



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS



**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE UN SUELO
CONTAMINADO CON PETRÓLEO DURANTE EL PROCESO DE
BIORREMEDIACIÓN**

**TRABAJO RECEPCIONAL BAJO LA MODALIDAD DE
“TESIS”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
“MAESTRO EN CIENCIAS EN QUÍMICA APLICADA”**

PRESENTA

VIRIDIANA CÓRDOVA BAUTISTA

DIRECTOR

DR. JUAN CARLOS ARÉVALO PÉREZ

CO-DIRECTOR

DRA. MARCIA EUGENIA OJEDA MORALES

CUNDUACÁN, TABASCO

AGOSTO 2021



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ciencias
Básicas



DIRECCIÓN

10 de agosto de 2021

**ING. VIRIDIANA CORDOVA BAUTISTA
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN QUÍMICA APLICADA
P R E S E N T E.**

Por medio de la presente y de la manera más atenta, me dirijo a Usted para hacer de su conocimiento que proceda a la impresión del trabajo titulado " **ESTUDIOS DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICA DE UN SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN**" en virtud de que reúne los requisitos para presentar el EXAMEN PROFESIONAL para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Química Aplicada.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE

**DR. GERARDO DELGADILLO PIÑÓN
DIRECTOR**



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS BÁSICAS

DR'GDP/M'NLBA
C.c.p.- Archivo

CARTA DE AUTORIZACIÓN

El que suscribe autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que se utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **“Estudio de las propiedades fisicoquímicas de un suelo contaminado con petróleo durante el proceso de biorremediación”**, del cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionado, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en Cunduacán, Tabasco el día diecinueve de agosto de 2021.

AUTORIZÓ



ING. VIRIDIANA CÓRDOVA BAUTISTA

Tesista

Dedicatoria

A MIS PADRES por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y por ayudarme con los recursos necesarios para iniciar este proyecto. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi empeño y mi coraje por conseguir mis objetivos.

A mis hermanos por formar parte importante en mi vida.

Viridiana Córdova Bautista

Agradecimientos

EN PRIMER LUGAR, agradezco a DIOS, que sin el nada de esto sería posible.

Gracias a la máxima casa de estudios la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por brindarme la oportunidad de formarme académicamente como un profesionista, dándome conocimientos y permitiéndome ponerlos en práctica.

A la Dra. Marcia Eugenia Ojeda Morales por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por brindarme su confianza y apoyo para llevar a cabo el trabajo de investigación.

A la Dra. Yolanda Córdova Bautista por brindarme siempre su ayuda y conocimiento para poder sacar adelante la investigación, por aclarar mis dudas, gracias.

Al DR. Juan Carlos Arévalo Pérez por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y brindarme su apoyo.

A mis padres y hermanos por apoyarme en mis proyectos profesionales.

A mis compañeros de laboratorio y amigos. la ing. Eli Estefanía, el ing. Claudio y el biólogo Uri Marcial, por su compañía y apoyo.

A la comisión revisora, Gracias por su dedicación y observaciones a lo largo de la revisión de este trabajo.

Viridiana Córdova Bautista

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	1
CAPÍTULO 1.....	2
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
HIPÓTESIS.....	4
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. El suelo.....	5
2.1.1. Clasificación de los suelos.....	6
2.1.2. La Base Referencial Mundial del Recurso Suelo (WRB).....	7
2.1.3. Unidades de suelo en México.....	9
2.1.4. Los suelos del estado de Tabasco.....	11
2.2. Suelos de zonas petroleras.....	12
2.2.1. La industria petroquímica en México.....	13
2.2.2. Naturaleza y composición de los hidrocarburos derivados del petróleo.....	14
2.2.2.1. Impacto ambiental de los hidrocarburos del petróleo.....	15
2.3. Papel de la biotecnología en la biorremediación.....	17
2.3.1. Mecanismos de degradación de hidrocarburos de petróleo.....	18
2.3.2. Remediación de suelos contaminados.....	19
2.3.3. Métodos de tratamiento biológico.....	20
2.3.3.1. Tecnologías <i>in situ</i>	20
2.3.3.2. Tecnologías <i>ex situ</i>	22
2.3.4. Factores que influyen en la biorremediación de los Hidrocarburos del petróleo (HP).....	23
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y METODOS.....	25
3.1. ETAPA I. Trabajo de campo.....	27
3.1.1. Localización y descripción del área de estudio.....	27
3.1. 2. Toma de muestra de suelo contaminado con petróleo.....	28
3.1.3. Desarrollo del perfil de suelo.....	29
3.2. ETAPA II: caracterización fisicoquímica del suelo.....	31

3.2.1. Caracterización fisicoquímica del perfil de suelo	31
3.2.1.1. Nitrogeno total	32
3.2.1.2. Fosforo aprovechable	33
3.2.1.3. pH y conductividad eléctrica	33
3.2.1.4. Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	34
3.2.1.5. Textura del suelo por el procedimiento del Bouyoucos	35
3.2.1.6. Densidad real por el método del picnómetro	36
3.2.1.7. Densidad aparente.....	38
3.2.2. Caracterización fisicoquímica del suelo contaminado	38
3.2.2.1. Determinación de los suelos-hidrocarburos fracción pesada por extracción y gravimetría establecido en la NMX-AA-134-SCFI-2006	39
3.2.2.2. Determinación del contenido de humedad del suelo por gravimetría (NOM-021-SEMARNAT-2000)	42
3.2.2.3. Análisis por espectrofotometría infrarrojo (FTIR) para evaluar la biodegradación de hidrocarburos.....	43
3.2.2.4. Determinación de los suelos-hidrocarburos fracción media por cromatografía de gases con detector de ionización de flama establecido en la NMX-AA-145-SCFI-2008.44	
3.2.2.5. Análisis elemental del suelo por espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS).....	46
3.3. ETAPA III: Aislamiento e identificación de bacterias degradantes de petróleo.....	47
3.3.1. Medio de cultivo.....	47
3.3.1.1. Aislamiento de las cepas bacterianas	47
3.3.2. Caracterización morfológica a nivel colonia	49
3.3.3. Caracterización fenotípica de los aislados bacterianos que degradan el petróleo	49
3.3.3.1. Tinción de Gram	49
3.3.3.2. Pruebas bioquímicas API 20 E	50
3.3.3.3. Morfología celular	51
3.3.4. Evaluación de la producción de biomasa bacteriana.....	52
3.3.4.1. Establecimiento de los biorreactores	52
3.3.4.2. Preparación del inoculo	53
3.3.4.3. Diseño experimental para evaluar la producción de biomasa microbiana	54
3.3.4.4. Establecimiento de las unidades experimentales.....	55
3.3.5. Curva de calibración de la biomasa	55
3.3.5.1. Modelamiento cinético del crecimiento microbiano	57
3.3.6. Métodos de detección de la capacidad para producir biotensioactivos	58
3.3.6.1. Actividad hemolítica	58

3.3.6.2. Gota colapsada.....	59
3.3.6.3. Difusión del diámetro de la gota de aceite	59
3.3.6.4. Método de Índice de emulsificación (I.E%)	60
3.4. ETAPA IV: Preparación de las unidades experimentales para biorremediación..	61
3.4.1. Diseño experimental	62
3.4.2. Producción y caracterización del biotensioactivo	63
3.4.3. Identificación de lípidos polares	66
3.4.4. Determinación de grupos funcionales por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR).....	67
3.5. ETAPA V: Análisis estadístico.....	67
CAPITULO 4. Resultados y discusión.....	68
4.1. Estudio de las características fisicoquímicas del perfil edafológico.....	68
4.1.1. Propiedades físicas y químicas del suelo.....	68
4.1.2. Designación de horizontes genéticos.....	74
4.1.3. Horizontes y propiedades de diagnóstico.....	74
4.1.4. Clasificación del suelo	75
4.2. Caracterización fisicoquímica del suelo contaminado.....	77
4.3. Identificación de las bacterias degradadoras de petróleo.....	78
4.3.1. Caracterización morfológica a nivel colonia	79
4.3.2. Caracterización fenotípica de los aislados bacterianos	79
4.4. Evaluación de la cinética de crecimiento de las cepas bacterianas.....	81
4.4.1. Efecto de las relaciones C/N sobre la tasa máxima de crecimiento microbiano... 83	
4.5. Cepas con capacidad biotensioactiva y propiedad emulsificante.....	85
4.6. Biodegradación del petróleo.....	88
4.6.1. Identificación de Hidrocarburos Fracción pesada mediante análisis FT-IR	90
4.6.2. Cromatografía de los hidrocarburos fracción media	92
4.6.3. Análisis elemental del suelo biorremediado	96
4.6.4.1. Temperatura de biorremediación	97
4.6.4.2. pH de biorremediación	99
4.6.4.3. Conductividad eléctrica (CE) durante la biorremediación.....	101
4.6.4.4. Densidad aparente / densidad real	103
4.6.4.5. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) durante la biorremediación.....	104
4.7. FT-IR del biotensioactivo.....	107
4.7.1. Identificación de lípidos polares	108
CAPITULO 5.....	109

Conclusiones	109
Referencias bibliográficas	111
ANEXOS	129

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Unidades de suelos más importantes de México, de acuerdo con la clasificación internacional FAO/UNESCO/ISRIC _____	10
Tabla 2. Clase y características de hidrocarburos de petróleo (Ossai et al., 2020) _____	15
Tabla 3. Parámetros analizados al perfil de suelo libre de contaminantes _____	32
Tabla 4. Parámetros analizados al suelo contaminado _____	39
Tabla 5. Composición del caldo nutritivo, productor del crecimiento microbiano _____	53
Tabla 6. Diseño experimental unifactorial para evaluar la producción de biomasa bacteriana en los tratamientos _____	54
Tabla 7. Composición del medio con fertilizante NPK _____	55
Tabla 8. Diseño unifactorial completamente al azar para evaluar la biodegradación del petróleo _____	62
Tabla 9. Composición química de los diferentes horizontes de un suelo cultivado con plátano macho (Musa balbisiana), en la rancharía Huapacal 3ra sección, Cunduacán, Tabasco _____	70
Tabla 10. Composición química de los diferentes horizontes de un suelo cultivado con plátano macho (Musa balbisiana), en la rancharía Huapacal 3ra sección, Cunduacán, Tabasco _____	71
Tabla 11. Propiedades físicas de los diferentes horizontes del perfil _____	73
Tabla 12. Perfil. Unidad representativa Fluvisol Eútrico (FLeu) _____	76
Tabla 13. Propiedades fisicoquímicas del suelo contaminado _____	77
Tabla 14. Caracterización macroscópica de las bacterias aisladas del suelo contaminado con petróleo _____	79
Tabla 15. Capacidad para producir biotensioactivo cepa B1 _____	86
Tabla 16. Capacidad para producir biotensioactivo cepa B3 _____	86
Tabla 17. Capacidad para producir biotensioactivo cepa B5 _____	87
Tabla 18. Concentraciones de hidrocarburos identificados en la muestra B3 a los cero días _____	93
Tabla 19. Concentraciones de hidrocarburos identificados en la muestra B3 a los 60 días _____	94
Tabla 20. Elementos presentes en el suelo _____	96
Tabla 21. Elementos presentes en el suelo _____	96
Tabla 22. Datos de temperatura Vs eficiencia de biodegradación de los cinco tratamientos durante la biorremediación. _____	98
Tabla 23: Datos de pH Vs eficiencia de biodegradación de los cinco tratamientos durante la biorremediación _____	100
Tabla 24: Datos de conductividad eléctrica Vs eficiencia de biodegradación de los cinco tratamientos durante la biorremediación _____	102
Tabla 25: Datos de UFC Vs eficiencia de biodegradación de los cinco tratamientos durante la biorremediación _____	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Superficie aproximada de los grupos mayores de los suelos de Tabasco (Palma et al., 2007)	12
Figura 2. Esquematación de: transporte de nutrientes, agua y microorganismos en un suelo no contaminado (Yu et al., 2005; Maier, 2000; García-Rivero, 2003)	13
Figura 3. Mecanismos de degradación de hidrocarburos de petróleo (Ossai et al., 2020)	19
Figura 4. Factores que afectan la biodegradación de los hidrocarburos de petróleo (Al-Hawash et al., 2018)	24
Figura 5. Metodología para la remediación del suelo contaminado con petróleo	26
Figura 6. Ubicación del área de estudio por georreferenciación	27
Figura 7. Derrame de petróleo en platanales de la ranchería Huapacal 2da sección del municipio de Cunduacán Tabasco, el 15 de enero del 2018	28
Figura 8. Toma de muestra de suelo contaminado	29
Figura 9. Determinación y descripción del perfil de suelo	29
Figura 10. Caracterización de algunas propiedades del suelo en campo. a) Color; b) Consistencia en mojado; c) Textura; d) Materia orgánica con H ₂ O ₂ ; e) Presencia de microorganismos	30
Figura 11. Proceso de preparación de muestra: a) Secado y homogeneizado; b) molienda; c) Tamizado	31
Figura 12. Lectura del pH del suelo contaminado	33
Figura 13. Muestras de suelo contaminado para conductividad eléctrica	34
Figura 14. Triangulo de texturas	36
Figura 15. Triturado de la muestra de suelo con Na ₂ SO ₄ anhidro; b) Muestras de suelo con n-Hexano; c). Sonicado de las muestras	39
Figura 16. a) Filtrado del extracto; b) Destilación del disolvente; c) Material Extraíble con n-Hexano (MEH)	40
Figura 17. a) Filtrado del extracto con silica gel; b) Concentración de hidrocarburos fracción pesada	41
Figura 18. a) Pesado de la muestra en la caja petri; b) Muestras llevadas al horno para sequedad a 105 °C	43
Figura 19. Espectrofotómetro FT-IR Shimadzu IRAffinity-1	44
Figura 20. a) Muestras de HFM en viales de 2 mL; b) Cromatógrafo de gases (GCMS-QP2010, Shimadzo)	45
Figura 21. a) Portamuestras; b) Software InTouchScope™, microscopio electrónico de barrido JEOL Modelo 6010-LAB)	46
Figura 22. Medio de sales minerales (MSM+ suelo + hidrocarburo)	47
Figura 23. a) Biorreactor con medio sales minerales (MSM + suelo + petróleo); b) Enriquecimiento con medio fresco al biorreactor	48
Figura 24. Proceso de sembrado a) Adición de hidrocarburo al MSM; b) Homogeneizado de MSM + hidrocarburo; c) Vaciado de MSM en palcas; d) Rastrillado de alícuota de la solución madre	48
Figura 25. Caracterización macroscópica a nivel colonia (Koneman & Allen, 2008)	49
Figura 26. Tinción de Gram de cepas bacterianas: a) Preparación del frotis; b) Adición de la solución de cristal violeta; c) Adición de la solución yodo-yodurada de lugol y d) Adición de solución de safranina	50
Figura 27. Galería API 20E con suspensión bacteriana a los 48 días de incubación	51
Figura 28. Preparación de las muestras para micrografías	52
Figura 29. Diseño del biorreactor	53
Figura 30. Curva de calibración de biomasa en peso seco	56
Figura 31. Preparación y vaciado de las placas de agar sangre	59
Figura 32. Gotas colapsadas sobre la tira de Parafilm	59

Figura 33. Difusión del diámetro de la gota de aceite; a) B1; b) B3; c) B5	60
Figura 34. Emulsificación de las muestras del caldo libre de células (B1, B3, B5)	60
Figura 35. a) Adición del caldo de cultivo al suelo; b) establecimiento de las unidades experimentales	61
Figura 36. Establecimiento del biorreactor con el Medio de cultivo	63
Figura 37. Centrifugación del caldo de cultivo después de las 72 h de incubación	64
Figura 38. a) Precipitación de los sólidos mezcla, caldo-acetona; b) Eliminación de la acetona en el evaporador rotatorio	65
Figura 39. Separación de primera fracción extraída mezclada con metanol	65
Figura 40. a) Cepas bacterianas cultivadas en MSM+Agar+petróleo, del sitio impactado con petróleo; b) Estriado de cepa bacteriana	78
Figura 41. a) bacteria B1, Gram negativa, forma de bacilos bordes redondos; b) bacteria B3, Gram negativa, forma de cocobacilos; c) bacteria B5, Gram negativa, forma de cocobacilos	80
Figura 42. Ajuste de los datos del crecimiento; a) B520, b) B525	81
Figura 43. Ajuste de los datos del crecimiento; a) B320, b) B325, c) B125, d) B120	82
Figura 44. Tasas máximas de crecimiento (μ_{max})	84
Figura 45. Hemólisis beta en la cepa B5	85
Figura 46. Eficiencia de biodegradación (%) de los tratamientos B1, B3, B5, Con y Testg	89
Figura 47. Eficiencia (%) de los tratamientos a los 60 días de la biorremediación	90
Figura 48. FT-IR de hidrocarburos fracción pesada del tratamiento B360 Vs cero días	91
Figura 49. Cromatograma del tratamiento B3 al día cero	92
Figura 50. Cromatograma del tratamiento B3 al día 60	94
Figura 51. Micrografías de los elementos con mayor masa (%) en el suelo a los cero días	96
Figura 52. Micrografías de los elementos con mayor masa (%) en el suelo a los 60 días	96
Figura 53. Valores de temperatura durante la biorremediación de los cinco tratamientos (B1, B3, B5, Con y Testg)	98
Figura 54. Valores de pH durante la biorremediación de los cinco tratamientos (B1, B3, B5, Con y Testg)	100
Figura 55. Valores de CE durante la biorremediación de los cinco tratamientos (B1, B3, B5, Con y Testg)	102
Figura 56. Valores de densidad real y aparente a los cero y 60 días de la biorremediación en los cinco tratamientos (B1, B3, B5, Con y Testg)	103
Figura 57. Unidades Formadoras de Colonias durante la biorremediación de los cinco tratamientos (B1, B3, B5, Con y Testg)	105
Figura 58. Unidades Formadoras de Colonias al día 60 de la biorremediación	106
Figura 59. Espectro FT-IR de biotensioactivo producido por la cepa B3	107
Figura 60. Lípidos polares asociados a la acción tensoactiva. a) Lipopéptidos; b) Fosfolípidos; c) glicopéptidos	108

