

# Aplicación de isótopos ambientales en la determinación de la biodegradación de compuestos orgánicos

• Luis E. Lesser-Carrillo\* •

Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey

\*Autor de correspondencia

## Resumen

Lesser-Carrillo, L. E. (septiembre-octubre, 2015). Aplicación de isótopos ambientales en la determinación de la biodegradación de compuestos orgánicos. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 6(5), 123-129.

Se realizaron experimentos de microcosmos para determinar el fraccionamiento de los isótopos estables de carbono durante la biodegradación de naftaleno. Los microcosmos se realizaron bajo condiciones aeróbicas, anaeróbicas (con adiciones de sulfatos, con adiciones de nitratos y sin adiciones) y controles estériles. Se analizó la fase líquida para determinar la concentración e isótopos estables de carbono de naftaleno. Los microcosmos aeróbicos muestran que el naftaleno se degradó aeróbicamente en menos de 60 horas. El  $d^{13}C$  se incrementó de  $-25.5$  a  $-25.1\text{‰}$  (enriquecimiento de  $0.4 \pm 0.08\text{‰}$ ) en una sola muestra, en la que 95% del naftaleno había sido biodegradado. Los microcosmos anaeróbicos muestran que después de 288 días, los microcosmos sin adiciones, con adición de  $NO_3^-$  y con adición de  $SO_4^{2-}$  habían consumido, respectivamente, 30, 50 y 60% de naftaleno en promedio, comparados con los microcosmos de control. Bajo condiciones desnitrificantes, el  $d^{13}C$  de naftaleno aumentó de  $-25.2$  a  $-23.9\text{‰}$  (enriquecimiento de  $1.3 \pm 0.3\text{‰}$ ) después de una biodegradación de 95% del naftaleno. Para los microcosmos sin adiciones se detectó un ligero enriquecimiento en  $d^{13}C$  de naftaleno de  $-25.2$  a  $-24.5\text{‰}$  (enriquecimiento de  $0.7 \pm 0.3\text{‰}$ ) después de una biodegradación de un 65% (después de 288 días). Para los microcosmos en condiciones reductoras de  $SO_4^{2-}$  no se percibieron cambios significativos en el  $d^{13}C$  de naftaleno durante su biodegradación.

**Palabras clave:** naftaleno, fraccionamiento, isótopo, biodegradación, aeróbica, anaeróbica.

## Abstract

Lesser-Carrillo, L. E. (September-October, 2015). Application of environmental isotopes to determine the biodegradation of organic compounds. *Water Technology and Sciences (in Spanish)*, 6(5), 123-129.

Microcosm experiments were conducted to determine the fractionation of stable carbon isotopes during naphthalene biodegradation. The experiments were developed under aerobic and anaerobic conditions (sulfate-amended, nitrate-amended and unamended) and with sterile controls. The liquid phase was analyzed to determine the carbon concentration and stable carbon isotopes of the naphthalene. The aerobic microcosms showed that naphthalene aerobically biodegraded in less than 60 hours. The  $d^{13}C$  increased from  $-25.5$  to  $-25.1\text{‰}$  (enrichment of  $0.4 \pm 0.08\text{‰}$ ) in only one sample, in which 95% of naphthalene was biodegraded. After 288 days, the anaerobic microcosms showed a naphthalene consumption of 30, 50 and 60% on average for the unamended,  $NO_3^-$  amended and  $SO_4^{2-}$  amended microcosms, respectively, relative to sterile controls. Under denitrifying conditions,  $d^{13}C$  increased from  $-25.2$  to  $-23.9\text{‰}$  (enrichment of  $1.3 \pm 0.3\text{‰}$ ) after a 95% biodegradation of naphthalene. The unamended microcosms demonstrated a slight enrichment ( $0.7 \pm 0.3\text{‰}$ ) of  $d^{13}C$  from  $-25.2$  to  $-24.5\text{‰}$  after a biodegradation of 65% (after 288 days). For microcosms with  $SO_4^{2-}$  reduction conditions, no significant changes were detected in the  $d^{13}C$  of naphthalene during biodegradation.

