

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



EFFECTO DEL DISPERSANTE COREXIT 9500[®] EN
EL PROCESO DE DEGRADACIÓN DE
HIDROCARBUROS EN EL AMBIENTE MARINO.

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

ADA DE LA LUZ MELÉNDEZ SÁNCHEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.

SEPTIEMBRE 2009

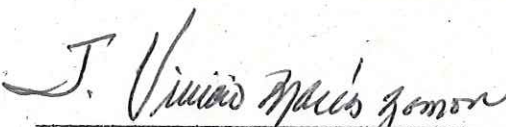
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

**EFFECTO DEL DISPERSANTE COREXIT 9500[®] EN
EL PROCESO DE DEGRADACIÓN DE
HIDROCARBUROS EN EL AMBIENTE MARINO**

TESIS QUE PRESENTA

ING. ADA DE LA LUZ MELÉNDEZ SÁNCHEZ

APROBADA POR:


DR. JOSÉ VINICIO MACÍAS ZAMORA
DIRECTOR


DR. JULIO A. VILLAESCUSA CELAYA

SINODAL


DR. EFRAÍN A. GUTIERREZ GALINDO

SINODAL

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca cuyo número de registro fue 199057, la cual me fue autorizada para el período 2005-2007.

Al Dr. Santamaría por ofrecerme la oportunidad de integrarme al programa de posgrado, ya que fue la primera persona que me proporcionó información del plan de estudios y me contactó con los investigadores que podían recibirme en su grupo de trabajo.

Al Dr. José Vinicio Macías Zamora, por aceptarme en su grupo de trabajo y por darme la oportunidad de plantearme retos que solo pueden alcanzar el éxito si se fundamentan en la dedicación y el trabajo constante, gracias por orientarme y generar en mí un instinto crítico que puede ser aplicado no solo en el área académica sino también en la vida cotidiana y profesional.

Al Dr. Efraín Abraham Gutiérrez Galindo, por haber aceptado ser parte de este comité y haberle dedicado tiempo a la revisión de mi trabajo. Sus comentarios y explicación sobre la manera de relacionar las ideas en el escrito me fue de mucha utilidad para mejorar este trabajo.

Gracias especialmente al Dr. Julio Alberto Villaescusa Celaya, por aceptar ser parte de mi comité y por estar siempre disponible al momento de tocar a su puerta con un sin fin de dudas o planteamientos sobre este proyecto, por escucharme y orientarme mientras estuve en Ensenada, por las asesorías brindadas, que a pesar de la distancia, me sirvieron de guía para poder concluir este trabajo, mil gracias por los comentarios que me hizo sobre este escrito y por enseñarme que la respuesta puede ser más simple de lo que uno piensa.

Al Dr. Francisco Delgadillo, por ser como es, por estar presente en esta etapa de mi vida, por ser amigo, confidente, por ser un farolito en el camino, por sus consejos, simplemente por escuchar y por hablar en el momento que era necesario. Porque profe, todas sus palabras han sido muy valiosas para mí, gracias a ellas pude entender que las cosas pasan por una razón y que uno no debe darles la espalda, al contrario, se deben encarar y aprender de ellas. Porque me enseñó a entender y valorar que aquello que realizamos con mucho empeño y que representa para nosotros un reto nos brindará una enseñanza de mayor importancia en nuestra vida. También muchas gracias por contestar las dudas que se me presentaban en los temas que impartió en la clase de oceanografía química, porque de esta forma pude descubrir lo maravilloso de esta ciencia.

Gracias a Nancy Ramírez, y José Luis Sánchez, por haberme orientado y enseñado las técnicas de laboratorio que se aplicaron durante la etapa analítica de este proyecto, así también como su apoyo para la obtención del sedimento marino de la Bahía de Todos Santos.

A todos los profesores que en clase compartieron con nosotros sus conocimientos y experiencia: Víctor Camacho, Miguel Angel Huerta, Carlos Torres, Luis Felipe Navarro, Roberto Millán, Jose Zertuche, Antonio Trujillo.

Por supuesto que no me olvido de las personitas que me brindaron su amistad y cariño durante el tiempo que viví en Ensenada y que hasta la fecha y a pesar de la distancia siguen siendo parte de mi vida, a ustedes que los considero mi "familia ensenadense" y cuyos miembros son: Monserrat Santiago González, Francisco Flores de Santiago, Vanesa Torres Delgado, Gabriela Alarcón, Astrid Montiel, Constanza Ricaurte, Leslie Aveytua, Carlos Peña, Carlos Romero, Carlos Alberto Rivas, Ana Edith Rodríguez, Claudia Carrillo, Karina Xolaltenco y Evaristo del Ángel, les agradezco por los momentos vividos, por compartir lo poco o mucho que tenían, por sus consejos, por su apoyo, por tolerarme y por enseñarme lo mucho que saben.

De manera especial a Monse, Pancho, Gaby y Vane, muchas gracias por su amistad y me gustaría que sepan que los considero como unos hermanos, les agradezco por haberme brindado su confianza y cariño, por hablar y callar en el momento justo y por todos los momentos vividos, los cuales fueron muy gratos para mí, nunca los olvidaré.

La lista de personas a las cuales tengo que agradecer es inmensa, ya que recuerdo a muchos de los investigadores y personal del IIO que me brindaron apoyo en el momento que lo requerí. Con el simple hecho de prestarme un mesa de agitación, usar la campana de extracción para preparar mis curvas de calibración, proporcionarme agua de mar filtrada, una perilla, la draga para la extracción del sedimento que se utilizó en mi trabajo, el darme un lugar en un laboratorio, fue lo que contribuyó y dio forma a mi proyecto, es por esa razón que tengo que agradecerles a todos ustedes: Ricardo Searcy, Casandra Anguiano, María Victoria Orozco, Pepe Guzmán, Arturo Siqueiros, Celia Pérez, Karina Lugo, Pedro Castro, Verónica Rodríguez, Angélica Arce, Beto Sánchez y Yunuén Cañedo, los dos últimos, fueron parte del Instituto y ahora laboran en otros centros de investigación, pero eso no les resta agradecimiento por apoyarme.

No puedo dejar de mencionar a mis amigas y amigos que desde Puebla me brindaron su apoyo y creyeron en este proyecto, gracias por confiar en mí, por no olvidarme y ayudarme desde lejos, este grupo de personas que conozco desde hace algunos añitos esta formado por: Rubielina Pablo Pablo, Efraín Neri Ramírez, Guadalupe Salgado Ávila, Katia Santillana Romero, Martha Monroy Pedroza, Gabriel Martínez, Eduardo Ortiz, Martín Palma Sánchez, Karina Castillo, Leobardo González.

Gracias Arturo Morales Reyes por brindarme tu cariño, confianza y tiempo, porque desde la distancia me apoyaste a superar los problemas que tenía encima con tus consejos, gracias por todo lo que hiciste por mí y por mi familia, y por formar parte de esta etapa de mi vida.

A todas las personas que posterior a la etapa experimental y de análisis de datos se interesaron en mi trabajo y me brindaron su apoyo y consejos para que pudiera concluirlo este proyecto.

Dedicatoria.

A mi madre: María Virginia Sánchez Cordero

Este trabajo esta dedicado especialmente para ti; tal vez ésta sea una forma poco común de agradecerte todo lo que has hecho por mí, pero es la manera de demostrarte que eres la persona más importante en mi vida, porque siempre confías en lo que hago y me brindas consejos cuando llego a perder mi camino. Desde que tengo memoria me inculcaste que el trabajo se debe hacer con paciencia y dedicación, con esmero y cuidado, con orden y planeación. Tal vez en el pasado no entendía porque eras tan estricta en ese sentido, pero ahora comprendo que todo lo que me enseñaste era para que yo pudiera afrontar lo que se presente a lo largo de mi vida, he aprendido de la mejor maestra.

Gracias por todo el amor que nos brindas a mis hermanos y a mí, esto nos lo has demostrado al entregarnos tu vida entera. Una vez más te agradezco por darme ánimos para continuar y concluir todo lo que comienzo y por la herencia más valiosa que nos otorgaste, me refiero a nuestra educación y valores.

A mi Tío: Rafael Olayo Castillo.

Por ser como un padre para mí, porque me has transmitido que todo lo que se realiza en la vida debe ser con entrega y con cariño. Durante todo el tiempo que he convivido contigo he aprendido que el trabajo no debe ser una carga, al contrario, es algo que se disfruta y te ofrece experiencias que te hacen madurar. Muchas gracias Tío por estar siempre pendiente de mí, por brindarme tu apoyo, cariño, por escucharme y por todas las bellas experiencias que has compartido conmigo.

A mi Abuela Luz Cordero Bello.

Que desde pequeña me cuidó y enseñó que no se debe esperar a que los triunfos caigan del cielo. Gracias mami por brindarme tu cariño y tiempo.

A mis hermanos: Vicky y Hermes:

Porque se que siempre han confiado en mí, aunque no lo expresen abiertamente, ustedes son las personas más cercanas que tengo y con quienes he compartido alegrías, tristezas, logros, fracasos además sé que siempre nos apoyaremos en los proyectos que emprendamos como hasta ahora.

A Monse:

Porque durante esta etapa me has apoyado enormemente y siempre has estado conmigo, mil gracias por tu amistad, cariño, consejos, apoyo. Gracias por estar aquí el día que culmine esta etapa.

Por todo esto y más les dedico este sencillo trabajo, porque en todo momento estuvieron conmigo.

Resumen

La introducción de petróleo por diferentes rutas constituye una de las formas más frecuentes de contaminación marina en el mundo. Las distintas maneras en las que los componentes del crudo entran a los ecosistemas marinos incluyen la descarga de aguas residuales, provenientes de áreas industriales y urbanas principalmente; las actividades que involucran la explotación y el transporte del petróleo así como de sus derivados, los derrames accidentales, la ruta atmosférica, y la exploración y producción, que son también contribuyentes importantes.

Los derrames de petróleo sobre la superficie de los cuerpos de agua limitan el intercambio gaseoso, que a su vez provocan un decremento en la fotosíntesis del fitoplancton, en la respiración y el crecimiento del zooplancton, y mata o causa anomalías en el desarrollo de muchos organismos acuáticos. Debido a estos efectos, se han desarrollado estrategias de control para limitar los impactos, entre ellas destacan la contención y recuperación mediante el uso de bombas, la combustión y la aplicación de dispersantes. En cada caso, se deberá considerar para una buena elección las características del derrame y la topografía de la zona.

Los dispersantes incrementan el área superficial del petróleo, lo que favorece el ataque microbiano y la migración de las micelas de petróleo y sus derivados a través de la columna de agua. Sin embargo, inicialmente, las sustancias utilizadas tuvieron efectos tóxicos sobre el proceso microbiano, retardando la tasa de descomposición del petróleo. Debido a que no se conoce con exactitud el efecto que los dispersantes tienen sobre el proceso de degradación de los hidrocarburos, en este estudio se planteó como objetivo el identificar si la presencia del dispersante comercial Corexit 9500[®] favorecía la degradación de los compuestos alifáticos y aromáticos una vez que se depositaban en el sedimento. Para el experimento, se utilizó sedimento que presentaba un ligero enriquecimiento de los compuestos que se estudiaron, con la finalidad de que la posible comunidad bacteriana pudiera estar presente para realizar el proceso de degradación de los compuestos

Los resultados sugieren que la degradación de la fracción alifática no se ve favorecida por la presencia del dispersante, ya que este proceso se desarrolló de la misma forma en el tratamiento que no contenía al Corexit 9500[®], en ambos casos se identificó que los compuestos que presentaron una disminución en su concentración fueron los hidrocarburos de catorce hasta dieciocho carbonos. Su decaimiento parece seguir un comportamiento que se ajusta a uno de tipo logarítmico y exponencial. Adicionalmente, el petróleo utilizado contenía 4 compuestos aromáticos identificables por cromatografía, y al igual que en la fracción alifática, se observó que su degradación no fue inhibida con la presencia del dispersante, por el contrario, es mayor en el tratamiento que contiene únicamente combustible. Las ecuaciones que se identificaron para explicar el tipo de decaimiento fueron del tipo lineal y logarítmica, alcanzando para el compuesto Benzo(a)antraceno un 88 por ciento de remoción, con respecto a su concentración inicial. Estos datos muestran que es importante investigar el efecto del dispersante una vez asociado con el combustible, sobre los microorganismos presentes en la columna de agua, a diferentes concentraciones y en diversos ambientes para asegurar que los diferentes dispersantes no resultarán en efectos negativos sobre organismos y ecosistemas.

Índice

| | |
|--|----|
| 1.0. Introducción..... | 1 |
| 1.1. Características y composición del petróleo y sus derivados..... | 1 |
| 1.2. Entrada de los hidrocarburos del petróleo al océano..... | 3 |
| 1.3. Estrategias de control..... | 4 |
| 2.0. Antecedentes..... | 6 |
| 3.0. Objetivos..... | 13 |
| 3.1. Objetivo General..... | 13 |
| 3.2. Objetivos Particulares..... | 13 |
| 4.0. Hipótesis..... | 13 |
| 5.0. Materiales y métodos..... | 14 |
| 5.1. Obtención de muestras de sedimento..... | 14 |
| 5.2. Análisis de muestras..... | 15 |
| 5.2.1. Limpieza de material..... | 15 |
| 5.2.2. Porcentaje de humedad..... | 15 |
| 5.2.3. Tamaño de grano..... | 16 |
| 5.2.4. Materia orgánica..... | 16 |
| 5.3. Extracción y análisis de hidrocarburos..... | 16 |
| 5.4. Diseño experimental..... | 17 |
| 5.4.1. Preparación de unidades experimentales..... | 17 |
| 5.4.2. Seguimiento de los hidrocarburos..... | 19 |
| 5.4.3. Identificación y cuantificación de los hidrocarburos..... | 19 |
| 6.0. Resultados y discusión..... | 22 |
| 6.1. Características y nivel de contaminación del sedimento..... | 22 |
| 6.2. Caracterización del combustible..... | 28 |
| 6.3. Degradación de los hidrocarburos en los microcosmos..... | 29 |
| 6.3.1. Hidrocarburos en agua..... | 29 |
| 6.3.2. Hidrocarburos alifáticos en sedimento..... | 32 |
| 6.3.3. Hidrocarburos aromáticos en sedimento..... | 39 |
| 7.0. Conclusiones..... | 46 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 8.0. Recomendaciones..... | 47 |
| 9.0. Referencias Bibliográficas..... | 48 |
| Apéndice 1..... | 53 |
| Apéndice 2..... | 54 |
| Apéndice 3..... | 56 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Mecanismo de dispersión química..... | 6 |
| Figura 2. Proceso de remoción de los compuestos del crudo y sus derivados en el ambiente marino..... | 7 |
| Figura 3. Concentración de los hidrocarburos alifáticos en las muestras de sedimento utilizadas para el experimento, comparada con los datos de otros trabajos..... | 24 |
| Figura 4. Identificación de los hidrocarburos alifáticos de las muestras de sedimento recolectadas en la zona de descarga de combustibles de Pemex; Rosarito, BC y en la Boca de la Bahía Todos Santos, Ensenada BC..... | 25 |
| Figura 5. Concentración de los hidrocarburos aromáticos en las muestras de sedimento utilizadas para el experimento y datos bibliográficos..... | 27 |
| Figura 6. Compuestos de la fracción aromática identificados en las muestras de sedimento recolectadas en la zona de descarga de combustibles de PEMEX, Rosarito, BC y en la Boca de la Bahía Todos Santos, Ensenada, BC..... | 28 |
| Figura 7. Compuestos Alifáticos identificados en la mezcla de combustóleo y diesel, conocida como IFO-15..... | 29 |
| Figura 8. Hidrocarburos alifáticos totales en las muestras de agua..... | 30 |
| Figura 9. Hidrocarburos alifáticos totales en las muestras de agua sustrayendo el valor del control a cada tratamiento..... | 31 |
| Figura 10. Sumatoria de los hidrocarburos del sedimento desde C-14 hasta Fitano, de los tres tratamientos durante los muestreos realizados en los microcosmos..... | 33 |
| Figura 11. (A) valor promedio de las concentraciones de los hidrocarburos alifáticos durante el primer muestreo (15 días desde el inicio del experimento), (B) valor promedio de las concentraciones de los hidrocarburos alifáticos en el último muestreo (120 días desde el inicio del experimento)..... | 34 |
| Figura 12. Cambio en la concentración de Tetradecano (C14) durante 120 días, de la fase experimental. La curva que se ajusta a este comportamiento es de tipo logarítmico..... | 35 |
| Figura 13, Concentración de Hexadecano (C16) identificada durante el experimento, el ajuste de la recta que se aproxima a este comportamiento es de tipo exponencial..... | 35 |

| | |
|--|----|
| Figura 14. Concentraciones cuantificadas para el compuesto Octadecano (C18) durante el experimento. Los compuestos que tienen un comportamiento similar al C18 son el resto de los Alifáticos identificados en las muestras, desde C18 hasta C36..... | 36 |
| Figura 15. Decaimiento de la concentración del Fenantreno durante 5 meses de experimento. Comparación entre tratamientos, los valores mostrados son los promedios de tres replicas para cada uno de ellos. El modelo de degradación de este compuesto para cada tratamiento esta dentro de los rectángulos, el superior para IFO-15 y el inferior para Corexit ©..... | 40 |
| Figura 16. Decaimiento de la concentración del Pireno durante 5 meses de experimento. Comparación entre tratamientos, los valores mostrados son los promedios de tres replicas para cada uno de ellos. El modelo de degradación de este compuesto para cada tratamiento esta dentro de los rectángulos, el superior para IFO-15 y el inferior para Corexit ©..... | 41 |
| Figura 17. Decaimiento de la concentración del Benzo(a) antraceno durante 5 meses de experimento. Comparación entre tratamientos, los valores mostrados son los promedios de tres réplicas para cada uno de ellos. El modelo de degradación de este compuesto para cada tratamiento esta dentro de los rectángulos, el superior para IFO-15 y el inferior para Corexit ©..... | 41 |
| Figura 18. Decaimiento de la concentración del Criseno durante 5 meses de experimento. Comparación entre tratamientos, los valores mostrados son los promedios de tres réplicas para cada uno de ellos. El modelo de degradación de este compuesto para cada tratamiento esta dentro de los rectángulos, el superior para IFO-15 y el inferior para Corexit ©..... | 42 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Diseño experimental planteado para este estudio..... | 17 |
| Tabla 2. Estándar comercial de hidrocarburos alifáticos, SFL-601 y UST-310 (Isoprenoides, C ₁₇ y C ₁₈), ambos del laboratorio Ultra Scientific..... | 20 |
| Tabla 3. Lista de los 16 compuestos aromáticos del estándar comercial de la mezcla de 16 hidrocarburos aromáticos del laboratorio Ultra Scientific..... | 21 |
| Tabla 4. Características físicas y porcentaje de materia orgánica obtenidas de las muestras de sedimento..... | 22 |
| Tabla 5. Porcentaje de recuperación de los hidrocarburos..... | 22 |
| Tabla 6. Valores comparativos para las concentraciones totales de hidrocarburos aromáticos poli -cíclicos de estudios en diferentes partes del mundo, Macías-Zamoraet al., (2002)..... | 26 |
| Tabla 7. Porcentaje de degradación de C14-C17 y Pristano. Ecuación de degradación de cada uno de los compuestos..... | 38 |
| Tabla 8. Porcentaje de degradación de hidrocarburos aromáticos y ecuación de degradación de cada uno de los compuestos..... | 44 |
| Tabla 9. Clave de identificación de las unidades experimentales..... | 53 |
| Tabla 10. Orden de unidades experimentales en los estantes..... | 54 |

1.0 Introducción.

1.1. Características y composición del petróleo y sus derivados.

El término petróleo proviene del latín *petro oleum*, cuyo significado es “Roca de Aceite”. El petróleo es una mezcla compleja de diversos componentes, de los cuales se considera como principales a los hidrocarburos. Los hidrocarburos son compuestos formados principalmente por átomos de carbono e hidrógeno, de gran abundancia en la naturaleza y son considerados como una mezcla compleja de gases, líquidos y sólidos, existiendo cantidades trazas de nitrógeno, oxígeno y azufre, además de contener compuestos de hierro, níquel, vanadio y otros metales. (Bojes *et al.*, 2007; Aldrett *et al.*, 1997 & Altamirano-García, 2004, PEMEX, 1988).