ABREVIATURAS

ASEA	Agencia de Seguridad, Energía y Ambiente
BTEX	Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xileno
C/N	Relación Carbono Nitrogeno
CIC	Capacidad de Intercambio Catiónico
Con	Consortio
DO	Densidad Óptica
FT-IR	Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (siglas en ingles)
HAP	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
HFM	Hidrocarburos Fracción Media
HFP	Hidrocarburos Fracción Pesada
HTP	Hidrocarburos Totales del Petróleo
IE	Índice de emulsificación
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IUSS	Unión Internacional de ciencias del suelo (Siglas en ingles)
Kg	Kilogramo
Km	Kilometro
MEH	Material Extraíble con Hexano
mg	Miligramo
MSM	Medio de Sales Minerales
Nm	nanómetro
NPK	Nitrógeno, Fosforo, Potasio
rpm	repeticiones por minuto
SAGARPA	Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación
SGT-MEH	Material Extraíble con Hexano Tratado con Silica Gel
Testg	Testigo
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
WRB	Base Referencial Mundial del Recurso Suelo (Siglas en ingles)

RESUMEN

El estado de Tabasco forma parte de la zona petrolera continental más importante de México, se estima que hay 2,017 km de ductos en 26,894 hectáreas. El mal manejo de esta fuente no renovable durante su extracción, transporte y almacenamiento ha provocado que los suelos hayan sido impactados negativamente en las últimas décadas cambiando radicalmente su uso al variar propiedades fisicoquímicas. La implementación de un proceso de biorremediación utilizando bacterias del sitio contaminado con hidrocarburo mejora las condiciones del suelo. El sitio contaminado seleccionado para efectos de este trabajo se ubicó en la ranchería Huapacal 3ra sección, Cunduacán, Tabasco, situado en una región territorial con alta actividad petrolera. Para lograr la biodegradación de los hidrocarburos presentes en el suelo contaminado a $4607 \text{ mg. Kg}^{-1} \pm 11.26$ de HFP se implementó el proceso de biorremediación usando microorganismos autóctonos del sitio. En esta investigación se desarrolló un perfil edafológico el cual determinó la clasificación del suelo de estudio como *Fluvisol eutrico*. La selección de las cepas degradadoras de hidrocarburos se realizó utilizando medio de sales minerales específico para bacterias petrofílicas, la cual determinó tres cepas codificadas como B1, B3 y B5, de acuerdo con la caracterización fenotípica las tres cepas presentan una tinción Gram negativa con características pertenecientes a la especie *Pseudomonas* (B1 y B3) y *Azotobacter* (B5). La evaluación de la máxima tasa de crecimiento bacteriano usando el fertilizante Nitrofoska como fuente de nitrógeno determinó para B1 0.014 g/L a una $C/N= 25$, 0.020 y 0.032 g/L para B3 y B5 con $C/N= 20$. El ANOVA indicó que existen diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$), esto confirma lo descrito por otras investigaciones que a niveles bajos de nitrógeno se restringe el crecimiento bacteriano, pero activa la capacidad metabólica para la producción de biosurfactante. En la evaluación de bacterias productoras de biotensioactivos las tres cepas registraron un índice de emulsión de 80 y 100 %, igual para la difusión de la gota de aceite se registraron resultados positivos durante la fase estacionaria del crecimiento microbiano. Los resultados de la biodegradación de los hidrocarburos totales del petróleo mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$, Tukey) lo cual permitió seleccionar al mejor tratamiento B360 con $96.3 \pm 0.1 \%$ de eficiencia.

En este proceso de biodegradación el suelo mostró cambios en las propiedades fisicoquímicas; pH, conductividad eléctrica, comunidad microbiana, densidad real y aparente, así como la porosidad del suelo, y la relación que existe con respecto a la degradación del contaminante. El análisis por espectroscopia FT-IR del biotensioactivo reveló la presencia de grupos peptídicos y carboxílicos, además por cromatografía en capa fina se determinó la presencia de glicopéptidos lo cual se asocia a la acción tensioactiva de los biosurfactantes.

Palabras claves: Biorremediación, hidrocarburos, hidrocarbonoclastas, edafológico, morfología, consorcio, *Fluvisol eutrico*.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Los suelos son sistemas naturales abiertos y complejos. Es un recurso natural fundamental para la producción agrícola a nivel global; desde el punto de vista ecológico representa un importante aporte a la cadena trófica. De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2007), en México existen 26 grupos de suelo reconocidos por el Sistema Internacional Base Referencial Mundial del Recurso Suelo (IUSS, 2007). En Tabasco existen 16 de estos grupos, los cuales se han visto afectados por las actividades productivas realizadas por el hombre. Los agroecosistemas localizados en algunas áreas petroleras del sureste de México están contaminados con petróleo, inclusive, en algunos sitios se han registrado concentraciones de 450,000 mg/kg (Domínguez *et al.*, 2011). Según datos proporcionados por la Agencia de Seguridad, Energía y Ambiente (ASEA, 2018) del año 2012-2018 se reportaron 388 derrames de petróleo correspondiente al 86.03 % del total de emergencias ambientales.

El mal manejo de esta fuente no renovable ha impactado negativamente los suelos cambiando radicalmente su uso al variar propiedades fisicoquímicas como: densidad, retención de humedad, pH, porosidad, capacidad de intercambio catiónico, materia orgánica, nutrientes, adición de macro y microelementos, entre otras (Souza *et al.*, 2014; PEMEX, 2013, Zavala *et al.*, 2012). Para contrarrestar este fenómeno, se han desarrollado tecnologías basadas en procesos físicos, químicos y biológicos. Generalmente, los métodos biológicos son especialmente utilizados debido a su sustentabilidad (Zhang *et al.*, 2011), entre los más empleados sobresale la biorremediación, este proceso está basado en la aplicación de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) capaces de utilizar al petróleo como su única fuente de energía. En este contexto, existen diversas investigaciones enfocadas a la disminución del petróleo en suelos, pero no aportan suficiente información sobre los cambios en sus propiedades fisicoquímicas después de una biorremediación. Debido al poco conocimiento en este campo, la presente investigación tiene como objetivo monitorear las propiedades fisicoquímicas de un suelo contaminado con petróleo

durante el proceso de biorremediación, el cual consiste en la aplicación de bacterias nativas del suelo contaminado con capacidad de degradar hidrocarburos del petróleo y producir biotensioactivos. Para tener mejores resultados en el crecimiento de biomasa bacteriana se implementó un medio de cultivo con fertilizante NPK como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono. Para determinar la producción de biotensioactivos se emplearon métodos específicos (gota colapsada, difusión de la gota de aceite, actividad hemolítica e índice de emulsificación) y se monitoreó cada ocho horas la producción biotensioactiva durante toda la fase estacionaria con el fin de agregar las bacterias al suelo contaminado al tiempo (h) en que presentan la mayor capacidad de producir biotensioactivos y así mantener biodisponible el petróleo para su biodegradación.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar en función del tiempo, las características fisicoquímicas *ex situ* de un suelo del estado de Tabasco, México, impactado con petróleo durante la biorremediación, utilizando bacterias petrofílicas, con capacidad de sintetizar biotensioactivos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar el tipo de suelo a través de sus propiedades físicas y químicas de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 y la base referencial mundial del recurso suelo
2. Obtener en condiciones *in vitro* cepas bacterianas, con capacidad de degradar petróleo y sintetizar biotensioactivos
3. Evaluar las propiedades fisicoquímicas del suelo sujeto de estudio durante su biorremediación.

HIPÓTESIS

Las cepas bacterianas nativas del suelo de Cunduacán Tabasco producen biotensioactivos que hacen biodisponible el petróleo y aumentan la eficiencia en su degradación.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1. El suelo

El suelo puede definirse como un cuerpo natural compuesto de sólidos (minerales y materia orgánica), líquidos y gases, ocupa un espacio y se caracteriza por tener horizontes o capas que se diferencian del material inicial como resultado de las adiciones, pérdidas, translocaciones y transformaciones de energía y materia, además de ser capaz de sostener las plantas en un ambiente natural (White, 2006). La formación de los suelos se debe a procesos mecánicos, químicos y biológicos se origina a partir de factores como el clima; material parental; organismos; relieve y tiempo. Los procesos corresponden a adiciones, transformaciones, translocaciones y pérdidas (Bonilla, 1996).

Para la formación de los suelos se ha requerido de un largo proceso evolutivo donde el primer paso fue la desintegración de las rocas superficiales bajo los efectos del intemperismo físico y químico, su transformación en partículas muy pequeñas de gran actividad fisicoquímica; al inicio estos agentes actúan solos, pero simultáneamente con los seres vivos, dieron como resultado final un conjunto de partículas de diversos tamaños y características químicas, ricas en elementos necesarios para la vida (Bonilla, 1996). Los fragmentos de roca descompuesta son los minerales. Los tipos de minerales presentes dependen fundamentalmente del tipo de roca y se clasifican de acuerdo con su tamaño en arcillas, limos y arenas. El contenido de cada tipo de mineral determina la clase de suelo y sus propiedades (Dalzell *et al.*, 1991).

El límite superior del suelo es el límite entre el suelo y el aire, aguas poco profundas, plantas vivas o materiales de plantas que no han empezado a descomponerse. Se considera que las áreas no tienen suelo si la superficie está cubierta en forma permanente por agua muy profunda (típicamente a más de 2.5 m) para no permitir el desarrollo de vegetación. Los límites horizontales del suelo son las áreas donde el suelo cambia a aguas profundas, áreas estériles, roca o hielo. En algunos lugares la separación entre el suelo y no suelo es tan gradual que no se pueden hacer distinciones claras. El límite inferior que separa al suelo del suelo subyacente es el

más difícil de definir. El suelo consiste de horizontes cercanos a la superficie terrestre que, en contraste con el material parental subyacente, han sido alterados por las interacciones del clima, relieve y organismos vivos sobre el tiempo (Claves para la Taxonomía de Suelos, 2014).

2.1.1. Clasificación de los suelos

Es común que el suelo en su límite inferior cambie a roca dura o materiales terrestres virtualmente desprovistos de animales, raíces u otras marcas de actividad biológica. Sin embargo, la profundidad inferior de la actividad biológica es difícil de establecer y con frecuencia es gradual. Para propósitos de clasificación, el límite inferior del suelo se fija de manera arbitraria a 200 cm. En suelos donde la actividad biológica o los procesos pedogenéticos actuales se extiendan a profundidades mayores de 200 cm, el límite inferior del suelo con propósitos de clasificación se mantiene a esa profundidad. En algunos casos los lechos rocosos débilmente cementados (materiales paralíticos, definidos posteriormente) se deben describir para diferenciar a series de suelos (en la sección de control de series, definida posteriormente), a pesar de que, en un sentido estricto, los materiales por debajo de un contacto paralítico no son considerados como verdaderos suelos. En áreas donde el suelo tenga horizontes delgados cementados que impiden el crecimiento de las raíces, la profundidad del suelo será hasta donde se localice el horizonte cementado más profundo, pero no hasta los 200 cm (Claves para la Taxonomía de Suelos, 2014).

Utilizan letras y números en varias combinaciones para designar horizontes y capas. Las mayúsculas se usan para designar los horizontes maestros o principales, las minúsculas se utilizan como subíndices para señalar características específicas del horizonte principal y los números son usados como subíndices para indicar subdivisión vertical dentro de un horizonte y como un prefijo para mostrar discontinuidades (Centro Interamericano de Fotointerpretación [CIAF], 1980). Los principales horizontes que pueden ser reconocidos según Lavelle y Spain (2005) y CIAF, (1980) son:

Horizonte "O": corresponde a una capa dominada por materiales orgánicos que generalmente se encuentra en la superficie del suelo (Epipedón).

Horizonte "A": se encuentra en la superficie cuando ha desaparecido el "O", o bien, por debajo de éste; se caracteriza por presentar acumulación de materia orgánica humificada, íntimamente mezclada con el material mineral del suelo; generalmente es el resultado de actividades de laboreo o pastoreo, así como de la actividad de los macro y microorganismos.

Horizonte "E": se caracteriza por presentar pérdidas generalmente de arcilla silicatada, aluminio o alguna combinación de estos que deja una concentración de partículas de cuarzo u otros minerales resistentes del tamaño de la arena y el limo. Una capa "E" se diferencia de un horizonte "A" por tener el color más claro y porque tiene por lo general menos materia orgánica.

Horizonte "B": es un horizonte mineral que se desarrolla por debajo de alguno de los horizontes anteriormente mencionados; generalmente se pierde el vestigio del material parental del suelo y se observan algunos de los siguientes rasgos: acumulaciones, remociones y/o recubrimientos.

Horizonte "C": es una capa muy poco afectada por procesos pedogenéticos; está formada por sedimentos como fragmentos de roca poco consolidados, acumulaciones de sílice, carbonatos, yeso, etc.

El horizonte "R" se reserva para las rocas duras, en las cuales se dificulta su excavación.

Horizontes transicionales: son aquellos que poseen características de un horizonte principal, pero con características subordinadas de otro, por ello se nombran con dos letras mayúsculas, por ejemplo, AB, EB, BE o BC.

La descripción del perfil del suelo, consiste en el análisis de sus características internas y externas en campo y de la recolección de muestras utilizando la norma NOM-021-RECNAT-2000, para determinar las diferentes propiedades del suelo, como los son química, física, microbiología y mineralogía, las cuales en conjunto determinan la fertilidad de los suelos.

2.1.2. La Base Referencial Mundial del Recurso Suelo (WRB)

La Base Referencial Mundial (WRB) está basada en la Leyenda (FAO-UNESCO, 1974) y la Leyenda Revisada (FAO, 1988) del Mapa Mundial de Suelos (FAO-UNESCO,

1971-1981). En 1980, la Sociedad Internacional de la Ciencia del Suelo (ISSS, desde el año 2002 la Unión Internacional de la Ciencia del Suelo, IUSS) formó la “Base Referencial Internacional para Clasificación de Suelos”, un Grupo de Trabajo para la posterior elaboración de un sistema de clasificación de suelos con base científica. Este Grupo de Trabajo se renombró como “Base Referencial Mundial del Recurso Suelo” en 1992. El Grupo de Trabajo presentó la primera edición de la WRB en 1998 (FAO, 1998) y la segunda edición en 2006 (IUSS Working Group WRB, 2006). En 1998, el Consejo de ISSS aprobó la WRB como su terminología oficialmente recomendada para nombrar y clasificar suelos.

La segunda edición de la WRB es un sistema para clasificar suelos. Poco después de su publicación, se detectó un incremento en la demanda para crear leyendas de mapas de suelo usando la WRB. Para tal efecto, fue publicada en 2010, la “Guía para la construcción de leyendas de mapas a pequeña escala con la WRB” <<http://www.fao.org/nr/land/soils/soil/wrb-documents/en/>>. Se recomienda para escalas de mapas de 1:250 000 o más pequeñas. La versión para la clasificación de suelos (2006/07) y la versión para la creación de leyendas de mapas (2010) se basan en las mismas definiciones, pero usan diferentes secuencias de calificadores y diferentes reglas para el uso de calificadores (véase más adelante). Ahora, ocho años después, se ha preparado una tercera edición (IUSS Working Group WRB, 2014).

Principios Generales

La clasificación de suelos se basa en propiedades del suelo definidas en términos de horizontes, propiedades y materiales de diagnóstico, las cuales en medida de lo posible deben poder ser medidas y observadas en campo. La tabla 1 proporciona una visión general de los diagnósticos usados en la WRB.

La selección de características de diagnóstico tiene en cuenta su relación con los procesos formadores de suelos. La comprensión de estos procesos formadores de suelos contribuye a una mejor caracterización de los suelos, pero estos procesos no deben, como tales, usarse como criterio de diferenciación.

En medida de lo posible a un alto nivel de generalización, se seleccionan rasgos de diagnóstico de suelo que son importantes para su manejo.

Parámetros climáticos no se aplican en la clasificación de suelos. Se entiende que estos parámetros deben usarse para propósitos interpretativos, en combinación con propiedades del suelo, sin formar parte de definiciones de suelos. La clasificación de suelos por lo tanto no está subordinada a la disponibilidad de datos climáticos. El nombre de un determinado suelo no se pierde debido a un cambio climático global o local.

La WRB comprende dos niveles de detalle categórico:

el **Primer Nivel** tiene 32 Grupos de Suelos de Referencia (GSR);

el **Segundo Nivel**, consiste en el nombre del GSR combinado con un conjunto de calificadores principales y suplementarios.

El término Base Referencial es connotativo de la función de denominador común de la WRB: sus unidades (GSR) tienen la suficiente amplitud para facilitar la armonización y correlación con los sistemas nacionales de clasificación existentes.

Además de servir como correlación entre los sistemas de clasificación existentes, la WRB también sirve como una herramienta de comunicación para la recopilación de bases de datos de suelos globales y para el inventario y monitoreo de los recursos de suelos del mundo.

La nomenclatura usada para distinguir grupos de suelo integra términos que han sido utilizados tradicionalmente o que pueden introducirse fácilmente al lenguaje común. Estos se definen, precisamente, para evitar la confusión que se presenta cuando nombres se utilizan con diferentes connotaciones (IUSS Working Group WRB, 2014).

2.1.3. Unidades de suelo en México

Para determinar el estado actual del suelo es necesario comprender las características de las unidades de suelo, las formas de muestreo y las propiedades que determinan su calidad, como una forma de interpretar la calidad en que se encuentran los suelos de México.

Para entender y comprender la capacidad productiva de los suelos el sistema de clasificación propuesto por FAO/UNESCO/ISRIC, versión 1988, considera 28 unidades y 153 subunidades de suelo. En México solo se han identificado 25 de esas unidades, agrupando a los suelos de acuerdo a ciertas características generales, como

su morfología y composición, con énfasis en las propiedades que se pueden ver, sentir o medir, como: la profundidad, el color, la textura, la estructura y la composición química. También se han considerado las características de los horizontes, junto con el grosor, número y naturaleza de las capas, entre otros factores de formación. En la Tabla 1 se muestran las principales unidades de suelo, las principales características, la superficie y el porcentaje que representa cada una dentro del territorio nacional.

