



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE UN SUELO AGRÍCOLA
CONTAMINADO CON HIDROCARBURO**

NADIA VIRIDIANA ARGUIJO PORTILLO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2017



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas
Campeche-Córdoba-Montecillo-Puebla-San Luis Potosí-Tabasco-Veracruz

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Nadía Viridiana Arguijo Portillo**, alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor **Armando Guerrero Peña**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "**Actividad enzimática de un suelo agrícola contaminado con hidrocarburo**" y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y la que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

H. Cárdenas, Tabasco, a 12 de junio de 2017.

Firma

Vo. Bo. Profesor Consejero o Director de Tesis

La presente tesis, titulada: **Actividad enzimática de un suelo agrícola contaminado con hidrocarburo**, realizada por la alumna **Nadia Viridiana Arguijo Portillo**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:


DR. ARMANDO GUERRERO PEÑA

ASESORA:


DRA. VERÓNICA ISIDRA DOMÍNGEZ RODRÍGUEZ

ASESOR:


DR. EUGENIO CARRILLO ÁVILA

ASESOR:


DR. JOEL ZAVALA CRUZ

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO, 30 DE JUNIO DE 2017

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE UN SUELO AGRÍCOLA CONTAMINADO CON HIDROCARBURO

Nadia Viridiana Arguijo Portillo, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

La importancia de los suelos como parte esencial de la producción agrícola y de la sustentabilidad del medio ambiente y de la biósfera, fundamenta el creciente interés por lograr una mayor comprensión del deterioro de su fertilidad por el impacto a nivel microbiológico y bioquímico de compuestos como los hidrocarburos. O bien, para evaluar metodologías de remediación y biorremediación a través de la recuperación de carácter físico-químico, biológico y bioquímico de suelos impactados. En el presente trabajo se analizaron los efectos del petróleo crudo ligero y petróleo crudo pesado sobre las actividades enzimáticas ureasa, fosfatasa y deshidrogenasa, y de la respiración del suelo y el carbono de la biomasa microbiana como parámetros de actividad biológica en un Fluvisol. En la etapa preliminar se desarrolló un método mediante la validación de modelos de calibración lineal construidos por espectrofotometría UV-Vis para cuantificar hidrocarburos en el suelo a bajas concentraciones (menores a 100 mg kg^{-1}), verificando así la ausencia de contaminación por petróleo en el suelo empleado como control. Los resultados de la segunda etapa demuestran que en la mayoría de las propiedades bioquímicas y biológicas, el petróleo crudo ligero (PCL) causó mayor inhibición debido a su contenido de compuestos volátiles de mayor toxicidad. Las actividades ureasa, la respiración y la actividad fosfatasa fueron estimuladas con 200 mg kg^{-1} de petróleo crudo pesado (PCP), obteniéndose valores significativamente más altos; sin embargo, la respiración fue inhibida con el incremento de la concentración de ambos petróleos. Los pH registrados se clasificaron como neutros y moderadamente alcalinos. Los niveles de N total y P fueron bajos mientras que el CO aumentó significativamente conforme se incrementó el nivel de los dos tipos de petróleo. La CIC determinada en los tratamientos se clasificó como media sin mostrar una tendencia conforme a la variación de los niveles de ambos petróleos.

Palabras clave: actividad enzimática, suelo agrícola, petróleo crudo, espectrofotometría UV-Vis, modelos de calibración lineal simple.

ENZYMATIC ACTIVITY OF A HYDROCARBON-POLLUTED AGRICULTURAL SOIL

Nadia Viridiana Arguijo Portillo, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

The importance of soils as an essential component for agricultural production, sustainability of the environment and the biosphere, supports the growing interest for a better understanding of deterioration of soil fertility due to the impact of hydrocarbons on its biological and biochemical properties. Or, to evaluate different remediation and bioremediation methodologies by recovering physical-chemical, biological and biochemical character of impacted soils. In the present research the effects of light crude and heavy crude oil on the enzymatic activities urease, phosphatase and dehydrogenase, and on the soil respiration and microbial biomass carbon as parameters of biological activity in a Fluvisol soil were analyzed. In the preliminary phase, a method was developed by validating linear calibration models constructed by UV-Vis spectrophotometry to quantify hydrocarbons in soil at low concentrations ($<100 \text{ mg kg}^{-1}$), thus verifying that the soil used as control was oil pollution free. The results of the second phase showed that in most of biochemical and biological properties, light crude oil (LCO) caused a greater inhibition due to its content of volatile compounds of greater toxicity. Urease activity, respiration and phosphatase activity were stimulated with 200 mg kg^{-1} of heavy crude oil (HCO), resulting in significantly higher values; however, respiration was inhibited with increasing concentration of both oils. The pH values were classified as neutral and moderately alkaline. Total N and P levels were low while organic C increased significantly as the level of the two types of oil increased. The CIC determined in the treatments was classified as average without showing a tendency according to the variation of the levels of both oils.

Keywords: enzymatic activity, agricultural soil, crude oil, UV-Vis spectrophotometry, calibration models

DEDICATORIA

El fruto del empeño y dedicación en este trabajo lo quiero dedicar a:

A mis padres, Sergio Arguijo y Martha Portillo, que en esta etapa y durante toda mi vida han estado a mi lado, dándome un ejemplo de trabajo y dedicación para alcanzar nuevos logros; y que en ningún momento han bajado la guardia, siempre entregando a su familia lo mejor de sí con un amor incondicional.

A mis hermanas Carmen, Argelia y Lizbeth, y a mis sobrinos Karen y Alexis, porque ustedes también son parte del fruto de este aprendizaje, y que aun en la distancia siempre han estado a mi lado, apoyándome y queriéndome siempre.

A mi tío Manuel, que sé que estará muy orgulloso y contento por este logro, como siempre lo estuvo de cada una de nosotras.

A mi amor Carlos, por estar a mi lado motivándome, alentándome y acompañándome; por ser parte de esta experiencia y de cada aprendizaje. Gracias por ser parte de mi vida y por este logro que de muchas maneras es un logro de ambos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo de investigación.

A cada uno de los profesores que conformaron el Consejo Particular, quienes en todo momento mostraron la mejor disposición para aportar su conocimiento y experiencia a este proyecto: Dr. Armando Guerrero Peña, Dr. Eugenio Carrillo Ávila, Dr. Joel Zavala Cruz y Dra. Verónica Isidra Domínguez Rodríguez, gracias por sumarse al esfuerzo y por su valiosa colaboración en cada una de las etapas del proyecto.

A mis compañer@s de maestría, a los profesores y profesoras que impartieron cursos, a los técnicos del laboratorio de LASPA por su orientación en los experimentos; al personal de Servicios Escolares, de las Subdirecciones de Educación, Vinculación e Investigación del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, gracias por las atenciones brindadas.

A Gabriela Oliva y Karen Alejandro, por su total apoyo en la realización de la etapa experimental de este proyecto.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
OBJETIVOS.....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos particulares.....	3
HIPÓTESIS.....	3
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SUELO.....	4
Ureasa.....	4
Deshidrogenasa.....	5
Fosfatasa.....	6
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL SUELO.....	7
Carbono de biomasa microbiana.....	7
Respiración del suelo.....	7
EFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y BIOLÓGICA DEL SUELO.....	8
LITERATURA CITADA.....	9
CAPÍTULO III. MODELOS DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN ESPECTROMÉTRICA DE HIDROCARBUROS TOTALES DEL PETRÓLEO EN SUELO.....	15
RESUMEN.....	15
ABSTRACT.....	16
INTRODUCCIÓN.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	31
LITERATURA CITADA.....	32
CAPÍTULO IV. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE UN FLUVISOL	

CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE CON DOS TIPOS DE PETRÓLEO CRUDO.....	34
RESUMEN.....	34
ABSTRACT.....	35
INTRODUCCIÓN.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES.....	51
LITERATURA CITADA.....	52
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES.....	55
CONCLUSIONES.....	55
RECOMENDACIONES.....	56

LISTA DE CUADROS

Cuadro 3.1.	Preparación de las soluciones de referencia de petróleo crudo para el escaneo completo de la región UV-Vis (1100-200 nm).....	19
Cuadro 3.2.	ANOVA de los cuatro modelos de calibración.....	27
Cuadro 3.3.	Límites de detección y cuantificación para los modelos de calibración..	31
Cuadro 4.1.	Propiedades físico-químicas del suelo a diferentes niveles de contaminación de dos tipos de petróleo crudo.....	42
Cuadro 4.2.	Propiedades biológicas del suelo a diferentes niveles de contaminación de dos tipos de petróleo crudo (valor medio \pm desviación estándar).....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1.	Espectro completo de la región UV-Vis para el intervalo de concentración de 0 a 1000 mg kg ⁻¹ de las concentraciones de referencia de PCL en hexano y ampliación de la región 254 nm.....	23
Figura 3.2.	Ajuste de las absorbancias de las concentraciones de PCL en hexano en el intervalo de concentración de 0 a 1000 mg kg ⁻¹ , a la recta ajustada mediante regresión lineal de las soluciones de referencia, medidas a 254 nm.....	23
Figura 3.3.	Curvas de calibración de las concentraciones de referencia de petróleo crudo en el intervalo de 0 a 100 mg kg ⁻¹ , en dos solventes. PL=petróleo ligero y PP=petróleo pesado.....	24
Figura 3.4.	Modelos de calibración y coeficientes de determinación obtenidos por el ajuste de las absorbancias.....	25
Figura 3.5.	Gráficos de residuales de las regresiones lineales de los cuatro calibrados para la validación interna de los modelos. PCL=Petróleo crudo ligero y PCP=petróleo crudo pesado.....	28
Figura 3.6.	Coeficientes de correlación entre las muestras observadas y estimadas, obtenidos durante la validación interna de los modelos de calibración. PCL=petróleo crudo ligero y PCP=petróleo crudo pesado.....	29
Figura 3.7.	Coeficientes de correlación obtenidos durante la validación externa de los cuatro modelos de calibración. PCL= petróleo crudo ligero y PP= petróleo crudo pesado.....	30
Figura 4.1.	Propiedades físico-químicas del suelo contaminado a diferentes niveles de petróleo crudo ligero (PCL) y petróleo crudo pesado (PCP). A) pH, B) N _{total} , C) CO, D) P y E) CIC.....	44
Figura 4.2.	Propiedades biológicas del suelo con diferentes concentraciones de petróleo crudo ligero (PCL) y petróleo crudo pesado (PCP). A) Ureasa, B) ADH, C) Fosfatasa, D) CBM y E) Respiración del suelo.....	50

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

El suelo es un componente esencial de los ecosistemas terrestres y es la principal fuente de la producción agrícola (Piotrowska-Dlugosz, 2014). Por tal motivo, su conservación es clave para el aseguramiento de la sustentabilidad del medio ambiente y de la biósfera (Bastida *et al.*, 2008). Desafortunadamente, el petróleo y sus derivados se han vuelto contaminantes comunes para el suelo y se ha observado que ejerce efectos negativos en sus propiedades y sobre la diversidad de flora y fauna (Osuji *et al.*, 2004). Además, el incremento en la concentración de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) disminuye la cuenta microbiana y las actividades enzimáticas (Guo *et al.*, 2012).

En regiones productoras de crudo es común la ocurrencia de derrames que afectan los ecosistemas. El estado de Tabasco, situado en la región sureste de México, se caracteriza por su alta productividad en la extracción de petróleo crudo. El estado es el segundo productor en el país después de Campeche, y actualmente cuenta con una capacidad de producción de 279 mil barriles por día, aproximadamente 15 % menos que en 2015 (327 mil barriles por día) (PEMEX, 2017). Sin embargo, en 2014 se reportaron oficialmente un total de 153 eventos entre derrames y fugas, equivalentes a 5.1 mil barriles (mbls) derramados, y aunque ocurrieron alrededor de 100 eventos menos que en 2012, el volumen derramado en 2014 fue dos veces mayor que en 2012 (PEMEX, 2015). El inventario de suelos contaminados del 2013 reportó una superficie igual a 1020 ha como consecuencia de la actividad petrolera (PEMEX, 2013). La Comisión Nacional de Hidrocarburos (CNH) menciona que en Tabasco ocurrieron el 30 % de los derrames cuantificados y el 50 % de los derrames no cuantificados, desde 2000 al 2014. El volumen en dicho periodo equivale a 37.5 mbls, de los cuales 24.7 mbls ocurrieron en tierra y el resto en mar (CNH, 2015). Por su parte Zavala *et al.* (2005), reportaron al activo Cinco Presidentes como el sitio con mayores problemas de derrames en el estado, con afectaciones principalmente sobre el desarrollo de la vegetación natural y de los pastos cultivados con fines ganaderos.

Los cambios inducidos en el suelo por la contaminación, por factores naturales y por las prácticas de manejo (Piotrowska-Dlugosz, 2014), se pueden evaluar a través de las propiedades bioquímicas y biológicas del suelo debido a que son más sensibles a las condiciones que provocan estrés ambiental, por lo que son consideradas indicadores de la calidad y fertilidad de

los suelos. Los indicadores más frecuentes en estudios son la actividad de diversas enzimas como la ureasa, fosfatasa y deshidrogenasa (Andreoni *et al.*, 2004; Baran *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2012;); la cuantificación de carbono de la biomasa microbiana (Alrumman *et al.*, 2015) y la medida de la actividad metabólica mediante la respiración del suelo (Brohon *et al.*, 2001), entre otros.

Aunque en la literatura predominan estudios realizados en orden de evaluar la efectividad de los métodos de remediación a través de la recuperación de dichas propiedades del suelo, recientemente ha aumentado el interés por estudiar los cambios inducidos en suelos impactados a nivel de su capacidad degradadora y mineralizadora, donde la actividad metabólica y enzimática juegan un papel fundamental (Peña *et al.*, 2007).

Por todo lo anterior, los resultados de este trabajo se presentan en dos secciones. La primera corresponde al Capítulo III, donde se muestran los resultados de la validación de modelos lineales simples para la cuantificación de petróleo crudo mediante espectrofotometría UV-Vis, en suelos contaminados a niveles inferiores a 3000 mg kg⁻¹ de HTP, límite máximo permitido en suelos agrícolas por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (DOF, 2013). Esta etapa de la investigación permitió desarrollar y validar un método sencillo y preciso para determinar bajas concentraciones de hidrocarburos en suelo, siendo una alternativa viable al método gravimétrico que no es apto en suelos con niveles mucho menores 50 000 mg kg⁻¹ de HTP (Fernández *et al.* 2006).

En la segunda sección correspondiente al Capítulo IV, se presentan los resultados del análisis en condiciones de laboratorio de la actividad enzimática y microbiana de un suelo agrícola (Fluvisol) contaminado con petróleo crudo, de tipo ligero y pesado, a diferentes niveles de contaminación, para conocer el impacto en la fertilidad y su relación con su carácter físico-químico. Para tal fin se establecieron los siguientes objetivos e hipótesis:

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el impacto de la contaminación por hidrocarburos de fracción ligera y pesada en la actividad de enzimas y otros indicadores de fertilidad biológica, física y química de un suelo agrícola (Fluvisol).

Objetivos particulares

- Determinar los niveles de HTP en el suelo Fluvisol limpio.
- Medir la actividad ureasa, fosfatasa y deshidrogenasa de un Fluvisol contaminado a diferentes concentraciones de petróleo crudo ligero y petróleo crudo pesado.
- Medir la biomasa microbiana y la respiración de un suelo Fluvisol contaminado a diferentes concentraciones de petróleo crudo ligero y petróleo crudo pesado.
- Medir las propiedades químicas y físicas de un Fluvisol contaminado a diferentes concentraciones de petróleo crudo ligero y petróleo crudo pesado.

HIPÓTESIS

- El suelo Fluvisol limpio contiene HTP en niveles inferiores a los establecidos por la normativa mexicana.
- La actividad de las enzimas evaluadas en el suelo agrícola disminuye conforme aumenta el nivel de contaminación por hidrocarburos y existe efecto por el tipo de petróleo.
- La biomasa microbiana y la respiración disminuyen por el aumento del nivel de contaminación en el suelo y existe efecto por el tipo de petróleo.
- La presencia de hidrocarburo en diferentes concentraciones modifica las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y existe efecto por el tipo de petróleo.

CAPÍTULO II

REVISION DE LITERATURA

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL SUELO

Las células microbianas tienden a gastar lo mínimo de carbono y nutrientes y una de las estrategias para lograr esto es mediante la producción de enzimas extracelulares, las cuales permiten que las células dispongan de nutrientes minerales asimilables, fuentes de energía y moléculas orgánicas de bajo peso molecular (Allison *et al.*, 2011; Burns *et al.*, 2013).

Las enzimas son moléculas proteicas solubles, de naturaleza orgánica y en el interior de las células se encuentran en estado coloidal, formando parte del protoplasma. Si bien son elaboradas por las células vivas, que actúan independientemente de éstas, tienen poder catalítico específico y se destruyen por el calor húmedo a 100 °C (Acosta y Paolin, 2005).

El estudio de la actividad enzimática del suelo permite conocer su potencial para sostener los procesos bioquímicos relacionados con la fertilidad y tales procesos son mediados fundamentalmente por la biota del suelo. La fertilidad está estrechamente ligada a la disponibilidad de compuestos disueltos o de bajo peso molecular que son producidos durante la degradación microbiana de los restos de tejidos orgánicos (Baležentienė, 2012). Las enzimas microbianas, las cuales provienen principalmente de los microorganismos del suelo, de las raíces de las plantas y residuos animales (Zhou *et al.*, 2011), juegan un papel muy importante en dichos procesos, ya que están involucradas desde la despolimerización de las moléculas complejas hasta la mineralización de los compuestos lábiles producidos (Burns *et al.*, 2013), además de que pueden tomarse como indicadores de la efectividad de procesos bioquímicos, incluyendo la descomposición de compuestos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Chen *et al.*, 2016).

Por ello, una gran variedad de actividades enzimáticas han sido propuestas para la evaluación de la funcionalidad de suelos recuperados tras la contaminación por hidrocarburos (Alrumman *et al.*, 2015).