La composición química del petróleo varía de acuerdo a la región de extracción del crudo. En México se conocen tres tipos de crudo, aunque solo se tienen caracterizados por su composición de hidrocarburos a dos, los cuales tienen las siguientes características: (a) el crudo proveniente del Istmo de Tehuantepec que contiene un 24% de octanos (C5-C10), 15% de Keroseno (C11-C12), 11% de destilados ligeros (C13-C20), 28% de destilados pesados (C21-C40) y 16% de residuos pesados (>C40); (b) el crudo Maya 20.5% de octanos (C5-C10), 10% de Keroseno (C11-C12), 7% de destilados ligeros (C13-C20), 14% de destilados pesados (C21-C40) y 48% de residuos pesados (>C40). Los hidrocarburos del petróleo de mayor estudio son los alcanos de cadena lineal y ramificados, los cuales representan en promedio el 30%, los ciclo alcanos, 50%, y los aromáticos que conforman un 15%. (Albers 1994). El crudo Olmeca es una mezcla, considera como extra ligera, por lo tanto abundan los octanos, kerosenos y destilados ligeros.

Los productos del petróleo son mezclas complejas de cientos de hidrocarburos, desde compuestos ligeros y volátiles, de cadena corta, hasta compuestos pesados de cadena larga y compuestos ramificados, cíclicos y aromáticos. La composición exacta de los productos del petróleo varía dependiendo principalmente del tipo y la fuente del petróleo crudo y las prácticas de refinación usadas para obtener los productos. Durante el proceso de refinación, el petróleo crudo es separado en fracciones que presentan

similares puntos de ebullición, estas fracciones son modificadas por craqueo, condensación, polimerización y el proceso de alquilación.

Posteriormente son formulados productos comerciales como la nafta, la gasolina, el combustible para aviones y el conocido como Fuel Oil. La composición de estos productos puede variar en base a la refinación involucrada, la época del año, la adición de aditivos o modificadores y otros factores. Las principales características de estos combustibles son:

Gasolina de Autos: La gasolina para automóviles es una mezcla de hidrocarburos con punto de ebullición bajo, es adecuado para generar la combustión interna en las máquinas y tiene un rango de octanos de al menos 60. Esta, típicamente contiene alrededor de 150 compuestos de hidrocarburos, sin embargo han sido identificados cerca de mil (ATSDR 1995a). La longitud de las cadenas de los hidrocarburos típicos son desde C4 hasta C12 con una distribución general de los hidrocarburos de la siguiente manera: 4-8% alcanos, 2-5% alquenos, 25-40% isoalcanos, 3-7% cicloalcanos, 3-7% cicloalcanos, 1-4% cicloalquenos y del 20-50% aromáticos (IARC 1989a). Sin embargo estas proporciones varían considerablemente.

Diesel: Se caracteriza por hidrocarburos de cadenas largas en el rango de C11-C20. Su composición consiste de aproximadamente 64% de hidrocarburos alifáticos (cadenas lineales de alcanos y cicloalcanos), 1-2% de hidrocarburos insaturados (alquenos), 35% de hidrocarburos aromáticos (incluyendo alquil-benceno y compuestos aromáticos de 2/3 anillos). Contiene menos del 5% del hidrocarburos aromáticos policíclicos (ATSDR 1995g).

Fuel Oil #6: Es la forma residual del petróleo crudo después de que han sido extraídos los aceites ligeros, la gasolina, la nafta, el Fuel Oil #1 y Fuel Oil #2. Los combustibles residuales son generalmente más complejos en cuanto a su composición e impurezas que los combustibles destilados. Los datos disponibles sobre la composición del Fuel Oil #6 son limitados (ATSDR 1995g). Clark *et al* (1990), indican que el Fuel Oil #6 contiene alrededor de 25% de aromáticos, 15% parafinas, 45% naftalenos y 15% de otros compuestos. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) y HAP's

alquilados son componentes persistentes y riesgosos en el Fuel Oil #6. (Robert, Joan, & Daniel 1999)

1.2. Ingreso de los hidrocarburos del petróleo al océano.

Los mares son considerados receptores de compuestos orgánicos de origen natural y antropogénico, por ejemplo los que ingresan del continente vía fluvial y del transporte atmosférico. Los sedimentos costeros actúan, a corto o largo plazo, como sumidero de compuestos orgánicos de diversas fuentes (Medeiros *et. al* 2004). Cuando los contaminantes orgánicos son aportados al ambiente, especialmente en suelos y sedimento, la función y la estructura de la microflora cambia.

Es razonable asumir que las especies microbianas que pueden degradar estos compuestos crecerán en un sitio donde la contaminación ocurra, mientras aquellas que no puedan competir o soportar tales niveles de polución, disminuirán con el tiempo (Moon *et al.*, 2006).

En años recientes el volumen de petróleo que ha sido introducido en el ambiente se ha incrementado de manera importante, ya que el petróleo es la principal fuente de energía usada por el hombre. El ingreso de petróleo constituye una de las formas más frecuentes de contaminación marina en el mundo (Martínez-Alonso. *et al.*, 2003). Existen varias formas de ingreso de petróleo hacia el mar, la más importante es la descarga de aguas residuales, la cual contribuye con un 38% y es consecuencia del propio consumo de hidrocarburos, que a nivel mundial ha crecido en 25% desde 1985 hasta el 2000 comprende todas las descargas provenientes del continente (industriales, urbanas, etc.). Las actividades que involucran explotación y transporte del petróleo y sus derivados contribuyen con un 33%, los derrames por accidentes representan solo un 12% del total descargado al mar; al transporte atmosférico aporta un 9%; los aportes naturales el 7% y por último la exploración y producción con un 2% (NRC 2005 & Altamirano-García, 2004).

Los hidrocarburos del petróleo están formados por compuestos químicos de extrema complejidad, debido a que provienen de diversas fuentes. Los hidrocarburos que han sido descargados al mar pueden sufrir cambios en sus propiedades químicas por

los procesos naturales presentes, como son la foto oxidación, el metabolismo biológico de diversos microorganismos y el equilibrio de partición, de diferentes componentes individuales, entre fases disueltas y particuladas en el agua (Zaghden *et. al* 2005).

Los derrames de petróleo sobre la superficie de los cuerpos de agua limitan el intercambio gaseoso, así como también asfixia y mata a los organismos que habitan en la superficie y a los peces. Este problema provoca un decremento en la fotosíntesis del fitoplancton, en la respiración y el crecimiento del zooplancton, mata o causa anomalías en el desarrollo y el crecimiento de muchos organismos acuáticos.

El petróleo que ingresa al mar, ya sea de fuentes naturales o antropogénicas, está sujeto a una serie de procesos naturales que cambian su estado físico o localización. Estos procesos incluyen la dispersión, disolución, evaporación y sedimentación; sin embargo, no tienen efecto en la remoción final del petróleo derramado, en cambio los procesos que modifican su composición química como la combustión, la foto oxidación y biodegradación, finalmente convierten a los hidrocarburos en bióxido de carbono y agua.

1.3. Estrategias de Control.

Los derrames de petróleo y el alcance negativo de los efectos a gran escala que estos generan sobre el ambiente demandan el desarrollo de diversas estrategias de control. Entre los más importantes se encuentran los sistemas de contención y recuperación usando bombas, desnatadoras, etc., así como la combustión y aplicación de dispersantes. Sin embargo, ciertas características se deben considerar para dictaminar el tipo de estrategia de control a desarrollar, tales como son el volumen de petróleo derramado, la sensibilidad del cuerpo receptor, la topografía del área, etc. Los dispersantes son aplicados usualmente cuando es necesario eliminar de manera inmediata la masa flotante de la película de petróleo, especialmente cuando el derrame se presenta cerca de la línea de costa (NRC 1989).

Los dispersantes actúan emulsificando o fraccionando la capa de petróleo, formando pequeñas gotas de tal manera que garanticen la dispersión de los hidrocarburos no solubles en los ecosistemas acuáticos. Sin embargo, es importante

resaltar que la mayoría de los dispersantes que fueron introducidos inicialmente en el mercado resultaron extremadamente tóxicos para los organismos que habitaban en los ecosistemas marinos, debido a que estos incrementaban la toxicidad de los hidrocarburos del petróleo (Otitoloju, 2005).

Los dispersantes incrementan el área superficial lo que favorece el ataque microbiano y la migración de las esferas de petróleo y sus derivados a través de la columna de agua, lo cual provoca que el oxígeno y los nutrientes sean disponibles. Sin embargo, con su empleo se encontró que algunos tuvieron efectos tóxicos sobre el proceso microbiano, retardando la tasa de descomposición del petróleo.

Con relación al proceso de degradación en el medio ambiente, la evidencia es controversial. Algunos estudios han propuesto que los dispersantes tienen un efecto insignificante sobre la biodegradación, mientras que otros sugieren un efecto positivo y algunos otros estudios contradicen estas conclusiones ya que sugieren un efecto negativo (Mulkins-Phillips & Stewart, 1974; Varadaj *et al.*, 1995; Lindstrom *et al.*, 2002; Macnaughton *et al.*, 2003; Otitoloju, 2005).

Debido a la controversia que se ha generado sobre el uso de los dispersantes y los pocos estudios que existen en la Republica Mexicana relacionados con este tema, es necesario realizar investigaciones para conocer los efectos que los dispersantes tienen sobre la degradación de los hidrocarburos del petróleo en el ambiente marino. Los planes de contingencia requieren de una respuesta rápida al problema de los derrames de petróleo y sus derivados que se puedan presentar en las costas mexicanas, y donde los dispersantes químicos están considerados como alternativa para atender y evitar que el petróleo llegue a la zona costera.

2.0. Antecedentes.

Los dispersantes químicos son sustancias importantes para el control de derrames de petróleo en ambientes acuáticos debido a que minimizan la presencia de hidrocarburos en la superficie de los cuerpos de agua. Sin embargo, se deben tomar en cuenta diversos factores para su utilización, como son la efectividad física de los dispersantes bajo diferentes condiciones, la toxicidad del dispersante y del petróleo dispersado sobre especies marinas locales y el efecto de los dispersantes sobre el petróleo derramado y sus hidrocarburos (Lindstrom *et al.*, 2002).

Un dispersante comercial es una mezcla de tres tipos de sustancias químicas: solventes, aditivos y los más importantes: agentes de superficie activa (surfactantes). Los solventes se agregan principalmente para promover la disolución de los surfactantes, para mantener los surfactantes en solución, los solventes reducen la viscosidad de los productos y afecta la solubilidad de los dispersantes en el petróleo. Los aditivos están presentes para mejorar la disolución de los surfactantes en la mancha de petróleo e incrementan la estabilidad de la formulación del dispersante a largo plazo. Los surfactantes son compuestos que contienen dos partes, una es compatible con el petróleo (parte lipofílica o hidrofóbica) y la otra es compatible con el agua (parte hidrofílica), reducen la tensión entre las fases (agua-aceite), por la orientación de los grupos hidrofílicos los cuales interactúan con la fase acuosa y los grupos hidrofóbicos los cuales interactúan con el petróleo. La reducción de la tensión superficial entre el petróleo y el agua facilita la formación de un gran número de pequeñas gotas de petróleo (Fig. 1) que se pueden integrar a la columna de agua donde se asocian con material particulado para finalmente depositarse en el fondo de los cuerpos de agua (NRC 2005).

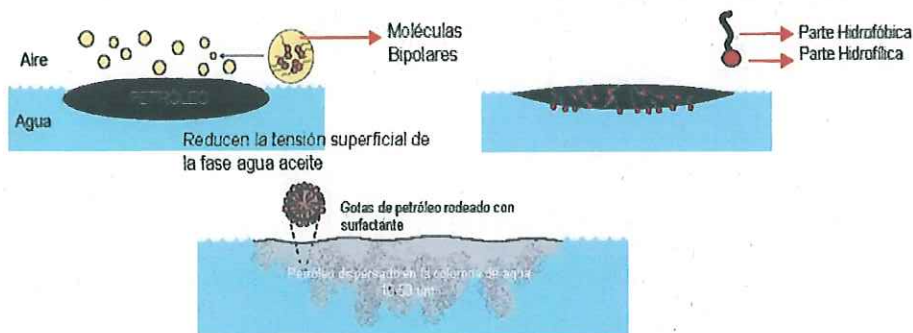


Figura 1. Mecanismo de dispersión química, con la aplicación del dispersante.

La evidencia más directa del efecto de los dispersantes sobre la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo involucra la medición de los cambios en la composición del petróleo, usualmente mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas (GC-MS), o también por la medición de la tasa de biotransformación de hidrocarburos específicos a dióxido de carbono (NRC 2005).

El efecto de los surfactantes y las mezclas de dispersantes sobre la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo involucra interacciones complejas entre el petróleo, el surfactante y la composición de la comunidad microbiana debido a que se incrementa su solubilidad en el agua y a su vez la biodisponibilidad de estos compuestos (Bruheim *et al.*, 1997).

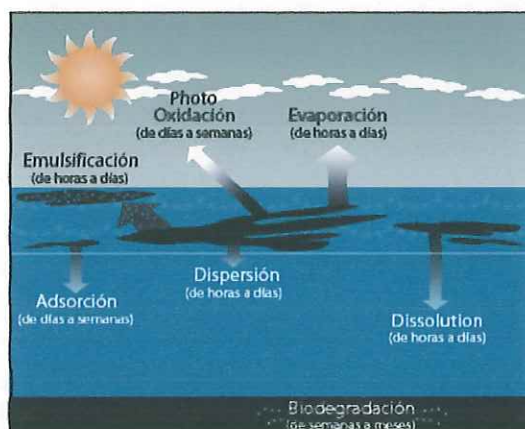


Figura 2. Procesos de remoción de los compuestos del crudo y sus derivados en ambiente marino.

La biodegradación de los hidrocarburos del petróleo derramado en ambientes acuáticos es el mecanismo de mayor importancia en la remoción de estas sustancias, ya que los compuestos resultantes finalmente se depositan en el sedimento. Es durante el proceso microbiano donde el combustible es usado como una fuente de carbono orgánico, resultante de la desintegración de los componentes de la mezcla de hidrocarburos a compuestos de bajo peso molecular, o su transformación a compuestos más polares de igual número de carbonos que el compuesto padre (Aldrett *et al.* 1997).

Esto se demuestra con los trabajos hechos en Alaska donde ocurrió el derrame del Exxon Valdez, los cuales han estimado que el 50% del petróleo derramado fue biodegradado tanto en la columna de agua como en los sedimentos (Wolfe *et al.* 1994).

De manera natural, la población de los microorganismos degradadores de hidrocarburos presentes en el ambiente marino es de menos del 1% del total de la comunidad microbiana. Sin embargo, al ocurrir un derrame de petróleo, la población de estos microorganismos especializados se incrementa y puede llegar a alcanzar hasta un 10% de la comunidad microbiana (Atlas 1995).

En adición a la biodegradación, el petróleo derramado experimenta varios procesos fisicoquímicos (*Fig. 2*), como son la evaporación, la oxidación fotoquímica, la emulsificación y la disolución. Cuando estos procesos se llevan a cabo, se presentan cambios en la composición del petróleo sobre la superficie del mar horas después de un derrame. En principio, se evaporan las fracciones volátiles de bajo peso molecular, inicia la foto-oxidación de algunos hidrocarburos, los constituyentes solubles se disuelven en el agua de mar y los componentes inmiscibles se comienzan a emulsificar; los compuestos del petróleo más volátiles, tóxicos y ligeros se pierden relativamente rápido debido a estos procesos (Kennish 1997).

La importancia de estudiar la biodegradación en los sedimentos marinos se debe a que los hidrocarburos en el medio acuático tienden a asociarse con la materia orgánica en función del tamaño y del contenido de las partículas finas. Las características de la materia orgánica favorecen el transporte de los hidrocarburos hacia el sedimento marino el cual actúa como un depósito a largo plazo de los compuestos hidrofóbicos (Colombo *et al.* 1989).

Varios estudios han incluido análisis de sedimentos después de los derrames de petróleo (Hoffman and Quinn, 1978; 1979); en ecosistemas experimentales controlados (Gearing *et al.*, 1980; Gearing & Gearing 1982, a,b; Wade & Quinn, 1980); se ha estimado la tasa de sedimentación en regiones con actividad petrolera, (Malinky & Shaw, 1979); y estudios fundamentales de absorción (Bassin & Ichiye, 1977; Herbes 1977; Rogers *et al.*, 1980; Karickhoff, 1981). La interacción física (química) de las gotas de petróleo dispersas con el material particulado en suspensión ha sido estudiada

desde los 80's por Mackay & Hossain hasta, Payne *et al.*, (2003), quienes sugieren que la interacción entre la materia suspendida y el petróleo disperso en la columna de agua puede ser importante para el transporte de los hidrocarburos del petróleo derramado a los sedimentos submareales. El material particulado suspendido puede interactuar con las gotas de petróleo dispersadas química o físicamente, para formar aglomerados, también puede interactuar abióticamente con las partículas biológicas, incluyendo aglomerados de fitoplancton o el zooplancton puede ingerir el petróleo, el cual subsecuentemente será depositado como pellets fecales (Johansson *et al.* 1980). Cuando se incrementa el tamaño de la partícula debido a la aglomeración o al empaquetamiento biológico, se favorece la sedimentación y el transporte de los componentes del petróleo al sedimento (Payne *et al.*, 2003).

El proceso de sedimentación puede ocurrir en regiones a lo largo de la línea de costa en playas arenosas donde encontramos altas cargas de material suspendido. En ausencia de la turbulencia suficiente para mantener los aglomerados de petróleo y material particulado en suspensión en la columna de agua, las partículas se hunden y se depositan en los sedimentos superficiales.