Tabla 1. Unidades de suelos más importantes de México, de acuerdo con la clasificación internacional FAO/UNESCO/ISRIC

Unidades de suelo	Características	Superficie km ²	Porcentaje
Leptosoles	Suelos muy delgados (<30cm) sobre roca dura	469,436	23.96
Regosoles	Se forman a partir de la roca madre	362,461	18.50
Calcisoles	Suelos con alta concentración de Ca (CaCO ₃)	356,583	18.20
Feozems	Muy fértiles y saturados con de bases, profundos (125 cm) y con superficie oscura.	190,047	9.70
Vertisoles	Con alto contenido de arcillas (>35%) y 50 cm de profundidad.	162,618	8.30
Arenosoles	Alta concentración de arenas y profundos (>125 cm)	121,473	6.20
Cambisoles	Bien desarrollados, color claro, buena estructura.	92,085	4.70
Luvisoles	Arcillosos, saturados de bases (alta CIC), se encuentran en cualquier tipo de climas, excepto en tropical y subtropical.	47,022	2.40
Gleysoles	Suelos saturados permanentemente de agua.	29,389	1.50
Alisoles	Con alto contenido de aluminio, presentes en climas tropicales y subtropicales.	29,389	1.50
Andosoles	Son de origen volcánico, de color oscuro y muy porosos, con alto contenido de materia orgánica y gran capacidad de retención de agua.	23,511	1.20
Kastañozems	Suelos con alto contenido de humus y de calcio.	21,552	1.10
Solonchaks	Presentan acumulación de sales por no poseer un buen sistema de drenaje.	21,552	1.10
Planosoles	Generalmente están anegados por su lenta capacidad de drenaje.	13,715	0.70
Acrisoles	Son ácidos con baja concentración de nutrientes.	9,796	0.50
Nitisoles	Son considerados fértiles a pesar de su bajo contenido en fósforo asimilable y su baja saturación en bases. Son profundos, estables y con propiedades físicas favorables	7,837	0.40
Fluvisoles	Es habitual que requieran un control de las inundaciones, drenajes artificiales y que se utilicen bajo riego.	784	0.04
Nacional		1,959,248	100.00

Los suelos más fértiles y más explotados (feozems y vertisoles) ocupan el 18% de la superficie del país. Los feozems se caracterizan por tener una superficie oscura, de consistencia suave, ricos en materia orgánica y en nutrientes como resultado de la intensa actividad biológica. Presentan textura media, con estructura granular en la parte más superficial, buen drenaje e intercambio gaseoso, en general son poco profundos, casi siempre pedregosos y muy inestables. Muchos feozem son profundos y están situados en terrenos planos, que se utilizan para agricultura de riego o de temporal, con altos rendimientos. Los vertisoles son suelos muy arcillosos, duros, con grietas anchas y profundas cuando están secos, pero si se encuentran húmedos son pegajosos y con drenaje deficiente. Su utilización agrícola es muy extensa, variada y productiva, son generalmente muy fértiles, pero presentan problemas en su manejo debido a su dureza, y con frecuencia ocasionan problemas de inundación y drenaje (SAGARPA, 2012).

2.1.4. Los suelos del estado de Tabasco

En la figura 1 se presenta presentan los grupos mayores y subunidades de los suelos en el estado de Tabasco.

El grupo de suelos más abundante en el estado de Tabasco corresponde a los Gleysoles, distribuido principalmente en las grandes áreas de humedales, los Vertisoles son un grupo de suelos importante para las actividades agrícolas y pecuarias del estado que ocupan un segundo sitio y seguidamente los Fluvisoles en áreas cercanas a la vega de ríos y los Luvisoles en la zona de lomeríos (Palma-López, Cisneros, Moreno, & Rincón, 2016).

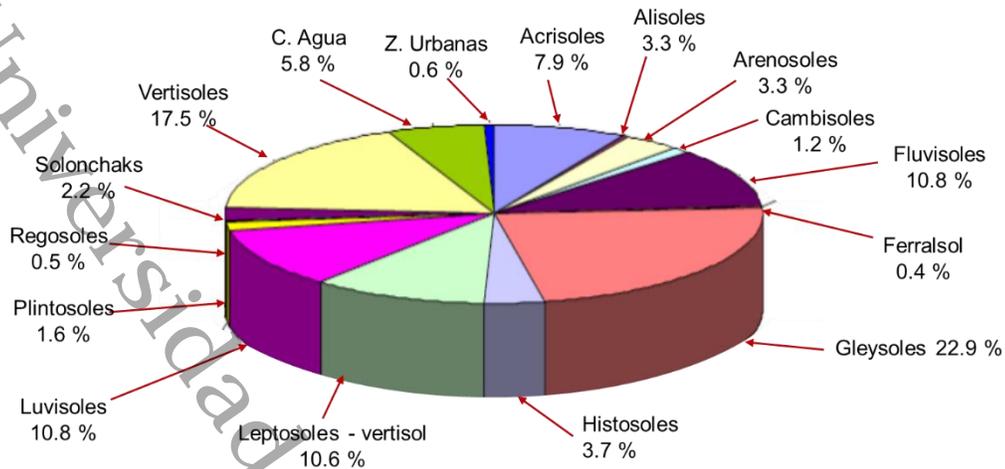


Figura 1. Superficie aproximada de los grupos mayores de los suelos de Tabasco (Palma et al., 2007)

2.2. Suelos de zonas petroleras

Las zonas de mayor exploración petrolera se localizan en las zonas costeras, estos sitios son ecosistemas extremos donde prevalecen condiciones de acidez, altas temperaturas, alto contenido de materia orgánica, por lo que, en zonas de inundación es común encontrar procesos anaeróbicos dificultando la degradación de los contaminantes (Jiménez Hernández, 2018).

Para comprender los efectos negativos al suelo, después de un derrame de petróleo crudo, es necesario analizar un suelo donde no hay presencia de hidrocarburos.

En un suelo no contaminado el transporte de agua, aire, microorganismos y nutrientes tienen un movimiento natural en la fase libre. El ambiente de la fase libre, tiene carga neutra por la ocurrencia de interacciones electrostáticas entre las moléculas de agua y los iones con carga negativa de las arcillas del suelo, lo que promueve una alta capacidad de intercambio catiónico (CIC) tal como se muestra en la figura 2.

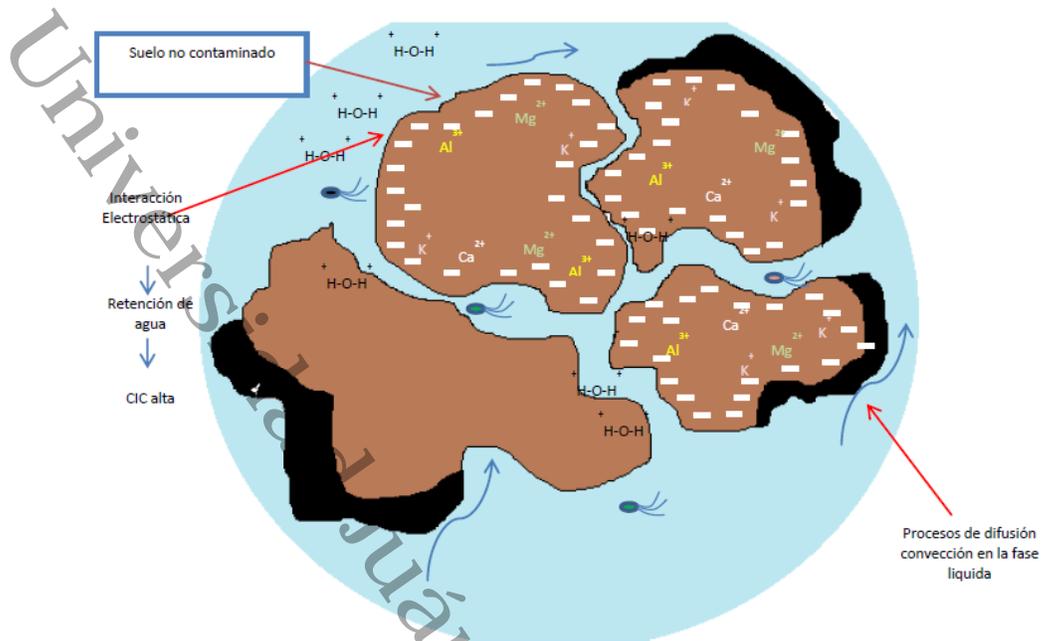


Figura 2. Esquematzación de: transporte de nutrientes, agua y microorganismos en un suelo no contaminado (Yu *et al.*, 2005; Maier, 2000; García-Rivero, 2003)

2.2.1. La industria petroquímica en México

El desarrollo económico en México ha favorecido la concentración y expansión de la industria petrolera, sin embargo, actualmente este desarrollo ha dado origen a graves problemas en materia ambiental, derivados de emergencias ambientales, con graves repercusiones a la salud humana y al equilibrio ecológico de los ecosistemas (Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2002).

La intensificación y diversificación de la actividad industrial en el país, así como el acelerado crecimiento en la población, ha dado como resultado la demanda de mayores cantidades de combustibles fósiles (hidrocarburos); aunque gran parte de estos compuestos se utilizan para generar energía, un alto porcentaje es liberado al medio ambiente como agente contaminante (Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2003).

Las diferentes actividades industriales son fuentes potenciales de contaminación ambiental, como la emisión de humos, polvos, gases y descargas de aguas residuales generadas durante la perforación de pozos petroleros, en la extracción de líquidos, por la refinación y en la producción de petroquímicos (Ortínez *et al.*, 2003). Esto como consecuencia del inadecuado manejo y disposición final de estos residuos, que se ha

visto reflejado en poco tiempo en los altos niveles de contaminación alcanzados en los suelos, agua y aire (Beltrán *et al.*, 2013).

2.2.2. Naturaleza y composición de los hidrocarburos derivados del petróleo

Los hidrocarburos de petróleo se producen naturalmente en depósitos, en el subsuelo, debajo de la superficie de la tierra en las rocas sedimentarias, existiendo en forma de gases (gas natural), semisólidos (betún), sólidos (cera o asphaltita) y líquidos, como el petróleo crudo comúnmente conocido como combustible fósil que comprende una mezcla simple a, compleja de varios compuestos de hidrocarburos, en forma de compuestos alifáticos saturados o parafinas que incluyen alcanos de cadena lineal y ramificada (n-alcanos), cicloalcanos, alquenos insaturados, alquinos; aromáticos que incluyen hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) tales como naftaleno, monoaromáticos tales como benceno, tolueno, etilbenceno, xileno (BTEX); asfaltenos que incluyen fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres, porfirinas; resinas que incluyen piridinas, quinolinas, cardaxoles, sulfonatos, amidas; así como ceras y alquitranes como se muestra en Tabla 2 (Moubasher *et al.*, 2015; Ossai, Ahmed, Hassan, & Hamid, 2020; Varjani, 2017).

Los componentes no hidrocarbonados del aceite de petróleo consisten en compuestos de azufre tales como sulfuros, tioles, sulfuros cíclicos, disulfuros, dibenzotiofeno, benzotiofeno y naftobenzotiofeno; compuestos de oxígeno incluyen alcoholes, ácidos carboxílicos, ésteres, éteres, cetonas y furanos; y los compuestos de nitrógeno incluyen pirrol, piridina, indol, benzo (a) carbazol, carbazol, benzo (f) quinolona, nitrilos, indolina y quinolina, Speight (2007). También se pueden encontrar ciertos metales, y estos heterocompuestos están contenidos principalmente en el componente no volátil de los hidrocarburos de petróleo (Speight, 2001; Speight, 2007; Costa *et al.*, 2012).

Tabla 2. Clase y características de hidrocarburos de petróleo (Ossai *et al.*, 2020)

Hidrocarburos	Características	Ejemplos
Alifáticos		
<ul style="list-style-type: none"> Alcanos Alquenos Alquenos cicloalifáticos 	<ul style="list-style-type: none"> Menos denso que el agua El tamaño de la molécula es inversamente proporcional a su volatilidad y solubilidad en agua 	Metano, propano, butano (gas a temperatura ambiente); hexano, octano y hexadecano (líquido a temperatura ambiente); eicosano, triacontano y pentacontano (sólido a temperatura ambiente)
<ul style="list-style-type: none"> Cicloalcanos aromáticos 	<ul style="list-style-type: none"> Contiene hasta seis átomos de carbono en un anillo Bastante resistente a la degradación microbiana 	Ciclohexano, metilciclohexano, metilciclopentano, 1,2-dimetilciclopentano
<ul style="list-style-type: none"> Monoaromáticos BTXE PAH 	<ul style="list-style-type: none"> Muy volátil y relativamente soluble en agua Tienen anillo de benceno Algunos son resistentes a la degradación microbiana 	Benceno, etilbenceno, naftaleno, tolueno, xileno y fenantreno
Otros componentes		
<ul style="list-style-type: none"> Asfáltenos Ceras y alquitrán 	<ul style="list-style-type: none"> Solubles en aromáticos y no solubles en alcanos ligeros 	Fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres, porfirinas, piridinas, quinolinas, cardaxol y sulfonatos
<ul style="list-style-type: none"> Resinas Compuestos hidrocarbonados 	<ul style="list-style-type: none"> Contienen alrededor de 18 a 65 átomos de carbono 	

2.2.2.1. Impacto ambiental de los hidrocarburos del petróleo

Cuando los hidrocarburos de petróleo ingresan al medio ambiente, sus componentes experimentan una variedad de procesos, como procesos abióticos físicos, cambios químicos y biológicos a través de la interacción con microorganismos y vías metabólicas conocidas colectivamente como meteorización (Abdel-Shafy y Mansour, 2016).

El nivel en el que varios componentes del hidrocarburo de petróleo se deterioran bajo los procesos de meteorización depende en gran medida de la naturaleza, composición, características físicas y químicas de los hidrocarburos. El proceso de meteorización incluye la adsorción a partículas del suelo y materiales orgánicos, volatilización a la

atmósfera y disolución en agua (Esbaugh *et al.*, 2016; Mishra y Kumar, 2015; Barakat *et al.*, 2001).

Con la inmensa cantidad de compuestos contenidos en los hidrocarburos de petróleo, solo una pequeña fracción de los compuestos está bien caracterizada por su efecto toxicológico (Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR], 2011). Los compuestos de hidrocarburos de petróleo con una amplia gama de masa molecular relativa y puntos de ebullición causan diversos grados de toxicidad en el medio ambiente afectado. Los hidrocarburos de petróleo son generalmente tóxicos y letales dependiendo de la naturaleza química, composición y propiedades de las fracciones compuestas, modo de exposición, nivel de exposición y tiempo de exposición. Los contaminantes pueden causar diversos problemas de salud toxicológica a humanos y animales, incluyendo hemotoxicidad (destrucción de glóbulos rojos), carcinogenicidad (capacidad o tendencia de inducir cáncer), genotoxicidad (capacidad de inducir daño no transmisible del ADN), mutagenicidad (capacidad de incitar mutaciones genéticas transmisibles), teratogenicidad (inducción de malformación del embrión o feto), citotoxicidad (capacidad de ser tóxico para las células), neurotoxicidad (daño al cerebro y al sistema nervioso), inmunotoxicidad (capacidad para reprimir el sistema inmune), nefrotoxicidad (daño al riñón), hepatotoxicidad (capacidad de provocar daño al hígado). (Lawal, 2017; Gutzkow, 2015; Azeez *et al.*, 2015; Ogunneye *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2014; Sriram *et al.*, 2011; Omoti *et al.*, 2008; Cajaraville *et al.*, 1991; OMS, 1986).

También tiene efectos inhibitorios del crecimiento en las plantas cuando obstruyen o disminuyen la ingesta de agua y sales minerales, lo que causa la descomposición de los procesos metabólicos de las plantas, lo que resulta en una deficiencia de clorofila y nutrientes que conduce a la disminución de la resistencia a plagas y enfermedades, exhibe un crecimiento atrofiado, deformado raíces, hojas y flores con clorosis y necrosis (Rusin *et al.*, 2015; Shan *et al.*, 2014; Zhu, 2010; Mendez-Natera *et al.*, 2004; Adam y Duncan, 2002; Vavrek y Campbell, 2002).

2.3. Papel de la biotecnología en la biorremediación

La biotecnología puede definirse como el proceso que emplea principios de ingeniería y científicos para la creación de materiales mediante el uso de agentes biológicos para suministrar bienes y servicios a los humanos y al medio ambiente (McHughen, 2016). Los compuestos químicos que interactúan con los iones metálicos para formar un complejo estable y soluble en agua se conocen como agentes quelantes o, agentes secuestrantes o secuestradores de metales. Con la ayuda de estos químicos, se realiza el lavado del suelo, las partículas del suelo se purifican mediante la transferencia selectiva de contaminantes del suelo hacia la solución (Ferraro *et al.*, 2015). Se utilizan diferentes clases de compuestos para el lavado del suelo que incluyen agentes quelantes, tensioactivos, codisolventes, ciclodextrinas y ácidos orgánicos (Morillo y Villaverde, 2017). Los ácidos orgánicos naturales que tienen bajo peso molecular, es decir, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido acético, etc. son los productos originales de exudados de raíz, secreción microbiana, restos de animales y plantas que se descomponen en los suelos (Hayat *et al.*, 2017).

Podemos hacer uso de la biotecnología para diseñar un solo microorganismo (bacterias o hongos) con todas las enzimas necesarias o la vía de degradación requerida para fines de remediación (Dangi *et al.*, 2019). Es importante identificar los microorganismos que tienen el potencial de biodegradar un contaminante específico y las técnicas convencionales requieren mucho tiempo. Las sondas de ADN pueden recorrer un largo camino a este respecto si se quiere identificar una cepa particular de una población. La biotecnología utiliza la aplicación de la ingeniería genética para mejorar el costo y la productividad de la próxima utilización universal de los microorganismos para eliminar las sustancias tóxicas del ecosistema. Los agentes biológicos han demostrado su capacidad de remediación, sin embargo, su uso a largo plazo y a gran escala requiere la aplicación de herramientas genéticas (Tylecote, 2019). *Bacillus thuringensis* se ha utilizado para mejorar la biodegradación bacteriana del gasóleo (Mnif *et al.*, 2017). Las bacterias resistentes a la radioactividad (*Deinococcus radiodurans*) se han actualizado para asimilar y utilizar el mercurio iónico

y el tolueno de los desechos demasiado radiactivos (Manobala *et al.*, 2018; Shukla y Rao, 2017).

