200 g de hidróxido de sodio (NaOH), disolver en agua destilada y aforar a 500 ml. El agua para preparar la solución debe ser hervida previamente para eliminar el CO_2 , dejándola enfriar antes de agregarla.

- 5) Solución de ácido sulfúrico 0.01 N: Diluir 0.28 ml de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) hasta completar un volumen de 1 L con agua destilada. La concentración del ácido debe ser estandarizada con la solución valorada de carbonato de sodio.
- 6) Solución valorada de carbonato de sodio: Pesar 0.25 g de carbonato de sodio ($NaCO_3$), previamente secado en la estufa durante 2 horas a $105^\circ C$, disolver en agua destilada y aforar a 50 ml.
- 7) Solución de anaranjado de metilo: Pesar 0.1 g de anaranjado de metilo, disolver en agua destilada y aforar a 100 ml.

Valoración de la normalidad del ácido sulfúrico 0.01 N:

- Tomar 3 alícuotas de 10 ml de la solución de $NaCO_3$.
- Agregar 5 o 6 gotas de anaranjado de metilo como indicador.
- Titular con la solución de ácido sulfúrico 0.01 N.
- Calcular la normalidad real sustituyendo en la siguiente fórmula:

Normalidad del $H_2SO_4 = (0.050 \text{ g} / 53) \times (1 / \text{Promedio de ml gastados en las tres alícuotas})$.

- 8) Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).
- 9) Granallas de zinc.

Procedimiento

A. Digestión.

- 1) Pesar una muestra de suelo de 0.25 a 1 g, que dependerá de la materia orgánica contenida en el suelo, entre más materia orgánica tenga un suelo menos serán los gramos de muestra.
- 2) Colocar la muestra de suelo en un matraz Kjeldahl seco.
- 3) Adicionar 2 g de mezcla de catalizadores.
- 4) Agregar 5 ml de ácido sulfúrico concentrado.
- 5) Poner a calentar en el digestor a una temperatura media, hasta que la muestra se torne clara. La temperatura debe ser regulada de modo que los vapores de ácido sulfúrico se condensen en el tercio inferior del cuello del matraz Kjeldahl.
- 6) Hervir la muestra por una hora a partir de ese momento.
- 7) Una vez terminada la digestión, apagar el digestor y tapar con un frasco los matraces para dejar enfriar.

B. Destilación.

- 1) Añadir al matraz Kjeldahl frío 25 ml de agua destilada y mezclar vigorosamente hasta una disolución completa.
- 2) Transferir el líquido a un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Colocar de 5 a 6 perlas de ebullición.
- 3) Adicionar 3 granallas de zinc. Añadir 15 ml de la solución de hidróxido de sodio 10 N, sosteniendo el matraz inclinado de modo que se deposite en el fondo.
- 4) Colocar en la salida del aparato de destilación un vaso de precipitados de 50 ml, que contenga 10 ml de la solución de ácido bórico más indicador.
- 5) Conectar el flujo de agua e iniciar la destilación. Destilar hasta que el volumen alcance la marca de 20 ml en el vaso de precipitados de 50 ml. Una vez alcanzado dicho volumen, retirar el matraz y apagar el aparato.
- 6) Titular el nitrógeno amoniacal con la solución de ácido sulfúrico 0.01 N hasta que vire de verde a rosado fuerte.
- 7) Realizar un blanco siguiendo los pasos del 3 al 15.

Cálculos

Calcular la concentración de nitrógeno, sustituyendo en la siguiente fórmula:

$$\text{Nitrógeno (\%)} = \frac{(T - B) \times N \times 1.4}{S}$$

Donde:

T = ml de ácido sulfúrico valorado gastados en la muestra.

B = ml de ácido sulfúrico valorado gastados en el blanco.

N = normalidad exacta del ácido sulfúrico.

S = peso de la muestra de suelo.

En la tabla 4.9 se presentan valores de nitrógeno que sirven para evaluar la calidad de un suelo.

Tabla 4.9 Criterios para evaluar un suelo con base en su contenido de nitrógeno total (Moreno, 1978).

Categoría	Valor (%) de nitrógeno en suelo
Extremadamente pobre	< 0.032
Pobre	0.032 - 0.063
Medianamente pobre	0.064 - 0.095
Medio	0.096 - 0.126
Medianamente rico	0.127 - 0.158
Rico	0.159 - 0.221
Extremadamente rico	> 0.221

4.7 Amonio intercambiable

Introducción

Los microorganismos participan de forma importante en el ciclo del nitrógeno en el suelo, debido a que realizan la fijación del nitrógeno, nitrificación y desnitrificación, así como su inmovilización. Se reportan como fracciones predominantes al amonio y nitratos (Foster, 1995; Maynard y Kalra, 1993).

En el caso de los derrames de hidrocarburos, la relación C/N aumenta significativamente; la adición de nitrógeno inorgánico permite balancearla y estimular la biodegradación al satisfacer los requerimientos de síntesis de aminoácidos, proteínas, purinas, ácidos nucleicos, aminoazúcares y vitaminas que en conjunto representan el contenido de nitrógeno en alrededor de 10% del peso celular seco de los microorganismos (Graham *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1998). Sin embargo, en la literatura existen discrepancias sobre el efecto de la estimulación, que se pueden atribuir a la variabilidad y compleja composición de los suelos y a otros factores como altas reservas de nitrógeno o adiciones excesivas (Bossert y Bartha, 1984; Leahy y Colwell, 1990; Walworth *et al.*, 1997). Comúnmente se evalúa al amonio intercambiable por representar la fuente de nitrógeno más directamente disponible para su incorporación en aminoácidos, sin requerir ser oxida-

do o reducido (Gaudy y Gaudy, 1981). Adicionalmente, se recomienda cuantificar nitratos para complementar la fracción de nitrógeno inorgánico susceptible de ser empleado por los microorganismos.

El amonio intercambiable se define como el amonio que puede extraerse con una solución neutra de ión potasio a temperatura ambiente. Las sales de potasio utilizadas comúnmente son K_2SO_4 0.05 M y KCl de 0.1 a 2 M; la capacidad de extracción depende del tipo de sal y su concentración. Posteriormente se cuantifica el amonio en el extracto, para lo cual se emplea una gran variedad de métodos: técnicas colorimétricas manuales, microdifusión, destilación con arrastre de vapor, análisis de inyección de flujo y electrodo de ión selectivo (Maynard y Kalra, 1993).

Método

Determinación de amonio intercambiable en suelo por extracción con cloruro de potasio (KCl 1M) y determinación por electrodo de ión selectivo.

Fundamento

Se recupera el amonio extraíble con KCl 1 M y se cuantifica por medio de un electrodo de ión selectivo, que consta de una membrana hidrofóbica permeable al gas, permitiendo separar la solución de la muestra de la solución interna del electrodo (el líquido no penetra la membrana). El amoniaco de la muestra en solución se difunde a través de la membrana, hasta que la presión parcial del amoniaco es la misma en ambos lados de la membrana. Así, para las muestras la presión parcial del amoniaco es proporcional a su concentración y ésta a su vez se encuentra en equilibrio con el ión amonio.

Material y equipo

- ♦ Estufa.
- ♦ Mortero.
- ♦ Balanza.
- ♦ Centrífuga.
- ♦ Potenciómetro con electrodo ión selectivo.
- ♦ Tubos Falcon para centrífuga o equivalente.
- ♦ Vórtex.
- ♦ Pipetas.
- ♦ Matraces volumétricos.

Reactivos y soluciones

- Cloruro de potasio (KCl) 1M. Solución extractora. Pesar 74.56 g de KCl disolver en agua destilada y aforar a volumen de 1 L.
- Hidróxido de sodio (NaOH) 10N. Disolver 400 g de NaOH en agua. Enfriar y diluir a 1 L.
- Solución patrón. 1 000 mg NH_4/L . Secar NH_4Cl por una hora a 100°C . Pesar 3.027 g, disolver en agua y diluir a 1 L.

Procedimiento**A. Extracción.**

- 1) Secar el suelo a temperatura ambiente ($25\text{-}30^\circ\text{C}$) y moler en un mortero.
- 2) Pesar 10 g del suelo molido, colocarlos en un tubo (Falcón para centrífuga o equivalente); posteriormente, agregar gradualmente 30 ml de KCl 1M, mezclando intensamente en vórtex durante un minuto. Centrifugar a 8 000 rpm por 10 minutos y recuperar el sobrenadante. Aproximadamente 25 ml serán utilizados para el análisis del amonio.

Nota: La determinación de amonio intercambiable en el presente método permite también extraer con la solución extractora (KCl 1M) a los iones nitrito y nitrato. Con la diferencia que el amonio se cuantifica por electrodo de ión selectivo y los iones nitrito y nitrato por electroforesis capilar (EIC).

B. Cuantificación.

- 1) Tomar 25 ml del sobrenadante de la extracción, adicionar 0.45 ml de NaOH 10N; bajo agitación llevar a cabo la medición de mV mediante electrodo de ión selectivo para amonio. Calcular de la curva estándar (de elaboración reciente) la concentración mg NH_4/L .

Curva patrón. Preparar por lo menos tres estándares según rango de concentración esperada en muestras. Es importante preparar siempre estándares nuevos. Deberán prepararse estándares entre 0.1 a 100 mg NH_4/L en un volumen de por lo menos 25 ml, usando la solución patrón 1 000 mg NH_4/L y como medio de disolución KCl 1M. Para estándares de 1, 10 y 100 mg NH_4/L medir 0.05, 0.5 y 5 ml de solución patrón y aforar a 50 ml con KCl 1M. Al igual que las muestras, medir la diferencia de potencial en milivolts (mV). Construir gráfica semilogarítmica. Poner en

el eje (x) logarítmico la concentración NH_4/L y en el eje lineal (y) el potencial del electrodo.

Cálculos

Para convertir el resultado a concentración en peso ($\text{mg NH}_4/\text{kg suelo}$), en este caso se utiliza la siguiente relación. Además es necesario corregir con la humedad.

$$\text{mg NH}_4/\text{kg suelo} = \text{mg NH}_4/\text{L} * 3.$$

Interpretación

En la tabla 4.10 se proporciona la clasificación de fertilidad de suelos por el contenido de nitrógeno inorgánico (nitrato y amonio).

Tabla 4.10 Clasificación de fertilidad de suelos en función del nitrógeno inorgánico (NOM-021-RECNAT-2000).

Clase	N inorgánico en el suelo (mg kg^{-1})
Muy bajo	0 - 10
Bajo	10 - 20
Medio	20 - 40
Alto	40 - 60
Muy alto	> 60

Nota: La solución extractora propuesta, así como las otras definidas para fertilidad de suelos, son representativas de la fracción de amonio biodisponible para plantas. Esta misma metodología, en cuanto a extracción y cuantificación, se aplica en la remediación de suelo. Sin embargo, no se ha establecido la solución extractora que sea la más adecuada de la fracción biodisponible a los microorganismos, tampoco se ha generalizado un rango de concentraciones óptimas para la remediación de suelos.

4.8 Nitritos y nitratos intercambiables

Introducción

Las fracciones minerales de nitrógeno son predominantemente amonio y nitratos, mientras que los nitritos son rara vez detectados en el suelo; incluso su determinación es normalmente injustificada excepto en suelos neutros y alcalinos que reciben amonio o fertilizantes liberadores de amonio (Foster, 1995; Maynard y Kalra, 1993).

Al igual que el amonio, los nitritos se pueden emplear para estimular la biodegradación de hidrocarburos contaminantes al balancear la relación C/N (Brook et al., 2001; Walworth y Reynolds, 1995). Diferenciándose por lixiviarse más fácilmente por su carga negativa, especialmente en suelos arcillosos. Los nitratos, además de ser una fuente de nutrientes, son aceptores de electrones en condiciones limitadas de oxígeno.

En la determinación analítica de nitratos en suelos, varias soluciones extractoras se han empleado para su separación del suelo. Entre éstas se encuentra el agua; KCl de 1 a 2 M; CaCl_2 0.01 M; NaHCO_3 0.5 M; solución de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 0.35% con 0.03 M de NH_4F y 0.015 M H_2SO_4 ; CuSO_4 0.01 M; y CuSO_4 0.01 M con Ag_2SO_4 . De todas éstas la solución más común es el KCl. Para la determinación de las concentraciones de nitritos y nitratos en el extracto se utilizan diferentes métodos que incluyen técnicas colorimétricas, microdifusión, vapor de destilación, análisis de inyección de flujo, cromatografía de iones y electrodo de ión selectivo (Maynard y Kalra, 1993).

Método

Determinación de nitritos y nitratos intercambiables en suelo por extracción con cloruro de potasio (KCl 1M) y determinación por electroforesis ión capilar (EIC).

Fundamento

Los nitritos y nitratos solubles se extraen del suelo con una solución de KCl 1 M y se cuantifican por electroforesis capilar, previa filtración del extracto a través de una membrana de 0.45 μm , para proteger el equipo de precipitados y material sólido. La mayoría de los instrumentos (EIC) emplean como detector primario al UV, pero la mayoría de aniones y

todos los cationes no son activos al UV. En el analizador ión capilar se emplea un electrolito a base de cromato de sodio y la detección es por absorción UV indirecta (ASTM D1498-00, 2000; Krol et al., 2000; US EPA 6500, 1998; US EPA 4140, 1998).

Material y equipo

- ♦ Estufa.
- ♦ Mortero.
- ♦ Balanza.
- ♦ Centrífuga.
- ♦ Analizador ión capilar.
- ♦ Tubos Falcon para centrífuga o equivalente.
- ♦ Vórtex.
- ♦ Pipetas.
- ♦ Matraces volumétricos.
- ♦ Filtro con membrana de 0.45 μm .

Reactivos y soluciones

- ♦ Solución extractora. Cloruro de potasio (KCl) 1M. Pesar 74.56 g de KCl disolver en agua destilada y aforar a volumen de 1 L.
- ♦ Medio de dilución de estándares. Cloruro de potasio (KCl) 0.0037M. Medir 0.915 ml de la solución KCl 1M y aforar a 0.25 L.
- ♦ Solución para lavado de columna. Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N. Pesar 0.4 g de NaOH disolver en agua desionizada y diluir a 100 ml.
- ♦ Solución patrón de nitrato (NO_3) 1 000 mg L^{-1} . Pesar 1.37 g de NaNO_3 , disolver en agua desionizada en un volumen de 1 L.
- ♦ Solución patrón de nitrito (NO_2) 1 000 mg L^{-1} . Pesar 1.5 g de NaNO_2 , disolver en agua desionizada en un volumen de 1 L.
- ♦ Electrolito. Base de cromato de sodio 0.1 M. 4.6 ml de solución OFM anión-BT (Water CIA-pak), 9.2 ml de cromato de sodio 0.1 M en 200 ml de agua desionizada grado MiliQ.

Procedimiento

A. Extracción.

- 1) Secar el suelo a temperatura ambiente (25-30°C) y moler en un mortero.
- 2) Pesar 10 g del suelo molido, colocarlos en un tubo (Falcón para centrífuga o equivalente), posteriormente agregar gradualmente 30 ml de KCl 1M, mezclando intensamente en vórtex durante un minuto. Centrifugar a

8 000 rpm por 10 minutos y recuperar el sobrenadante. Aproximadamente 1 ml será utilizado para el análisis de nitrato y nitrito.

Nota: Este procedimiento de extracción permite la obtención de sobrenadante para la determinación de amonio intercambiable, con la diferencia de requerirse 25 ml para la determinación del amonio con otro protocolo de cuantificación (ver sección 4.7).

B. Cuantificación.

1) Realizar una dilución inicial 0.5/5 (0.5 ml de sobrenadante en 4.5 ml de agua desionizada); a partir de ésta hacer una segunda dilución 0.2/5 (0.2 ml de la primera en 4.8 ml de agua desionizada). Esta última se debe filtrar a través de una membrana de 0.45 μm y, posteriormente, colocar 0.5 ml del filtrado en viales para el análisis por electroforesis capilar.

2) Condiciones del equipo (CIA).

Temperatura: 25°C.

Voltaje: 15kV con fuente de poder negativa.

Detección: UV indirecta a 254 nm.

Columna: Capilar de 75 μm (di) x 375 μm (de) x 60 cm (largo).

Curva patrón. Elaboración de la curva estándar para nitrato (NO_3). Deberá preparar estándares entre 5 a 80 mg NO_3/L a partir de la solución patrón 1 000 mg NO_3/L y como medio de disolución KCl 0.0037M. El tiempo de corrida durante el análisis debe ajustarse a 4.5 minutos.

Elaboración de la curva estándar para nitrito (NO_2). Deberá preparar estándares entre 5 y 80 mg NO_2/L , a partir de la solución patrón 1 000 mg NO_2/L y como medio de disolución KCl 0.0037M. El tiempo de corrida durante el análisis debe ajustarse a 4.5 minutos.

Cálculos

Para calcular la concentración final en mg L^{-1} deberá tomarse en cuenta la relación de diluciones. Finalmente, para convertir el resultado mg L^{-1} a concentración en peso (mg kg^{-1}), se utiliza la siguiente relación. Además es necesario corregir con la humedad.

$$\text{mg anión/kg suelo} = \text{mg anión /L} * 3.$$

Interpretación

La clasificación de fertilidad de suelos por el contenido de nitrógeno inorgánico (nitrato y amonio) se muestra en la tabla 4.11.

Tabla 4.11 Clasificación de fertilidad de suelos por el contenido de nitrógeno inorgánico.

Clase	N inorgánico en el suelo mg kg ⁻¹
Muy bajo	0 - 10
Bajo	10 - 20
Medio	20 - 40
Alto	40 - 60
Muy alto	> 60

Nota: Los valores de la tabla 4.11 corresponden a fertilidad de suelos del nitrógeno biodisponible para plantas; por lo que junto al amonio se debe interpretar el contenido de nitrógeno inorgánico en función a la capacidad extractiva de la solución empleada, y evaluar si es un parámetro que permita definir los requerimientos nutricionales de los microorganismos en los procesos de biodegradación de hidrocarburos.

4.9 Sulfato

Introducción

El sulfato es la principal forma inorgánica de azufre en la mayoría de los suelos, aunque pueden estar presentes las formas elementales y en sulfuro bajo condiciones predominantemente anaerobias. Otras formas oxidadas como tiosulfatos, tetratiónato o sulfito también pueden estar presentes en el suelo, pero sólo como intermediarios durante la oxidación o reducción del sulfuro. Los sulfatos pueden estar presentes en formas solubles, adsorbidos en la superficie del suelo o como sales insolubles (yeso o asociados con carbonato de calcio). Teóricamente el sulfato biodisponible en fertilidad de suelos es el adsorbido y el soluble, mientras que el insoluble no se considera directamente disponible (Kowalenko, 1993).

Diferentes soluciones extractoras se han empleado en las determinaciones de sulfato en suelo, entre ellos se reportan el agua, acetatos, carbonatos, cloruros, fosfatos, citratos y oxalatos. Para cuantificar sólo el sulfato soluble, la elección teórica es el agua; sin embargo, comúnmente se emplea una solución salina débil en bajas concentraciones, como el cloruro de calcio para flocular el suelo y para poder disminuir materia orgánica coloreada; o el cloruro de litio que presenta el efecto benéfico adicional de inhibir la actividad microbiana. Para recuperar todo el sulfato adsorbido se recomienda una alta relación extractante: suelo, e incrementar el pH por arriba de 6.5 para neutralizar las cargas positivas que establecen la adsorción del sulfato al suelo, y a su vez evitar una extracción ácida de porciones de yeso o sulfato asociado a carbonatos. Sin embargo, a pH altos también se extrae materia orgánica coloreada (Kowalenko, 1993).

Se han desarrollado varios métodos para la cuantificación de iones: turbidimétricos, volumétricos, gravimétricos o colorimétricos después de precipitar al sulfato como sulfato de bario o después de la reducción ácida a sulfuro. Otros métodos emplean cromatografía de iones, plasma inductivamente acoplado y fluorescencia de rayos X.

El método que se describe a continuación emplea la electroforesis ión capilar (EIC), que es una tecnología de separación relativamente nueva (1990) para el análisis de iones inorgánicos y orgánicos en solución acuosa (ASTM D6508, 2000; Krol *et al.*, 2000; US EPA 6500, 1998; US EPA 4140, 1998b).

Método

Determinación de sulfatos extraíbles en suelo con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 0.5 M y determinación por electroforesis ión capilar (EIC).

Fundamento

Se extrae al sulfato que se encuentra en suelo en forma soluble y adsorbido con NaHCO_3 0.5 M y se cuantifica por electroforesis capilar. La mayoría de los instrumentos (EIC) emplean al detector UV como primario, pero la mayoría de aniones y todos los cationes no son activos al UV. En el analizador ión capilar se emplea un electrolito a base de cro-

mato de sodio, y la detección por absorción UV indirecta (ASTM D6508, 2000; Krol *et al.*, 2000; US EPA 6500, 1998; US EPA 4140, 1998).

Material y equipo

- Estufa.
- Mortero.
- Balanza.
- Centrífuga.
- Analizador ión capilar.
- Tubos Falcon para centrífuga o equivalente.
- Vórtex.
- Pipetas.
- Matraces volumétricos.
- Filtros de membrana de 0.45 μm .

Reactivos y soluciones

- 1) Solución extractora. Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 0.5 M. Secar NaHCO_3 por una hora a 100°C . Pesar 42 g, disolver en agua y diluir a 1 L.
- 2) Medio de dilución de estándares. Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 0.004 M. Medir 8 ml de la solución NaHCO_3 0.5 M y diluir en 1 L.
- 3) Solución para lavado de columna (CIA). Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N. Pesar 0.4 g de NaOH disolver en agua desionizada y diluir a 100 ml.
- 4) Solución patrón de sulfato (SO_4) 1 000 mg L^{-1} . Sulfato de sodio (Na_2SO_4). Pesar 1.479 g de Na_2SO_4 disolver en agua desionizada en un volumen de 1 L.
- 5) Electrolito. Base de cromato de sodio 0.1 M. 4.6 ml de solución OFM anión-BT (Water CIA-pak), 9.2 ml de cromato de sodio 0.1 M en 200 ml de agua desionizada grado MiliQ.

Procedimiento

A. Extracción.

- 1) Secar el suelo a temperatura ambiente ($25\text{-}30^\circ\text{C}$) y moler en un mortero.
- 2) Pesar 1g del suelo, colocarlo en un tubo (Falcon para centrífuga o equivalente), agregar gradualmente 3 ml de NaHCO_3 0.5M, mezclando intensamente en vórtex durante un minuto. Centrifugar a 8 000 rpm por 10 minutos y recuperar el sobrenadante.

B. Cuantificación.

1) Realizar una dilución inicial 2:5 (2 ml de sobrenadante y 3 ml de agua desionizada), a partir de ésta hacer una segunda dilución 0.2:5 (0.2 ml de la primera dilución y 4.8 ml de agua desionizada). Esta última se filtra a través de una membrana 0.45. Transferir 0.5 ml en viales para el análisis por electroforesis capilar (MeEC).

2) Condiciones del equipo (CIA).

Temperatura: 25°C.

Voltaje: 15kV con fuente de poder negativa.

Detección: UV indirecta a 254 nm.

Columna: Capilar de 75 mm (di) x 375 mm (de) x 60 cm (largo).

Curva patrón. Deberá preparar estándares entre 5 a 80 mg SO₄/L a partir de una solución patrón de 1 000 mg SO₄/L de HCO₃ 0.004 M. Los estándares deben de filtrarse a través de una membrana 0.45 µm, agua de purga y electrolito. El tiempo de corrida durante el análisis debe ajustarse a 4.5 minutos.

Cálculos

Para calcular la concentración final en mg L⁻¹ se debe considerar la relación de diluciones. Finalmente, para convertir el resultado mg SO₄/L a concentración en peso (mg SO₄/kg suelo), en este caso, se utiliza la siguiente relación:

$$\text{mg SO}_4/\text{kg suelo} = \text{mg SO}_4/\text{L} * 3.$$

Interpretación.

Las concentraciones de sulfato en suelos no contaminados comúnmente no son altas, se cuenta sólo con una referencia de umbral tentativo del Reino Unido de 100 a 200 mg kg⁻¹ (ASTM DS64, 1996). Se debe tener cuidado especial en la interpretación de suelos contaminados con residuos y recortes de lodos de perforación impregnados con hidrocarburos, por la presencia de barita (BaSO₄).

Los métodos de cuantificación del sulfato, así como otros aniones, por lo general están asociados a estudios de fertilidad de suelos, relacionando a los aniones como biodisponibles para el crecimiento de plantas (sulfato soluble y adsorbido) (Kowalenko, 1993). Aunque es razonable

considerar que la fracción soluble en agua está biodisponible para los microorganismos, poco se puede intuir sobre la fracción adsorbida y la insoluble, para poder establecer qué *fuera* extractante es la adecuada para la extracción del sulfato disponible. Algunos estudios realizados en laboratorios del IMP (datos no proporcionados) muestran una mayor cuantificación en la extracción de sulfato con NaHCO_3 0.5 M que con KCl 1M y agua destilada durante cinéticas de biodegradación.

4.10 Fe^{+2} y Fe^{+3}

Introducción

El hierro está presente en la biosfera en dos estados de oxidación, Fe^{+2} y Fe^{+3} , los cuales son termodinámicamente estables bajo condiciones anóxicas y óxicas, respectivamente. El Fe^{+3} se encuentra en una amplia variedad de formas químicas, como minerales altamente cristalinos: magnetita (Fe_3O_4), geotita (FeOOH), hematita (Fe_2O_3), vivianita ($\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) o ferrihidrita ($\text{Fe}(\text{OH})_3$), y minerales con poca o ninguna estructura cristalina: oxihidróxidos amorfos (Hacher *et al.*, 2001).

Las bacterias reducen preferentemente los oxihidróxidos amorfos de Fe^{+3} (Lovley y Phillips, 1987). El método más comúnmente utilizado para medir la concentración de estos compuestos amorfos de Fe^{+3} en suelos y sedimentos es la técnica de extracción con oxalato ácido de amonio. Sin embargo este método puede catalizar la disolución de las formas cristalinas que no son biodisponibles para las bacterias reductoras de Fe, y no distingue entre la fracción cristalina y la amorfa. Un método más selectivo para la extracción de los oxihidróxidos amorfos de Fe^{+3} es la técnica de extracción con hidroxilamina hidrociorada (Lovley y Phillips, 1987; Byong-Hun *et al.*, 2001).

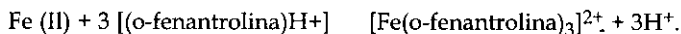
Método

Este método es aplicable para extraer Fe^{+2} y Fe^{+3} de muestras de suelo con una solución ácida y su cuantificación por colorimetría.

Fundamento

La prueba se basa en la extracción de Fe^{+2} y Fe^{+3} en muestras de suelo con una solución ácida, y la medición indirecta de los iones Fe^{+2} ,

mediante la cuantificación del complejo colorido formado por Fe^{+2} con o-fenantrolina, que absorbe a 510 nm.



Para determinar la concentración de Fe^{+3} , inicialmente el Fe^{+3} extraído debe ser reducido a Fe^{+2} con hidroxilamina hidrociorada, que puede ser cuantificado como Fe^{+2} con o-fenantrolina.

El límite de detección de la técnica va de 1 a 50 ppm de Fe^{+2} , y en caso de tener extractos más concentrados se recomienda hacer las diluciones necesarias para obtener mediciones de absorbancia entre 0.1 y 0.8.

Interferencias

Valores de $\text{pH} > 6$, provocan una recuperación ineficiente de Fe^{+2} . La presencia de NaNO_3 a concentraciones mayores de 0.01M provoca una recuperación variable y a $\text{pH} 7$ el Fe^{+2} puede ser oxidado de forma abiótica por nitratos o nitritos. La presencia de sulfato provoca que sólo sea extraíble aproximadamente 15% del Fe^{+2} total entre un pH de 4 y 5.

Material y equipo

- ♦ Probetas de 100 ml.
- ♦ Matraces volumétricos de 1L.
- ♦ Tubos de ensayo de vidrio con tapa de rosca de 20 ml.
- ♦ Pipetas graduadas de 1 y 10 ml.
- ♦ Vasos de precipitados de 25, 50 y 100 ml.
- ♦ Vórtex.
- ♦ Tubos de centrífuga de 15 ml.
- ♦ Centrífuga.
- ♦ Espectrofotómetro visible.

Reactivos y soluciones

- 1) Ácido clorhídrico (HCl) 0.5 M. En un matraz volumétrico de 1L con 100 ml de agua destilada, adicionar lentamente 41.82 ml de HCl y finalmente aforar con agua destilada.
- 2) Hidroxilamina hidrociorada ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) 0.25 M en HCl 0.25 M. Adicionar 17.37 g de hidroxilamina en un matraz volumétrico de 1L,

disolver con 100 ml de una solución de HCl 0.5M y posteriormente aforar con la misma solución.

- 3) Etanol 10%. Disolver 10 ml de etanol 98% en 90 ml de agua destilada.
- 4) o-fenantrolina ($C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$) 0.25%. Pesar 0.25 g de o-fenantrolina y llevar a 100 ml con una solución de etanol al 10%.
- 5) Buffer de acetato ($C_2H_3O_2 \cdot Na$) al 10%. Pesar 10 g de acetato de sodio y disolver en 100 ml de agua destilada. Ajustar a pH 4 con ácido acético.
- 6) Solución estándar de sulfato ferroso amoniacal ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$) (50 ppm de Fe). Pesar 0.3512 g de sulfato ferroso amoniacal y transferir a un matraz volumétrico de 1L, disolver y aforar con solución de HCl 0.5 M.

Procedimiento

A. Extracción.

- 1) En un tubo de centrifuga de 15 ml pesar 0.1 g de suelo húmedo bajo condiciones anaerobias y adicionar 5 ml de solución de HCl 0.5 M. Agitar en forma intermitente durante una hora en vórtex.
- 2) Centrifugar por 10 minutos a 6 000 rpm.
- 3) Utilizar el sobrenadante para la determinación de Fe^{+2} y Fe^{+3} .

Nota: Si es necesario, diluir la muestra para poder hacer una lectura dentro del rango de 0.1 a 0.8 de absorbancia.

B. Cuantificación.

- 1) Para la cuantificación de Fe^{+2} , tomar 0.2 ml del sobrenadante de la centrifugación, adicionar 1 ml de solución de o-fenantrolina, 1 ml de solución buffer, completar a 10 ml con agua destilada y agitar vigorosamente en vórtex. Permitir el desarrollo del color (15 a 20 minutos) y leer la absorbancia a 510 nm.
- 2) Para la cuantificación de Fe total, tomar 0.2 ml de sobrenadante de la centrifugación, adicionar 1 ml de solución de hidroxilamina y esperar una hora. Posteriormente, adicionar 1 ml de solución de o-fenantrolina, 1 ml de solución buffer, completar a 10 ml con agua destilada y agitar vigorosamente en vórtex. Permitir el desarrollo del color (15 a 20 minutos) y leer absorbancia a 510 nm.

Curva patrón. Preparar una curva patrón con la solución estándar de sulfato ferroso amoniacal (50 ppm de Fe) de acuerdo con la tabla 4.12.

Tabla 4.12 Preparación de la curva patrón para determinar sulfatos.

Concentración Fe ($\mu\text{g/ml}$ o ppm)	Sol. estándar de sulfato (ml)	Agua desionizada (ml)
0	0	1
5	0.1	0.9
10	0.2	0.8
20	0.4	0.6
30	0.6	0.4
40	0.8	0.2
50	1	0

Adicionar 1 ml de solución de hidroxilamina hidroclorada y esperar una hora. Posteriormente adicionar 1 ml de solución de o-fenantrolina, 1 ml de solución buffer, completar a 10 ml con agua destilada y agitar vigorosamente en vórtex. Permitir el desarrollo del color (15 a 20 minutos) y leer la absorbancia a 510 nm.