Ureasa

La ureasa es una enzima ampliamente estudiada en análisis de suelos dado que cataliza la hidrólisis de la urea que es suministrada al suelo como fertilizante o mediante la orina de los animales. La urea se hidroliza produciendo NH_3 y CO_2 , con un consecuente aumento del pH y pérdida de N por volatilización de NH_3 (Tabatabai y Bremner, 1972). La enzima puede ser inhibida en presencia de una fuente preferida de N como el amonio (NH_4^+) y su actividad se induce en presencia de la urea u otra fuente alternativa de N. Es ampliamente utilizada para evaluar los cambios en la fertilidad del suelo, ya que su actividad se incrementa después de la fertilización orgánica (Piotrowska-Dlugosz, 2014). La reacción de hidrólisis por la ureasa se presenta a continuación: $\text{H}_2\text{N-CO-NH}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2$

De acuerdo con McCarty y Bremner (1991), aunque la producción de la enzima por los microorganismos del suelo en condiciones anaeróbicas es retardada, aún con la adición de nutrientes disponibles, la actividad enzimática no es inhibida; por el contrario, en condiciones aeróbicas y con disponibilidad de compuestos rápidamente disponibles se incrementa la actividad de la enzima y la actividad microbiana. Además, se ha observado también que la producción de la ureasa disminuye conforme la relación C:N decrece en el suelo (McCarty *et al.*, 1992).

Se ha reportado que la actividad ureasa correlaciona positivamente con la materia orgánica del suelo y con el contenido de arcilla, además de que el C presente en el humus juega un papel importante en el control de la actividad de la enzima (Chakrabarti *et al.*, 2006). En adición, el uso de soluciones amortiguadoras o no en el análisis, es un factor que influye significativamente y se debe considerar.

Deshidrogenasa

Las deshidrogenasas se clasifican como oxido-reductasas. Oxidan la materia orgánica mediante la transferencia de protones y electrones, siendo ésta la donadora de electrones y los compuestos orgánicos los aceptores. Las co-enzimas (NAD o NADP), que participan en la transferencia de H, están involucradas en procesos de reducción durante la biosíntesis, en las rutas de respiración de los microorganismos del suelo, y están estrechamente ligados al tipo de suelo y a las condiciones de agua-aire (Wyszkowska *et al.*, 2006). Aseguran la correcta secuencia de las rutas bioquímicas de los ciclos biogeoquímicos (Kumar *et al.*, 2013). No son enzimas extracelulares,

es decir, se les encuentra formando parte de células intactas (Kumar *et al.*, 2013). Es por ello que la importancia de la actividad deshidrogenasa como indicador de la contaminación ambiental radica en que no se acumula en el reservorio de enzimas extracelulares del medio (Kaczyńska *et al.*, 2015). La actividad deshidrogenasa en el suelo proporciona información de la actividad actual y directa de los microorganismos viables gracias a su carácter intracelular, por lo que es una medida de la actividad microbiana del suelo en general (Kumar *et al.*, 2013).

Entre las enzimas involucradas en la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) se encuentran precisamente las deshidrogenasas, además de la oxigenasa y las enzimas lignolíticas. De ahí su importancia en procesos de degradación y de detoxificación de compuestos xenobióticos (Chen *et al.*, 2016). Por tal motivo ha sido ampliamente estudiada como un indicador en la recuperación de suelos impactados por diversos contaminantes, entre ellos hidrocarburos del petróleo (Trasar-Cepeda *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Alrumman *et al.*, 2015).

En condiciones de laboratorio la cuantificación de la actividad deshidrogenasa se basa en la reducción del cloruro de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio por la complementaria oxidación de las moléculas orgánicas del suelo, dando como producto el 1, 3, 5-trifenil formazán. La intensidad de la coloración de este compuesto es medida espectrométricamente a 485 nm de longitud de onda, y una alta o baja intensidad del color indica una alta o baja actividad enzimática, respectivamente. El método propuesto por Casida *et al.* (1964) es el más ampliamente utilizado.

Fosfatasa

Las fosfatasas pertenecen a la clase de las hidrolasas. Tienen gran valor agronómico que radica en la catálisis de los compuestos fosforados orgánicos hacia fósforo inorgánico, el cual es asimilado por las plantas y microorganismos. La disponibilidad del fósforo en el suelo está ligada al reciclaje de los compuestos fosforados presentes en la materia orgánica del suelo (Tabatabai y Bremner, 1969) y a la capacidad de los suelos de adsorberlos a los iones de Fe y Al. El proceso enzimático que vuelve disponible al fósforo para las plantas y microorganismos consiste en la hidrólisis de los enlaces monoéster y diéster fosfato (Ferreira *et al.*, 2016).

La relación entre el P disponible y la actividad de la enzima en el suelo es compleja, y en suelos con deficiencia del nutriente P la actividad suele inducirse. Es por eso que la actividad de esta enzima en el suelo está en función de la demanda por parte de microorganismos y plantas (Wyszkowska *et al.*, 2006).

Uno de los métodos más ampliamente utilizados en la determinación de la actividad fosfatasa es el propuesto por Tabatabai y Bremner (1969) y su fundamento es la estimación colorimétrica del p-nitrofenol producido por la hidrólisis del p-nitrofenil fosfato de sodio, cuya reacción se desarrolla en una solución amortiguadora a pH 6 y con tolueno que funciona como inhibidor microbiano, a 37 °C durante 1 h. El color desarrollado es muy estable y permite la cuantificación del p-nitrofenol.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL SUELO

Carbono de biomasa microbiana

El carbono de biomasa microbiana (CBM) es la fracción de C contenido en el componente vivo de la materia orgánica del suelo (Carson, 2012). La biomasa microbiana representa del 1-3 % del C orgánico del suelo (Jenkinson, 1977) y se compone principalmente de bacterias y hongos. De acuerdo con Martens (1995), los suelos agrícolas pueden presentar, en términos de CBM, de 200-1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ suelo, y esta fracción microbiana se involucra en procesos de fijación de N y P en el horizonte superficial del suelo, aunque dichos procesos están mediados también por la dinámica de estos microorganismos. Los nutrientes se liberan en el suelo cuando ocurre lisis celular. Se estima que cerca de la mitad de la fracción microbiana del suelo se concentra en los primeros 10 cm del horizonte del suelo (Carson, 2012).

El CBM refleja de forma rápida los cambios inducidos por las prácticas de manejo. Por ejemplo, la incorporación de materia orgánica en el suelo refleja los incrementos en su contenido total después de periodos prolongados (Powlson y Jenkinson, 1981; Powlson y Brookes, 1987), mientras que el CBM es capaz de responder en periodos más cortos a dichas adiciones. De esta manera es posible estudiar los efectos de la incorporación de materia orgánica indirectamente a través de los cambios observados en el contenido de CBM del suelo (Powlson y Brookes, 1987).

El CBM generalmente se determina de acuerdo con el método fumigación-extracción con cloroformo descrito por Vance *et al.* (1987), en el que los vapores del cloroformo provocan la lisis de las células microbianas, sin afectar la fracción no viva de la materia orgánica. Es un método indirecto para medir la cantidad de biomasa microbiana en el suelo (Alrumman *et al.*, 2015).

Respiración del suelo

La respiración es un proceso de rendimiento de energía donde los donadores de electrones son los compuestos reducidos orgánicos o inorgánicos presentes en las células, mientras que los compuestos en estado de oxidación son los aceptores finales de electrones. La respiración aerobia y anaerobia ocurre cuando el aceptor final de electrones es el O₂ en el primer caso y el NO₃⁻ o SO₄²⁻ en el segundo (Pell *et al.*, 2006).

La respiración del suelo es un proceso que contribuye de manera importante en el reciclaje de C y en el flujo de nutrientes, siendo la mayor ruta de intercambio de gases entre el suelo y la atmósfera. Las fuentes principales del flujo de CO₂ en los ecosistemas terrestres son la descomposición de la materia orgánica del suelo, la respiración de los microorganismos heterótrofos y respiración autótrofa de las raíces (Jha y Mohapatra, 2011).

El factor más influyente en la respiración del suelo es la disponibilidad de agua, siendo entre el 50-70 % de la capacidad de campo el nivel óptimo, aunque también son importantes la biodisponibilidad de C, la temperatura y la concentración de O₂ (Pell *et al.*, 2006).

El método para determinar la respiración del suelo consiste en atrapar el CO₂ producido por la respiración en una solución de NaOH. Gracias a la elevada concentración de iones OH⁻, la reacción procede de izquierda a derecha conforme el CO₂ se disuelve: $\text{CO}_2 + 2\text{NaOH} \rightarrow \text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O}$. El NaOH remanente se titula con un ácido que puede ser HCl (Pell *et al.*, 2006).

EFFECTOS DE LA CONTAMINACIÓN POR HIDROCARBUROS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y BIOLÓGICA DEL SUELO

Los hidrocarburos del petróleo son potencialmente peligrosos y persistentes en el ambiente, ya que generalmente contienen pequeñas cantidades de heteroátomos de oxígeno, nitrógeno, azufre, y cantidades traza de vanadio y níquel (Li *et al.*, 2012). Algunos de los compuestos de los hidrocarburos son capaces de bioconcentrarse y bioacumularse a través de las cadenas tróficas (Hentati *et al.*, 2013). La baja solubilidad de los hidrocarburos de fracción pesada (n-alkanos C₂₀-C₄₀) hace que permanezcan mayor tiempo después de que los de bajo y medio peso molecular, C₅-C₉ y C₁₀-C₁₈, respectivamente, se volatilizan o degradan en periodos más cortos por su mayor solubilidad (Zavala *et al.*, 2005). Además, se ha sugerido que el nivel de toxicidad de los hidrocarburos en el suelo puede estar influenciado por las interacciones que se establecen en el medio natural debido a la presencia de otros contaminantes (Shen *et al.*, 2005).

En algunos casos de suelos impactados se han observado respuestas a la presencia de hidrocarburos como el incremento en la biomasa microbiana, o la estimulación de la actividad enzimática en general (Trasar-Cepeda *et al.*, 2000). Sin embargo, Wyszowska *et al.* (2006) aclara que esto no necesariamente representa una relación directa con el mejoramiento de la fertilidad bajo dichas condiciones, debido a que la presencia del contaminante tiende a alterar negativamente el resto de las propiedades físicas y químicas del suelo. Por su parte, Guo *et al.* (2012), observaron que el incremento en la concentración de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) disminuye tanto el número de microorganismos como la actividad de la enzima ureasa.

Se ha reportado que a concentraciones de $\sim 2,500$ mg HTP kg^{-1} en el suelo se afecta el crecimiento de la vegetación (Adams *et al.*, 2008). Como señalan Essien y John (2010), la presencia del petróleo en la capa superficial, donde se concentra la actividad biológica, es capaz de convertir al suelo tóxico e improductivo, aunque el grado de afectación depende de la concentración. Para las raíces de las plantas, el aire, los nutrientes y el agua ya no se encuentran disponibles una vez que el petróleo los desplaza para ocupar el espacio poroso. Los autores observaron hasta 67 % de degradación de propiedades de un suelo areno limoso, incluyendo el contenido de humedad, la permeabilidad/conductividad hidráulica y la tasa de infiltración. Sin embargo, en este caso no fue posible restaurar la tasa de infiltración después de aplicar un tratamiento químico de remediación.

Por otro lado, las características del suelo también pueden contribuir a controlar el efecto de la contaminación por diésel y el queroseno, como lo señalan Alrumman *et al.* (2015), quienes además demostraron que la influencia de los contaminantes sobre la actividad de las enzimas deshidrogenasa y fosfatasa, está relacionada con propiedades como la materia orgánica, la textura, el pH, entre otras.

La actividad deshidrogenasa de un suelo areno arcilloso como indicador de contaminación por diferentes hidrocarburos reveló que el biodiésel, diésel y combustóleo resultaron estimulantes de la actividad y que el petróleo resultó inhibitorio. La adición de composta como bioestimulante fue determinante en dichos resultados (Kaczyńska *et al.*, 2015).

LITERATURA CITADA

Acosta Y. y J. Paolini. 2005. Actividad de la enzima deshidrogenasa en un suelo Calciorthids enmendado con residuos orgánicos. *Agronomía Tropical* 55:217-232.

- Adams, R. H., J. Zavala C. y F. Morales G. 2008. Concentración residual de hidrocarburos en suelos del trópico: afectación a la fertilidad y su recuperación. *Interciencia* 33:483-489.
- Allison, S. D., M. N. Weintraub, T. B. Gartner y M. P. Waldrop. 2011. Evolutionary economic principles as regulators of soil enzyme production and ecosystem function. In: Shukla, G., Varma, A. (Eds.), *Soil Enzymology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 229-243.
- Alrumman, S. A., D. B. Standing y G. I. Paton. 2015. Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University-Science* 27:31-34.
- Andreoni, V., L. Cavalca, M. A. Rao, G. Nocerino, S. Bernasconi, E. Dell'Amico, M. Colombo y L. Gianfreda. 2004. Bacterial community and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57:401-412.
- Baležentienė, L. 2012. Hydrolases related to C and N cycles and soil fertility amendment: responses to different management styles of agro-ecosystems. *Polish Journal of Environmental Studies* 21:1153-1159.
- Baran, S., J. E. Belińska y P. Oleszczuk. 2004. Enzymatic activity in an airfield soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Geoderma* 118:221-232.
- Bastida, F., A. Zsolnay, T. Hernández y G. García. 2008. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* 147:159-171.
- Brohon, B., C. Delolme y R. Gourdon. 2001. Complementary of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biology and Biochemistry* 33:883-891.
- Burns, R. G., J. L. De Forest, J. Marxsen, R. L. Sinsabaugh, M. E. Stromberger, M. D. Wallestein, M. N. Weintraub y A. Zoppini. 2013. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry* 58:216-234.
- Carson, J. 2012. Microbial biomass carbon. *Soil Quality*.
<http://soilquality.org.au/factsheets/microbial-biomass-carbon-nsw>. Cit. 07/06/2017.
- Casida, L. E. Jr., D. A. Klein y T. Santoro. 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Science* 98: 371-376.
- Chakrabarti, K., N. Sinha, A. Chakraborty y P. Bhattacharyya. 2006. Influence of soil properties on urease activity under different agro-ecosystems. *Archives of Agronomy and Soil Sciences* 50:477-483.

- Chen, T., X. Liu, X. Zhang, X. Chen, K. Tao y X. Hu. 2016. Effect of alkyl polyglucoside and nitrilotriacetic acid combined application on lead/pyrene bioavailability and dehydrogenase activity in co-contaminated soils. *Chemosphere* 154:515-520.
- CNH (Comisión Nacional de Hidrocarburos). 2015. Reporte de derrames de petróleo crudo al primer semestre de 2014. http://www.cnh.gob.mx/docs/Reporte_de_volumen_de_petroleo_crudo_derramado_y_fugas_de_gas_natural_I_2014.pdf
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2013. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación, México, 10 de septiembre de 2013. http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5313544&fecha=10/09/2013
- Essien, O. E. y John, I. A. 2010. Impact of crude-oil spillage pollution and chemical remediation on agricultural soil properties and crop growth *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 14:147–154.
- Fernández L., Rojas N., Roldan T., Ramírez M., Zegarra R. y Reyes R. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelo aplicadas a la remediación de sitios contaminados. SEMARNAT-INE-IMP. México, México 180 p.
- Ferreira, A. S., S. P. Espíndola y M. R. C. Campos. 2016. Assessment and kinetics of soil phosphatase in Brazilian Savanna systems. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 88: 1035-1044.
- Guo, H., J. Yao, M. Cai, Y. Qian, Y. Guo, H. H. Richnow, R. E. Blake, S. Doni y B. Ceccanti. 2012. Effect of petroleum contamination on soil microbial numbers, metabolic activity and urease activity. *Chemosphere* 87:1273-1280.
- Hentati, O., R. Lachhab, M. Ayadi y M. Ksibi. 2013. Toxicity assessment for petroleum-contaminated soil using terrestrial invertebrates and plant bioassays. *Environmental Monitoring and Assessment* 185:2989–2998.
- Jenkinson, D. S. 1977. The soil biomass. *NZ Soil News* 25:213-218.
- Jha, P. y K. P. Mohapatra. 2011. Soil respiration under different forest species in the riparian buffer of the semi-arid region of northwest India. *Current Science* 100:1412-1420.

- Kaczyńska, G., A. Borowik y J. Wyszowska. 2015. Soil dehydrogenase as an indicator of contamination of the environment with petroleum products. *Water, Air and Soil Pollution* 226: 372.
- Kumar, S., S. Chaudhuri y S. K. Maiti. 2013. Soil Dehydrogenase Enzyme Activity in Natural and Mine Soil - A Review. *Middle-East Journal of Scientific Research* 13:898–906.
- Li, J., X. Zhou, J. Yan, H. Li y J. He. 2015. Effects of regenerating vegetation on soil enzyme activity and microbial structure in reclaimed soils on a surface coal mine site. *Applied Soil Ecology* 87:56-62.
- Li, X., Y. Du, G. Wu, Z. Li, H. Li y H. Sui. 2012. Solvent extraction for heavy crude oil removal from contaminated soils. *Chemosphere* 88:245–249.
- Martens, R. 1995. Current methods for measuring microbial biomass C in soil: Potentials and limitations. *Biology and Fertility of Soils* 19:87-99.
- McCarty, G.W. y J.M. Bremner. 1991. Production of urease by microbial activity in soils under aerobic and anaerobic conditions. *Biology and Fertility of Soils* 11:228-230.
- McCarty, G.W., D.R. Shogren y J.M. Bremner. 1992. Regulation of urease production in soil by microbial assimilation of nitrogen. *Biology and Fertility of Soils* 12:261-264.
- Osuji, L. C., S. O. Adesiyun y G. C. Obute. 2004. Post-impact assessment of oil pollution in Agbada west plain of Niger Delta, Nigeria: field reconnaissance and total extractable hydrocarbon content. *Chemistry and Biodiversity* 1:1569-1578.
- Pell, M., J. Stenström y U. Granhall. 2006. Soil respiration. *In: Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. Bloem, J., Hopkins D. W. and Benedetti, A. (Eds). CABI Publishing. London, UK. Pp 117-126.
- PEMEX (Petróleos Mexicanos). 2013. Anuario Estadístico 2013. Dirección Corporativa de Finanzas. 71 p. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Pemex_Anuario_estadistico_2013_25400.pdf . Cit. 12 de junio de 2015.
- PEMEX. 2015. Anuario Estadístico 2014. Dirección Corporativa de Finanzas. 80 p. <http://www.pemex.com/ri/Publicaciones/Paginas/AnuarioEstadistico.aspx> . Cit. 10 de junio de 2017

- PEMEX (Petróleos Mexicanos). 2017. Base de Datos Institucional. <http://ebdi.pemex.com/bdi/bdiController.do?action=cuadro&cvecua=ECRURA>. Cit. 31 de mayo de 2017.
- Peña, W., C. Trasar-Cepeda, F. Gil Sotres y M. C. Leirós. 2007. Modification of the degradative capacity of a soil artificially contaminated with diesel. *Chemosphere* 67:1057–1063.
- Piotrowska-Dlugosz, A. 2014. Enzymes and soil fertility. *In*: L. Gianfreda, M. A. Rao (Eds). *Enzymes in Agricultural Sciences*. Omics Group eBooks. Foster City, USA. pp: 20.
- Powlson, D. S. y P. C. Brookes. 1987. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. *Soil Biology and Biochemistry* 19:159-164.
- Powlson, D. S. y D. S. Jenkinson. 1981. A comparison of the organic matter, biomass, adenosine triphosphate and mineralizable nitrogen contents of ploughed and direct drilled soils. *Journal of Agricultural Science* 97:713-721.
- Shen, G., Y. Lu, Q. Zhou y J. Hong. 2005. Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzyme. *Chemosphere* 61:1175-1182.
- Tabatabai, M. A. y J. M. Bremner. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1:301-307.
- Tabatabai, M. A. y J. M. Bremner. 1972. Assay of urease activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 4:479-487.
- Trasar-Cepeda, C., M. C. Leirós, S. Seoane y F. Gil-Sotres. 2000. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology and Biochemistry* 32:1867–1875.
- Vance, E.D., P. C. Brookes y D. S. Jenkinson. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19:703–707.
- Wyszkowska, J., M. Kucharski y J. Kucharski. 2006. Application of the activity of soil enzymes in the evaluation of soil contamination by diesel oil. *Polish Journal of Environmental Studies* 15:501-506.
- Zavala C., J., F. Gavi R., R. H. Adams S., R. Ferrera C., D. J. Palma L., H. Vaquera H., y J. M. Domínguez E. 2005. Derrames de petróleo en suelos y adaptación de pastos tropicales en el Activo Cinco Presidentes, Tabasco, México. *Terra Latinoamericana* 23:293–302.