2.3.1. Mecanismos de degradación de hidrocarburos de petróleo

La degradación de los hidrocarburos del petróleo es el resultado de los efectos combinados de la transformación química y la biodegradación (Joutey *et al.*, 2013). La degradación de los hidrocarburos de petróleo es un proceso complejo que depende de la naturaleza, la composición y la concentración de hidrocarburos presentes en el medio impactado. Comprende una serie de pasos que implican la transformación química y la mineralización de contaminantes, a través de actividades metabólicas y enzimáticas que se transforman en sustancias menos nocivas y no peligrosas que se asimilan en los ciclos biogeoquímicos (Abbasian *et al.*, 2015; Maletic *et al.*, 2013). Los hidrocarburos de petróleo se degradan principalmente por mecanismos enzimáticos que involucran microorganismos aeróbicos (en presencia de oxígeno) o anaeróbicos (en ausencia de oxígeno), y la unión de células microbianas con los sustratos para la producción de biosurfactantes y emulsionantes (Varjani y Upasani, 2017; Das y Chandran, 2011; Hu, 2016).

La luz también puede degradar los contaminantes de hidrocarburos del petróleo. La división fotolítica es la ruptura de enlaces químicos por causa de energía radiante. se inicia por la interacción de uno o más fotones con una molécula objetivo, los componentes del hidrocarburo de petróleo, como los compuestos aromáticos simples benceno, tolueno, etilbenceno, xileno (BTEX) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) presentan estados fotoexcitados que facilitan su desintegración.

La energía electromagnética y ultrasónica puede estimular mecanismos como la volatilización, la filtración, la desorción, el flujo de aire y las actividades microbianas. Como se muestra en la figura 3, la mayor parte de la degradación de los contaminantes de hidrocarburos de petróleo se inicia bajo condiciones quimiotróficas aeróbicas donde la actividad intracelular inicial es una reacción oxidativa catalizada por enzimas tales como oxigenasas y peroxidasas y las vías de degradación

convierten los contaminantes de hidrocarburos de petróleo en intermediarios (Fritsche y Hofrichter, 2000).

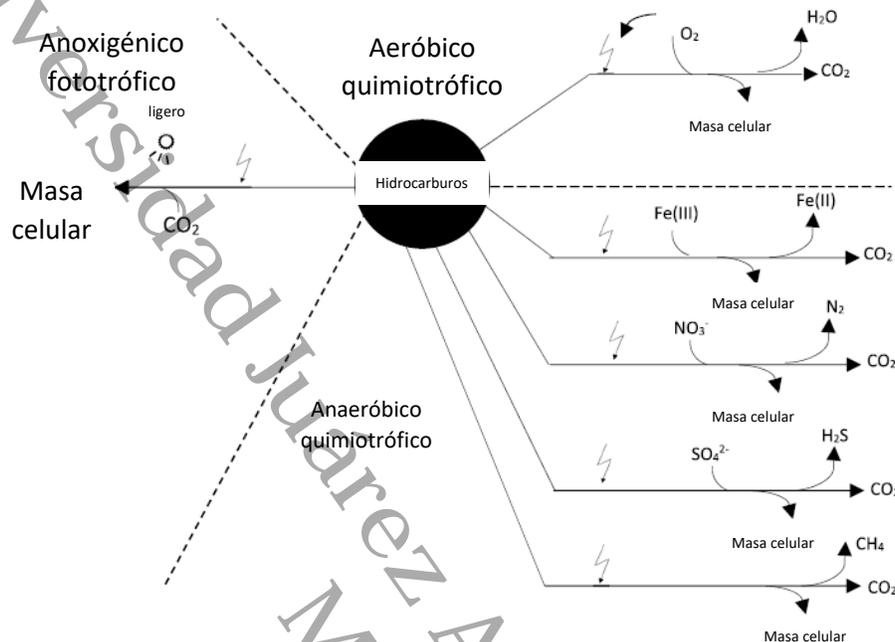


Figura 3. Mecanismos de degradación de hidrocarburos de petróleo (Ossai *et al.*, 2020)

2.3.2. Remediación de suelos contaminados

Es ampliamente reconocido que la contaminación por hidrocarburos derivados del petróleo en el suelo, sedimentos, aguas superficiales y subterráneas representa una gran amenaza para la salud humana. Los métodos y técnicas de tratamiento de remediación juegan un papel vital en la limpieza completa, contención, remoción, recuperación y restauración del ambiente contaminado. El enfoque de remediación elegido para cualquier ambiente contaminado es específico del sitio y se consideran las variables asociadas con la naturaleza y composición de los contaminantes, las condiciones físicas, químicas y biológicas del ambiente afectado junto con la comunidad microbiana presente o el aumento requerido. El sistema de gestión lleva a la selección del enfoque de remediación a partir de métodos de contención, separación y destrucción basados en varias tecnologías de tratamiento de remediación *in situ* y *ex situ* para suelos, aguas superficiales y aguas subterráneas que comprenden productos biológicos, químicos, fisicoquímicos, térmicos, eléctricos, electromagnéticos y

métodos de tratamiento ultrasónico (Reddy, 2013; Rodrigo *et al.*, 2014). Estas técnicas de remediación pueden contener, secuestrar, separar, extraer, eliminar, destruir, transformar y mineralizar contaminantes en el ambiente contaminado en formas menos dañinas, no peligrosas y menos reactivas (Maletic *et al.*, 2013).

2.3.3. Métodos de tratamiento biológico

La viabilidad de un método de tratamiento biológico depende en gran medida de los factores limitantes, así como de la ubicación de los contaminantes. También depende del suelo contaminado, los sedimentos, el agua superficial y el agua subterránea que se remediará, ya sea que esté intacta en el medio ambiente o que se retire, excave y transporte para su tratamiento a una instalación de tratamiento fuera del sitio (Hamzah *et al.*, 2013).

Los métodos de remediación biológica han demostrado un éxito notable para la remediación *in situ* y *ex situ*. Son capaces de remediar o degradar hidrocarburos de petróleo y diversos contaminantes orgánicos a sustancias más simples y no tóxicas sin ningún efecto adverso a largo plazo en los entornos afectados (Lim *et al.*, 2016).

El término biorremediación se aplica principalmente a la utilización de microorganismos (bacterias y hongos) para degradar, transformar y desintoxicar contaminantes orgánicos e inorgánicos y residuos peligrosos a compuestos inocuos tales como dióxido de carbono, agua o a formas menos tóxicas (US EPA, 2005; Paul *et al.*, 2005). Las transformaciones de los contaminantes se logran a través de las capacidades catabólicas de los microorganismos (Domde *et al.*, 2007). Durante la biorremediación se puede emplear organismos autóctonos (organismos propios del sitio contaminado) o exógenos (de otros sitios), puede realizarse *in situ* o *ex situ* (Ang *et al.*, 2005).

2.3.3.1. Tecnologías *in situ*

La técnica *in situ* consiste en estimular y crear un ambiente favorable para el crecimiento microbiano a partir de los contaminantes, incluyen el bioventeo, la bioaugmentación, la bioestimulación, la biolabranza, la atenuación natural y

fitorremediación (Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2003). A continuación, se describe cada una de ellas:

Biorremediación (in situ / ex situ):

Este es un método fácil, ecológico, sostenible y rentable para la restauración y limpieza de contaminantes en el suelo. Implica la degradación natural de contaminantes de hidrocarburos de petróleo por microorganismos que degradan los hidrocarburos, como bacterias, hongos y levaduras. Elimina y neutraliza los contaminantes en el suelo en compuestos no tóxicos o más simples como el óxido de carbono (IV) y el agua a través de la oxidación en condiciones aeróbicas por los microorganismos con suministro de nutrientes y optimización de los factores limitantes para sus actividades biológicas (Yanti, 2018; Dzionek *et al.*, 2016).

Bioventeo:

Esta es la inyección de aire (oxígeno) en el suelo contaminado para aumentar la degradación *in situ* y minimizar los contaminantes volátiles a la atmósfera (Trulli *et al.*, 2016, Camenzuli y Freidman, 2015). La adición de aire al suelo estimula y aumenta la condición aeróbica para el crecimiento de microorganismos autóctonos y mejora la actividad catabólica de los contaminantes. La bioventilación se ha utilizado para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo.

Bioaumentación:

Se entiende como la introducción de especies de microorganismos que ayuden a la biodegradación de los contaminantes presentes en el suelo. Cultivos microbianos exógenos, comunidades microbianas autóctonas o microbios genéticamente modificados con actividad catabólica específica que se han adaptado y demostrado degradar contaminantes y aumentar la tasa de degradación (Nwankwegu y Onwosi, 2017).

Bioestimulación:

Esta es una adición de cualquier material estimulante, agentes de carga, enmiendas de nutrientes, bio-tensioactivos, biopolímeros y fertilizantes de liberación lenta para mejorar y apoyar el crecimiento microbiano y las actividades enzimáticas de los microorganismos autóctonos en el suelo contaminado para actividades de remediación

(Wu *et al.*, 2016 y Adams *et al.*, 2015). La bioestimulación se logra mediante la adición u optimización de varias formas de parámetros limitantes, micronutrientes y aceptores de electrones como nitrógeno, fósforo, potasio, carbono y oxígeno, que están disponibles principalmente en bajas concentraciones en el suelo contaminado y disminuye o limita el rendimiento microbiano.

Biolabranza:

Este es un sistema de biorremediación diseñado, que emplea labrar, arar y esparcir el suelo impactado en una capa delgada en la superficie de la tierra para mejorar y estimular las actividades microbianas aeróbicas con la adición de nutrientes. Es adecuado para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo de bajo peso molecular, compuestos orgánicos volátiles (COV) y una variedad de otros compuestos orgánicos (Guarino *et al.*, 2017).

Atenuación natural:

Proceso natural por el cual los microorganismos descomponen o degradan sustancias peligrosas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o inocuas (Margesin y Schinner, 2001).

Fitorremediación:

Este es el proceso mediante el cual las plantas verdes se utilizan para eliminar o extraer contaminantes en el suelo, sedimentos, aguas superficiales y subterráneas. La técnica elimina los contaminantes del suelo (descontaminación) o secuestra los contaminantes en la matriz (estabilización) (Adam, 2001).

2.3.3.2. Tecnologías ex situ:

Este proceso se lleva a cabo fuera del sitio de contaminación, estas técnicas implican la excavación o remoción de suelo contaminado de la tierra (Sardrood *et al.*, 2013).

Landfarming:

Es una técnica en la que el suelo se excava y extiende, es labrada periódicamente, el objetivo es estimular los microorganismos nativos para facilitar la degradación de los contaminantes (Vidali, 2001).

Composteo:

Esta es una degradación bioquímica microbiana aeróbica controlada de los materiales de desecho orgánicos y su conversión en un material orgánico estabilizado que se puede usar como acondicionadores del suelo para la remediación del suelo contaminado con compuestos orgánicos (Ren *et al.*, 2018; Saum *et al.*, 2018).

Biopilas:

Esto implica la combinación de cultivo y compostaje en una celda de ingeniería aireada con sopladores y bombas de vacío, sistema de riego y nutrientes, así como un sistema de recolección de lixiviados para la biorremediación de componentes contaminantes adsorbidos al suelo y sedimentos (Kim *et al.*, 2018, Benyahia y Embaby, 2016). La técnica consiste en apilar un suelo contaminado excavado, seguido de bioestimulación y aireación para mejorar las actividades microbianas para la degradación. Es adecuado para el tratamiento de grandes volúmenes de suelo y sedimentos contaminados en un espacio limitado y remedia eficazmente las contaminaciones en ambientes extremos (Whelan *et al.*, 2015).

Biorreactores:

Este método se utiliza para tratar material sólido contaminado (suelos, lodos y sedimentos) o agua a través de un biorreactor. Un biorreactor puede ser definido como un recipiente de contención (sólido, líquido y gas) que mezcla el contenido para aumentar la tasa de degradación por medio de los microorganismos (Vidali, 2001).

2.3.4. Factores que influyen en la biorremediación de los Hidrocarburos del petróleo (HP)

La actividad de los microbianos puede verse afectada por los siguientes factores: temperatura, oxígeno, pH y nutrientes (figura 4), para una biodegradación exitosa, los microorganismos deberían desarrollar una actividad catabólica mediante los siguientes procesos: desarrollo de nuevas capacidades metabólicas por cambios genéticos, inducción de enzimas específicas y enriquecimiento ecléctico de microorganismos capaces de convertir los contaminantes. Cuando las condiciones son favorables para los microorganismos, la biodegradación de los HP alcanzará un nivel máximo (Al-Hawash *et al.*, 2018). La composición química de los HP es el factor fundamental e influyente en la biodegradación. Fedorak y Westlake, (1981) informaron que los

hidrocarburos aromáticos fueron atacados más rápidamente durante la degradación del petróleo crudo por las poblaciones microbianas marinas.

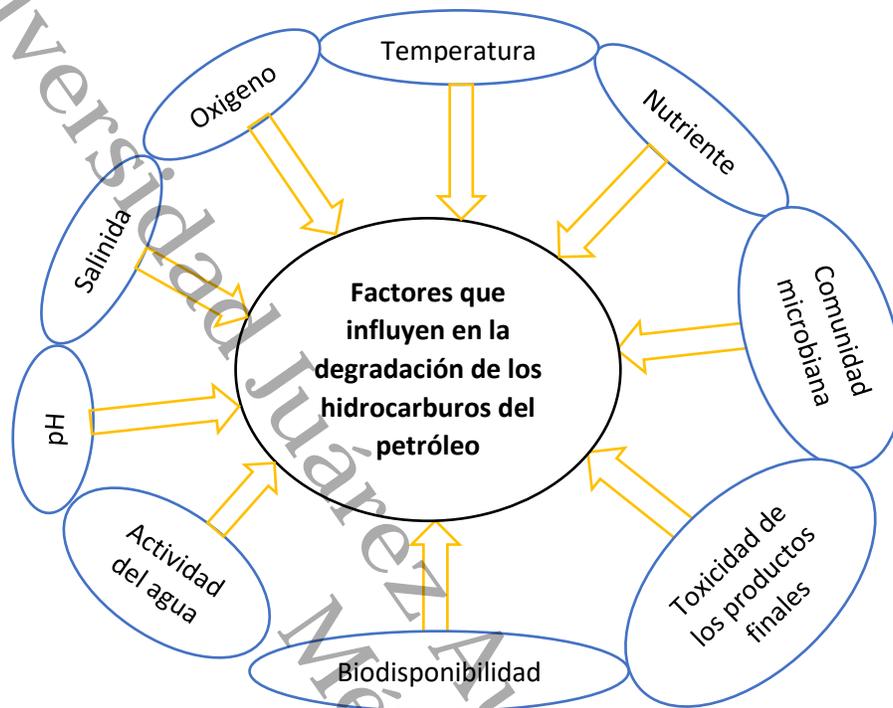
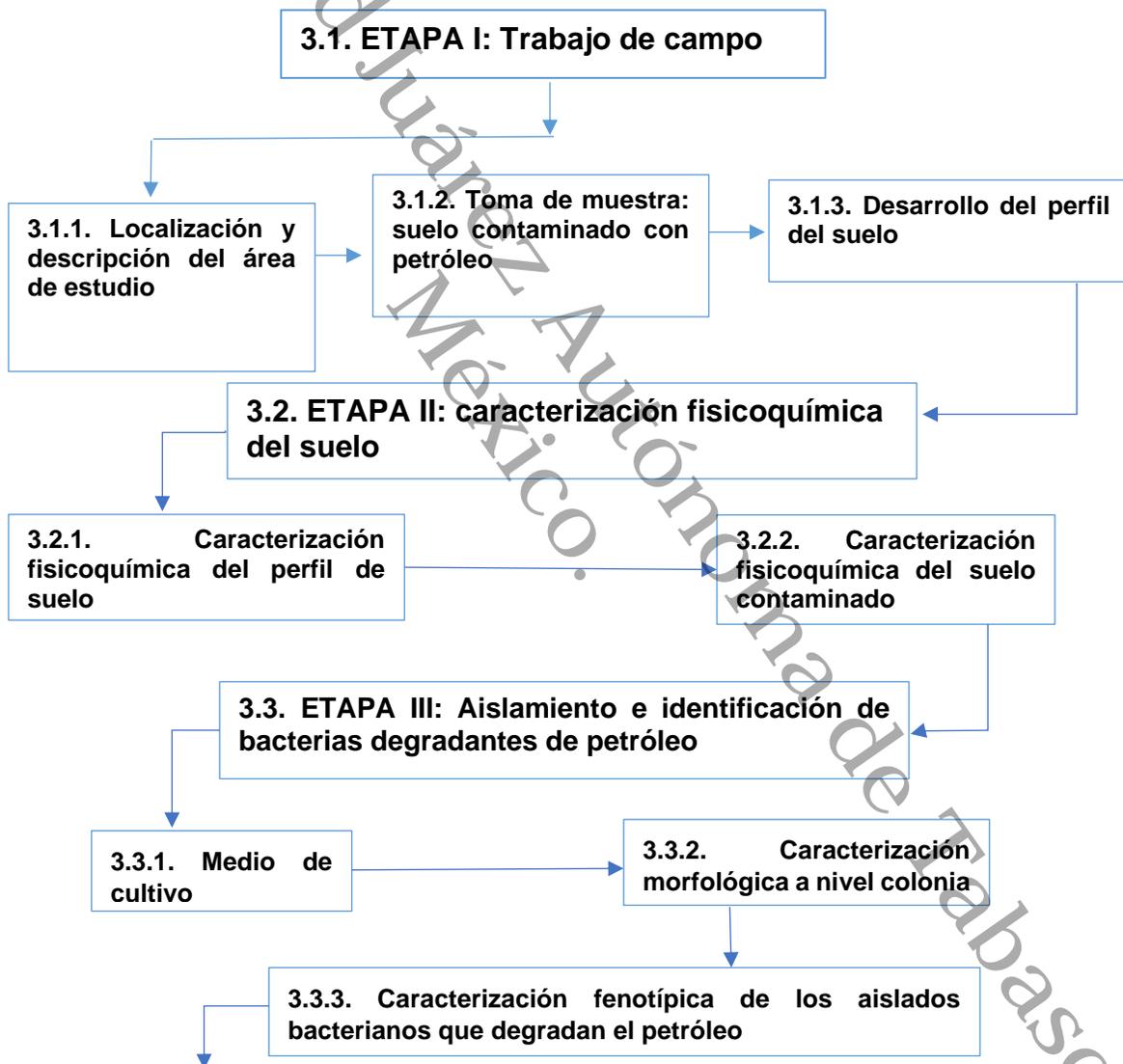


Figura 4. Factores que afectan la biodegradación de los hidrocarburos de petróleo (Al-Hawash *et al.*, 2018)

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y METODOS

El desarrollo de esta investigación se realizó en cinco etapas, las cuales consistieron en: trabajo de campo, laboratorio; caracterización fisicoquímica del suelo, establecimiento del bioensayo en el laboratorio y análisis de los datos. Cada una de las etapas se desglosa en diferentes técnicas las cuales se muestran en el siguiente diagrama de la figura 5.