**Keywords:** Naphthalene, isotope, fractionation, biodegradation, aerobic, anaerobic.

Recibido: 04/05/2012  
Aceptado: 18/05/2015

## Introducción

La contaminación de acuíferos con hidrocarburos ha sido ampliamente documentada (Fetter, 1993; Iturbe & Silva, 1989, Lesser-Carrillo, 2006). El naftaleno es el hidrocarburo aromático polinuclear (HAP) producido de forma principal por la refinación de petróleo y es encontrado en especial en la brea. El naftaleno es un contaminante del agua subterránea que se encuentra por lo común en instalaciones de preservación de la madera (Environment Canada, 1993; USEPA, 1992). Se ha demostrado que el naftaleno se biodegrada aeróbicamente (Ehrlich, Goerlitz, Gody, & Hult, 1982; Heitkamp & Cerniglia, 1989) bajo condiciones anóxicas (Agarry & Owabor, 2011; Maillacheruvu & Pathan, 2009; Kleemann & Meckenstock, 2011), bajo condiciones reductoras de hierro (Blum *et al.*, 2009), en condiciones desnitrificantes (Mihelcic & Luthy, 1998; Al-Bashir, Cseh, Leduc, & Samson, 1990) y bajo condiciones reductoras de sulfato (Thierrin, Davis, & Barber, 1995; Rockne & Strand, 1998).

El carbono tiene dos isótopos estables ( $^{13}\text{C}$  y  $^{12}\text{C}$ ) y un isótopo radiactivo ( $^{14}\text{C}$ ) ( $T_{1/2} = 5730$  años). La abundancia natural del  $^{13}\text{C}$  es de 1.11% (Clark & Fritz, 1997). Por razones cinéticas existe una preferencia de los microorganismos para romper enlaces  $^{12}\text{C}$ - $^{12}\text{C}$  en vez de enlaces  $^{12}\text{C}$ - $^{13}\text{C}$  durante la biodegradación de compuestos orgánicos (Van de Velde, Marley, Studer, & Wagner, 1995). Por tanto, la relación  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  del compuesto que está siendo degradado podría aumentar en el proceso de biodegradación. Varios estudios han demostrado un cambio en la relación de isótopos de carbono estables durante la biodegradación de los solventes clorados (Hunkeler, Aravena, & Butler, 1999; Bloom, Aravena, Hunkeler, Edwards, & Frape, 2000; Sherwood-Lollar *et al.*, 1999). Los compuestos BTEX producen fraccionamientos isotópicos muy pequeños en carbono durante su biodegradación (Sherwood-Lollar *et al.*, 1999; Stehmeier *et al.*, 1999; Ahad, Sherwood-Lollar, Edwards, Slater, & Sleep, 2000), así como el MTBE (Lesser *et al.*, 2008). Richnow, Annweiler, Michaelis y Meckenstock (2003) encontraron un fracciona-

miento isotópico en naftaleno muy bajo en un estudio de campo.

Para estudiar este fenómeno en laboratorio, se puede reproducir la biodegradación del naftaleno en microcosmos y se esperaría que la relación de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  dentro del naftaleno aumentaría con el tiempo al avanzar la biodegradación del compuesto. El objetivo de este estudio es determinar, mediante pruebas de laboratorio, el fraccionamiento de los isótopos estables de carbono durante la biodegradación aeróbica y anaeróbica de naftaleno.

## Métodos

### *Experimentos de microcosmos*

Se realizaron experimentos de microcosmos bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas con controles estériles. Los microcosmos anaeróbicos se llevaron a cabo con adiciones de sulfatos, con adiciones de nitratos y sin adiciones. El propósito de las adiciones fue promover la biodegradación anaeróbica de naftaleno mediante la adición de aceptores de electrones que pudieran haberse agotado en los sedimentos y aguas utilizadas. Todos los experimentos se hicieron por triplicado. Los microcosmos se realizaron en viales de vidrio de 60 ml. Cada microcosmo fue llenado con 20 g de sedimentos provenientes de un acuífero contaminado con naftaleno, y aproximadamente 55 ml de agua subterránea sin dejar aire en los viales. Los microcosmos anaeróbicos fueron preparados en una cámara anaeróbica. Se realizó un total de 144 microcosmos.

Los microcosmos fueron sacrificados de forma periódica en triplicado y la fase líquida se analizó para determinar la concentración de compuestos orgánicos y, en su caso, oxígeno disuelto, nitratos o sulfatos. Las muestras de agua de los microcosmos que iban a ser analizadas para isótopos estables de carbono se tomaron en viales de vidrio de 4.8 ml, con un tapón de teflón y sin dejar espacios de aire. Estas muestras se conservaron con azida de sodio a una tasa de 1  $\mu\text{l}$  por cada ml de muestra, y se almacenaron a 4 °C hasta que fueron analizadas.