El Coeficiente de partición octanol/agua (octanol/water partition coefficient) representa la solubilidad relativa de un compuesto en octanol y en agua. Suele representarse con K_{OW} . Cuanto mayor es el valor de K_{OW} , menos soluble es el compuesto en agua. El logaritmo de K_{OW} suele utilizarse como un indicador de la tendencia relativa de un compuesto orgánico en ser adsorbido por un suelo. Durante la fase de precipitación o hundimiento, los compuestos aromáticos monocíclicos, mas solubles ($\log K_{OW}$ 2.1-3.7) y los compuestos alifáticos más volátiles (C_1 - C_{10}), son fraccionados en la columna de agua, donde subsecuentemente se evaporan y/o biodegradan bajo condiciones aeróbicas; mientras que los compuestos de medio y alto peso molecular (C_{11} - C_{40+}) y sustitutos alquilados 2-5 anillos en HPA's (Hidrocarburos poliaromáticos) ($\log K_{OW} > 4$), permanecen asociados con la precipitación de las partículas (Payne *et al.*, 1984).

Los microorganismos degradadores del petróleo, producen una variedad de surfactantes que son diversos compuestos químicos que pseudo-solubilizan a los

hidrocarburos poco solubles en agua, y facilitan la degradación por los microorganismos, de esta forma el contaminante puede ser removido del ambiente en el que se depósito (Nievasa *et al.*, 2005). El efecto de los surfactantes sobre la biodegradación de hidrocarburos depende de un determinado número de factores incluyendo el tipo de surfactante, la concentración aplicada, el tipo de hidrocarburo y de los microorganismos presentes. Los surfactantes pueden incrementar la solubilización de hidrocarburos que se encuentran adsorbidos sobre las partículas del suelo o sedimento. Sin embargo, los surfactantes también tienen efectos negativos sobre la biodegradación de los hidrocarburos como resultado de su toxicidad para los microorganismos o la toxicidad de los hidrocarburos debido al incremento de su solubilidad (Sartoros *et al.*, 2005).

Debido a la controversia que existe alrededor del uso de los dispersantes se han hecho estudios que han evaluado el efecto que tienen los dispersantes sobre las concentraciones de los hidrocarburos que forman parte del petróleo bajo condiciones experimentales. Lindstrom *et al.*, (2002) examinaron el efecto del dispersante Corexit 9500[®] sobre la biodegradación de ciertos hidrocarburos del petróleo a una temperatura de 8 grados centígrados, donde se utilizó un inóculo de bacterias crecidas en un medio enriquecido con hidrocarburos para que de esta forma la degradación de los compuestos se realizara solo por el grupo bacteriano que fue aislado en el laboratorio. También, Macnaughton *et al.*, (2003) estudiaron el efecto del Corexit 9500[®] sobre la dispersión, biodegradación y colonización microbiana de dos tipos de petróleo crudo, a 8 y 15 grados centígrados. Este estudio se realizó con agua de mar natural bajo condiciones de laboratorio simulando el ambiente marino, durante 35 días y el efecto del dispersante estudiado se evaluó en la columna de agua. Otiloloju (2005) estudió la toxicidad del dispersante al mezclarse con un petróleo ligero, comparándolo con el efecto que tiene el petróleo por si solo sobre juveniles de camarones de la especie *Macrobrachium vollenhovenii*. Se analizaron diferentes concentraciones de petróleo y dispersante, con la finalidad de encontrar mezclas adecuadas que mostraran una toxicidad baja para los organismos.

Venosa *et al.*, (2007) evaluaron bajo condiciones de laboratorio, la biodegradabilidad de petróleo crudo disperso químicamente en agua de mar artificial, a dos diferentes temperaturas, 20°C y 5°C. Se utilizaron dos dispersantes, Corexit 9500® y JD2000®, los cuales se encuentran listados en el Plan de Contingencia Nacional de la EPA. Se aisló un consorcio bacteriano de la Isla Disk, cuya línea de costa fue contaminada por el derrame de petróleo del Exxon Valdez en 1989, los grupos de compuestos que se analizaron fueron los hidrocarburos alifáticos y aromáticos totales durante 50 días, con la finalidad de evaluar el decremento de las concentraciones, durante el tiempo que realizó el experimento

La razón por la cual se sigue estudiando el efecto del dispersante químico sobre el proceso de degradación de los hidrocarburos en el ambiente marino, se debe a que a pesar de los estudios realizados en la década de los 80's, 90's y aún en época reciente, no ha sido posible llegar a conclusiones concretas que permitan observar los efectos del dispersante en el proceso de biodegradación. Esto puede deberse a que los experimentos que se ha ejecutado solo se enfocan en estudiar la degradación de los compuestos del petróleo en la columna de agua como principal objetivo (Mulkins-Phillips & Stewart, 1974; Lindstrom *et al.*, 2002; Macnaughton *et al.*, 2003; Otiloloju, 2005; Venosa *et al.*, 2007), olvidando que el sedimento finalmente será el depósito de los compuestos que ingresen al medio y donde la mayor remoción de los mismos se efectúa, principalmente por el proceso de biodegradación.

Existen evidencias que sugiere que la dispersión, ya sea química o mecánica del petróleo en el agua acorta el tiempo requerido para la degradación microbiana de los hidrocarburos, aunque esto depende principalmente de la capacidad de los organismos para utilizar a estos compuestos como fuente de carbono y energía. Hua (2006) apoyándose en trabajos como el publicado por Wolfe *et al.*, (1994), quienes mencionan que alrededor del 50 por ciento de la degradación del petróleo derramado por el Exxon Valdez en 1989, se presentó durante 3 años, no solo en la columna de agua sino también en el sedimento; plantearon su experimento, el cual consistía en estudiar la biodegradación en el sedimento, con el objetivo de entender el efecto que las estrategias de aplicación de dispersante tienen sobre los microorganismos que habitan en el

sedimento y son capaces de aprovechar los hidrocarburos como fuentes de energía y carbono y consideraron dos escenarios:

1. Una pre-aplicación de dispersantes al petróleo antes de su ingreso al mar.
2. El segundo consideró aplicar dispersante una vez que el contaminante está sobre la superficie del agua, lo que se ha planteado como respuesta en los planes de contingencia.

Actualmente, a nuestro conocimiento, en la costa noroccidental de Baja California no existen estudios que analicen la degradación de los hidrocarburos dispersos químicamente y que posteriormente se depositan en el sedimento. Por tal motivo en este estudio se evalúa de manera experimental el efecto de los dispersantes sobre el proceso de degradación natural de los hidrocarburos pertenecientes a la fracción alifática y aromática en un ambiente marino de Baja California. Lo anterior permitirá comprender y diferenciar la manera en la que los hidrocarburos permanecen en la columna de agua una vez dispersos y cuando estos se depositan en el sedimento.

3.0. Objetivos.

3.1 Objetivo general.

Estimar de manera experimental el efecto del dispersante químico Corexit 9500[®] sobre el proceso de degradación natural de los hidrocarburos pertenecientes a la fracción alifática y aromática, en un sustrato contaminado con un combustible utilizado en la subestación de descarga de PEMEX, en Rosarito, Baja California.

3.2 Objetivos particulares.

- Cuantificar las concentraciones de hidrocarburos aromáticos y alifáticos en el sedimento contaminado y en la columna de agua de las unidades experimentales, así como sus variaciones a lo largo del tiempo.
- Comparar la degradación, de los compuestos alifáticos y aromáticos presentes en el sedimento contaminado, con y sin la presencia de dispersante químico
- Comprobar si ocurre una mayor disolución de los compuestos hidrocarburos en el tratamiento que contiene dispersante contra el tratamiento que no lo contiene.

4.0. Hipótesis

La aplicación de dispersante Corexit 9500[®] en los derrames de combustibles, favorecerá la degradación de los hidrocarburos alifáticos y aromáticos, una vez que estos se depositan en el sedimento. Lo anterior, debido a que el surfactante que contiene el dispersante aumenta su biodisponibilidad y favorecen la atenuación natural que los microorganismos ofrecen para la remoción de los compuestos antes mencionados.

5.0. Materiales y Métodos

5.1 Obtención de muestras de sedimento.

Se seleccionaron dos lugares para la obtención del sedimento que se utilizó en este experimento: 1) Zona de descarga de combustibles, correspondiente a la subdirección de almacenamiento y distribución Pemex, ubicada en el municipio de Rosarito, BC., México. Esta localidad fue seleccionada debido a que los ductos de transporte de combustibles están en contacto con el fondo marino, por lo tanto puede estar influenciado por la presencia de los hidrocarburos del petróleo. Este sedimento se obtuvo por buceo autónomo; la muestra se colectó en la superficie del sedimento y se depositó en un recipiente metálico de ~10 Lts que se tapó en el fondo para evitar perder el sedimento.

El segundo punto de muestreo fue en la boca de la Bahía de Todos Santos (BTS), ubicada en el municipio de Ensenada, B.C. Este lugar fue seleccionado debido a que estudios previos hacen referencia de la presencia de concentraciones relativamente altas de hidrocarburos (Macias-Zamora *et. al.* 2002), esta muestra de sedimento se colectó con una draga tipo Van Veen y con cuidado se tomó el sedimento de la superficie. Ambas muestras se mantuvieron en refrigeración, a una temperatura de 4 grados centígrados hasta el momento de su análisis.

Debido a que los combustibles que arriban a la costa noroccidental de Baja California no contienen una variedad extensa de hidrocarburos (comunicación personal en PEMEX, Rosarito BC) se optó por utilizar un combustible conocido como IFO-15. El combustible usado en este experimento fue proporcionado por la subdirección de almacenamiento y distribución de PEMEX. El IFO-15 es una combinación de combustóleo (85%) y diesel (15%); es utilizado por los barcos y en las boyas de descarga, se utiliza como "tapón", debido a que es el primer material drenado a través de las boyas, posteriormente se descargan los combustibles contenidos en las embarcaciones. Éste nos da un espectro más amplio de los compuestos que conforman a los grupos aromáticos y alifáticos, con los cuales se enriquecieron los sedimentos que formaron parte del microcosmos. Los crudos que se extraen en nuestro país no fueron considerados para este estudio debido a que no arriban a las costas de Baja California,

en dado caso se puede hacer la recomendación que en las costas mexicanas donde se transporten, almacenen o descarguen, se cuente con estudios de este tipo, si es que se considera como respuesta la aplicación de algún dispersante, en caso de presentarse fuga o derrame de hidrocarburos en las zonas costeras o cuerpos de agua.

Finalmente, el dispersante Corexit 9500 fue proporcionado por personal de Pemex y la Secretaría de Marina ubicada en Ensenada, BC. Este dispersante fue considerado en el experimento ya que dentro del plan de contingencia MEX-US-PAC (Plan de contingencia binacional entre México y Estados Unidos de America, del lado del Pacífico), es utilizado como respuesta de control en caso de derrames de hidrocarburos. Las características de este producto son similares a las del dispersante Corexit 9527[®], el cual tiene constituyentes aniónicos y noiónicos; el solvente oleofílico que caracteriza a Corexit 9500[®] es identificado como "glicol éter, sal ácida carboxílica" (Lindstrom *et. al.* 2002).

5.2 Análisis de muestras.

5.2.1. Limpieza de material.

El material de laboratorio que se utilizó en el proceso de extracción y concentración de las muestras fue lavado con jabón Micro[®] diluido a un 2%. El material se enjuagó con agua corriente y posteriormente con agua destilada. Para eliminar material orgánico, el material se calcinó en una mufla por 4 horas a una temperatura de 400°C. El material volumétrico, , se descontaminó con metanol y diclorometano.

5.2.2. Porcentaje de humedad.

El porcentaje de humedad del sedimento de ambas zonas se calculó por diferencia de pesos. De manera independiente, se pesó una alícuota de sedimento y se colocó en una navecilla de aluminio, tarada. La muestra se secó a una temperatura de 50°C en una estufa durante 96 horas, posteriormente se colocó en un desecador a temperatura ambiente y finalmente se pesó. Esta operación se repitió hasta que se alcanzó el peso constante.

El porcentaje de humedad se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\%Humedad = \frac{W_{hum} - W_{sec}}{W_{hum}} * 100$$

$$\%S_{sec} = 100 - \%Humedad$$

Donde:

W_{hum} = Peso del sedimento húmedo.

W_{sec} = Peso del sedimento seco

S_{sec} = Sedimento seco

5.2.3. Tamaño de grano.

Para determinar la distribución de tamaño del sedimento, se utilizó un analizador de partículas marca Horiba (Horiba Instruments, Irvine, CA, USA).

5.2.4. Materia orgánica.

El análisis de carbono orgánico total (COT) se realizó en un analizador elemental marca Carlo Erba, modelo 1106 (Carlo Erba, Milan, Italia), conectado a un integrador marca Spectra Physics Minigrator, utilizando como estándar de referencia el sedimento MAG, (valor de referencia de COT es de 2.15 ± 0.02 %).

5.3. Extracción y análisis de hidrocarburos.

Para la extracción de hidrocarburos del sedimento se utilizó un sistema soxhlet, utilizando aproximadamente 15 gr. de sedimento seco colocado en un dedal de extracción. Se adicionó cobre activado con HCl en el matraz colector con el objetivo de eliminar el azufre elemental. Las muestras se extrajeron por 12 horas con 150 mL de diclorometano (DCM) a una temperatura de 50°C. Al finalizar el tiempo de extracción se colocó una columna Snyder sobre los matraces y se introdujeron en un baño maría a una temperatura de 55°C con el objetivo de intercambiar el solvente de extracción por hexano. Posteriormente, las muestras se traspasaron a tubos de concentración, se enjuagó varias veces el matraz colector con hexano y se traspasó al tubo con ayuda de pipetas Pasteur. Finalmente los extractos se concentraron a 1 mL con un flujo constante y suave de nitrógeno, grado alta pureza. Los extractos fueron fraccionados y

purificados por medio de cromatografía de columna empacada con sílica gel y alúmina. (Ver Apéndice 1, con la metodología detallada). De la cromatografía de columna se obtuvieron dos fracciones:

- Hidrocarburos Alifáticos (F1), eluída con 15 ml. hexano.
- Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (F2), eluída con 40 ml. De una mezcla de dicloro metano y hexano (DCM:Hexano), 30:70, v/v.

Las fracciones obtenidas fueron concentradas en dos etapas primero con un rotaevaporador hasta 1 mL, posteriormente se traspasaron a tubos de concentración. Cada fracción se concentro con un flujo suave de nitrógeno gaseoso, se resuspendió al volumen al cual se inyectaría la muestra al cromatógrafo, para este caso el volumen fue de 1.0 mL, finalmente se transfirió a viales de vidrio color ámbar con tapones de teflón, para evitar que el solvente se evapore.

5.4. Diseño experimental

El diseño de este experimento consistió de nueve contenedores, todos bajo las mismas condiciones de temperatura, aireación, y concentración de hidrocarburo. El experimento constó de dos tratamientos y un control (C), cada uno con tres réplicas (Tabla 1).

Tabla 1. Diseño experimental planteado para este estudio.

| Tratamiento 1 (CIFO) | Tratamiento 2 (DIFO) | Control (C) | Réplicas por tratamiento. |
|--|--|----------------|------------------------------|
| Sedimento contaminado con IFO- 15. | Sedimento contaminado con IFO-15 y dispersante | Sedimento. | 3 |

El total de unidades experimentales se aleatorizaron, con el objetivo de disminuir el error experimental. (Ver Apéndice 1).

5.4.1. Preparación de unidades experimentales.

El primer paso consistió en eliminar la humedad del sedimento que evitaba que el combustible se adhiriera a la superficie de las partículas, se colocó en bandejas y se introdujo a la estufa a una temperatura de 30°C, temperatura que no altera las

propiedades del sedimento. Una vez obtenido el sedimento seco, se pesó y se distribuyó el peso entre las nueve cajas que formarían las unidades experimentales.

Martínez y López (2001), establecen que las concentraciones bajas de combustóleo y diesel tienden a aglutinarse una vez que tienen contacto con el sedimento formando grumos difíciles de deshacer. En este trabajo se propone utilizar una concentración relativamente alta de hidrocarburo ya que de esta manera se produce un fenómeno llamado "humectancia", lo que facilita la manipulación del sedimento contaminado. Por lo tanto Martínez, *et al.*, (2001) sugieren que se prepare un stock a una concentración alta, y en base a esta tomar alícuotas para preparar concentraciones más bajas.

Para asegurar que las partículas se contaminaran de manera uniforme y evitar que el sedimento de la superficie tuviera la mayor concentración de hidrocarburos, se preparó una solución de 15 gr de IFO-15, disolviéndolo en 5 ml de DCM y después se llevó a un volumen de 500 ml con pentano. Posteriormente, se vertió a cada uno de los contenedores que contenían al sedimento seco, cuyo peso fue de 415 gr. Para homogenizar y ayudar a que el solvente se evaporara, se colocaron en una mesa de agitación hasta que el proceso de homogenización se completó. Una vez que el solvente se volatilizó se añadió a cada uno de los contenedores 585 gr de sedimento húmedo, con la finalidad de completar 1000 gr en cada unidad experimental. Esto se realizó con la finalidad de reestablecer los organismos asociados al sustrato, que pudieran ser capaces de degradar a los hidrocarburos del petróleo de manera natural.

El tratamiento 2, fue sometido al mismo procedimiento, con la diferencia que se adicionó dispersante Corexit 9500[®] siguiendo el procedimiento descrito por Macnaughton *et al.*, (2003). Estos autores proponen que el porcentaje de dispersante debe ser el 10% en razón peso del hidrocarburo contaminante. Al sedimento que formó parte del control, también se le adiciono pentano, se volatilizo, se homogenizó y se adicionó sedimento húmedo, pero sin adicionar dispersante. Las unidades experimentales se dejaron en reposo por 36 horas, finalmente se adicionaron 5 lts de agua de mar filtrada en cada unidad experimental y se colocaron según la aleatorización en el estante. Por último se introdujo el sistema de aireación, con el objetivo de evitar

anoxia en el sistema. La temperatura de $16.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ fue constante durante los 4 meses y medio que duro este experimento.

5.4.2. Seguimiento de los hidrocarburos.

Este experimento fue montado el día 21 de junio del 2007 y a partir de entonces cada 15 días se tomaron muestras de sedimento y de agua con el objetivo de evaluar de que manera los hidrocarburos cambiaban con respecto al tiempo. El procedimiento de extracción para las muestras de sedimento fue detallado anteriormente, para el caso de los tratamientos contaminados con IFO-15 y COREXIT 9500© el peso aproximado del sedimento a extraer fue de 1.0 gr. Para extraer los hidrocarburos de las muestras de agua, se tomaron alícuotas de 50 ml de agua, se vertieron en embudos de separación y se les adicionó 25 mL de DCM; se agitaron vigorosamente durante 3 min., de manera constante y bajo la campana de extracción procurando liberar los gases que forma el solvente para controlar la presión. Posteriormente cada embudo se colocó en un soporte por 5 min o hasta que se formaron dos fases. El solvente se recolecto en un matraz, y este procedimiento se repitió dos veces más para cada muestra. Tanto para la extracción de hidrocarburos en el sedimento y agua se utilizó un control fortificado con los estándares de los hidrocarburos aromáticos y alifáticos, y un blanco de procedimiento.