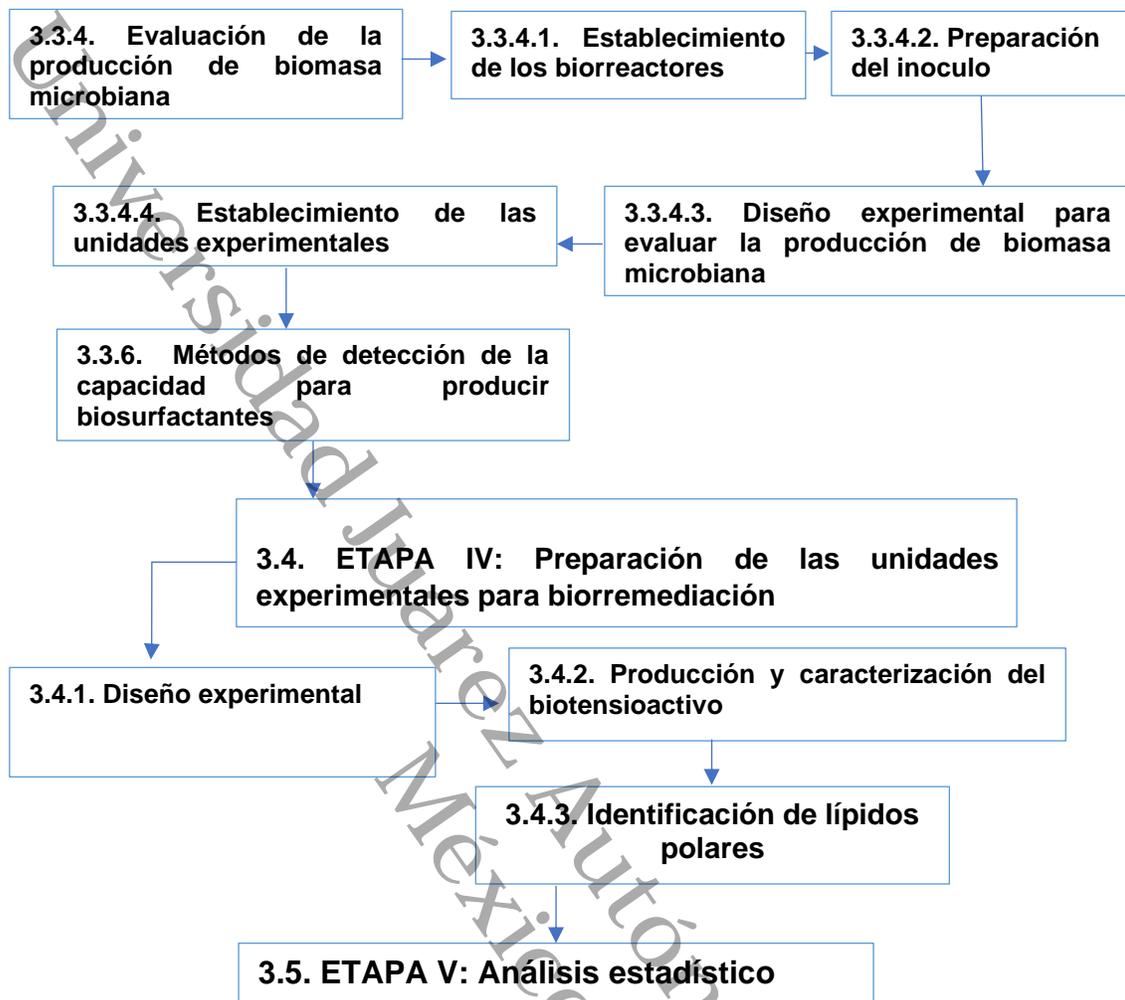


Figura 5. Metodología para la remediación del suelo contaminado con petróleo

3.1. ETAPA I. Trabajo de campo

La etapa I consistió en la localización y descripción de área de estudio. Se realizó la toma de muestra del suelo contaminado de los puntos de muestreo establecidos en la NOM-021-SEMARNAT-2000 y el desarrollo del perfil edafológico del área no impactada por el derrame, con el propósito de clasificar el tipo de suelo del área de estudio de acuerdo a Cuanalo (1990) y world reference base for soil resources (2015).

3.1.1. Localización y descripción del área de estudio

El sitio de muestreo se ubicó en una zona de platanales de la ranchería Huapacal 2^{da} sección del municipio de Cunduacán Tabasco (figura 6), ubicada en las coordenadas 18.04°49'27.20" latitud norte y 93.15°37'83.40" longitud oeste.

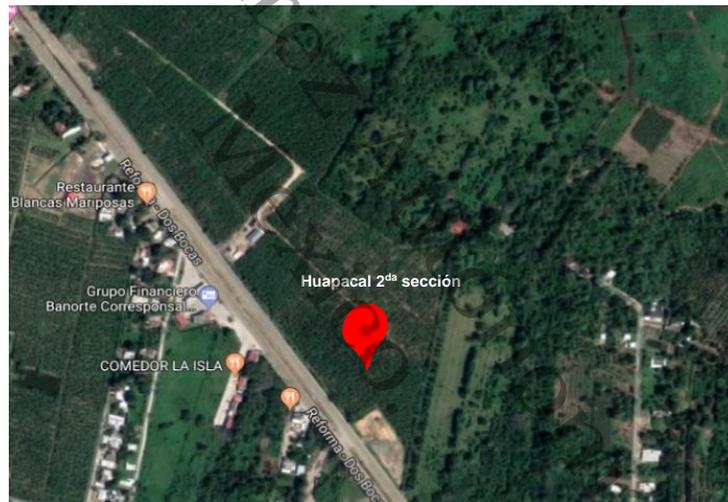


Figura 6. Ubicación del área de estudio por georreferenciación

El clima predominante es cálido húmedo con lluvias en verano, presenta una temperatura media anual de 26.2 °C, con máxima de 30.5 °C, y mínimas de 22.5 °C.

El sitio cuenta con 15 hectáreas cultivadas con plátano macho variedad “chifle mejorado” de las cuales siete hectáreas presentan antecedentes de contaminación por derrames de petróleo desde el 15 de enero del 2018 (figura 7), causados por corrosión en los ductos. De acuerdo a información proporcionada por el propietario del terreno, el petróleo fue removido con maquinaria pesada, no hubo ninguna remediación en el sitio impactado, se tomaron muestras representativas del sitio para su análisis en el

laboratorio, descrito en el apartado 3.1.2, así también se desarrolló un perfil de suelo en el área libre de contaminantes (área aledaña al sitio impactado con petróleo).



Figura 7. Derrame de petróleo en platanales de la ranchería Huapacal 2da sección del municipio de Cunduacán Tabasco, el 15 de enero del 2018

3. 1. 2. Toma de muestra de suelo contaminado con petróleo

El muestreo consistió en coleccionar 33 muestras aleatorias con duplicado de acuerdo a los puntos establecidos por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.

Para la toma de muestra se utilizó una pala recta, cucharones, frascos de vidrio con contratapa de teflón, hielera y kit de limpieza (figura. 8). La profundidad de las muestras fue de 0-20 cm, éstas se guardaron en frascos de vidrio boca ancha con contratapa de teflón, etiquetadas y trasladadas al laboratorio de biotecnología de la División Académica de Ingeniería y Arquitectura (DAIA) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) donde se les practicaron los análisis físicoquímicos correspondientes.



Figura 8. Toma de muestra de suelo contaminado

3.1.3. Desarrollo del perfil de suelo

Para determinar el perfil se realizó en la misma área de estudio, en una zona aledaña al área impactada por el derrame, con el propósito de clasificar el tipo de suelo del sitio impactado, de acuerdo a Cuanalo, 1990 para determinar los horizontes diagnósticos y la NOM-021-SEMARNAT-2000 para la determinación de los horizontes genéticos del perfil.

Para el desarrollo del perfil se utilizó una pala recta y una curva, para excavar y extraer el suelo para una calicata de un metro de ancho por 112 cm de profundidad, una vez terminado se registraron las anotaciones de las observaciones e identificación de los horizontes que se desarrollaron en el interior de este (figura 9).



Figura 9. Determinación y descripción del perfil de suelo

En campo se registraron las características de horizonte, tales como su profundidad, color; con ayuda de las tablas de colores Munsell (figura 10a) ;textura, estructura; tipo, clase y grado (figura 10c); consistencia en húmedo y mojado (figura 10b); porosidad, presencia de cutanes o formaciones especiales, presencia de microorganismos como se muestra en la figura 10e; contenido y distribución de raíces y reacción al peróxido de hidrógeno (prueba en campo para aproximarse cualitativamente a los contenidos de materia orgánica) (figura 10d) de acuerdo con Cuanalo. (1990).



Figura 10. Caracterización de algunas propiedades del suelo en campo. a) Color; b) Consistencia en mojado; c) Textura; d) Materia orgánica con H_2O_2 ; e) Presencia de microorganismos

Se realizó la toma de muestra de 1 kg de cada uno de los horizontes que presento el perfil, empezando de abajo hacia arriba esto con el fin de evitar contaminación; con residuos que se desprendan del horizonte anterior. Las muestras se guardaron en frascos de vidrio previamente etiquetadas, estas fueron trasladadas al laboratorio de biotecnología para su procesamiento.

Esta información se complementó con la descripción de las características del entorno: drenaje, nivel freático, relieve, paisaje, tipo de relieve, pendiente, vegetación natural, material parental, clima ambiental y temperatura promedio anual, régimen de humedad del suelo, uso actual del suelo y horizontes diagnósticos.

La determinación taxonómica del suelo se realizó según World Reference Base For Soil Resources (2014).

3.2. ETAPA II: caracterización fisicoquímica del suelo

El proceso de preparación de las muestras consistió en el secado, molienda, tamizado, homogeneizado y el almacenamiento para su conservación de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 (figura 11). Para el secado las muestras fueron colocadas sobre bolsas de polietileno logrando una profundidad inferior de 2.5 cm, y expuestas a la sombra a una temperatura no mayor a 35 °C y una humedad relativa entre 30 y 70 %, para la molienda se retiraron las rocas y el material orgánico visible, posteriormente se realizó el tamizado en un tamiz malla 10, las muestras se guardaron en frascos de vidrio para realizar los análisis fisicoquímicos correspondientes.



Figura 11. Proceso de preparación de muestra: a) Secado y homogeneizado; b) molienda; c) Tamizado

3.2.1. Caracterización fisicoquímica del perfil de suelo

Las muestras tomadas de los horizontes del perfil agrológico fueron caracterizadas mediante parámetros fisicoquímicos de acuerdo con la NOM-021-RECNACT-2000, los parámetros analizados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros analizados al perfil de suelo libre de contaminantes

Parámetros	Referencia
	NOM-021-RECNACT-2000
Temperatura	
Textura	AS-09
pH	AS-02
Conductividad eléctrica	AS-18
Densidad real	AS-04
Densidad aparente	AS-03
Capacidad de intercambio catiónico y cationes intercambiables	AS-12
Materia orgánica	AS-07
Porcentaje de saturación de bases	AS-21
Carbonatos de calcio	AS-30
Fosforo aprovechable	AS-10
Nitrógeno total	AS-25
HTP	NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012

3.2.1.1. Nitrogeno total

El nitrógeno total se determinó con el método micro-kjeldahl, se pesó 1 gr de suelo molido y tamizado, se colocó en un matraz Kjeldahl de 100 mL, al cual se le añadió 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, y perlas de ebullición luego se pusieron en agitación para su homogenización. Posteriormente se filtró la muestra recogiendo en un matraz aforado de 100 mL. Se realizó una titulación con ácido sulfúrico 0.025 M para lo cual se toman 50 mL del total de los 100 mL y se introducen en un matraz Erlenmeyer. Seguidamente se añadió 20 mL de una solución de NaOH al 35 % y 20 mL de agua destilada. Se utilizó ácido bórico con una mezcla de indicadores (0.099 g de verde de bromocresol y 0.066 g de rojo de metilo disueltos en 100 mL de alcohol etílico 95 %), posteriormente se anotó el volumen de ácido sulfúrico gastado para proceder a calcular el porcentaje del nitrógeno total (ec.1) (AS-25).

$$\% N \text{ total} = (V_m - V_b) * N * \frac{14}{p} * 10 \dots \dots \dots (\text{ec.1})$$

Donde:

V_m= Volumen de ácido sulfúrico empleado en titular la muestra

Vb= Volumen de ácido sulfúrico empleado en titular blanco

N= Normalidad exacta del ácido sulfúrico

14= Peso equivalente del nitrógeno

10= Factor de conversión a porcentaje

P= Peso de la muestra de suelo en g.

3.2.1.2. Fosforo aprovechable

El fósforo disponible fue determinado con el método de Olsen, se utilizó 2.5 g de suelo y una solución extractora de bicarbonato de sodio 0.5 M, se filtró a través de papel filtro Whatman 42 con 1 g de carbón activado. Se tomó una alícuota de 5 mL del filtrado y se colocó en un matraz aforado de 50 mL, se adicionó 5 mL de la solución reductora de ácido ascórbico y se aforó. Se leyó en absorbancia de 882 nm en el espectrofotómetro GENESYS 20 después de 30 minutos, pero antes de una hora (AS-10).

3.2.1.3. pH y conductividad eléctrica

El pH se midió de acuerdo al procedimiento AS-02 de la NOM-021-RECNACT-2000. A un vaso de precipitado de 100 mL de capacidad nominal se le agregaron 10 g de suelo y se mezclaron con 20 mL de agua destilada. Con ayuda de una varilla de vidrio, la mezcla se agitó manualmente a intervalos de 5 minutos, durante 30 minutos. Dejando reposar durante 15 minutos, para después realizar la lectura de las muestras (figura 12).



Figura 12. Lectura del pH del suelo contaminado

Después de la lectura del pH se filtró la solución para obtener un extracto acuoso al cual se le realizó la lectura de la conductividad eléctrica (figura 13) con un conductímetro marca EC-3M.



Figura 13. Muestras de suelo contaminado para conductividad eléctrica

3.2.1.4. Capacidad de intercambio catiónico (CIC)

La capacidad de intercambio catiónico y la determinación de K por acetato de Amonio 1N pH 7.0 (AS-13) consistió en agitar 5 g de suelo con 33 mL de solución de acetato de amonio en un tubo de polipropileno de 100 mL durante 30 min a 2500 rpm hasta que el sobrenadante estuviera claro, posteriormente se decantó en un matraz Erlenmeyer de 100 mL, al sobrenadante se añadieron 30 mL de solución de cloruro de amonio 1N y se agitó durante 10 min y luego se centrifugó hasta que el líquido del sobrenadante estuviera claro y después se desechó, para luego adicionar 30 mL de solución de cloruro de amonio 0.25 N, nuevamente se agitó durante 10 min, se centrifugó y se desechó el sobrenadante. Después se lavaron las muestras con porciones de alcohol de 30 mL agitando durante 10 min, se centrifugó y elimino el sobrenadante. El lavado termina cuando la prueba de cloruros en el decantado sea mínima, para ello se tomaron 10 mL del sobrenadante alcohólico en un tubo de ensaye y se agregaron 4 o 5 gotas de nitrato de plata, si se observó un ligero precipitado blanco, la reacción fue positiva y se continuó lavando hasta que la prueba de cloruros fuera negativa.

Luego se reemplazó el amonio adsorbido con tres porciones de 33 mL de cloruro de sodio al 10 %, agitando durante 10 minutos y centrifugando cada vez, el sobrenadante de cada centrifugado se decantó en un matraz volumétrico de 100 mL completando el volumen con cloruro de sodio al 10 %. Para determinar el contenido de amonio se tomó

una alícuota de 10 mL de la solución que se obtuvo del centrifugado, la cual se transfirió a un matraz Kjeldahl de 300 mL, se le agregaron aproximadamente 8 mL de NaOH al 40 % y se conectó al aparato de destilación microkjeldahl. El producto de la destilación se recogió en un matraz Erlenmeyer que contenía 10 mL de la mezcla del indicador y ácido bórico para determinar por titulación con HCl 0.01 N.

Para la determinación de K intercambiables se agitaron 5 g de suelo con 33 mL de solución de acetato de amonio en tubo de polietileno de 100 mL durante 30 min a 2500 rpm hasta que el sobrenadante estuviera claro el cual se decantó en un matraz de 100 mL, luego se repitió la extracción otras dos veces y finalmente se aforó con acetato de amonio. De esta solución aforada se tomó 1.0 mL de solución de cloruro de cesio acidificada y 8 mL de agua y se mezcló. La concentración de K se midió por espectrofotometría de Absorción Atómica (AA) en modo de emisión a la longitud de onda correspondiente y el color por tabla de colores (Munsell, 1973).