Zhou, X., G. Yu y F. Wu. 2011. Effects of intercropping cucumber with onion or garlic on soil enzyme activities, microbial communities and cucumber yield. *European Journal of Soil Biology* 47:279-287.

CAPÍTULO III

MODELOS DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN ESPECTROMÉTRICA DE HIDROCARBUROS TOTALES DEL PETRÓLEO EN SUELO

RESUMEN

Los modelos de calibración usados en química analítica deben ser previamente validados para cumplir con su objetivo. Esto se hace generalmente mediante el análisis estadístico de regresión. En el presente trabajo se proponen estrategias de validación interna, en las que el modelo se emplea para estimar una a una las concentraciones de referencia con las que fue calibrado (validación cruzada); y de validación externa, en las que el modelo estima concentraciones de referencia que no fueron usadas en su calibración, con lo cual se demuestra su robustez. Se construyeron y validaron cuatro modelos de calibración lineal simple (MCLS) para determinar hidrocarburos totales del petróleo (HTP) mediante espectrometría UV-Vis; demostrando en todos los casos la linealidad y robustez de los MCLS en el rango estudiado, de acuerdo con los parámetros de validación interna y externa empleados (cuantitativos y gráficos). Por lo tanto, los cuatro MCLS son adecuados para su aplicación en la cuantificación espectrométrica de HTP extractados con diferentes solventes de muestras de suelos o agua, en cantidades que se encuentran dentro de los límites máximos permitidos en la normativa mexicana. En los calibrados se identificó el efecto matricial dado por el tipo de solvente usado para diluir los hidrocarburos así como por el tipo de hidrocarburo, hecho que influyó en los límites de detección y cuantificación.

Palabras clave: modelos de calibración lineal, espectrometría UV-Vis, validación, hidrocarburos del petróleo, suelo.

CALIBRATION MODELS FOR THE SPECTROPHOTOMETRIC QUANTIFICATION OF TOTAL PETROLEUM HYDROCARBONS IN SOIL

ABSTRACT

In order to accomplish the calibration of models applied in analytical chemistry, they must be previously validated. Validation generally relies on regression analysis. This study proposes internal validation based on cross validation, where the model estimated one by one those standard concentrations used for its calibration; and an external validation, where the model estimated standard concentrations that were not used for its calibration, making possible to prove the robustness of each model. Four single linear calibration models (SLCM) were obtained and validated for UV-Vis spectroscopic determination of total petroleum hydrocarbons (TPH). Linearity and robustness of SLCM were demonstrated according to the internal and external validation parameters (cuantitatives and graphical). Therefore, the SLCM are suitable for spectroscopic determination of TPH extracted with different solvents from soil or water samples, in quantities below the limits established by mexican regulations. A matrix effect, given by solvent and hydrocarbon type, had influence upon limits of detection and quantification.

Key words: calibration linear model, UV-Vis spectroscopy, validation, petroleum hydrocarbons, soil.

INTRODUCCIÓN

Los modelos de calibración analíticos construidos con base en espectroscopia UV-Vis para la determinación de los HTP en suelos y de hidrocarburos aromáticos (HA) en aceites vegetales, alimentos asados y en agua, son una alternativa rápida y han demostrado ser adecuados para su aplicación en Análisis Químico Cuantitativo de muestras problema. En su método para la cuantificación de HTP en suelo, Wang *et al.* (2011) obtuvieron y validaron un modelo lineal basándose en el coeficiente de correlación. A su vez, Dost e Ideli (2012) obtuvieron sus modelos de calibración mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) equipado con un detector UV-Vis; la linealidad de dichos modelos, desarrollados para la cuantificación de HA, fue evaluada por el método de mínimos cuadrados.

Si bien la mayoría de las técnicas convencionales de cuantificación de HTP se basan en el método gravimétrico por su sencillez y una relativa rapidez y bajo costo, este sólo es recomendable para suelos que contienen niveles superiores a 50 000 mg kg⁻¹ de HTP o de asfaltenos, dado que en suelos con bajas concentraciones de hidrocarburos disminuye la precisión del método debido al error que implica el manejo de pesos pequeños (Fernández *et al.*, 2006).

En estudios cuyo objetivo es el análisis cuantitativo o identificación de compuestos específicos en mezclas complejas de hidrocarburos como los aromáticos policíclicos, comúnmente se aplican técnicas como la cromatografía de gases (GC) o la HPLC, entre otras (Dost e Ideli, 2012). Sin embargo, estos métodos requieren largos tiempos de análisis por la necesidad de extracción de compuestos específicos, además del alto consumo de reactivos y el elevado costo de los instrumentos.

Los modelos de calibración obtenidos por espectrofotometría son producto de lo que se considera calibración indirecta ya que la cantidad del analito presente en las soluciones de referencia se determina en función de la señal dada por el instrumento analítico (Cuadros-Rodríguez *et al.*, 2001). En los métodos de calibración por espectroscopia UV-Vis que han sido reportados, se muestra que las relaciones entre las concentraciones de referencia de hidrocarburos y la respuesta del espectrofotómetro son adecuadamente descritas por modelos lineales simples. Éstos, además de la estadística descriptiva (medias y desviación estándar de los resultados estimados por los modelos de calibración), consideran como parámetros de validación, y para medir la precisión de las estimaciones realizadas, al coeficiente de

determinación (R^2), el límite teórico de detección, el límite teórico de cuantificación, el análisis de reproducibilidad y de precisión (Dost e Ideli, 2012) y el coeficiente de correlación (r) (Wang *et al.*, 2011).

Barwick (2003) establece paso a paso el proceso para la construcción de calibraciones, incluyendo también los parámetros estadísticos, solo para la validación interna de los modelos de calibración. Entre ellos se encuentran indicadores para evaluar los resultados de la regresión a la que son sujetas las series de datos de calibración como son: 1) el cálculo y representación gráfica de los residuales, y 2) los estadísticos de la regresión como el r , el coeficiente de determinación (R^2), la desviación estándar de los residuales o error estándar, la tabla de ANOVA y los coeficientes de la regresión m y a (pendiente y ordenada al origen), los cuales no son considerados en su totalidad en los estudios realizados por Vogt *et al.* (2000), Wang *et al.* (2011) y Dost e Ideli (2012).

En el presente estudio se presenta la validación interna y externa de modelos de calibración lineal simple obtenidos por espectrofotometría UV-Vis, para determinar HTP en suelos o en agua extractados con diferentes solventes y en niveles que no superan los límites máximos permitidos (3000 mg kg⁻¹ base seca de hidrocarburo de la fracción pesada, en suelos agrícolas) establecidos por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (DOF, 2013).

MATERIALES Y MÉTODOS

Petróleos crudos y solventes orgánicos

Se utilizaron dos tipos de petróleo, crudo ligero (PCL) y crudo pesado (PCP), cuyas densidades reportadas por el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) son de 0.83-0.87 g cm⁻³ y de 0.92 a 1.0 g cm⁻³, respectivamente (IMP, 2014). En tanto, las densidades correspondientes por grados API (*American Petroleum Institute*) son de 31.1 a 39.0 y de 10.2 a 22.3, respectivamente (IMP, 2014). Los solventes empleados en la preparación de las soluciones de referencia o estándares de petróleo crudo fueron hexano ultra puro y éter etílico grado ACS. El primero tiene una polaridad más baja que el segundo, basado en sus constantes dieléctricas (1.9 y 4.3, respectivamente) (UNAM, 2003).

Espectrómetro ultravioleta-visible

Para las determinaciones se utilizó un espectrómetro ultravioleta-visible Perkin Elmer Lambda 10 de haz sencillo, con un intervalo de escaneo de 200 a 1100 nm.

Análisis preliminar de un calibrado de petróleo crudo mediante espectrometría

En un análisis preliminar se obtuvo el espectro completo de la región UV-Visible (1100 a 200 nm) de soluciones de referencia de 0 a 1000 mg L⁻¹ de PCL diluido con hexano (el solvente). En el Cuadro 3.1 se indica su preparación, la cual fue realizada en matraz volumétrico clase A de 25 mL. Se prepararon 17 concentraciones, número mucho mayor de siete, que es el mínimo indicado por Barwick (2003). Los registros fueron realizados cada 2 nm. Esta prueba fue desarrollada para conocer el espectro completo de cada una de las soluciones preparadas y con la cual fue seleccionada la longitud de onda (λ) que mejor correlación lineal demostró entre la concentración de PCL y la absorbancia.

Cuadro 3.1. Preparación de las soluciones de referencia de petróleo crudo para el escaneo completo de la región UV-Vis (1100-200 nm). PCL = Petróleo crudo ligero.

Concentración de PCL (mg L ⁻¹)	Solvente (mL)	Alícuota del estándar de 10 mg L ⁻¹ (mL)
0	25	0
1	22.5	2.5
2	20	5
4	15	10
6	10	15
8	5	20
10	0	25

Concentración de PCL (mg L ⁻¹)	Solvente (mL)	Alícuota del estándar de 100 mg L ⁻¹ (mL)
20	20	5
40	15	10
60	10	15
80	5	20
100	0	25

Concentración de PCL (mg L ⁻¹)	Solvente (mL)	Alícuota del estándar de 1000 mg L ⁻¹ (mL)
200	20	5
400	15	10
600	10	15
800	5	20
1000	0	25

Preparación y análisis por espectrofotometría UV-Vis de los calibrados de PCL y PCP en dos diferentes solventes

Al incluir los dos tipos de petróleo crudo y los dos solventes, fueron preparadas cuatro soluciones de referencia con las combinaciones siguientes de solvente-petróleo crudo: 1) hexano-petróleo crudo ligero, 2) hexano-petróleo crudo pesado, 3) éter-petróleo crudo ligero y 4) éter-petróleo crudo pesado. En todos los casos fueron utilizadas ocho concentraciones de referencia (el mínimo indicado por Barwick, 2003, es siete), y éstas fueron: 0, 4, 8, 20, 40, 60, 80 y 100 mg L⁻¹; se prepararon cinco repeticiones de cada concentración. La absorbancia de todas las soluciones fue medida en un espectrómetro UV-Vis a 254 nm, longitud de onda para la que se encontró la mejor correlación lineal entre la concentración de petróleo crudo y la absorbancia, definida en la etapa previa. Los resultados se graficaron para la obtención de las curvas de calibración y sus respectivos modelos de calibración lineal, construidos mediante una regresión lineal simple entre los valores de concentración y absorbancia.

Validación de los modelos de calibración

La validación de los modelos obtenidos fue realizada en dos etapas. Las soluciones preparadas (ocho concentraciones con cinco repeticiones) fueron divididas en dos grupos. Para el primer grupo, al que se le denominó grupo de entrenamiento, fue utilizado el 90 % para construir el modelo y para la calibración o validación interna; mientras que el 10 % restante se denominó grupo de validación, y fue utilizado para la validación externa del modelo.

Validación interna o calibración

La construcción de cada modelo fue realizada con 35 concentraciones de referencia (siete concentraciones con cinco repeticiones) preparadas como se explicó antes (90 % del total preparado). La validación se realizó mediante la técnica conocida como validación cruzada, la cual fue realizada dividiendo el total de las soluciones de referencia de entrenamiento en 35 grupos; de los cuales 34 fueron tomados para establecer una primera calibración mediante una regresión lineal simple y uno para la predicción o validación. El proceso fue repetido hasta encontrar un modelo lineal con el que cada concentración de referencia es predicha con el resto del grupo de calibración. La precisión de los modelos se determinó mediante el cálculo del coeficiente de determinación (R^2), el análisis de varianza (ANOVA) de la regresión entre valores medidos y estimados, los residuales y el error absoluto medio (EAM). Además, en este trabajo se

propone utilizar el grado de asociación (r) entre las concentraciones estimadas por dichos modelos y el conjunto de concentraciones de referencia correspondientes para medir su precisión, y una prueba t de Student para datos apareados también para dichos valores. Los estadísticos empleados se describen a continuación (Marqués, 2010):

Coficiente de determinación (R^2) del modelo de regresión lineal

$$R^2 = (r)^2 \quad (1)$$

Donde:

r = Coeficiente de correlación para las variables de las curvas de calibración

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\{[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2][\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}} \quad (2)$$

x_i = Valor observado en el eje x

y_i = Valor observado en el eje y

\bar{x} = Media de los valores x_i

\bar{y} = Media de los valores y_i

n = número de puntos de calibración

Residuales (e_i) y error absoluto medio EAM

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad (3)$$

$$EAM = \frac{\sum_{i=1}^n |e_i|}{n} \quad (4)$$

Análisis de varianza (ANOVA) de la regresión de las curvas de calibración

Suma de cuadrados de los residuales:

$$SC_{residuales} = \sum_{i=1}^n (e_i)^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (5)$$

Suma de cuadrados de la regresión:

$$SC_{regresión} = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (6)$$

Pendiente (m) de la línea de regresión:

$$m = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (7)$$

Ordenada al origen (a) de la línea de regresión

$$a = \bar{y} - m\bar{x} \quad (8)$$

Donde:

\hat{y}_i = Valores de y estimados por la ecuación de regresión para un valor dado de x .

Prueba t de Student para datos apareados entre concentraciones estimadas por los modelos y las concentraciones de referencia

$$t = \frac{(\bar{x}_d)(\sqrt{n})}{s_d} \quad (9)$$

Dónde:

\bar{x}_d = Media de las diferencias de los valores de las variables

n = Número total de diferencias

s_d = Desviación estándar de las diferencias de los valores de las variables

Validación externa

Para la validación externa fueron utilizados los modelos lineales construidos mediante regresión y seleccionados con el grupo de entrenamiento durante la validación interna o calibración; y con cada modelo fueron estimadas las concentraciones de referencia que componen el grupo de validación (equivalente al 10% de las mediciones que se omitieron en la construcción y calibración de los modelos). En la validación externa se calculó el valor de r para establecer el grado de asociación entre las concentraciones estimadas y las concentraciones de referencia del set del 10 % de las mediciones, y el estadístico t de Student para datos apareados, ambos descritos en el apartado anterior.

También fueron calculados los límites de detección y los límites de cuantificación de cada modelo. El primero se obtuvo sumando la media de las concentraciones estimadas por el modelo más tres veces su desviación estándar; el segundo se calculó sumando la media de las concentraciones estimadas más 10 veces su desviación estándar (Shrivastava y Gupta, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis preliminar de un calibrado de petróleo crudo mediante espectrometría

La obtención del espectro completo de la región UV-Vis (Fig. 3.1) de las soluciones de referencia (0 a 1000 mg L⁻¹) de PCL permitió identificar que en la longitud de onda λ de 254 nm las soluciones presentan un pico de absorción con respuesta lineal entre la concentración de PCL y la absorbancia. Posteriormente este resultado fue ratificado repitiendo la medición de dichas soluciones, pero únicamente a una λ de 254 nm, también en el intervalo de concentración de 0 a 1000 mg kg⁻¹. Con las absorbancias obtenidas del segundo análisis se construyó el gráfico con la recta ajustada por regresión, que se muestra en la Figura 3.2.