5.4.3. Identificación y cuantificación de hidrocarburos

Para la fracción alifática y aromática se generó una curva de calibración con los estándares comerciales con el objetivo de obtener los tiempos de retención y compararlos con los de las muestras de sedimento y agua. Los compuestos contenidos en los estándares comerciales tanto de la fracción alifática y aromática se muestran en las tablas 2 y 3.

Para el caso de los aromáticos la curva planteada tiene como concentración mas baja $0.625 \mu\text{g/ml}$ y la concentración más alta de $20 \mu\text{g/ml}$, esta fue construida con 6 concentraciones. Del mismo modo, se generó una curva de calibración para los hidrocarburos alifáticos de siete puntos con concentraciones entre 2.5 a $100 \mu\text{g/mL}$.

La fracción alifática y aromática se analizó en un cromatógrafo de gases (CG) Hewlett Packard 6890 plus acoplado a un detector de llama (FID) equipado con un inyector Split/Splitless, usado en el modo Splitless. La temperatura del inyector durante el tiempo de la corrida permaneció en 280°C y la del detector en 300°C. El programa de temperaturas para el horno del CG fue de 70°C (5 min.) a 300°C (28 min.), con un incremento en la temperatura de 5°C por minuto, con un tiempo de corrida de 77 min. El gas transportador fue helio con una presión constante de 8.83 Psi. El CG está equipado con una columna capilar HP-5 (5% metil-fenil polisiloxano) de 30 m. de longitud, con un diámetro interno de 250 µm y 0.25 µm de fase estacionaria.

Tabla 2. Estándar comercial de hidrocarburos alifáticos, SFL-601 y UST-310 (Isoprenoides, C₁₇ y C₁₈), ambos del laboratorio Ultra Scientific.

| Compuesto | # Carbonos | *T.R (min.) |
|------------------|------------|-------------|
| Octano | 8 | 4.267 |
| Decano | 10 | 7.731 |
| Dodecano | 12 | 11.913 |
| Tetradecano | 14 | 15.713 |
| Hexadecano | 16 | 19.088 |
| Heptadecano | 17 | 20.645 |
| Pristano | ---- | 20.743 |
| Octadecano | 18 | 22.124 |
| Fitano | ---- | 22.269 |
| Eicosano | 20 | 24.883 |
| Docosano | 22 | 27.413 |
| Tetracosano | 24 | 29.741 |
| Hexacosano | 26 | 31.901 |
| Octacosano | 28 | 33.913 |
| Tricontano | 30 | 35.793 |
| Dotriacontano | 32 | 37.832 |
| Tetratriacontano | 34 | 40.536 |
| Hexatriacontano | 36 | 44.304 |
| Octatriacontano | 38 | 49.742 |
| Tetracontano | 40 | 57.67 |

Tabla 3. Lista de los 16 compuestos aromáticos del estándar comercial de la mezcla de 16 hidrocarburos aromáticos del laboratorio Ultra Scientific. Se muestra el ión monitoreado para su cuantificación y el tiempo de retención (min) en el GC-FID, bajo las condiciones establecidas.

| Ion | Compuesto | *T.R (min.) |
|-----|-------------------------|-------------|
| 128 | Naftaleno | 12.604 |
| 152 | Acenaftaleno | 18.392 |
| 154 | Acenaftileno | 19.089 |
| 166 | Fluoreno | 20.962 |
| 178 | Fenantreno | 24.488 |
| 178 | Antraceno | 24.654 |
| 202 | Fluoranteno | 28.935 |
| 202 | Pireno | 29.742 |
| 228 | Benzo(a)antraceno | 34.249 |
| 228 | Criseno | 34.395 |
| 252 | Benzo(b)fluoranteno | 38.288 |
| 252 | Benzo(k)fluoranteno | 38.387 |
| 252 | Benzo(a)pireno | 39.63 |
| 276 | Indeno(1,2,3,c,d)pireno | 45.411 |
| 276 | Benzo(g,h,i)perileno | 45.579 |
| 278 | Dibenzo(a,h)antraceno | 47.011 |

*T.R se refiere al tiempo de retención para cada uno de los compuestos.

El control fortificado con los estándares de los hidrocarburos aromáticos y alifáticos fue utilizado para calcular el porcentaje de recuperación de las extracciones de las muestras de agua y sedimento, estos resultados fueron utilizados para ajustar los datos de concentración obtenidos para cada una de las muestras para que de esta manera los resultados fueran comparables. En el caso de los hidrocarburos alifáticos la concentración que se adicionó a la muestra fue de 10 µg/ml y se sometió al mismo procedimiento que las muestras. Para realizar la comparación de las concentraciones, se inyectó el estándar al inicio de cada corrida con el valor que se le adicionó al Spike.

En el caso de los hidrocarburos aromáticos se utilizó la siguiente relación para poder calcular el porcentaje de recuperación:

$$PR = \frac{(A_{SURR} * C_{IS})}{(C_{SURR} * A_{IS} * FR_{SIS})} * 100$$

Donde:

PR = Porcentaje de recuperación

A_{SURR} = Área de subrogado

C_{IS} = Concentración del estándar interno.

A_{IS} = Área de estándar interno

FR_{SIS} = Factor de respuesta

$$FR_{SIS} = \frac{A_{SURR} * C_{IS}}{A_{IS} * C_{SURR}}$$

6.0 Resultados y discusión

6.1 Características y nivel de contaminación del sedimento

Los datos de humedad, materia orgánica y tamaño de grano de las muestras de Bahía Todos Santos y Pemex, se muestran en la tabla 4. Los valores de materia orgánica obtenidos para ambas muestras son similares a los reportados por Altamirano-García 2004, que son de 1.0 a 6.5 por ciento.

Tabla 4. Características físicas y porcentaje de materia orgánica obtenidas de las muestras de sedimento.

| | Bahía Todos Santos | Pemex |
|--|--------------------|------------------|
| Humedad (%) | 36.47 ±0.24 % | 7.54 ±0.41 %; |
| Carbón orgánico total (COT %) | 2.0 | 1.38 |
| Fracción de partículas finas (<63µm %) | 95.7 | 5.2 |

Los porcentajes de recuperación obtenidos para las fracciones aromáticas y alifáticas se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Porcentajes de recuperación de los hidrocarburos.

| % de recuperación | Junio | Julio | Agosto | Septiembre | Octubre |
|--------------------------|-------|-------|--------|------------|---------|
| Hidrocarburos Alifáticos | 52.1 | 83.6 | 90.46 | 58.53 | 98.83 |
| Hidrocarburos Aromáticos | 47.2 | 51.7 | 60.1 | 58 | 62 |

En la muestra de sedimento de la bahía, se presentan las características más idóneas para que las partículas interactúen con los hidrocarburos del petróleo, ya que el área superficial de la fracción fina, es mayor. Se ha establecido que los hidrocarburos

alifáticos de alto peso molecular y los compuestos aromáticos con más de dos anillos de benceno, tienden a asociarse a las partículas finas existentes en el sedimento, cuando este proceso se presenta, el crecimiento de las bacterias que se encuentran en las partículas suspendidas disminuyen de manera considerable las concentraciones de los hidrocarburos aromáticos (Xia et al 2006).

La muestra de sedimento de Pemex, a pesar de no tener características similares a las de la bahía, se considera de importancia por lo que la zona representa para el estudio. Esto es debido a las maniobras de descarga de los diversos combustibles que los barcos transportan, y por el contacto de las mangueras que tiene en el fondo del mar, las cuales podrían estar aportando pequeñas cantidades de hidrocarburos al sustrato.

La degradación de los componentes del petróleo se presenta por la interacción entre los procesos físicos, químicos y biológicos; a esto se le conoce como atenuación natural. La biodegradación, es el proceso de mayor relevancia ya que en el ambiente marino habitan microorganismos capaces de degradar los compuestos orgánicos; en aguas donde se presenta una contaminación severa o crónica los organismos degradadores suelen ser fundamentales en el proceso de remoción (Altamirano-García 2004). Wolfe *et al.*, (1994), estimaron que el 50% del petróleo derramado puede ser biodegradado tanto en la columna de agua como en los sedimentos, en comparación con las zonas que fueron sometidas a tratamientos de limpieza artificial.

Se considera que un sustrato marino se encuentra severamente contaminado por hidrocarburos, si la fracción alifática sobrepasa los 70 $\mu\text{g}/\text{gr}$ (Zavala et al., 1996), mientras que una contaminación moderada no debe tener concentraciones que superen el valor de 8.33 $\mu\text{g}/\text{gr}$ y un ambiente libre de contaminación de hidrocarburos tendrá concentraciones cercanas a los 0.04 $\mu\text{g}/\text{gr}$ (Madeiros *et al.*, 2004).

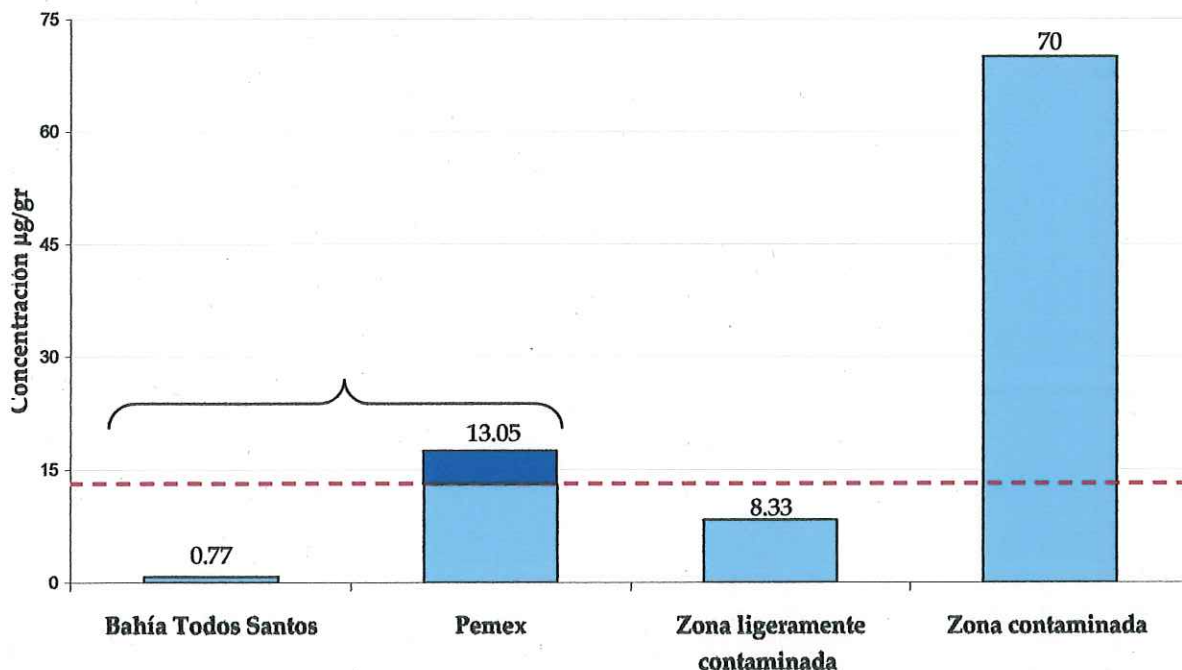


Figura 3. Concentración de los hidrocarburos alifáticos en las muestras de sedimento utilizadas para el experimento, comparada con los datos de otros estudios.

En la figura 3, se muestran las concentraciones de los hidrocarburos alifáticos (HA's) cuantificadas para las muestras de sedimento, las cuales se propusieron utilizar en el experimento como sustrato. Se incluyen datos de otros estudios como referencia para comparar el nivel de contaminación de la Bahía Todos Santos, Baja California y de la terminal de Pemex en Rosarito, Baja California. De acuerdo con lo que publica Atlas (1995), las comunidades degradadoras se encuentran de manera natural en los ambientes marinos y estas se incrementan de un 10 a 12 por ciento si existen eventos que aumenten la concentración de sus fuentes de carbono. La degradación que se evalúa en este estudio es la que se realiza de forma natural, y por esta razón se buscó sedimento en el que se observara la presencia de hidrocarburos en el ambiente para que las posibles comunidades bacterianas pudieran degradar los compuestos durante el tiempo que el experimento funcionara.

El valor del total de las concentraciones de los hidrocarburos en la muestra de Pemex es de 13.04 µg/gr, y de acuerdo a la clasificación propuesta por Madeiros *et al.*, (2004), este sedimento presenta una contaminación de leve a moderada. En el caso del sedimento de la Bahía Todos Santos, la concentración total de los compuestos

identificados es de 0.77 ug/gr, por lo tanto el sedimento extraído de la Bahía representa un ambiente no contaminado.

Si se realiza una comparación por analito entre las dos muestras, (Fig. 4), el hidrocarburo con la mayor concentración es el alcano C29, en la muestra de Pemex, con un valor de 1.12 ug/gr, y representa un 8.6% del total de los compuestos alifáticos. Para el caso de la Bahía Todos Santos, la concentración más alta, sin tomar en cuenta los isoprenoides, es el alcano C20, con una concentración de 0.07 ug/gr, representando un 11.5% del total de los hidrocarburos de la fracción cuantificada.

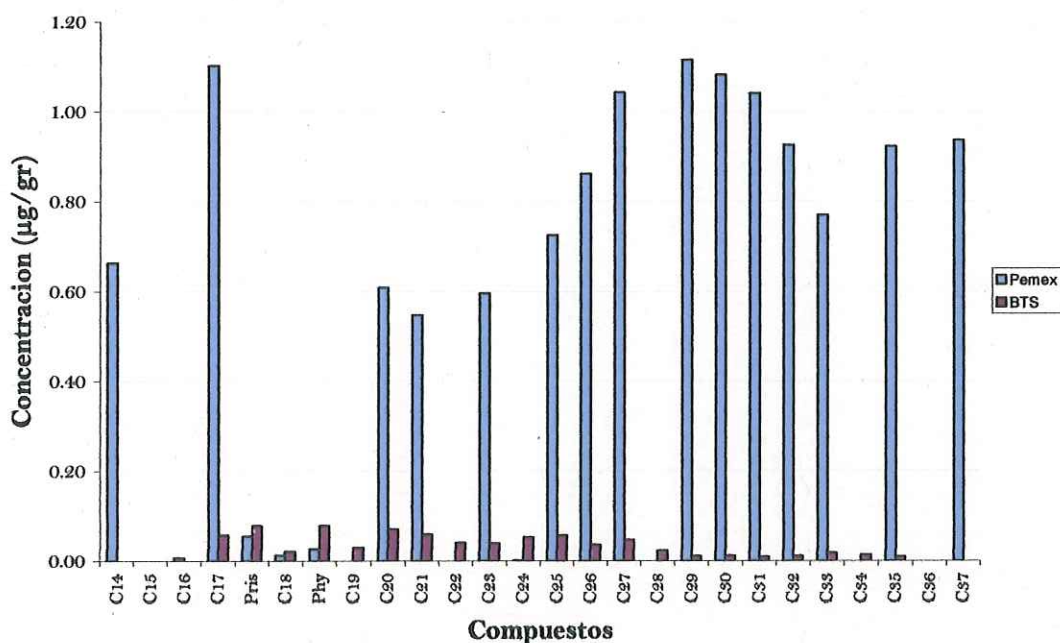


Figura 4. Identificación de los hidrocarburos alifáticos de las muestras de sedimento recolectadas en la zona de descarga de combustibles de Pemex; Rosarito, BC y en la Boca de la Bahía Todos Santos, Ensenada BC.

Respecto a los hidrocarburos aromáticos totales (ΣPAH), Macías-Zamora *et al.*, (2002), reportó concentraciones de ΣPAH en la Bahía Todos Santos (BTS), de 7.6 hasta 813 ng/gr peso seco y de acuerdo a estos autores la Bahía es un ambiente relativamente limpio de ΣPAH comparándola con estudios de puertos, marinas y bahías alrededor del mundo (ver Tabla 6).

Tabla 6. Valores comparativos para las concentraciones totales de hidrocarburos aromáticos polí-cíclicos de estudios en diferentes partes del mundo, Macías- Zamora *et al.*, (2002).

| <i>Localidad</i> | <i>Número de PAH analizados</i> | <i>Concentración promedio. (ng/gr peso seco)</i> |
|--------------------|-------------------------------------|--|
| Estuario Girona | | 871 |
| Marina Kiel | | 2500 |
| Marina Victoria | No especificado | 8862 |
| Mar Adriático | 12 | 200 |
| Mar Báltico | 16 | 1200 |
| Bahía Chesapeake | 15 | 52 |
| Bahía Todos Santos | 16 | 96 |

Sin embargo, se ha propuesto que sedimentos marinos cuyas concentraciones de ΣPAH sean mayores a 2000 ng/gr, se consideran como zonas contaminadas (Zavala *et al.*, 1996) y menores de 200 ng/gr, son lugares limpios (Madeiros *et al.*, 2004).

En la Fig 5 se puede observar que la concentración del total de los hidrocarburos aromáticos de Pemex (2163.32 ng/gr), al igual que con el total de los compuestos alifáticos, representa un ambiente contaminado, debido a que sobrepasa los valores establecidos en el trabajo de Zavala *et al.*, (1996). Por otro lado, la muestra de la bahía presenta una contaminación ligera (Madeiros *et al.*, 2004), aunque Macías-Zamora *et al.* (2002), quienes midieron concentraciones de hasta 813 ng/gr, consideran que zonas con estos valores representan ambientes relativamente limpios.

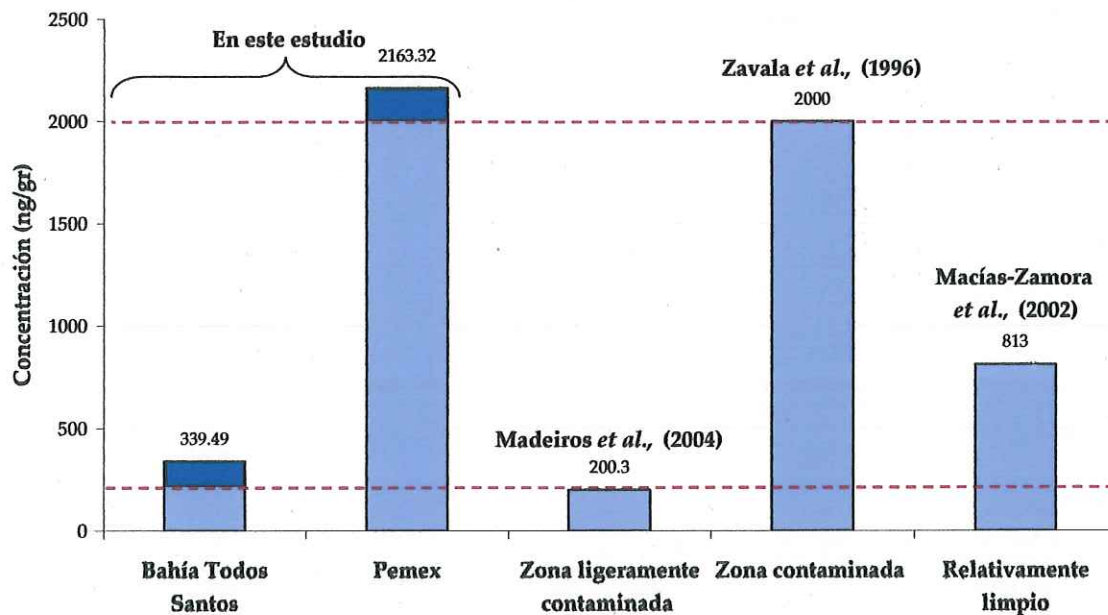


Figura 5. Concentración de los hidrocarburos aromáticos en las muestras de sedimento utilizadas para el experimento y datos bibliográficos.