Cálculos

Calcular la concentración de Fe^{+2} y Fe total en el extracto, con la ecuación lineal de la curva estándar.

$$\text{CE (ppm)} = ((\text{Abs} - b) / m) * (\text{FD}).$$

Donde:

CE = concentración del extracto.

b = ordenada al origen.

m = pendiente.

FD = factor de dilución.

Calcular la concentración final de Fe^{+2} y Fe total de la muestra de suelo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{CS } (\mu\text{g} / \text{g de suelo seco}) = (\text{CE} * \text{V}) / (\text{P} * \text{FH}).$$

CS = concentración de Fe en suelo.

V = volumen de solución extractora (5 ml).

P = cantidad de suelo húmedo (0.1 g).

FH = factor de corrección de humedad (1-(%humedad/100)).

La concentración de Fe^{+3} se calcula con la siguiente ecuación:

$$\text{Fe}^{+3} = \text{Fe total} - \text{Fe}^{+2}.$$

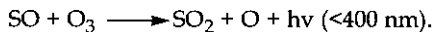
4.11 Sulfuro de hidrógeno y metano

Introducción

La actividad microbiana sulfato-reductora y metanogénica de los microorganismos presentes en un suelo, agua o sistemas de cultivo en laboratorio, se puede determinar con la presencia de sulfuro (H_2S) y metano (CH_4) (Salminen *et al.*, 2004; Tiehm y Schulze, 2003; Atteia y Franceschi, 2002; Lors *et al.*, 2001; Loser *et al.* 1998). Esta determinación puede realizarse por cromatografía de gases, por ser un método sensible a bajas concentraciones. La determinación de la actividad metabólica, anaerobia o aerobia, a través de los metabolitos liberados (CH_4 , H_2S , CO_2), permite relacionar la pérdida de hidrocarburos con la actividad microbiana; factor esencial principalmente en el seguimiento de la atenuación natural y en estudios de biodegradación de hidrocarburos.

El detector de ionización de flama (FID) es no selectivo, emplea la combustión de hidrógeno para la ionización de los compuestos orgánicos. Este tipo de sistemas es utilizado para la separación y detección de compuestos orgánicos en muestras ambientales.

El detector de quimioluminiscencia (SCD) es selectivo para compuestos azufrados. La operación se basa en la reacción de ozono con monóxido de sulfuro producido por la combustión del analito. La luz producida por la combustión es detectada con un fotomultiplicador sensible a la luz azul.



Método

Este método es aplicable para medir simultáneamente CH_4 y H_2S por cromatografía de gases con detectores FID y SCD. El alcance del método es de 10 a 70 mg/m^3 de H_2S y 6 000 a 32 000 mg/m^3 de CH_4 .

Fundamento

La prueba se basa en la cuantificación simultánea de CH_4 y H_2S en la atmósfera de muestras líquidas o sólidas por cromatografía de gases con detectores de ionización de flama (FID), para la detección de metano, quimioluminiscencia de sulfuro (SCD) y sulfuro de hidrógeno conectados en serie.

Material, equipo, reactivos y gases

- Cromatógrafo de gases con detector FID y SCD.
- Columna para separar metano y sulfuro de hidrógeno (por ejemplo: HP-1).
- Jeringa para muestras gaseosas de 100 μl .
- Jeringa para muestras gaseosas de 250 μl .
- Helio de ultra alta pureza (99.999%).
- Aire extraseco.
- Hidrógeno de ultra alta pureza (99.999%).
- Gases de calibración, 2.5% CH_4 , 50 ppm CO, 25 ppm H_2S , 12% O_2 , balance en N_2 .

Procedimiento

Inyectar 100 μl de la atmósfera de la muestra de interés, y determinar la concentración de H_2S y CH_4 con base en el área bajo la curva de cada pico, y a la curva de calibración correspondiente a cada compuesto.

Para realizar las curvas de calibración de H_2S y CH_4 , tomar alícuotas directas del tanque de los gases. En la tabla 4.13 se presentan las alícuotas y las concentraciones (p/v) para cada compuesto.

Tabla 4.13 Volúmenes de gases para realizar curva patrón de CH₄ y H₂S.

Volumen de inyección (µl)	Concentración de CH ₄ (mg/m ³)	Concentración de H ₂ S (mg/m ³)
50	6 302.8	13.39
100	12 605.7	26.78
150	18 908.5	40.17
200	25 211.4	53.56
250	31 514.2	66.95

4.12 Potencial óxido-reducción. Determinación en laboratorio y campo

Introducción

El potencial óxido-reducción puede definirse como una medida cuantitativa de la energía de oxidación o de la tendencia del electrón de escaparse o fugarse de un sistema reversible óxido-reducción (redox). Esta medición refleja qué tan oxidado o reducido está el sistema con referencia a un estándar. Cuando el potencial redox está referido con respecto al hidrógeno, se expresa como Eh en unidades de milivolts; E es la diferencia de potencial entre el electrodo estándar de hidrógeno y el sistema en el cual el potencial redox es medido.

Debido a que el estado redox es una medida cuantitativa del estado de oxidación y reducción de las sustancias en el sistema, ésta permite representar el estado de oxidación de los compuestos susceptibles de ser empleados como principal aceptor de electrones para los microorganismos. Así, los microorganismos emplean a los aceptores de electrones más oxidados que les permitan obtener más energía, disminuyendo de manera secuencial de aceptores bajo condiciones aerobias (potencial redox positivo) a anóxica y anaerobia (potencial redox más negativos).

Método

Determinación del potencial óxido reducción en suelos, procedimientos en laboratorio y campo. Este protocolo se basa en los métodos estándares para la determinación del potencial redox en soluciones (ASTM D1498-

00, 2000; US GS, 1998; APHA, 1995), adecuado para suelos y lodos (ISO 11271, 2002; NRES 381, 2002; Patrick *et al.*, 1996; Benada, 1995; Zausig, 1995; ZoBell, 1946). El método se modificó para su aplicación en muestreos a distintas profundidades durante la caracterización de suelos.

Fundamento

Debido a que las reacciones de oxidación o reducción son movimiento de electrones que involucran cambios en las cargas eléctricas, las intensidades de las reacciones redox pueden medirse en términos de diferencias potenciales eléctricas (*emf* por sus siglas en inglés). Cuando un electrodo no atacable (como el platino o el oro metálico) se sumerge en un sistema reversible redox, una diferencia de potencial se establece en el electrodo, la cual puede medirse potenciométricamente. Esta diferencia de potencial se crea debido a que el electrodo no participa en la reacción redox, por lo que la concentración o tendencia de escape de electrones en el electrodo es diferente a la concentración en el sistema reversible de reacción redox. Este electrodo no atacable puede ser considerado como un almacén de electrones actuando como un conductor inerte de electrones *desde o para* un sistema. Así también se observa que cuanto más oxidado está el sistema, más alto será el potencial del electrodo.

Interferencias

Si el electrodo se expone a altas concentraciones de sulfuro de hidrógeno por varias horas, puede producirse una película en el electrodo de platino que interfiere con la medición.

La materia orgánica, aceite y el sulfuro pueden causar contaminación de la superficie del electrodo, del puente salino o del electrolito interno. Esto puede provocar un funcionamiento errático cuando se emplean electrodos de referencia. Se debe limpiar y calibrar el equipo para verificar su funcionamiento.

Los electrodos de redox combinados y simples de platino pueden producir lecturas inestables en soluciones que contienen iones cromo, uranio, vanadio o titanio, y otros iones que son agentes reductores más fuertes que el hidrógeno o el platino.

No inserte directamente electrodos redox en soluciones ricas en hierro, después de estar el electrodo en contacto con la solución ZoBell. Un pre-

cipitado azul insoluble puede cubrir la superficie del electrodo debido a una reacción inmediata entre los iones de hierro y cianuro férrico en la solución ZoBell con los iones ferrosos y férricos en la muestra de agua, causando lecturas erráticas.

Material y equipo

- ♦ Potenciómetro con electrodos ORP.
- ♦ Termómetro.
- ♦ Balanza portátil.
- ♦ Muestra de suelo (10 g mínimo).
- ♦ Pipetas de 10 ml.
- ♦ Viales de vidrio de 40 ml.
- ♦ Vasos de precipitados.
- ♦ Papel suave para secado del electrodo.

Nota: El potenciómetro con un rango de +/- 1 000 mV, resolución de 1 mV y precisión de +/- 1 mV es adecuado. Los arreglos de electrodos comerciales deben estar especificados para evaluar el potencial óxido-reducción, comúnmente compuestos de un electrodo de un metal inerte (platino u oro) en forma de botón o anillo y un electrodo de referencia de calomelano (Hg/HgCl₂) o Ag/AgCl. Estos electrodos deben tener una solución de inmersión de referencia especificada de KCl (3, 3.5, 3.8, 4 y 4.7 M o saturada), para permitir el cálculo de potencial referido al electrodo de hidrógeno.

Reactivos y soluciones

- 1) Agua desionizada.
- 2) Solución ZoBell (solución estándar redox). Consiste en 0.1 M KCl con cantidades equimolares de K₄Fe(CN)₆ y K₃Fe(CN)₆: Pesar de 1.4080 g K₄Fe(CN)₆·3H₂O, 1.0975 g K₃Fe(CN)₆ y 7.4557 g KCl, disolver en agua desionizada y aforar a 1 L. Los reactivos deben estar secos antes de su uso, mantenerlos en un desecador una noche. La solución final debe ser almacenada en un recipiente de polietileno de alta densidad (HDPE) oscuro que no permita el paso de la luz, perfectamente tapado, refrigerado a 4°C. Se conserva hasta seis meses. Se pueden emplear soluciones comerciales que se reconstituyen antes de su uso.
- 3) Agua regia. Mezcle un volumen de ácido nítrico concentrado (HNO₃, sp gr 1.42) con tres volúmenes de ácido clorhídrico (HCl, sp gr 1.18).

4) Detergente libre de fosfatos.

Nota: Algunas guías recomiendan la solución estándar redox de quinhidrona. Se prefiere la ZoBell debido a que es más estable a temperaturas mayores a 30°C y a que su dependencia con la temperatura no está tan bien definida como en la solución ZoBell.

Procedimiento

A.1 Preparación de la muestra en laboratorio.

Para la determinación del potencial redox en pruebas de biodegradación o tratabilidad en laboratorio, en los cuales no sea factible la toma de muestras, se puede introducir el electrodo directamente en el sistema (suelo), extremando cuidados de limpieza. En el caso de muestras anaerobias, se debe realizar el análisis en una campana anaerobia para evitar la penetración de oxígeno. Si es posible tomar una muestra del suelo o lodo, se recomienda verterlo en un vial de 40 ml de boca ligeramente más ancha que el electrodo, para reducir el volumen de la muestra.

Por último, si el poco volumen de muestra no permite la inmersión del electrodo se puede adicionar agua (recientemente hervida pero enfriada a temperatura ambiente para eliminar el oxígeno) hasta desplazar todo el aire y agitar el vial para dispersar el suelo, con ayuda opcional de perlas de vidrio (ZoBell, 1946). Las muestras deben estar siempre saturadas de agua, por lo que se recomienda este último procedimiento si la muestra no está totalmente húmeda.

A.2 Preparación de la muestra en campo.

1) De acuerdo con el diseño del muestreo se pueden realizar las siguientes adecuaciones para los distintos tipos de muestreos:

- a) Superficial: Se introduce el electrodo en el nivel de superficie (Patrick, 1996).
- b) *In situ*. Se hace un agujero en el suelo con una profundidad adecuada para el electrodo, dejando 2 o 3 cm de menor profundidad para introducir el electrodo (ISO, 2002).
- c) Núcleo o muestra de suelo. Se submuestran 10 g de suelo y se depositan en un vial cerrado para evitar la influencia del oxígeno. Se adiciona agua (recientemente hervida pero a temperatura ambiente para eli-

minar el oxígeno), hasta desplazar todo el aire y se agita el vial para dispersar el suelo. Se pueden emplear perlas de vidrio (ZoBell, 1946).

En caso de suelos en los que se dificulta la humectación por la "repelencia al agua" por hidrocarburos, por el alto contenido de arcilla o por el contenido de otros residuos, se recomienda pesar 10 g de suelo en el vial, adicionar 20 ml de agua y medir el potencial redox (NRES 381, 2002). La preparación es semejante al procedimiento para medir pH (US EPA 9045D, 2004), se recomienda al menos saturar el suelo (Brown, 1934).

Este último procedimiento permite evaluar el potencial redox en muestras de suelo, a distintas profundidades provenientes de núcleos inalterados, para caracterizar la contaminación a través de muestreadores tipo nucleadores, penetrómetros y tubos Shelby. Se recomienda la determinación en campo inmediatamente después de recuperar el núcleo y con anterioridad a su homogeneización.

B. 1 Cuantificación.

- 1) Introducir el electrodo verificando que esté en contacto íntimo con el suelo. Esperar a que se alcance un equilibrio térmico y registrar los milivolts y la temperatura inicial¹.
- 2) Esperar a que se estabilice la lectura hasta ± 5 mV. La estabilización puede ocurrir hasta 30 minutos después; tomar la lectura.

Calibración diaria. A diferencia de los sistemas pH, los electrodos de potencial de óxido reducción (ORP) no pueden ser estandarizados con amortiguadores (buffers). Incluso los equipos ORP son muy sensibles a interferencias, por lo que su calibración debe ser más continua.

- 1) Encender el equipo y esperar a que se estabilice de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Verificar, el contenido de la solución de inmersión de referencia (KCl), al menos una pulgada por arriba del nivel en que se tomará la lectura. Agitar el electrodo para remover burbujas y reemplazar la solución de ser necesario, de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

¹Esta lectura sirve sólo como referencia para verificar el buen funcionamiento del equipo.

- 2) Enjuagar el electrodo y el termómetro con agua desionizada y secarlos con un papel suave.
- 3) Verter la solución ZoBell, introducir el electrodo y el termómetro y registrar la temperatura y el potencial después de 15 a 30 minutos de estabilización (+/- 5 mV).
- 4) Enjuagar el electrodo y el termómetro con agua desionizada y secarlos con un papel suave. Se recomienda conservar la solución ZoBell para futuras verificaciones.

Nota: En caso de observar una respuesta dudosa o se considere adecuado, limpiar el electrodo con detergente y un cepillo de dientes. Sumergir en agua regia caliente (70°C) por un minuto, no más tiempo porque el agua regia disuelve el metal noble y genera respuestas erráticas. Enjuagar el electrodo en agua varias horas antes de usarlo (verificar las recomendaciones del fabricante).

Cálculo del potencial óxido reducción con respecto al hidrógeno (Eh)

$$E_h = E_{\text{medido}} + E_{\text{ref.}}$$

E_h = potencial relativo al electrodo de hidrógeno (mV).

E medido = potencial redox medido en milivolts.

E ref = potencial redox de referencia.

El potencial redox de referencia (E ref) se obtiene de acuerdo con la tabla 4.14. Se debe considerar el tipo de electrodo de referencia (orion, calomelano o Ag/AgCl); la concentración de la solución de inmersión de referencia especificada de KCl; y la temperatura.

En caso de estar evaluando el buen funcionamiento del equipo y del electrodo con la solución de referencia ZoBell, se puede comparar el valor E_h calculado con la siguiente compensación de la temperatura. La diferencia entre el valor observado y el de la tabla 4.15 no debe ser mayor que 5 mV; en caso contrario considerar la limpieza del electrodo.

Tabla 4.14 Potencial estándar de media celda de algunos electrodos de referencia seleccionados en función de la temperatura y la concentración de la solución de referencia de KCl.

T (°C)	Ag/AgCl				Calomelano (Hg/HgCl ₂)				Orión
	KCl (3M)	KCl (3.5M)	KCl (3.8M)	KCl (sat)	KCl (3M)	KCl (3.5M)	KCl (4M)	KCl (sat)	
10	220	215	216	214	260	256	—	254	256
15	216	212	212	209	—	—	—	251	253
20	213	208	208	204	257	252	—	248	249
25	209	205	204	199	255	250	246	244	246
30	205	201	200	194	253	248	244	241	242
35	202	197	195	189	—	—	—	238	238
40	198	193	191	184	249	244	239	234	234

Tabla 4.15 Potencial relativo al electrodo de hidrógeno de la solución ZoBell en función de la temperatura.

T (°C)	Eh(mV)	T (°C)	Eh(mV)
10	467	26	428
12	462	28	423
14	457	30	418
16	453	32	416
18	448	34	407
20	443	36	402
22	438	38	397
24	433	40	393
25	430		

Reproducibilidad

No es posible alcanzar reproducibilidad de milivolt en sistemas tan complejos como los suelos, lodos y sedimentos. La fluctuación de Eh en los primeros 5 a 10 minutos después de la inserción de los electrodos se debe a un fenómeno de equilibrio; sin embargo, en lodos y suelos que contienen materia orgánica, organismos o enzimas, estos no permiten que se alcance el equilibrio. Se ha observado que en 30 minutos las lecturas son estables, pero más de 120 minutos después se puede registrar actividad bacteriana que evita que la reacción redox sea reversible (ZoBell, 1946). Este efecto puede presentarse en un tiempo más corto en muestras de reactores de pruebas de biodegradabilidad o tratabilidad.

Interpretación

La escala de Eh no presenta límites teóricos ni neutralidad; sin embargo, se observa que el potencial redox es cero ($Eh = 0$) para un electrodo de hidrógeno normal estándar (H_2 , 1 atm, $25^\circ C$ y $pH = 0$). También como referencia se establecen los límites de reducción a -410 mV para el caso de hidrógeno ($pH = 7$) y oxidado a +810 mV para oxígeno ($pH = 7$), aunque pueden existir sistemas con agentes más oxidantes o reductores. Algunos aceptores de electrones para microorganismos, con respecto a los potenciales redox, se muestran en la tabla 4.16.

Tabla 4.16 Aceptores de electrones utilizados por microorganismos en función al potencial-redox del suelo.

Proceso	Reacción	ΔG° [KJ]	Eh [mV]
Respiración aerobia	$CH_2O + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O$	- 502,3	>300
Desnitrificación	$CH_2O + \frac{4}{5}NO_3^- + \frac{4}{5}H^+ \rightarrow CO_2 + \frac{2}{5}N_2 + \frac{7}{5}H_2O$	- 476,8	>300
Reducción de Mn (IV)	$CH_2O + 2MnO_2 + 4H^+ \rightarrow CO_2 + 2Mn^{2+} + 3H_2O$	- 340,3	300-100
Reducción de Fe(III)	$CH_2O + 4Fe(OH)_3 + 4H^+ \rightarrow CO_2 + 4Fe^{2+} + 11H_2O$	- 115,0	300-100
Reducción de SO_4^{2-}	$CH_2O + \frac{1}{2}SO_4^{2-} + \frac{1}{2}H^+ \rightarrow CO_2 + \frac{1}{2}HS^- + H_2O$	- 104,7	<100
Formación de CH_4	$CH_2O \rightarrow \frac{1}{2}CH_4 + \frac{1}{2}CO_2$	-92,9	<-100

En el caso de suelos contaminados con metales pesados (Al, As, Ba Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni, Pb, Se, V y Zn), el estado redox altera su solubilidad, movilidad y por ende su efecto tóxico, variando para cada metal. Los solventes clorados modifican el potencial redox del suelo, hasta condiciones reductoras que favorecen su biodegradación.

Las determinaciones en experimentos en laboratorio permiten dar seguimiento de procesos y para el caso de determinaciones en campo, se prefiere el procedimiento en el sitio. Debido a la naturaleza compleja del suelo y a que varios sistemas biológicos no están en equilibrio, así como a los cambios puntuales en el suelo, se recomienda la interpretación de los Eh junto con otras determinaciones, como la cuantificación directa de los principales aceptores de electrones, e interpretar los resultados comparándolos con la información del sitio, especialmente los controles (US EPA 600/R-02, 2002).

4.13 Determinación de textura (tamaño de las partículas de los suelos)

Introducción

La textura del suelo es la proporción relativa por tamaños de partículas de arena, limo y arcilla; las cuales al combinarse permiten categorizar al suelo en una de las 12 clases texturales.

Método

La determinación del tamaño de partículas del suelo puede realizarse entre otros métodos por el procedimiento de la pipeta.

Interferencias

En el caso de suelos contaminados con hidrocarburos, si no se realiza una buena eliminación de la materia orgánica (que incluye a los hidrocarburos), ésta puede interferir con la determinación.

Principio y aplicación

El método de la pipeta es un procedimiento de muestreo directo que consiste en tomar una submuestra (alícuota) de una suspensión de suelo en agua, donde se está llevando a cabo un proceso de sedimentación,

determinando el tipo de partícula en función de su velocidad de sedimentación.

La submuestra es tomada a una profundidad h y a un tiempo t , en el que todas las partículas con diámetro mayor o igual que 0.002 mm han sedimentado, teniéndose en las alícuotas únicamente partículas pertenecientes a la fracción arcillosa. El método se basa en la Ley de Stokes.

Material y equipo

- Hexametáfosfato de sodio 1 N.
- Agua destilada.
- Agua oxigenada al 6%.
- Pipeta lowy.
- Botellas de 250 ml.
- Tamices de 300 mallas.
- Botes de aluminio.
- Cápsulas de porcelana.
- Estufa de aire forzado.
- Suelo sin materia orgánica.
- Agitador eléctrico.
- Agitador de vidrio.
- Plancha eléctrica graduable.

Procedimiento

Pretratamiento de la muestra, digestión de la materia orgánica (m.o.).

- 1) Tomar 100 g de suelo seco, tamizarlo a través de una malla de 2 mm y colocarlo en un vaso de precipitado de 1 L, agregar agua destilada hasta cubrir el suelo.
- 2) Adicionar 10 ml de agua oxigenada al 6% y con el agitador de vidrio revolver durante 10 minutos.
- 3) Agregar otros 10 ml de agua oxigenada y observar si se da una reacción violenta con producción de espuma; si esto sucede agregar 10 ml de agua oxigenada cada 15 minutos, hasta que no se produzca espuma.
- 4) Colocar el vaso en la parrilla o plancha eléctrica ubicada dentro de la campana de extracción, y calentar hasta 90°C.
- 5) Verter 10 ml más de agua oxigenada y observar la intensidad de la reacción. Si la reacción es violenta (mucho espuma) añadir una dosis más de 10 ml de agua oxigenada hasta que no se forme espuma.

- 6) Después de la última adición de agua oxigenada, continuar calentando para eliminar el posible exceso de agua oxigenada. Se recomienda un tiempo mínimo de 45 minutos.
- 7) Pasar el suelo a un recipiente de aluminio, usando agua destilada si es necesario.
- 8) Introducir el recipiente a la estufa para secar a 105°C hasta tener peso constante.
- 9) Vaciar la muestra en un mortero, moler y tamizar a través de una malla de 2 mm.

Determinación de la textura

- 1) Pesar 5 g de suelo seco, sin materia orgánica, molerlo y posteriormente tamizarlo a través de una malla de < 2 mm.
- 2) Colocar la muestra en una botella de 250 ml.
- 3) Agregar a la botella con suelo 10 ml del dispersante hexametáfosfato de sodio.
- 4) Llevar a aproximadamente 50 ml con agua destilada.
- 5) Agitar la botella con suelo, agua y dispersante por 5 minutos, y dejar reposar por 12 horas.
- 6) Después del periodo del reposo agitar la suspensión por 30 minutos con un agitador eléctrico.
- 7) Pasar la suspensión por el tamiz de 300 mallas, recogiendo el filtrado en cápsulas de porcelana. Usar la menor cantidad de agua para separar la arena que quedará en el tamiz; la arcilla y el limo quedarán en la suspensión.
- 8) Pasar el filtrado a la botella de 250 ml y agregar agua destilada hasta que se tenga un volumen de 200 ml.
- 9) Agitar la suspensión durante 2 minutos y dejar reposar por 1 hora 21 minutos 40 segundos, después se toma una alícuota de 25 ml a la profundidad de 2 cm.
- 10) Colocar la alícuota de 25 ml en un bote de aluminio previamente pesado y secar en estufa a 105°C hasta peso constante. Poner la muestra a enfriar en el desecador y pesar.
- 11) Las arenas retenidas en el tamiz de 300 mallas pasarlas a un recipiente de aluminio previamente pesado y poner a secar en la estufa a 105°C hasta peso constante.

Cálculos

$$\% \text{ de arena} = (B/A) \times 100.$$

Donde:

A = peso de la muestra.

B = peso de arenas.

$$\% \text{ de arcilla} = (E / A) \times 100.$$

C = peso de arcilla + limo = (A - B).

$$\% \text{ de limo} = (F / A) \times 100.$$

D = peso del suelo en la alicuota (partículas < 0.002 mm).

E = peso de arcilla = D x 8.

F = peso del limo = A - B - E.

Con los porcentajes de arena, limo y arcilla y mediante el uso del triángulo de textura (figura 4.1) se determina la textura del suelo.

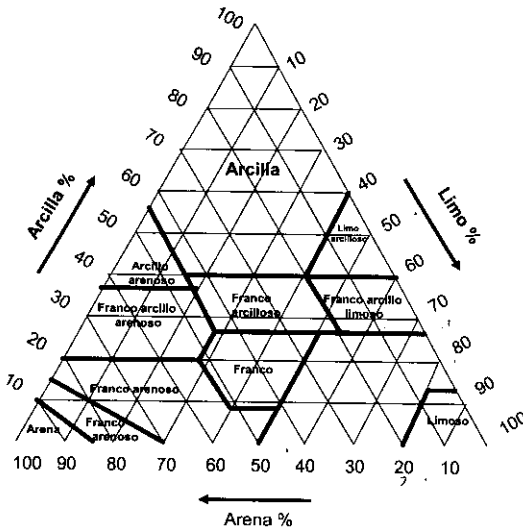


Figura 4.1 Triángulo de textura del sistema de clasificación de la USDA.

4.14 Determinación de la capacidad de intercambio catiónico y bases intercambiables

Introducción

Todas las moléculas, en mayor o menor medida, tienen minúsculas cargas eléctricas, positivas y/o negativas. Por ello, en el suelo actúan como pequeños imanes, formando entre ellas estructuras que pueden ser muy simples, como la atracción entre una partícula de arcilla cargada negativamente y una partícula de un fertilizante cargada positivamente; o muy complejas, como cuando hay la materia orgánica, con infinidad de cargas eléctricas de ambos signos.

La CIC o capacidad de intercambio catiónico es la capacidad del suelo para retener e intercambiar diferentes elementos minerales. Esta capacidad aumenta notablemente con la presencia de materia orgánica, y podría decirse que es la base de lo que llamamos fertilidad del suelo.

Catión, ión cargado positivamente (NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Na^+ , H^+ , Al^{3+}) o anión, ión cargado negativamente (NO_3^- , PO_4^{2-} , SO_4^{2-} , etc...).

La CIC depende de la textura del suelo y del contenido de materia orgánica. En general, entre más arcilla y materia orgánica en el suelo, la capacidad de intercambio es mayor. El contenido de arcilla es importante, debido a que estas pequeñas partículas tienen una relación alta de área superficial a volumen. Los diferentes tipos de arcillas presentan diferentes valores de la CIC. Las esmectitas tienen una mayor capacidad de intercambio catiónico (80-100 miliequivalentes 100 g^{-1}), seguida por ilitas (15-40 meq 100 g^{-1}) y caolinitas (3-15 meq 100 g^{-1}).

Algunos ejemplos de valores de capacidad de intercambio catiónico para diferentes texturas de suelo se mencionan a continuación:

Textura de suelo	CIC (meq/100 g suelo)
Arenas (color claro)	3 - 5
Arenas (color oscuro)	10 - 20
Franco	10 - 15
Franco limoso	15 - 25
Arcilla y franco arcilloso	20 - 50
Suelos orgánicos	50 - 100

En general, en la mayoría de los suelos la CIC aumenta cuando se presentan incrementos en el pH.

Método

Determinación de la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y bases intercambiables (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+) de los suelos, empleando acetato de amonio.

Principio y aplicación

El método para la determinación consiste en la saturación de la superficie de intercambio con un catión índice, el ión amonio; lavado del exceso de saturante con alcohol; desplazamiento del catión índice con potasio y determinación del amonio mediante destilación. El amonio se emplea como catión índice debido a su fácil determinación, poca presencia en los suelos y porque no precipita al entrar en contacto con el suelo. La concentración normal que se usa asegura una completa saturación de la superficie de intercambio, y como está amortiguada a pH 7.0, se logra mantener un cierto valor de pH. El lavado con alcohol pretende desplazar el exceso de saturante y minimizar la pérdida del amonio adsorbido.

Material y equipo

- ♦ Tubos de centrífuga de 50 ml con fondo redondo.
- ♦ Agitador mecánico.
- ♦ Centrífuga con capacidad para 8 o 16 tubos.
- ♦ Matraces volumétricos de 100 ml.
- ♦ Matraces Erlenmeyer de 125 ml.
- ♦ Aparato de destilación.

Soluciones

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra cosa. Cuando se hable de agua se debe entender agua desionizada o destilada. Las soluciones para este análisis deben almacenarse en recipientes de polietileno.

- 1) Solución de acetato de amonio 1.0 N, pH 7.0. Diluir 57 ml de ácido acético glacial (99.5%) con agua a un volumen de aproximadamente 500 ml. Agregar 60 ml de hidróxido de amonio concentrado, diluir con agua a un volumen de 990 ml, mezclar, ajustar a pH 7.0 y diluir a un volumen final de 1 L con agua.
Una alternativa consiste en pesar y disolver 77 g de acetato de amonio ($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$) en 900 ml de agua y de ser necesario ajustar a pH 7.0 y entonces completar a 1 L con agua.
- 2) Alcohol etílico grado industrial.
- 3) Solución de cloruro de sodio al 10%. Pesar 100 g de cloruro de sodio grado analítico y disolver en 1 L de agua, empleando un matraz aforado.
- 4) Solución de cloruro de amonio 1N. Pesar 53.50 g de NH_4Cl y disolver en agua. Ajustar a pH 7.0 con hidróxido de amonio y diluir a 1 L empleando un matraz aforado.
- 5) Solución de cloruro de amonio 0.25N. Pesar 13.38 g de NH_4Cl y disolver en agua. Ajustar a pH 7.0 con hidróxido de amonio y diluir a 1 L empleando un matraz aforado.
- 6) Indicador mixto. Mezclar volúmenes iguales de rojo de metilo al 0.66% y de verde de bromocresol al 0.99%. Ambos disueltos en etanol al 95%.
- 7) Solución de ácido bórico. Usar H_3BO_3 al 2% en agua destilada que contenga 10 ml del indicador por litro.
- 8) Acido clorhídrico 0.01 N, valorado.
- 9) Hidróxido de sodio al 40%. Disolver 400 g de NaOH en agua destilada y llevar a 1 000 ml.
- 10) Nitrato de plata 0.1 N. Disolver 16.98 g de AgNO_3 en agua destilada y llevar a 1 000 ml.
- 11) Solución de lantano acidificada. Pesar 7.742 g de $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en un matraz volumétrico de 250 ml con agua destilada añadir 17.5 ml de HNO_3 concentrado y aforar.
- 12) Solución diluida de lantano acidificada. Tomar 50 ml de la solución de lantano acidificada en un matraz volumétrico de 500 ml y aforar con agua destilada.

- 13) Solución de cloruro de cesio acidificada. Disolver 11.12 g de CsCl y 250 ml de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ en 500 ml de agua en un matraz volumétrico de 1 000 ml, añadir 20 ml de HNO_3 2 M y aforar con agua.
- 14) Solución de ácido nítrico 2 M. Diluir 7 ml de HNO_3 concentrado en agua, aforar a 100 ml en un matraz volumétrico.