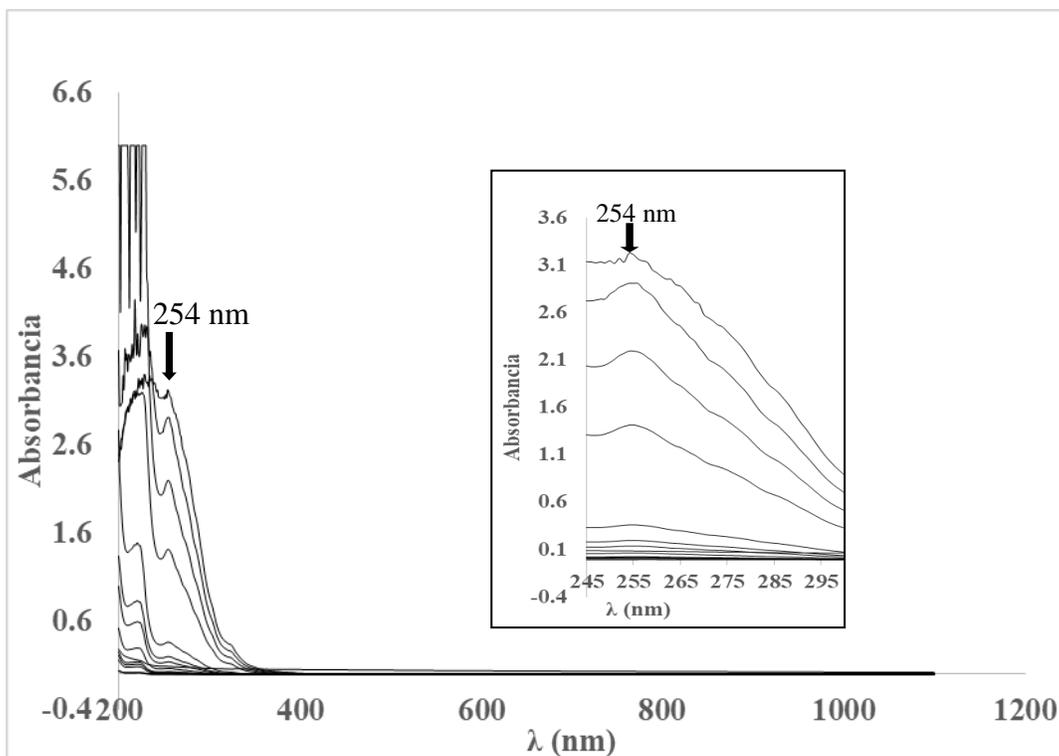


Figura 3.1. Espectro completo de la región UV-Vis para el intervalo de concentración de 0 a 1000 mg kg⁻¹ de las concentraciones de referencia de PCL en hexano y ampliación de la región 254 nm.

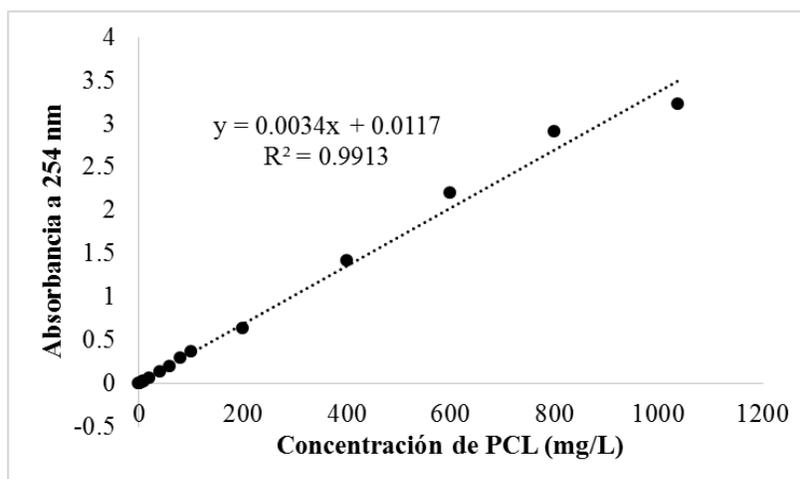


Figura 3.2. Ajuste de las absorbancias de las concentraciones de PCL en hexano en el intervalo de concentración de 0 a 1000 mg kg⁻¹, a la recta ajustada mediante regresión lineal de las soluciones de referencia, medidas a 254 nm.

La λ de 254 nm seleccionada en el presente estudio coincide con la reportada por Dost e Ideli (2012) quienes observaron que en dicha longitud de onda se encontró la mejor respuesta lineal

para nueve hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en la región UV. Por su parte, Wang *et al.* (2011) observaron una absorción estable a una λ de 230 y 200 nm para una mezcla de hidrocarburos disueltos en diclorometano y hexano, respectivamente.

Preparación y análisis por espectrofotometría UV-Vis de los calibrados de PCL y PCP en diferentes solventes

En la Figura 3.3 son presentados los gráficos de las cuatro curvas de calibración, teniendo para cada concentración de ambos petróleos cinco repeticiones. La representación gráfica de los puntos de calibración (absorbancia-concentración de petróleo crudo) es una opción rápida para observar el comportamiento de los datos en cuanto a linealidad, siendo una forma cualitativa de evaluarla. También se observa el efecto matriz de la combinación solvente-petróleo crudo, en las diferentes pendientes de cada combinación.

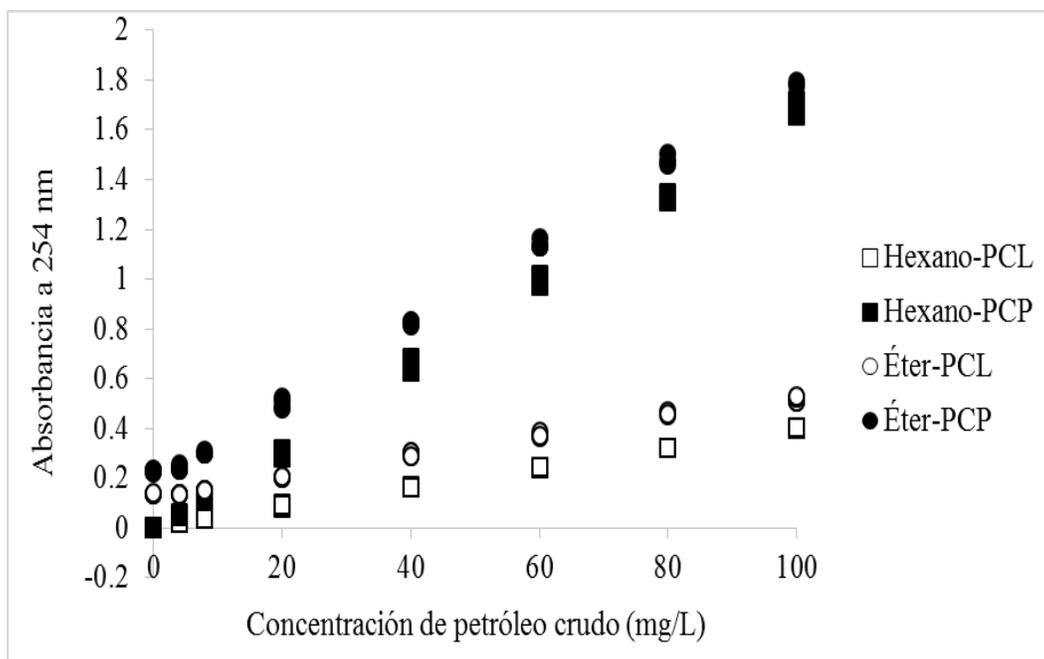


Figura 3.3. Curvas de calibración de las concentraciones de referencia de dos tipos de petróleo crudo en el intervalo de 0 a 100 mg kg⁻¹, en dos solventes. PCL=petróleo crudo ligero y PCP=petróleo crudo pesado.

Validación de los modelos de calibración

Validación interna o calibración

Coefficiente de determinación (R^2) del modelo de regresión lineal

Como resultado del proceso de validación interna se construyeron cuatro modelos lineales entre la absorbancia a 254 nm y la concentración de cada tipo de petróleo crudo (Fig. 3.4) con valores de R^2 obtenidos de 0.9952 a 0.9996. Esto significa que los modelos explican en promedio el 99.74 % de la variabilidad de los resultados. Valores de R^2 similares fueron obtenidos por Dost e Ideli (2012) durante la validación de un método de detección de diferentes hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) por HPLC/UV-Vis, usando acetonitrilo como solvente; y por Wang *et al.* (2011), con valores de 0.9998 en mezclas de hidrocarburos de petróleo disueltos en hexano y en diclorometano.

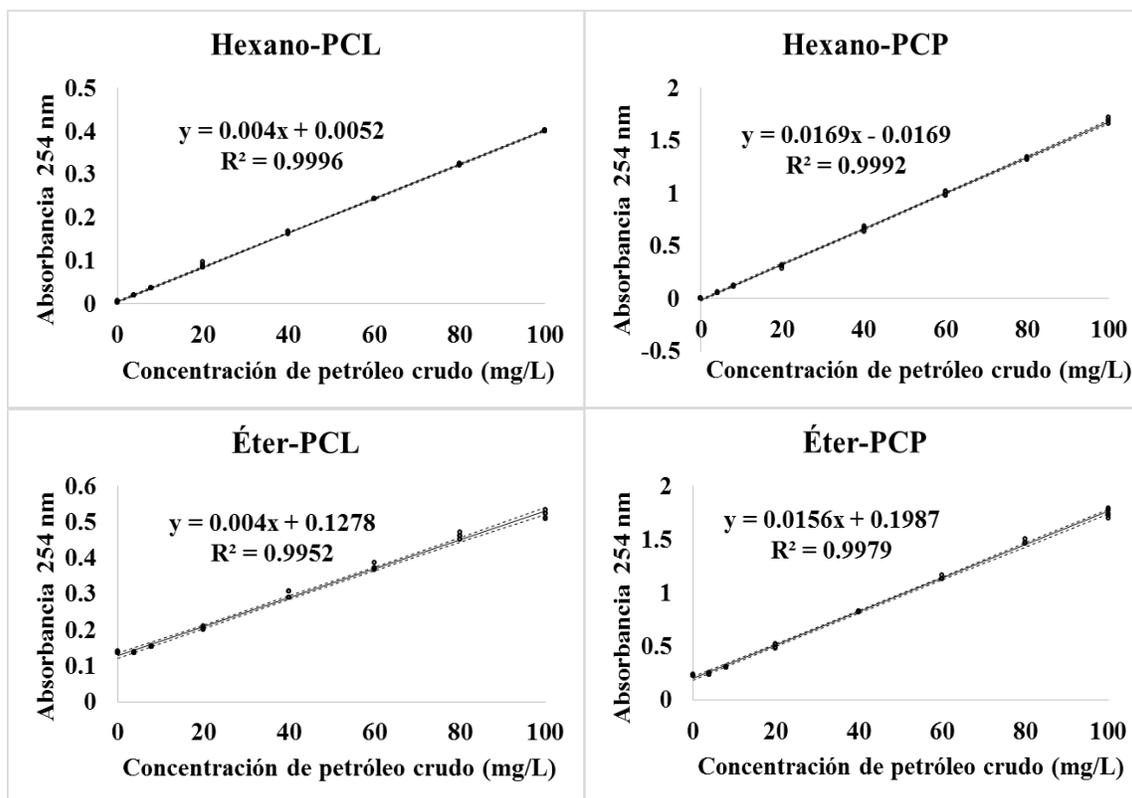


Figura 3.4. Modelos de calibración y coeficientes de determinación obtenidos por el ajuste de las absorbancias experimentales a la recta ajustada mediante regresión lineal simple para la validación interna, con bandas de confianza al 99 % de probabilidad. PCL=petróleo crudo ligero y PCP=petróleo crudo pesado.

En la Figura 3.4 se observa también que para los calibrados con petróleo crudo ligero (PCL) y petróleo crudo pesado (PCP), el solvente usado influye modificando los valores de la ordenada al origen en las ecuaciones de regresión, siendo en ambos casos mayores con éter etílico que con hexano. Por otra parte, los valores de la pendiente se ven influenciados por el tipo de hidrocarburo, siendo mayores con el petróleo pesado en ambos solventes.

Analizando particularmente el caso de los modelos a base de PCL, la pendiente conserva su valor indistintamente del solvente usado ($m=0.004$). Sin embargo, la pendiente mostró un ligero aumento con el hexano respecto al éter etílico (0.0169 y 0.0156, respectivamente) en los modelos a base de PCP.

En la Figura 3.4 se observa que el intervalo de confianza (IC) al 99 % (la región enmarcada por las bandas punteadas a ambos lados de la recta ajustada) es muy estrecho para las cuatro líneas ajustadas, especialmente para los calibrados donde se usó hexano como solvente; lo cual coincide con los bajos valores de los residuales. Barwick (2003) indica que el IC es el intervalo dentro del cual los valores de la curva no ajustada deberían caer con un 99% de probabilidad; mientras que Newcombe (1998) lo define como el margen de error para un punto estimado por el modelo.

ANOVA de la regresión

El análisis de varianza es considerado un método no gráfico para evaluar la linealidad de un modelo de calibración (Raposo, 2016). El ANOVA de los modelos de regresión de los cuatro calibrados (Cuadro 3.2) muestra que las sumas de cuadrados de las regresiones son superiores a la suma de cuadrados de los residuales en todos los casos. Esto indica que el modelo del calibrado Hexano-PCL es capaz de describir el 99.96 % de la variabilidad de los datos, el del Hexano-PCP en un 99.92 %, el del Éter-PCL en un 99.52 % y el del Éter-PCP en un 99.79 %.

El elevado valor de F en los cuatro modelos indica un alto grado de la relación de linealidad de los datos de calibración, dado por el contraste de valores en los promedios de los cuadrados entre la regresión y los residuales.

Residuales y EAM

La distribución de los residuales de acuerdo con la Figura 3.5 indica un comportamiento más aleatorizado para el calibrado Hexano-PCL que en el resto, destacando además que el rango de dichos valores fue el más cercano a cero (0.0122 a -0.0033). Los rangos correspondientes a los

residuales de los calibrados Éter-PCL, Hexano-PCP y Éter-PCP presentaron una dispersión respecto al cero en el orden siguiente: 0.0209 a -0.0215, 0.0450 a -0.0359 y 0.0557 a -0.0663, respectivamente.

El EAM o promedio de los valores absolutos de los residuales es catalogado como una medida de desviación (Mayer y Butler, 1993) aplicada en la validación de modelos de calibración. Los valores para los calibrados Hexano-PCL, Hexano-PCP, Éter-PCL y Éter-PCP fueron 0.0017, 0.0133, 0.0081 y 0.0214, respectivamente.

Cuadro 3.2. ANOVA de la regresión de los cuatro modelos de calibración.

Hexano-PCL					
	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>F crítica</i>
Regresión	1	0.71846936	0.71846936	86096.4487	5.8204E-58
Residuos	33	0.00027538	8.3449E-06		
Total	34	0.71874474			
Hexano-PCP					
	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>F crítica</i>
Regresión	1	12.0796147	12.0796147	42363.2316	6.9845E-53
Residuos	33	0.00940975	0.00028514		
Total	34	12.0890244			
Éter-PCL					
	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>F crítica</i>
Regresión	1	0.73864744	0.73864744	6878.49859	6.9648E-40
Residuos	33	0.0035437	0.00010738		
Total	34	0.74219114			
Éter-PCP					
	<i>GL</i>	<i>SC</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>F crítica</i>
Regresión	1	11.2470541	11.2470541	15714.2794	8.738E-46
Residuos	33	0.02361882	0.00071572		
Total	34	11.270673			

PL = Petróleo ligero; PP = Petróleo pesado; GL= grados de libertad; SC= suma de cuadrados; CM= cuadrado medio.

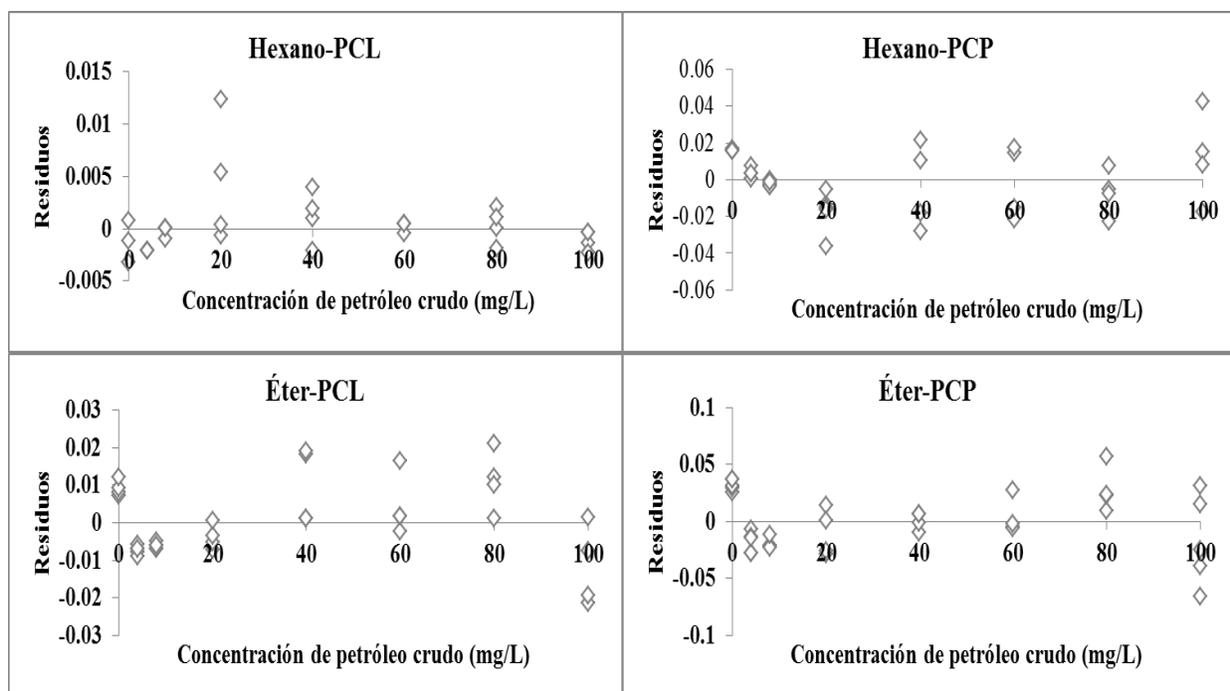


Figura 3.5. Gráficos de residuales de las regresiones lineales de los cuatro calibrados para la validación interna de los modelos. PCL=petróleo crudo ligero y PCP=petróleo crudo pesado.

Prueba t de Student para datos apareados entre concentraciones estimadas y concentraciones de referencia

Los resultados de la prueba *t* de Student para datos apareados o relacionados mostraron que no existió diferencia significativa entre las concentraciones estimadas por los modelos y las concentraciones de referencia de las muestras del grupo de entrenamiento, en los cuatro modelos analizados.

Coefficiente de correlación (r) entre concentraciones estimadas y concentraciones de referencia

Los coeficientes de correlación entre las concentraciones estimadas y observadas (Fig. 3.6), obtenidos en la validación interna, fueron superiores a 0.9996 para los calibrados Hexano-PCL y Hexano-PCP; y para los calibrados Éter-PCL y Éter-PCP los valores de *r* fueron superiores a 0.9976. En todos los casos estos resultados indican una alta asociación entre dichas concentraciones. Es importante mencionar que el uso de *r* es ampliamente usado como una medida de la linealidad del modelo (Barwick, 2003; Raposo, 2016), pero no es completamente

aceptada, ya que aunque exista una correlación entre las variables analizadas, esta puede ser o no lineal (Van Loco *et al.*, 2002).