Al realizar un análisis comparativo por compuestos individuales (Fig. 6), se observa que el compuesto con la mayor concentración es benzo(B)fluoranteno, en la muestra de Pemex (620 ng/gr) y este representa un 28.7% del total de los compuestos aromáticos. Para el caso de la Bahía Todos Santos, el criseno es el compuesto con mayor concentración (198 ng/gr) y representa un 58.4% del total de los hidrocarburos de la fracción cuantificada.

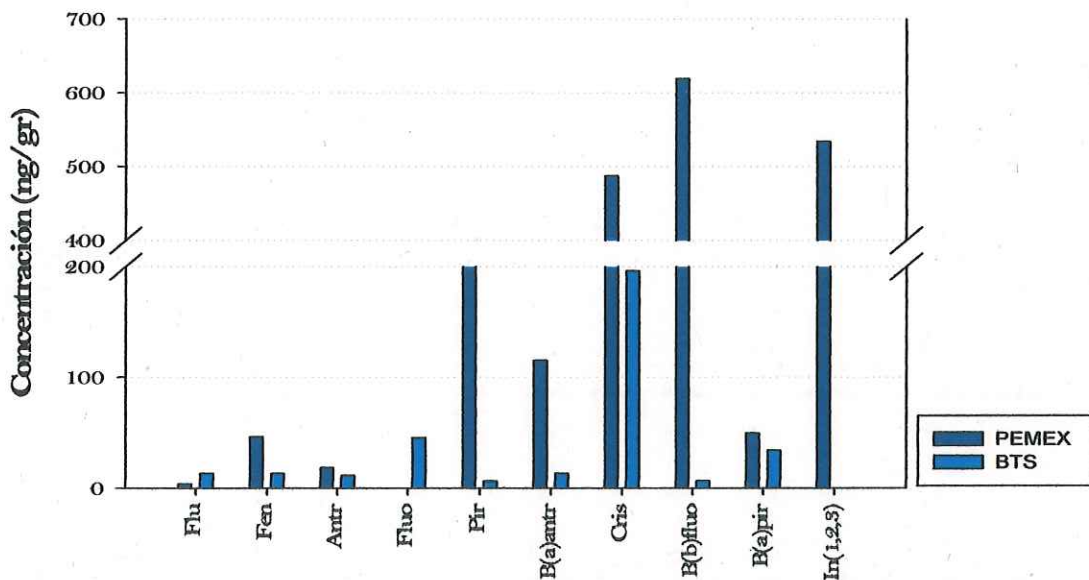


Figura 6. Compuestos de la fracción aromática identificados en las muestras de sedimento recolectadas en la zona de descarga de combustibles de PEMEX, Rosarito B.C y en la Boca de la Bahía Todos Santos, Ensenada B.C. Los compuestos de izquierda a derecha identificados son Flu (Fluoreno), Fen (Fenantreno), Antr (Antraceno), Fluo (Fluoranteno), Pir (Pireno), B(a)antr (Benzo(a)antraceno), Cris (Criseno), B(b)fluo (Benzo(b)fluoranteno), B(a)pir (Benzo(a)pireno) y In(1,2,3) (Indeno(1,2,3)c,d pireno).

6.2 Caracterización del combustible.

El combustible usado en el experimento se caracterizó en su contenido de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, con la finalidad de utilizarlo para enriquecer al sedimento y de esta manera poder seguir la degradación de los compuestos identificados. El combustible que se analizó es conocido como IFO-15, el cual consta de un 85% de combustóleo y 15% de diesel. En la figura 7, se muestra uno de los cromatogramas obtenidos del análisis del combustible, donde se muestra la presencia de la mayoría de los hidrocarburos alifáticos que están contenidos en IFO-15.

Los resultados del análisis fueron considerados posteriormente como una guía para comparar los tiempos de retención con el de los compuestos localizados en cada una de las muestras y observar como es que estos cambiaban durante el tiempo en el que se ejecutó el experimento.

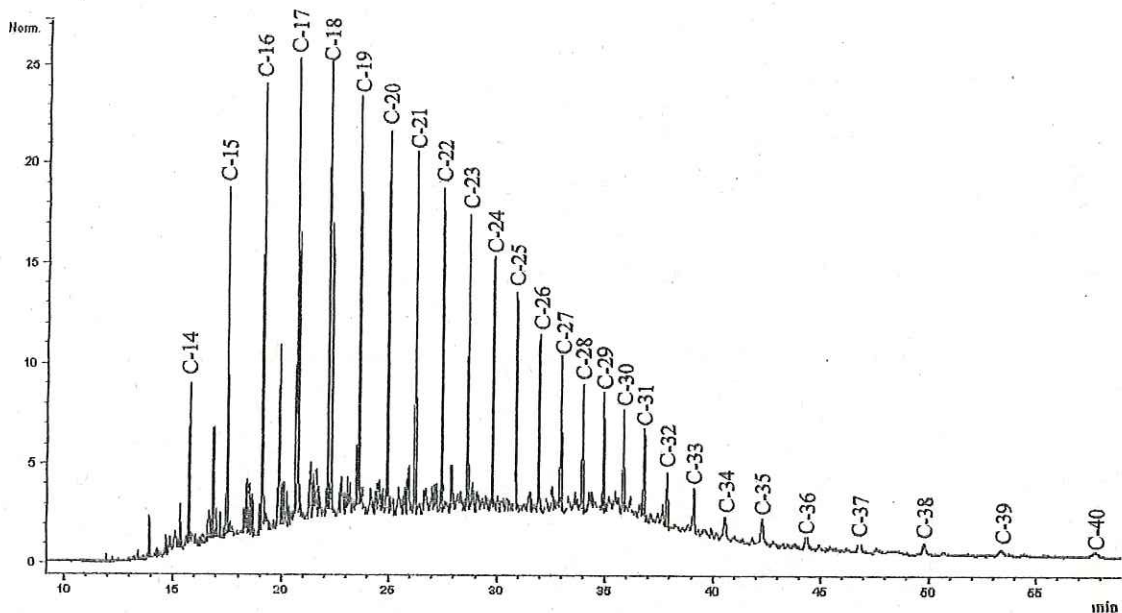


Figura 7. Compuestos Alifáticos identificados en la mezcla de combustóleo y diesel, conocida como IFO-15.

6.3. Degradación de los hidrocarburos en las unidades experimentales.

6.3.1. Hidrocarburos en muestras de agua.

Debido a que no se tiene claro si los hidrocarburos que se depositaron en el sedimento, después de asociarse al material particulado, se resuspenden en el agua por la presencia de los fenómenos físicos y biológicos, en este estudio se planteó el análisis de dicho proceso. Se decidió identificar y cuantificar los hidrocarburos de ambas fracciones, tomando muestras de agua al mismo tiempo que se realizaron los muestreos de sedimento para posteriormente compararlo entre tratamientos.

Los compuestos que se identificaron en cada una de las muestras durante los 120 días que las unidades experimentales estuvieron en operación nos revelaron que fueron 5: C-16, C-17, C-18, Pristano y Fitano. En la figura 8 se puede observar la sumatoria de las concentraciones de los compuestos mencionados anteriormente, que reflejan el comportamiento de estos hidrocarburos en las unidades experimentales, al analizarla se puede observar que los compuestos identificados fueron más abundantes en el tratamiento que tenía una mezcla de dispersante y combustible.

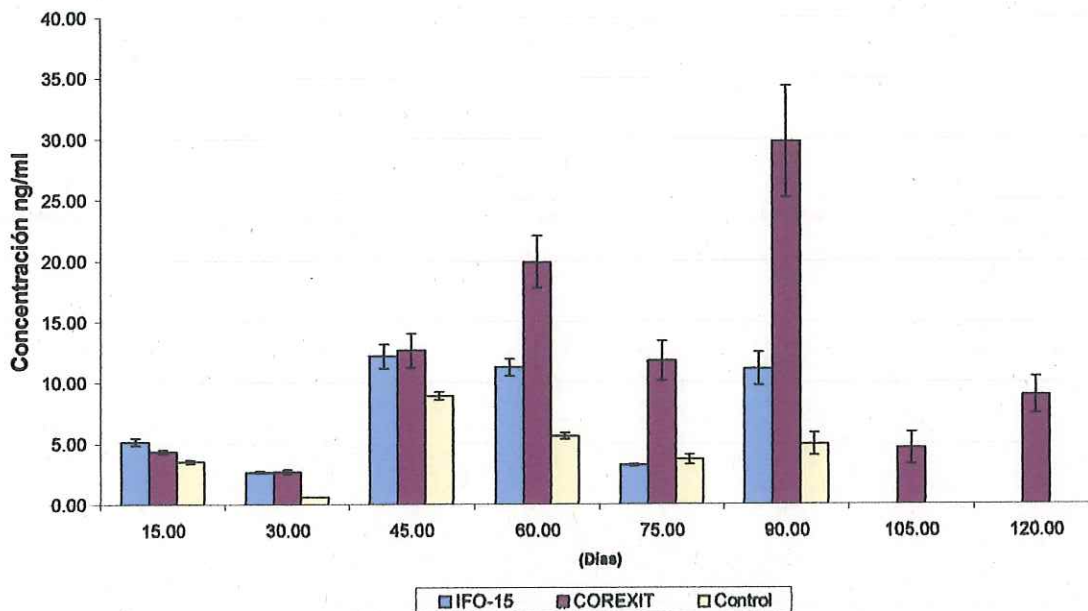


Figura 8. Hidrocarburos alifáticos totales en las muestras de agua.

En la figura 8 se puede observar que la sumatoria de las concentraciones, para el tratamiento que contiene dispersante, aumenta, a excepción de tres muestreos que se realizaron a los 75, 105 y 120 días. Sin embargo, en el último muestreo se observa que a los 120 días la concentración tiende a aumentar con respecto al punto anterior. Para el tratamiento que contiene solamente combustible, la tendencia es diferente, ya que se puede observar cierto incremento en los valores de las concentraciones entre los 45 y 90 días; en el control, la tendencia es muy similar a la que tiene el tratamiento con IFO-15.

Estos resultados nos sugieren que el control presentó variaciones en las concentraciones de los hidrocarburos alifáticos y esto pudo deberse a: 1) Fluctuación normal producida por la medición que depende de la falta de homogeneidad del sitio de donde se extrajeron las muestras; 2) Debido a la evaporación que se presentó en las unidades experimentales de los niveles superiores y que finalmente se depositara en las cajas inferiores; 3) Durante el proceso analítico de las muestras, éstas pudieron haber adquirido diferentes grados de contaminación; 4) A pesar de controlar los factores de

temperatura, concentración de combustible y aireación en las unidades experimentales, la concentración de los compuestos detectados varió de manera significativa durante este proceso.

Debido a que los contenedores se encontraban en diferentes niveles, los controles pudieron ser interferidos por la deposición de las micropartículas de agua que se generaban con los aireadores y de esta forma, al realizar el proceso analítico pudieron ser detectadas esas pequeñas aportaciones, ya que todo el material que se ocupaba para extraer las muestras se sometía a un proceso de limpieza muy estricto, para evitar contaminación.

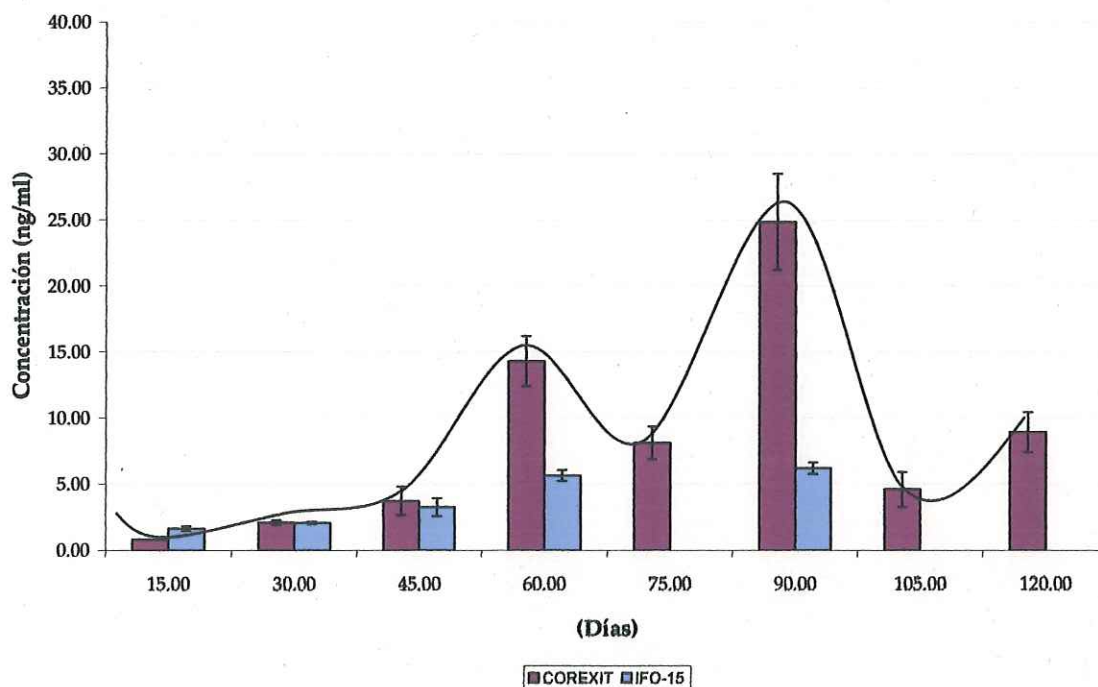


Figura 9. Hidrocarburos alifáticos totales en las muestras de agua sustrayendo el valor del control a cada tratamiento.

La máxima dilución de los compuestos se alcanza en ambos casos a los 90 días. Al restar la concentración del control a los tratamientos que contienen dispersante y combustible se puede observar que los valores más altos de disolución fueron: para el tratamiento que contiene IFO-15, $6.2 (\pm 0.44)$ ng/ml, y para el dispersante, $24.9 (\pm 3.64)$ ng/ml.

En la Figura 9, se puede observar que la sumatoria de los hidrocarburos alifáticos del tratamiento que solo contiene combustible, muestra un incremento en su concentración conforme pasa el tiempo. No se puede decir con exactitud si esa tendencia se conservó, ya que en los últimos dos puntos los valores obtenidos estuvieron por debajo de los límites de detección del cromatógrafo, probablemente esto se deba a un manejo inadecuado de las muestras o porque tal vez los compuestos no se encontraban suspendidos en el agua al momento de tomar las muestras. Las concentraciones para el tratamiento que contiene Corexit tienden a incrementarse conforme pasa el tiempo, a los 75 días se puede observar que disminuye, y posterior a este muestreo los valores se incrementan hasta su valor máximo y después nuevamente disminuye.

A pesar de ser concentraciones muy bajas, se observa que existe una dilución mayor con la presencia de dispersante, aunque estos valores muestran, incrementos y decrementos en su concentración, esto se puede deber a los ciclos de depositación y resuspensión del material sedimentario en las unidades experimentales.

6.3.2. Hidrocarburos alifáticos en el sedimento.

Para iniciar con el análisis de los datos se decidió agrupar a los compuestos analizados de tal forma que compartieran características que reflejaran similitudes durante la fase experimental, se pudo observar que los compuestos que reflejaban cambios en su concentración fueron alcanos de 14 hasta 18 carbonos, a este conjunto se le nombró PM medio, ya que su peso molecular se considera intermedio. El resto de los compuestos no presentó cambios significativos en sus concentraciones durante el experimento, debido a que la concentración inicial y final fueron muy parecidas [Ver Figura 11 (A-B)].

Los resultados indican que la asimilación de los compuestos alifáticos se relaciona de manera directa con el número de carbonos que forman las cadenas, ya que entre más largas sean, la degradación de los compuestos es más compleja o requiere más tiempo, por lo que se puede observar en la figura 11 (A-B), el tiempo propuesto

para la disminución de la concentración de los compuestos sólo tuvo efecto en aquellos que son propensos a la degradación de los organismos presentes en el sustrato.

En la Figura 10, se muestran los valores quincenales de los HA's (PM medio), de esta forma se observa que la sumatoria de las concentraciones presenta un decaimiento a partir del segundo y tercer muestreo (30 y 45 días). A los 60 días se observa un incremento alcanzando un valor similar al del primer muestreo (15 días) y nuevamente decae. Tanto para el tratamiento que contiene dispersante como para el que no se alcanzó, al final del experimento, una disminución de aproximadamente 50% con respecto a la concentración inicial.

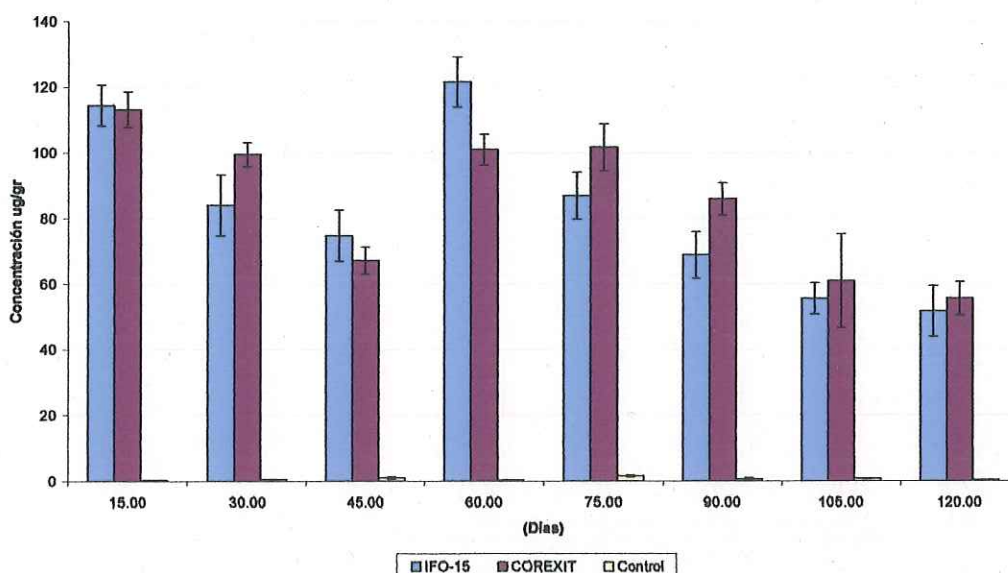


Figura 10. Sumatoria de los hidrocarburos del sedimento desde C-14 hasta Fitano, de los tres tratamientos durante los muestreos realizados en los microcosmos.

El objetivo de realizar una comparación en las concentraciones desde el inicio hasta el final de la etapa experimental, es tener una idea general del comportamiento de los compuestos alifáticos que ya se tenían identificados; debido a que no se inoculó el sedimento con una cepa bacteriana específica para degradar compuestos de petróleo, la manera en la que las concentraciones cambiarían con el tiempo era indefinida, debido a otros factores que interfirieron en el experimento.