### Análisis de laboratorio

Las concentraciones de los compuestos orgánicos e inorgánicos de las muestras de agua y los análisis de isótopos estables de carbono fueron analizados tanto por el Organic Geochemistry Laboratory como por el Environmental Isotope Laboratory de la Universidad de Waterloo, Canadá.

### Resultados y discusión

#### Microcosmos aeróbicos

Los microcosmos aeróbicos muestran que el naftaleno se degradó aeróbicamente en menos de 60 horas. Estos resultados concuerdan con estudios previos que han demostrado la biodegradación aeróbica de naftaleno (Ehrlich *et al.*, 1982; Heitkamp & Cerniglia, 1989). Los datos obtenidos de estos experimentos muestran que después de 48 horas había diferencias significativas en la cantidad consumida de naftaleno en cada microcosmo (de 50 a 95%).

Tomando en cuenta los resultados de la biodegradación de naftaleno se analizaron 13

muestras para  $d^{13}C$  provenientes de los microcosmos. Los resultados muestran que se observó un ligero enriquecimiento del  $d^{13}C$  durante la biodegradación aeróbica. El  $d^{13}C$  se incrementó de  $-25.5$  a  $-25.1‰$  (enriquecimiento de  $0.4 \pm 0.08‰$ ), en una sola muestra, en la que 95% del naftaleno había sido biodegradado. Los datos muestran con claridad que este enriquecimiento es sólo aparente después de que la mayor parte del naftaleno ha sido degradado (figura 1).

Otros investigadores, como O'Malley, Abranjano Jr. y Hellou (1994) también han observado muy pequeños enriquecimientos isotópicos en naftaleno en las etapas finales de su biodegradación aeróbica. Como comparación con otros compuestos, Stehmeier *et al.* (1999) encontraron un enriquecimiento isotópico de  $1.1‰$  durante la biodegradación aeróbica de benceno y Sherwood-Lollar *et al.* (1999) no encontraron ningún fraccionamiento significativo en tolueno durante su biodegradación aeróbica.

Este fraccionamiento isotópico puede no ser suficiente para demostrar la biodegradación de naftaleno en situaciones de campo, donde muchos otros procesos, como la advección, dispersión y adsorción también contribuyen a dis-

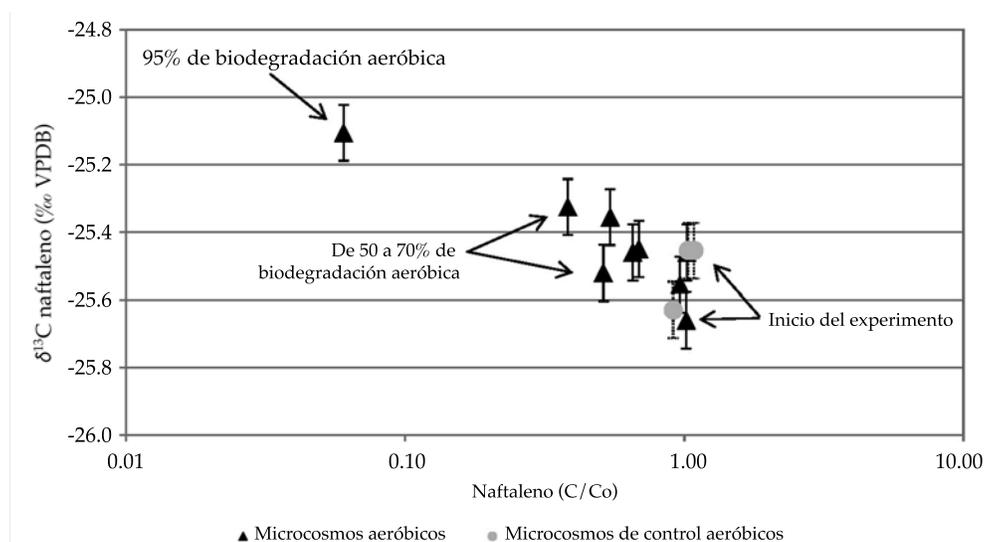


Figura 1.  $d^{13}C$  de naftaleno durante la biodegradación aeróbica en microcosmos. La concentración de naftaleno está normalizada y las barras de error representan el error analítico.

minuir las concentraciones de los contaminantes.