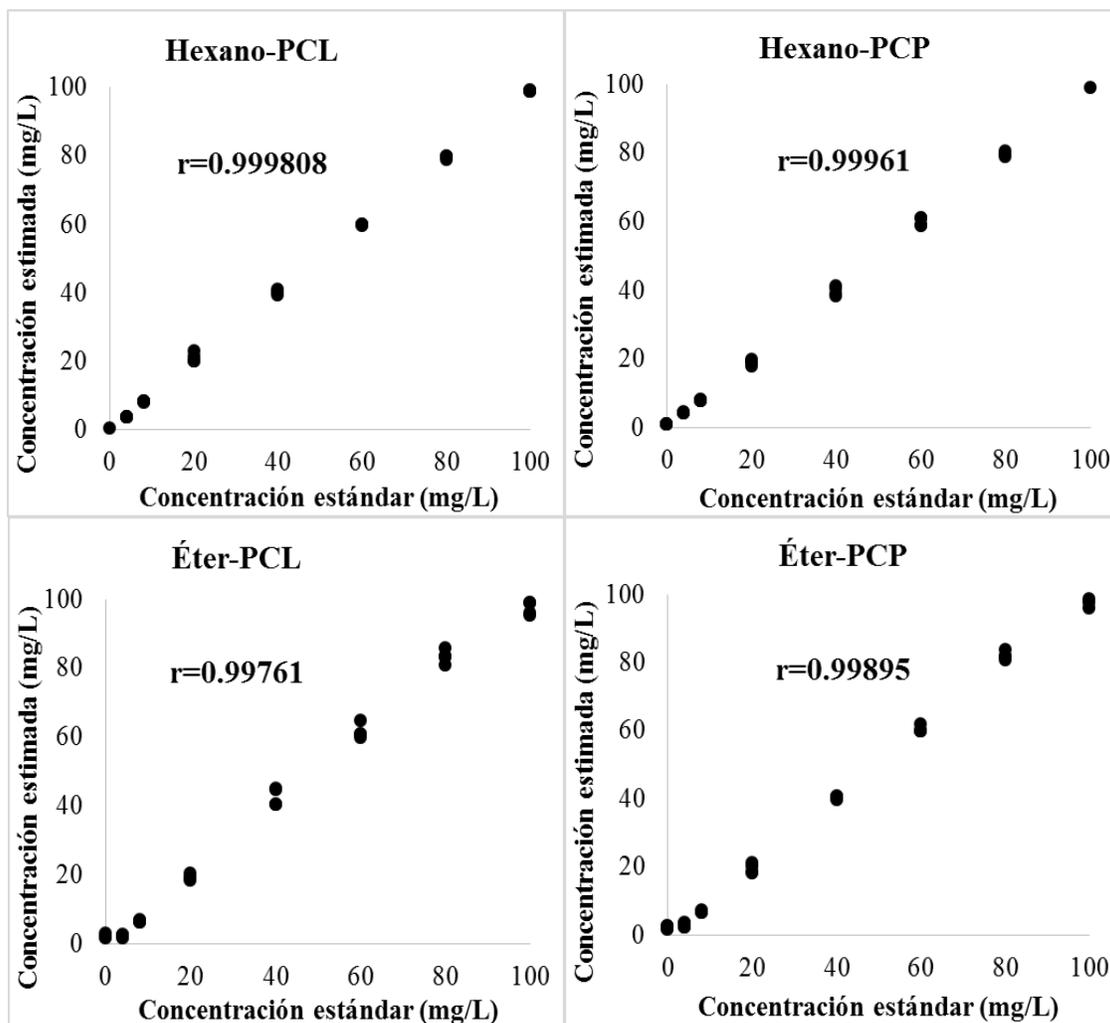


Figura 3.6. Coeficientes de correlación entre las muestras observadas y estimadas, obtenidos durante la validación interna de los modelos de calibración. PCL=petróleo crudo ligero y PCP=petróleo crudo pesado.

Validación externa

Prueba t de Student para datos apareados

Con la prueba *t* se encontró que no existió diferencia estadística entre las medias de las concentraciones estimadas por los modelos y las concentraciones de referencia del set del 10% de las mediciones que se omitieron en la construcción y calibración de los modelos.

Coeficiente de correlación (r) entre concentraciones estimadas y concentraciones de referencia

Los coeficientes de correlación obtenidos en la validación externa (Fig. 3.7) para las concentraciones estimadas con los modelos y las concentraciones de referencia que se omitieron en la construcción y calibración de los modelos fueron superiores a 0.9993 para los calibrados Hexano-PCL, Hexano-PCP y Éter-PCP, e igual a 0.9983 para el calibrado Éter-PCL. En todos los casos existe un alto grado de asociación entre ambos conjuntos de concentraciones.

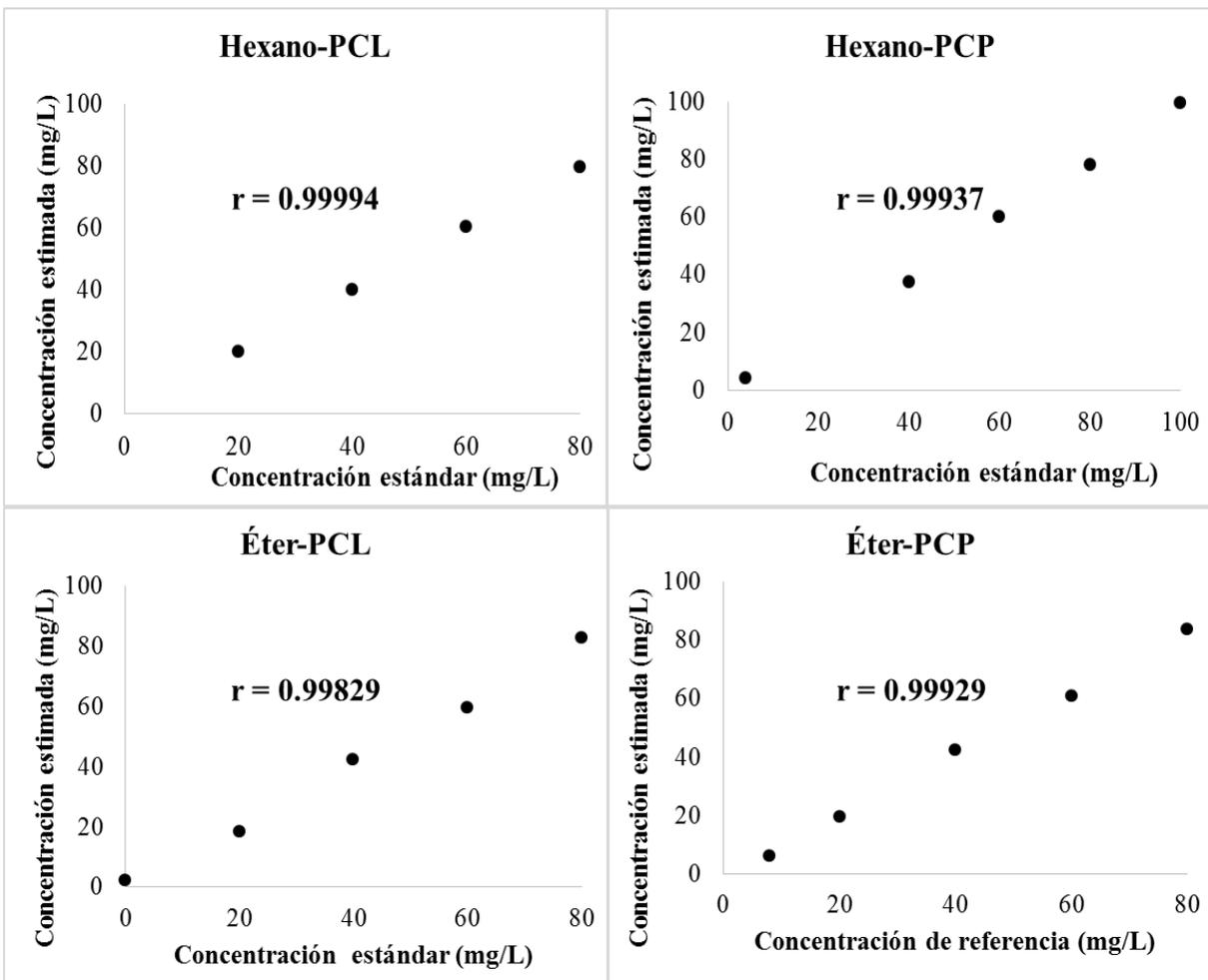


Figura 3.7. Coeficientes de correlación obtenidos durante la validación externa de los cuatro modelos de calibración. PCL: petróleo crudo ligero y PCP: petróleo crudo pesado. Límites de detección y cuantificación de los calibrados.

Una vez validados los modelos y a partir de los datos obtenidos con los calibrados, se calcularon los límites de detección y los límites de cuantificación para cada uno de los modelos de calibración (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3. Límites de detección y cuantificación para los modelos de calibración.

	Hexano-PCL	Hexano-PCP	Éter-PCL	Éter-PCP
Límite de detección (mg L ⁻¹)	0.82	1.03	3.70	2.81
Límite de cuantificación (mg L ⁻¹)	3.72	1.21	6.98	4.7

PCL: petróleo crudo ligero; PCP: petróleo crudo pesado.

Los valores más bajos en el límite de detección y de cuantificación correspondieron a ambos tipos de petróleo crudo con hexano, mientras que para los calibrados de petróleo crudo con éter fueron mayores. Este resultado coincide con los valores de las ordenadas al origen en los modelos mostrados en la Figura 3.4. Los valores encontrados por Dost e Ideli (2012) para sus modelos se situaron en rangos menores: 2.6×10^{-4} a 1.15×10^{-3} mg L⁻¹ para los límites de detección y de 8.7×10^{-4} a 3.84×10^{-3} mg L⁻¹ para los límites de cuantificación, para diferentes HAP. Por su parte, Vogt *et al.* (2000) determinaron límites de detección menores a 1×10^{-2} mg L⁻¹ para HA.

CONCLUSIONES

La evaluación interna y externa de los MCLS propuesta para calificar las calibraciones por espectrofotometría UV-Vis indican que las estimaciones para cuantificar HTP extractados con diferentes solventes de muestras de suelos o agua, son adecuadas para su aplicación en concentraciones menores a las establecidas como límites máximos permitidos en la Normativa Mexicana. La linealidad de los modelos fue demostrada cuantitativamente en la validación interna por el valor del coeficiente de determinación muy cercano de la unidad, y el ANOVA, en el que el modelo lineal resultó altamente significativo, además de la representación gráfica de los datos experimentales, que es una demostración cualitativa de la linealidad. Los residuales presentaron una distribución aleatoria cercana al cero. La capacidad para estimar la concentración de HTP de los modelos fue evaluada en la validación externa mediante las pruebas de *t* y de correlación, con las cuales se demostró que no hay diferencias significativas entre los datos estimados con los modelos y los valores de referencia que se omitieron en la construcción y calibración de los modelos. Además, los límites de detección y de cuantificación variaron en

función del tipo de solvente empleado (efecto matricial), siendo ambos valores más altos en los calibrados con éter etílico que con hexano, lo cual coincide con las ordenadas al origen en los modelos. Todos los indicadores estadísticos usados demuestran la robustez de los modelos propuestos y son la base para la evaluación de calibraciones lineales.

LITERATURA CITADA

- Barwick, V. 2003. Preparation of calibration curves. A guide to best practice. LGC/VAM/2003/032, LGC (www.lgcgroup.com/nmi). 04/05/2016
- Cuadros-Rodríguez., L., L. Gámiz-G. y E. Almansa-L. 2001. Calibration in chemical measurement processes: I. A methodological approach. Trends in Analytical Chemistry. 20:195-206.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2013. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación, México, 10 de septiembre de 2013. http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5313544&fecha=10/09/2013
- Dost K. y C. Ideli. 2012. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and barbecued food by HPLC/UV-Vis detection. Food Chemistry 133:193-199.
- Fernández L., L.C., N. G. Rojas A., T. G. Roldan C., M. E. Ramírez I., H. G. Zegarra M., R. Uribe H., R. J. Reyes A., D. Flores H. y J. M. Arce O. 2006. *Manual de técnicas de análisis de suelo aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. SEMARNAT-INE-IMP. México, México. 180 p.
- IMP 2014. Tipos de petróleo. Instituto Mexicano del Petróleo. <http://www.imp.mx/petroleo/?imp=tipos>. 13/09/2016.
- Marqués A.F. 2010. Estadística descriptiva a través de EXCEL. Alfaomega Group Editor SA de CV. México, México. 288 p.
- Mayer D.G. y Butler D.G. 1993. Statistical validation. Ecol. Model. 68:21-32.
- Newcombe R.G. 1998. Two-sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. Statistics in Medicine.17:857-872.
- Raposo, F. 2016. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. Trends in Analytical Chemistry 77:167-185.

- Shrivastava A. y Gupta V. B. 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantification of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*. 2: 21-25.
- UNAM. 2003. El agua como solvente. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/agua%20como%20solvente.html>. 13/09/2016.
- Van Loco, J., M. Elskens, C. Croux y H. Beernaert. 2002. Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. *Accreditation and Quality Assurance* 7:281-285.
- Vogt, F., M. Tacke, M. Jakusch y B. Mizaikoff. 2000. A UV spectroscopic method for monitoring aromatic hydrocarbons dissolved in water. *Analytica Chimica Acta* 422:187-198.
- Wang, J.G., X. H. Zhan, J. R. Liang, L. X. Zhou, Y. S. Lin y W.C. Wong. 2011. A novel method for the determination of total hydrocarbon in the hydrocarbon mixture-contaminated soil. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*. S2:001. doi:10.4172/2155-6199.S2-001

CAPÍTULO IV

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE UN FLUVISOL CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE CON DOS TIPOS DE PETRÓLEO CRUDO

RESUMEN

Las propiedades bioquímicas y biológicas del suelo han sido de especial interés en el estudio de los suelos contaminados debido a que responden en corto tiempo al estrés ambiental, adoptándose como indicadores de fertilidad y de la recuperación de suelos remediados. En esta investigación, un suelo Fluvisol (FL) fue contaminado con diferentes niveles de petróleo crudo ligero (PCL) y petróleo crudo pesado (PCP) (0–9000 mg kg⁻¹), y, después de un periodo de estabilización se analizó la actividad de las enzimas ureasa, deshidrogenasa (ADH) y fosfatasa, el carbono de biomasa microbiana (CBM), la respiración del suelo, así como las propiedades físico-químicas, para determinar el efecto de los hidrocarburos. En la mayoría de las propiedades bioquímicas y biológicas del FL, el PCL causó mayor inhibición debido a su contenido de compuestos volátiles de mayor toxicidad. Las actividades ureasa, la respiración del suelo y la actividad fosfatasa fueron estimuladas con 200 mg kg⁻¹ de PCP (tratamiento 200-PCP), y para la fosfatasa también con la misma concentración de PCL (tratamiento 200-PCL), donde se observaron los valores significativamente más altos. Contrariamente, la respiración del suelo fue inhibida hacia los niveles más elevados de ambos petróleos. El pH se encontró en un rango de 7.3-7.54 clasificándose como neutro en el primer caso y moderadamente alcalino en el segundo. Los niveles de N_{total} y P fueron bajos mientras que el C orgánico aumentó significativamente conforme se incrementó el nivel de los dos tipos de petróleo. La CIC determinada en los tratamientos se clasificó como media sin mostrar una tendencia conforme a la variación de los niveles de ambos petróleos.

Palabras clave: Actividad enzimática, petróleo crudo, Fluvisol, actividad biológica

ENZYMATIC ACTIVITY OF AN AGRICULTURAL SOIL ARTIFICIALLY POLLUTED WITH TWO TYPES OF CRUDE OIL

ABSTRACT

Soil biochemical and biological properties are of special interest in the study of contaminated soils because they respond in a short time to environmental stress, being adopted as indicators of fertility and recovery of reclaimed soils. In this investigation, a Fluvisol soil (FL) was contaminated with different levels of light crude (LCO) and heavy crude oil (HCO) (0-9000 mg kg⁻¹), and, after a stabilization period the enzymatic activity of urease, dehydrogenase (DHA) and phosphatase, microbial biomass carbon (MBC), soil respiration, as well as physicochemical properties were analyzed in order to determine the effect of crude oils on their values. In most of the biochemical and biological properties of the FL, the LCO caused greater inhibition due to its content of volatile compounds of greater toxicity. Urease activity, respiration and phosphatase activity were stimulated with 200 mg kg⁻¹ of HCO (treatment 200-HCO), the latter also at the same concentration of LCO (treatment 200-LCO), where significantly higher values were observed. In contrast, soil respiration was inhibited towards the higher levels of both oils. The pH recorded was found in a range of 7.3-7.54 classifying as neutral in the first and moderately alkaline in the second case. Total N and P levels were low while organic C increased significantly as the level of the two oil types increased. The CIC determined in the treatments was classified as medium without showing a tendency according to the variation of the levels of both oils.

Key words: enzymatic activity, crude oil, Fluvisol, biological activity

INTRODUCCIÓN

Las propiedades bioquímicas y biológicas del suelo se han empleado como parámetros para evaluar los cambios inducidos por diversos contaminantes (Piotrowska-Dlugosz, 2014) debido a que son más sensibles al estrés ambiental, y por tal razón se han propuesto como indicadores de la calidad y fertilidad de los suelos. Entre las propiedades de mayor relevancia se encuentran la actividad de diversas enzimas como la ureasa, fosfatasa y deshidrogenasa (Andreoni *et al.*, 2004; Baran *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2012), el carbono de la biomasa microbiana (Trasar-Cepeda *et al.*, 2000; Peña *et al.*, 2007; Alrumman *et al.*, 2015) y la actividad metabólica mediante la respiración del suelo (Brohon *et al.*, 2001).