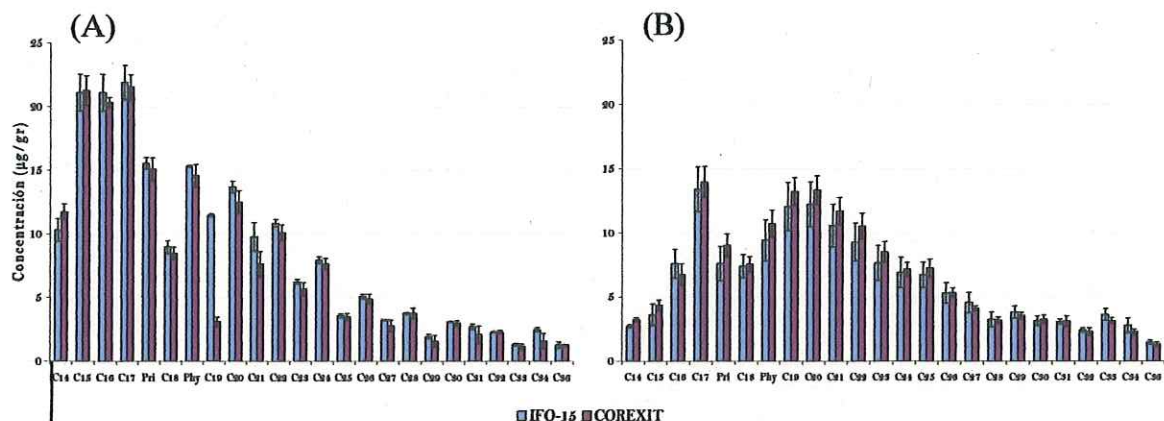


Figura 11, (A) valor promedio de las concentraciones de los hidrocarburos alifáticos durante el primer muestreo (15 días desde el inicio del experimento), (B) valor promedio de las concentraciones de los hidrocarburos alifáticos en el último muestreo (120 días desde el inicio del experimento).

Después de identificar las variaciones en la concentración de los compuestos alifáticos alojados en el sedimento durante 120 días, se generó un análisis para cada compuesto, con la finalidad de evaluar el comportamiento de la degradación individual con respecto al tiempo y entre tratamientos. El principal objetivo de éste fue identificar la tendencia de los valores iniciales de concentración y proponer una ecuación que permita estimar el tiempo que tardaría en alcanzar un 99% de degradación.

Los compuestos que presentaron diferencias notables desde el inicio del experimento, fueron aquellos que contienen cadenas de catorce carbonos (C14) hasta los que estuvieron constituidos por una cadena de 18 carbonos. En la Figura 11 se muestra el comportamiento del n-alcano C14 durante el transcurso del experimento.

Se detectaron tres comportamientos distintos en la degradación de los compuestos alifáticos, por lo tanto los resultados se muestran en tres figuras que representan el comportamiento de degradación de los hidrocarburos alifáticos identificados en las muestras de sedimento de cada uno de los tratamientos (Figura 12, 13 y 14).

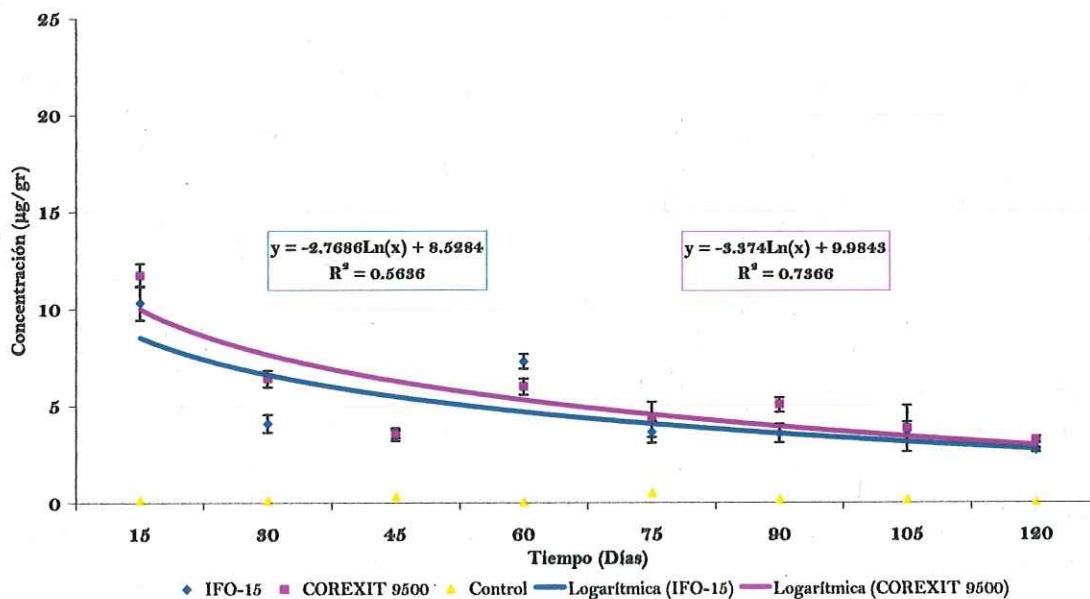


Figura 12. Cambio en la concentración de tetradecano (C14) durante 120 días de la fase experimental. La curva que se ajusta a este comportamiento es de tipo logarítmico.

El comportamiento de degradación del pentadecano (C15), es similar al que se muestra en la Figura 12. Los compuestos que al igual que C16 tienen un decaimiento de este tipo son: heptadecano (C17) y el pristano (Pris), las figuras que muestran lo anterior se pueden observar en el apéndice tres.

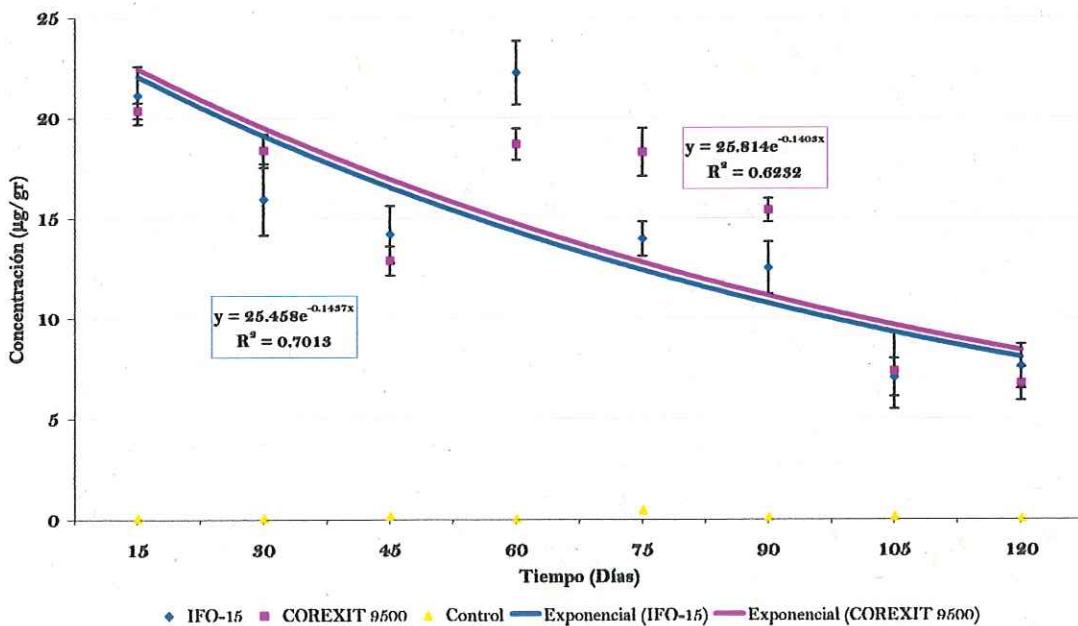


Figura 13. Concentración de Hexadecano (C16) identificada durante el experimento, el ajuste de la curva que se aproxima a este comportamiento es de tipo exponencial.

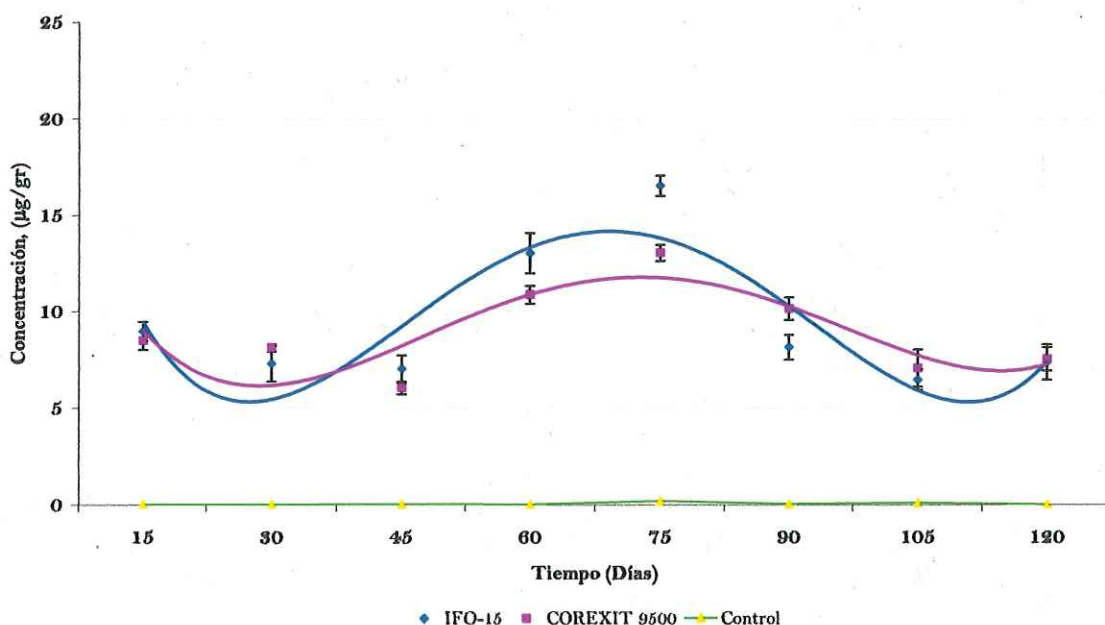


Figura 14, Concentraciones cuantificadas para el compuesto Octadecano (C18) durante el experimento. Los compuestos que tienen un comportamiento similar al C18 son el resto de los Alifáticos identificados en las muestras, desde C18 hasta C36.

Con el propósito de observar como se degradaron los compuestos ya mencionados, se hizo un análisis individual. Los datos obtenidos se resumen en la Tabla 7, donde se puede observar el porcentaje de degradación para cada analito en ambos tratamientos y la ecuación que muestra la forma de degradación con el tiempo. Los modelos que se proponen explican aproximadamente un 66% para los compuestos Tetradecano y Pentadecano, y hasta un 55% para Heptadecano y Pristano.

En general, la degradación de los n-alcenos estudiados muestran una tendencia no lineal y esto coincide con observaciones experimentales previas. Por ejemplo, Venosa *et al.*, (2007), estudiaron la biodegradación de petróleo dispersado a diferentes temperaturas y en su trabajo logró modelar las curvas de decaimiento de la concentración de los hidrocarburos. La degradación de los analitos pertenecientes al grupo de los hidrocarburos alifáticos (HA's), puede ser representada con un análisis de regresión no lineal, cuyos datos arrojaron una ecuación de primer orden: $C_1 = C_0 \exp(-kt)$. Donde C_1 representa la concentración del analito (mg/L), en cualquier tiempo (t); C_0 es la concentración inicial del analito (mg/L) y k es el coeficiente de biodegradación (día^{-1}). El experimento de Venosa *et al.*, (2007) se realizó en agua, es por eso que las

concentraciones son reportadas en mg/L, se inoculó cada una de las unidades experimentales con un consorcio bacteriano y por esa razón obtuvieron una ecuación de primer orden como modelo de degradación.

Tabla 7. Porcentaje de degradación de C14-C17 y Pris. Ecuación de degradación de cada uno de los compuestos.

| Muestra | C14 | | C15 | | C16 | | C17 | | PRIS | |
|---------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|---------------------------------|---------------|--------------------------|---------------|-------------------------|---------------|-------------------------|
| | % Degradación | Ecuación | % Degradación | Ecuación | % Degradación | Ecuación | % Degradación | Ecuación | % Degradación | Ecuación |
| Combustóleo | 73 | $C = -2.77\text{Ln}(t) + 8.53$ | 82 | $C = -6.89\text{Ln}(t) + 19.73$ | 68 | $C = 25.458e^{-0.1437t}$ | 38 | $C = 23.03e^{-0.072t}$ | 51 | $C = 18.045e^{-0.089t}$ |
| Combustóleo + Dispersante | 79 | $C = -3.37\text{Ln}(t) + 9.98$ | 79 | $C = -7.15\text{Ln}(t) + 21.18$ | 66 | $C = 25.814e^{-0.1403t}$ | 35 | $C = 21.845e^{-0.051t}$ | 40 | $C = 16.38e^{-0.051t}$ |

Donde:

C = Concentración

t = Tiempo

En este trabajo, se obtuvieron ecuaciones similares a la propuesta por Venosa *et al.*, (2007), pero sólo para los compuestos C16, C17 y Pris. Se puede observar que los porcentajes de degradación de los compuestos que se apegan a este modelo son mayores para el tratamiento que no contiene dispersante (Ver tabla 7). Este modelo funcionó de igual manera para el tratamiento que contenía dispersante y para aquél que contenía solo combustible. Por lo tanto, se concluye que el dispersante Corexit 9500[®] no inhibe la degradación de los analitos de los hidrocarburos alifáticos ya que se observa el mismo patrón para los analitos de mayor peso molecular.

6.3.3 Hidrocarburos aromáticos en el sedimento.

Los hidrocarburos aromáticos son compuestos formados por anillos aromáticos fusionados, los cuales son resistentes al ataque nucleofílico. Poseen características de baja solubilidad acuosa y alta distribución de sólido/agua, lo cual promueve su acumulación en la fase sólida del ambiente. En general, la solubilidad acuosa y la biodisponibilidad de los HAP's decrece logarítmicamente con el incremento de la masa molecular (Johansen *et al.* 2005)

La degradación biológica de los hidrocarburos aromáticos se puede llevar a cabo de tres formas: 1) Biodegradación asimilativa, en la cual se produce carbono y energía para los organismos degradadores, con lo que se favorece la mineralización de los analitos, o parte de ellos; 2) Desintoxicación celular, en este proceso se tiene como propósito que los analitos aumente su solubilidad en agua como pre-requisito, para la excreción de los compuestos. La oxidación intracelular y la hidroxilación de los compuestos aromáticos en las bacterias, es un paso inicial para preparar la fisión del anillo y la asimilación del carbono y 3) Co-metabolismo, que es el proceso en el cual se presenta la degradación de los analitos, sin generar energía y carbono para el metabolismo de las células. También se define como una reacción enzimática no específica, la cual es la competencia de sustrato con uno de estructura primaria similar para los sitios activos de la enzima. Un ejemplo, es el co-metabolismo de benzo(a)pireno por bacterias crecidas en pireno, en el caso de un cultivo puro, el co-metabolismo es el punto final de la transformación sin ningún beneficio para el

organismo (Johnsen *et. al.* 2005). En nuestro estudio, sólo se logró identificar positivamente cuatro hidrocarburos aromáticos. Los cuatro compuestos identificados se reportan mensualmente debido a que son más resistentes a la degradación y los valores obtenidos no presentaban diferencias importantes en el curso del experimento.

Los compuestos que se identificaron en las muestras de sedimento son el Fenantreno, Pireno, Benzo(a)antraceno y Criseno. A diferencia de los compuestos alifáticos, la tendencia de degradación de los PAH's es mejor descrita por una línea recta. La tendencia que muestra el cambio de concentración en el tiempo para el fenantreno, pireno, benzo(a)antraceno y el criseno, se muestra en las Figuras, 15, 16, 17 y 18 respectivamente.

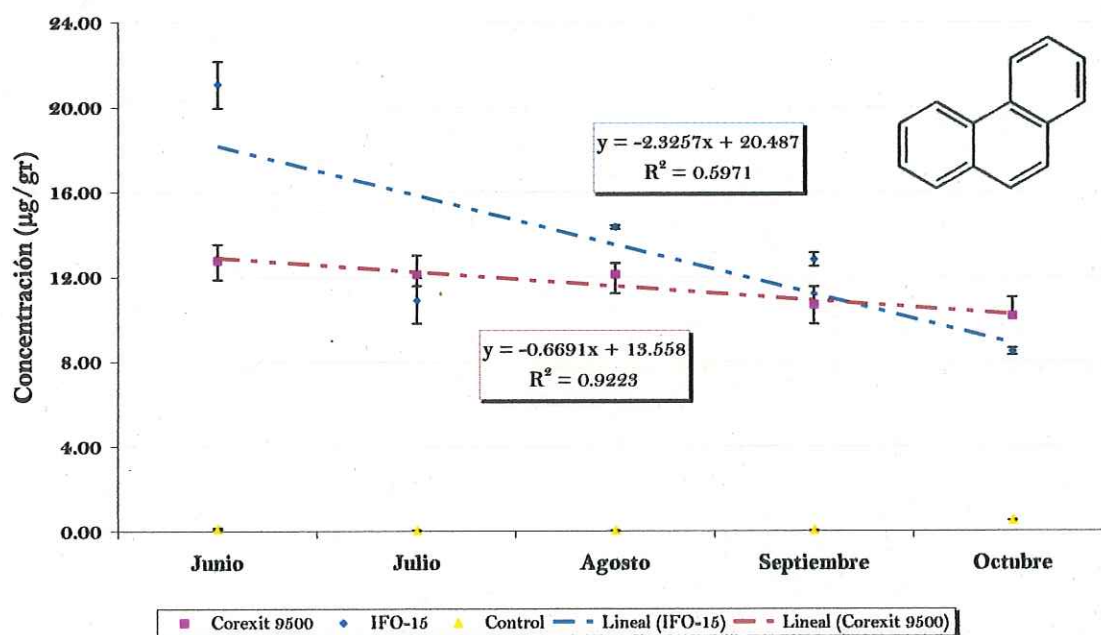


Figura 15. Decaimiento de la concentración del Fenantreno durante 5 meses de experimento. Comparación entre tratamientos, los valores mostrados son los promedios de tres replicas para cada uno de ellos. El modelo de degradación de este compuesto para cada tratamiento esta dentro de los rectángulos, el superior para IFO-15 y el inferior para Corexit ©.