3.2.1.5. Textura del suelo por el procedimiento del Bouyoucos

La textura de un suelo es la cantidad relativa de arenas, limos y arcillas expresadas en porcentaje (%) de la fracción mineral del suelo una vez tamizado por un tamiz de 2 mm de diámetro de malla. Se define como arena a las partículas con tamaños comprendidos entre 0.05 y 2 mm de diámetro; limos a las partículas entre 2 y 50 μm y arcillas al particulado con diámetro inferior a 2 μm . En el presente método se elimina la agregación debida a materia orgánica y la floculación debida a los cationes calcio y magnesio. No se elimina otros cementantes como carbonatos.

Se pesaron 60 gr de suelo ya tamizado en un vaso de precipitados de 500 mL, posteriormente se agregaron 40 mL de agua oxigenada y se dejó evaporar hasta sequedad, se repitió el procedimiento hasta que no hubo efervescencia al agua oxigenada. Dos ataques son suficientes para la mayoría de suelos. Después de eliminar la materia orgánica y llevar a sequedad el suelo, se pesaron 50 g de suelo y se colocaron en un vaso de precipitados de 250 mL. Se agregó agua hasta cubrir la superficie con una lámina de 2 cm. Se adicionó a la muestra de suelo 5 mL de oxalato de sodio y 5 mL de metasilicato de sodio y se dejó reposar durante 15 min.

Se pasaron las muestras de los vasos de precipitado a las copas del agitador mecánico, pasando todo el material con la ayuda de una piceta. Se activaron los agitadores y se procedió a dispersar cinco minutos. Al finalizar el tiempo de agitación se pasó el contenido a una probeta de 1000 mL (figura 14a). Se agregó agua destilada hasta completar un litro en la probeta. Una vez completado el litro en la probeta se sumerge el Bouyoucos y se toma la lectura en los primeros 40 s y se toma la temperatura, después de 2 h transcurridas se toma la segunda lectura y la temperatura cuidando de alterar lo menos posible la suspensión (figura 14b).

Para determinar los contenidos de arena, limo y arcilla consultar el apartado 7.1.9. del método AS-19 de la NOM-021-RECNACT-2000. Con el resultado de contenidos de limo, arena y arcilla se determina la textura correspondiente con el triángulo de texturas.

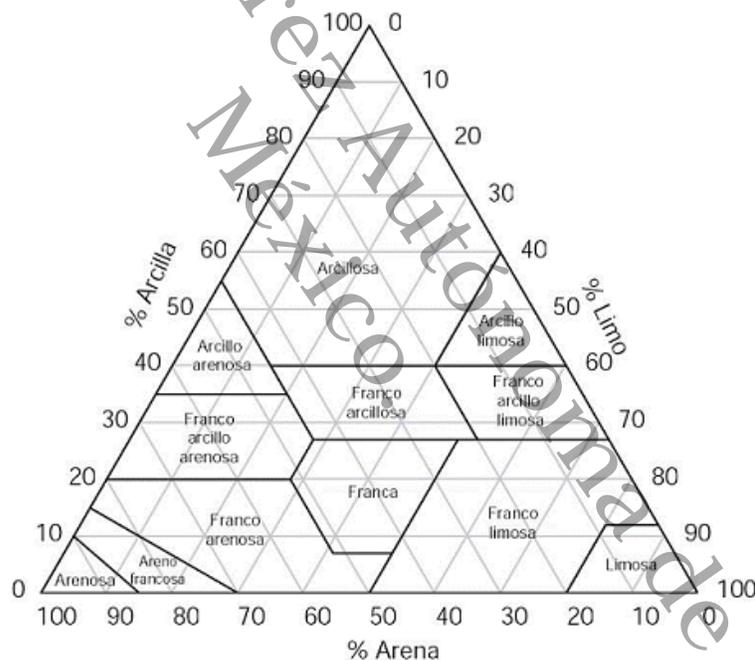


Figura 14. Triángulo de texturas

3.2.1.6. Densidad real por el método del picnómetro

La densidad real de un suelo puede ser calculada a partir a partir del conocimiento de dos parámetros: la masa y el volumen de una cierta cantidad del suelo. La masa es determinada pesando directamente el suelo y el volumen de manera indirecta por el

cálculo de la masa y la densidad del agua (o cualquier otro fluido) desplazada por la muestra de suelo.

Se pesó un picnómetro limpio y perfectamente seco (ec.2). Posteriormente se colocó en el interior del picnómetro 5 g de suelo usando un embudo de plástico. Una vez colocado el suelo dentro del picnómetro se tomó el peso de este, manteniendo el matraz completamente limpio (evitar humedad y/o grasa en las manos) (ec.3). Se le adicionó agua destilada hervida recientemente y fría hasta la mitad del volumen del picnómetro; se giró entre los dedos con mucha suavidad y se colocó en el desecador con vacío.

Se mantuvo a vacío durante 15 min para eliminar todo el aire retenido en el suelo. La succión de la bomba se aumentó paulatinamente para evitar pérdidas de material por formación de espuma. Ya transcurrido los 15 min, se dejó reposar dentro del desecador durante 30 min aproximadamente para eliminar el vacío del desecador paulatinamente, una vez transcurrido el tiempo se retiró del desecador y se llenó hasta el aforo con agua destilada hervida y fría. Se secó perfectamente el exterior del picnómetro y se pesó en la balanza analítica (ec.4). Una vez tomado el peso, se retiró el contenido del picnómetro y se le tomó la temperatura. Se volvió a llenar el picnómetro con agua hervida y fría, se pesó y se tomó la temperatura (ec.4).

Para determinar la densidad real se realizaron los siguientes cálculos:

Peso de las partículas del suelo (ps)

$$Ps = (2) - (1) \dots\dots\dots(ec.2)$$

Volumen de las partículas del suelo (VS)

$$vs = \frac{(4)-(1)}{pw} - \frac{(3)-(2)}{pw} = \frac{\text{peso del agua desplazada por partículas del suelo}}{\text{densidad del agua}} \dots\dots(ec.3)$$

$$\text{Densidad real } (\rho_s) = \frac{ps}{vs} \dots\dots(ec.4)$$

para corregir el valor de la densidad del agua por efecto de la temperatura ir al cuadro de temperaturas del apartado 7.1.4 del método AS-04 de la NOM-021-RECNACT-2000.

3.2.1.7. Densidad aparente

La densidad aparente de una muestra de suelo es calculada a partir del conocimiento de dos parámetros: la masa del suelo y el volumen total, es decir el volumen de los sólidos y el volumen ocupado por el espacio poroso.

Se utilizaron dos terrones de aproximadamente dos cm y se metieron a secar a la estufa a 105 °C hasta mantener un peso constante. A uno de los terrones se le colocó un hilo procurando que quedara bien sujeto y en el otro extremo del hilo una lazada para sujetarla al brazo del platillo de la balanza, posteriormente se pesó el terrón sujetando la lazada al brazo del platillo de la balanza, este se tomó como el peso del terrón al aire [(Pt)a]. Una vez tomado el peso se procedió a sumergir el terrón en la parafina derretida a 60 °C cuidando que quedara completamente cubierta por una capa delgada y uniforme. Se pesó el terrón parafinado al aire [(Ptp)a]. También se sumergió el terrón parafinado en agua colocando dentro de la balanza el recipiente con agua solo para introducir el terrón y se registró el peso [(Ptp)w]. Para calcular la densidad aparente se realizaron los siguientes puntos:

1. Volumen del H₂O desplazado por el terrón
(Ptp)a – (ptp)w = considerando una $\rho_w = 1 \text{ g/cm}^3$ que es igual (Vt+Vp)
2. (Ptp)a – (pt)a = peso de la parafina (Pp)
3. Pp = Vp = Volumen de la parafina (Vp)
4. (Vt + Vp) – Vp = volumen del terrón (Vt)

$$\frac{(Pt)a}{Vt} = \text{densidad aparente} \dots\dots\dots (\text{ec.5})$$

ρ_w = Densidad de H₂O

ρ_p = Densidad de la parafina (0.90 g/cm³)

3.2.2. Caracterización fisicoquímica del suelo contaminado

Los análisis físicos y químicos se realizaron conforme a la: NOM-021-RECNACT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreos y análisis. En la tabla 4 se muestran los métodos utilizados.

Tabla 4. Parámetros analizados al suelo contaminado

Parámetros	Referencias y métodos
	NOM-021-RECNACT-2000
Temperatura	
Textura	AS-09
pH	AS-02
Conductividad eléctrica	AS-18
Densidad real	AS-04
Densidad aparente	AS-03
Análisis elemental	
Hidrocarburos derivados del petróleo	NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012

3.2.2.1. Determinación de los suelos-hidrocarburos fracción pesada por extracción y gravimetría establecido en la NMX-AA-134-SCFI-2006

En una balanza semi-analítica (VE-300, Velab) se pesaron 10 g de suelo contaminado y se mezclaron con 15 g de Na₂SO₄ anhidro A.C.S., (figura 15a) posteriormente se trituró hasta que la muestra no presentara grumos (polvo fino). Una vez obtenida la mezcla homogénea se transfirió a un matraz Erlenmeyer (250 mL, CIVEQ), al que se le añadieron 30 mL de Hexano A.C.S. (figura 15b), para luego ser introducido a un baño ultrasónico (LUC-405, Labtech), por un tiempo de sonicación de 20 min, lavándolo de acuerdo a la EPA 3550C (figura 15c).

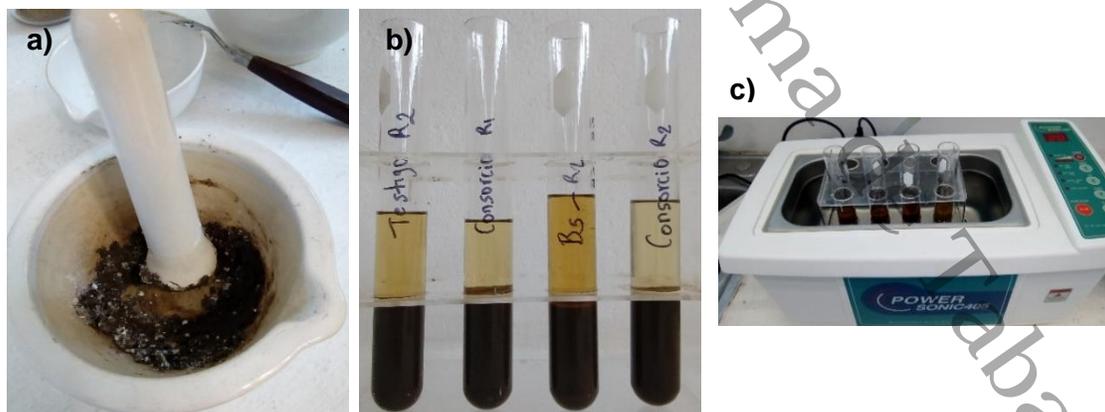


Figura 15. Triturado de la muestra de suelo con Na₂SO₄ anhidro; b) Muestras de suelo con n-Hexano; c). Sonicado de las muestras

Terminado el tiempo de sonicación, el extracto fue filtrado a través de un papel filtro libre de grasa, en el matraz bola tarado (figura 16a) (se repitió dos veces más este proceso), una vez obtenido el filtrado en el matraz, este se conectó al aparato de destilación para destilar el disolvente a una temperatura de 75 °C durante 30 min (figura 16b). Al terminar la destilación se retiró el matraz que contenía el Material Extraíble con Hexano (MEH) de la fuente de calor y se retiró toda la humedad y grasa de la superficie exterior del matraz, para llevarlo a la estufa a 125 °C durante 1 h, transcurrido el tiempo se retiró de la estufa y se colocó en un desecador por 30 min para enfriarlo y llevarlo hasta peso constante (figura 16c).

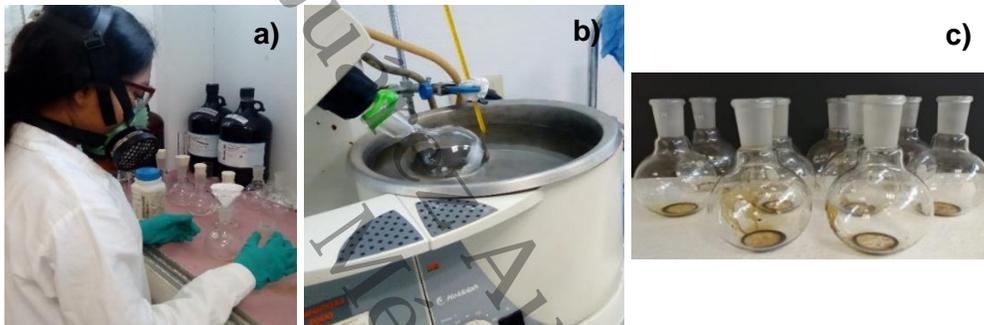


Figura 16. a) Filtrado del extracto; b) Destilación del disolvente; c) Material Extraíble con n-Hexano (MEH)

La concentración del Material Extraíble con n-Hexano (MEH) se determinó mediante la ecuación 6:

$$MEH \left(\frac{mg}{kg} \text{ en base húmeda} \right) = \frac{W_h * 1000 * 1000}{W_s} \dots \dots \dots (ec.6)$$

Donde:

Wh= es el peso MEH seco (W2-W1)

W1= es el peso del matraz tarado

W2= es el peso del matraz con MEH seco en g

Ws= es el peso de muestra (suelo) en g.

Para la determinación de hidrocarburos fracción pesada se procedió a tratar el MEH con sílica gel. Debido a que la capacidad de la sílica gel no se conoce para todas las sustancias, se asume que 3 g normalmente adsorberán 100 g de todos los materiales.

Por lo que todas las muestras que contienen hasta 1000 mg de MEH en la alícuota analizada, necesitarán un máximo de 30 g de sílica gel. La cantidad que puede ser utilizada para la adsorción en el procedimiento de SGT-MEH se limita a 30 g debido a posibles impurezas extraíbles en la sílica. Si la cantidad de MEH en la muestra es mayor a 1000 mg, diluir el extracto.

Se le adicionó al matraz con MEH la cantidad de sílica gel calculada, también se le agregaron 85 mL de n-Hexano para disolver el MEH. Ya que estaba completamente disuelto se filtró la disolución a través de un papel filtro humedecido con n-Hexano en un matraz bola de ebullición previamente tarado (figura 17a). Se enjuago la sílica gel y el papel filtro con pequeñas porciones de n-Hexano y se transfirieron los enjuagues al matraz. Se conectó el matraz de ebullición al aparato de destilación para destilar el disolvente, se ajustó la temperatura a 75 °C para completar está a 30 min a fin de evitar proyecciones y pérdidas de la muestra. Cuando terminó la destilación se retiró el matraz de la fuente de calor y se secó con una toalla absorbente para retirar el exceso de humedad y grasa del matraz. Se colocó el matraz en una estufa a 125 °C durante 45 min, transcurrido el tiempo se retiró de la estufa y se colocó dentro de un desecador para enfriarse durante 30 min. Se repitió el ciclo de secado, enfriamiento y pesado hasta tener un peso constante (figura 17b).



Figura 17. a) Filtrado del extracto con sílica gel; b) Concentración de hidrocarburos fracción pesada

Los cálculos para la concentración de HFP en la muestra se muestran a continuación:

$$\text{SGT-MEH (mg/kg en base húmeda)} = \frac{W_2 - W_1 \times 1000 \times 1000 \times fd}{W_s} \dots\dots\dots (\text{ec. 7})$$

Donde:

W₁ = es el peso del matraz a peso constante en g

W₂ = es el peso del matraz con HFP en g;

W_s = es el peso de muestra (suelo) húmeda en g, y

*fd = es el factor de dilución si aplica.

Para reportar los resultados en base seca se utiliza el siguiente calculo:

$$\text{HFP (mg/kg en base seca húmeda)} = \frac{\text{HFP(base húmeda)} \times 100}{100 - \% \text{ humedad de la muestra}} \dots\dots\dots (\text{ec.8})$$

Donde:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(\text{peso del bote con suelo contaminado} - \text{peso del bote con suelo seco})}{\text{peso suelo húmedo}} \times 100 \dots\dots\dots (\text{ec.9})$$

3.2.2.2. Determinación del contenido de humedad del suelo por gravimetría (NOM-021-SEMARNAT-2000)

Se pesaron cajas petri limpias, en una balanza semi-analítica (VE-300, Velab), se metieron al horno de secado (9053A, Ecoshel) a una temperatura de 105 °C, por dos horas hasta alcanzar un peso constante, este se tomó como el peso del bote (PB). Una vez alcanzado el peso constante, se adicionó 30 g de suelo contaminado (figura 18a), posteriormente se volvió a tomar el peso de las cajas con el suelo húmedo (PB + Psh) una vez ya pesado se metió al horno hasta sequedad (figura 18b) (105°C por 24 hrs) transcurrido el tiempo se metieron las cajas con muestra a un desecador para que se enfriaran y después se pesaran, este peso fue del bote más el peso del suelo seco (PB + Pss). Ya pesadas se procedió a meterlas al horno por una hora más. Después se sacaron a enfriar y a pesar, este proceso se repitió hasta obtener un peso contante.



Figura 18. a) Pesado de la muestra en la caja petri; b) Muestras llevadas al horno para sequedad a 105 °C

Con los datos obtenidos en el procedimiento, se aplicó la siguiente ecuación:

$$\theta g = \frac{(PB+Psh)-(PB+Pss)}{(PB+Pss)-PB} \times 100 \dots\dots (ec.10)$$

Donde:

##g = contenido de humedad gravimétrica expresada en porcentaje (%)

PB = peso del bote (g)

Psh = peso del suelo húmedo (g)

PB + Psh = peso del bote más peso del suelo húmedo (g)

PB + Pss = peso del bote más peso del suelo seco (g)

3.2.2.3. Análisis por espectrofotometría infrarrojo (FTIR) para evaluar la biodegradación de hidrocarburos

La espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR, por sus siglas en inglés) es una técnica cualitativa que permite identificar de manera rápida compuestos desconocidos, con menor ruido analítico y mayor sensibilidad óptica en relación con instrumentos IR que no tienen integrado el logaritmo FT. El análisis de los hidrocarburos se realizó de manera cualitativa y se llevó a cabo empleando FTIR, el espectro fue tomado en la región media (fundamental), entre 400 y 4000 cm^{-1} , ajustando la transmitancia T a 100 %. Las muestras del extracto se mezclaron con KBr a una concentración de 10 % p/p. Después fueron prensadas para obtener pastillas

para después ser analizadas. Los espectros fueron obtenidos a 10 scan, los análisis se realizaron en un FT-IR marca Shimadzu IRAffinity-1 (figura 19).