Procedimiento

- 1) Pesar 5 g de suelo secado al aire y tamizado por malla de abertura de 2 mm y transferirlo a un tubo de centrifuga de 50 ml. Agregar 33 ml de solución de acetato de amonio. Tapar y agitar en posición horizontal durante 10 minutos. Luego, centrifugar hasta que el líquido sobrenadante esté claro. Esto se logra fácilmente centrifugando a 2 500 rpm. Decantar el líquido en un matraz de 100 ml y repetir la extracción otras dos veces; aforar con acetato de amonio y guardarlo para la posterior determinación de las bases intercambiables (solución A).
- 2) Agregar 30 ml de la solución de cloruro de amonio 1 N; agitar durante 10 minutos y luego centrifugar hasta que el líquido sobrenadante esté claro y desecharlo. Adicionar 30 ml de la solución de cloruro de amonio 0.25 N, agitar durante 10 minutos, centrifugar y desechar el sobrenadante. Lavar la muestra con porciones de alcohol de 30 ml agitando durante 10 minutos, centrifugar y eliminar el sobrenadante cada vez. El lavado termina cuando la prueba de cloruros en el decantado es negativa.
- 3) Prueba de cloruros. Pipetear 10 ml del sobrenadante alcohólico en un tubo de ensaye y agregar 4 o 5 gotas de nitrato de plata, si se observa un ligero precipitado blanco, la reacción es positiva y se debe continuar el lavado hasta que la prueba de cloruros sea negativa.
- 4) Reemplazar el amonio adsorbido con tres porciones de 33 ml de cloruro de sodio al 10%, agitando durante 10 minutos y centrifugando cada vez. Decantar cada reemplazo en un matraz volumétrico de 100 ml y completar al volumen. Determinar el amonio a partir de una alícuota de 10 ml, la cual se transfiere a un matraz Kjeldahl de 300 ml, se le agregan aproximadamente 8 ml de NaOH al 40% y se conecta al aparato de destilación microkjeldahl. Recoger el producto de la destilación en un matraz Erlenmeyer que contenga 10 ml de mezcla de indicador y ácido bórico. Determinar por titulación con HCl 0.01N.

Cálculos

La capacidad de intercambio catiónico expresado en $\text{cmol}(+) \text{kg}^{-1}$ de suelo (CIC) se calculará de la forma siguiente:

$$\text{CIC} = (F) (V) (N).$$

En donde:

V = volumen (ml) de HCl empleado al titular lo destilado en la solución borada.

N = normalidad del HCl; y

$$F = \frac{100}{\text{Alicuota}} \times \frac{100}{\text{Peso del suelo}}$$

Si la alícuota = 10 ml y peso de suelo = 5 g, entonces $F = 200$.

Determinación de Ca y Mg intercambiables

- 1) Pipetear 0.5 ml de la solución A en un tubo de ensaye.
- 2) Añadir 9.5 ml de la solución diluida de lantano y mezclar.
- 3) Medir la concentración de Ca y Mg en las series estándar, el blanco y la muestra por espectrofotometría de absorción atómica a una longitud de onda de 422.7 y 285.2 nm, respectivamente, usando una flama de aire-acetileno.

Cálculos

$$\text{Na}(\text{cmol}(+) \text{kg}^{-1}) = (a-b) \times \frac{30}{100} \times 10 \times \frac{1000}{10w} \times \frac{1}{2} = 1.304 \times \frac{a-b}{w}$$

$$\text{Mg}(\text{cmol}(+) \text{kg}^{-1}) = (a-b) \times \frac{100}{100} \times 20 \times \frac{1000}{10w} \times \frac{2}{24.32} = 16.447 \times \frac{a-b}{w}$$

Donde:

a = concentración de Ca o Mg medida en la muestra (mg L^{-1}).

b = concentración de Ca o Mg medida en el blanco (mg L^{-1}).

w = peso del suelo seco (g).

Determinación de Na y K intercambiables

- 1) Pipetear 1.0 ml de la solución A en un tubo de ensaye.
- 2) Añadir 1.0 ml de la solución de cloruro de cesio acidificada.
- 3) Añadir 8 ml de agua y mezclar.
- 4) Medir la concentración de Na y K en las muestras, el blanco y las series estándar por espectrofotometría de emisión de flama.

Cálculos

$$\text{Na (cmol(+) kg}^{-1}\text{)} = (a-b) \times \frac{30}{1\,000} \times 10 \times \frac{1\,000}{10w} \times \frac{1}{23} = 1.304 \frac{a-b}{w}$$

$$\text{K (cmol(+) kg}^{-1}\text{)} = (a-b) \times \frac{3}{1\,000} \times 10 \times \frac{1\,000}{10w} \times \frac{1}{39.1} = 0.767 \times \frac{a-b}{w}$$

Donde:

a = concentración de Na o K medida en la muestra (mg L⁻¹).

b = concentración de Na o K medida en el blanco (mg L⁻¹).

w = peso del suelo seco (g).

Comentarios

La CIC no deberá expresarse como meq/100 g, ya que las unidades aceptadas por el Sistema Internacional (SI) son cmol(+) kg⁻¹, pero para que los valores de la CIC sean familiares se dividirán entre 100. Por lo tanto, la CIC es expresada como cmol (+) kg⁻¹. El signo (+) es añadido para indicar que la CIC deberá ser expresada como moles de cationes monovalentes; por lo tanto, los iones divalentes cuentan el doble.

Interpretación de resultados de la capacidad de intercambio catiónico (CIC)

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) es una propiedad química a partir de la cual es posible inferir acerca del tipo de arcilla presente, de la magnitud de la reserva nutricional y del grado de intemperismo de los suelos. El resultado numérico de la determinación sirve además como base en el cálculo del porcentaje de saturación de bases, que es un dato ampliamente usado en los estudios de fertilidad. Para poder inferir sobre los

minerales arcillosos presentes en los suelos hay que considerar la medición hecha por Grim (1953) en los silicatos laminares del tipo 1:1 y 2:1, empleando acetato de amonio 1 N, pH 7.0.

Con respecto al grado de intemperismo, se considera que un valor de CIC inferior que $10 \text{ cmol (+) kg}^{-1}$ de suelo en un horizonte B con más de 30 a 40% de arcilla indica tanto la ausencia de minerales primarios intemperizables, como la acumulación de minerales secundarios del grupo caolinítico y óxidos libres. Por lo que respecta a la reserva nutricional se considera que ésta es abundante cuando la CIC es mayor que $25 \text{ cmol (+) kg}^{-1}$ de suelo. La fertilidad de los suelos se puede clasificar de acuerdo con los resultados analíticos obtenidos con métodos apropiados tanto en suelos ácidos como alcalinos (tabla 4.17).

Tabla 4.17 Clasificación de la fertilidad de suelos de acuerdo a la CIC.

Clase	CIC (cmol(+) kg ⁻¹)
Muy alta	> 40
Alta	25 - 40
Media	15 - 25
Baja	5 - 15
Muy baja	> 5

Los niveles de calcio, magnesio y potasio (Ca, Mg y K) obtenidos de los análisis de las bases intercambiables pueden interpretarse como se indica en la tabla 4.18.

Tabla 4.18 Clasificación de los niveles de calcio, magnesio y potasio.

Clase	cmol (+) kg ⁻¹		
	Ca	Mg	K
Muy baja	< 2	< 0.5	< 0.2
Baja	2 - 5	0.5 - 1.3	0.2 - 0.3
Media	5 - 10	1.3 - 3.0	0.3 - 0.6
Alta	> 10	> 3.0	> 0.6

4.15 Determinación de la capacidad de intercambio catiónico en suelos ácidos y calcáreos y bases intercambiables

Método

La determinación de la capacidad de intercambio catiónico en suelos ácidos y calcáreos y bases intercambiables se realizará a través del método AS-13, con tiourea de plata.

Principio y aplicación

Método para determinar la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y bases intercambiables (Ca, Mg, Na y K) de los suelos ácidos y calcáreos, empleando tiourea de plata (Ag TU) 0.01 M como solución saturante. El procedimiento consiste en equilibrar una muestra de suelos con una solución de Ag TU 0.01M. La afinidad de este reactivo por las cargas negativas de las partículas del suelo permite una completa saturación, aun cuando el suelo contenga relativamente altas concentraciones de otras sales. Esto requiere de una sola etapa, o sea la extracción y centrifugación para que el intercambio sea completo. Por lo tanto, el sobrenadante contendrá todos los cationes intercambiables.

Material y equipo

- ♦ Material común de laboratorio.
- ♦ Tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml de capacidad con tapón de rosca.
- ♦ Agitador mecánico de agitación recíproca.
- ♦ Centrifuga.
- ♦ Espectrofotómetro de absorción atómica.

Soluciones

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico cuando se hable de agua se debe entender agua desionizada o destilada. Las soluciones para este análisis deben almacenarse en recipientes de polietileno.

- 1) Solución de nitrato de plata 0.04M. Disolver 3.4 g de AgNO_3 en 500 ml de agua.
- 2) Solución de tiourea de plata 0.01M. Disolver 15.0 g de tiourea en un litro de agua y filtrar a través de papel Whatman 42 o su equivalente,

- recibiendo el filtrado de un frasco volumétrico de 2 000 ml. Agregar mientras mezcla la solución de nitrato de plata 0.04 M y aforar con agua. Almacenar en la oscuridad.
- 3) Solución de tiourea 0.1 M. Disolver 7.5 g de tiourea en un litro de agua y filtrar a través de papel Whatman 42 o su equivalente.
 - 4) Solución estándar de Ag de 500 mg L⁻¹. Disolver 0.3937 g de AgNO₃ en agua en un matraz volumétrico de 500 ml y aforar el volumen con agua. Almacenar en la oscuridad.
 - 5) Solución estándar diluida de Ag de 100 mg L⁻¹. Pipetear 20 ml de la solución estándar en un matraz volumétrico de 100 ml y diluir al volumen con agua. Almacenar en condiciones de oscuridad.
 - 6) Solución de ácido nítrico 1 M. Diluir 70 ml de HNO₃ concentrado en agua aforando a 1 000 ml en un matraz volumétrico.
 - 7) Series estándar. Pipetear en matraces volumétricos de 100 ml: 0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 ml, respectivamente, de la solución diluida estándar y agregar 0.5 ml de la solución de tiourea 0.1 M; adicionar 10 ml de la solución de HNO₃ 1 M a cada uno, y aforar el volumen con agua. La concentración de Ag en esta serie estándar es de 0, 2, 4, 6, 8 mg L⁻¹.
 - 8) Solución de lantano acidificada. Pesar 7.742 g de La(NO₃)₃ 6H₂O en un matraz volumétrico de 250 ml, añadir agua y 17.5 ml de HNO₃ concentrado, aforar con agua.
 - 9) Solución estándar de 1 000 mg L⁻¹ de Ca. Pesar 2.5 g de CaCO₃ en un vaso de precipitado de 250 ml, añadir aproximadamente 100 ml de agua y 12.5 ml de HCl 4 M; hervir para eliminar el CO₂ (si permanecen partículas de CaCO₃ añadir 2 ml más de HCl 4 M). Enfriar y transferir la solución a un matraz volumétrico de un litro y aforar con agua.
 - 10) Solución estándar de 100 mg L⁻¹ de Mg. Pesar 1.013 g de MgSO₄ 7H₂O en un matraz volumétrico de un litro y aforar con agua.
 - 11) Solución estándar mezclada, 100 mg L⁻¹ de Ca y 10 mg L⁻¹ de Mg tomar 10 ml de la solución estándar de 1 000 mg L⁻¹ de Ca y 10 ml de la solución estándar de 100 mg L⁻¹ de Mg en un matraz volumétrico de 100 ml y aforar con agua.
 - 12) Solución diluida de lantano acidificada. Tomar 50 ml de la solución de lantano acidificada en un matraz volumétrico de 500 ml y aforar con agua.
 - 13) Series estándar. Pipetear 0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 ml, respectivamente, de la solución estándar mezclada en seis matraces volumétricos de 100 ml; agregar 5.0 ml de tiourea 0.1 M y 9.5 ml de la solución diluida de lantano y aforar. La concentración de las series estándar es de 0, 0.1, 0.2,

- 0.3, 0.4 y 0.5 mg L⁻¹ de Mg y 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mg L⁻¹ de Ca y Mg.
- 14) Solución de cloruro de cesio acidificada. Disolver 11.12 g de CsCl y 250 g de Al(NO₃)₃ 9H₂O en aproximadamente 500 ml de agua en un matraz volumétrico de 1 000 ml, añadir 20 ml de HNO₃ 2M y aforar con agua.
 - 15) Solución de ácido nítrico 2 M. Diluir 7 ml de HNO₃ concentrado en agua aforando a 100 ml en un matraz volumétrico.
 - 16) Solución estándar de potasio de 1 000 mg L⁻¹ y de sodio de 400 mg L⁻¹. Disolver 1.9068 g de KCl y 1.0168 g NaCl en agua en un matraz volumétrico de 1 000 ml y aforar con agua.
 - 17) Solución estándar diluida de potasio de 100 mg L⁻¹ y de sodio de 40 mg L⁻¹. Pipetear 25 ml de la solución estándar en un matraz volumétrico de 250 ml, aforar con agua.
 - 18) Serie estándar de Na y K. Pipetear 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 ml de la solución estándar diluida en seis matraces volumétricos de 100 ml, respectivamente, añadir un poco de agua, 10 ml de tiourea 0.1 M y 9 ml de la solución de CsCl, y aforar con agua y mezclar. Esta serie estándar tiene concentraciones de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mg L⁻¹ de K y 0.04, 0.8, 1.2, 1.6 y 2 mg L⁻¹ de Na.

Procedimiento para determinar CIC

- 1) Pesar 1 g de muestra pasada por un tamiz de 0.5 mm de abertura.
- 2) Pasarlo a un tubo de centrifuga de polietileno de 50 ml.
- 3) Añadir 30 ml de la solución de tiourea de plata 0.01 M.
- 4) Preparar un blanco, es decir, a un tubo de centrifuga sin suelo, añadir 30 ml de la solución de tiourea de plata 0.01 M.
- 5) Tapar y agitar en posición horizontal durante cuatro horas.
- 6) Centrifugar a 2 500 rpm durante 10 minutos.
- 7) Filtrar a través de papel filtro No. 41 o equivalente (solución A).
- 8) Pipetear 0.5 ml de esta solución a matraces volumétricos de 100 ml, diluir aproximadamente a 50 ml con agua, añadir 10 ml de HNO₃ 1 M mezclar y aforar con agua.
- 9) Medir la concentración de Ag en las series estándar, la muestra y el blanco por espectrofotometría de absorción atómica a 328.1 nm de longitud de onda, usando una flama de aire-acetileno.

Cálculos

$$\text{CIC (cmol (+)kg}^{-1}\text{)} = (b-a) \times 200 \times \frac{30}{1\,000} \times \frac{1\,000}{10w} \times \frac{1}{107.87} = 5.562 \frac{b-a}{w}$$

Donde:

a = concentración de Ag medida en la muestra (mg L⁻¹).

b = concentración de Ag medida en el blanco (mg L⁻¹).

w = peso de suelo seco (g).

Determinación de Ca y Mg intercambiables

- 1) Pipetear 0.5 ml de la solución A en un tubo de ensaye.
- 2) Añadir 9.5 ml de la solución diluida de lantano y mezclar.
- 3) Medir por espectrofotometría de absorción atómica, la concentración de Ca y Mg en las series estándar, el blanco y la muestra a una longitud de onda de 422.7 y 285.2 nm, respectivamente, usando una flama de aire-acetileno.

Cálculos

$$\text{Ca (cmol (+) kg}^{-1}\text{)} = (a-b) \times \frac{30}{1\,000} \times 20 \times \frac{100}{10w} \times \frac{2}{40.08} = 2.994 \times \frac{a-b}{w}$$

$$\text{Mg (cmol (+) kg}^{-1}\text{)} = (a-b) \times \frac{3}{1\,000} \times 20 \times \frac{1\,000}{10w} \times \frac{2}{24.32} = 4.934 \times \frac{a-b}{w}$$

Donde:

a = concentración de Ca o Mg medida en la muestra (mg L⁻¹).

b = concentración de Ca o Mg medida en el blanco (mg L⁻¹).

w = peso del suelo seco (g).

Determinación de Na y K intercambiables

- 1) Pipetear 1.0 ml de la solución A en un tubo de ensaye.
- 2) Añadir 1.0 ml de la solución de cloruro de cesio acidificada.
- 3) Añadir 8 ml de agua y mezclar.
- 4) Medir por espectrofotometría de emisión de flama la concentración de Na y K en las muestras el blanco y las series estándar.

Cálculos

$$\text{Na (cmol (+) kg}^{-1}\text{)} = (a-b) \times \frac{100}{1000} \times 10 \times \frac{1000}{10w} \times \frac{1}{23} = 4.347 \times \frac{a-b}{w}$$

$$\text{K (cmol (+) kg}^{-1}\text{)} = (a-b) \times \frac{100}{1000} \times 10 \times \frac{1000}{10w} \times \frac{1}{39.1} = 2.557 \times \frac{a-b}{w}$$

Donde:

a = concentración de Na o K medida en la muestra (mg L⁻¹).

b = concentración de Na o K medida en el blanco (mg L⁻¹).

w = peso del suelo seco (g).

Comentarios

La CIC no deberá expresarse como meq/100 g, ya que las unidades preferidas por el SI son mol kg⁻¹, pero para que los valores de la CIC sean familiares se dividirá entre 100. Por lo tanto, la CIC es expresada como cmol kg⁻¹. El signo (+) es añadido para indicar que la CIC deberá ser expresada como moles de cationes monovalentes; por lo tanto, los iones divalentes cuentan el doble.

4.16 Determinación de la acidez y el aluminio intercambiables**Introducción**

El término pH define la relativa condición básica o ácida de una sustancia. La escala del pH cubre un rango de 0 a 14: Un valor de pH⁺ de 7.0 es neutro. Los valores por debajo de 7.0 son ácidos. Aquellos que están sobre 7.0 son básicos. Cuando un suelo se satura con H⁺ actúa como un ácido débil. Mientras mayor sea el H⁺ retenido por el complejo de intercambio, mayor será la acidez del suelo. El aluminio (Al) también actúa como un agente acidificante y activa el H⁺.

El pH del suelo mide la actividad de los iones H⁺ y se expresa en términos logarítmicos. El significado práctico de la expresión logarítmica del pH es que cada cambio de una unidad en pH representa un cambio de

una magnitud 10 veces mayor en la acidez o alcalinidad del suelo. Así, por ejemplo, un suelo con pH de 6.0 tiene 10 veces más actividad de iones H^+ que uno de pH 7.0. La necesidad de cal se incrementa rápidamente a medida que el pH del suelo se reduce.

En el pH del suelo tienen influencia varios factores, entre los que se incluyen: material de origen y profundidad del suelo, precipitación, inundación, vegetación natural, cultivos sembrados y fertilización nitrogenada.

En los suelos rojos tropicales los minerales arcillosos son estables hasta un pH tan bajo como 5.0. El Al y el Fe se encuentran atrapados dentro de las estructuras de las arcillas; se tornan tóxicos para la planta, solamente cuando la caolinita y los óxidos e hidróxidos se disuelven; es decir, cuando el pH llega a un rango entre 5.0 y 5.3, liberando Al a la solución del suelo. En estos casos la toxicidad del Al puede corregirse si se encala el suelo hasta llegar a un pH de 5.5 a 6.0, lo cual logra la precipitación del Al tóxico como hidróxido de aluminio $Al(OH)_3$, y causa al mismo tiempo un incremento apreciable en la CIC (suelos de carga variable).

La toxicidad del Al es probablemente el factor que más limita el crecimiento de las plantas en suelos fuertemente ácidos (pH menor que 5.5 en la mayoría de los suelos). El H^+ solamente es tóxico a un pH menor que 4.2.

Como se mencionó anteriormente, el pH del suelo es una expresión de la actividad del H^+ . La principal fuente de H^+ en la mayoría de los suelos de pH menor que 5.5 es la reacción de Al con el agua, como se demuestra en la siguiente ecuación:



Esta reacción libera H^+ (acidifica) y a su vez incrementa la cantidad de Al^{+3} listo para reaccionar nuevamente.

A medida que los iones básicos como Ca^{+2} , Mg^{+2} y K^+ son removidos por la absorción de las plantas o se pierden por lixiviación, pueden ser

reemplazados por Al^{3+} . Este proceso incrementa la actividad de H^+ y por lo tanto reduce el pH del suelo en forma constante.

El pH influye en la actividad microbiana del suelo. Las bacterias se desarrollan mejor en pH neutro y los hongos filamentosos en pH ácidos; así, la degradación de hidrocarburos es mejor en condiciones de pH neutro y alcalino que en pH ácidos (Maier *et al.*, 1999).

Método

Determinación de la acidez y el aluminio intercambiables por el procedimiento de cloruro de potasio.

Principio y aplicación

Metodología para la determinación de la acidez intercambiable por el método de Barnhisel y Bertsch que utiliza cloruro de potasio. Además de las bases (Ca, Mg, Na y K) también hay una cantidad de acidez que puede ser desplazada del complejo intercambiable del suelo. La cantidad de acidez está en función del pH y de la capacidad de intercambio catiónico del suelo. En la mayoría de los suelos la acidez está compuesta por el H^+ , el Al^{3+} y los ácidos orgánicos.

Material y equipo

- ♦ Material común de laboratorio.
- ♦ Tubos de polietileno para centrifuga (100 ml).
- ♦ Agitador mecánico de oscilatorio.
- ♦ Centrifuga.

Soluciones

1. Cloruro de potasio 1 M. Pesar 74.55 g de KCl en un matraz volumétrico de un litro, disolverlo y aforar con agua. Finalmente ajustar el pH a 7.0
2. Hidróxido de sodio 0.1 M. Pesar 4 g de NaOH y disolverlos en 1 L de agua (valorarlo con HCl 0.1 M de referencia certificado).
3. Ácido clorhídrico 0.1 M. (valorado).
4. Fenolftaleína a 0.5% (p/v) en etanol. Pesar 0.5 g de fenolftaleína en un matraz volumétrico de 100 ml, disolverlo con etanol y aforar.
5. Solución de fluoruro de potasio 1 M. Pesar 58.1 g de fluoruro de potasio en un matraz volumétrico de 1 L y aforar con agua.

Procedimiento

- 1) Pesar 5 g de suelo en un tubo de polietileno.
- 2) Adicionar 50 ml de la solución de KCl 1 M.
- 3) Tapar el tubo y agitar mecánicamente durante 30 minutos.
- 4) Destapar los tubos y centrifugar durante 10 minutos a 2 500 rpm.
- 5) Filtrar el sobrenadante a través de papel Whatman número 42 o su equivalente, recoger el filtrado en un vaso de precipitado de 100 ml.
- 6) Tomar una alícuota de 40 ml con una pipeta volumétrica, y transvasarla en un matraz Erlenmeyer de 125 ml.
- 7) Agregar cinco gotas de fenolftaleína a 0.5% y titular con hidróxido de sodio 0.1 M valorado, hasta un punto final de rosa permanente.
- 8) Titular un blanco (igual volumen que muestra, de cloruro de potasio 1 M) de la misma forma.
- 9) Después de registrar el gasto de NaOH, agregar 2 ml de fluoruro de potasio 1 M a la misma solución problema y titular con HCl 0.1 M valorado, hasta la desaparición del color rosa.
- 10) Después de 30 minutos agregar HCl 0.1 M valorado adicional, hasta un punto final claro.

Cálculos

El aluminio e hidrógeno extraídos son calculados como sigue:

$$\text{Acidez intercambiable (cmol (+) kg}^{-1}\text{)} = \frac{(a-b)}{s} (M \times 100)$$

Donde:

a = ml de NaOH gastados en la muestra.

b = ml de NaOH gastados en el blanco.

M = molaridad de la solución de NaOH.

s = peso de la muestra, en gramos.

$$\text{Acidez intercambiable (cmol (+) kg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{mL HCl} \times M \times 100}{\text{g de muestra}}$$

$$\text{Acidez de H}^+ \text{ (cmol (+) kg}^{-1}\text{)} = \text{acidez como KCl - Al intercambiable}$$

Donde:

M = muestra.

t = testigo.

M = molaridad.

Referencias

- APHA. 1995. Oxidation-reduction potential. Standard methods for the examination of water and wastewater, 19a Edition. American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation. Washington, D.C.
- ASTM D1498-00. 2000. Standard practice for oxidation-reduction potential of water.
- ASTM D6508. 2000. Standard Test Method for Determination of Dissolved Inorganic Anions in Aqueous Matrices Using Capillary Ion Electrophoresis and Chromate Electrolyte. Pennsylvania, USA.
- ASTM DS64. 1996. Cleanup Criteria for Contaminated Soil and Groundwater Pennsylvania, USA.
- Atteia O. and Franceschi M. 2002. Kinetics of natural attenuation of BTEX: review of the critical conditions and measurements at bore scale. *The Scientific World* [online computer file]. 2: 1338-1346.
- Baker K. H. and Herson D. S. 1994. Bioremediation. McGraw Hill Inc.
- Bates R. G. 1983. Determination of pH, Wiley, New York.
- Benada J. 1995. The measurement of redox potential in soil. *Ob. listy*. 3: 48-49. (en Checo).
- Bossert I. and Bartha R. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. In Atlas, R. M. (Eds). *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing Company. New York.
- Bray R. H. and Kurtz L. T. 1945. Determination of total, organic and available form of phosphorus in soil. *Soil Sci.* 59:360-361.
- Bremner J. M. 1965. Nitrogen availability indexes. In: C.A. Black *et al.* (ed.) *Methods of soil analysis*, Part 2. *Agronomy* 9:1324-1345. Am. Soc. of Agron Madison, Wis.
- Brook T., Stiver W., Zytner R. 2001. Biodegradation of diesel fuel in soil under various nitrogen addition regimes. *J Soil Contam.* 10(5): 539-553.
- Brown L. 1934. Oxidation reduction potentials in soil: I principles and electrometric determination. *Soil Sci.* 37: 65-76.
- Byong-Hun J., Dempsey B. A., Burgos W. D., Royer R. A. 2001. Reactions of ferrous iron with hematite. *Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 191:41-55.
- Etchevers J. D. 1988. *Análisis químico de suelos y plantas*. Centro de Edafología. Colegio de Posgraduados, Chapingo, Estado de México. 803p.
- Foster J. 1995. Soil nitrogen. En Alef, K. and Nannipieri, P. (Eds.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press.

- Gaudy A. F. y Gaudy E. T. 1981. *Microbiology for environmental scientists and engineers*. McGraw Hill, Tokyo.
- Graham D. W., Smith V. H., Law K. P., Clealand D. D. 1999. Effects of nitrogen and phosphorus supply on hexadecane biodegradation in soil systems. *Water Air Soil Pollut.* 111: 1 - 18.
- Grim E. R. 1953. *Clay Mineralogy*. McGraw-Hill, New York, 190 p.
- Hacher L. E., Kosson, D. S., Young, L. Y., Cowan, R. M. 2001. Measurement of Iron(III) bioavailability in pure iron oxide minerals and soils using anthraquinone-2,6-disulfonate oxidation. *Environ Sci Technol.* 35:4886-4893.
- ISO 11271. 2002. Soil quality - determination of redox potential. Field method.
- Karma A. 1993. Chemical properties of organic soils. In: *Soil sampling and methods of analysis*. Martin R. Carter Editor. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers. Pp. 459-471.
- Krol J., Benvenuti M., Roman J. 2000. Ion analysis methods for IC and CIA and practical aspects of capillary ion analysis. Waters Corporation.
- Kowalenko C. 1993. Extraction of available sulfur. En Carter (Ed.). *Soil Sampling and Methods of Soil Analysis*. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers.
- Leahy J. G., and Colwell R. R, 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev.* 54 (3): 305 - 315.
- León A.R. y A. Aguilar S. 1987. *Materia orgánica*. pp 85-91. En: Aguilar S.A., J.P. Etchevers B. y J.Z. Castellanos R. *Análisis químico para evaluar la fertilidad del suelo*. Publicación especial No. 1. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Chapingo, Estado de México. 217p.
- Lors C., Mossmann J-R., Barbe P., Laboudigue A. 2001. Investigation of PAHs intrinsic degradation in soils of former coke facility sites. Editor(s): Leeson, Andrea. *International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, 6th, San Diego, CA, United States, June 4-7, 2001* 2 129-136.
- Loser C., Seidel H., Zehnsdorf A., Stottmeister U. 1998. Microbial degradation of hydrocarbons in soil during aerobic/anaerobic changes and under purely aerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol.* 49(5): 631-636.
- Lovley R.D. and Phillips J.P.E. 1987. Rapid assay for microbially

- reducible ferric iron in aquatic sediments. *Appl Environ Microbiol.* 53(7):1536-1540.
- Maier R. M., Pepper I. L., Yerba Ch. P. 1999. *Environmental microbiology*. Academia Press. San Diego, California, USA. 585 p.
- Maynard C. and Kalra. 1993. Nitrate and exchangeable ammonium nitrogen. En Carter (Ed.). *Soil sampling and methods of soil analysis*. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers.
- Moreno D. R. 1978. Clasificación de pH del suelo, contenido de sales y nutrientes asimilables. INIA-SARH. México D.F.
- Muñoz I. D. J., Mendoza C. A., López G. F., Soler A. A., Hernández M. M. M. 2000 *Manual de análisis de suelo*. Edafología. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM, México.
- NRES 381. 2002. Soil pH and Eh measurement by electrode and a pH-meter. College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences.
- Patrick W., Gambrell R., Faulkner S. 1996. Redox measurements of soils en Sparks, D. *Methods of soil analysis, Parte 3: Chemical methods*. Soil Science Society of America, Madison, Wi.
- NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. *Diario Oficial*, 31 de diciembre de 2002.
- Salminen J. M., Tuomi P. M., Suortti A-M., Jorgensen K. S. 2004. Potential for aerobic and anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in Boreal Subsurface. *Biodegradation*. 15(1): 29-39.
- Sievers Instruments, Inc. *Manual de operación y mantenimiento del detector de quimioluminiscencia*. DLM 21000-02 Revisión A
- Smith V., Graham D., Cleland D. 1998. Application of resource-ratio theory to hydrocarbon biodegradation. *Env Sci Technol*. 32(21): 3386-3395.
- Tiehm A. and Schulze S. 2003. Intrinsic aromatic hydrocarbon biodegradation for groundwater remediation. *Oil & Gas Science and Technology*. 58(4): 449-462.
- Tiessen H. and Moir J. O. 1993. Total and organic carbon. In: *Soil sampling and methods of analysis*. Martin R. Carter Editor. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers. pp. 187-199.
- Topp G. C. 1993. Soil water content. In: *soil sampling and methods of analysis*. Martin R. Carter Editor. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers. Pp. 541-557.

- US EPA 4140. 1998. Inorganic anions by capillary ion electrophoresis. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th Edition.
- US EPA 6500. 1998. Dissolved inorganic anions in aqueous matrices by capillary ion electrophoresis. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods.
- US EPA 600/R-02/002. 2002. Workshop on monitoring oxidation-reduction processes for ground-water restoration.
- US EPA 9045D. 2004. Soil and Waste pH. SW- 846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. (Revisión 4).
- US GS. 1998. Reduction-oxidation potential (electrode method). En: National field manual for the collection of water-quality data. U.S. Geological Survey Techniques of Water-Resources Investigations. Book 9.
- Vázquez A. A. y Bautista N. 1993. Guía para interpretar el análisis químico de suelo y agua. Departamento de Suelos. Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- Walworth J. L. and Reynolds C. M. 1995. Bioremediation of a petroleum-contaminated cryic soil: effects of phosphorus, nitrogen, and temperature. *J Soil Contam.* 4(3): 299-310.
- Walworth J. L., Woolard C. R., Braddock J. F., Reynolds C. M. 1997. Enhancement and inhibition of soil petroleum biodegradation through the use of fertilizer nitrogen: an approach to determining optimum levels. *J Soil Contam.* 6 (5): 465-480.
- Willard H. H., Merrit L. L., Dean J. A. 1974. Instrumental methods of analysis. 5th edition Van Nostrand.
- Zausig J. 1995. Redox potential measurement. In Alef, K. and Nannipieri, P. (Eds.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry.* Academic Press.
- Zobell C. E. 1946. Studies on the redox potential of marine sediments. *Bull Amer Assoc Petrol Geol.* 30: 477-513.