### *Microcosmos anaeróbicos*

Estos experimentos también se hicieron por triplicado. Los resultados muestran que después de 288 días, los microcosmos sin adiciones, con adición de  $\text{NO}_3^-$  y con adición de  $\text{SO}_4^{=}$  habían consumido, respectivamente, 30, 50 y 60% de naftaleno en promedio, en relación con los microcosmos de control. El naftaleno fue prácticamente consumido en su totalidad en cuatro de los microcosmos. La concentración de naftaleno en los controles estériles disminuyó tan sólo ligeramente durante el mismo tiempo; por lo tanto, la mayor parte de la disminución en la concentración de naftaleno en los microcosmos activos se atribuye a la biodegradación.

Las tasas de biodegradación se calcularon restando la pérdida de masa en los controles estériles. Para las tasas de biodegradación aparente de orden cero ( $\lambda_0$ ) se obtuvieron 0.26, 0.77 y 0.58 años<sup>-1</sup> para los microcosmos sin adiciones, con adición de  $\text{NO}_3^-$  y con adición de  $\text{SO}_4^{=}$ , respectivamente. Las tasa de biodegradación de primer orden ( $\lambda_1$ ) obtenidas fueron 0.51, 1.50 y 2.23 años<sup>-1</sup> para para los microcosmos sin adiciones, con adición de  $\text{NO}_3^-$  y con adición de  $\text{SO}_4^{=}$ , respectivamente. Estas tasas de biodegradación son considerablemente inferiores a las obtenidas para la degradación aeróbica. Blum *et al.* (2009) obtuvieron una  $\lambda_0$  de 1.39 años<sup>-1</sup>, similar a lo reportado en este estudio; sin embargo Agarry y Owabor (2011) reportan  $\lambda_0$  de 5 a 31 años<sup>-1</sup>.

En los microcosmos anaeróbicos también se analizaron las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{SO}_4^{=}$  para monitorear su actividad como receptores de electrones. Los resultados muestran que la disminución en la concentración de naftaleno en los microcosmos con adición de  $\text{SO}_4^{=}$  se correlaciona con una baja en la concentración de  $\text{SO}_4^{=}$  (datos no mostrados). Esto evidencia que la biodegradación de naftaleno se produjo en un medio reductor de sulfatos. De la misma manera, la disminución en la concentración de naftaleno en los microcosmos con adición de  $\text{NO}_3^-$  también se correlaciona con una merma en

la concentración de  $\text{NO}_3^-$  (datos no mostrados), evidenciando que la biodegradación de naftaleno se produjo bajo condiciones desnitrificantes.

Tomando en cuenta los resultados de la biodegradación de naftaleno, se analizaron 20 muestras para  $\text{d}^{13}\text{C}$  provenientes de los microcosmos. Los resultados muestran que bajo condiciones desnitrificantes, el  $\text{d}^{13}\text{C}$  de naftaleno aumentó de -25.2 a -23.9‰ (enriquecimiento de  $1.3 \pm 0.3\%$ ) después de una biodegradación de 95% del naftaleno (figura 2). Dicho fraccionamiento significa que bajo condiciones desnitrificantes en situaciones de campo, este efecto pudiera no ser apreciado con facilidad.

Para los microcosmos sin adiciones se detectó un ligero enriquecimiento en  $\text{d}^{13}\text{C}$  de naftaleno de -25.2 a -24.5‰ (enriquecimiento de  $0.7 \pm 0.3\%$ ) después de una biodegradación de un 65%. En este experimento no se perciben cambios significativos en el  $\text{d}^{13}\text{C}$  de naftaleno durante su biodegradación y no se observa ningún microcosmo con un  $\text{d}^{13}\text{C}$  estadísticamente diferente.

Richnow *et al.* (2003) encontraron un fraccionamiento isotópico en naftaleno de 1.2‰ en un acuífero anaeróbico. Sin embargo Kelley, Coffin y Mueller (1998) analizaron el  $\text{d}^{13}\text{C}$  de varios HAPs (incluido el naftaleno) en un acuífero con condiciones anaeróbicas. En sus datos de su campo se aprecia un muy pequeño enriquecimiento en el  $\text{d}^{13}\text{C}$  de naftaleno, sin embargo no le dan importancia, quizás debido a la incertidumbre de un enriquecimiento tan bajo. Los resultados de este estudio están de acuerdo con los resultados de Kelley *et al.* (1998).