Figura 19. Espectrofotómetro FT-IR Shimadzu IRAffinity-1

3.2.2.4. Determinación de los suelos-hidrocarburos fracción media por cromatografía de gases con detector de ionización de flama establecido en la NMX-AA-145-SCFI-2008

Para procesar la muestra de suelo contaminado con petróleo se pesaron 30 g de suelo en una balanza semi-analítica (VE-300, Velab) y se agregó a un mortero adicionándole 15 g de Na₂SO₄ anhidro A.C.S., se trituro hasta obtener una consistencia homogénea, la cual se vertió en un matraz Erlenmeyer (250 mL, CIVEQ), adicionando 40 mL de una disolución 1:1 (v/v) de hexano H.P.L.C./acetona H.P.L.C. el matraz Erlenmeyer se introdujo en un baño ultrasónico (LUC-405 Labtech), y se sónico por 5 min (EPA 3550C). Ya transcurrido los 5 min se retiró el matraz del baño ultrasónico y el extracto se filtró a través de un papel filtro libre de grasa, en un matraz bola. La separación del disolvente se realizó en un rotavapor (LABORATO 4000-Heidolph) a 60 °C hasta llevar a un volumen final de 3 mL. Una vez obtenida la muestra concentrada se colocó en un vial de 2 mL (figura 20a), para su inyección al cromatógrafo de gases (GCMS-QP2010, Shimadzo) (figura 20b). El cromatógrafo de gases tiene acoplado un detector de ionización de flama (CG-FID).

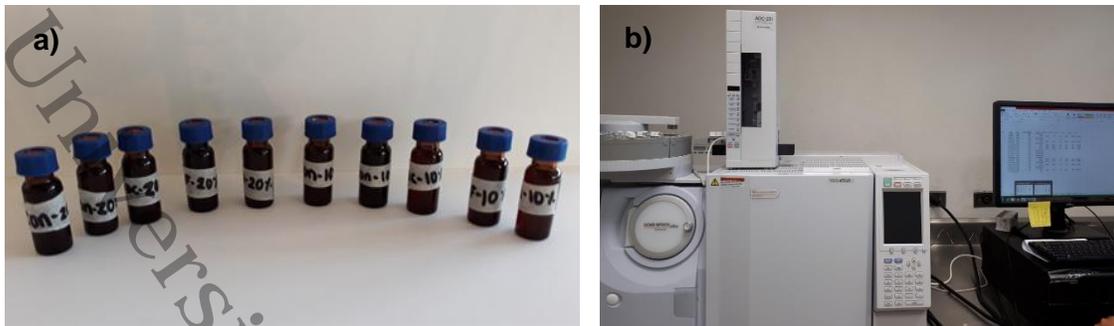


Figura 20. a) Muestras de HFM en viales de 2 mL; b) Cromatógrafo de gases (GCMS-QP2010, Shimadzu)

El cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama genera un aspecto de cuantificación (cromatograma de los compuestos detectados) con respecto a la curva de calibración vigente. Dicho informe contiene los valores de suma de áreas, en los intervalos de tiempos de retención de C₁₀ a C₂₈.

$$C_m = \frac{(X_m)(V_t)(D)}{(V_{ex})(m_m)} \dots\dots (ec.11)$$

Donde:

C_m= es la concentración en la muestra (µg/kg)

X_m= es la masa del analito calculada (en nanogramos) en la alícuota de la muestra inyectada en el instrumento

V_t= es el volumen total del extracto concentrado

D= es el factor de dilución

V_{ex}= es el volumen del extracto inyectado (en µL). El volumen de inyección nominal para las muestras y para los estándares de calibración debe ser el mismo.

3.2.2.5. Análisis elemental del suelo por espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS)

Para el análisis elemental del suelo las muestras de suelo fueron secadas a la sombra a temperatura ambiente, tamizadas y homogeneizadas. Después, las muestras fueron colocadas en un desecador por 2 h para eliminar los restos de humedad. Finalmente se colocaron sobre cinta de carbono de doble cara en un portamuestras (figura 21a) y se observaron en condiciones de bajo vacío en un microscopio electrónico de barrido JEOL Modelo 6010-LA a 20 kV a 1500x 3500x y 5000x. Para el procesamiento de imágenes se utilizó el Software InTouchScope™ (figura 21b).



Figura 21. a) Portamuestras; b) Software InTouchScope™, microscopio electrónico de barrido JEOL Modelo 6010-LA

3.3. ETAPA III: Aislamiento e identificación de bacterias degradantes de petróleo

El proceso de aislamiento de las bacterias se realizó utilizando suelo contaminado obtenido del área de estudio y el medio de sales minerales (MSM), con la finalidad de determinar el tipo de bacterias presentes de acuerdo a su caracterización morfológica y fenotípica.

3.3.1. Medio de cultivo

El medio de sales minerales (MSM) contenía 10 g/L de NaCl, 1.5 NH₄NO₃, 0.5 K₂HPO₄, 0.5 KH₂HPO₄, 0.02 FeSO₄, 0.1 MgSO₄, 0.1 CaCl₂, 0.0005 MnSO₄ y 0.00064 g/L de ZnCl₂. El medio se ajustó a pH 7.0 y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 min antes de su uso (figura 22). El petróleo se usó como su única fuente de carbono y energía para el enriquecimiento y el aislamiento de las líneas de degradación del hidrocarburo (Ma *et al.*, 2015). El petróleo también fue esterilizado en autoclave antes de su uso.



Figura 22. Medio de sales minerales (MSM+ suelo + hidrocarburo)

3.3.1.1. Aislamiento de las cepas bacterianas

En un matraz Erlenmeyer de un litro se preparó el inoculó el cual contenía diez gramos de muestra de suelo contaminado y 200 mL de medio de MS que contenían 10 g/L de hidrocarburo como su única fuente de carbono (figura 23a). El cultivo se mantuvo en un biorreactor y transcurrido los primeros tres días el cultivo se enriqueció con tres

inoculaciones consecutivas (figura 23b) (en las mismas condiciones) en un periodo de 16 días (Ma *et al.*, 2015).



Figura 23. a) Biorreactor con medio sales minerales (MSM + suelo + petróleo); b) Enriquecimiento con medio fresco al biorreactor

Después del enriquecimiento, para conocer las colonias de bacterias en unidades formadoras de colonias, estas se determinaron por el conteo de células viables mediante el método en placa usando diluciones seriadas. Se tomó una alícuota del inóculo y se prepararon las diluciones (Madigan *et al.*, 2017), por triplicado se colocaron las cajas petri con su respectivo medio de cultivo: medio de sales minerales (MSM + agar + 10 g/L de petróleo), en cada placa de agar se distribuyeron alícuotas de 0.1 mL. Las placas de agar se incubaron bajo condiciones aeróbicas a 30 °C durante 4 a 5 días donde se logra la expresión de estos microorganismos (figura 24).



Figura 24. Proceso de sembrado a) Adición de hidrocarburo al MSM; b) Homogeneizado de MSM + hidrocarburo; c) Vaciado de MSM en palcas; d) Rastrillado de alícuota de la solución madre

3.3.2. Caracterización morfológica a nivel colonia

Las colonias de bacterias se caracterizaron en su morfología externa a nivel colonia en placa, esta identificación se basó en la observación de las características del desarrollo en medio sólido evaluando su forma, elevación, borde, consistencia y color (figura 25) (Kumar *et al.*, 2015).

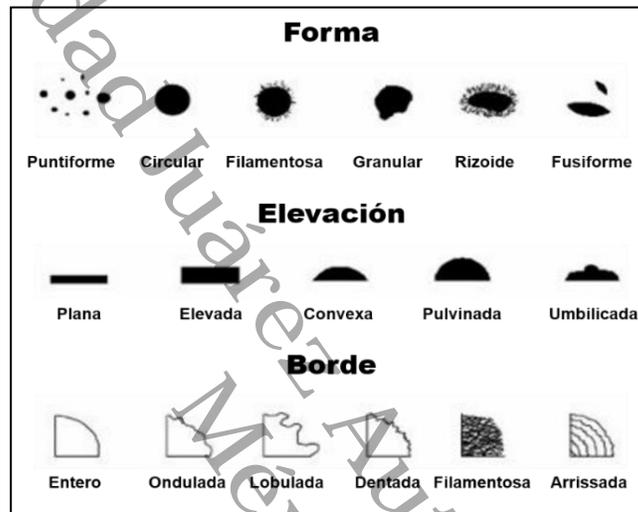


Figura 25. Caracterización macroscópica a nivel colonia (Koneman & Allen, 2008)

Se aislaron colonias individuales representativas de las placas en MSM para llevar a cabo experimentos adicionales.

3.3.3. Caracterización fenotípica de los aislados bacterianos que degradan el petróleo

Los aislados bacterianos que salieron seleccionadas como degradadoras de petróleo se caracterizaron mediante la tinción de Gram y morfología celular como sigue:

3.3.3.1. Tinción de Gram

Para iniciar con la identificación de una bacteria, se comienza determinando si es gram-positiva o gram-negativa. La caracterización interna se realizó a cada una de las cepas encontradas, para caracterizar cada aislado se usó la tinción de Gram. Esta es una tinción diferencial y la respuesta a la tinción se debe a diferencias en la estructura de la pared celular de las células Gram positivas y Gram negativas. El procedimiento

empleado fue el propuesto por Madigan *et al.*, 2012. De la cepa aislada se tomó un frotis y se colocó sobre un porta-objeto (figura 26a), el frotis fue fijado a la llama, después se adicionó la solución de cristal violeta y se mantuvo sobre el frotis durante un min (figura 26b). (Resultado: todas las células se tiñen de color violeta). Posteriormente se adicionó la solución yodo-yodurada de lugol y se mantuvo sobre el frotis durante un min (figura 26c). (Resultado: todas las células permanecen de color violeta). Después se realizó la decoloración breve con alcohol y se mantuvo sobre el frotis durante 20 s (Resultado: las células Gram positivas permanecen de color violeta y las Gram negativas se decoloran). Finalmente se agregó la solución de safranina y se mantuvo sobre el frotis durante 2 min (figura 26d) (Resultado: las células Gram positivas se ven de color violeta y las Gram negativas de color rosa). La tinción de las células bacterianas se observó en microscopio, para esto se colocó una gota de aceite de inmersión en el portaobjetos para examinar con objetivo de 10X en el microscopio óptico.



Figura 26. Tinción de Gram de cepas bacterianas: a) Preparación del frotis; b) Adición de la solución de cristal violeta; c) Adición de la solución yodo-yodurada de lugol y d) Adición de solución de safranina

3.3.3.2. Pruebas bioquímicas API 20 E

Para el estudio taxonómico de los aislamientos bacterianos se utilizó el análisis fenotípico del sistema API 20E (Biomeriux, 2017) descrito por Logan y Berkeley (1984). La galería API 20E consta de 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados de las pruebas bioquímicas tradicionales. Se inoculan con una suspensión bacteriana que rehidrata los medios y después de la incubación se observan los cambios de color con o sin adición de reactivos según las instrucciones del fabricante. Posteriormente,

el resultado se observa y registra a las 24-48 h de incubación, consultando la tabla de identificación del sistema API 20E (API 20E Analytical Profile Index, Bio-Mériux, 2019) (figura 27).



Figura 27. Galería API 20E con suspensión bacteriana a los 48 días de incubación

3.3.3.3. Morfología celular

La morfología celular de las cepas bacterianas aisladas se analizó por microscopía electrónica de barrido (MEB) siguiendo el procedimiento propuesto por Bozzola & Russell (1999) y Vázquez & Echeverría (2000). La preparación de las muestras consistió en lo siguiente: de una caja petri se extrajo con un asa estéril una porción del aislado, después fue depositada en un tubo para centrifuga que contenía 6 mL de solución fisiológica. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min, después el sobrenadante fue eliminado. Este procedimiento se realizó 4 veces más, con el fin de lavar las células para eliminar el exopolisacárido. Posteriormente, con un asa de platino estéril se extrajeron las células lavadas y se depositaron sobre una lámina de aluminio de 4 x 4 cm, después la muestra fue distribuida. Con el fin de fijar las células se adicionó glutaraldehído ($\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$) al 2 % de tal forma que cubriera la lámina por 5 min y después se deshidrató con diluciones progresivas de etanol al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 y 100 % durante 10 min por cada solución de etanol. Después, las muestras fueron colocadas en un desecador por dos h para eliminar los restos de humedad. Finalmente se colocaron sobre cinta de carbono de doble cara en un portamuestras y se observaron en condiciones de bajo vacío en un microscopio

electrónico de barrido JEOL Modelo 6010-LA a 20 kV a 1500x 3500x y 5000x. Para el procesamiento de imágenes se utilizó el Software InTouchScope™ (figura 28).



Figura 28. Preparación de las muestras para micrografías

3.3.4. Evaluación de la producción de biomasa bacteriana

Para determinar la máxima tasa de crecimiento bacteriano de las tres cepas degradadoras de petróleo encontradas en el apartado 3.3, se probó la efectividad de un fertilizante granulado utilizado comúnmente en la agricultura. El NPK 12-11-18 se usó como fuente de nitrógeno inorgánico y glucosa como única fuente de carbono, como medios nutritivos en los cultivos bacterianos. Para llevar a cabo este experimento se realizaron los siguientes procedimientos:

3.3.4.1. Establecimiento de los biorreactores

Cada unidad experimental requirió de un matraz Erlenmeyer de 500 mL de capacidad nominal y un tapón de goma horadado a los cuales se les instalaron tres tubos de vidrio con un diámetro de 3 mm (figura 29). Un primer tubo funcionó para alimentar aire mediante flujo impulsado por un compresor de 1.5 Watts (Elite 802), acoplado con un filtro Vacushield™ Microporo (0.45 μm) para evitar el paso de microorganismos no deseados. Un segundo tubo se utilizó como salida de aire o venteo atmosférico para liberar la presión del sistema (Hernández et al., 2011), y al tercer tubo le fue conectada una venocllisis para la toma de muestra mediante una jeringa de 5 mL. El material de vidrio se esterilizó a calor húmedo en una autoclave a 121 °C durante 15 min a 1,3 Kg/cm² (Ramírez et al., 2001). El número de biorreactores establecidos corresponde

al número de microorganismos que crecieron en la prueba del medio de sales minerales para bacterias degradadoras de petróleo (apartado 3.3).

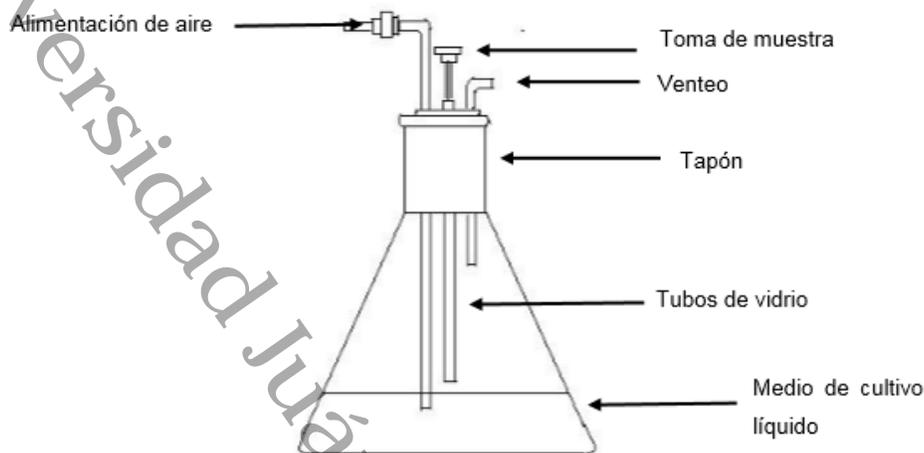


Figura 29. Diseño del biorreactor

3.3.4.2. Preparación del inoculo

La elaboración del inoculo consistió en hacer crecer las bacterias que salieron seleccionadas en la prueba de bacterias degradantes del petróleo (apartado 3.3). De manera individual cada aislado de bacteria se hizo crecer en agar nutriente un medio de cultivo sólido específico para bacterias, para después hacerlas crecer en un medio de cultivo líquido propuesto por Subba Rao, N.S (2001), denominado caldo nutritivo cuya composición se muestra en la tabla 5. Antes de utilizarse el medio de cultivo se esterilizó a calor húmedo en una autoclave a 121 °C durante 15 min a 1,3 Kg/cm² (Ramírez *et al.*, 2001).

Tabla 5. Composición del caldo nutritivo, productor del crecimiento microbiano

Reactivos	Cantidad (g/L)
Extracto de carne	3.0
Peptona	5

En condiciones axénicas en un matraz Erlenmeyer previamente esterilizado que contenía 200 mL de caldo nutritivo se inoculó la bacteria en un ambiente axénico se tomó una placa petri que contenía a la cepa aislada y con el asa de platino se extrajo la biomasa, después se colocó en el caldo nutritivo. La fermentación se mantuvo por 24 h en condiciones aerobias. Una vez transcurrido el tiempo esperado, en condiciones asépticas se extrajo 10 mL del inóculo que posteriormente fueron añadidos a los biorreactores de las unidades experimentales.

3.3.4.3. Diseño experimental para evaluar la producción de biomasa microbiana

Para el bioensayo se estableció un diseño experimental unifactorial completamente al azar. Donde el factor o variable independiente son las relaciones de C/N. Las variables dependientes (Y) es la tasa máxima de crecimiento específico. Los datos fueron evaluados mediante un análisis de varianza y prueba de medias Tukey al 95 % de límite de confianza. En tabla 6 se describe el diseño experimental.

Tabla 6. Diseño experimental unifactorial para evaluar la producción de biomasa bacteriana en los tratamientos

Microrganismos	Factor 1 Concentración de NPK	Repeticiones
B1	C:N= 20	R1, R2, R3
	C:N= 25	R1, R2, R3
B3	C:N= 20	R1, R2, R3
	C:N= 25	R1, R2, R3
B5	C:N= 20	R1, R2, R3
	C:N= 25	R1, R2, R3

El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el modelo estadístico siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + l_i + \epsilon_{ji} \quad i = 1, 2, 3 \dots t \quad j = 1, 2, 3 \dots r \dots \dots \quad (\text{ec. 12})$$

donde:

Y_{ij} = variable respuesta en tratamiento i , repetición j .