5. Hidrocarburos del petróleo en suelo

Más de dos mil millones de toneladas métricas de petróleo son producidas por año en todo el mundo; una gran cantidad de los productos petrolíferos finales contaminan ambientes marinos y terrestres. Los grandes accidentes que se presentan en la industria del petróleo, como derrame de tanques, rupturas de tuberías y extracción de pozos, representan 10% de estas descargas, las cuales son más evidentes por la gran cantidad de hidrocarburos liberados en un sitio y tiempo determinado; sin embargo, el restante 90% es debido a descargas menores de las actividades industriales, que contaminan el suelo y son arrastradas por las aguas continentales.

En México existe un gran número de sitios contaminados, principalmente con hidrocarburos del petróleo. Este hecho ha generado, en los últimos años, interés de las instituciones gubernamentales y privadas por la legislación y remediación de estos sitios. El conocimiento del tipo de contaminación y su concentración es fundamental para establecer las condiciones del sitio, el riesgo que representa y la selección de posibles tecnologías de recuperación.

Los límites de limpieza para hidrocarburos en suelos y aguas dependerá de los criterios o normas vigentes en México. En marzo de 2005 se publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-SEMARNAT/SS-2003, que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. En éste, se establecen los límites en función de las fracciones ligera, media y pesada, así como del uso del suelo (tabla 5.1).

Tabla 5.1 Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo (NOM-SEMARNAT/SS-2003).

Fracción de hidrocarburos	Uso del suelo predominante ¹ (mg kg ⁻¹ base seca)		
	Agrícola ²	Residencial ³	Industrial
Ligera	200	200	500
Media	1,200	1,200	5,000
Pesada	3,000	3,000	6,000

¹ Para usos de suelos mixtos, deberá aplicarse la especificación al menor de los valores de usos de suelo involucrados.

² Incluye suelo forestal, recreativo y de conservación.

³ Incluye comercial.

Para la determinación de las diferentes fracciones de hidrocarburos se debe consultar la norma, donde se proporcionan las metodologías. Para la determinación tanto de los límites permisibles de hidrocarburos como de las metodologías, se recomienda estar actualizados con la legislación.

En este manual se presentan diferentes técnicas de extracción y cuantificación de hidrocarburos, que buscan optimizar los recursos y el tiempo de realización.

5.1 Preparación de muestras de suelo para extracción

Aunque el análisis de hidrocarburos puede hacerse con muestras húmedas, se recomienda secarlas y molerlas para obtener muestras más homogéneas. El secado de suelo para extracción se lleva a cabo de la siguiente forma.

Material

- Espátula.
- Mortero.
- Papel aluminio.
- Frascos de vidrio de 30 ml.

Procedimiento

- ♦ Poner a secar la muestra (8-15 g de suelo) extendida en un papel aluminio a 30°C, durante 48 horas, en un cuarto de temperatura controlada o a la sombra.
- ♦ Moler la muestra en un mortero hasta obtener partículas finas.
- ♦ Colocar la muestra seca en un frasco seco y limpio.

Nota: Aunque las muestras se ponen a secar, casi nunca se elimina completamente el agua, por lo que hay que determinar la humedad final de éstas, como se indica en la sección 4.2.

5.2 Extracción de hidrocarburos

Existen diferentes técnicas de extracción de hidrocarburos, en este manual se mencionan dos de las más comunes:

- ♦ Extracción por reflujo (Soxhlet).
- ♦ Extracción agitación-centrifugación.

5.2.1 Extracción por reflujo (Soxhlet)

Introducción

La extracción Soxhlet es una de las técnicas analíticas más ampliamente usadas; es un procedimiento para la extracción de compuestos orgánicos no volátiles y semivolátiles de sólidos, como suelos, lodos y residuos. Este método asegura el contacto íntimo de la matriz de la muestra con el solvente de extracción. La extracción de hidrocarburos del petróleo por Soxhlet provee fracciones de C6 a C50. Para la óptima extracción de los compuestos orgánicos, los sólidos deben estar en partículas pequeñas; mientras más pequeñas sean las partículas, más área de superficie y contacto y, por lo tanto, mejor extracción. Así, sólidos de mayor tamaño deben ser reducidos a pequeñas partículas antes de la extracción. El desarrollo del método de extracción Soxhlet incluye encontrar un solvente o mezclas de solventes que tengan una alta afinidad por los analitos y una baja afinidad por la matriz de la muestra sólida. El solvente debe tener una alta volatilidad porque debe ser removido al final de la extracción para concentrar el analito de interés (Weisman, 1998).

Método

Para extraer los hidrocarburos de suelos contaminados se utiliza el método de reflujo con equipo Soxhlet, tomando como referencia los métodos D5369-93 de la ASTM (2003) y 3540C y 3541 de la US EPA (1996, 1994).

Fundamento

Este método consiste en extraer los hidrocarburos contenidos en el suelo, mediante la acción de un solvente orgánico volátil apropiado, que es reflujo a través de la muestra varias veces durante un tiempo determinado. El solvente es evaporado y posteriormente condensado en un refrigerante, se le hace pasar por la muestra y se le regresa al origen para ser nuevamente evaporado. La muestra sólida es mezclada con sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua residual, se la coloca en un dedal o cartucho de papel o fibra de vidrio y se usa un solvente orgánico apropiado para su extracción en un equipo Soxhlet. Mediante los reflujos del solvente y la temperatura se permite el contacto íntimo de la muestra con el solvente de extracción, de esta manera se logra la liberación de los hidrocarburos presentes en la muestra. El extracto orgánico se concentra (si es necesario) o bien se evapora para realizar el intercambio de solvente, acorde con el método de cuantificación.

Interferencias

Los solventes, reactivos, material de cristalería y otros artículos utilizados en los procedimientos de preparación de la muestra pueden contener impurezas (como hidrocarburos residuales). Por lo que se requiere confirmar que estos materiales estén libres de interferencias, bajo las mismas condiciones de análisis, mediante la corrida de un blanco, utilizando reactivos puros. La limpieza rigurosa de los materiales por utilizar es necesaria y, en ocasiones, dependiendo del grado de pureza de solvente, es conveniente purificarlo por destilación.

Los plásticos en particular deben ser evitados porque los ftalatos que contienen son comúnmente usados como plastificantes y son fácilmente extraídos de estos materiales.

Los residuos de jabón (e.g. dodecil sulfato de sodio) pueden causar la degradación de ciertos analitos.

Material y equipo

- ♦ Equipo de reflujo Soxhlet de 250 ml.
- ♦ Perlas de ebullición.
- ♦ Cartuchos de celulosa o fibra de vidrio.
- ♦ Balanza analítica.
- ♦ Vaso de precipitados 250 ml.
- ♦ Viales.
- ♦ Espátula.

Reactivos

- ♦ Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).
- ♦ Diclorometano (cloruro de metileno, CH_2Cl_2) grado HPLC.

Procedimiento

- 1) Colocar de 5 a 10 g de suelo seco y finamente molido en un cartucho de celulosa o fibra de vidrio.
- 2) Adicionar sulfato de sodio anhidro en una relación suelo:sulfato 1:1 y mezclar.
- 3) Colocar cada cartucho conteniendo las muestras dentro de la camisa o columna extractora del equipo Soxhlet.
- 4) Adicionar 125 ± 5 ml de diclorometano en el matraz de bola y colocar suficientes perlas de ebullición para evitar la proyección del solvente al calentarse.
- 5) Ensamblar el equipo Soxhlet e iniciar calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 45°C .
- 6) Mantener el reflujo en estas condiciones durante 8 horas, de tal manera que se efectúen entre 6 y 8 reflujos por hora, lo que permitirá la liberación de los analitos.
- 7) Después de 8 horas, el extracto orgánico contendrá todos los hidrocarburos solubles en diclorometano. Pasar el matraz bola a un rotoevaporador y concentrar el extracto orgánico a sequedad.
- 8) Recuperar el concentrado en un vial de 40 ml con tapón de teflón para su cuantificación por alguno de los métodos reportados en la sección 5.4.

5.2.2 Extracción agitación-centrifugación

Introducción

Aunque la extracción con Soxhlet es una de las técnicas más utilizadas para la extracción de hidrocarburos por su eficiencia de extracción (mayor a 80%), el tiempo y número de muestras que se logran procesar son limitadas a la cantidad de equipos disponibles. Por esta razón, se han desarrollado otras técnicas que tienen como finalidad optimizar los tiempos de extracción y cantidad de solvente por utilizar, haciéndolas más económicas y rápidas, con la ventaja de poder procesar más muestras en menor tiempo; tal es el caso de la extracción agitación-centrifugación.

Método

La técnica para la extracción de los hidrocarburos del petróleo del suelo se basa en los métodos 3500B y 3540C de la US EPA (1996) y el reportado por Schwab *et al.* (1999), con algunas modificaciones (Arce *et al.*, 2004) en cuanto a la velocidad de agitación y volúmenes de solvente por utilizar.

Fundamentos

Este método se basa en la extracción de hidrocarburos no volátiles y semi-volátiles de muestras sólidas (suelo) a través del contacto íntimo de la muestra con el solvente, mediante la agitación en un matraz o tubo (lavado), produciendo un efecto de extracciones sucesivas, y separando posteriormente el solvente del suelo por centrifugación.

Interferencias

Son las mismas que para el método de extracción por Soxhlet. Aunque en el caso de los tubos de centrifuga de plástico que se utilizan en esta técnica hay que tomar en cuenta que no contengan ftalato en su formulación, los más apropiados son de polipropileno.

Material y equipo

- ♦ Tubos de centrifuga de plástico Corning o Falcon de 15 ml.
- ♦ Espátulas.
- ♦ Vórtex.
- ♦ Balanza analítica.
- ♦ Rotoevaporador.

- ♦ Pipetas de vidrio.
- ♦ Centrifuga.

Reactivos

Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).

Diclorometano (CH_2Cl_2) grado HPLC.

Procedimiento

- 1) Pesar una muestra de 0.5 a 2 g de suelo seco, previamente triturado en mortero, en un tubo para centrifuga de 15 ml y adicionar 3 g de Na_2SO_4 anhidro, mezclar con agitación en el vórtex hasta homogeneizar.

Nota: el sulfato de sodio anhidro debe secarse previamente en el horno por 4 horas a 120°C.

- 2) Adicionar 5 ml de diclorometano y volver a agitar en el vórtex durante 45 segundos, de tal manera que se incorpore bien el solvente con el suelo.
- 3) Centrifugar la muestra a 6 000 rpm durante 10 minutos. Retirar el sobrenadante y colocarlo en un vial, matraz bola o tubo de vidrio.
- 4) Lavar el suelo dos ocasiones más sobre el residuo sólido extraído, hasta obtener aproximadamente 15 ml de sobrenadante (extracto orgánico).
- 5) Evaporar el disolvente (diclorometano) del extracto orgánico en un rotoevaporador hasta concentrar a sequedad. El residuo obtenido contiene todos los hidrocarburos solubles en diclorometano.
- 6) Recuperar el concentrado en un vial de 40 ml con tapón de teflón para su cuantificación por alguno de los métodos reportados más adelante.

Nota: Los resultados obtenidos con este método fueron comparados con el método de extracción Soxhlet de acuerdo con el método D5369-93 del ASTM (1998 y 2003), y los métodos 3540C y 3541 de la US EPA (1996 y 1994), para su validación (ver Anexo).

5.3 Fraccionamiento de hidrocarburos

Introducción

Para caracterizar el tipo de hidrocarburos presentes en una mezcla de hidrocarburos proveniente de un suelo contaminado, se recomienda la separación de los diferentes componentes de acuerdo con su polaridad por cromatografía. Con esta metodología es posible separar las fracciones aromática, nitrogenada y azufrada en una muestra de petróleo.

Método

Esta metodología fue adaptada tomando como referencia los métodos 3600C, 3610B y 3611B de la US EPA (1996), así como lo reportado por Later *et al.* (1981), en los que se describen los procedimientos para llevar a cabo la separación de cada una de las fracciones componentes de un extracto de hidrocarburos. Los cambios fundamentales con respecto a estas metodologías consistieron en modificar el tipo de eluyente utilizado (específicamente se sustituyó benceno por tolueno) y los volúmenes de elución.

Fundamento

Esta técnica se basa en la separación de los componentes (fracciones) de un extracto orgánico rico en hidrocarburos del petróleo, proveniente de un suelo contaminado, de acuerdo con su polaridad, en una columna empacada con un material muy poroso y granular (alúmina) de pH neutro, separando las fracciones de compuestos alifáticos (1ª fracción), aromáticos (2ª fracción) y nitrogenados (3ª fracción) del petróleo, mediante la elución con diferentes solventes. Los hidrocarburos se adsorben diferencialmente en la alúmina, de acuerdo con la polaridad de los compuestos, y son eluidos (separados) de manera selectiva al pasar un disolvente con el cual los hidrocarburos tienen mayor afinidad. Un disolvente no polar logrará separar los compuestos menos adsorbidos en la alúmina.

Interferencias

La selectividad en la columna puede ser alterada debido a la formación indeseable de canales o agrietamientos que se producen por falta de disolvente o por un proceso de empacado deficiente. La selectividad también se ve afectada si se introduce agua en la columna.

La columna de alúmina tiene una capacidad máxima para adsorber los hidrocarburos, la cual no debe ser rebasada. Es aconsejable que se hagan pruebas preliminares, si se desea agregar más hidrocarburo del que se señala en esta técnica.

Los reactivos por utilizar deben ser de grado HPLC libres de impurezas, ya que si se desea analizar trazas o alguna de las fracciones que estén en baja concentración, puede haber contaminación en la separación.

Material y equipo

- ♦ Columna de vidrio (13 mm de diámetro X 24 cm longitud) con llave de teflón, tipo bureta.
- ♦ Probetas de 10 y 50 ml.
- ♦ Rotoevaporador.
- ♦ Lana de vidrio (previamente lavada con hexano).
- ♦ Matraces balón de 50 ml.
- ♦ Viales de 35 ml con tapón de teflón.

Reactivos

- ♦ Óxido de aluminio (alúmina) neutra y de actividad 1 (malla 60-325).
- ♦ Diclorometano (CH_2Cl_2) grado HPLC.
- ♦ Hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) grado HPLC.
- ♦ Tolueno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$) grado HPLC.
- ♦ Cloroformo (CHCl_3) grado HPLC.

Procedimiento

- 1) En un vial, colocar una muestra de 0.8 g de extracto de hidrocarburo (obtenido como se indica en la sección de extracción 5.2) proveniente del suelo contaminado y disolver en 0.5 ml de cloroformo.
- 2) A la mezcla anterior, adicionar 3 g de alúmina (óxido de aluminio) (malla 60-325), homogeneizar perfectamente hasta que la muestra se adsorba, colocar el vial en una campana de extracción y dejar evaporar el disolvente durante dos horas.
- 3) En una columna de vidrio (13 mm de diámetro X 24 cm longitud), en la parte inferior, colocar fibra de vidrio (de 0.5 a 1.0 cm^3), de tal forma que impida la pérdida del material de empaque y únicamente permita el flujo del líquido.
- 4) Adicionar 8 ml de hexano en la columna con la llave cerrada, antes de empacarla con 3 g de alúmina y los 3 g de la mezcla obtenida en el paso 2, haciendo un total de 6 g de material empacado. Con esto, se evitan espacios vacíos (grietas o canales) y se permite que se humedezca el empaque, de tal manera que sedimente perfectamente.

Nota: Una vez que se inicia el procedimiento de fraccionamiento, evitar que el empaque de la columna se seque, lo que ocasionaría fracturas en el soporte y una separación ineficiente.

- 5) Una vez sedimentada la alúmina con la muestra, adicionar 7 ml de hexano en la parte superior de la columna para iniciar la elución de la 1ª fracción (A1) que contiene los compuestos alifáticos. Abrir la llave de la columna recolectando en la probeta los primeros 10 ml eluidos, los cuales se depositan en un matraz de bola de 50 ml.
- 6) Después, adicionar en la columna 30 ml de tolueno, recuperando en la probeta de 50 ml los siguientes 28 ml, y verter en un matraz de bola de 50 ml marcado como A2 (2ª fracción), que contiene las fracciones azufrada y los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA).
- 7) La 3ª fracción (A3) se eluye adicionando 80 ml de cloroformo en la columna, recolectar el disolvente restante en un matraz marcado como A3, el cual contiene los compuestos nitrogenados.
- 8) Evaporar el disolvente en cada una de las fracciones recolectadas en un rotoevaporador.
- 9) Una vez que se tienen las fracciones separadas y concentradas a sequedad, se procede a su análisis por cromatografía de gases (ver sección 5.4.3) o por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (ver sección 5.5). Para la fracción azufrada se recomienda utilizar un cromatógrafo de quimioluminiscencia.

5.4 Cuantificación de hidrocarburos

Después de realizar la extracción y/o fraccionamiento de los hidrocarburos contenidos en una muestra de suelo, estos se pueden cuantificar por varios métodos, entre ellos:

Métodos gravimétricos:

- HTPs.
- Asfaltenos.

Métodos analíticos:

- Espectroscopia de infrarrojo.
- Cromatografía de gases.

5.4.1 Método gravimétrico para la cuantificación de hidrocarburos totales del petróleo

Introducción

La técnica de gravimetría mide el peso de los contaminantes totales extraídos con un solvente por medio de una balanza analítica. Ofrece una cuantificación gruesa que no requiere equipo sofisticado, es un procedimiento sencillo, barato y rápido. El contenido de hidrocarburos a bajas concentraciones no puede ser determinado con mucha precisión con este método, debido al error que se puede presentar con pesos muy pequeños; sin embargo, por arriba de 50 000 mg kg⁻¹ es recomendada. Este método no da información sobre el tipo de compuesto presente, o de la presencia o ausencia de compuestos tóxicos.

Método

Esta técnica es aplicable para cuantificar de una manera gruesa a los compuestos totales extraídos (HTPs y asfaltenos) contenidos en muestras de suelos contaminados por medio de un balance de pesos.

Fundamento

El método se basa en la cuantificación de los hidrocarburos que son extraídos dentro de un solvente adecuado. El solvente es evaporado y el extracto orgánico obtenido es pesado. Esta cuantificación es llamada HTPs y es reportada como porcentaje de la muestra total en peso seco. Este método es más adecuado para petróleos pesados que no se pierden en la etapa de evaporación.

Interferencias

Algunas veces, cuando se realiza un método gravimétrico, se requiere incluir etapas de limpieza con sílica gel, para remover material biogénico y evitar así interferencias.

Este método no es adecuado para mediciones de hidrocarburos ligeros que volatilizan a temperaturas por debajo de 70-85°C.

5.4.1.1 Hidrocarburos totales del petróleo (HTPs)

El método gravimétrico es recomendado para la medición de HTPs provenientes de muestras muy aceitosas, por ejemplo que contienen hidrocarburos pesados o para muestras acuosas cuando el hexano es preferido como solvente (US EPA 821-B94-004, 1995).

Material y equipo

- Matraces de bola de 250 ml.
- Rotoevaporador.
- Viales o tubos de vidrio de 25 ml.
- Balanza analítica.
- Pinzas.

Procedimiento

- 1) Poner a peso constante el recipiente donde se colocará el extracto orgánico obtenido (matraz de bola para la extracción, vial o tubo de vidrio) (ver sección 5.2). Colocar el recipiente en la estufa a 120°C durante 4 horas. Sacar este material y colocarlo en un desecador para que se enfríe. Pesar el recipiente, después colocarlo otra vez dentro de la estufa y volver a realizar el procedimiento hasta que el peso no cambie. Anotar el peso del recipiente (R_A).
- 2) Una vez que el extracto orgánico obtenido (ver sección 5.2) esté en un matraz de bola, tubo o vial de vidrio a peso constante, se procede a la evaporación total del solvente (diclorometano) en un rotoevaporador 740 ± 50 mbar y 45°C hasta sequedad.
- 3) Pesar nuevamente el matraz, vial o tubo con el extracto libre de solvente. Anotar el peso (R_B).

Cálculos

La diferencia en peso corresponde al contenido total de HTPs. Para hacer el cálculo de concentración de hidrocarburos totales del petróleo provenientes de la muestra, se debe considerar la cantidad de suelo que se pesó para la extracción, así como la humedad de la muestra. El resultado debe expresarse en mg de HTP/kg de suelo seco, y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{HTPs (mg kg}^{-1} \text{ de s.s.)} = (R_B - R_A) * (FC) / (P * FH).$$

Donde:

HTP's (mg kg⁻¹ de s.s.) = hidrocarburos totales del petróleo en mg/ kg de suelo seco.

R_A = peso (mg) del recipiente vacío a peso constante.

R_B = peso (mg) del recipiente con el extracto orgánico concentrado.

P = cantidad de suelo extraído (g).

FH = factor de corrección de humedad (1-(%humedad/100)).

FC = factor de corrección para transformar a kg de s.s. = 1 000.

5.4.1.2 Asfaltenos insolubles en hexano

Los asfaltenos son compuestos que forman parte de la mezcla de hidrocarburos contenidos en los suelos contaminados. Estos compuestos son una mezcla compleja de hidrocarburos de alto peso molecular (de 1 000 a 2 000 000 Da), contienen compuestos aromáticos condensados de más de 30 átomos de carbono, son hetero-aromáticos con presencia de azufre, como el benzotiofeno; y con nitrógeno, como el carbazol, contienen moléculas bi o polifuncionales de nitrógeno, aminas y amidas; y grupos con oxígeno (cetonas, fenoles y ácidos carboxílicos). También contienen metales como níquel y forman complejos de vanadio con átomos de nitrógeno. En la naturaleza los asfaltenos se forman como resultado de la oxidación de resinas naturales (Cervantes, 2001).

Método

Los asfaltenos pueden ser cuantificados en forma sencilla por el método gravimétrico, previa su precipitación con solventes orgánicos (ASTM D6560, 2000).

Fundamento

Este método se basa en la propiedad de los asfaltenos de ser insolubles en algunos solventes (hexano, por ejemplo), mientras que las otras fracciones de los hidrocarburos totales del petróleo no lo son, facilitando con esto la separación de estos compuestos. Los asfaltenos, por ser insolubles, precipitan formando un sólido negro que puede pesarse al eliminar el hexano con los hidrocarburos solubles en él.

Material y equipo

- ♦ Matraz de bola de 250 ml.

- Viales o tubos de vidrio de 25 ml.
- Pinzas para matraces de bola viales o tubos de vidrio.
- Balanza analítica.
- Pipeta de 10 ml.
- Jeringa de vidrio de 20 ml.
- Portamembrana de acero inoxidable.
- Filtros de fibra de vidrio GF/C Whatman.
- Sonicator.
- Rotoevaporador.

Reactivos

Hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) grado HPLC.

Procedimiento

- 1) Poner a peso constante el recipiente donde se colocará el extracto orgánico obtenido (matraz de bola para la extracción, vial o tubo de vidrio) (ver sección 5.2). Colocar el recipiente en la estufa a 120°C durante 4 horas. Sacar este material y colocarlo en un desecador para que se enfríe. Pesar el recipiente, después colocarlo otra vez dentro de la estufa y volver a realizar el procedimiento hasta que el peso no cambie. Anotar el peso del recipiente (R_A).
- 2) Una vez que el extracto orgánico obtenido (ver sección 5.2) esté en un matraz de bola, tubo o vial de vidrio a peso constante, se procede a la evaporación total del solvente (diclorometano) en un rotoevaporador hasta sequedad, y pesar.
- 3) La muestra extraída libre de solvente se debe resuspender con hexano: 60 ml para el método de extracción por reflujo (Soxhlet) o 5 ml para el método de extracción, agitación y centrifugación. Con este solvente precipitarán los asfaltenos insolubles en hexano (fracción pesada de los hidrocarburos).
- 4) Dejar reposar la muestra en hexano de 12 a 24 horas o bien colocarla en un sonicator de 15 a 30 minutos para acelerar la precipitación de asfaltenos (sólido negro).
- 5) Cuando los asfaltenos (insolubles en hexano) se observen en el fondo del vial o tubo, se procede a separar el precipitado mediante filtración; tomando el extracto orgánico con una jeringa y pasándolo a través de un filtro de fibra de vidrio a peso constante (F_{FV}), que se coloca en un portamembranas de acero inoxidable. Una vez que se hizo pasar el contenido

total del extracto, el filtro de fibra de vidrio se deja secar y se pesa (F_{FVS}) para la cuantificación de asfaltenos (A_F) retenidos en él.

6) Pesar el recipiente (matraz de bola, vial o tubo) donde estaba el extracto con hexano y asfaltenos (R_B).

Cálculos

La cantidad de asfaltenos se calcula mediante un balance de sólidos obtenidos tanto en el recipiente (A_R) como en el filtro de fibra de vidrio (A_F). Para hacer el cálculo de concentración de asfaltenos provenientes de la muestra se debe considerar la cantidad de suelo que se pesó para la extracción, así como la humedad de la muestra. El resultado se expresa en mg de asfaltenos/kg de suelo seco y se calcula de la siguiente manera:

$$A_F \text{ (mg)} = F_{BVS} - F_{FV}$$

Donde:

A_F (mg) = asfaltenos contenidos en el filtro de fibra de vidrio (mg).

F_{BVS} = peso (mg) del filtro de fibra de vidrio a peso constante.

F_{FV} = peso (mg) del filtro de fibra de vidrio seco por donde se pasa el extracto orgánico con hexano y asfaltenos.

$$A_R \text{ (mg)} = R_B - R_A$$

Donde:

A_R (mg) = asfaltenos contenidos en el recipiente (mg).

R_A = peso (mg) del recipiente vacío a peso constante.

R_B = peso (mg) del recipiente donde estaba el extracto orgánico con hexano y asfaltenos.

$$\text{Asfaltenos (mg kg}^{-1} \text{ de s.s.)} = (A_F + A_R) * (FC) / (P * FH).$$

Donde:

Asfaltenos (mg kg⁻¹ de s.s.) = Asfaltenos totales contenidos en la muestra en mg/ kg de suelo seco.

A_F = asfaltenos retenidos en el filtro de fibra de vidrio (mg).

A_R = asfaltenos contenidos en el recipiente (mg).

P = cantidad de suelo extraído (g).

FH = factor de corrección de humedad (1-(%humedad/100)).

FC = factor de corrección para transformar a kg de s.s. = 1 000.

5.4.2 Cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo por espectroscopia de infrarrojo (IR)

Introducción

El análisis cuantitativo de los hidrocarburos totales del petróleo (HTPs) por espectroscopia de infrarrojo es un método relativamente rápido para determinar la cantidad aproximada presente en el suelo. La principal ventaja de la espectroscopia IR para medir (cuantitativamente) HTPs es que es un método simple, rápido y barato. Este método presenta en ciertas ocasiones limitada exactitud y precisión, especialmente para muestras heterogéneas, ya que no da información referente a qué tipo de hidrocarburos hay en la muestra, ni a la presencia o ausencia de moléculas tóxicas (Weisman, 1998).

Método

La cuantificación de los hidrocarburos totales del petróleo se realiza utilizando el método 8440 de la US EPA (1996) por espectroscopia de infrarrojo.

Fundamento

El método de infrarrojo mide la vibración (estiramientos y doblamientos) que ocurre cuando una molécula absorbe energía (calor) en la región de infrarrojo del espectro electromagnético. Grupos funcionales y tipos de uniones tienen diferentes frecuencias de absorción e intensidades en el IR. Para el caso de los HTPs, mide la absorción producida por los cambios de vibración-rotación de los enlaces C-H de los hidrocarburos en un rango de longitud de onda de 3 200 a 2 700 cm^{-1} . La cuantificación se lleva a cabo comparando la absorción de la muestra contra una curva de calibración hecha con un petróleo de referencia.

El límite de detección de la técnica va de 10 a 600 mg kg^{-1} de HTPs, y en caso de tener extractos más concentrados se recomienda hacer las diluciones necesarias para obtener mediciones de absorbancia entre 0.1 y 0.8.

Interferencias

Los enlaces C-H provenientes de fuentes que no sean petróleo, como lípidos y ácidos grasos de la materia orgánica del suelo, pueden dar valores de HTPs mayores a los reales; por lo que en algunas ocasiones se

recomienda hacer un lavado de la muestra para eliminar todo el material biogénico.

Material y equipo

- Matraces aforados.
- Pipetas de vidrio.
- Espectrofotómetro de infrarrojo.
- Celdas de cuarzo para infrarrojo de 5 ml.
- Viales o tubos de vidrio.

Reactivos y soluciones

- 1) Tetracloroetileno (C_2Cl_4) grado espectrofotométrico o equivalente.
- 2) Reactivos para la curva de calibración:
 - N-hexadecano $C_{15}H_{32}$.
 - Iso-octano $(CH_3)_3CCH_2CH(CH_3)_2$.
 - Clorobenceno C_6H_5Cl o petróleo crudo extraído de las muestras por cuantificar.
- 3) Solución de referencia. La curva de calibración debe realizarse con una solución de referencia compuesta por n-hexadecano, iso-octano y clorobenceno de la siguiente manera: mezclar 15 ml de n-hexadecano, 15 ml de iso-octano y 10 ml de clorobenceno, medidos con precisión con una pipeta de vidrio.
- 4) Solución madre. Colocar 0.5 ml de la solución de referencia en un matraz aforado de 50 ml a peso constante, y pesar esta cantidad en una balanza analítica. Anotar este peso para obtener la concentración total de los estándares, aforar con tetracloroetileno hasta 50 ml. Esta mezcla es la solución madre que servirá para hacer las diluciones necesarias para la curva de calibración. Esta solución de hidrocarburos tendrá aproximadamente una concentración de 3 810 mg L⁻¹ de HTPs.

Procedimiento

- 1) El extracto orgánico obtenido en la sección 5.2 se resuspende en 5 ml de diclorometano. De esta solución se toma un volumen de muestra que dependerá de la concentración de hidrocarburos presentes en la misma. Se recomienda tomar entre 0.1 a 1 ml y colocarlos en un vial y evaporar a sequedad.
- 2) Una vez que se tiene el extracto sin solvente, adicionar un volumen

conocido de tetracloroetileno (4.9 a 4 ml) hasta alcanzar un volumen total de 5 ml.

Si es necesario, de esta solución hacer diluciones mayores para que el valor obtenido de absorbancia esté dentro de la curva de calibración (lecturas dentro del rango de absorbancia de 0.1 a 0.8).

- 3) Colocar la muestra en la celda de cuarzo, la cual se introduce al espectrofotómetro de infrarrojo. Antes de llevar a cabo la medición de las muestras debe correrse un testigo del solvente por utilizar (tetracloroetileno), para eliminar posibles interferencias.

Cuantificación

Hacer las mediciones en absorbancia. La cuantificación de hidrocarburos debe hacerse alrededor de la longitud de onda de 2 950 cm^{-1} . La huella característica de los HTPs en infrarrojo produce una huella digital de 3 picos en 2 956, 2 926 y 2 855 cm^{-1} (figura 5.2); sin embargo, para el cálculo de la concentración de HTPs únicamente se puede considerar el pico a 2 956 cm^{-1} .

Curva de calibración. Hacer varias diluciones con la solución madre para construir la curva de calibración como se muestra en la tabla 5.2.

Tabla 5.2 Diluciones para realizar curva patrón de HTPs (0-609.6 mg L^{-1})

No. solución	Volumen de la solución madre a tomar (ml)	Volumen de tetracloroetileno (ml)	HTP (mg l^{-1})
1	-	10	0
2	De (8) tomar 0.2 ml	9.8	10.16
3	De (8) tomar 1 ml	9.0	50.80
4	De (8) tomar 2 ml	8.0	101.60
5	De (7) tomar 5 ml	5.0	203.20
6	De (9) tomar 5 ml	5.0	304.80
7	De sol. stock tomar 1.6 ml	13.4	406.40
8	De sol stock tomar 2 ml	13.0	508.00
9	De sol stock tomar 2.4 ml	12.6	609.6

Nota: La curva de calibración también se puede realizar con petróleo crudo similar al de las muestras por cuantificar.