### **Conclusiones**

Los microcosmos aeróbicos muestran que el naftaleno se degradó aeróbicamente en menos de 60 horas. Las tasas de biodegradación calculadas fueron  $\lambda_1 = 2.4 \text{ d}^{-1}$  y  $\lambda_0 = 0.72 \text{ d}^{-1}$ . El  $\text{d}^{13}\text{C}$  se incrementó de -25.5 a -25.1‰ (enriquecimiento de  $0.4 \pm 0.08\%$ ) en una sola muestra, en la que 95% del naftaleno había sido biodegradado. Este resultado fue estadísticamente diferente de otras tres muestras con menor grado de biodegrada-

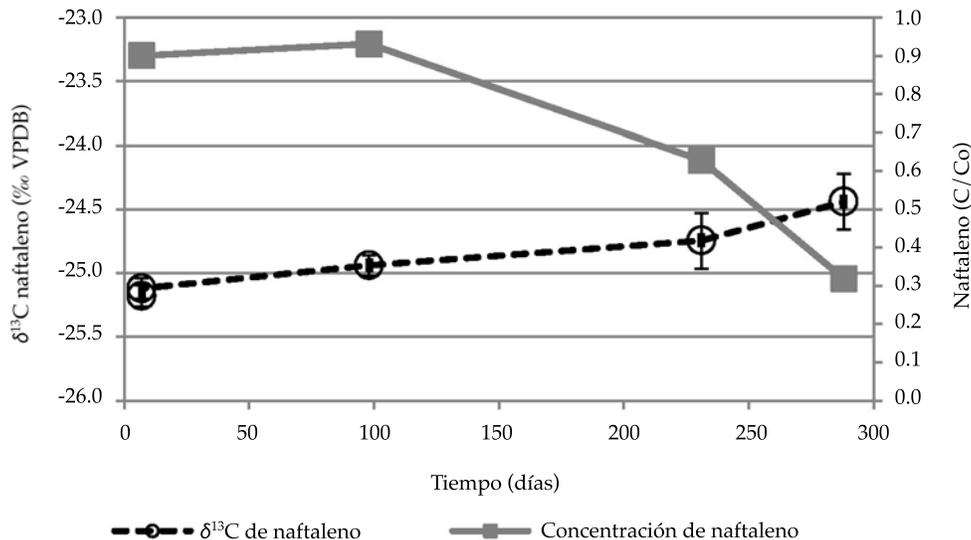


Figura 2.  $\delta^{13}\text{C}$  de naftaleno durante la biodegradación anaeróbica en microcosmos en condiciones de desnitrificación (adición de  $\text{NO}_3^-$ ). La concentración de naftaleno está normalizada y las barras de error representan el error analítico.

ción. El factor de enriquecimiento ( $e$ ) para la biodegradación aeróbica según la destilación de Rayleigh fue de -0.16.

Los microcosmos anaeróbicos muestran que después de 288 días, los microcosmos sin adiciones, con adición de  $\text{NO}_3^-$  y con adición de  $\text{SO}_4^{2-}$  habían consumido, respectivamente, 30, 50 y 60% de naftaleno en promedio, en relación con los microcosmos de control. Las tasas de biodegradación calculadas para  $\lambda_0$  fueron 0.26, 0.77 y 0.58 años<sup>-1</sup> para los microcosmos sin adiciones, con adición de  $\text{NO}_3^-$  y con adición de  $\text{SO}_4^{2-}$ , respectivamente. Para los mismos casos,  $\lambda_1$  fue 0.51, 1.50 y 2.23 años<sup>-1</sup>.

Bajo condiciones desnitrificantes, el  $\delta^{13}\text{C}$  de naftaleno aumentó de -25.2 a -23.9‰ (enriquecimiento de  $1.3 \pm 0.3\text{‰}$ ) después de una biodegradación de 95% del naftaleno, mientras se obtuvo un  $e$  de -0.3. Para los controles estériles, los valores  $\delta^{13}\text{C}$  demostraron ser estadísticamente iguales. Para los microcosmos sin adiciones se detectó un ligero enriquecimiento en  $\delta^{13}\text{C}$  de naftaleno de -25.2 a -24.5‰ (enriquecimiento de  $0.7 \pm 0.3\text{‰}$ ) después de una biodegradación de un 65% (después de 288 días), con  $e$  de -0.62.