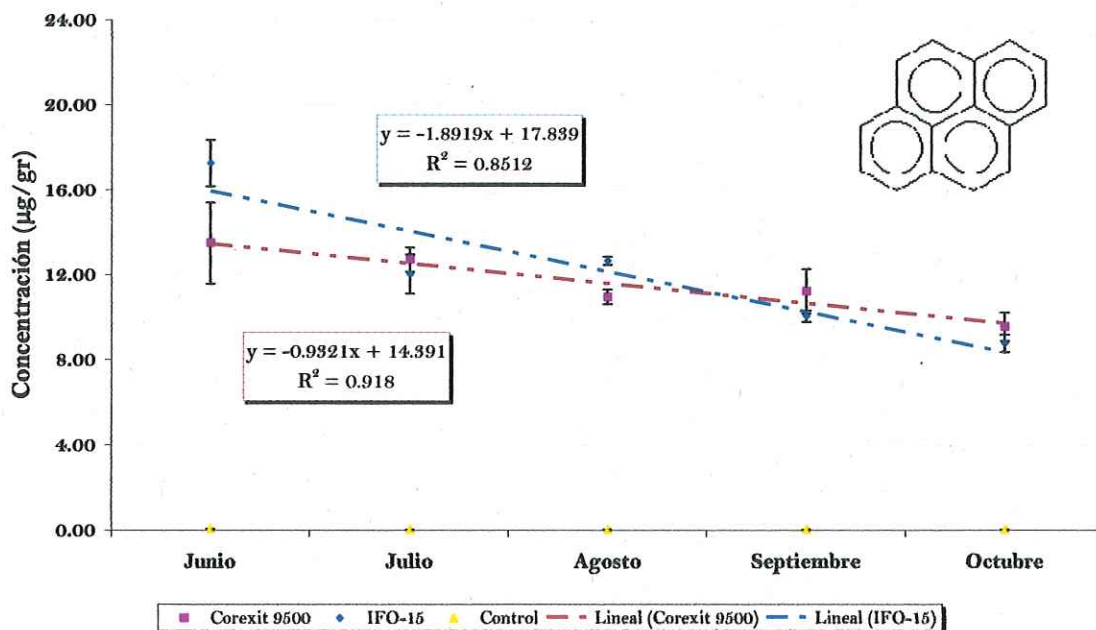


Figura 16. Decaimiento de la concentración del Pireno durante 5 meses de experimento. Comparación entre tratamientos, los valores mostrados son los promedios de tres replicas para cada uno de ellos. El modelo de degradación de este compuesto para cada tratamiento esta dentro de los rectángulos, el superior para IFO-15 y el inferior para Corexit ©.

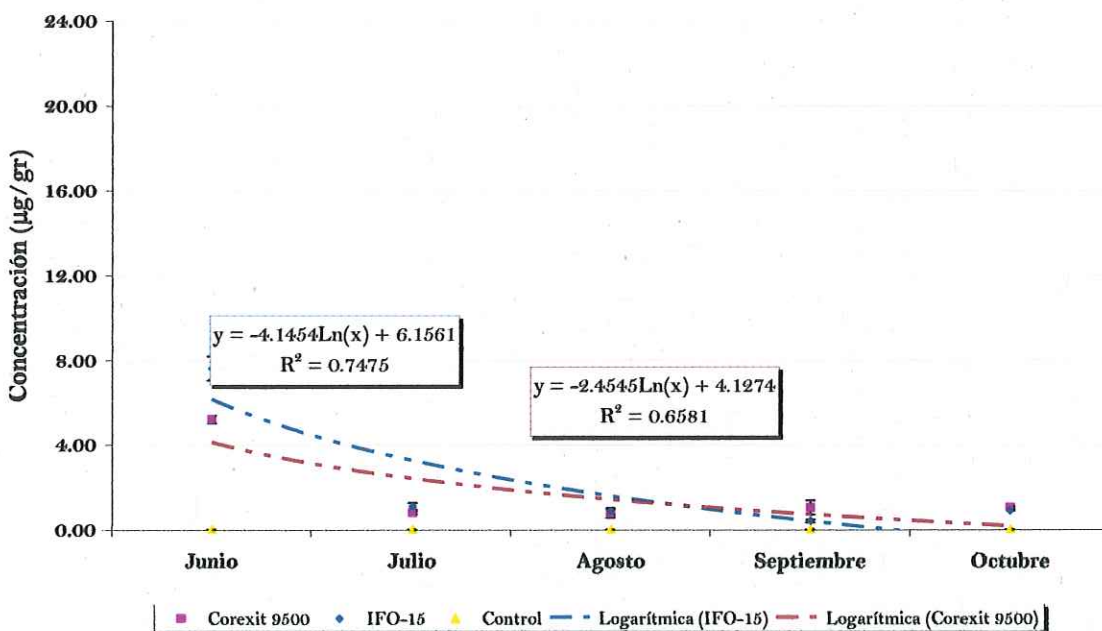


Figura 17. Decaimiento de la concentración del Benzo(a)antraceno durante 5 meses de experimento. Comparación entre tratamientos, los valores mostrados son los promedios de tres réplicas para cada uno de ellos. El modelo de degradación de este compuesto para cada tratamiento esta dentro de los rectángulos, el superior para IFO-15 y el inferior para Corexit ©.

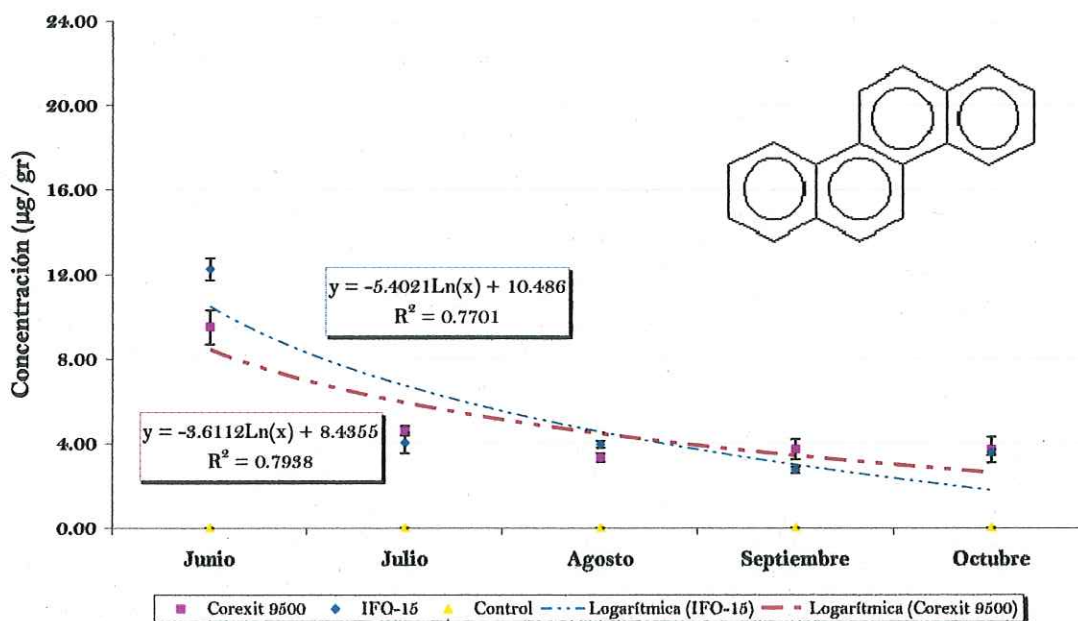


Figura 18. Decaimiento de la concentración del Criseno durante 5 meses de experimento. Comparación entre tratamientos, los valores mostrados son los promedios de tres réplicas para cada uno de ellos. El modelo de degradación de este compuesto para cada tratamiento esta dentro de los rectángulos, el superior para IFO-15 y el inferior para Corexit ©.

Los datos obtenidos de las unidades experimentales, nos revelan que la degradación de los hidrocarburos aromáticos, no es tan eficiente comparados con los hidrocarburos lineales. No obstante los 4 compuestos que se identificaron en la muestra de combustible nos pueden dar una buena idea de la forma que el dispersante afecta a la degradación de estos compuestos durante la etapa experimental.

En la Tabla 8 se muestran las ecuaciones y porcentaje de remoción durante 5 meses de cada uno de los analitos que formaron la fracción aromática. Estos datos revelan la degradación en cada tratamiento y muestra que en el caso donde se adicionó solamente el combustible, ocurrió una remoción mayor de fenantreno, comparado con el tratamiento con dispersante, mas del 30 por ciento (Figura 15). Esta misma tendencia se observó en el pireno, la diferencia es del 20 por ciento (Figura. 16) y en el criseno, con una diferencia del 10 por ciento (Figura. 18). En contraste, el benzo(a)antraceno muestra que la diferencia es menor al 10 por ciento. Al observar los datos de la tabla,

destaca la manera en que la diferencia entre los porcentajes de los dos tratamientos disminuye conforme la estructura química del analito es más compleja

Una de las posibilidades para explicar sólo la presencia de aromáticos complejos, se debe a que los compuestos aromáticos de dos y tres anillos, pueden ser degradados aeróbicamente, mientras que los que están formados por 4, 5 ó 6 anillos bencénicos son más persistentes en el ambiente y al igual que los hidrocarburos alifáticos de cadena larga, tienden a asociarse al material particulado y por lo tanto disminuye su proceso de degradación. (Altamirano-García., 2004).

El Benzo(a)antraceno, criseno y pireno son compuestos de alto peso molecular que están formados por cuatro anillos aromáticos. En el caso de estos compuestos, el proceso de remoción ejecutado por microorganismos es muy lento y éste se inicia una vez que se han adaptado a su presencia, una vez que este proceso se realiza, la vida media de estos compuestos es de alrededor un año (Environmental contaminants encyclopedia; 1997).

El fenantreno que es un compuesto de tres anillos, presenta una disminución en su concentración del 60 por ciento aproximadamente para el tratamiento que no contiene dispersante y 20 para el que si lo contiene. Se ha propuesto que los compuestos de dos y tres anillos aromáticos pueden degradarse hasta en un 80-90% en un periodo corto de tiempo en el ambiente (Glaser et al., 1999; Johnsen et al., 2005; Venosa et al., 2007). Estos autores han demostrado experimentalmente, que los hidrocarburos aromáticos pueden ser degradados por microorganismos aislados de lugares contaminados con hidrocarburos del petróleo, controlando la presencia de organismos y nutrientes para favorecer el proceso de degradación.

Tabla 8. Porcentaje de degradación de hidrocarburos aromáticos y ecuación de degradación de cada uno de los compuestos.

| Muestra | Fenantreno | | Pireno | | Benzo(a)antraceno | | Criseno | |
|---------------------------|---------------|--------------------------|---------------|--------------------------|-------------------|-------------------------------|---------------|-------------------------------|
| | % Degradación | Ecuación | % Degradación | Ecuación | % Degradación | Ecuación | % Degradación | Ecuación |
| Combustóleo | 59 | $C1 = -2.3257t + 20.487$ | 49 | $C1 = -1.8919t + 17.839$ | 88 | $C1 = -4.1454\ln(t) + 6.1561$ | 70 | $C1 = -5.4021\ln(t) + 10.486$ |
| Combustóleo + Dispersante | 21 | $C1 = -0.6691t + 13.558$ | 29 | $C1 = -0.9321t + 14.391$ | 80 | $C1 = -2.4545\ln(t) + 4.1274$ | 60 | $C1 = -3.6112\ln(t) + 8.4355$ |

Donde:

C1 = Concentración del analito

t = Tiempo

En este trabajo se puede observar que los hidrocarburos aromáticos de bajo peso molecular tienden a degradarse más rápido, posiblemente porque las condiciones experimentales favorecieron este proceso.

Venosa *et al.*, (2007), presentan un modelo de degradación de tipo exponencial, para el total de los hidrocarburos aromáticos, con dispersante y sin dispersante. El consorcio bacteriano existente en los sedimentos es capaz de reducir concentración hasta un 90 por ciento en ambos tratamientos y en un periodo aproximado de 30 días. Las ecuaciones obtenidas en este trabajo difieren a los resultados publicados por Venosa *et al.* (2007), pero a diferencia de estos autores que el experimento es llevado a cabo en la columna de agua, nuestro experimento en sedimentos sugiere que existe un consorcio bacteriano distinto que afecta de diferente manera el proceso de degradación.

Con este trabajo se pretendió mostrar, que la atenuación natural esta presente, una vez que los organismos se restablecen y toman como fuente de carbono prioritaria a los compuestos que ahora están en su ambiente, además de demostrar el efecto que el dispersante tiene sobre el proceso de remoción de estos compuestos. En el caso de los hidrocarburos aromáticos, a pesar de existir diferencias entre los porcentajes de remoción, el comportamiento para ambos tratamientos fue similar, lo que se puede observar en las Figuras 15- 18. A pesar de presentarse valores más bajos de remoción con la presencia de dispersante, éste no va a impedir que la degradación se presente. Tal vez en menor cantidad, comparándolo con el tratamiento que no lo contiene, pero la presencia de Corexit 9500[®] no inhibe el proceso de remoción.

7.0. Conclusiones.

En el sedimento contaminado, los hidrocarburos alifáticos, de 14 a 18 carbonos fueron más susceptibles a los procesos de degradación durante el tiempo del experimento, con y sin dispersante. Para los hidrocarburos aromáticos se observó que la remoción de los compuestos es favorecida, aunque la presencia del dispersante no inhibe este proceso.

En base a los resultados se puede observar que no hay diferencia entre los tratamientos debido a que el porcentaje de remoción para los compuestos alifáticos varió dependiendo del compuesto, obteniéndose valores mas altos para los hidrocarburos de menos carbonos (C14, C15 y C16) con una variación de $\pm 5\%$ en cada uno de los tratamientos.

La disolución de los hidrocarburos fue menor al 1 % con respecto al sedimento hacia la columna de agua, las concentraciones fueron del orden de nanogramos (ng/ml), por lo tanto se considera que la resuspensión de los compuestos es mínima a pesar de la presencia de dispersante.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el dispersante asociado al petróleo que se deposita en el sedimento, no favorece el aumento de la degradación de los hidrocarburos aromáticos y alifáticos, esto debido a que el comportamiento de los mismos es similar durante la etapa experimental.

La degradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en la etapa experimental de 4 meses, sugiere que el uso de Corexit 9500[®] no favorecere un aumento en la degradación de los compuestos del petróleo que ingresan en el ambiente marino.

8.0. Recomendaciones.

Es importante considerar que el tiempo de experimentación pudo no ser suficiente para observar cambios evidentes en la disminución de la concentración de los compuestos, por lo que se sugiere evaluar la degradación por más de 4 meses.

Es necesario continuar con la investigación de los efectos tóxicos que el dispersante puede tener una vez que se asocia a los hidrocarburos del petróleo, debido a que en este experimento no se evaluó la toxicidad que el dispersante puede tener sobre las comunidades bacterianas bentónicas que habitan en los ecosistemas.

De igual manera, se considera importante observar el efecto de las concentraciones de dispersante a diferentes temperaturas, para tener un análisis más amplio de los efectos que este podría tener en diversos escenarios en zonas templadas y calidas más propias de nuestro país.

Debido a que no se conocen con exactitud los efectos que los dispersantes pueden causar en ambientes marinos, se recomienda que no se consideren como la primera medida de acción. En su lugar, se deberán utilizar medios mecánicos para recolectar los combustibles, de esta forma el ingreso de los compuestos será menor en los ecosistemas

Finalmente, y de acuerdo a las características de las zonas costeras de la República Mexicana donde se quiera utilizar el dispersante como una medida de control en caso de ocurrir un derrame de combustibles, se deben estudiar los posibles efectos sobre la biota endémica en base a los combustibles o crudos que se transporten en esas regiones.

9.0 Referencias Bibliográficas.

1. **Albers, P.H.**, Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons, in *Handbook of ecotoxicology*, Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A., Jr., and Cairns, J., Jr. (Eds), Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1994, 330.
2. **Aldrett, S.**, James S. Bonner, Marc A. Mills, Robin L. Autenrieth and Frank L. Stephens. Microbial degradation of crude oil in marine environments tested in a flask experiment (1997). *Water Research*. 31(11): 2840 – 2848.
3. **Atlas R.M.** Bioremediation of petroleum pollutants. (1995). *International Biodeterioration & Biodegradation*. 317-327.
4. **ATSDR.** 1995a. Toxicological profile for automotive gasoline. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. department of Health and Human Services, Atlanta, GA. NTIS PB95-264206.
5. **ATSDR.** 1995g. Toxicological profile for fuel oils. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. NTIS PB95- 264222.
6. **Altamirano-Garcia R.I.** Evaluación del potencial de degradación de hidrocarburos por bacterias provenientes de un sitio portuario. Centro de investigación científica y educación superior de Ensenada. Tesis de maestría. (2004).
7. **Bassin N.J & T. Ichiye.** Flocculation Behavior of suspended sediments and oil emulsions. (1977). *Journal of Sedimentary Petrology*. 47: 671-677.
8. **Brakstad O.G., A.G.G. Lodeng.** 2005. Microbial diversity during biodegradation of crude oil in Seawater from the North Sea. *Microbial Ecology* 49: 94-103.
9. **Bojes, H. and P. Pope.** Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and 9 production sites in Texas. (2007). *Regul. Toxicol. Pharm.* 47: 288-285.
10. **Bruheim, P., H. Bredholt & K. Eimhejellen.** Bacterial degradation of emulsified crude oil and the effect of various surfactants. (1997). *Canadian Journal of Microbiology*. 43:17-22.

11. Carlberg, S.R., -oil Pollution of the Marine environment –with an emphasis on estuarine studies in *Chemistry and Biogeochemistry of Estuaries*, Olausson, E. & Cato, I. (Eds), John Wiley & Sons, Chichester, 1980, 367.
12. Clark, R.B., *Marine Pollution*, 3rd ed., Clarendon Press, Oxford, 1992.
13. Colombo J.C., E. Pelletier, C. Brochu, M. Khalil & J.A Cataggio (1989) Determination of hydrocarbon Sources using n-alkane and Polyaromatic Hydrocarbon distribution Indexes. Case study: Rio de la Plata Estuary, Argentina. *Environ. Sci. Technol.* 23 (7): 888-894.
14. Gearing, P.J. & J.N. Gearing. Behavior of No 2 Fuel oil in water column of controlled ecosystems. (1982a). *Marine Environmental Research.* 6: 115-132.
15. Gearing, P.J. & J.N. Gearing. Transport of No 2 Fuel oil between water column, surface microlayer and atmosphere in controlled ecosystems. (1982b). *Marine Environmental Research.* 6: 133-143.
16. Gearing, P.J., J.N. Gearing., R.J. Pruell, T.L. Wade & J.G. Quinn. Partitioning of No 2 Fuel oil in controlled ecosystems. Sediments and suspended particulate matter (1980). *Environ. Sci. and technol.* 14: 1129-1136.
17. Garrett, R.M., S.J. Rothenburger & R.C. Prince. Biodegradation of Fuel Oil Under Laboratory and Arctic Marine Conditions (2003). *Spill Science & Technology Bulletin*, 8(3): 297–302.
18. Herbes, S.E. Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons between dissolved and particulate phases in natural waters. (1977). *Water Research.* 11(6): 493-496.
19. Hoffman, E.J. & J.G. Quinn. Gas Chromatographic analysis of Argo Merchant oil in sediment hydrocarbons at the wreck site. (1979). *Marine Pollution Bulletin.* 10: 20-24.
20. IARC. 1989a. Gasoline. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. International Agency for Research on Cancer, 45: 159-201.
21. J. Hua. Biodegradation of dispersed marine fuel oil in sediment under engineered pre- spill application strategy. (2006). *Ocean engineering.* 33: 152- 167.
22. Johnsen A.R., Lukas Y. Wick, Hauke Harms. Principles of microbial PAH-degradation in soil. (2005). *Environmental pollution.* 133: 171- 184

23. **Johansson, S.U., U. Larsson & P.D. Boehm.** The *Tsesis* oil spill impact on the pelagic ecosystem. (1980). *Marine Pollution Bulletin*. 11: 284-293.
24. **Karickhoff, S.W.** Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. (1981). *Chemosphere*. 10: 833-846.
25. **Kennish, M.J.,** *Oil Pollution, in Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution.* Kennish M.J & Lutz P.L (Eds). CRC Press Boca Raton, New York, London, Tokyo, 1997. pp 83.
26. **Lindstrom J.E. & J.F. Braddock.** 2002. Biodegradation of petroleum hydrocarbons at low temperature in the presence of the dispersant Corexit 9500. *Marine Pollution Bulletin* 44: 739-747.
27. **Macías-Zamora J.V., E. Mendoza-Vega, J.A. Villaescusa-Celaya.** PAHs composition of surface marine sediments: a comparison to potential local sources in Todos Santos Bay, B.C., Mexico. (2002). *Chemosphere*. 46: 459-468
28. **Mackay, D. & K.Hossain.** (1982).An exploratory study of naturally and chemically dispersed oil. EE-35. Report to Environment Canada. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
29. **Malinky, G., & D.G. Shaw.** (1979). Modeling the association of petroleum hydrocarbons and sub-artic sediments. Pp. 621-623 in *Proceedings of the 1979 International Oil Spill Conference*, Los Angeles, California.American Petroleum Institute, Washington, D.C.
30. **Martínez-Alonso M., N. Gaju** (2005). El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. *Ecosistemas*. 2:1-12
31. **Martínez V.E. y Felipe López.** efecto de hidrocarburo en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso (2001). *Terra*. 19: 9-17.
32. **McNaughton, S.J., R. Swannell, F. Daniel & L. Bristow.** Biodegradation of dispersed forties crude and Alaskan North Slope oils in microcosms under simulated marine conditions (2003). *Spill Science. and Tecnology. Bulletin*. 8: 179-186.
33. **Medeiros P.M., Márcia Caruso Bicego.** Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers.