Cálculos

Para cuantificar los hidrocarburos totales del petróleo (HTPs) se debe extrapolar el valor de absorbancia obtenido para las muestras dentro de la curva de calibración, el valor está en mg L^{-1} y puede convertirse a mg kg^{-1} de suelo seco, considerando la cantidad de suelo extraído, así como la cantidad de disolvente que se utilizó para hacer una solución, y la cantidad de muestra que se tomó de esta solución, de la siguiente manera:

$$\text{HTPs (mg l}^{-1}\text{)} = (\text{Abs} - b) / m.$$

Donde:

HTPs (mg L^{-1}) = hidrocarburos totales del petróleo en mg L^{-1} .

Abs = absorbancia de la muestra a 2956 cm^{-1} .

b = ordenada al origen de la curva de calibración.

m = pendiente de la curva de calibración.

$$\text{HTPs (mg/ kg s.s.)} = \text{HTPs (mg L}^{-1}\text{)} * \text{VT} / \text{FC}_1 * [\text{VD} / \text{VE}] * [\text{FC}_2 / \text{P}].$$

Donde:

HTPs (mg kg^{-1} s.s.) = hidrocarburos totales del petróleo en mg kg^{-1} de suelo seco.

HTPs (mg L^{-1}) = hidrocarburos totales del petróleo en mg L^{-1} .

VD = volumen total del disolvente (diclorometano) donde se puso el concentrado de hidrocarburos.

VE = volumen tomado del VD y que se puso a evaporación.

VT = volumen de tetracloroetileno donde se disolvió la muestra evaporada.

FC_1 = factor de corrección para obtener los mg de HTP en $\text{VT} = 1000$.

P = peso en g de suelo seco extraído = $P_H * \text{FH}$.

FC_2 = factor de corrección para obtener los mg de HTP/ kg de suelo seco.

P_H = cantidad de suelo húmedo extraído.

FH = factor de corrección de humedad = $(1 - (\% \text{humedad} / 100))$.

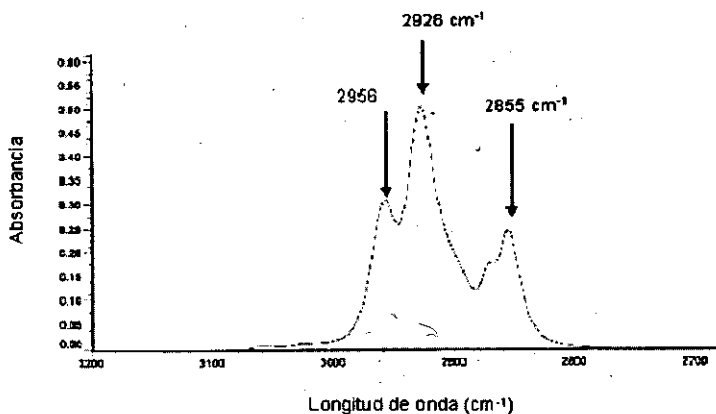


Figura 5.2 Espectro de infrarrojo típico de una muestra que contiene hidrocarburos totales del petróleo.

5.4.3 Cuantificación de hidrocarburos del petróleo por cromatografía de gases

Introducción

La cromatografía de gases (CG) es una técnica que permite observar el perfil de contaminación de una muestra, y es capaz de diferenciar aquellos compuestos que provienen de la materia orgánica del suelo o bien productos metabólicos generados durante un tratamiento. Para los métodos basados en CG, los HTPs son definidos como cualquier compuesto extraíble mediante un solvente o gas de purga, y detectado por cromatografía de gases/detector de ionización de flama (CG/FID) con un rango específico de carbonos. La principal ventaja de este tipo de método es que provee información acerca del tipo de petróleo en la muestra, además de su cuantificación, aunque la identificación del tipo de producto no es siempre sencilla (Weisman, 1998).

Método

Para la cuantificación de los hidrocarburos presentes en el extracto orgánico libre de asfaltenos se tomó como referencia los métodos 8015B y 8440

de la US EPA (1996) utilizando cromatografía de gases con detector de ionización flama (CG/FID).

Fundamento

En la CG una muestra es separada dentro de sus componentes individuales cuando viaja a través de una columna. Para lograr la separación de hidrocarburos no volátiles y no polares por CG, los compuestos por analizar deben estar en fase de vapor (lo cual se logra al introducir la muestra en el inyector, alcanzando la temperatura de ebullición de estos compuestos). La separación se lleva a cabo por una combinación de factores, incluyendo punto de ebullición, polaridad y diferencias de afinidad entre los diferentes componentes de la muestra y la columna, y mediante el uso de un gas acarreador inerte (He o N₂). El tiempo que un compuesto pasa sobre una columna específica es llamado tiempo de retención, y es reproducible y característico de un compuesto bajo parámetros experimentales establecidos y una columna específica. A medida que los componentes separados fluyen a través de la columna pueden ser detectados. La señal del detector es proporcional a la cantidad del compuesto presente. En la CG/FID, los compuestos son detectados con un detector de ionización de flama, el cual responde virtualmente a todos los compuestos que pueden quemarse. La suma de todas las respuestas con un rango específico es igual a la concentración de hidrocarburos por referencia de estándares de concentración conocida.

Este método establece las condiciones para analizar mezclas de hidrocarburos de C₁₀ a C₂₄ y los 16 HPAs, señalados por la EPA en concentraciones de 10 hasta 200 mg L⁻¹ para cada uno de los compuestos.

Nota: Las muestras que no están libres de asfaltenos provocan que la columna capilar se sature de estos compuestos que son difíciles de desorber, debido a su alto peso molecular y a su alto punto de ebullición, acortando la vida útil de la columna.

Las muestras deben estar libres de disolventes polares, que podrían acortar la vida útil de la columna y eluir la fase de la columna. Asimismo, el detector debe estar libre de residuos que puedan alterar el nivel de la línea base.

Este método no puede detectar cuantitativamente compuestos debajo de C6, porque son altamente volátiles y puede ocurrir interferencia con el pico del solvente. De la gasolina fresca, 25% puede estar por debajo de C6.

Este método también puede tener problemas de cuantificación de hidrocarburos polares que contengan moléculas de nitrógeno, oxígeno y sulfuro. Algunos hidrocarburos polares son reactivos al pasar a través de un cromatógrafo de gases, además no alcanzan el detector para su medición.

Las gasolinas oxigenadas son algunas veces analizadas por CG. La eficiencia de los métodos de purga es más bajo para los oxigenados tales como éteres y alcoholes.

Material y equipo

- ♦ Cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama CG/FID.
- ♦ Columna capilar DB-1.
- ♦ Viales de 40 ml con tapa de teflón.
- ♦ Pipetas Pasteur.
- ♦ Viales especiales para el cromatógrafo con tapa de teflón.
- ♦ Jeringa de 10 μ L.
- ♦ Pipeta de vidrio 5 ml.
- ♦ Engargoladora de viales.

Reactivos

- ♦ Hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) grado HPLC.

Procedimiento

A. Preparación de la muestra.

- 1) Para la determinación de hidrocarburos en un suelo contaminado, se obtiene el extracto orgánico mediante los métodos de extracción señalados en la sección 5.2. El extracto obtenido se lleva hasta sequedad en un rotoevaporador.
- 2) La muestra extraída libre de solvente se resuspende en hexano: 60 ml para el método de extracción por reflujo (Soxhlet) (5.2.1) o 5 ml para el método de extracción, agitación-centrifugación (5.2.2).
- 3) Dejar reposar de 12 a 24 horas para que precipiten los asfaltenos. O bien acelerar el proceso introduciendo la muestra en un sonicador durante 30 minutos.

B. Cuantificación.

- 1) Colocar la muestra en un vial para cromatografía y sellar. El volumen dependerá de la cantidad de muestra y tipo de viales empleados.
- 2) Una vez que la muestra está envasada, se procede a hacer su inyección (1 μ l) en el CG/FID para su cuantificación.
- 3) Para determinar la concentración de HTPs en las muestras, el cromatograma se integra considerando el área bajo la curva de los picos resueltos, y extrapolando dicho valor en una curva de calibración.

Curva de calibración. La curva de calibración es específica del tipo de hidrocarburo por analizar y se prefiere tomar una muestra proveniente del suelo contaminado. A partir del extracto orgánico obtenido se puede conocer su peso y preparar una serie de diluciones e inyectarlas al cromatógrafo de gases, con el fin de obtener una curva de concentración conocida contra área de picos resueltos. Lo anterior permitirá extrapolar el área de la muestra problema en la curva de calibración y conocer la concentración de la misma.

Cálculos

Para obtener la concentración de hidrocarburos en la muestra, se considera la curva de calibración que tiene una correspondencia lineal entre el área bajo la curva y la concentración del extracto de acuerdo con la ecuación obtenida:

$$C \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = (A - b) / m.$$

Donde:

C = concentración de HTPs (mg L⁻¹).

A = área bajo la curva.

m = pendiente de la ecuación obtenida.

b = ordenada al origen de la ecuación obtenida.

Con la ecuación anterior y conociendo el área de los picos resueltos para cada muestra, se puede obtener la concentración de hidrocarburos presentes en ella, en mg L⁻¹. Para tener el valor en mg kg⁻¹ de suelo hay que considerar la cantidad de suelo que se utiliza para la extracción, y el volumen de hexano donde está resuspendida la muestra, así como las diluciones correspondientes, si las hay.

$$\text{HTPs (mg / kg s.s.)} = (C) * (V / \text{FC}_1) * \text{FC}_2 / (P * \text{FH}).$$

HTPs (mg / kg s.s.) = Hidrocarburos totales del petróleo en mg kg⁻¹ de suelo seco

C = hidrocarburos totales del petróleo en mg L⁻¹.

V = volumen de hexano donde está resuspendida la muestra (5 ml o 60 ml).

P = cantidad de suelo extraído (g).

FH = factor de corrección de humedad del suelo (1-(%humedad/100)).

FC1 = factor de corrección para obtener los HTPs contenidos en el hexano = 1 000.

FC2 = factor de corrección para convertir los HTPs contenidos en la muestra en mg kg⁻¹ s.s. = 1 000

5.5. Identificación de hidrocarburos por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG / EM)

Introducción

Cuando se requiere un análisis a detalle del tipo de compuestos presentes en una muestra de suelo contaminado, se recomienda utilizar cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para identificar dichos compuestos. La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM) es una técnica analítica instrumental de alta sensibilidad capaz de identificar cualitativa y cuantitativamente cualquier tipo de mezclas de sustancias, mediante el análisis de su patrón de fragmentación. Asimismo, esta técnica permite también determinar la masa molecular de un compuesto. El sistema de CG/EM es usado para medir concentraciones de constituyentes volátiles y semivolátiles del petróleo, pero no es típicamente usado para medir HTPs. La ventaja de la CG/EM es su alta selectividad o habilidad para confirmar la identificación de compuestos a través del tiempo de retención y la vía espectral única. Debido a la complejidad de su operación y a la interpretación de sus resultados, las técnicas de CG/EM tienden a ser más costosas que otras técnicas de cromatografía de gases, por ejemplo CG/FID. (Weisman, 1998).

Para analitos volátiles los límites de detección están por debajo de 1-5 µg L⁻¹ para agua y 20 µg kg⁻¹ para suelo. Para analitos semivoláti-

los los límites de detección están por debajo de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para agua y $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ para suelo.

Método

El método (US EPA 8270DC, 1996) es utilizado para determinar la concentración de compuestos orgánicos semivolátiles en extractos preparados de muchos tipos de matrices sólidas residuales, suelos, medios muestreados de aire y muestras de agua. Esta metodología contiene los criterios para verificar el método global del desarrollo del sistema de CG/EM.

Las muestras son preparadas para su análisis por CG/EM y si es necesario se realiza hasta una limpieza de la muestra. El extracto de la muestra es introducido en el cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas por inyección del extracto de la muestra dentro del CG. La columna del CG es programada a cierta temperatura para separar los analitos, los cuales son entonces detectados con una interfase del EM al CG. Los analitos eluidos en la columna capilar son introducidos en el EM. La identificación de los analitos es alcanzada por comparación de su espectro de masas con el espectro de electrones de estándares o base de datos disponibles.

Fundamento

Los sistemas de espectrometría de masas están diseñados para compuestos ionizados y exploración de iones de masa específica. Cada compuesto se fragmenta en iones reconocibles. La cromatografía de gases (CG) acoplada con la espectrometría de masas (EM) permite separar una mezcla dentro de sus constituyentes, ioniza cada constituyente e identifica los compuestos constituyentes por la vía de su fragmentación. El método de CGEM identifica compuestos por el tiempo de retención y su espectro de masas.

Interferencias

Los espectrómetros de masas están entre los detectores más selectivos, pero son aún susceptibles a interferencias:

- ♦ Los isómeros tienen espectros idénticos, mientras muchos otros compuestos tienen espectros de masas similares. Productos pesados del petróleo pueden contener miles de componentes principales que no son resueltos por cromatografía de gases. Como resultado, compues-

tos múltiples están simultáneamente dentro del espectro de masas. Diferentes compuestos pueden compartir muchos de los mismos iones, confundiendo el proceso de identificación.

- ♦ La probabilidad de una incorrecta identificación es alta en mezclas complejas, como productos del petróleo.
- ♦ Algunas veces la identificación de compuestos está acompañada por un programa de biblioteca de investigación. Debido a que la biblioteca computarizada no puede contener todos los posibles isómeros del petróleo y frecuentemente contiene pesticidas, plásticos y otros compuestos no encontrados en el petróleo, ellos frecuentemente realizan una identificación incorrecta de los compuestos. La identificación de biblioteca computarizada debe ser usada con extrema precaución.
- ♦ La CG/EM no es una técnica capaz de cuantificar HTPs. La respuesta de un FID es proporcional a la masa de los hidrocarburos presentes y es insensible a los tipos de hidrocarburos. (e.g. aromáticos, n-alcanos y olefinas). Un espectro de masas, sin embargo, puede tener muy diferentes respuestas para dos diferentes compuestos hidrocarburos. Puesto que los productos del petróleo son mezclas complejas de hidrocarburos, la misma masa de dos diferentes productos puede tener dos diferentes respuestas en un espectro de masas.

Material y equipo

- ♦ Viales especiales para el cromatógrafo.
- ♦ Pipetas.
- ♦ Cromatógrafo de gases - Espectrómetro de masas.

Reactivos

- ♦ Hexano grado HPLC.

Procedimiento

- 1) Una vez que la muestra es extraída con alguno de los métodos de la sección 5.2, y teniendo la muestra evaporada a sequedad, se adiciona un volumen conocido de hexano. Se deja reposar de 12 a 24 horas para permitir que los asfaltenos presentes precipiten.
- 2) Se toma una cantidad conocida de la muestra y se colocan en un vial para el equipo de cromatografía y se sella el vial. El volumen de muestra depende de la cantidad de muestra y el volumen del vial.

- 3) Una vez que la muestra esté envasada se procede a hacer su medición en cromatografía de gases-espectrometría de masas.
- 4) Para determinar la concentración de los componentes de hidrocarburos en las muestras el cromatograma se integra, considerando el área bajo la curva de los picos resueltos, y extrapolando dicho valor en una curva de calibración. Además, se puede hacer uso de la biblioteca que está incluida en el software del equipo para identificar los compuestos presentes en la muestra.

Referencias

- Arce O. J.M., Rodríguez V. R., Rojas A. N.G. 2004. Identification of recalcitrant hydrocarbons present in a drilling waste-polluted soil. *J Environ Sci & Health Part A*, 39 (6): 1535-1545.
- ASTM D5369-93. 2003. Standard practice for extraction of solid waste samples for chemical analysis using soxhlet extraction. *Environmental Assessment, Book of Standards*, Vol. 11.04, September 2004.
- ASTM D5369-93. 1998. Standard practice for extraction of solid waste samples for chemical analysis using Soxhlet extraction.
- ASTM D6560. 2000. Standard test method for determination of asphaltenes (heptane insolubles) in crude petroleum and petroleum products.
- Cervantes G. E. 2001. Estudio de la población asociada a la degradación de la fracción asfáltica y aromática presentes en un suelo contaminado. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México.
- Later D., Lee M., Bartle D., Kong R., Vassilaros D. 1981. Chemical class separation and characterization of organic compounds in synthetic fuels. *Anal Chem* 53 (11): 1612-1620.
- Schwab A. P., Su J., Wetzel S., Pekarek S., Banks M. K. 1999. Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environ Sci Technol*. 33 (11): 1940-1945.
- US EPA 3500B. 1996. Organic extraction and sample preparation. SW 846 Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. (Revision 2).

- US EPA 3540C. 1996. Soxhlet extraction organics. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. (Revision 3).
- US EPA 3541. 1994. Automated soxhlet extraction. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. (Revision 0).
- US EPA 3600C. 1996. Cleanup. SW 846 Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. (Revision 3).
- US EPA 3610B. 1996. Alumina Cleanup. SW 846 Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. (Revision 2).
- US EPA 3611B. 1996. Alumina column cleanup and separation of petroleum wastes. SW 846 Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. (Revision 2).
- US EPA 8015B. 1996. Nonhalogenated organics using GC/FID. SW 846 Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. (Revision 2).
- US EPA 8270C. 1996. Semi-volatile organic compounds by chromatography/mass spectrometry (GC/MS). SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. (Revision 3).
- US EPA 821-B-94-004 (Method 1664). 1995. N-hexane extractable material (HEM) and silica gel treated N-hexane extractable material (SGT-HEM) by extraction and gravimetry (oil and grease and total petroleum hydrocarbons).
- US EPA 8440. 1996. Total recoverable petroleum hydrocarbons by infrared spectrophotometry. SW 846 Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. (Revisión 0).
- Weisman W. 1998. Analysis of petroleum hydrocarbons in environment media. Vol. 1. Total petroleum hydrocarbon criteria working group series. Association of American Railroads BP Oil Company. United States Air Force, Armstrong Laboratory, Occupational Medicine Division.

6. Análisis microbiológicos

El suelo es un ecosistema que contiene una gran variedad de poblaciones microbianas cuyos miembros representan muchos tipos fisiológicos. Las características químicas, físicas y biológicas de un suelo particular, así como la presencia de crecimiento de plantas influirán en el número y actividades de sus diversos componentes microbianos. Además, a causa de la naturaleza heterogénea del suelo varios tipos fisiológicos de organismos serán encontrados en las proximidades cercanas de uno a otro. La comunidad microbiana en suelos es importante por su relación con la fertilidad del suelo y con los ciclos biogeoquímicos de los elementos, además del uso potencial de los miembros específicos para aplicaciones ambientales e industriales. Por lo que existe la necesidad de conocer, enumerar y aislar los miembros principales y menores de la comunidad microbiana en suelos.

La cuenta viable de microorganismos del suelo puede realizarse por la técnica de cuenta en placa o la técnica del número más probable (NMP). Los principios fundamentales de estas técnicas son (1) dispersión de una muestra en un diluyente apropiado (solución fisiológica), (2) distribución de una alícuota a un medio apropiado de crecimiento, (3) incubación bajo condiciones óptimas, y (4) conteo de las colonias desarrolladas o lectura de tubos NMP (Germida, 1993).

La composición del medio de crecimiento usado para contar poblaciones microbianas es importante, ya que afectará el resultado final. El medio de crecimiento puede ser selectivo o no selectivo. Los medios selectivos contienen componentes que permiten o favorecen el crecimiento de un grupo determinado de organismos. Los medios no selectivos pueden ser suficientes para el crecimiento de muchos grupos de organismos como sea posible. Para contar un tipo fisiológico específico de microorganismos generalmente es necesario diseñar un medio de cultivo, el cual, cuando es incubado bajo condiciones apropiadas de atmósfera y temperatura, reduce las interferencias de poblaciones no deseadas.

Aunque la cuenta en placa y la técnica del número más probable (NMP) son métodos simples de desarrollar, su utilidad está limitada por un número de factores clave, como la elección del medio, problemas con la dispersión, y aún adsorción de microorganismos a la pared de la pipeta, ya que pueden interferir con la estandarización de estos procedimientos. La consistencia y adecuado uso de muestras réplica ayudan a minimizar algunos de estos problemas.

Esta sección provee principios básicos y referencias sobre los procedimientos de conteo y medios de cultivo para algunos tipos representativos de microorganismos del suelo.

6.1. Microorganismos aerobios

6.1.1. Cuenta de microorganismos viables por dilución en placa

Introducción

Existen diferentes técnicas para determinar el número de microorganismos en suelos o aguas, tanto directas como indirectas. Para la determinación de microorganismos heterótrofos totales e hidrocarbonoclastas aerobios, se seleccionó la cuenta microbiana por dilución en placa. Es una técnica indirecta de cuantificación; sin embargo, provee una medición de la viabilidad microbiana, permite determinar indirectamente el potencial de biodegradación en un suelo contaminado, es la más adecuada para medios con hidrocarburos como sustrato, es rápida de efectuar y no requiere de mucho material (Lorch *et al.*, 1995; Bossert y Kosson, 1997).

Método

El conteo de poblaciones microbianas por dilución en placa es un método simple y rápido para la cuenta viable de células microbianas en el suelo. Sin embargo, la cuenta obtenida es generalmente 10 a 100 veces menos que aquella determinada por cuenta directa por microscopía. Las razones para esta discrepancia incluyen la exclusión de la cuenta no viable directamente en el suelo y la inhabilidad para proveer apropiados nutrimentos en el medio de crecimiento, para obtener la cuenta total en placa.

Fundamento

El método de dilución en placa se fundamenta en que cualquier célula viable inoculada en un medio de cultivo se multiplica y produce datos de fácil identificación, como la formación de colonias en placas de agar. Este método consiste en la preparación de una serie de diluciones de una muestra de suelo en un diluyente apropiado, esparciendo una alícuota de una dilución sobre la superficie de un medio de cultivo sólido e incubando la placa de agar bajo condiciones ambientales apropiadas. La dilución debe permitir generar colonias separadas, cada colonia puede proceder de una sola célula o de una agrupación (unidad viable), la cual se contará como una bacteria. Bajo este fundamento, estas placas pueden ser usadas no sólo para el conteo de poblaciones microbianas, sino también para el aislamiento de organismos. Un medio selectivo o no selectivo puede ser usado dependiendo de la naturaleza del microorganismo que se desea contar o aislar (Ramírez *et al.*, 1992).

Interferencias

Los errores más frecuentes en este método son:

- a) Que durante la realización de las diluciones no se logre separar perfectamente los agregados bacterianos y más de una bacteria forme una colonia.
- b) Cuando el diluyente se esteriliza en tubos tapados con torundas de algodón el volumen inicial generalmente se altera, por lo que se recomienda el uso de tubos con tapón de rosca o la esterilización separada del diluyente y tubos, a fin de pipetear en cada tubo el volumen exacto del diluyente al que se agrega el volumen exacto de la muestra.
- c) Debe evitarse el choque osmótico cuando se hacen las diluciones; se recomienda el empleo de agua peptonada, solución salina isotónica; el medio de cultivo utilizado para su crecimiento o diferentes soluciones amortiguadoras.
- d) La temperatura de la varilla para extender el inóculo en la placa. Cuando la varilla queda muy caliente después de ser esterilizada con alcohol y flameada, puede quemar el inóculo.
- e) Durante el recuento se pueden producir dificultades ocasionadas por la carencia de uniformidad en la extensión de los microorganismos (Ramírez *et al.*, 1992).

Material y equipo

- Tubos de vidrio de 15 ml para cultivo con 9 ml de solución salina 0.85% estéril.
- Matraz Erlenmeyer con tapa con 99 ml de solución salina 0.85% estéril.
- Pipetas de 1 ml y de 0.2 ml, estériles.
- Vórtex.
- Balanza.
- Espátulas.
- Campana de flujo laminar o área estéril.
- Cajas de Petri con medio de cultivo-agar.
- Varilla de vidrio.
- Muestra de suelo o agua.
- Incubadora.
- Papel aluminio estéril.

Soluciones y reactivos

- 1) Solución salina 0.85% estéril. Adicionar 8.5 g de cloruro de sodio (NaCl) en 1 L de agua destilada.
- 2) Cajas de Petri con medio de cultivo adecuado para el crecimiento.
- 3) Etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$).

Procedimiento

- 1) En condiciones estériles (trabajar en campana de flujo laminar), adicionar 1 g del suelo a una botella de dilución o matraz con tapa de rosca con 99 ml de solución salina isotónica estéril (dilución 10^{-2}). Dispersar el suelo y homogeneizar con agitación vigorosa en vórtex.
- 2) Tomar 1 ml y transferirlo a un tubo con 9 ml de solución salina estéril (dilución 10^{-3}). De ahí se hacen diluciones sucesivas hasta completar diluciones decimales hasta 10^{-10} o las adecuadas, asegurándose de utilizar una punta o pipeta estéril diferente en cada paso. Agitar de forma constante con vórtex en cada paso.
- 3) Tomar 0.1 ml de la dilución seleccionada y colocarla en el centro de la superficie del medio de cultivo seleccionado para el crecimiento. Realizar esto por triplicado y con tres diluciones próximas (ej. 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) para asegurar la cuenta.
- 4) Extender la alícuota en la superficie de la placa con una varilla de vidrio previamente esterilizada (inmersa en alcohol y pasándola por

la flama del mechero permitiendo su enfriamiento). Asegurar una distribución homogénea por toda la superficie del medio.

- 5) Incubar las placas de forma invertida a 30°C en ausencia de luz.
- 6) Después de un periodo de incubación (de 3 a 7 días, dependiendo del tipo de microorganismo), contar el número de colonias y reportar como unidades formadoras de colonias (UFC)/ g de suelo seco.

Cálculos

- 1) Contar sólo aquellas cajas (diluciones) que contengan de 30 a 300 colonias.
- 2) Con la siguiente ecuación calcular las UFC/g s.s.

$$\text{UFC/g s.s.} = (\text{NC} * 1/\text{FD} * 1/ \text{V}) / (\text{P} * \text{FH}).$$

Donde:

UFC/ g s. s. = unidades formadoras de colonias / g de suelo seco.

NC = número de colonias en una caja.

FD = factor de dilución que corresponde a la dilución de donde se tomó la muestra con la que se inocula la caja (10^{-2} a 10^{-10}).

V = volumen inoculado en la caja = 0.1 ml.

P = peso de la muestra húmeda = 1 g.

FH = factor de corrección de humedad ($1 - (\% \text{humedad}/100)$).

6.1.2 Bacterias totales por dilución en placa

Introducción

La cuenta de bacterias totales de un sistema se refiere a las bacterias heterótrofas presentes en el suelo, es decir, aquellas que obtienen su fuente de carbono a partir de compuestos orgánicos. En este grupo de bacterias se puede encontrar la gran mayoría de la población microbiana del ambiente. Los medios usados para la cuenta de un amplio número de bacterias en el suelo, sedimento, agua, aguas residuales o composta pueden ser complejos en su formulación (incluyendo peptona o extractos de carne o de levadura), pero relativamente escasos en su composición. Uno de los medios de cultivo recomendado para su desarrollo es el agar nutritivo o caldo nutritivo, ya que es un medio relativamente simple, rico en fuentes de carbono y/o proteínas (peptona), capaz de permitir el desarrollo de muchas bacterias heterótro-

fas y en corto tiempo (en menos de 3 días a 30°C) (Lorch *et al.*, 1995; Madigan *et al.*, 1998).

Método

Para el conteo de bacterias heterótrofas del suelo se utiliza la técnica de cuenta por dilución en placa (sección 6.1.1) con agar nutritivo como medio de crecimiento.

Fundamento

Este método se basa en el fundamento de la dilución en placa (6.1.1) y en este caso el crecimiento se debe a la capacidad de los microorganismos heterótrofos de crecer bien en agar nutritivo, debido a que contiene:

- ♦ Extracto de carne. Extracto acuoso de carne magra de res concentrado en pasta, que contiene las sustancias solubles en agua de tejidos animales, entre ellas carbohidratos, compuestos orgánicos nitrogenados, vitaminas solubles en agua y sales.
- ♦ Peptona. Producto que resulta de la digestión de materiales proteínicos, por ejemplo carne, caseína y gelatina. Es la fuente principal de nitrógeno orgánico; puede contener también algunas vitaminas y algunas veces carbohidratos (Pelczar *et al.*, 1982).

Interferencias

Aunque muchos de los heterótrofos se desarrollan bien en agar nutritivo o medio rico, algunos tienen requerimientos nutricionales específicos (heterótrofos exigentes), por ejemplo, vitaminas y sustancias promotoras del crecimiento, cosubstratos, etcétera, y no existen medios que puedan proporcionar todos los nutrimentos necesarios y, por ende, permitir el crecimiento de todos los microorganismos heterótrofos.

Material y equipo

- ♦ Cajas de Petri.
- ♦ Matraces o botellas de cultivo 1 L.
- ♦ Espátula.
- ♦ Balanza analítica.
- ♦ Material y equipo de la sección 6.1.1.
- ♦ Agitador magnético.
- ♦ Autoclave.
- ♦ Campana de flujo laminar.
- ♦ Varilla para expandir muestra.

Reactivos y medios de cultivo

- 1) Agua destilada.
- 2) Agar nutritivo. Disolver 15 g de agar nutritivo o lo que indique el envase del medio de cultivo en 1 L de agua destilada.
- 3) Reactivos y soluciones de la sección 6.1.1.

Procedimiento

- 1) Preparar medio de cultivo con agar nutritivo en un matraz Erlenmeyer o botella de cultivo.
- 2) Calentar hasta disolución total.
- 3) Esterilizar el medio de cultivo a 15 lb, 121°C durante 15 minutos.
- 4) Una vez esterilizado el medio de cultivo dejarlo enfriar a 50°C aproximadamente.
- 5) Vaciar el medio en cajas Petri en condiciones estériles en una campana de flujo laminar.
- 6) Dejar enfriar y gelificar el medio.
- 7) Preparar la muestra de suelo y diluciones, e inocular cada caja como se indica en la sección 6.1.1.
- 8) Después de tres días de incubación proceder al conteo de colonias.
- 9) Para el cálculo final de unidades formadoras de colonias (UFC) se debe considerar la dilución con que se inoculó la caja, la cantidad de inóculo (0.1 ml) y la humedad de la muestra (Cálculos en 6.1.1).

6.1.3 Hongos totales por dilución en placa

Introducción

Los hongos tienen hábitats muy diversos; sin embargo, la mayoría son terrestres y habitan en el suelo, desempeñando una actividad importante en la mineralización del carbono orgánico. Cuando se compara a los hongos con las bacterias, en general, estos tienen requerimientos nutricionales muy simples, pero su desarrollo es más lento, por lo que requieren mayor tiempo de incubación para su cultivo. En el aislamiento, cultivo y cuenta de la mayoría de los hongos se aprovechan ciertas características especiales de ellos, como su tolerancia a pH ácido y su preferencia por medios de cultivo con gran cantidad de azúcar fácilmente degradable. Además, su resistencia a la penicilina y estreptomina permite usar estos antibióticos, los que al ser agregados a los medios de cultivo reducen el número de bacterias contaminantes.

En la preparación de los medios de cultivo para hongos con frecuencia se prefiere usar mezclas de vegetales (agar-papa, agar-harina de maíz, etcétera) y otras sustancias naturales (Ramírez *et al.*, 1992).

Método

El método para el conteo de hongos del suelo es por la técnica de cuenta por dilución en placa (sección 6.1.1). El medio recomendado para la detección y enumeración de hongos y levaduras es el de papa-dextrosa-agar (PDA) adicionado con rosa de Bengala para permitir el conteo de hongos, así como la adición de un antibiótico (estreptomicina) para evitar el crecimiento de bacterias.

Fundamento

Este método se basa en el fundamento de la dilución en placa (6.1.1); sin embargo, en este caso una célula no da origen a una colonia, sino a una spora o una parte del hongo, basándose en la habilidad de estos microorganismos para crecer en medios vegetales (papa), así como en las propiedades tanto del rosa de Bengala, de limitar el crecimiento de los hongos permitiendo su conteo, como de la estreptomicina, de evitar el crecimiento indeseable de bacterias.