La fosfatasa y la ureasa son enzimas extracelulares que hidrolizan a los ésteres-fosfato y urea, respectivamente, con la producción de H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} por la primera, y NH_3 y CO_2 por la segunda, nutrientes que son disponibles para las plantas (Cruz-Flores *et al.*, 2007; Piotrowska-Dlugosz, 2014). La fosfatasa es también una enzima intracelular (Brohon *et al.*, 2001). La catálisis por la ureasa conlleva a un aumento del pH y pérdida de nitrógeno por volatilización de amonio. En suelos donde hay amonio su actividad es inhibida y se induce en presencia de la urea u otra fuente alternativa de N. Es ampliamente utilizada para evaluar los cambios en la fertilidad del suelo, ya que su actividad se incrementa después de la fertilización orgánica (Piotrowska-Dlugosz, 2014). Las fosfatasas del suelo pueden inducirse cuando hay deficiencia de P ya sea por las raíces de las plantas, hongos y bacterias (Cruz-Flores *et al.*, 2007). Las fosfatasas permanecen estabilizadas en los coloides minerales y complejos húmicos y de esta manera pueden mantener su actividad fuera de las células (Cruz-Flores *et al.*, 2007).

La actividad deshidrogenasa del suelo está dada por un grupo de enzimas que pertenecen a la clase de las oxidorreductasas, de las que las deshidrogenasas son las más representativas (Piotrowska-Dlugosz, 2014); son enzimas intracelulares que transfieren iones hidrógeno (H^+) y electrones a los aceptores adecuados (Mathew y Obbard, 2001) como parte de las reacciones de óxido-reducción en los sistemas vivos, y están estrechamente ligadas al tipo de suelo y a las condiciones de agua-aire (Wyszkowska *et al.*, 2006). La actividad deshidrogenasa en el suelo proporciona información de la actividad actual y directa de los microorganismos viables gracias a su carácter intracelular, por lo que es una medida de la actividad microbiana del suelo en general (Kumar *et al.*, 2013). Por tal motivo ha sido ampliamente estudiada como un indicador en la recuperación de suelos impactados por diversos contaminantes, entre ellos hidrocarburos

del petróleo (Trasar-Cepeda *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Alrumman *et al.*, 2015).

Aunque en la literatura predominan estudios para evaluar la efectividad de los métodos de remediación a través de la recuperación del carácter biológico y bioquímico del suelo contaminado (Andreoni *et al.*, 2004; Alrumman *et al.*, 2015;), recientemente ha aumentado el interés por estudiar los cambios en suelos impactados a nivel de su capacidad degradadora y mineralizadora, donde la actividad metabólica y enzimática juegan un papel fundamental (Peña *et al.*, 2007).

Se ha observado que la respuesta de las propiedades biológicas del suelo varía de acuerdo con el nivel de contaminación, la textura del suelo, el tipo de hidrocarburo, el tiempo de incubación y el carácter físico-químico del suelo, entre otras. Al respecto, Guo *et al.* (2012) observaron que el incremento en la concentración de HTP resultó en la disminución de la cuenta microbiana y las actividades enzimáticas; Hentati *et al.* (2013) reportan que a 500 y 1000 mg kg⁻¹ de HTP la tasa de crecimiento de poblaciones de lombrices y colémbolos en el suelo disminuyó hasta en 50% en un periodo de 6 días. Sin embargo, como mencionan Trasar-Cepeda *et al.* (2000), la actividad enzimática es estimulada por la presencia del petróleo en concentraciones crecientes. Además, se ha sugerido que el nivel de toxicidad de los hidrocarburos en el suelo puede estar influenciado por las interacciones que se establecen en el medio natural debido a la presencia de otros contaminantes (Shen *et al.*, 2005).

La medición de la actividad enzimática en condiciones de laboratorio permite determinar la actividad potencial de un suelo, es decir, la tasa máxima a la que una reacción es catalizada. El uso de lodos en lugar de extractos de la solución del suelo permite medir también la actividad de enzimas adheridas a las partículas del suelo. Adicionalmente, el sustrato no es un factor limitante y, en dichas condiciones existe una homogénea difusión que asegura el acceso de la enzima al sustrato (Wallenstein y Weintraub, 2008).

El objetivo del presente estudio fue determinar en condiciones de laboratorio, la actividad enzimática y microbiana de un Fluvisol contaminado artificialmente con petróleo crudo, de tipo ligero y pesado, a diferentes niveles de contaminación, para conocer el impacto en la fertilidad y su relación con su carácter físico-químico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Suelo

La muestra de suelo se recolectó de una plantación de plátano macho ubicada en la Ranchería San Pedro, municipio de Cunduacán, Tabasco, en el campo petrolero Samaria, con coordenadas 15Q0488134 UTM1991971. El suelo de la unidad Fluvisol éutrico (Zavala *et al.*, 2003) (clase agrícola) se muestreó de la capa arable (0 a 30 cm), se secó a temperatura ambiente, se molió y tamizó a 2 mm de apertura de malla. Posteriormente se homogenizó y almacenó en un lugar seco y fresco. El suelo se sometió a una extracción de HTP mediante Soxhlet (USEPA, 1996) para verificar la ausencia de contaminantes del petróleo y la determinación se realizó por espectrofotometría UV-Visible a 254 nm de longitud de onda, empleando hexano en ambos procesos.

Contaminación artificial del suelo con petróleo crudo

La contaminación del suelo se realizó pesando la cantidad correspondiente de PCL y petróleo pesado (PCP) para una cantidad total de suelo de 500 g. Las muestras se dejaron estabilizar a 37 °C por tres días, alternando periodos de homogenización de 30 min a 1 h en un agitador de acción recíproca cada día. Las concentraciones a las que se prepararon los suelos contaminados fueron: 0, 200, 400, 1200, 3000, 6000 y 9000 mg kg⁻¹ para cada tipo de petróleo.

Actividad enzimática y biológica del suelo contaminado con hidrocarburos

Actividad ureasa

La actividad de la enzima ureasa fue determinada de acuerdo con Tabatabai y Bremner (1972). El método consiste en la degradación de 5 g de suelo mezclado con 1 mL de solución de urea 0.2 M, 9 mL de buffer TRIS 0.5 M pH 9 y 0.2 mL de tolueno, todo esto en un matraz volumétrico de 50 mL. La mezcla se incubó a 37 °C por 2 h. Posteriormente la reacción se inhibió con 35 mL de KCl-Ag₂SO₄, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se aforó a 50 mL con la misma solución. En los controles la urea se agregó después de la incubación y antes del aforo con KCl-Ag₂SO₄. Una alícuota de 10 mL se destiló en un aparato Kjeldahl en presencia de MgO y se colectó el destilado en un matraz con 10 mL de indicador de ácido bórico. El amonio (NH₄⁺) destilado se tituló con HCl 0.05 N estandarizado.

Actividad fosfatasa

La actividad de la enzima fosfatasa se determinó de acuerdo con Tabatabai y Bremner (1969). El método consistió en la incubación de 1 g de suelo en un matraz Erlenmeyer de 25 mL, con 4 mL de buffer universal modificado (MUB) pH 6.5, 0.25 mL de tolueno y 1 mL de sustrato *p*-nitrofenil fosfato 115 mM. Las muestras y controles se incubaron por 1 h a 37 °C. A los controles se les agregó el sustrato después de la incubación. Posteriormente las muestras y controles se filtraron con papel Whatman 42 y se colectaron en matraces Erlenmeyer de 50 mL. Se transfirió 1 mL del filtrado a un matraz volumétrico de 25 mL y se aforó. La concentración de *p*-nitrofenol (*p*-NF) producido se determinó en un espectrofotómetro UV-Vis a 400 nm.

El modelo obtenido de la curva de calibración se empleó para la estimación de las concentraciones. Las soluciones estándar de *p*-NF para construir el modelo se prepararon a partir de una solución stock de 500 µg mL⁻¹, de la cual se tomaron alícuotas de 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 5 y 10 mL, llevándose a un volumen final de 25 mL usando agua destilada. Las concentraciones de las soluciones fueron: 0, 5, 10, 20, 40, 80, 100 y 200 µg mL⁻¹ de *p*-nitrofenol. De cada estándar se prepararon 5 repeticiones. La absorbancia de las soluciones se determinó a 400 nm.

Actividad deshidrogenasa

La actividad deshidrogenasa (ADH) se determinó de acuerdo con Casida *et al.* (1964). Es importante evitar la exposición del sustrato cloruro de 2, 3, 5- trifeniltetrazolio (2, 3, 5-CTT) a la luz para evitar su degradación. El proceso consistió en incubar 2 g de suelo en un tubo de ensayo cubierto con papel aluminio al cual se agregaron 0.0335 g de CaCO₃, 0.5 mL de 2, 3, 5-CTT al 3 % y 1.75 mL de agua destilada. Los controles se prepararon sin suelo, sólo con la mezcla de reactivos. Los tubos se cubrieron e incubaron a 37 °C durante 24 h en la oscuridad. Al término, el contenido de los tubos se filtró con papel Whatman 42; la transferencia al filtro se hizo mezclando las muestras con un agitador de vórtice y enjuagando con alícuotas de metanol, mientras el filtrado se recolectó en matraces volumétricos de 25 mL. El enjuague con metanol terminó hasta completar los 25 mL del matraz. Todo se realizó en un entorno con luz difusa. La absorbancia de las soluciones se determinó en un espectrofotómetro UV-Vis a 485 nm, midiendo primero un blanco de metanol.

Una serie de soluciones estándar de 1, 3, 5-trifenil formazan (1, 3, 5-TFF) se preparó para construir la curva de calibración, tomando alícuotas de 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mL a partir

de una solución stock de 1,3,5- TFF preparada a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ y colocándolas en matraces volumétricos de 25 mL. Después se añadieron 4.15 mL de buffer TRIS pH 7.6 y se aforaron con metanol. Las concentraciones de los estándares fueron: 0, 1, 2, 4, 6, 8 y $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Se realizaron cinco repeticiones por cada concentración. Las soluciones se midieron a 485 nm para determinar su absorbancia en un espectrofotómetro UV-Vis.

Carbono de biomasa microbiana

El carbono de biomasa microbiana (CBM) se determinó mediante el método descrito por Vance *et al.* (1987) que consiste en la incubación de 50 g de suelo humedecido a capacidad de campo colocado en un desecador conteniendo un vial con 25 mL de cloroformo libre de etanol (cloroformo pasado a través de 20 g de alúmina colocados en una columna de vidrio). Los controles se incubaron en las mismas condiciones pero sin el cloroformo. El desecador con las muestras y el cloroformo se sometió a vacío hasta alcanzar 0.7 atm, donde el cloroformo alcanzó su punto de ebullición que duró de 3-5 min y posteriormente se selló el desecador. Las muestras fumigadas y los controles no fumigados con cloroformo se incubaron a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ en la oscuridad durante 24 h. En seguida de la incubación, el suelo se transfirió a matraces Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de K_2SO_4 0.5 M, realizando enjuagues hasta transferir la muestra en su totalidad al matraz. Las muestras se taparon y se agitaron a 80 rpm durante 30 min y al término se filtraron con papel Whatman 42. Una alícuota de 8 mL del extracto se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 70 mg de HgO. Se añadieron 2 mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1 N y 10 mL de H_2SO_4 y se mezcló suavemente. Después de 30 min de reacción se agregaron 25 mL de agua destilada y se dejaron enfriar. La determinación del CBM se realizó agregando a los matraces 4 gotas de indicador de 1,10-fenantrolina y titulando con FeSO_4 0.5 N, procesándose al mismo tiempo un blanco sin extracto.

Respiración del suelo

Se colocaron 100 g de suelo en frascos de 500 mL y se humedeció al 60 % de su capacidad de campo; el suelo se mezcló hasta tener una humedad homogénea; se corrió simultáneamente un blanco sin suelo. En el frasco se colocó un vial con 15 mL de NaOH 0.5 N y se cerró herméticamente para dejarlo en incubación por 24 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, el NaOH se vertió en un matraz de 125 mL donde se le agregaron 5 mL de BaCl 0.5 N y 4 gotas de indicador fenolftaleína para luego titularse con HCl 0.5 N estandarizado.

Caracterización físico-química del suelo contaminado con hidrocarburos

Las propiedades físicas y químicas se analizaron de acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002). Estas fueron: humedad, textura, capacidad de intercambio catiónico (CIC), pH, carbono orgánico (C orgánico), nitrógeno total (N_{total}) y fósforo (P).

Diseño experimental

Se estableció un experimento factorial alojado en un diseño completamente al azar. El primer factor a evaluar fue el tipo de petróleo, para el que se establecieron 2 niveles, petróleo crudo ligero (PCL) y petróleo crudo pesado (PCP); y el segundo factor fue la concentración de petróleo, con siete niveles: 0, 200, 400, 1200, 3000, 6000 y 9000 $mg\ kg^{-1}$. Con la combinación de los niveles de ambos factores se obtuvieron 14 tratamientos: 0-PCL, 200-PCL, 400-PCL, 1200-PCL, 3000-PCL, 6000-PCL, 9000-PCL, 0-PCP, 200-PCP, 400-PCP, 1200-PCP, 3000-PCP, 6000-PCP y 9000-PCP. Por cada tratamiento se hicieron cinco repeticiones.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza multifactorial y una prueba de medias de Tukey (diferencia mínima significativa) con un nivel de significancia de 0.05, con el programa estadístico Statgraphics Centurion XV® v. 15.2.06.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización físico-química del suelo contaminado con hidrocarburos

Los resultados del análisis físico-químico del suelo control o no contaminado (concentración 0 $mg\ kg^{-1}$) y del suelo contaminado a diferentes niveles de ambos petróleos crudos se muestran en el Cuadro 4.1. El suelo Fluvisol éutrico estudiado se clasificó como arcilloso, con 14 % de arena, 39 % de limo y 47 % de arcilla. La humedad determinada fue de 4.005 %. El pH se clasificó como moderadamente alcalino en la mayoría de los tratamientos con valores desde 7.3 hasta 7.54 (Cuadro 4.1). El pH disminuyó conforme aumentó la concentración de PCP, observándose los valores significativamente más bajos respecto al suelo no contaminado en los tratamientos 400-PCP, 1200-PCP y 6000-PCP (7.38, 7.36 y 7.3, respectivamente), los cuales se clasifican como neutros (DOF, 2002). En los tratamientos con PCL no se observó una tendencia concreta en las variaciones del pH conforme al nivel de contaminación. Sin embargo, se observó que en el tratamiento 3000-PCL se alcanzó el mínimo (7.3) y fue significativamente diferente al del suelo

no contaminado (Fig. 4.1A). En contraparte, Andreoni *et al.* (2004) y Wang *et al.* (2013) señalan que la presencia de diferentes hidrocarburos en el suelo tiende a provocar la alcalinización de éstos hasta 8.0, lo que tiene efecto en otras propiedades como la reducción de la disponibilidad de P en el suelo y de algunos micronutrientes.

Por otra parte, los valores del contenido de nitrógeno total (N_{total}) determinados en el suelo con los diferentes tratamientos, se clasificaron dentro del rango bajo, de acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002).

Como se observa a la izquierda de la Figura 4.1B, en casi todos los tratamientos con PCP el N_{total} fue menor que en aquellos con PCL. Los tratamientos 1200-PCL, 6000-PCL, 200-PCP, 400-PCP presentaron los niveles estadísticamente más bajos ($p < 0.05$) de N_{total} (0.052-0.0124 %). En cuanto a los valores más altos, estos se obtuvieron en los tratamientos 3000-PCL, 9000-PCL y 9000-PCP (0.0293, 0.0288 y 0.0254 %, respectivamente), los cuales fueron estadísticamente iguales entre sí pero significativamente diferentes a los del suelo no contaminado (Fig. 4.1B). La adición del petróleo incrementa la relación C:N, lo que deriva en una mayor inmovilización de N en las células microbianas (John *et al.*, 2016), lo cual coincide con los bajos niveles de N_{total} observados en general. Sin embargo, se ha reportado que en suelos con 7.5-34600 mg kg⁻¹ de HTP los contenidos de N_{total} , P y pH no mostraron diferencias significativas por efecto del contenido de HTP (Peña *et al.* 2007; Guo *et al.* 2012).

Cuadro 4.1. Propiedades físico-químicas del suelo a diferentes niveles de contaminación de dos tipos de petróleo crudo.

Concentración de petróleo (mg kg ⁻¹)	pH		N total (%)		C orgánico (%)		P (mg kg ⁻¹)		CIC (cmol(+) kg ⁻¹)	
	PCL	PCP	PCL	PCP	PCL	PCP	PCL	PCP	PCL	PCP
0	7.54 _a	7.54 _a	0.0216 _{cd}	0.0216 _{cd}	2.10 _f	2.10 _f	0.082 _{def}	0.082 _{def}	20.95 _a	20.95 _a
200	7.54 _a	7.40 _{abcd}	0.0219 _{bcd}	0.0052 _g	2.43 _{cd}	2.06 _f	0.096 _{ab}	0.093 _{bcd}	18.12 _c	21.42 _a
400	7.42 _{abcd}	7.38 _{bcd}	0.0211 _{cd}	0.0059 _g	2.24 _{def}	3.32 _{ef}	0.089 _{bcd}	0.084 _f	20.74 _a	20.46 _b
1200	7.54 _a	7.36 _{cd}	0.0124 _{efg}	0.0152 _{def}	2.48 _c	2.38 _{cde}	0.096 _{ab}	0.083 _{def}	20.90 _a	21.49 _a
3000	7.3 _d	7.39 _{abcd}	0.0293 _a	0.0176 _{de}	2.42 _{cd}	2.45 _c	0.086 _{bcd}	0.095 _{abc}	20.69 _a	22.32 _a
6000	7.53 _{ab}	7.3 _d	0.0163 _{def}	0.0094 _{fg}	2.90 _b	2.90 _b	0.084 _{bcd}	0.079 _{ef}	22.59 _a	21.86 _a
9000	7.46 _{abc}	7.44 _{abcd}	0.0288 _{ab}	0.0254 _{abc}	3.32 _a	3.36 _a	0.084 _{cdef}	0.107 _a	21.72 _a	21.47 _a

PCL: petróleo crudo ligero; PCP: petróleo crudo pesado. Literales a la derecha de los valores indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (combinación de niveles de ambos factores).