Para los microcosmos en condiciones reductoras de  $\text{SO}_4^{2-}$  no se perciben cambios significativos en el  $\delta^{13}\text{C}$  de naftaleno durante su biodegradación y no se observa ningún microcosmo con un  $\delta^{13}\text{C}$  estadísticamente diferente.

El enriquecimiento isotópico observado durante las biodegradaciones aeróbica y anaeróbica de naftaleno, aunque pequeño, es estadísticamente significativo. Sin embargo, este enriquecimiento isotópico puede no ser suficiente para demostrar la biodegradación de naftaleno en situaciones de campo, donde muchos otros procesos, como la advección, dispersión y adsorción, también contribuyen a disminuir las concentraciones de los contaminantes.

## Agradecimientos

El autor externa su más profundo agradecimiento a los doctores Jim Barker y Ramón Aravena de la Universidad de Waterloo, Canadá, por todo su apoyo para la realización de estos experimentos. Los análisis isotópicos fueron realizados en el Laboratorio de Isotopía Ambiental (Environmental Isotope Lab) de la Universidad de Waterloo.

## Referencias

- Agarry, S. E., & Owabor, C. N. (2011). Anaerobic Bioremediation of Marine Sediment Artificially Contaminated with Anthracene and Naphthalene. *Environmental Technology*, 13(12), 1375-1381.
- Ahad, J. M. E., Sherwood-Lollar, B., Edwards, E. A., Slater, G. F., & Sleep, B. E. (2000). Carbon Isotope Fractionation during Anaerobic Biodegradation of Toluene: Implications for Intrinsic Bioremediation. *Environmental Science and Technology*, 34(5), 892-896.
- Al-Bashir, B., Cseh, T., Leduc, R., & Samson, R. (1990). Effect of Soil/Contaminant Interactions on the Biodegradation of Naphthalene in Flooded Soil under Denitrifying Conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34, 414-419.
- Bloom, Y., Aravena, R., Hunkeler, D., Edwards, E., & Frappe, S. K. (2000). Carbon Isotope Fractionation during Microbial Dechlorination of Trichloroethene, Cis-1,2-Dichloroethene, And Vinyl Chloride: Implications for Assessment of Natural Attenuation. *Environmental Science and Technology*, 34(13), 2768-2772.
- Blum, P., Hunkeler, D., Weede, M., Beyer, C., Grathwohl, P., & Morasch, B. (2009). Quantification of Biodegradation for O-Xylene and Naphthalene Using First Order Decay Models, Michaelis-Menten Kinetics and Stable Carbon Isotopes. *Journal of Contaminant Hydrology*, 105, 118-130.
- Clark, I., & Fritz, P. (1997). *Environmental Isotopes in Hydrogeology* (328 pp.). Boca Ratón, USA: Lewis Publishers.
- Ehrlich, G. G., Goerlitz, D. F., Godsy, E. M., & Hult, M. F. (1982). Degradation of Phenolic Contaminants in Ground Water by Anaerobic Bacteria: St. Louis Park, Minnesota. *Ground Water*, 20(6), 703-710.
- Environment Canada (1993). Creosote-Impregnated Waste Materials. Priority Substance List Assessment Report (23 pp.). Environment Canada. (<https://www.ec.gc.ca/toxiques-toxics/Default.asp?lang=En&n=5018787E-1>)
- Fetter, C. W. (1993). *Contaminant Hydrogeology* (458 pp.). New York: MacMillan Publishing Company.
- Heitkamp, M. A., & Cerniglia, C. E. (1989). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by a Mycobacterium Sp. In a Microcosm Containing Sediment and Water from a Pristine Ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), 1968-1973.
- Hunkeler, D., Aravena, R., & Butler, B. J. (1999). Monitoring Microbial Dechlorination of Tetrachloroethene (PCE) in Groundwater Using Compound-Specific Stable Carbon Isotope Ratios: Microcosm and Field Studies. *Environmental Science and Technology*, 33(16), 2733-2738.
- Iturbe, R., & Silva, A. (1989). Revisión bibliográfica sobre contaminación de suelos y acuíferos. *Ingeniería Hidráulica en México* (ahora *Tecnología y Ciencias del Agua*), 4(3), 51-56.