Interferencias

Las principales interferencias en este tipo de cultivos están dadas por el pH del medio de cultivo, prefiriéndose pH ácidos para el crecimiento de hongos, ya que pH neutros o alcalinos favorecen el crecimiento de bacterias; además, si no se evita el crecimiento bacteriano con el pH, el no incluir un antibiótico también favorece la contaminación bacteriana.

Material y equipo

- ♦ Cajas de Petri.
- ♦ Matraces o botellas de cultivo 1 L.
- ♦ Espátula.
- ♦ Varilla para expandir muestra.
- ♦ Material y equipo de la sección 6.1.1.
- ♦ Balanza analítica.
- ♦ Agitador magnético.
- ♦ Autoclave.
- ♦ Campana de flujo laminar.

Reactivos y medios de cultivo

- 1) Agua destilada.
- 2) Medio de cultivo Agar papa-dextrosa (PDA). Disolver 39 g de PDA en 1 L de agua destilada.
- 3) Rosa de Bengala.
- 4) Estreptomicina.

Procedimiento

- 1) Preparar medio de cultivo para hongos totales utilizando PDA (39 g L⁻¹ o lo indicado en el frasco) y rosa de Bengala (50 mg L⁻¹). Llevar a ebullición hasta disolución completa.
- 2) Esterilizar el medio en autoclave a 121°C (15lb) /15 minutos.
- 3) Una vez que el medio esté aproximadamente a 50°C, en condiciones estériles (en campana de flujo laminar) ajustar su pH a 4.9 con ácido láctico estéril al 10% y adicionar estreptomicina (48 mg L⁻¹).

Nota: Para suprimir el crecimiento bacteriano algunas veces es deseable acidificar el medio a pH 3.5. Esto se puede conseguir adicionando 1 ml de ácido láctico al 10% por cada 100 ml del medio estéril y a 50°C. El medio no debe de ser calentado después de la adición del ácido, ya que esto podría hidrolizar el agar alterando su propiedad gelificante. Si no se requiere medio selectivo se sugiere el empleo de PDA sin la adición de ácido o utilizar algún antibiótico como estreptomina (Oxoid, 1995).

- 4) Mezclar bien antes de vaciar el medio en cajas de Petri, una vez vaciado en cajas esperar a que gelifique.
- 5) Preparar la muestra de suelo y diluciones e inocular cada caja como se indica en la sección 6.1.1.
- 6) Incubar las cajas invertidas a 30°C.
- 7) Después de cinco días de incubación proceder al conteo de colonias.
- 8) Para el cálculo final de unidades formadoras de colonias (UFC) se debe considerar la dilución con que se inoculó la caja, la cantidad de inóculo (0.1 ml) y la humedad de la muestra, reportando finalmente UFC/g suelo seco.

Cálculos

Para realizar los cálculos de UFC/ g s.s. seguir el mismo procedimiento de la sección 6.1.1.

6.1.4. Bacterias hidrocarbonoclastas por dilución en placa

Introducción

Las bacterias hidrocarbonoclastas son aquellas capaces de crecer en presencia de hidrocarburos como única fuente de carbono y energía. En suelos contaminados, la biodegradación es un proceso donde la actividad metabólica de organismos vivos, principalmente microorganismos, degrada a los contaminantes orgánicos en compuestos más simples y/o menos tóxicos, y en el mejor de los casos los mineraliza (transforma en CO_2 y H_2O). La cuenta microbiana provee evidencia de la presencia de grupos determinados de microorganismos cuando se utiliza un medio de cultivo específico, y es usado como indicador del potencial de biodegradación de un suelo en particular (Bossert y Bartha, 1984).

La presencia de petróleo en el suelo enriquece selectivamente la comunidad microbiana capaz de adaptarse y utilizar el nuevo sustrato, y crea una situación selectiva. Sin embargo, los componentes tóxicos del petróleo pueden inhibir a algunos miembros de la comunidad microbiana, produciendo tanto una disminución en el tamaño de la población, como en la diversidad de especies. Es difícil generalizar acerca de la respuesta microbiana de los suelos sujetos a contaminación por petróleo; sin embargo, las bacterias y hongos son los principales responsables de la biodegradación de hidrocarburos en suelo, aunque la relativa contribución de cada uno de estos grupos no es clara. Es por esto que desde el punto de vista de la biorremediación de suelos (procesos biológicos de eliminación de contaminantes) es importante determinar las bacterias y hongos capaces de utilizar al petróleo como sustrato, es decir, determinar a las bacterias y hongos hidrocarbonoclastas (Bossert y Kosson, 1996).

Método

El método para el aislamiento y cuenta de las bacterias hidrocarbonoclastas del suelo es por la técnica de cuenta por dilución en placa (ver sección 6.1.1), utilizando un medio mineral basal (tabla 6.1) (Mejía y Molina, 2000) que contenga petróleo crudo o un hidrocarburo específico de interés, como única fuente de carbono y energía.

Tabla 6.1 Medio mineral basal.

Componente		Cantidad
Agua destilada		1 L
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	0.4 g
Fosfato de potasio dibásico	K_2HPO_4	1.6 g
Cloruro de amonio	NH_4Cl	1.5 g
Cloruro de magnesio sextahidratado	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.17 g
Sulfato de sodio heptahidratado	$\text{NaSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5 g
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.045 g
Solución mineral*		1.0 ml

*La solución mineral se agrega después de esterilizar.

Fundamento

El fundamento es el de dilución en placa (6.1.1), basado en la capacidad de los microorganismos hidrocarbonoclastas de poder utilizar a los hidrocarburos como fuente de carbono y energía, cuando crecen en un medio con estas características de selección. El petróleo ligero que se impregna en un papel filtro permite que las bacterias hidrocarbonoclastas se alimenten de los hidrocarburos volátiles, o la adición de un hidrocarburo en solución asperjando la superficie de la caja ya inoculada.

Interferencias

El agar noble para preparar el medio de cultivo sólido debe ser un agar puro, libre de cualquier contaminante; de lo contrario puede haber crecimiento de bacterias por las impurezas que pueda contener, permitiendo el crecimiento de bacterias no hidrocarbonoclastas. Se recomienda inocular cajas de medio mineral sin hidrocarburo para tener un control negativo y asegurar la pureza del agar.

El petróleo crudo o hidrocarburo utilizado para este método debe ser ligero (volátil), ya que el acceso de esta fuente de carbono y energía es a través de los vapores que se generan de ella.

Material y equipo

- ♦ Cajas de Petri.
- ♦ Matraces o botellas de cultivo 1 L.
- ♦ Espátula.
- ♦ Balanza analítica.
- ♦ Agitador magnético.
- ♦ Varilla para expandir muestra.
- ♦ Papel filtro estéril.
- ♦ Autoclave.
- ♦ Campana de flujo laminar.
- ♦ Material y equipo de la sección 6.1.1.

Reactivos y medios

- 1) Agua destilada.
- 2) Agar noble (libre de impurezas).
- 3) Medio mineral basal (tabla 6.1).
- 4) Reactivos y soluciones de la sección 6.1.1.
- 5) Solución mineral (tabla 6.2). Disolver en un litro de agua destilada cada uno de los componentes de la tabla 6.2 y esterilizar por filtración.
- 6) Petróleo crudo ligero estéril. Esterilizar el petróleo crudo tres veces a 110°C durante una hora, dejando entre cada esterilización un día a temperatura ambiente.
- 7) Solución de hidrocarburos puros: hacer una solución del hidrocarburo de interés (fenantreno, dibenzotiofeno, eicosano, antraceno, etcétera) en hexano, en una concentración de 1 g L⁻¹.

Procedimiento

- 1) Preparar el medio de cultivo con los componentes de la tabla 6.1, disolviéndolas en el orden señalado en un litro de agua destilada.
- 2) Ajustar el pH a 7.0, después adicionar 15 g de agar puro (agar noble).
- 3) Esterilizar a 15 lb/15 min. Dejar enfriar, cuando el medio se encuentre a 50°C aproximadamente, añadir la solución mineral estéril previamente preparada (1 ml por L de medio) (tabla 6.2).
- 4) Vaciar el medio en cajas de Petri en condiciones estériles, esperar a que gelifique.
- 5) En un disco de papel filtro estéril impregnar el petróleo crudo ligero estéril y colocarlo en la parte interna de la tapa de la caja de Petri. El hidrocarburo que se volatiliza servirá como fuente de carbono y energía.

Tabla 6.2 Solución mineral.

	Componente	Cantidad
Agua destilada		1 L
Cloruro de calcio dihidratado	MgCl ₂ H ₂ O	5.1 g
Cloruro de manganeso monohidratado	MnCl ₂ H ₂ O	0.66 g
Cloruro de sodio	NaCl	1.0 g
Cloruro férrico sextahidratado	FeCl ₃ 6H ₂ O	1.0 g
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ 2H ₂ O	0.1 g
Cloruro de cobre	CuCl ₂	0.01 g
Cloruro de zinc	ZnCl ₂	0.08 g
Cloruro de aluminio	AlCl ₃	0.05 g
Acido bórico	H ₃ BO ₃	0.01 g
Molibdato de sodio dihidratado	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.04 g

- ♦ Si se quiere trabajar con un hidrocarburo puro, en lugar del paso 5 primero inocular como se indica en 6.1.1 y, posteriormente, asperjar la solución de hidrocarburo con un frasco provisto de atomizador y dejar evaporar el solvente en la campana de flujo laminar.
- 6) Preparar la muestra de suelo y diluciones e inocular cada caja como se indica en la sección 6.1.1. Incubar las cajas de forma invertida a la temperatura que se considere óptima en función del suelo y la localización del sitio.
- 7) Después de cinco días de incubación, proceder al conteo de colonias.
- 8) Para el cálculo final de unidades formadoras de colonias (UFC) se debe considerar la dilución con que se inoculó la caja, la cantidad de inóculo (0.1 ml) y la humedad de la muestra.

Cálculos

Para realizar los cálculos de UFC/ g s.s. seguir el mismo procedimiento de la sección 6.1.1

6.1.5 Hongos hidrocarbonoclastas por dilución en placa

Método

Para el aislamiento y cuenta de hongos degradadores de hidrocarburos se utilizó la misma técnica y medio que para bacterias hidrocarbonoclas-

tas (6.1.4), con la diferencia de que al medio se le adiciona rosa de Bengala y estreptomycinina y se ajusta el pH a 4.9.

Material y equipo

- Cajas de Petri.
- Matraces o botellas de cultivo 1 L.
- Espátula.
- Balanza analítica.
- Agitador magnético.
- Material y equipo de la sección 6.1.1.
- Potenciómetro.
- Campana de flujo laminar.
- Autoclave.
- Papel filtro estéril.
- Varilla para expandir muestra.

Reactivos y medios de cultivo

Los mismos que para 6.1.4, además de rosa de Bengala, estreptomycinina y ácido láctico al 10% (sección 6.1.3).

Procedimiento

- 1) Preparar el medio de cultivo con los componentes de la tabla 6.1, disolviéndolos en el orden señalado en un litro de agua destilada, adicionar rosa de Bengala (50 mg /L).
- 2) Esterilizar a 15 lb/15 minutos.
- 3) Después de la esterilización, cuando el medio se encuentre a 50°C aproximadamente, ajustar su pH a 4.9 con ácido láctico estéril al 10% (en condiciones estériles en campana de flujo laminar), añadir 1 ml de la solución mineral estéril previamente preparada y la estreptomycinina (48 mg L⁻¹).
- 4) Mezclar bien y vaciar el medio en cajas de Petri en condiciones estériles y esperar a que gelifique.
- 5) En un disco de papel filtro estéril impregnar el petróleo crudo ligero estéril y colocarlo en la parte interna de la tapa de la caja de Petri. El hidrocarburo que se volatilice servirá como fuente de carbono y energía.
 - Si se quiere trabajar con un hidrocarburo puro en lugar del paso 5, primero inocular (paso 6) como se indica en 6.1.1 y, posteriormente,

asperjar la solución de hidrocarburo con un frasco provisto de atomizador y dejar evaporar el solvente en la campana de flujo laminar.

- 6) Preparar la muestra de suelo y diluciones, e inocular cada caja como se indica en la sección 6.1.1. Incubar las cajas de forma invertida a la temperatura que se considere óptima en función del suelo y la localización del sitio.
- 7) Después de cinco días de incubación proceder al conteo de colonias.
- 8) Para el cálculo final de unidades formadoras de colonias (UFC) se debe considerar la dilución con que se inoculó la caja, la cantidad de inóculo (0.1 ml) y la humedad de la muestra.

Cálculos

Para realizar los cálculos de UFC/ g s.s. seguir el mismo procedimiento de la sección 6.1.1.

6.2 Microorganismos anaerobios

6.2.1 Fundamentos de la técnica del número más probable

Introducción

Existen diversos métodos para cuantificar el número de microorganismos presentes en muestras líquidas y sólidas. Dentro de las técnicas más comunes se encuentra el recuento directo por microscopía de fluorescencia, así como los procedimientos basados en diluciones en serie, haciendo crecer microorganismos en medios de cultivo sintéticos sólidos o líquidos, como el recuento en placa de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) o la estimación por el método del Número Más Probable (NMP). Este último es muy adecuado para determinar bacterias anaerobias, porque permite mantener un ambiente anaerobio dentro de los tubos, sin necesitar de sistemas anaerobios más complejos como cámaras o jarras anaerobias.

El método del número más probable fue descrito por McCrady en 1915 y actualmente sigue siendo ampliamente utilizado (Hurley y Roscoe, 1983). En un principio este método fue empleado para estimar el número de microorganismos en muestras de alimentos y aguas. Sin embargo, se ha demostrado que también puede ser aplicado para la determinación de microorganismos aerobios y anaerobios en lodos, sedimentos marinos y

suelos contaminados (Wrenn y Venosa, 1996; Vester y Ingvorsen, 1998; Kuai *et al.*, 2001).

Método

Este método es aplicable para estimar el número de microorganismos en muestras de suelo y agua, tanto para bacterias aerobias como anaerobias.

Fundamento

El método consiste en la estimación del número de microorganismos viables a partir de diluciones sucesivas (1/10) partiendo de 1 g de suelo o sedimento en base húmeda o 1 ml de agua; posteriormente, de tres o más de las diluciones se inoculan tubos con medio de cultivo con sustratos y aceptores de electrones específicos. En este método se asume que en las series de diluciones los microorganismos se encuentran distribuidos al azar y que al menos un microorganismo generará crecimiento, produciendo una respuesta positiva (turbidez, cambio de color del medio, producción de algún metabolito específico). Esta técnica se basa en la estimación de la densidad bacteriana por el método estadístico de máxima probabilidad, utilizando la teoría de las diluciones.

Para realizar la estimación microbiana se utiliza un mínimo de tres diluciones y un intervalo de 3 a 10 réplicas ("n" tubos de medio para crecimiento) por dilución; el número de diluciones y réplicas utilizadas estará en función de la precisión requerida. Actualmente, existen tablas estándar como las publicadas por la FDA o NACE para estimar el número de microorganismos más probable. Estas tablas están limitadas a tres diluciones y a 3, 5 y 10 réplicas por dilución; sin embargo, también existen programas de computadora (MPN CalculatorTM, "Chem SW") para obtener la estimación microbiana empleando más de tres diluciones y un número mayor de réplicas.

6.2.2 Método de NMP para la cuantificación de microorganismos anaerobios en suelos

A continuación se presenta la metodología general para la determinación de bacterias anaerobias por NMP, proporcionándose posteriormente el medio base y los aceptores específicos para cada grupo y la interpretación de las pruebas.

Interferencias

La presencia de oxígeno es el principal factor de interferencia, por lo que se deben conservar las condiciones anaerobias durante toda la técnica.

Material y equipo

- ♦ Matraz Erlenmeyer de 1 L.
- ♦ Matraz volumétrico de 1 L.
- ♦ Jeringas hipodérmicas de 1 ml (0.1/1.0 ml).
- ♦ Papel aluminio.
- ♦ Gradillas.
- ♦ Espátula.
- ♦ Tubos para cultivo anaerobio tipo Hungate, con septo de hule y tapa horadada.
- ♦ Autoclave.
- ♦ Cámara de anaerobiosis.

Reactivos y soluciones

- 1) Nitrógeno (N_2), de preferencia de ultra alta pureza (99.999%), como gas reductor.
- 2) Agua destilada anóxica. Adicionar agua destilada necesaria para la preparación de las soluciones estándar en un matraz Erlenmeyer. Marcar el nivel del líquido con una línea en el matraz para indicar el volumen de solución deseado y adicionar de 15 a 25% más de agua destilada. Tapar el matraz con papel aluminio haciendo dos pequeños orificios para permitir la salida del vapor y colocarlo en una parrilla hasta ebullición. Retirar el matraz de la parrilla un poco antes de que el nivel de la solución llegue hasta la marca y enfriar con un burbujeo de N_2 para mantener las condiciones anóxicas: Una vez frío el nivel del medio debe estar en la marca.
- 3) Hidróxido de potasio (KOH) 1N. Disolver 56.09 g de KOH en 200 ml de agua destilada y posteriormente aforar a 1L.
- 4) Resarzurina al 0.1%. Disolver 0.1 g de resarzurina en 100 ml de agua destilada y esterilizar por filtración.

Procedimiento

A) *Preparación de tubos con medio de crecimiento.*

Se preparan tubos anaerobios tipo Hungate (tubo con tapón de rosca y septo) con 9 ml de medio de cultivo base. La técnica se detalla en la sección 6.2.3.

B) Adición de sustratos y aceptores de electrones.

Los sustratos y aceptores de electrones son adicionados a los tubos de crecimiento con medio base anaerobio, previamente esterilizados. El tipo de sustratos y aceptores adicionados dependerán del grupo de microorganismos que se está evaluando (secciones de 6.2.4 a 6.2.8).

C) Preparación de tubos con solución salina para diluciones 1/10.

- 1) Agregar 8.5 g de NaCl, 0.5 g de cisteína-HCl y 1.0 ml de solución de resazurina en un matraz Erlenmeyer y disolver en 1 L de agua destilada.
- 2) Ajustar el pH a 7 a la solución salina con un potenciómetro a temperatura ambiente, agregando aproximadamente 0.4 ml de KOH 1N; la tonalidad de la solución se tornará de color azul oscuro a guinda. Marcar con una línea el nivel del líquido en el matraz Erlenmeyer y adicionar entre 15 y 25% más de agua destilada. Tapar el matraz con papel aluminio haciendo dos pequeños orificios para permitir la salida del vapor, y colocarlo en una parrilla para su calentamiento hasta ebullición.

Nota: El cambio de coloración de la solución de rosa a transparente es indicativo de la pérdida de oxígeno y de las condiciones anóxicas.

- 3) Retirar el matraz de la parrilla un poco antes de que el nivel de la solución llegue hasta la marca y enfriar con N₂ para mantener las condiciones anóxicas.
- 4) Una vez que la solución salina se encuentre a temperatura ambiente, continuar burbujeando con N₂ hasta que termine la dosificación (distribución en cada tubo). Colocar los tubos de cultivo perfectamente limpios en gradillas e introducir una manguera con flujo de N₂ en cada uno de ellos. Para dosificar la solución se utiliza una pipeta de 10 ml con una perilla de tres vías o un dosificador de engranes. Antes de iniciar la dosificación purgar la pipeta tres veces con N₂.
- 5) En cada tubo adicionar 9.0 ml de solución fisiológica salina anóxica, tapar el tubo con el septo de hule, extrayendo la manguera de N₂ lentamente, y posteriormente colocar la tapa de rosca horadada. Esterilizar los tubos en autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 121°C a 15 lb/pulg² de presión.

D) Inoculación.

- 1) Preparación del inóculo. Pesar dentro de la cámara anaerobia 1 g de muestra de suelo en base húmeda y adicionarla a un tubo con 9 ml de solución salina estéril. Tapar nuevamente con el septo de hule y la tapa horadada, agitar perfectamente hasta obtener una suspensión homogénea (desaparición de los agregados del suelo). Bajo condiciones estériles y anóxicas (purga con nitrógeno), tomar (con jeringa estéril) 1 ml de la suspensión de suelo y adicionarlo en un tubo nuevo con solución salina estéril, agitar perfectamente. Realizar las diluciones sucesivas, necesarias para la inoculación.

Nota: El número de diluciones dependerá de la densidad microbiana de cada muestra de suelo.

- 2) Inoculación. Utilizando como inóculo las últimas tres diluciones preparadas, adicionar 1 ml de la dilución correspondiente a cada una de las "n" réplicas o tubos con 9 ml de medio de cultivo por dilución. Realizar la inoculación bajo condiciones estériles y anóxicas (purga con nitrógeno).

Nota: El número de réplicas o tubos inoculados por dilución dependerá de la precisión requerida. Suponiendo un mínimo de tres tubos por dilución, se tendrán que inocular tres tubos de medio de cultivo por cada dilución, para obtener un total de nueve tubos inoculados.

- 3) Mantener los tubos inoculados en oscuridad. La temperatura y el tiempo de incubación estarán en función de las condiciones de crecimiento específicas de los microorganismos por evaluar.

E) Análisis de resultados, indicador de crecimiento

Después del tiempo de incubación analizar los tubos de crecimiento. Dependiendo del tipo de respuesta producida por los microorganismos, puede ser la evaluación del crecimiento (turbidez), cambio de coloración del medio de cultivo o la detección de algún metabolito específico.

Cálculos

Dependiendo de las respuestas obtenidas se utiliza el siguiente procedimiento para calcular el número de microorganismos más probables por gramo de suelo (base seca):

- 1) Ordenar los resultados negativos y positivos por dilución.
- 2) Determinar, de acuerdo con el número de tubos positivos en cada dilución, el número más probable de microorganismos, empleando las tablas de valores reportadas por (NACE, 1990).
- 3) De acuerdo con estas tablas, multiplicar el número de microorganismos por la dilución más baja inoculada.

$$\text{NMP/g suelo húmedo} = V_t * \text{FD}$$

NMP/g suelo húmedo = número más probable de microorganismos por g de suelo húmedo.

V_t = valor de tablas (NACE, 1990).

FD = factor de la primera dilución.

- 4) Corregir la cuenta de microorganismos por la humedad de la muestra para obtener los resultados en base seca.

$$\text{NMP/g suelo seco} = \text{NMP} \times (100/(100-h))$$

h = humedad del suelo con respecto al peso húmedo (%).

Nota: Ejemplo con tres diluciones y tres réplicas por dilución:

Dilución	10^4	10^5	10^6
Respuesta	+ + +	+ - +	- - +
Valor	3	2	1

Buscar el valor de tablas:

$$3, 2, 1 = 15.$$

Multiplicar por la dilución más baja:

$$\text{NMP/g de suelo húmedo} = 15 \times 10^4$$

Suponiendo una humedad de 30%:

$$\text{NMP/g de suelo (base seca)} = 21 \times 10^4$$

6.2.3 Preparación de tubos con medio base para el cultivo de bacterias anaerobias

Introducción

En condiciones de laboratorio, los medios de cultivo proveen las características físicas y químicas del ambiente para el crecimiento de los microorganismos, existiendo una gran diferencia en los requerimientos nutricionales entre las diferentes especies. Gradualmente se han ido perfeccionando los medios de cultivo para hacerlos específicos; para las bacterias anaerobias los medios de cultivo son más delicados que los medios para bacterias aerobias, y la especificidad va aunada a indicadores y secuestradores de oxígeno, los cuales garantizan la efectividad de un medio anóxico.

La preparación de los medios de cultivo anaerobios se basa en la aplicación de dos principios fundamentales: 1) exclusión total de trazas de oxígeno en la preparación y almacenamiento de los medios de cultivo; y 2) mantenimiento de condiciones reductoras estrictas.

Los medios de cultivo específicos para cada grupo de bacterias anaerobias (fermentativas, sulfato reductoras, nitrato reductoras, hierro reductoras, metanogénicas, etcétera), están constituidos por un medio de cultivo base en condiciones anóxicas, el cual se describe a continuación.

Fundamento

El presente método se basa en la preparación de tubos con medio de cultivo base en condiciones anóxicas, al cual sólo hay que adicionar los aceptores de electrones específicos para cada tipo de microorganismo que se quiere crecer. Dichos tubos son utilizados en la cuantificación de microorganismos por la técnica del número más probable.

Interferencias

La presencia de oxígeno es el principal factor de interferencia, por lo que se deben conservar las condiciones anaerobias durante todo el procedimiento.

Material y equipo

- ♦ Frascos Wheaton de 125 ml.

- Agitador magnético.
- Potenciómetro.
- Papel aluminio.
- Balanza analítica.
- Espátula.
- Parrilla de calentamiento.
- Matraz Erlenmeyer de 2 L.
- Pipeta de 10 ml (1/10 ml).
- Gradillas.
- Tubos para cultivo anaerobio tipo Hungate.
- Perilla de tres vías o dosificador de engrane.
- Autoclave.

Soluciones y reactivos

- 1) Nitrógeno (N_2), de preferencia de ultra alta pureza (99.999%), como gas reductor.
- 2) Mezcla de gas N_2/CO_2 , 80/20%.
- 3) Resazurina al 0.1% (ver sección 6.2.2).
- 4) Agua destilada anóxica (ver sección 6.2.2).
- 5) Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) al 10%. Preparar la solución estándar de $NaHCO_3$ en condiciones anóxicas (flujo de N_2) en un frasco Wheaton de 125 ml, pesar 10 g de $NaHCO_3$ por cada 100 ml de agua destilada anóxica (agua previamente hervida y enfriada con N_2) y disolver. Tapar el frasco con un septo de hule y sellar con un casquillo de aluminio, agitar hasta disolver el reactivo y finalmente esterilizar en autoclave por 20 minutos a $121^\circ C$ (15 lb/pulg²).
- 6) Hidróxido de potasio (KOH) 1M. Disolver 56.09 g de KOH en 200 ml de agua destilada y posteriormente aforar a 1L.
- 7) Solución de oligoelementos (Balch *et al.*, 1977). En un frasco de capacidad adecuada disolver 1.5 g de ácido nitrilotriacético en 100 ml de agua destilada, ajustar el pH a 6.5 con KOH 10N; en otro frasco disolver en 100 ml de agua destilada los reactivos listados en la tabla 6.3, agregar esta solución lentamente a la solución de ácido nitrilotriacético previamente preparado, y llevar a 1 L con agua destilada en un matraz volumétrico. Mantener esta solución en refrigeración.

Tabla 6.3 Compuestos de la solución de oligoelementos.

Compuesto	Fórmula	Cantidad
Cloruro de magnesio hexahidratado	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	2.5 g
Cloruro de manganeso tetrahidratado	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.6 g
Cloruro de sodio	NaCl	1.0 g
Cloruro ferroso tetrahidratado	$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	0.1 g
Cloruro de cobalto hexahidratado	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.1 g
Cloruro de aluminio	$AlCl_3$	0.01 g
Acido bórico	H_3BO_3	0.01 g
Molibdato de sodio dihidratado	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.01 g
Cloruro cúprico dihidratado	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.01 g
Cloruro de calcio dihidratado	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1 g
Cloruro de zinc	$ZnCl_2$	0.1 g
Agua destilada		1.0 L

Procedimiento

- 1) En un matraz Erlenmeyer disolver en 1L de agua destilada los reactivos listados en la tabla 6.4 y agitar hasta disolver. Una vez disueltos todos los compuestos se obtiene una solución con tonalidad rosa debido a la resarzurina, indicativo de que hay oxígeno presente en el medio.

Tabla 6.4 Medio de cultivo para el cultivo de microorganismos anaerobios
(Ravot *et al.*, 1995).

Compuesto	Fórmula	Cantidad
Agua destilada		1 L
Cloruro de amonio	NH ₄ Cl	1.0 g
Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄	0.3 g
Fosfato de potasio dibásico	K ₂ HPO ₄	0.3 g
Cloruro de magnesio sexta hidratado	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.2 g
Cloruro de sodio	NaCl	2.0 g
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1 g
Cloruro de potasio	KCl	0.1 g
Extracto de levadura		1.0 g
Tripton peptona		1.0 g
Solución de oligoelementos		10 ml
Cisteína-HCl		0.5 g
Resazurina 0.1%		1 ml

- 2) Ajustar el pH a 7 con un potenciómetro a temperatura ambiente, agregando aproximadamente 0.4 ml de KOH 1N, la tonalidad de la solución se torna azul oscuro o guinda.
- 3) Marcar el nivel de la solución con una línea en el matraz, adicionar de 15 a 25% de agua destilada. Tapar el matraz con papel aluminio haciendo dos pequeños orificios para permitir la salida del vapor y colocarlo en una parrilla para su calentamiento hasta ebullición. Retirar el matraz de la parrilla de calentamiento un poco antes de que el nivel de la solución llegue hasta la marca, y enfriar con un burbujeo de N₂ para mantener las condiciones anóxicas. Una vez frío el nivel del medio debe estar en la marca.

Nota: El cambio de coloración del medio de rosa a transparente es indicativo de la pérdida de oxígeno y de las condiciones anóxicas del medio.

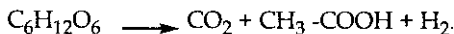
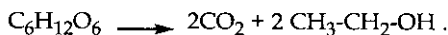
- 4) Una vez que el medio se encuentra a temperatura ambiente, continuar burbujeando con N_2 . Colocar los tubos de cultivo perfectamente limpios en gradillas e introducir una manguera con flujo de N_2 en cada uno de ellos. Para dosificar el medio se utiliza una pipeta de 10 ml con una perilla de tres vías o un dosificador de engranes. Antes de iniciar la dosificación del medio, purgar la pipeta tres veces con N_2 .
- 5) Adicionar en cada tubo 9 ml de medio de cultivo anóxico, tapar con los septos de hule extrayendo la manguera de N_2 , y finalmente colocar el tapón de rosca horadado.
- 6) Cambiar la atmósfera a N_2/CO_2 (80/20) en todos los tubos preparados. En el septo de cada tubo insertar una aguja conectada con la manguera de la mezcla de gases y otra aguja libre para permitir el intercambio de gases durante 30 segundos. Finalmente, esterilizar los tubos de cultivo en autoclave durante 20 minutos, a una temperatura de $121^\circ C$ a 15 lb/pulg^2 de presión.
- 7) Una vez estériles y fríos los tubos con medio de cultivo, adicionar con una jeringa estéril de 1 ml y bajo condiciones anóxicas (purga con nitrógeno) y estériles, 0.2 ml de la solución estéril de $NaHCO_2$ a cada tubo para obtener un pH final de 7.

6.2.4 Bacterias fermentativas

Introducción

Las bacterias fermentativas (por ejemplo *Clostridium*) en ausencia de un aceptador de electrones externo pueden catabolizar los compuestos orgánicos mediante fermentación. En la fermentación los compuestos orgánicos sirven como aceptor y donador de electrones. Estas bacterias pueden fermentar una amplia variedad de compuestos como azúcares, celulosa, proteínas, aminoácidos y purinas. En suelos contaminados con hidrocarburos, bajo condiciones limitadas de oxígeno o anóxicas, las bacterias anaerobias estrictas y facultativas son las que metabolizan los hidrocarburos, utilizándolos como aceptor de electrones o como sustrato. Si el metabolismo no es fermentativo, las bacterias anaerobias utilizan compuestos oxidados como sulfatos, nitratos, Fe^{+3} u otros, como aceptores de electrones.

La fermentación de la glucosa es el proceso más común y se puede representar, mediante la siguiente ecuación química (Suthersan, 1999):



Método

Este método es aplicable para el cultivo y cuantificación de bacterias anaerobias fermentativas, provenientes de muestras de suelo por la técnica NMP.

Fundamento

La cuantificación se basa en el crecimiento específico de bacterias fermentativas de muestras de suelo, en un medio de cultivo anaerobio utilizando glucosa como única fuente de carbono y aceptor de electrones. La cuantificación se realiza por el método de número más probable (NMP), utilizando como indicador positivo el cambio del color del medio de cultivo de azul a transparente. El indicador azul de bromotimol, presente en el medio, funciona como un indicador de acidez; varía a incoloro cuando el medio se acidifica como resultado de la presencia de ácidos orgánicos, producidos por el metabolismo fermentativo.