- II. São Sebastião, SP- Brazil. (2004). *Marine Pollution Bulletin*. 49: 892-899
34. Moon H.S, H.Y. Kanhn, J.Y. Kim, J.J. Kukor and K.Nam. Determination of biodegradation potential by two culture-independent methods in PAH-contaminated soils. (2006) *Environmental Pollution*. 140: 536 -545.
 35. Nieves M.LI, M.G. Commendatore, N.L. Olivera, J.L. Esteves, V.Bucalá. Biodegradation of bilge waste from Patagonia with an indigenous microbial community. (2005). *Bioresource Technology*. 97(18): 2280- 2290.
 36. **Oil Spill Dispersants**. Efficacy and effects. 2005. Committee on Understanding Oil Spill Dispersants: Efficacy and Effects. Ocean Studies Board. Division on Earth and life Studies. National Research Council. National academies press. 5:231-257.
 37. Otiloloju, A.A., Crude oil dispersant: Always a boon or bane? (2005). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60: 198-202.
 38. Payne J.R and McNabb, G.D., Jr. Weathering of petroleum in the marine environment. (1984). *Marine Technology Scociety Journal*. 18(3): 24-40.
 39. Payne J.R., J.R. Clayton, Jr & B.E., Kirstein. Oil/Suspended Particulate Material Interactions and Sedimentation (2003). *Spill Science & Technology*. 8(2): 201-221.
 40. Rogers, R.D., J.C. McFarlane & A.J Cross. Adsorption and desorption of benzene in two soils and montmorillonite clay.(1980). *Environ. Sci. Technol*. 14: 457-461.
 41. Sartoros C., Laleh Yerushalmi, Patrick Béron, Serge R. Guiot. (2005). *Chemosphere*. 61:1042- 1050.
 42. **Using Oil Spill Dispersants on the Sea**. 1989. Committee on Effectiveness of Oil Spill Dispersants. Ocean Studies Board. Division on Earth and life Studies. National Research Council. National academies press. p.p: 327.
 43. Venosa A.D., E.L. Holder. Biodegradability of dispersed crude oil at two different temperatures. (2007). *Marine Pollution Bulletin*. 54: 545 – 553
 44. Wade, T.L. & J.G. Quinn. Incorporation, distribution and fate of saturated petroleum hydrocarbons in sediments from a controlled marine ecosystem.(1980). *Marine Environmental Research*. 3: 15-33.
 45. Wolfe, D.A., Hameedi, M.J., Galt, J.A., Watabayashi, G., Short, J., O'Clair, C., Rice, S., Michael, J., Payne, J.R., Braddock, J. Hanna, S., Sale, D., The fate

of the oil spilled from the Exxon Valdez. (1994). *Environ. Sci. Technol.* 28: 561-568.

46. Xia X.H, H. Yu, Z. F. Yang, G.H. Huang. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the natural waters of the Yellow River: Effects of high sediment content on biodegradation. (2006). *Chemosphere.* 65(3): 457-466.
47. Zaghden H., Monem Kallel, Afifa Louati, Boubaker Elleuch, Jean Oudot, Alain Saliot. Hydrocarbons in surface sediments from the Sfax coastal zone, (Tunisia) Mediterranean Sea. (2005). *Marine Pollution Bulletin.* 50(11): 1287- 1294.
48. Zavala J. Orti, C. Ojeda, A. Botello. Contaminación del suelo por hidrocarburos en el campo petrolero Samaría, Tabasco. En: Botello, A. V., Rojas Galaviz, J.A. y Zarate Lomeli, D. (Eds) Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias, EPOMEX. Serie científica 5. Universidad Autónoma de Campeche, 666p.

Apéndice 1.

Aleatorización de las unidades experimentales.

La aleatorización es un método en el cual las unidades experimentales reciben las aplicaciones de los tratamientos en forma aleatoria. Al realizar la aleatorización de manera adecuada en el experimento, evita los posibles sesgos sistemáticos y neutraliza los efectos de todos aquellos factores externos no controlados por el investigador. La aleatorización debe asegurar que la asignación de los tratamientos a las unidades experimentales sea tal, que cualquier unidad tenga la misma oportunidad de recibir cualquier tratamiento.

Protocolo.

Para este experimento se decidió utilizar un diseño completamente aleatorio. Para llevar a cabo la asignación aleatoria de las unidades experimentales se utilizó el procedimiento de números aleatorios. Se asignó un número a cada una de las cajas, del 1 al 9, posteriormente se hicieron tarjetas con la numeración y se colocaron dentro de un contenedor.

Por otro lado al estante donde se colocaron las muestras se les asignó un número dependiendo del nivel, 1 al más bajo, 2 al medio y 3 al nivel alto.

Posteriormente se asignaron las unidades experimentales para el nivel 1, se sacaron de manera aleatoria tres tarjetas y dependiendo de los números que estas mostraron se trasladaron las cajas al nivel correspondiente del estante, el orden en el que se colocaron fue de izquierda a derecha conforme los números se mostraban. De la misma forma se hizo para el nivel 2 y el nivel 3. El orden de las unidades experimentales se muestra en la tabla 2.

Tabla 9. Clave de identificación de las unidades experimentales.

| CONTROL | SEDIMENTO | SEDIMENTO |
|---------|---------------------------|--|
| | CONTAMINADO CON IFO-15 | CONTAMINADO CON IFO-15 Y DISPERSANTE. |
| C1 | CIFO1 | DIFO1 |
| C2 | CIFO2 | DIFO2 |
| C3 | CIFO3 | DIFO3 |

Tabla 10. Orden de las unidades experimentales en el estante.

| | | | |
|---------|-------|-------|-------|
| Nivel 3 | DIFO1 | C2 | CIFO1 |
| Nivel 2 | C3 | CIFO2 | C1 |
| Nivel 1 | CIFO3 | DIFO3 | DIFO2 |

Apéndice 2.

Preparación de las Resinas.

La alúmina y el gel sílice utilizadas para la purificación de los extractos fueron del mismo lote, con la finalidad que las columnas fueran reproducibles para cada una de las separaciones. El diámetro de las partículas de la alúmina y el gel sílice son 58 Å. y 150 Å. Respectivamente.

El procedimiento de limpieza consistió en colocar una cantidad de alúmina y de gel sílice en matraces Erlenmeyer de 500 ml., y se hicieron 2 lavados con cada uno de los solventes. Esto consistió en adicionar metanol a cada uno de los matraces de manera que cubra las resinas, se introdujeron al sonificador por 15 min., al transcurrir el tiempo se sacaron, se dejaron reposar por 15 min., finalmente se decantó el solvente. Este procedimiento se repitió pero ahora se adicionó Diclorometano. Al finalizar el proceso de lavado los matraces deben permanecer bajo la campana para que el solvente se evapore y facilite el secado, una vez que se perdió gran cantidad del solvente se introducen a la estufa a una temperatura de 60°C., hasta que las resinas estén secas.

Una vez que las resinas estuvieron secas se activaron con temperatura, la alúmina se activó a 250°C y el gel sílice a 180°C, por 12 horas. Al terminar el tiempo de activación se extrajeron con cuidado de la mufla y se colocaron en un desecador por 12 horas. En matraces de bola de 500 ml., con tapones esmerilados, previamente lavados se pesó la cantidad de sílice y alúmina que se desea desactivar para empacar las columnas. A manera de ejemplo, aproximadamente 30 grs. de gel sílice y 80 gr de alúmina se empacan 7 columnas, aunque siempre se debe considerar un 20% más. Ya pesadas las resinas estas se desactivaron en un 3% con agua grado HPLC. Y esto se puede representar con las siguientes formulas.

Para el Gel Sílice:

$$Q_A = M_S * 0.03$$

$$Q_{AM} = (Q_A + M_S) * 0.03$$

Para Alúmina:

$$Q_A = M_{Al} * 0.03$$

$$Q_{AM} = (Q_A + M_{Al}) * 0.03$$

Donde:

Q_A ; es la cantidad de agua;

Q_{AM} ; es la cantidad de agua modificada;

M_S y M_{Al} ; son las masas del gel sílice y de la alúmina.

Utilizando los pesos del ejemplo, la cantidad de agua que se adicionó fue la siguiente:

Para desactivar al 3% de Sílice:

$$Q_A = 30 \text{ grs} * 0.03$$

$$Q_{AM} = (0.9 \text{ grs} + 30 \text{ grs}) * 0.03$$

$$Q_{AM} = 0.927 \text{ grs} \approx 0.930 \text{ grs}$$

Para desactivar al 3% la alúmina:

$$Q_A = 80 \text{ grs} * 0.03$$

$$Q_{AM} = (2.4 \text{ grs} + 80 \text{ grs}) * 0.03$$

$$Q_{AM} = 2.47 \text{ grs} \approx 2.5 \text{ grs}$$

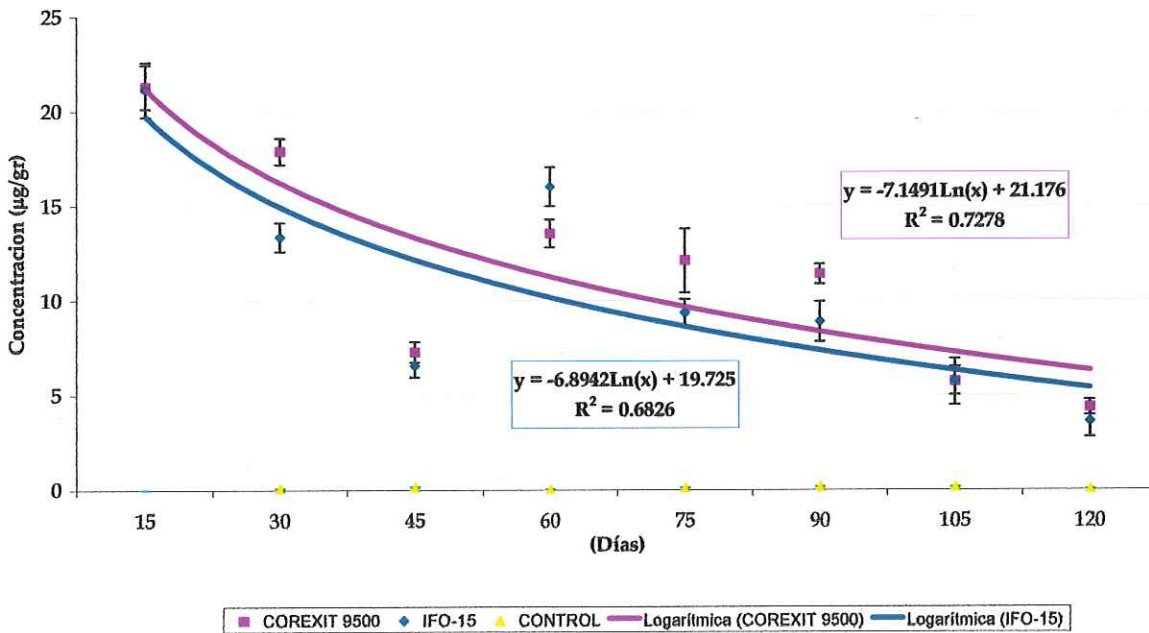
Es importante señalar que las resinas se deben desactivar por separado, se dio un lapso de 15 min., para cada uno de los matraces, debido a que al adicionar el agua, se deben agitar vigorosamente durante el tiempo mencionado. La alúmina, si se desactivo correctamente, al agitar el matraz incremento ligeramente la temperatura.

Una vez desactivadas las resinas, se dejan equilibrar, tapadas por 12 hrs. bajo la campana de extracción. Una vez equilibradas se adiciona hexano se tapan y se mezclan.

Apéndice 3.

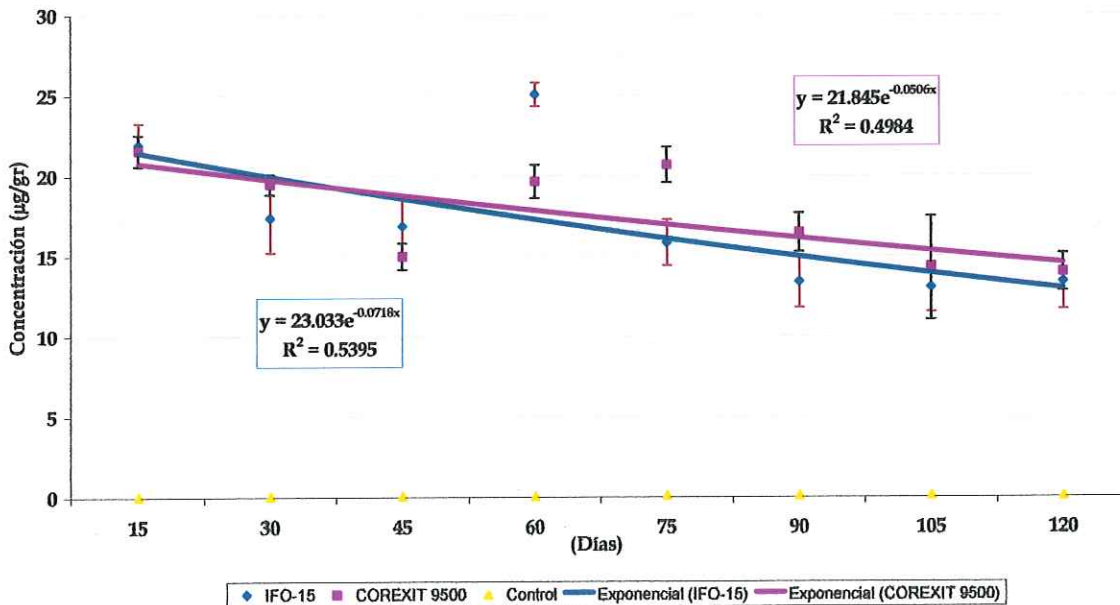
Gráficas del comportamiento de degradación de los hidrocarburos alifáticos en muestras de sedimento.

Pentadecano (C15). Presenta un comportamiento similar al tetradecano (C14)



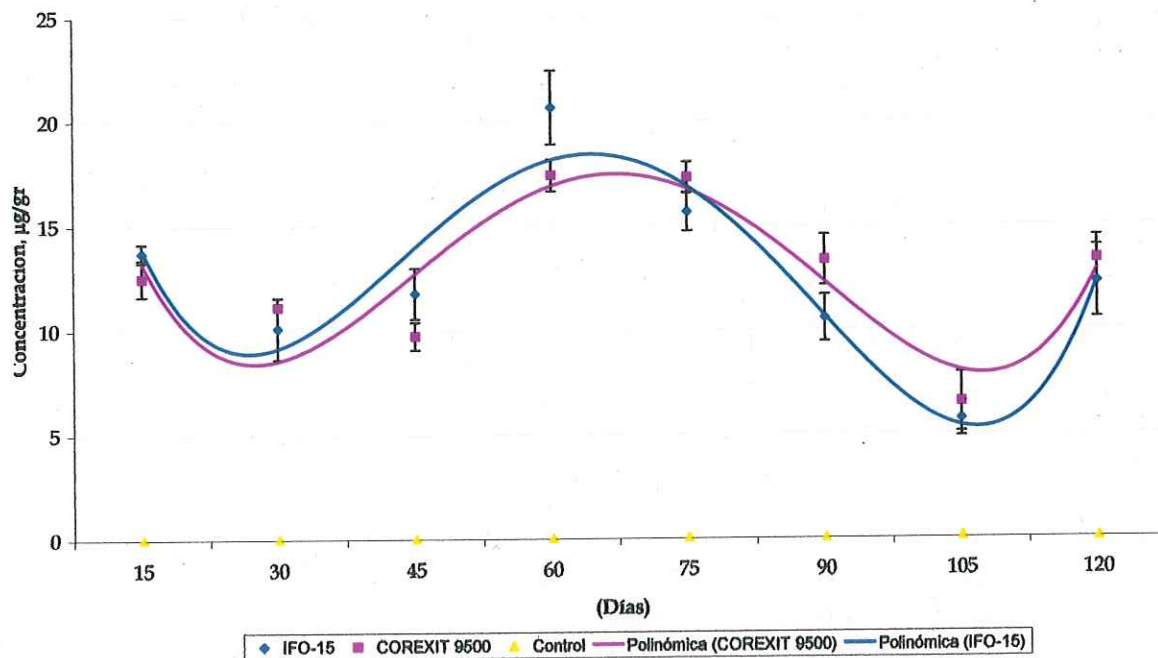
La degradación del compuesto con la presencia de Corexit 9500[®] fue alcanzó un 79.0 por ciento y para el tratamiento que contiene IFO-15 fue de 82.0 por ciento.

Heptadecano (C17). Presenta un comportamiento similar al hexadecano (C16)



La degradación del compuesto con la presencia de Corexit 9500[®] alcanzó un 35.0 por ciento y para el tratamiento que contiene IFO-15 fue de 38.0 por ciento.

Eicosano (C20). Presenta un comportamiento similar al octadecano (C18)



El comportamiento que tiene este compuesto, al igual que el resto de los alifáticos es muy inestable, debido a que las concentraciones aumentan y disminuyen de forma constante durante la etapa experimental.