- Kelley, C. A., Coffin, R. B., & Mueller, J. G. (1998). Stable Isotope Analyses – An Innovative Technique to Monitor Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons. *Geotechnical News*, 16(2), 20-24.
- Kleemann, R., & Meckenstock, R. U. (2011). Anaerobic Naphthalene Degradation by Gram-Positive, Iron-Reducing Bacteria. *FEMS Microbial Ecology*, 78, 488-496.
- Lesser-Carrillo, L. E. (2006). Situación actual del MTBE (metal terbutil éter) en sistemas acuíferos. *Ingeniería Hidráulica en México* (ahora *Tecnología y Ciencias del Agua*), 21(2), 117-123.
- Lesser, L. E., Johnson, P. C., Aravena, R., Spinnler, G., Bruce, C., & Salanitro, J. (2008). An Evaluation of Compound-Specific Isotope Analyses for Assessing the Biodegradation of MTBE at Port Hueneme, CA., *Environmental Science & Technology*, 42(17), 6637-6643.
- Maillacheruvu, K. Y., & Pathan, I. A. (2009). Biodegradation of Naphthalene, Phenanthrene and Pyrene under Anaerobic Conditions. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 44(13), 1315-1326.
- Mihelcic, J. R., & Luthy, R. G. (1998). Microbial Degradation of Acenaphthene and Naphthalene under Denitrification Conditions in Soil-Water Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(5), 1188-1198.
- O'Malley, V. P., Abrajano Jr., T. A., & Hellou, J. (1994). Determination of the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Ratios of Individual PAH from Environmental Samples: Can PAH Sources be Apportioned? *Organic Geochemistry*, 21(6-7), 809-822.
- Richnow, H. H., Annweiler, E., Michaelis, W., & Meckenstock, R. U. (2003). Microbial In Situ Degradation of Aromatic Hydrocarbons in a Contaminated Aquifer Monitored by Carbon Isotope Fractionation. *Journal of Contaminant Hydrology*, 65, pp. 101-120.
- Rockne, K. J., & Strand, S. E. (1998). Biodegradation of Bicyclic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Anaerobic Enrichments. *Environmental Science and Technology*, 32(24), 3962-3967.
- Sherwood-Lollar, B., Slater, G. F., Ahad, J., Sleep, B., Spivack, J., Brenan, M., & Mackenzie, P. (1999). Contrasting Carbon Isotope Fractionation during Biodegradation of Trichloroethylene and Toluene: Implications for Intrinsic Bioremediation. *Organic Geochemistry*, 30, 813-820.
- Stehmeier, L. G., Francis, M., Jack, T. R., Diegor, E., Winsor, L., & Abrajano Jr., T. A. (1999). Field and In Vitro Evidence for In-Situ Bioremediation using Compound-Specific  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Ratio Monitoring. *Organic Geochemistry*, 30, 821-833.
- Thierrin, J., Davis, G. B., & Barber, C. (1995). A Ground-Water Tracer Test with Deuterated Compounds for Monitoring In Situ Biodegradation and Retardation of Aromatic Hydrocarbons. *Ground Water*, 33(3), 469-475.
- USEPA (1992). *Contaminants and Remedial Options at Wood Preserving Sites* (pp. 152). Washington, DC: Office of Research and Development, EPA/600/R-92/182.

Van De Velde, K. D., Marley, M. C., Studer, J., & Wagner, D. M. (1995). Stable Carbon Isotope Analysis to Verify Bioremediation and Bioattenuation (pp. 241-257). In R.E. Hinchee, G. S. Douglas, & S. K. Ong (Eds.). *Monitoring and Verification of Remediation*. Columbus, USA: Battelle Press.

## Dirección institucional del autor

*Dr. Luis E. Lesser-Carrillo*

Director de la Carrera de Ingeniería Civil  
Departamento de Ingeniería Civil  
División de Ingeniería y Arquitectura  
Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de  
Monterrey, Campus Querétaro  
Av. Epigmenio González 500, Fraccionamiento San Pablo  
76000, Querétaro, Querétaro, MÉXICO  
Teléfono: +52 (442) 2383 100, extensión 3512  
lelesserc@itesm.mx