El C orgánico cambió su clasificación de contenido medio a alto conforme se incrementó la concentración de ambos tipos de petróleo, habiendo diferencia estadística entre el suelo no contaminado con el del resto de los tratamientos, excepto con el 400-PCL, 200-PCP y 400-PCP, los cuales representan las adiciones de petróleo más bajas hechas al suelo (Fig. 4.1C). Peña *et al.* (2007) observaron un incremento del C total del suelo, lo cual era esperado; los incrementos fueron de 23.2 hasta 149.4 g kg⁻¹ para cuatro diferentes dosis de diésel. Essien y John (2010) observaron que en suelo contaminado por petróleo crudo el contenido de C total y N se incrementaron por la actividad microbiana durante el metabolismo del petróleo, donde se produjo CO₂ y por la fijación del N atmosférico, respectivamente.

El P se clasificó como bajo con valores menores a 5.5 mg kg⁻¹ (Fig. 4.1D), de acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002). Sin embargo, no se encontró diferencia estadística ($p>0.05$) dada por el tipo de petróleo, pero sí por el nivel de contaminación. En cuanto a los tratamientos, se observó que el contenido de P en el suelo no contaminado fue estadísticamente menor que los tratamientos 200-PCL, 1200-PCL, 3000-PCP y 9000-PCP, mientras que no fue significativamente diferente al resto de los tratamientos. El contenido más alto se presentó en el tratamiento 9000-PCP (0.107 mg kg⁻¹).

La CIC determinada en los tratamientos 200-PCL y 400-PCP fueron los únicos que resultaron significativamente diferentes al resto de los tratamientos, siendo en el primer caso la CIC más baja registrada, 18.12 cmol (+) kg⁻¹ (Fig. 4.1E). De acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002), en todos los tratamientos la CIC determinada se clasificó como media (entre 15-25 cmol (+) kg⁻¹). Cuando la CIC en suelos es elevada, ya sea por el contenido de materia orgánica o por fracción arcillosa del suelo, ésta disminuye los efectos tóxicos de los hidrocarburos (Labud *et al.*, 2007).

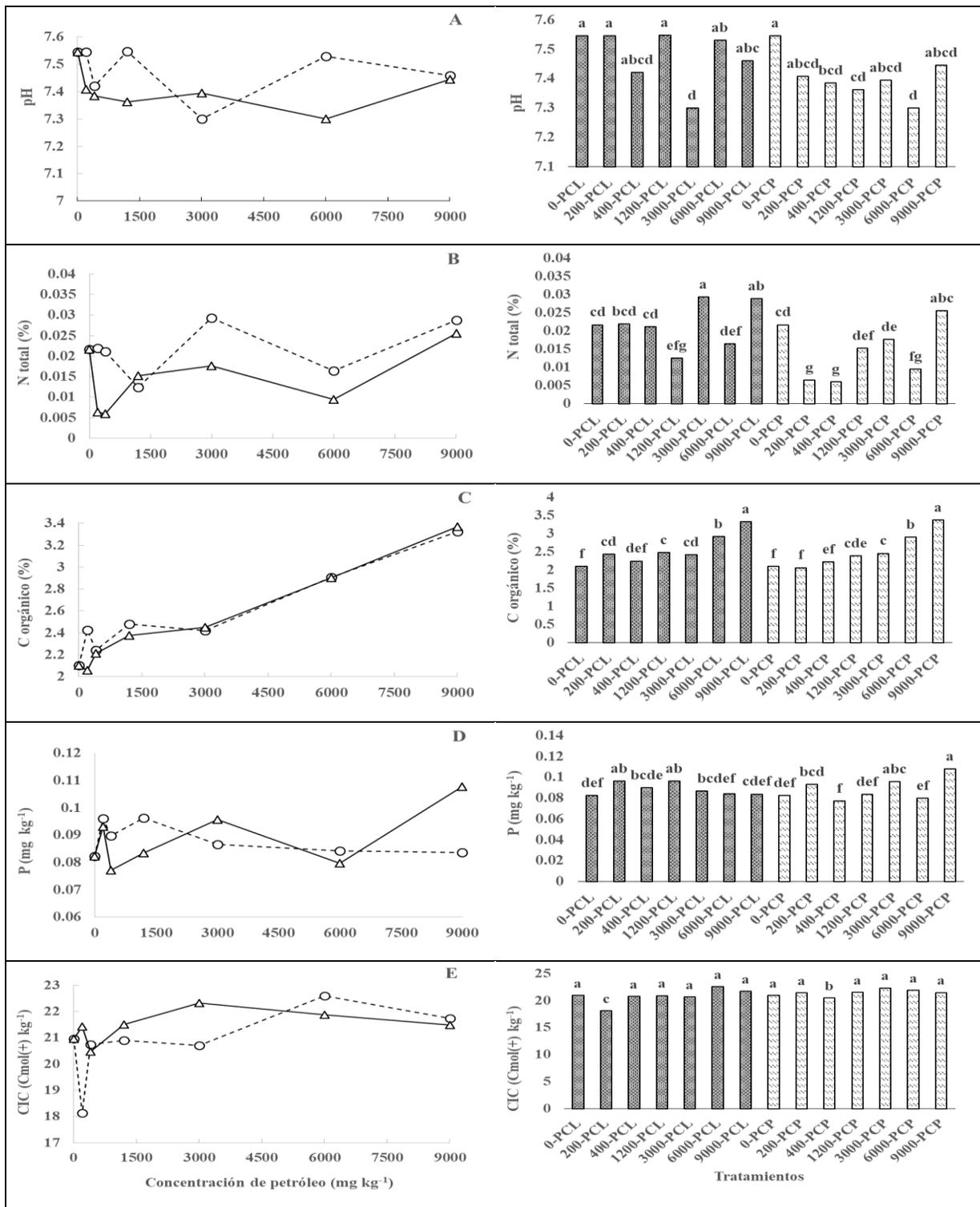


Figura 4.1. Propiedades físico-químicas del suelo contaminado a diferentes niveles de petróleo crudo ligero (PCL) y petróleo crudo pesado (PCP). A) pH, B) N_{total}, C) C orgánico, D) P y E) CIC. Literales sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos o combinaciones de niveles de ambos factores (der.). -○- PCL -△- PCP

Actividad enzimática y biológica del suelo contaminado con hidrocarburos

Los valores de los parámetros biológicos determinados bajo diferentes tipos de petróleo crudo a diferentes concentraciones se muestran en el Cuadro 4.2 y se indica su desviación estándar. En general se observó que, a excepción de la ADH, existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) dada por efecto del tipo de petróleo en el resto de las actividades enzimáticas y propiedades biológicas. El nivel de contaminación y la interacción de ambos factores tuvieron efecto sobre todos los parámetros biológicos estudiados.

Ureasa

La actividad de la enzima ureasa fue estadísticamente superior en el suelo contaminado con PCP respecto al PCL. En los tratamientos 200-PCP y 400-PCP se registraron las actividades significativamente más altas para esta enzima (31.42 y 31.21 $\mu\text{mol NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ 2 h}^{-1}$, respectivamente) y fueron estadísticamente diferentes tanto a las registradas en el suelo no contaminado como al resto de los tratamientos, excepto a la del tratamiento 9000-PCP (Fig. 4.2A). La actividad más baja se presentó en el tratamiento 6000-PCL, la cual fue estadísticamente igual a la del suelo no contaminado pero significativamente menor a la de todos los tratamientos con PCP y a la de los tratamientos 1200-PCL y 3000-PCL.

Aunque los valores más elevados de actividad se dieron en las concentraciones más bajas de PCP, se observó que a partir del tratamiento 6000-PCP la actividad ureasa volvió a mostrar un repunte, y que este fue significativamente diferente a la del suelo no contaminado. En los tratamientos con PCL un repunte en la actividad se observó en el tratamiento 9000-PCL, sin embargo, su valor no fue diferente al del suelo no contaminado. Al respecto, Guo *et al.* (2012) observaron la disminución de la actividad ureasa a concentraciones mayores a 300 mg kg^{-1} de HTP (los autores no especifican el tipo de hidrocarburo), siendo a partir de entonces iguales o inferiores a 31.59 $\mu\text{mol NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Los autores sugieren, además, que los hidrocarburos a bajas concentraciones se adhieren a la materia orgánica y son metabolizados lentamente a la par de la degradación de la materia orgánica. Por su parte Zhan *et al.* (2010) indicaron que la materia orgánica estimuló la actividad de la enzima ureasa permitiendo que en las primeras dos semanas la materia orgánica disuelta contrarrestara la inhibición de esta enzima. Pero a elevadas concentraciones los hidrocarburos se pueden adherir a las partículas órgano-minerales del suelo o a las paredes y membranas celulares dificultando las interacciones de enzimas y sustratos,

resultando en una expresión deficiente de la actividad enzimática (Andreoni *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2012). Andreoni *et al.* (2004), observaron que las actividades enzimáticas y número de bacterias heterotróficas más altos, ocurrieron en los suelos no contaminados o con niveles despreciables de contaminación por HAP. Con respecto a contaminantes como el diésel, la actividad ureasa fue la más afectada por el incremento en las dosis del compuesto, en comparación con la fosfomonoesterasa, que fue la menos afectada de acuerdo con Peña *et al.* (2007), aunque ellos no encontraron una relación lineal entre el incremento de la dosis y el descenso de la actividad.

Cuadro 4.2. Propiedades biológicas del suelo a diferentes niveles de contaminación de dos tipos de petróleo crudo (valor medio \pm desviación estándar).

Propiedades	Tipo de petróleo	Concentración de petróleo (mg kg ⁻¹)						
		0	200	400	1200	3000	6000	9000
Ureasa	PCL	17.38 \pm 1.42	18.35 \pm 2.76	16.30 \pm 2.82	19.78 \pm 2.38	21.83 \pm 3.69	12.05 \pm 2.16	14.04 \pm 2.82
	PCP	17.38 \pm 1.42	31.42 \pm 3.35	31.21 \pm 2.18	20.51 \pm 1.58	21.02 \pm 4.2	22.87 \pm 3.73	25.87 \pm 2.35
ADH	PCL	0.10 \pm 0.001	0.11 \pm .032	0.07 \pm 0.018	0.15 \pm 0.023	0.06 \pm 0.011	0.05 \pm 0.01	0.09 \pm 0.002
	PCP	0.10 \pm 0.001	0.12 \pm 0.019	0.08 \pm 0.023	0.09 \pm 0.013	0.10 \pm 0.011	0.09 \pm 0.005	0.08 \pm 0.016
Fosfatasa	PCL	5.83 \pm 0.25	26.51 \pm 0.79	8.40 \pm 0.5	9.23 \pm 0.13	9.16 \pm 0.26	9.44 \pm 1.22	11.39 \pm 0.76
	PCP	5.83 \pm 0.25	14.72 \pm 2.3	10.30 \pm 1.93	7.79 \pm 0.7	12.06 \pm 1.69	9.35 \pm 0.32	7.37 \pm 0.35
CBM	PCL	11.64 \pm 0.098	8.61 \pm 0.315	11.48 \pm 0.871	12.88 \pm 0.1	12.81 \pm 0.03	13.30 \pm 0.411	14.37 \pm 0.135
	PCP	11.64 \pm 0.098	13.19 \pm 2.63	14.49 \pm 0.234	14.37 \pm 0.034	18.41 \pm 0.44	15.84 \pm 0.441	14.77 \pm 0.235
Respiración	PCL	4.89 \pm 0.098	6.83 \pm 0.315	5.73 \pm 0.871	6.17 \pm 0.1	5.88 \pm 0.03	3.61 \pm 0.411	2.62 \pm 0.136
	PCP	4.89 \pm 0.098	10.97 \pm 2.63	6.24 \pm 0.23	5.68 \pm 0.034	7.77 \pm 0.44	4.80 \pm 0.44	4.86 \pm 0.235

PCL: petróleo crudo ligero; PCP: petróleo crudo pesado; Ureasa: $\mu\text{mol N-NH}_4 \text{ g}^{-1} \text{ 2h}^{-1}$; ADH: $\mu\text{mol 1,3,5-TFF g}^{-1} \text{ d}^{-1}$; Fosfatasa: $\mu\text{mol } p\text{-NF g}^{-1} \text{ h}^{-1}$; CBM: $\mu\text{g g}^{-1} \text{ d}^{-1}$; Respiración del suelo: $\mu\text{mol C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$

Deshidrogenasa

Durante la determinación de la ADH, el análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) dada por el tipo de petróleo. Las diferencias en este caso se dieron por el nivel de contaminación. La ADH del suelo del tratamiento 1200-PCL fue la más elevada con

0.15 μmol 1, 3, 5-TFF $\text{g}^{-1} \text{d}^{-1}$ y fue estadísticamente mayor a la del suelo no contaminado (0.101 μmol 1, 3, 5-TFF $\text{g}^{-1} \text{d}^{-1}$) y a las ADH de los suelos del resto de los tratamientos, a excepción del 200-PCP (Fig. 4.2B). En tanto, la ADH más baja se registró en el tratamiento 6000-PCL y fue estadísticamente diferente a la del suelo no contaminado y a casi todos los otros tratamientos. En general, la ADH mostró tendencia descendente a concentraciones superiores a 1200 mg kg^{-1} de PCL y a concentraciones mayores a los 3000 mg kg^{-1} de PCP. De manera similar, Andreoni *et al.* (2004) observaron una relación inversamente proporcional entre la concentración de hidrocarburos y la actividad de enzimas en suelos con niveles de hasta 14 mg kg^{-1} de fenantreno, 94 mg kg^{-1} de PAH y 209 mg kg^{-1} de alcanos, determinados antes de un proceso de biorremediación; y las ADH medidas en tal estudio estuvieron en el rango de 0.00249 a 0.0629 μmol 1,3,5-TFF $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$. En contraste, Trasar-Cepeda *et al.* (2000) observaron que en suelos con alto contenido de hidrocarburos (concentraciones no especificadas por los autores) se dieron los mayores incrementos en la actividad ureasa, fosfomonoesterasa y deshidrogenasa respecto al control, y que éstas declinaron conforme disminuyó el nivel de contaminación. En dicho estudio los rangos de valores fueron: 2.16 a 5.61 μmol *p*-NF $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ para fosfatasa, 6.11 a 11.83 μmol NH_4 $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ para ureasa y 0.553 a 1.391 μmol INTF $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ para deshidrogenasa (los valores más bajos corresponden al control y los más altos al suelo más contaminado). Por su parte, Ortiz-Maya *et al.* (2017) encontraron que en un suelo con 30 000 mg kg^{-1} de petróleo crudo medio, la ADH incrementó de 1.91 a 6.67 $\mu\text{mol g}^{-1}$ en un suelo recién contaminado (28 d). Cabe destacar que en dicho estudio el suelo fue bioestimulado con fertilizante Triple 17 para el ajuste de la relación C:N a 15, lo que pudo llevar a un efecto en el incremento del número de las comunidades microbianas y la actividad misma. Contrario a esto, Alrumman *et al.* (2015) observaron que la incubación de 10 semanas de suelos contaminados con diésel y queroseno y enmendados con fertilizantes de P y N, las ADH fueron inferiores a las de los suelos recién contaminados (2 semanas); además de que en la mayoría de los tratamientos la presencia de los hidrocarburos disminuyó la ADH con respecto al control.

Fosfatasa

Los resultados para la enzima fosfatasa indicaron mediante el ANOVA que existió efecto por el tipo de petróleo crudo, por la concentración y por la interacción de ambos factores sobre la actividad. Los valores máximos de actividad se dieron en los tratamientos 200-PCL y 200-PCP, 26.5 y 14.71 μmol *p*-NF $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$, respectivamente. En el primer caso la actividad fue

estadísticamente mayor al del suelo no contaminado ($5.82 \mu\text{mol } p\text{-NF g}^{-1}\text{h}^{-1}$) (Fig. 4.2C) y a los restantes tratamientos con PCL. En el segundo caso, dicho valor resultó igual al de los tratamientos 1200-PCP y 9000-PCP pero diferente al resto de los tratamientos con PCP. Cabe destacar que la actividad después de mostrar su pico máximo como ya se señaló, mostró una tendencia creciente desde el tratamiento 400-PCL hasta el 9000-PCL, donde se pudo observar una diferencia significativa entre ambos, no así entre los tratamientos intermedios. Se ha reportado que la actividad fosfatasa varía con el tipo de contaminante usado o por las condiciones de incubación. Por ejemplo, de acuerdo con Peña *et al.* (2007), la actividad fosfomonoesterasa fue la menos afectada por el incremento en las dosis de diésel, en comparación con el resto de las enzimas estudiadas; y según Alrumman *et al.* (2015), la actividad fosfatasa del suelo disminuyó en periodos de incubación de 10 semanas en comparación con los tratamientos no incubados en suelos conteniendo diésel y queroseno, y en algunos casos la actividad fosfatasa se comportó de manera similar en el control y el suelo con diésel. Además, la toxicidad de los compuestos derivados del petróleo se asocia con el tipo de compuesto, y se ha mencionado que el diésel es una fuente de carbono menos tóxica para los microorganismos (Labud *et al.*, 2007). Andreoni *et al.* (2004) registraron actividades de fosfatasa de 0.0025 a $0.0029 \mu\text{mol g}^{-1}\text{h}^{-1}$, bajo las condiciones de contaminación descritas en el apartado de la enzima deshidrogenasa. Xu y Johnson (1995) observaron que las concentraciones de hidrocarburo de 55 g kg^{-1} resultaron estimulantes para la actividad fosfatasa, resaltando en dicho estudio que la vegetación existente en el suelo influyó también la magnitud de la actividad.

Carbono de biomasa microbiana

El CBM en el suelo no contaminado fue estadísticamente igual ($p>0.05$) al contenido en el suelo de todos los tratamientos con PCL y al de los tratamientos 200-PCP al 1200-PCP. Se observaron diferencias significativas entre el tratamiento 200-PCL (donde se obtuvo el valor más bajo, $8.61 \mu\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$) y los tratamientos del 1200-PCL al 9000-PCL (Fig. 4.2D). En el caso de los tratamientos con PCP, el CBM mostró una tendencia a aumentar hasta alcanzar el máximo de $18.41 \mu\text{g g}^{-1} \text{d}^{-1}$ en el tratamiento 3000-PCP, sin embargo, en adelante comenzó a declinar pero aun así los valores registrados fueron estadísticamente mayores a los del suelo no contaminado. Se ha reportado que la MO y el contenido de arcilla pueden controlar los efectos de los hidrocarburos en el suelo y sobre los microorganismos, ya que elevados contenidos de MO reducen la inhibición del CBM (Turgay *et al.*, 2010; Alrumman *et al.*, 2015). Dichas propiedades

reducen la disponibilidad de los hidrocarburo en un medio acuoso debido a que son capaces de absorberlos (Alrumman *et al.*, 2015). En el FL estudiado, el bajo contenido de C orgánico aportado por la materia orgánica en el suelo no contaminado no fue suficiente para mitigar el efecto de las concentraciones de PCL y PCP, pero el contenido de arcilla equivalente a 47 %, probablemente contribuyó a que los efectos negativos no fueran tan severos.