Material y equipo

- ♦ Jeringas hipodérmicas de 1 ml (0.1/1.0 ml).
- ♦ Frascos Wheaton (serológicos) de 125 ml.
- ♦ Matraz volumétrico de 1 L.
- ♦ Espátula.
- ♦ Cámara de anaerobiosis.
- ♦ Tubos anaerobios con 9 ml de medio de cultivo base, preparados de acuerdo con la técnica 6.2.3 y azul de bromotimol.
- ♦ Autoclave.

Soluciones y reactivos

- 1) Nitrógeno (N_2), de preferencia de ultra alta pureza (99.999%), como gas reductor.
- 2) Agua destilada anóxica (ver sección 6.2.2).
- 3) Glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 1M. Preparar la solución en condiciones anóxicas (flujo de N_2) en frascos Wheaton de 125 ml, pesar 18 g de glucosa por cada 100 ml de agua destilada anóxica, tapar el frasco con un septo de hule y sellar con un casquillo de aluminio, agitar hasta disolver el reac-

tivo y finalmente esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121°C (15 lb/pulg²).

- 4) Hidróxido de sodio (NaOH) 1N. Pesar 40 g de NaOH y adicionarlos cuidadosamente a un matraz volumétrico de 1 L con 500 ml de agua destilada, disolver las lentejas conforme se vayan adicionando. Finalmente aforar con agua destilada.
- 5) Azul de bromotimol 1% en NaOH 1N. Pesar 1 g de azul de bromotimol y disolver en 100 ml de una solución de NaOH 1N. Almacenar en frasco ámbar.

Procedimiento

Este procedimiento comprende la adición de sustratos y aceptores de electrones a tubos con medio de cultivo base, previamente preparados de acuerdo con la técnica descrita en la sección 6.2.3, y el análisis de los resultados para cuantificar el número de microorganismo por la técnica NMP, la cual se detalla en la sección 6.2.2.

Nota: Para este tipo de bacterias se recomienda probar hasta una dilución 10⁻⁶.

A) Adición de sustratos y aceptores de electrones.

- 1) Para este grupo de microorganismos es necesario adicionar el indicador azul de bromotimol al momento de preparar el medio de cultivo base, de acuerdo con la técnica descrita en sección 6.2.3. Adicionar 1 ml de la solución de azul de bromotimol por cada litro de medio preparado.
- 2) Posteriormente, la fuente de carbono se adiciona a los tubos con 9 ml de medio de cultivo base y azul de bromotimol previamente esterilizados.
- 3) Agregar a cada tubo 0.2 ml de la solución estéril de glucosa a través de una jeringa hipodérmica, bajo condiciones estériles y anóxicas (purga con nitrógeno).

B) Condiciones de cultivo.

- 1) Mantener los tubos inoculados a una temperatura controlada de 30°C durante 30 días.

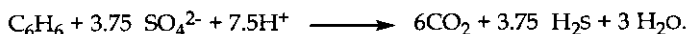
C) Análisis de resultados, indicativo de fermentación.

- 1) Después de los 30 días de incubación, determinar los tubos positivos por el cambio de color del medio de cultivo de azul a incoloro y determinar el número de bacterias de acuerdo con la técnica descrita en la sección 6.2.2.

6.2.5 Bacterias anaerobias sulfato reductoras

Introducción

Los microorganismos definidos como sulfato reductores abarcan una diversidad de bacterias que incluyen el dominio *Archaea* y *Bacteria*. Las bacterias sulfato reductoras son versátiles y capaces de crecer utilizando sulfato u oxianiones de sulfuro como aceptor de electrones y acetato, lactato y glucosa como donadores de electrones. El proceso general de sulfato reducción y de oxidación de benceno con sulfato como aceptor de electrones se muestra a continuación (Suthersan, 1999):



En suelos contaminados con hidrocarburos existen tanto bacterias aerobias como anaerobias que llevan a cabo la degradación de hidrocarburos. Es importante considerar ambos metabolismos, especialmente cuando se quiere seguir la atenuación natural o conocer la microflora de los sitios. En fosas de residuos de perforación existen grandes concentraciones de sulfatos y condiciones de baja concentración de oxígeno, por las arcillas y barita presentes; características que favorecen la presencia de bacterias sulfato reductoras (IMP, 2004).

Método

Este método es aplicable para el cultivo y la cuantificación de bacterias anaerobias sulfato reductoras en muestras de suelo por la técnica NMP.

Fundamento

Este método se basa en el cultivo de bacterias sulfato reductoras presentes en muestras de suelo, en un medio de cultivo anaerobio utilizando acetato como fuente de carbono y sulfato de sodio como aceptor de electrones. La cuantificación se realiza por la técnica del número más probable, utilizando como indicador positivo de la sulfato reducción la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro resultado de la reacción de sulfuro de hidrógeno producido por la reducción biológica de sulfatos, con el cloruro de hierro presente en el medio de cultivo.

Material y equipo

El mismo material requerido en la técnica descrita en la sección 6.2.4.

Soluciones y reactivos

- 1) Agua destilada anóxica. Ver la técnica descrita en la sección 6.2.2.
- 2) Acetato de sodio ($C_2H_3O_2Na$) 0.15 g/ml. Preparar la solución estándar en condiciones anóxicas en frascos Wheaton de 125 ml, pesar 15 g de acetato de sodio por cada 100 ml de agua destilada anóxica y disolver. Tapar el frasco con un septo de hule y sellar con un casquillo de aluminio, agitar hasta disolver el reactivo y finalmente esterilizar en autoclave por 20 minutos a $121^\circ C$ (15 lb/pulg²).
- 3) Sulfato de sodio (Na_2SO_4) 1M. Preparar la solución en condiciones anóxicas en frascos Wheaton de 125 ml, pesar 14.2 g de Na_2SO_4 por cada 100 ml de agua destilada anóxica, tapar el frasco con un septo de hule y sellar con un casquillo de aluminio, agitar hasta disolver el reactivo y finalmente esterilizar en autoclave por 20 minutos a $121^\circ C$ (15 lb/pulg²).
- 4) Cloruro ferroso ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) 1.8 mg/ml. Preparar la solución en condiciones anóxicas en frascos Wheaton de 125 ml, pesar 180 mg de cloruro férrico por cada 100 ml de agua destilada anóxica, tapar el frasco con un septo de hule y sellar con un casquillo de aluminio, agitar hasta disolver el reactivo y finalmente esterilizar en autoclave por 20 minutos a $121^\circ C$ (15 lb/pulg²).

Procedimiento

El procedimiento comprende la adición de sustratos y aceptores de electrones a tubos con medio de cultivo base, previamente preparados de acuerdo con la técnica descrita en la sección 6.2.3, y el análisis de los resultados para cuantificar el número de microorganismos por la técnica NMP, la cual se detalla en la sección 6.2.2.

Nota: Para las bacterias sulfato reductoras se recomienda probar hasta una dilución 10^{-6} .

A) Adición de sustratos y aceptores de electrones.

Agregar, con una jeringa hipodérmica, a cada tubo con 9 ml medio de cultivo base 0.2 ml de la solución estéril de acetato de sodio, 0.2 ml de solución de sulfato de sodio y 0.2 ml de cloruro férrico. Todo se realiza bajo condiciones estériles y anóxicas (purga con nitrógeno).

B) Condiciones de cultivo.

Mantener los tubos inoculados a una temperatura controlada de 30°C durante 30 días.

C) Análisis de resultados, indicativo de sulfato reducción.

Al término del tiempo de incubación determinar los tubos positivos por la formación de un precipitado negro en el medio de cultivo y calcular el número de bacterias de acuerdo con la sección 6.2.2.

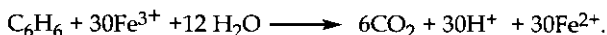
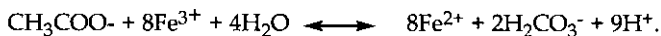
6.2.6 Bacterias anaerobias reductoras de hierro

Introducción

Las bacterias hierro reductoras son una clase especial de microorganismos que utilizan óxidos e hidróxidos de Fe como aceptores de electrones, obtienen energía de la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} acoplada a la oxidación de contaminantes orgánicos y otros metabolitos para formar CO_2 (Lovley, 1991).

Estudios moleculares del DNA ribosomal (DNAr) 16S, en bacterias aisladas de sistemas líquidos, indican que los miembros de la familia *Geobacteraceae* son los microorganismos reductores de Fe^{3+} predominantes (Lovley *et al.*, 1993).

La reducción de Fe^{3+} acoplada a la oxidación de acetato y benceno se presenta en las siguientes ecuaciones (Lovley *et al.*, 1991; Suthersan, 1999):



Método

Este método es aplicable para el cultivo y la cuantificación de bacterias anaerobias hierro reductoras en muestras de suelo por la técnica NMP.

Fundamento

La cuantificación se basa en el crecimiento específico de las bacterias reductoras de hierro presentes en muestras de suelo, en un medio de cultivo anaerobio utilizando acetato como fuente de carbono y Fe^{3+} como

aceptor de electrones. La cuantificación se realiza por el método del número más probable, utilizando como indicador positivo el cambio de color del medio de cultivo, de amarillo a transparente. El color amarillo del medio se debe a la presencia de hierro y el cambio a transparente indica la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} .

Material y equipo

Se emplea el mismo material que se reporta en la técnica descrita en la sección 6.2.4.

Soluciones y reactivos

- 1) Agua destilada anóxica. Ver técnica en la sección 6.2.2.
- 2) Acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$) 0.15 g/ml. Preparar la solución estándar en condiciones anóxicas en frascos Wheaton de 125 ml, pesar 15 g de acetato de sodio por cada 100 ml de agua destilada anóxica y disolver. Tapar el frasco con un septo de hule y sellar con un casquillo de aluminio, agitar hasta disolver el reactivo y finalmente esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121°C (15 lb/pulg²).
- 3) Citrato de hierro ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 0.1 g/ml. Preparar la solución estándar en condiciones anóxicas (flujo de N_2) en frascos Wheaton de 125 ml, pesar 10 g de citrato de hierro por cada 100 ml de agua destilada anóxica y disolver. Tapar el frasco con un septo de hule y sellar con un casquillo de aluminio, agitar hasta disolver el reactivo y finalmente esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121°C (15 lb/pulg²).

Procedimiento

El procedimiento comprende la adición de sustratos y aceptores de electrones a tubos con medio de cultivo base, previamente preparados de acuerdo con la técnica descrita en la sección 6.2.3, y el análisis de los resultados para cuantificar el número de microorganismos por la técnica NMP, la cual se detalla en la sección 6.2.2.

Nota: Para las bacterias hierro reductoras se recomienda probar hasta una dilución 10^{-5} .

A) Adición de sustratos y aceptores de electrones.

Agregar, con una jeringa hipodérmica, a cada tubo con 9 ml de medio de cultivo base, 0.2 ml de las soluciones estériles de citrato de hierro y

0.2 ml acetato de sodio; bajo condiciones estériles y anóxicas (purga de la jeringa con nitrógeno).

B) Condiciones de cultivo.

Mantener los tubos a una temperatura controlada de 30°C durante 30 días.

C) Análisis de resultados, indicativo de hierro reducción.

Al término del tiempo de incubación determinar los tubos positivos por el cambio de color del medio de cultivo de amarillo a incoloro, y calcular el número de bacterias de acuerdo con la sección 6.2.2.

Nota: La presencia de sulfatos en las muestras de suelo podría estimular, a bajas diluciones, la producción de H₂S por bacterias sulfato reductoras. La producción de este metabolito promueve la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro, que disminuye la disponibilidad del hierro para las bacterias hierro reductoras e interfiere en la cuantificación de estos microorganismos. Sin embargo, se ha demostrado que las bacterias hierro reductoras tienen la capacidad metabólica de reducir sulfatos, bajo ciertas condiciones de cultivo como altas concentraciones de este aceptor de electrones, formando también el precipitado negro. Esto dificulta determinar con exactitud qué tipo de bacterias son las que realmente están participando en el sistema cuando hay sulfato presente en el medio.

Es recomendable tener controles estériles de suelo para evitar la formación de otro tipo de precipitados abióticos, resultado de la presencia de compuestos en el suelo como: Fe(OH)₃, Mn(OH)₂, etcétera.

6.2.7 Bacterias nitrato reductoras

Introducción

La desnitrificación es un proceso llevado a cabo por una gran variedad de bacterias, la mayoría de ellas anaerobias facultativas, representantes de casi todos los taxos del dominio *Bacteria*. Estos organismos son constituyentes comunes de las comunidades microbianas, su distribución no necesariamente es afectada por una exposición previa a la contaminación (Cunhingham *et al.*, 1998). La oxidación de benceno hasta CO₂ en condiciones de nitrato reducción se ejemplifica en la siguiente ruta (Suthersan, 1999):



Método

Este método es aplicable para el cultivo y la cuantificación de bacterias nitrato reductoras en muestras de suelo por la técnica NMP.

Fundamento

La cuantificación se basa en el crecimiento específico de bacterias nitrato reductoras presentes en muestras de suelo, en un medio de cultivo anaerobio por la reducción de nitratos, empleando acetato como fuente de carbono. El número de bacterias se determina por el método del número más probable, analizando la aparición de nitritos por la adición de los reactivos de Griess Llosvay y polvo de zinc (Drysdale *et al.*, 2001).

La reacción de Griess Llosvay se basa en la adición de una solución de ácido sulfanílico y una solución ácida de alfa naftilamina, las cuales al reaccionar con los nitritos forman un complejo color rojo de diazonio, p-sulfobenceno-azo- α -naftilamina.

El desarrollo del color rojo después de la adición de los reactivos representa una reacción positiva para la reducción de nitratos. La ausencia de color después de agregar los reactivos representa una reacción negativa, lo cual significa la ausencia de nitritos en el medio. Esta reacción tiene dos explicaciones: (i) que los nitratos no han sido reducidos o (ii) que los nitratos han sido reducidos hasta amonio, óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O) o nitrógeno molecular (N₂). Para distinguir entre una reacción negativa falsa o verdadera es necesario añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc a todas las reacciones negativas. Los iones de zinc reducen los nitratos a nitritos; el desarrollo de un color rojo después de agregar el polvo de zinc indica la presencia de nitratos y confirma la reacción negativa verdadera. Si después de agregar el polvo de zinc el tubo permanece incoloro, significa que los nitratos fueron reducidos hasta óxidos de nitrógeno por la actividad reductora de las bacterias, por lo que la prueba es positiva (Drysdale *et al.*, 2001).

Material y equipo

♦ Se emplea el mismo material que se reporta en la sección 6.2.4.

Soluciones y reactivos

- 1) Agua destilada anóxica. Ver técnica descrita en la sección 6.2.2.
- 2) Acetato de sodio ($C_2H_3O_2Na$) 0.15 g/ml. Preparar la solución estándar en condiciones anóxicas en frascos Wheaton de 125 ml, pesar 15 g de acetato de sodio por cada 100 ml de agua destilada anóxica y disolver. Tapar el frasco con un septo de hule y sellar con un casquillo de aluminio, agitar hasta disolver el reactivo y finalmente esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121°C (15 lb/pulg²).
- 3) Nitrato de potasio (KNO_3) 50 g L⁻¹. Preparar la solución en condiciones anóxicas en frascos Wheaton de 125 ml, pesar 5 g de nitrato de potasio por cada 100 ml de agua destilada anóxica, tapar el frasco con un septo de hule y sellar con un casquillo de aluminio, agitar hasta disolver el reactivo y esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121°C (15 lb/pulg²).
- 4) Ácido acético (CH_3-COOH) 5N. Para preparar 250 ml de solución, medir en una probeta 71 ml de ácido acético puro, vaciar en un matraz aforado de 250 ml y aforar con agua destilada.
- 5) Ácido sulfanílico ($C_6H_7NO_3S$) 8g L⁻¹. Pesar 0.8 g de ácido sulfanílico, agregarlos a un matraz aforado de 100 ml y aforar con ácido acético 5N. Almacenar la solución en un frasco de vidrio y cubrirlo con papel aluminio.
- 6) Solución ácida de alfa-naftilamina ($C_{10}H_9N$) 5g L⁻¹. Pesar 0.5 g de α -naftilamina, agregarlos en un matraz aforado de 100 ml y aforar con ácido acético 5N. Almacenar la solución en un frasco de vidrio y cubrirlo con papel aluminio.

Procedimiento

El procedimiento comprende la adición de sustratos y aceptores de electrones a tubos con medio de cultivo base, previamente preparados de acuerdo con la técnica descrita en la sección 6.2.3, y el análisis de los resultados para cuantificar el número de microorganismos por la técnica NMP, la cual se detalla en la sección 6.2.2.

Nota: Para las bacterias nitrato reductoras se recomienda probar hasta una dilución 10⁻⁵.

A) Adición de sustratos y aceptores de electrones.

Agregar, con una jeringa hipodérmica, a cada tubo con 9 ml de medio

de cultivo base 0.2 ml de la solución estándar estéril de nitrato de potasio y 0.2 ml de solución de acetato de sodio, bajo condiciones estériles y anóxicas (purga con nitrógeno).

B) Condiciones de cultivo.

Mantener los tubos a una temperatura de 30°C durante 30 días.

C) Análisis de resultados, indicativo de nitrato reducción.

Al término del tiempo de incubación realizar la determinación de nitritos en cada tubo.

- 1) Adicionar a cada tubo 0.2 ml de la solución de ácido sulfanílico y 0.2 ml de la solución ácida de naftilamina, agitar vigorosamente y esperar 30 segundos para evaluar la aparición de color. Si aparece un color rojo entonces se considera una reacción positiva (+).
- 2) Si la reacción es negativa (tubos transparentes), entonces agregar una pequeña cantidad de polvo de zinc, agitar vigorosamente y esperar 30 segundos para evaluar la aparición de color. Si aparece un color rojo entonces se considera una reacción negativa (-). Si no aparece ninguna tonalidad se considera una reacción positiva (+).

Contar los tubos con reacción positiva, calcular el número de bacterias de acuerdo con la sección 6.2.2.

6.2.8 Bacterias anaerobias metanogénicas

Introducción

Todos los microorganismos metanógenos conocidos (por ejemplo: *Methanococcus*, *Methanobacterium*) se encuentran dentro de la familia *Euryarchaeota* del dominio *Archaea*. Estos organismos son anaerobios estrictos que producen metano por fermentación de acetato, o utilizando el CO₂ como aceptor de electrones y como donadores de electrones pueden utilizar hidrógeno, acetato, formato, compuestos de metilo y alcoholes. Viven en asociación íntima con bacterias acetogénicas reciclando el H₂ y CO₂ liberado (Suthersan, 1999; Zwolinski *et al.*, 2000).

Las rutas metabólicas que llevan a la formación de metano se muestran en las siguientes ecuaciones (Suthersan, 1999):



El metabolismo metanogénico en suelos contaminados se asocia a la degradación de hidrocarburos.

Método

Este método es aplicable para el cultivo y cuantificación de bacterias metanogénicas en muestras de suelo por la técnica NMP.

Fundamento

La cuantificación se basa en el crecimiento específico de bacterias metanogénicas de muestras de suelo, en un medio de cultivo base anaerobio empleando acetato como fuente de carbono. La cuantificación se realiza por el método del número más probable, utilizando como indicador positivo de la metanogénesis la producción de metano, el cual se detecta por cromatografía de gases.

Material y equipo

- Se emplea el mismo material que se reporta en la técnica descrita en la sección 6.2.4.
- Mezcla de gases $\text{H}_2:\text{CO}_2$ (20:80).

Soluciones y reactivos

- 1) Agua destilada anóxica. Ver técnica descrita en la sección 6.2.2.
- 2) Acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$) 0.15 g/ml. Preparar la solución estándar en condiciones anóxicas en frascos Wheaton de 125 ml, pesar 15 g de acetato de sodio por cada 100 ml de agua destilada anóxica y disolver. Tapar el frasco con un septo de hule y sellar con un casquillo de aluminio, agitar hasta disolver el reactivo y finalmente esterilizar en autoclave por 20 minutos a 121°C (15 lb/pulg²).

Procedimiento

El procedimiento comprende la adición de sustratos y aceptores de electrones a tubos con medio de cultivo base, previamente preparados de acuerdo con la técnica descrita en la sección 6.2.3, y el análisis de los resultados para cuantificar el número de microorganismos por la técnica

NMP, la cuál se detalla en la sección 6.2.2. Para estos microorganismos es necesario realizar el cambio de atmósfera de los tubos de crecimiento en la etapa de inoculación.

Nota: Para las bacterias metanogénicas se recomienda probar hasta una dilución 10^{-4} .

A) Adición de sustratos y aceptores de electrones.

Agregar, con una jeringa hipodérmica, a cada tubo con 9 ml de medio de cultivo base, 0.2 ml de solución estéril de acetato de sodio. Después de la etapa de inoculación, presurizar los tubos con un flujo de $H_2:CO_2$ (20:80) durante 30 segundos, conservando las condiciones estériles.

Nota: Tomar la precaución de no manipular los sistemas cerca de una flama debido a la explosividad del gas H_2 .

B) Condiciones de cultivo.

Mantener los tubos inoculados a una temperatura controlada de $30^\circ C$ durante 60 días.

C) Análisis de resultados, indicativo de metanogénesis.

Al finalizar la incubación, determinar la producción de metano en los tubos de cultivo. La detección de metano se puede realizar por varias técnicas: desplazamiento de medio por el gas, utilizando un tubo pequeño (campana) invertido dentro del tubo de cultivo, por cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama o conductividad térmica. Los sistemas con formación de gas son considerados positivos; calcular el número de bacterias de acuerdo con la sección 6.2.2.

6.3 Cuantificación de la producción de CO_2 en suelo

Introducción

Los suelos son sistemas que cuentan con una flora microbiana propia, la cual dependiendo de su actividad metabólica puede contribuir a la remediación de los sitios contaminados. La actividad metabólica de los microorganismos aerobios y de algunos anaerobios del suelo puede ser cuantificada por medio de la producción de CO_2 , el cual es un producto de la respiración de dichos microorganismos. Además, este parámetro puede estar estre-

chamente relacionado con la degradación de los contaminantes (Alef, 1995; Bossert y Kosson, 1997).

En la respiración, que es la oxidación de la materia orgánica por microorganismos aerobios, el oxígeno funciona como el aceptor final de electrones. El producto final del proceso son CO_2 y agua, por lo que la actividad metabólica de los microorganismos del suelo puede ser cuantificada por la medición de la producción de CO_2 o consumo de O_2 . (Nannipieri *et al.*, 1990). Como otras actividades metabólicas, ésta depende del estado fisiológico de las células y está influida por diferentes factores en el suelo como la humedad, temperatura, disponibilidad de nutrientes y estructura del suelo.

La producción microbiológica de CO_2 en el suelo puede ser determinada incubando el suelo en jarras, cajas de Petri cerradas o en diferentes tipos de matraces o recipientes. Una de las técnicas más sencillas para la cuantificación de CO_2 es adsorbiéndolo en NaOH y BaCl y determinándolo por titulación con HCl. Otros métodos para la determinación de CO_2 se basan en los cambios de conductividad eléctrica de la solución de NaOH o uso de cromatografía de gases (Brookes y Paul, 1987) o espectroscopia de infrarrojo. El consumo de O_2 también puede ser estimado por medio de un electrorrespirómetro o cromatografía de gases para determinar la actividad metabólica de los microorganismos en el suelo (Trevors, 1985).

Método

En esta técnica la medición de CO_2 producido por microorganismos durante la incubación de suelo en un sistema cerrado y a determinadas condiciones, se cuantifica por cromatografía de gases con un detector de conductividad térmica.

Fundamento

Este método es aplicable para medir el CO_2 producido por el metabolismo aerobio y/o anaerobio de microorganismos presentes en muestras de suelo incubadas en sistemas cerrados, mediante cromatografía de gases. De la atmósfera de los sistemas se toma una muestra con una jeringa que se introduce en un cromatógrafo de gases para su cuantificación. En la columna específica (CTR 1), se separan los gases de la muestra que son

acarreados con el helio (gas inerte), los cuales son detectados con un sistema de conductividad térmica. Los detectores de conductividad térmica (DCT) para CG consisten en un filamento calentado térmicamente o termistor. La temperatura del elemento sensible depende de la conductividad térmica del gas que se pasa sobre éste. Los cambios en conductividad térmica, que ocurren cuando las moléculas desplazan el gas acarreador, causan un incremento de temperatura, el cual es detectado como un cambio de resistencia.

El DCT es capaz de detectar concentraciones desde 100% y bajas hasta 100 mg kg⁻¹. Sin embargo, los límites de detección de este método van de 0.1 a 15% de CO₂ producido en el sistema.

Interferencias

Si en la atmósfera de los sistemas por monitorear CO₂ hay evaporación de agua, ésta puede capturarse junto con la muestra e introducirse al cromatógrafo, lo que produce problemas de contaminación en el equipo y lecturas erróneas.

La presencia de carbonatos en los sistemas es una fuente potencial abiótica de CO₂. Fugas en el sistema por monitorear pueden producir pérdidas de CO₂.

Material y equipo

- ♦ Botellas serológicas de 125 ml.
- ♦ Tapones de hule para botellas serológicas.
- ♦ Sellos de aluminio para los tapones de hule.
- ♦ Jeringa para gases de 5 ml.
- ♦ Cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica.

Reactivos

- 1) Helio grado cromatográfico de alta pureza.

Procedimiento

- 1) Sistema de degradación: colocar una muestra de suelo en un recipiente (botella serológica) sellado con un tapón de hule y arillo de aluminio (la cantidad dependerá del tamaño del sistema por establecer); posteriormente, se incubará a condiciones de temperatura, humedad, pH,

establecidas. Las condiciones dependerán del sistema de monitoreo del suelo que se desee evaluar.

Nota: La medición de CO₂ producido también se puede realizar en sistemas abiertos con flujo de aire constante, monitoreando en línea (conectando directamente al cromatógrafo).

- 2) A través del tapón de hule introducir la jeringa para obtener la muestra de gas.
- 3) Tomar con la jeringa de 0.5 a 2.0 ml de muestra de la atmósfera de los sistemas por monitorear.

Nota: El volumen de muestra dependerá del tipo de sistema que se tenga, mientras más actividad microbiana presente el sistema (suelo) menor será el volumen de muestra gaseosa que se requiera; por el contrario, mientras menor actividad microbiana se observe, mayor será el volumen necesario de muestra gaseosa para la cuantificación de CO₂ producido.

- 4) Antes de inyectar la muestra gaseosa, el cromatógrafo de gases debe estar a las condiciones señaladas en la tabla 6.5.

Tabla 6.5 Condiciones de operación del cromatógrafo de gases.

	Condición
Columna CTR 1	Temperatura ambiente (25 °C)
Inyector	40°C
Detector	100°C
Gas acarreador: helio	Flujo de 55 ml/min
Corriente	125 mAmp
Tiempo de corrida	5 min

- 5) Inyectar el volumen total de la muestra de gas tomada en la jeringa en el cromatógrafo de gases.
- 6) El resultado de la medición en este equipo permite cuantificar dióxido de carbono (CO₂), oxígeno (O₂), nitrógeno (N₂) y metano (CH₄). El

primer pico que sale es de inyección, el segundo corresponde a CO_2 , el tercero a O_2 , el cuarto a N_2 y el quinto a CH_4 (Fig. 6.3). Cuando se hace la integración de los datos, eliminar el primer pico de dicha integración, porque el resultado del área de cada pico se toma en porcentaje. Tomar la lectura del área del pico de CO_2 en porcentaje.

- 7) Una vez tomadas las áreas de los picos en porcentaje, se procede a calcular la concentración de CO_2 presente en los sistemas, utilizando la ecuación de los gases:

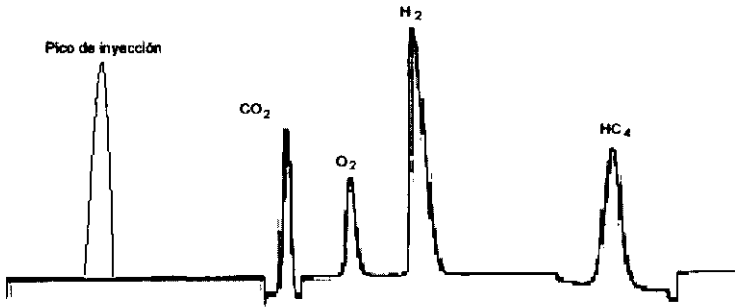


Figura 6.3 Cromatograma donde se muestran los gases que pueden ser cuantificados por CG-DCT.

Cálculos

Para calcular la concentración de CO_2 se emplea la ecuación de los gases ideales:

$$PV = nRT.$$

Despejando

$$n = PV / RT.$$

El resultado en mol CO_2 / g de suelo seco o material seco en el sistema, se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Moles de } \text{CO}_2 / \text{g}_{\text{s.s.}} = \frac{PV * (\% \text{CO}_2 / 100)}{RT * \text{g}_{\text{s.s.}}}$$

Donde:

%CO₂ = área del pico de CO₂ en porcentaje.

P = presión atmosférica (atm).

V = volumen de la atmósfera de los sistemas a medir (L).

R = constante de los gases (0.082205 L * atm / mol * K).

T = temperatura del sistema (° K).

g_{s.s.} = gramos de suelo seco.

La gráfica de CO₂ vs el tiempo deberá construirse de forma acumulativa (sumando las producciones de CO₂).

Nota: Con este mismo método o cuantificación se puede determinar al mismo tiempo el O₂ y N₂ del sistema. Esto permite conocer la cantidad de oxígeno consumido en los sistemas, dato que se utiliza para calcular su coeficiente respiratorio (QR). Este parámetro biológico determina la actividad biológica (estado fisiológico) que ocurre en un sistema y refleja la relación entre el CO₂ producido y el O₂ consumido.

QR = moles CO₂ producido / moles O₂ consumido.

Referencias

- Alef K. 1995. Soil respiration. In: *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. K. Alef and P. Nannipieri (Eds). Academic Press.
- Balch W. E., Schoberth S., Tanner R. S., Wolfe R. S. 1977. *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *Int J Syst Bacteriol.* 27:355-361.
- Bossert I. and Bartha R. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. In: *Petroleum microbiology*. Edited by R. M. Atlas, New York.
- Bossert I. D. and Kosson D. S. 1997. Measurement of hydrocarbon degradation in soils. In: *Manual of environmental microbiology*. C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach, M. V. Walter (Eds). American Society for Microbiology Press, pp. 738-752.

- Brookes P. D. and Paul E. A. 1987. A new automated technique for measuring respiration in soil samples. *Plant Soil*. 101:183-187.
- Cunningham J. A., Hopkins G. D., Lebron C.A., Reinhard M. 2000. Enhanced anaerobic bioremediation of groundwater contaminated by fuel hydrocarbons at Seal Beach, California. *Biodegradation*. 11:159-170.
- Drysdale G. D., Kasan H. C., Bux F. 2001. Assessment of denitrification by the ordinary heterotrophic organisms in an NABEPR activated sludge system. *Water Science and Technology*. 43:147-154.
- Germida J. J. 1993. Cultural methods for soil microorganisms. In: Soil sampling and methods of analysis. M. R. Carter editor. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers, pp. 263-275
- Hurley A. M. and Roscoe M.E. 1983. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. *J Appl Bacteriol*. 55:159-164.
- IMP, 2004. Atenuación natural de suelos contaminados con hidrocarburos. (Informe, en formato electrónico). ISBN 968-489-031-1. ©2004.
- Kuai L., Nair A. A., Polz M. F. 2001. Rapid and simple method for the most-probable-number estimation of arsenic-reducing bacteria. *App Environ Microbiol*. 67(7):3168-3173.
- Lorch H. J., Benckesser G. and Ottow J. C. G. 1995. Basic methods for counting microorganisms in soil and water. In: Methods in applied soil microbiology and biochemistry. K. Alef and P. Nannipieri (Eds). Academia Press, pp.146-161.
- Lovley D.R. 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbial Rev*. 55:259-287
- Lovley D.R., S. J. Giovannoni, D. C. White, J. E. Champine, E. J. P. Phillips, Y. A. Gorby, S. Goodwin. 1993. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Arch Microbiol*. 159:336-344.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 1998. Brock. *Biología de los microorganismos*. M. Gacto F., I. García A., T. González V., R. Guerrero M. y M. Sánchez P. (trads) 8ª. Ed. Rev. y Aum. Prentice may Iberia. Madrid, España, 1064 pp.
- Mejía S. M. A. y Molina L. I. I. 2000. Estudio microbiológico de la rizósfera de plantas que crecen en zonas contaminadas por hidrocar-

- buros con fines de biorremediación. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana.
- NACE International. 1990. Review of current practices for monitoring bacterial growth in oilfield systems. Item: #54281 Houston, TX.
- Nannipieri P., Grego S., Ceccanti B. 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. In *Soil biochemistry*. Vol. 6 Bollag J. M., Stotzky G. (eds). Marcel Dekker, New York, pp. 293-355.
- Oxoid. 1995. Manual de medios de cultivo. UNIPATH España, S.A.
- Pelczar M. J., Reid R. D., Chan E. C. S. 1982. *Microbiología*. 4ª edición. McGraw-Hill.
- Ramírez G. R. M., Luna M. B., Mejía Ch. A., Velázquez M. O., Tsuzuki R. G., Vierna G. L., Müggenburg I. 1992. En: Manual de prácticas de microbiología general. Laboratorio de microbiología experimental. Facultad de Química, UNAM.
- Ravot G., Ollivier B., Magot M., Patel C. 1995 Thiosulfate reduction, an important physiological feature shared by members of the order Thermotogales *Appl Environ Microbiol.* 61:2053-2055.
- Suthersan S.S. 1999. *In situ* bioremediation. Remediation engineering: desing concepts. Ed. Suthan S. Suthersan. Boca Raton: CRC: Press LLC.
- Trevors J. T. 1985. Oxygen consumption in soil: Effect of assay volume. *Soil Biol Biochem.* 17:385-386.
- Vester F. and K. Ingvorsen. 1998. Improved most probable number method to detect sulfate-reducing bacteria with natural media and a radiotracer. *App Environ Microbiol.* 64(5):1700-1707.
- Wrenn A. B. and A.D. Venosa. 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbons degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Can J Microbiol.* 42:252-258.
- Zwolinski M. D., R. F. Harris, W. J. Hickey. 2000. Microbial consortia involved in the anaerobic degradation of hydrocarbons. *Biodegradation.* 11:141-158.

7. Análisis toxicológicos de muestras de suelos

La toxicidad es el grado de efectividad de una sustancia tóxica en humanos, animales, plantas o microorganismos. Este efecto adverso puede tomar varias formas, como enfermedad, deformidad, modificaciones del comportamiento, cambios en la reproducción, daño genético o muerte.

La toxicidad se evalúa mediante bioensayos que consisten en exponer organismos vivos (algas, bacterias, vegetales y fauna en general) a sustancias tóxicas a diferentes concentraciones y registrar los efectos sobre los mismos. Finalmente, se determina para cada concentración el número de organismos afectados, dato con el que se pueden establecer varios parámetros:

CL₅₀ (Concentración letal media). Concentración de tóxico que mata 50% de los organismos ensayados.

CE₅₀ (concentración efectiva media). Concentración de tóxico que produce 50% del efecto tomado como indicador de toxicidad.

Concentración inhibitoria. Concentración de tóxico que inhibe un proceso biológico, tal como la reproducción en un determinado porcentaje.

NOEC (No observed effect concentratio, concentración a la que ningún efecto es observado). Máxima concentración de tóxico para la cual no se observan efectos sobre los organismos ensayados.

LOEC (Low observed effect concentration, concentración más baja en la que un efecto es observado). Mínima concentración de tóxico en la cual se observan efectos sobre los organismos.

Para todos los parámetros definidos anteriormente, cuanto menor sea el valor de CL_{50} para un determinado producto, más elevada será su toxicidad.

Conocer los efectos fitotóxicos que provoca un compuesto permite valorar y determinar los factores de riesgo asociados a su exposición, así como el grado de tolerancia o sensibilidad de la planta examinada. En conjunto, esto puede aportar mayor certeza, aunque no contundente, para vislumbrar el impacto ambiental y poder también atribuir a una especie el papel de bioindicador ambiental para un contaminante o conjunto de ellos.

La fitotoxicidad de un contaminante, por tanto, se evalúa por medio del análisis cualitativo y cuantitativo del efecto provocado en uno o más parámetros fisiológicos que se consideran relevantes o representativos. En este sentido, es común que las pruebas de fitotoxicidad estén orientadas a la valoración de: 1) la mortalidad (toxicidad aguda), 2) el índice de germinación, 3) la elongación radicular, 4) el crecimiento o producción de biomasa, 5) el contenido de clorofila y 6) la tasa fotosintética, entre otras.

7.1 Prueba de germinación de semillas

Introducción

La contaminación del suelo por hidrocarburos del petróleo tiene un efecto adverso sobre las comunidades vegetales. Después de un derrame, los hidrocarburos del petróleo de bajo punto de ebullición exhiben alto grado de toxicidad de contacto en las porciones frágiles o jóvenes de raíces y brotes; sin embargo, tienen poco efecto sobre las partes leñosas de arbustos y de árboles (Adam y Duncan, 2002).

Una de las etapas más importantes del desarrollo de una planta es la germinación de las semillas al emerger el primer cotiledón. En la germinación ocurren cuatro procesos: a) la imbibición o toma física de agua, b) la formación de los sistemas enzimáticos e inicio de la síntesis de proteínas y de ARN, c) la emergencia de la radícula y d) la iniciación del crecimiento.

La activación de la semilla es inhibida ante la presencia de sustancias tóxicas, que afectan su germinación. La división celular de los meristemas radiculares puede afectarse, ya sea por retardo en el proceso de mitosis o alteración en el proceso de alargamiento radicular, por lo que la fitotoxicidad de un compuesto puede ser determinada a través de la medición de la germinación de semillas.

Método

Este método es aplicable para evaluar la fitotoxicidad de hidrocarburos por la prueba de germinación de semillas (*Allium cepa*, *Glycine max*).

El método de referencia utilizado para este bioensayo de toxicidad es el de la EPA-Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4200 (1996), Seed Germination / Root Elongation Toxicity Test.

El método fue modificado de la siguiente forma: el solvente utilizado para el extracto de hidrocarburos fue diclorometano y el solvente usado como cosolvente, junto con el agua para la exposición, fue el dimetil sulfóxido (DMSO) al 0.5%.

Fundamento

En las pruebas de germinación se observa el efecto que causa el tóxico en la promoción o inhibición del surgimiento radicular en la semilla a diferentes concentraciones, se registra la frecuencia del evento y cuando se aprecia al menos 50% de la germinación en el testigo, entonces se considera el tiempo final de la prueba y se comparan los tratamientos.

Material, equipo y reactivos

- ♦ Diclorometano grado HPLC.
- ♦ Agua destilada.
- ♦ Papel filtro Whatman No. 1 o 40.
- ♦ Frascos de vidrio de 250 ml.
- ♦ Cajas de Petri de 210 mm.
- ♦ Probetas de 50 y 100 ml.
- ♦ Papel aluminio.
- ♦ Parafilm.
- ♦ Micropipetas (10-1 000ml).
- ♦ Pipetas graduadas y volumétricas de 1, 5 y 10 ml.

- ♦ Regla o vernier.
- ♦ Campana de extracción.
- ♦ Cámara ambiental / incubadora.
- ♦ Higrómetro.
- ♦ Timer.
- ♦ Balanza semianalítica.

Material biológico

Semillas certificadas de *Allium cepa*, *Glycine max*.

Soluciones

- 1) Hipoclorito de sodio al 5% (cloro). Mezclar 25 ml de hipoclorito de sodio con 475 ml de agua destilada.
- 2) Dimetil sulfóxido 0.5%. Preparar con 2.5 ml de dimetil sulfóxido de sodio con 475 ml de agua destilada.

Procedimiento

Esta metodología requiere de algunas pruebas preliminares o de tamiz con el extracto de hidrocarburo del suelo contaminado. Las pruebas se deben realizar por triplicado para cada tratamiento y llevando a cabo el siguiente procedimiento:

- 1) Extraer el hidrocarburo del suelo contaminado con diclorometano mediante el método de extracción Soxhlet o método de agitación-centrifugación, descritos en la sección 5.2.
- 2) Seleccionar y escarificar (acción de retirar la cubierta de la semilla) las semillas por utilizar con cloro al 5% durante 15 minutos, enjuagar con agua de la llave y al final con agua destilada.
- 3) Colocar discos de papel filtro Whatman No. 1 o 40 de celulosa dentro de la caja de Petri de 110 mm, proporcionales al diámetro de la caja (aprox. 9 cm).
- 4) Adicionar 2 ml de cada una de las disoluciones que son preparadas con diclorometano a partir del extracto de hidrocarburo original, en un intervalo de por lo menos cinco concentraciones (en serie logarítmica, ejem. 0.1, 1.0, 10, 100, 1 000), distribuyendo de forma homogénea sobre papel filtro.
- 5) Como testigo positivo utilizar una caja de Petri agregando 2 ml de diclorometano o del solvente utilizado para la extracción. Y como testigo negativo adicionar únicamente agua destilada.

- 6) Dejar evaporar el disolvente, durante 10 minutos, dentro de la campana de extracción.
- 7) Colocar 10 semillas por cada caja de Petri, distribuyendo de tal forma que se permita un adecuado crecimiento. Se hacen tres réplicas por tratamiento.
- 8) Incubar las semillas dentro de una cámara ambiental controlada a temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y en total oscuridad hasta que 65% de las semillas del testigo negativo haya germinado.
- 9) Agregar 1 ml de la solución de DMSO al 0.5 %, por caja de Petri cada 24 o 72 horas según se requiera en función de la humedad del papel filtro, el cual debe observarse húmedo.
- 10) Registrar el número de semillas germinadas, siguiendo el criterio de germinación con radícula mayor que 5 mm.
- 11) Posteriormente, realizar las pruebas definitivas utilizando un intervalo de concentraciones más reducido (en serie geométrica), seleccionando aquellos tratamientos en los que se observe un efecto adverso, para insertar entre alguno de ellos este nuevo intervalo de concentraciones (ejemplos: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125%).
- 12) Elaborar la curva dosis-respuesta de las diferentes concentraciones en un intervalo reducido y calcular los valores de CL_{50} , por medio del método Probit.

Cálculo de la CL_{50}

La CL_{50} se calcula utilizando el método de regresión Probit, también conocido como método de unidades probabilísticas, que es usado para evaluar la relación de dosis-respuesta de un contaminante sobre un organismo, medida en términos de la concentración letal media (CL_{50}) y su precisión o intervalo de confianza. Se asigna el valor Probit de tablas respecto del porcentaje de mortalidad obtenido para cada concentración o tratamiento, incluyendo los valores de cada una de las réplicas en el análisis de regresión. Los valores Probit se pueden consultar en el trabajo de Finney (1971) sobre el análisis Probit o en libros de estadística en los que se aborden modelos de regresión (Rosner, 1990).

Efectuar el análisis de regresión lineal entre la concentración y la respuesta tóxica, mediante el método mínimos cuadrados. Utilizando los valores obtenidos de la ecuación de la recta, calcular la CL_{50} , considerando el valor de mortalidad o efecto a 50% de individuos utilizados en

cada lote o tratamiento (valor de Y). Calcular el intervalo de confianza a 95% por medio de la desviación estándar y el valor de tablas del estadístico de "t" de Student.

Interpretación de resultados

El resultado es un valor virtual obtenido estadísticamente, en términos de concentración, ya sea en mg de HTP kg^{-1} de suelo o de μg de algún compuesto (ejemplo: HAP); en base seca, este valor se relaciona de forma inversa con el potencial de toxicidad; es decir, una sustancia es más tóxica si requiere de una menor concentración para producir la letalidad o algún otro daño subletal. Para tal efecto se ha establecido una clasificación para asignar categorías de toxicidad en función de la concentración (tabla 7.1).

Tabla. 7.1 Clasificación de la toxicidad en función de la concentración.

Categorías de toxicidad en función de la concentración	Valor
Extremadamente tóxico	$<1 \text{ mg kg}^{-1}$
Altamente tóxico	1 a 50 mg kg^{-1}
Moderadamente tóxico	50 a 500 mg kg^{-1}
Ligeramente tóxico	0.5 a 5 g kg^{-1}
Prácticamente atóxico	5-15 g kg^{-1}
Relativamente inofensivo	Más de 15 g kg^{-1}

Este valor se utiliza de forma comparativa con los valores obtenidos de otras sustancias o mezclas y no se maneja como una constante biológica, esperando una respuesta parecida bajo las mismas condiciones de prueba.

7.2. Prueba de crecimiento de plantas terrestres y de alargamiento radicular

Introducción

La fitotoxicidad generalmente se refiere a la manifestación o aparición de una o más respuestas adversas o desfavorables en las plantas, resul-

tado de la exposición (por una o varias vías) a una sustancia tóxica o mezcla de ellas (Kapustka, 1998).

Comparado con los árboles y arbustos, las plantas herbáceas, especialmente los pastos, tienen características de rápido crecimiento, cualidad que las hace excelentes organismos de prueba para la evaluación de los parámetros biométricos, asimismo pueden ser utilizados como puntos finales de respuesta tóxica (ISO 11269-1, 1994).

Método

Este método es aplicable para evaluar la fitotoxicidad de hidrocarburos por la prueba de crecimiento en plantas terrestres (principalmente de tipo herbáceas y hortalizas) y alargamiento radicular.

Esta prueba se realiza con la combinación de los métodos OECD-208 (1984): *Terrestrial plants, growth test* y US EPA-OPPTS 850.4200 (1996): *Seed germination/ root elongation. Toxicity Test*.

Fundamento

En algunas plantas los hidrocarburos forman una película hidrofóbica alrededor de la raíz, que impide la entrada de agua; esto provoca un estrés hídrico que afecta algunas etapas de su crecimiento; además son vulnerables a las sustancias tóxicas con efectos negativos en los parámetros biométricos ya mencionados. Los efectos adversos en el crecimiento se pueden reflejar en la biomasa del tejido vegetal, ya sea del ejemplar completo o de alguna estructura de interés.

Material, equipo y reactivos

- Agrolita.
- Diclorometano.
- Agua destilada.
- Frascos de vidrio de 250 ml de boca ancha.
- Balanza semianalítica.
- Luxómetro.
- Timer.
- Parafilm.
- Micropipetas (10-1 000 μ L).
- Regla o vernier.

- Cámara ambiental / incubadora.
- Higrómetro.
- Balanza analítica.

Material biológico

Semillas certificadas de *Allium cepa* y *Glycine max*.

Soluciones

Son las mismas que las reportadas en la sección 7.1.

Procedimiento

- 1) Para realizar esta prueba se debe partir del intervalo de concentraciones obtenidas de la prueba de toxicidad aguda (CL_{50}) de germinación de semillas (ver técnica descrita en la sección 7.1) y aplicar concentraciones similares o ligeramente por abajo de CL_{50} .
- 2) Seleccionar y escarificar las semillas (acción de retirar la cubierta de la semilla) con cloro al 5% (ver técnica descrita en la sección 7.1), durante 15 minutos; enjuagar con agua de la llave, 10 minutos, y al final con agua destilada.
- 3) Colocar 10 g de material inerte (agrolita) en un frasco de vidrio de 250 ml y humedecer con 30 ml de agua destilada, alcanzando aproximadamente 40% de humedad.
- 4) Adicionar 2 ml de cada una de las disoluciones preparadas del extracto original preparado con diclorometano, en un intervalo de concentraciones amplio (en serie logarítmica, ejemplo 0.1, 1.0, 10, 100, 1 000), distribuyendo de forma homogénea sobre la agrolita en toda la base del frasco.
- 5) Como testigo positivo utilizar un frasco agregando 2 ml de diclorometano o del solvente utilizado para la extracción. Y como testigo negativo adicionar agua destilada.
- 6) Colocar 10 semillas por cada frasco de 250 ml, distribuyendo de tal forma que se permita un adecuado crecimiento. Hacer tres réplicas por tratamiento.
- 7) Incubar las semillas dentro de una cámara ambiental controlada a temperatura de $22+2^{\circ}C$ y en total oscuridad hasta que 65% de las semillas del testigo negativo hayan germinado.
- 8) Posteriormente, aplicar iluminación con lámparas de luz de día ($30 \mu\text{molm}^{-2}/\text{s}^{-1}$) y con un fotoperiodo de 16:8 luz/oscuridad.

- 9) Adicionar a las plantas diariamente 1 ml de agua destilada conteniendo dimetil sulfóxido al 0.5 %.
- 10) Realizar observación diaria de las plantas y registrar anomalías (decoloración, necrosis de hojas, etcétera).
- 11) Después de 14 días a partir de la germinación se da por terminada la prueba y se miden los parámetros de crecimiento: biomasa, longitud de tallo y raíz. Para determinar el peso de la biomasa en peso seco, se debe secar el tejido en una estufa a 70°C por 24 horas y efectuar el pesado en una balanza analítica.
- 12) De ser necesario, realizar las pruebas definitivas en un intervalo de concentraciones más reducido.
- 13) Elaborar la curva dosis-respuesta de las diferentes concentraciones en un intervalo reducido y calcular los valores de CE_{50} (concentración efectiva media), por el método Probit.

Cálculo de la CE_{50}

Se utiliza el método Probit, también conocido como método de unidades probabilísticas, que es usado para evaluar la relación dosis-respuesta de un contaminante sobre un organismo, medida en términos de la concentración efectiva media (CE_{50}) y su precisión o intervalo de confianza.

Efectuar el cálculo de la misma manera que para la CL_{50} , de acuerdo con la técnica descrita en la sección 7.1

Interpretación de resultados

La interpretación de resultados de la CE_{50} se maneja en los mismos términos que la CL_{50} , es un valor virtual obtenido estadísticamente, en términos de concentración, ya sea en mg de HTP kg^{-1} de suelo o de μg de algún compuesto (ejemplo: HAP); en base seca, este valor se relaciona de forma inversa con el potencial de toxicidad, es decir una sustancia es más tóxica si requiere de una menor concentración para producir la letalidad o algún otro daño subletal.

No se manejan valores de referencia por no ser una constante biológica y sólo se puede interpretar en términos de comparación. Es de gran valía en el contexto de riesgo ambiental, la obtención de los percentiles de 1, 5 y 10%, que permiten obtener niveles de efecto umbral; además, con la

pendiente de la recta se puede estimar el margen de seguridad para el tóxico o contaminante en cuestión.

7.3 Prueba de toxicidad aguda con lombriz de tierra (*Eisenia foetida*)

Introducción

La contaminación del suelo por hidrocarburos del petróleo tiene un efecto adverso sobre las comunidades de invertebrados del suelo, como las lombrices de tierra, nemátodos, otros poliquetos y microartrópodos. En particular la lombriz de tierra ha sido utilizada en estudios en donde se evalúa la sobrevivencia, crecimiento y reproducción.

Estos organismos son cosmopolitas en ambientes en donde se provee suficiente humedad y adecuada temperatura, son vulnerables a la mayoría de los factores que afectan este microecosistema, especialmente aquellos asociados con la aplicación de químicos agrícolas y residuos dispuestos inadecuadamente (ISO 11268-1, 1993).

Método

Este método es aplicable para evaluar la toxicidad aguda de hidrocarburos en la lombriz de tierra (*Eisenia foetida*).

El bioensayo se realiza aplicando los métodos EPA 712-C-96-167-1996: Earthworm subchronic toxicity test, y OECD-207-1984: Earthworm acute toxicity test.

Fundamento

La exposición de estos organismos a suelos y sedimentos contaminados produce el contacto directo con su epidermis, lo que ocasiona un daño dérmico o la absorción de tóxicos por esta vía, al grado de provocar la muerte. La mortalidad en estos organismos es determinada por la falta de movimiento en respuesta a estímulos táctiles definidos en su porción final. Otro aspecto con el que se determina la condición de muerte es la tendencia a la desintegración rápida, queda como remanente del organismo una mancha amarillenta. Los síntomas patológicos previos son las lesiones superficiales y la hinchazón de la porción de intersegmentos o áreas ulceradas en la epidermis.

Materiales, equipo y reactivos

- ♦ Papel filtro Whatman No. 1 o 40.
- ♦ Diclorometano grado HPLC.
- ♦ Agua destilada.
- ♦ Frascos de vidrio de 250 ml.
- ♦ Cajas de Petri de 210 mm.
- ♦ Cámara ambiental / incubadora.
- ♦ Balanza semianalítica.
- ♦ Balanza analítica.
- ♦ Papel aluminio.
- ♦ Parafilm.
- ♦ Micropipetas (10-1 000 μ l).
- ♦ Pipetas serológicas de 1, 5 y 10 ml.
- ♦ Probetas de 50 y 100 ml.
- ♦ Regla o vernier.
- ♦ Higrómetro.

Material biológico

Organismos adultos de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*.

Soluciones

Ver técnica descrita en la sección 7.1.

Procedimiento

Realizar pruebas preliminares o de tamiz con el extracto del suelo contaminado como se indica a continuación:

- 1) Colocar discos de papel filtro Whatman números 1 o 40 de celulosa dentro de cajas de Petri proporcionales al diámetro de la caja de 210 mm de diámetro.
- 2) Colocar un control positivo agregando 1 ml de diclorometano grado HPLC en una caja de Petri. Y un control negativo en el que se adiciona agua destilada en otra caja de Petri (ASTM E1976, 1997).
- 3) Adicionar 2 ml de cada una de las disoluciones que son preparadas con diclorometano, a partir del extracto original, en un intervalo de por lo menos cinco concentraciones en serie logarítmica, (ejem. 0.1, 1.0, 10, 100, 1 000), distribuyendo de forma homogénea sobre papel filtro.
- 4) Dejar evaporar el disolvente por 10 minutos en una campana de extracción.

- 5) Posteriormente agregar en la caja de Petri 1 ml de agua destilada y 0.5 de dimetil sulfóxido al 0.5%, como vehículo para disolver el tóxico adecuadamente para el organismo.
- 6) Colocar cinco lombrices en cada caja, los organismos deben estar previamente pesados y aclimatados por 24 horas, las cajas se incuban en la oscuridad a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa $50 \pm 5\%$.

Nota: La especie *Eisenia foetida* que se selecciona para la prueba debe permanecer dentro del rango de 300-450 mg y debe tener más de seis semanas de edad.

- 7) Registrar los cambios morfológicos observados, así como la mortalidad después de siete días (considerando como muerto al organismo que no responda a ningún estímulo mecánico).
- 8) Adicionar 0.5 ml de agua destilada conteniendo DMSO al 0.5%, cada 48 horas, para evitar la desecación del organismo.
- 9) Realizar las pruebas definitivas utilizando un intervalo de concentraciones más reducido (en serie geométrica), seleccionando aquellos tratamientos en los que se observe un efecto adverso, para insertar entre alguno de ellos este nuevo intervalo de concentraciones (ejemplo: 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125%).
- 10) Elaborar la curva dosis-respuesta de las diferentes concentraciones en un intervalo reducido y calcular los valores de CL_{50} , por medio del método Probit.

Cálculo de la CL_{50}

Ver técnica descrita en la sección 7.1.

Interpretación de resultados

Ver técnica descrita en la sección 7.1.

Referencias

- Adam G., and Duncan H., 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental pollution*. 120: 363-370.
- ASTM E1676. 1997. Standard guide for conducting a laboratory soil toxicity test with lumbricid earthworm *Eisenia foetida*.

- Finney D. J. 1971. Probit analysis. 3 ed. Cambridge University Press, London, pp. 333
- ISO 11268-1. 1993. Soil quality effects of pollutants on earthworms (*Eisenia foetida*). Part 1 Method for the determination of the acute toxicity using artificial soil substrate.
- ISO 11269-1. 1994. Soil Quality Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 1. Method for the measurement of inhibition of root growth.
- Kapustka I and Reporter M. 1993. Terrestrial primary producers en handbook of ecotoxicology, P. Calow (Ed.), Vol. I, Blackwell Scientific Publications, Gran Bretaña, pp. 278-283.
- Loomis TA. 1978. Fundamentos de toxicología. Ed. Acirbia, 1ª ed. Zaragoza España. 274 pp.
- OECD 208. 1984. Terrestrial Plants, Growth test. Guideline for testing of chemicals.
- OECD 207. 1984. Earthworm acute toxicity test. Guideline for testing of chemicals.
- Rosner B. 1990. Fundamentals of biostatistics. 3 ed., Duxbury Press USA, California. 285 p.
- US EPA 712-C-96-154. (OPPTS 850.4200). 1996. Seed germination / root elongation toxicity test. Ecological effects test guidelines. Washington DC.
- US EPA 712-C-96-167. (OPPTS 850.6200). 1996. Earthworm subchronic toxicity test. Ecological effects test guidelines. Washington DC.

Anexo

Comparación de la eficiencia de extracción de hidrocarburos: Métodos Soxhlet / agitación-centrifugación

Debido a que los hidrocarburos que se encuentran en una matriz tan compleja como el suelo no siempre pueden ser removidos fácilmente durante los procesos de extracción, es necesario evaluar su eficiencia de extracción, para lo cual se usa generalmente un estándar interno.

Con base en el número de extracciones sucesivas que se realizan durante el proceso de extracción Soxhlet (sección 5.2.1), se puede considerar como uno de los métodos de extracción con mayor eficiencia de recuperación. Sin embargo, al utilizar este método se restringe el número de muestras que se pueden analizar, tomando en cuenta el tiempo de análisis, el número de plazas disponibles por equipo además de la cantidad de disolvente por utilizar. Por lo anterior, es importante analizar otro tipo de extracciones basado en los posibles equilibrios de partición que se pueden establecer al agitar una muestra de suelo finamente dividida en un disolvente con alta turbulencia, como es el método de extracción agitación-centrifugación propuesto en la sección 5.2.2.

Se comparó la eficiencia de extracción de los dos métodos señalados: Soxhlet y agitación-centrifugación, utilizando como estándar interno 2-fluorobifenilo, de acuerdo con el siguiente procedimiento.

Para evaluar la eficiencia de extracción por el método Soxhlet se trabajó con 5 g de una muestra de suelo sin contaminar, secada previamente y homogeneizada, a la cual se le adicionaron 158 μL de un estándar de 2-fluorobifenilo con una concentración de 2 000 mg kg^{-1} , alcanzando una concentración de 63 mg kg^{-1} .

Para evaluar la eficiencia de extracción por el método agitación-centrifugación se tomaron 2 g de la muestra de un suelo sin contaminar, secada

previamente y homogeneizada, se le adicionaron 63 μL del estándar de 2-fluorobifenilo con una concentración de 2 000 mg kg^{-1} . Alcanzando la misma concentración que en el caso anterior (63 mg kg^{-1}).

Para cada caso se procedió a realizar la metodología descrita en las secciones 5.2.1 y 5.2.2.

Se realizó un análisis cuantitativo de hidrocarburos en suelo por cromatografía de gases (sección 5.4.3) y espectroscopia de infrarrojo (sección 5.4.2).

Los resultados se presentan en la tabla A1, donde se observa que la eficiencia de extracción del estándar 2-fluorobifenilo adicionado al suelo, aun cuando no alcanza 100% de recuperación, para el método Soxhlet es de 88.6% mientras que para el método de agitación-centrifugación es de 87.87%.

Tabla A1 Eficiencia de extracción del estándar 2-fluorobifenilo.

Extracción	Suelo sin estándar (mg kg^{-1})	Suelo con estándar (mg kg^{-1})	Estándar en el extracto (mg kg^{-1})	Eficiencia de extracción (%)
Soxhlet	0	63.0	55.82	88.60
Agitación - centrifugación	0	63.0	54.92	87.87

Con los resultados obtenidos se puede concluir que el método de agitación-centrifugación puede utilizarse al igual que el método Soxhlet, con la ventaja de manejar un mayor número de muestras, en menor tiempo y utilizando una menor cantidad de disolvente.

También se compararon los métodos de cuantificación de hidrocarburos: espectroscopia infrarroja y cromatografía de gases-FID. En la tabla A2 se muestran los resultados correspondientes al promedio de cinco extractos de un suelo contaminado con hidrocarburos obtenidos por cada método de extracción, cuantificados mediante cromatografía de gases CG-FID y por espectroscopia de infrarroja (EIR).

Tabla A2 Comparación de las concentraciones promedio obtenidas para el suelo contaminado.

Tipo de extracción	Concentración promedio mg kg^{-1} de suelo seco	
	CG-FID	E IR
Extracción Soxhlet	141 438 \pm 40 948	110 336 \pm 59 458
Extracción agitación - centrifugación	140 909 \pm 23 667	139 521 \pm 32 841

La concentración de hidrocarburos promedio de los cinco extractos del suelo obtenidos por el método de extracción Soxhlet cuantificada por CG-FID fue 141 438 \pm 40 948 y por espectroscopia infrarroja 110 336 \pm 59 458, mientras que por el método de extracción agitación-centrifugación cuantificada por CG-FID fue 140 909 \pm 23 667 y por espectroscopia infrarroja 139 521 \pm 32 841 (tabla A2). Es importante destacar que la concentración obtenida por el método de agitación-centrifugación además de ser muy similar a la obtenida por extracción Soxhlet, presenta una desviación estándar menor. Se debe señalar que el método de cuantificación por espectroscopia infrarroja presentó una desviación estándar más elevada que la obtenida por el método de CG-FID.

La eficiencia de extracción del método agitación-centrifugación cuantificada por cromatografía de gases es de 99.63%. Lo que indica que este método es excelente, ya que nos reduce el gasto en solventes, así como el tiempo de extracción, permitiendo el manejo de más muestras.

Siglas y abreviaturas

APHA	American Public Health Association
API	Analytical Profile Index
ARN	Ácido ribonucleico
ASTM	American Society for Testing and Materials
CE	Concentración del extracto (F)
CE50	Concentración efectiva 50
CG	Cromatografía de gases
CG/EM	Cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas
CG/FID	Cromatografía de gases/detector de ionización de flama
CIA	Analizador Capilar de Iones
CIC	Capacidad de intercambio catiónico
CL ₅₀	Concentración letal 50
CO	Carbono orgánico
COT	Carbono orgánico total
CS	Concentración de Fe en suelo
DCT	Detectores de conductividad térmica
DMSO	Dimetil sulfóxido
DOF	Diario Oficial
E medido	Potencial redox medido en milivolts (F)
E ref	Potencial redox de referencia (F)
Eh	Potencial relativo al electrodo de hidrógeno (mV) (F)
EIC	Electroforesis ión capilar
EIR	Espectroscopia de infrarroja
EPA	Environmental Protection Agency
FD	Factor de dilución (F)
FDA	Food and Drug Administration
FH	Factor de corrección de humedad (F)
FID	Detector de ionización de flama
HDPE	Recipiente de polietileno de alta densidad
HPA	Hidrocarburos policíclicos aromáticos

HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
HTPs	Hidrocarburos totales del petróleo
INIA	Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas
ISO	International Organization for Standardization
LOEC	Low observed effect concentration
m.o.	Materia orgánica
NACE	National Association of Corrosion Engineers
NMP	Número más probable
NOEC	No observed effect concentration
NRES	Natural Resources and Environmental Sciences
OSWER	Office of Solid Waste and Emergency Response
PDA	Papa-dextrosa-agar
Profepa	Procuraduría Federal de Protección al Ambiente
SARH	Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos
SCD	Detector de quimioluminiscencia
Semarnat	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SI	Sistema Internacional de Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
US EPA	U. S. Environmental Protection Agency
US GS	U. S. Geological Survey