Se ha observado que la toxicidad dada por el tipo de compuestos presentes en el hidrocarburo influencia el efecto inhibitorio sobre el CBM (Labud *et al.*, 2007), esto es evidente en el suelo contaminado, donde la inhibición fue significativamente mayor en el suelo contaminado con PCL que en el suelo con PCP (Fig. 4.2D).

Saadoun *et al.* (2008) mencionan que el número de poblaciones microbianas y su diversidad se ven disminuidas en suelos recién impactados y con altas concentraciones de hidrocarburos, en comparación con suelos con un largo historial de contaminación, donde la diversidad y número de comunidades son mayores. El primer caso posiblemente influenciado por el mayor contenido de compuestos volátiles en el suelo recién contaminado, mientras que el segundo por la posible adaptación de consorcios microbianos degradadores de petróleo y el menor contenido de compuestos tóxicos de bajo peso molecular.

Respiración del suelo

El C-CO₂ producido mediante la respiración microbiana fue estadísticamente superior en el suelo contaminado con PCP respecto al contaminado con PCL, lo que indica que el efecto inhibitorio sobre la respiración fue mayor con el PCL (Fig. 4.2E). En los tratamientos 200-PCL y 200-PCP se observaron los picos más altos de C-CO₂ (6.83 ± 0.315 y $10.97 \pm 2.63 \mu\text{mol C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente). En el primer caso, este fue estadísticamente diferente tanto al valor en el suelo no contaminado como al del tratamiento 9000-PCL (el máximo nivel de contaminación); además, a partir del tratamiento 6000-PCL la tasa de respiración del suelo comenzó a disminuir significativamente. En el segundo caso (200-PCP), este fue estadísticamente diferente al de todos los tratamientos con PCP. El efecto negativo del PCL sobre la actividad microbiana puede deberse a la facilidad de los compuestos volátiles de este para entrar en contacto con enzimas y microorganismos y provocar su inhibición (Xu y Johnson, 1995).

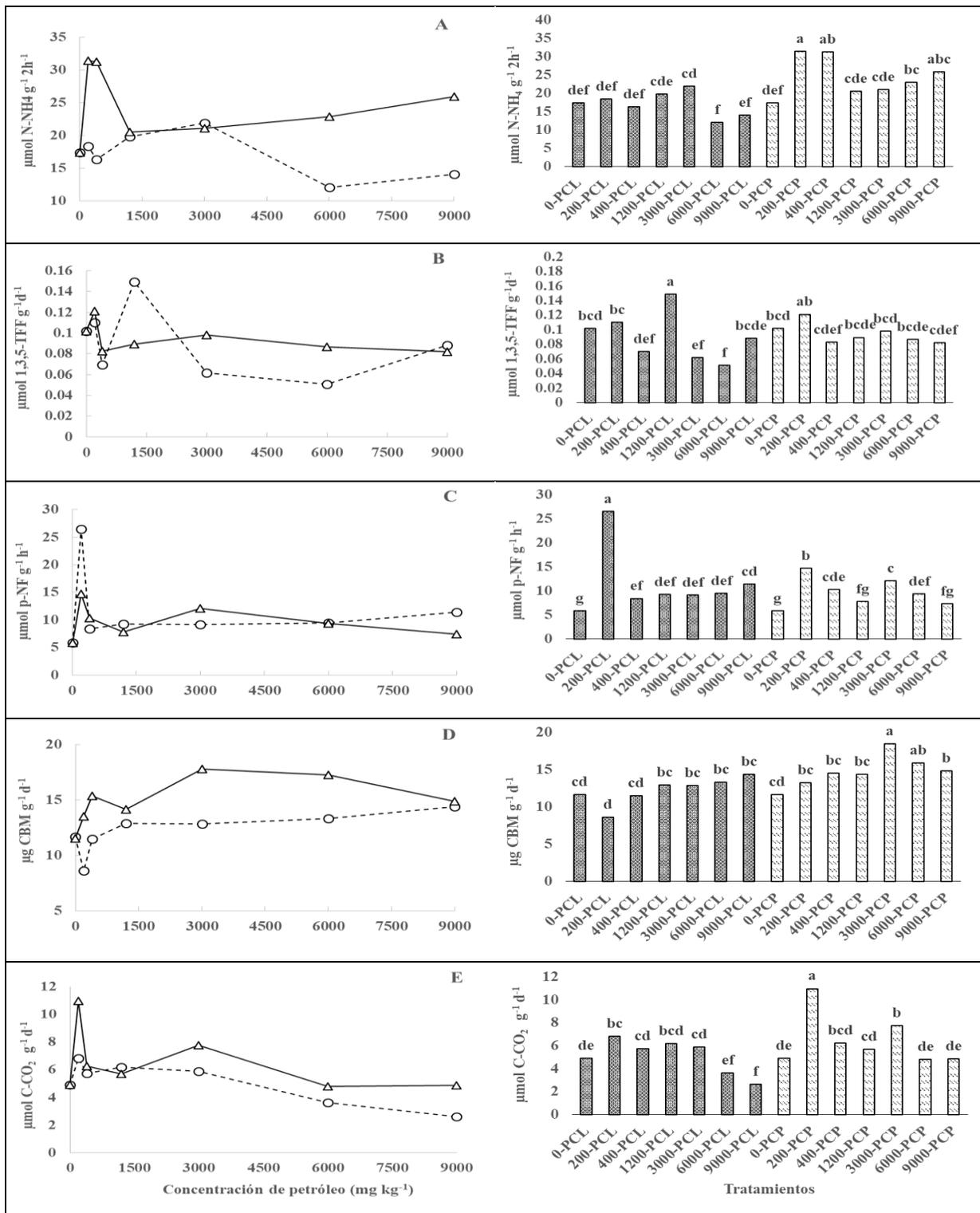


Figura 4.2. Propiedades biológicas del suelo con diferentes concentraciones de petróleo crudo ligero (PCL) y petróleo crudo pesado (PCP). A) Ureasa, B) ADH, C) Fosfatasa, D) CBM y E) Respiración del suelo. Literales sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos o combinaciones de niveles de ambos factores (der.). \circ -PCL \triangle -PCP

Labud *et al.* (2007) señalan que aunque la biomasa microbiana sea inhibida, los microorganismos remanentes capaces de metabolizar los hidrocarburos incrementan la respiración. Por su parte, Xu y Johnson (1995) observaron que la respiración y la biomasa microbiana fueron estimuladas por la presencia de hidrocarburos en suelos sembrados con guisante y cebada. Por el contrario, en el presente estudio la producción de C-CO₂ disminuyó con el incremento de la concentración de los petróleos, considerando que las determinaciones se realizaron inmediatamente después de la contaminación no habiendo un periodo de adaptación como en los estudios antes mencionados, donde el factor tiempo jugó un papel importante en el incremento de la respiración microbiana.

Labud *et al.* (2007) estudiaron el comportamiento de diferentes hidrocarburos por efecto de la textura del suelo, observando un incremento en la respiración de suelo contaminado con diésel y con petróleo crudo en un periodo de 180 días, en cuanto que la mayor inhibición de enzimas hidrolíticas ocurrió en presencia de gasolina. Sin embargo, observaron la estimulación de las enzimas estudiadas en un suelo arcilloso especialmente en presencia de diésel en altas concentraciones.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se estudiaron en condiciones de laboratorio los efectos del PCL y PCP a diferentes concentraciones en las propiedades bioquímicas, biológicas y físico-químicas de un suelo Fluvisol de uso agrícola. El PCL ejerció mayor efecto inhibitorio sobre la respiración del suelo, el CBM y las actividades ureasa y fosfatasa, ya que los valores fueron significativamente menores en comparación con el PCP. En cambio, para la ADH el tipo de petróleo crudo no tuvo efecto significativo pero sí la concentración de hidrocarburos, especialmente en el tratamiento 6000-PCL. Se encontró que en el nivel mínimo de contaminación por petróleo crudo (200 mg kg⁻¹) la respiración del suelo (200-PCP), la actividad fosfatasa (200-PCL y 200-PCP) y la actividad ureasa (200-PCP) mostraron los valores más elevados y significativamente diferentes a los de los correspondientes valores tanto del suelo no contaminado como de los niveles de contaminación superiores a este. El contenido de C orgánico fue la propiedad que aumentó directamente con el incremento de los tipos de petróleo en el suelo, mientras que el N total y el P se mantuvieron en los niveles muy bajo y bajo, respectivamente, y el pH se comportó de manera variable bajo los diferentes niveles de contaminación.

LITERATURA CITADA

- Alrumman, S. A., D. B. Standing y G. I. Paton. 2015. Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University-Science* 27:31-34.
- Andreoni, V., L. Cavalca, M. A. Rao, G. Nocerino, S. Bernasconi, E. Dell'Amico, M. Colombo y L. Gianfreda. 2004. Bacterial community and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57:401-412.
- Baran, S., J. E. Belińska, y P. Oleszczuk. 2004. Enzymatic activity in an airfield soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Geoderma* 118: 221-232.
- Brohon, B., C. Delolme, y R. Gourdon. 2001. Complementary of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biology and Biochemistry* 33:883-891.
- Casida, L. E. Jr., D. A. Klein, y T. Santoro. 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Science* 98:371-376.
- Cruz-Flores, G., D. Flores R., G. Alcántar G., A. Trinidad S., M. E. Álvarez S. y A. Bautista A. 2007. Actividad fosfatasa y pH del suelo adyacente a la rizosfera de maíz, trigo y triticale en suelos ácidos. *Terra Latinoamericana* 25:115-125.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2002. NOM-021-RECNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. *Diario Oficial de la Federación*. Martes 31 de diciembre de 2002. 75 p.
- Essien, O. E. e I. A. John. 2010. Impact of crude-oil spillage pollution and chemical remediation on agricultural soil properties and crop growth. *Journal of Applied Science and Environmental Management* 14:147–154.
- Guo, H., J. Yao, M. Cai, Y. Qian, Y. Guo, H. H. Richnow, R. E. Blake, S. Doni y B. Ceccanti. 2012. Effect of petroleum contamination on soil microbial numbers, metabolic activity and urease activity. *Chemosphere* 87:1273-1280.
- Hentati, O., R. Lachhab, M. Ayadi y M. Ksibi. 2013. Toxicity assessment for petroleum-contaminated soil using terrestrial invertebrates and plant bioassays. *Environmental Monitoring and Assessment* 185:2989–2998.

- John, R. C., E. S. Ntino y A. Y. Itah. 2016. Impact of crude oil on soil nitrogen dynamics and uptake by legumes grown in wetland Ultisol of the Niger Delta, Nigeria. *Journal of Environmental Protection* 7:507-515.
- Kumar, S., S. Chaudhuri y S. K. Maiti. 2013. Soil Dehydrogenase Enzyme Activity in Natural and Mine Soil - A Review. *Middle-East Journal of Scientific Research* 13: 898–906.
- Labud, V., C. García and T. Hernández. 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere* 66:1863-1871.
- Li, J., X. Zhou, J. Yan, H. Li y J. He. 2015. Effects of regenerating vegetation on soil enzyme activity and microbial structure in reclaimed soils on a surface coal mine site. *Applied Soil Ecology* 87:56-62.
- Mathew, M. y J. P. Obbard. 2001. Optimisation of the dehydrogenase assay for measurement of indigenous microbial activity in beach sediments contaminated with petroleum. *Biotechnology Letters* 23:227–230.
- Ortíz-Maya, J., E. Escalante-Espinosa, R.L. Fócil-Monterrubio, H. C. Ramírez-Saad e I. J. Díaz Ramírez. 2017. Dinámica de poblaciones bacterianas y actividad deshidrogenasa durante la biorremediación de suelo recién contaminado e intemperizado con hidrocarburos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 33:237-246, DOI: 10.20937/RICA.2017.33.02.05
- Peña, W., C. Trasar-Cepeda., F. Gil Sotres y M. C. Leirós. 2007. Modification of the degradative capacity of a soil artificially contaminated with diesel. *Chemosphere* 67:1057–1063.
- Piotrowska-Dlugosz, A. 2014. Enzymes and soil fertility. *In*: L. Gianfreda, M. A. Rao (Eds). *Enzymes in Agricultural Sciences*. Omics Group eBooks. Foster City, USA. pp: 20.
- Saadoun, I., M. J. Mohammad, K. M. Hameed y M. Shawaqfah. 2008. Microbial populations of crude oil spill polluted soils at the Jordan-Iraq desert (the Badia region). *Brazilian Journal of Microbiology* 39:453-456.
- Shen, G., Y. Lu, Q. Zhou y J. Hong. 2005. Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzyme. *Chemosphere* 61:175-1182.
- Tabatabai, M. A. y J. M. Bremner. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1:301-307.
- Tabatabai, M. A. y J. M. Bremner. 1972. Assay of urease activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 4:479-487.

- Trasar-Cepeda, C., M. C. Leirós, S. Seoane y F. Gil-Sotres. 2000. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. *Soil Biology and Biochemistry* 32:1867–1875.
- Turgay, O.C., E. E. Erdogan y A. Karaca. 2010. Effect of humic deposit (leonardite) on degradation of semi-volatile and heavy hydrocarbons and soil quality in crude-oil-contaminated soil. *Environmental Monitoring and Assessment* 170:45–58.
- USEPA. 1996. Method 3540C: Soxhlet Extraction, part of Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. 10/08/2015
<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3540c.pdf>
- Vance, E.D., P. C. Brookes y D. S. Jenkinson. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19:703–707.
- Wallenstein, M.D. y M. N. Weintraub. 2008. Emerging tools for measuring and modeling the in situ activity of soil extracellular enzymes. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 2098–2106.
- Wang, Y., J. Feng, Q. Lin, X. Lyu, X. Wang y G. Wang. 2013. Effects of crude oil contamination on soil physical and chemical properties in Momoge wetland of China. *Chinese Geographical Science* 23:708–715.
- Wyszkowska, J., M. Kucharski y J. Kucharski. 2006. Application of the activity of soil enzymes in the evaluation of soil contamination by diesel oil. *Polish Journal of Environmental Studies* 15:501-506.
- Xu, J.G. y R.L. Johnson. 1995. Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oil-contaminated, remediated and uncontaminated soils planted to barley and field pea. *Plant and Soil* 173:3–10.
- Zavala C., J., M. C. Gutiérrez C. y D. J. Palma-López. 2003. Impacto ambiental en las tierras del campo petrolero Samaria, Tabasco. COLPOS- CONACYT-CCYTET. Villahermosa, México. 131 p.
- Zhan, X., W. Wu, L. Zhou, J. Liang y T. Jiang. 2010. Interactive effect of dissolved organic matter and phenanthrene on soil enzymatic activities. *Journal of Environmental Sciences* 22: 607–614.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

CONCLUSIONES

Para la ureasa y fosfatasa se acepta la hipótesis nula, ya que con el mínimo de contaminación por petróleo crudo, 200 mg kg^{-1} , se obtuvieron los valores significativamente más altos y la actividad ureasa disminuyó a mayores niveles de contaminación. Se acepta también la hipótesis nula para ambas actividades de que existe diferencia por el tipo de petróleo; la inhibición fue significativamente mayor con el PCL en la actividad ureasa, para la actividad fosfatasa el PCP causó mayor inhibición.

Para la ADH se acepta la hipótesis nula, ya que a concentraciones mayores a 1200 mg kg^{-1} de PCL y mayores a 3000 mg kg^{-1} de PCP, las actividades enzimáticas disminuyeron significativamente. Respecto al efecto por el tipo de petróleo sobre la ADH, se rechaza la hipótesis nula.

Para el CBM en el suelo con PCL se rechaza la hipótesis nula, debido a que no se observaron cambios significativos respecto al suelo no contaminado y los niveles crecientes de contaminación. Respecto a la contaminación con PCP, se acepta la hipótesis nula, debido a que a concentraciones mayores a 3000 mg kg^{-1} de PCP, el CBM comenzó a declinar. Finalmente, para las diferencias por el tipo de petróleo se acepta la hipótesis nula, ya que fue mayor la inhibición con el PCL que con el PCP.

Para la respiración del suelo se acepta la hipótesis nula, dado que a concentraciones mayores a 3000 mg kg^{-1} tanto de PCL como de PCP, la respiración disminuyó significativamente. Y se acepta la hipótesis nula de diferencia por el tipo de hidrocarburo, pues el PCL causó mayor inhibición que el PCP.

Para los resultados de pH, N_{total} , C orgánico y CIC se acepta la hipótesis nula, que establece diferencias en los valores dadas por el tipo de hidrocarburo; para el P, se rechaza la hipótesis nula. En cuanto a los efectos dados por la concentración de petróleo crudo, se acepta la hipótesis nula para los cinco parámetros físico-químicos.

Finalmente, el desarrollo y validación de un método espectrofotométrico para la cuantificación de petróleo crudo en suelo en niveles inferiores a 100 mg kg^{-1} , permitió estimar con mayor precisión y exactitud la cantidad de hidrocarburos en el suelo empleado como control (no

contaminado), además de que a partir de esto se propuso una metodología de validación novedosa aplicable para modelos de calibración lineales simples construidos mediante espectrofotometría UV-Vis.

RECOMENDACIONES

En estudios de la fertilidad de suelos impactados por hidrocarburos es necesario un análisis que incluya la actividad de las enzimas involucradas en los ciclos de los nutrientes principales, y parámetros de actividad biológica, además de la caracterización físico-química.

Se recomienda emplear el método espectrofotométrico (aplicable en condiciones experimentales similares a las aquí presentadas) para cuantificar concentraciones bajas de petróleo crudo ligero y pesado en suelo con una mayor precisión y exactitud, además de que es sencillo y económicamente accesible. Se debe considerar que para cada tipo de hidrocarburo y/o solvente diferente empleado, se deberá realizar el proceso de calibración y validación correspondiente.