μ = media general.

l_i = efecto del tratamiento i .

ϵ_{ji} = error aleatorio; $\epsilon_{ji} \sim N(0, \sigma_2)$.

Los datos obtenidos fueron analizados en el software MINITAB®18 Versión 18.1.0.0.

3.3.4.4. Establecimiento de las unidades experimentales

Cada unidad experimental estaba formada por un matraz Erlenmeyer (biorreactor) de capacidad nominal de 500 mL previamente esterilizado que contenía 200 mL del medio a evaluar como productor de biomasa microbiana cuya composición se muestra en la tabla 7. En condiciones asépticas a cada biorreactor se le agregó 10 mL del inóculo (apartado 3.3.4.2) que contenía el microorganismo (B1, B3 y B5), posteriormente el biorreactor fue sellado y se mantuvo con aireación durante el tiempo que duró el experimento.

Tabla 7. Composición del medio con fertilizante NPK

Reactivos	Cantidad (g/L)	
	C/N:20	C/N:25
Nitrofoska 12-11-18	1	1
Glucosa	6	7.5

Montado el experimento se tomaron las muestras para determinar el crecimiento bacteriano siguiendo el aumento de la densidad óptica a 600 nm en espectrofotómetro GENESYS 20, Spectronic USA. La densidad óptica es convertible a la concentración celular como unidades formadoras de colonias (UFC/mL): $UFC/L = (DO_{600} - 0.0555 / 1.5741)$. Para determinar la concentración celular de las cepas bacterianas se realizó una curva patrón de peso seco (apartado 3.3.5).

3.3.5. Curva de calibración de la biomasa

La determinación de biomasa es una de las variables más importante de un bioproceso ya que su determinación nos lleva a la comprensión de la eficiencia del mismo.

El procedimiento permitió obtener la concentración celular de las cepas B1, B3 y B5 al transformar los valores de absorbancia correspondientes a cada tiempo de fermentación en unidades de gramos de masa celular seca por litro (g/L) (Fujiwara *et al.*, 2016).

Para realizar la curva patrón de peso seco, se preparó una suspensión concentrada de las bacterias (B1, B3 y B5) en medio de cultivo descrito en el apartado 3.3.4.4. Después se realizaron por duplicado diluciones en tubos a peso constante. Al primer lote se le midió la densidad óptica a 600 nm. Al segundo lote se le realizaron lavados con solución salina 0.85 % (p/v) por centrifugación a 300 rpm por 10 min y después fue llevado al horno a 105 °C por 24 h. Terminando el tiempo, los tubos fueron colocados en un desecador y transcurrido el tiempo de enfriamiento se registró el peso final de cada uno de los tubos y se calculó el peso seco de la biomasa con la ec. 13 para obtener la ecuación que relaciona la densidad óptica con la concentración de la biomasa (figura 30).

$$\text{peso seco de biomasa } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{(\text{peso de tubo} + \text{biomasa seca}) - \text{peso inicial del tubo}}{\text{volumen de la muestra}} \dots (\text{ec.13})$$

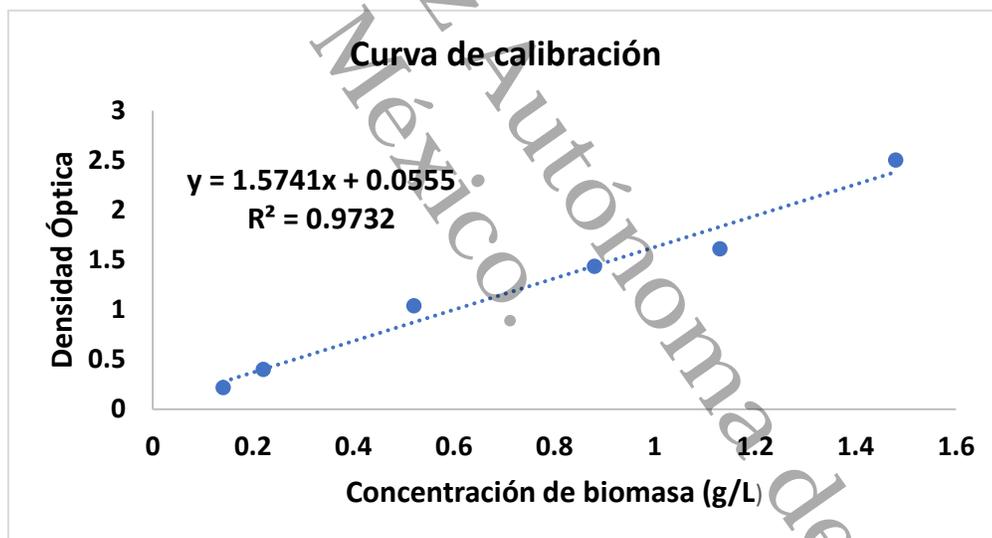


Figura 30. Curva de calibración de biomasa en peso seco

3.3.5.1. Modelamiento cinético del crecimiento microbiano

Entre los modelos no lineales, el modelo de Gompertz modificado se ha aplicado ampliamente para describir la forma sigmoideal asimétrica del crecimiento microbiano, tanto en términos de precisión estadística como de facilidad de uso, en comparación con otras funciones sigmoideales. El modelo de Gompertz modificado consistió en tres fases de curvas de crecimiento microbiano: una fase de retraso inicial donde no hay cambios, seguido de un período de cambio acelerado y desaceleración, y finalmente un periodo estacionario (Hengyuan *et al.*, 2017).

La cinética de crecimiento de la población puede describirse mediante el modelo de Gompertz modificado (Gibson *et al.*, 1987):

$$\text{Lg } N = A + C \times \exp \{- \exp [-B \times (t - M)]\} \dots\dots\dots (\text{ec.14})$$

Donde:

Log N: es el recuento log10 del número de microorganismo en el tiempo *t* (en horas),

A: es el recuento asintótico de *Log a* medida que *t* disminuye indefinidamente,

C: es la cantidad asintótica de crecimiento que ocurre cuando *t* aumenta indefinidamente,

B: es la tasa de crecimiento relativa en *M*

M: es el tiempo en cuál la tasa de crecimiento absoluta es máxima.

Se consideraron la tasa de crecimiento máxima $\mu_{max} (d^{-1})$ y el tiempo de retraso *L* (*d*):

$$\mu_{max} = B \times C / e \dots\dots\dots (\text{ec.15})$$

$$L = M - \left(\frac{1}{B}\right) \dots\dots\dots (\text{ec.16})$$

Aquí *e* es la constante de Euler, que es la base de los logaritmos naturales (aproximadamente 2.7183).

3.3.6. Métodos de detección de la capacidad para producir biotensioactivos

Se determinó la capacidad para producir biotensioactivos por medio de tres métodos: gota colapsada, difusión del diámetro de gota de aceite y hemólisis, también se realizó el índice de emulsificación. Todos los ensayos se realizaron al menos por triplicado. Cada cepa se inoculó en un matraz Erlenmeyer que contenía 200 mL del medio de cultivo seleccionado para el crecimiento microbiano descrito en el apartado 3.3.4.4. Para este método se utilizaron las cepas seleccionadas con la máxima tasa de crecimiento microbiano con respecto a la mejor relación C/N, una vez inoculadas las bacterias en el caldo nutritivo se dejaron en aireación hasta llegar a la fase estacionaria la cual se determinó en el apartado 3.3.5.1 Durante el periodo de la fase estacionaria se realizó la toma de muestra cada ocho horas. Con la ayuda de una jeringa se tomaron 30 mL del caldo de cultivo y se guardaron en frascos ámbar, posteriormente se guardaron en el refrigerador a 4 °C. Las muestras B1CN25, B3CN20 y B5CN20 se llevaron las muestras a centrifugación a 6000 rpm durante 20 min. Una vez centrifugado se recuperó el sobrenadante para realizar los métodos que se describen a continuación.

3.3.6.1. Actividad hemolítica

Se prepararon placas de agar sangre conteniendo 5% (v/v) de sangre de carnero y Agar Base Sangre (figura 31); ya solidificado el agar sangre se realizaron cuatro cortes con el sacabocado y posteriormente se colocaron 40 µL del caldo libre de células dentro de los pocillos. Las placas se incubaron a 30 °C durante 24 a 48 h para observar los resultados. La actividad hemolítica se determinó por la presencia de una zona clara alrededor de la colonia. Los biosurfactantes pueden causar la lisis de los eritrocitos de la sangre. La presencia de un halo de hemólisis alrededor de la cepa indica la lisis de los eritrocitos y, por lo tanto, la presencia del biosurfactante (Lara *et al.*, 2017).



Figura 31. Preparación y vaciado de las placas de agar sangre

3.3.6.2. Gota colapsada

Se colocaron aproximadamente 40 μL del caldo libre de células sobre la superficie hidrófoba de la tira de Parafilm para observar la forma de la gota (figura 32). La presencia de biosurfactante conduce a una reducción de la tensión interfacial entre la película hidrófoba y la gota hidrófila, lo que provoca la aparición de gotas planas/colapsadas sobre la película (Joy, Rahman, & Sharma, 2017).



Figura 32. Gotas colapsadas sobre la tira de Parafilm

3.3.6.3. Difusión del diámetro de la gota de aceite

Se vertieron aproximadamente 30 mL de agua destilada en una placa Petri de 90 mm de diámetro seguido de la adición de 30 mL de petróleo sobre la superficie del agua para formar una capa de aceite. Posteriormente, se colocaron suavemente en el centro de la superficie de la capa de aceite 10 μL de caldo libre de células. El diámetro del aceite desplazado se eligió como criterio para la selección de productos potentes de biosurfactantes (figura 33) (Álvarez *et al.*, 2015).

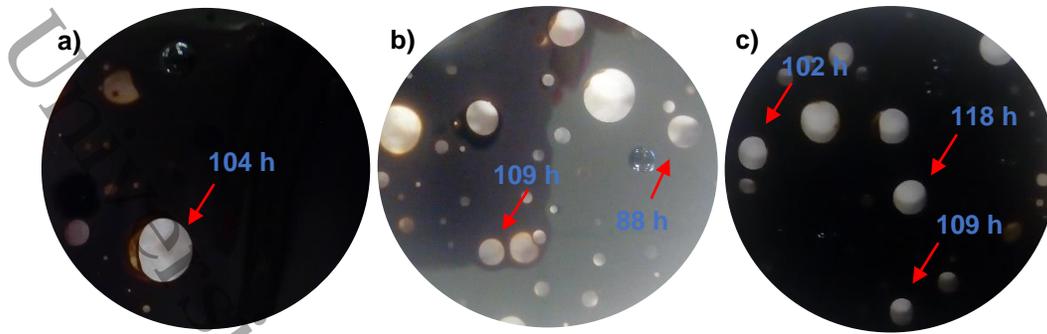


Figura 33. Difusión del diámetro de la gota de aceite; a) B1; b) B3; c) B5

3.3.6.4. Método de Índice de emulsificación (I.E%)

Se determinó adicionando 2 mL del caldo libre de células a 2 mL de petróleo en un tubo de ensayo. Esta mezcla se agitó con vórtex a alta velocidad durante 2 min y luego se dejó reposar durante 24 h. El índice de emulsificación (E_{24}) se define como la relación entre la altura de la capa de emulsión y la altura total y expresada como porcentaje (figura 34) (Lara *et al.*, 2017).



Figura 34. Emulsificación de las muestras del caldo libre de células (B1, B3, B5)

3.4. ETAPA IV: Preparación de las unidades experimentales para biorremediación

Se prepararon 15 charolas tres por cada tratamiento (B1, B3, B5, Consorcio y Testigo) a las cuales se les agregó 4 kg de suelo contaminado a $4607 \pm 11.26 \text{ mgKg}^{-1}$ de HFP, una vez preparadas las unidades experimentales se les agregó 2 L de caldo de cultivo (figura 35a) el cual se seleccionó en el apartado 3.3.4.4. (B1CN25, B3CN20, B5CN20). Para el tratamiento "Consortio (Con)" se le agregó la mezcla de los tres tratamientos seleccionados en igual proporción. Para la adición del caldo de cultivo se tomó como referencia las horas en las cuales se presentó producción de biosurfactante en los métodos de detección. Al tratamiento control "Testigo (Testg)" solo se le agregaron 2 L de agua de la llave.

Durante el proceso de biorremediación (60 días) las muestras se mantuvieron en constante aireación (bioventeo) y se le agregaron 500 mL de agua de la llave cada dos días para mantener el 50 % de humedad. Se monitoreo la temperatura de las muestras, pH, conductividad eléctrica, cuantificación de HFP y UFC al inicio, a los 15, 30, 45 y 60 días del experimento. El análisis elemental de las muestras, así como los HFM, densidad real y aparente, y el análisis de las fracciones pesadas del petróleo se monitorearon al inicio y al día 60 del proceso.

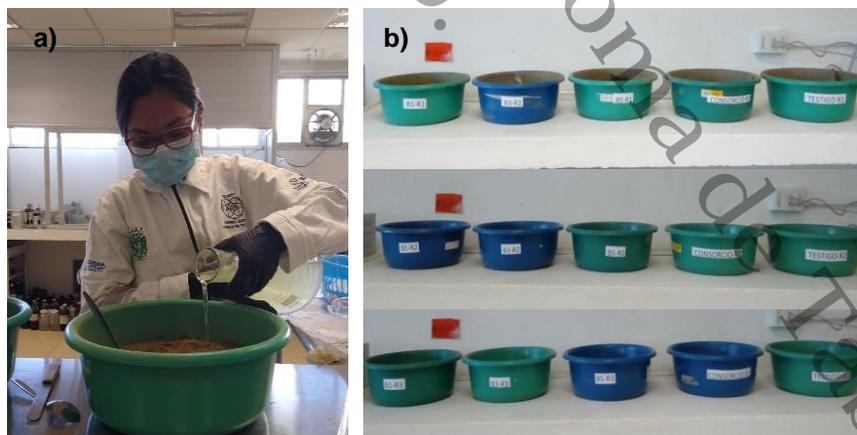


Figura 35. a) Adición del caldo de cultivo al suelo; b) establecimiento de las unidades experimentales

3.4.1. Diseño experimental

Para el bioensayo se estableció un diseño experimental unifactorial completamente al azar. Donde el factor o variable independiente son los tratamientos (B1, B3, B5, Con y Testg). La variable dependiente (Y) es la concentración de petróleo. Los datos fueron evaluados mediante un análisis de varianza y prueba de medias Tukey al 95 % de límite de confianza. En la tabla 8 se describe el diseño experimental.

Tabla 8. Diseño unifactorial completamente al azar para evaluar la biodegradación del petróleo

Factor 1 (microorganismos)	Tipo de suelo	Concentración HFP	Repeticiones
B1	Fluvisol	4607	R1, R2, R3
B3	Fluvisol	4607	R1, R2, R3
B5	Fluvisol	4607	R1, R2, R3
Con	Fluvisol	4607	R1, R2, R3
Testg	Fluvisol	4607	R1, R2, R3

El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el modelo estadístico siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + l_i + \epsilon_{ji} \quad i = 1, 2, 3 \dots t \quad j = 1, 2, 3 \dots r \dots \dots \dots \quad (\text{ec. 17})$$

donde:

Y_{ij} = variable respuesta en tratamiento i , repetición j .

μ = media general.

l_i = efecto del tratamiento i .

ϵ_{ij} = error aleatorio; $\epsilon_{ji} \sim N(0, \sigma_2)$.

Los datos obtenidos fueron analizados en el software MINITAB®18 Versión 18.1.0.0.

3.4.2. Producción y caracterización del biotensioactivo

La producción del bioactivo fue desarrollada usando el aislado previamente seleccionado con base al diseño experimental del apartado 3.4.1, este fue el B360 y fue cultivado en el medio que proporcionó un mayor crecimiento de biomasa bacteriana, el cual contenía Nitrofoska como fuente de nitrógeno y glucosa como fuente de carbono (Tabla 8). Antes de utilizarse el medio de cultivo se esterilizó a calor húmedo en una autoclave a 121 °C durante 15 min a 1.3 Kg/cm².

En condiciones axénicas en un matraz Erlenmeyer previamente esterilizado que contenía 1 L de medio de cultivo se inoculó la bacteria B3 y después se mantuvo en zona oscura por 72 h (figura 36). Una vez transcurrido el tiempo, en condiciones asépticas se extrajo el caldo de los biorreactores.



Figura 36. Establecimiento del biorreactor con el Medio de cultivo

Centrifugación

Una vez finalizada las 72 h la biomasa fue removida del caldo por centrifugación a 5000 rpm por 30 min en centrifuga marca LABNET, seguidamente el sobrenadante fue recuperado (Almazán *et al.*, 2000) (figura 37).



Figura 37. Centrifugación del caldo de cultivo después de las 72 h de incubación

Filtración

El resto de las células contenidas en el sobrenadante fueron removidas por método de filtración con succión reportado por Hernández *et al.*, 2011. Con la ayuda de un filtro microporo (0.45 μm) mediante succión a vacío (NOVATECH, 67.73 kPa). Para el filtrado se utilizó un embudo Buchner de porcelana de 9 cm de diámetro marca Kavalier. Además, se colocó una trampa de vacío con el fin de proteger la bomba de vacío. El proceso fue repetitivo hasta desprender la mayor cantidad de biomasa.

Extracción con acetona

El caldo libre de células fue mezclado con acetona marca FERMONT a una temperatura de 4 °C, la relación caldo-acetona fue de 1:1.2. la acetona se añadió al caldo lentamente a flujo constante y en agitación. Después, se dejó reposar en embudos de separación de 500 mL, marca PYREX hasta la precipitación de los sólidos (figura 38a). De la fase líquida, la acetona fue eliminada mediante vacío (375 mm Hg) en evaporador rotatorio marca ECISHEL a una temperatura de 40 °C y 30 rpm (figura. 38b) (Almazán *et al.*, 2000).

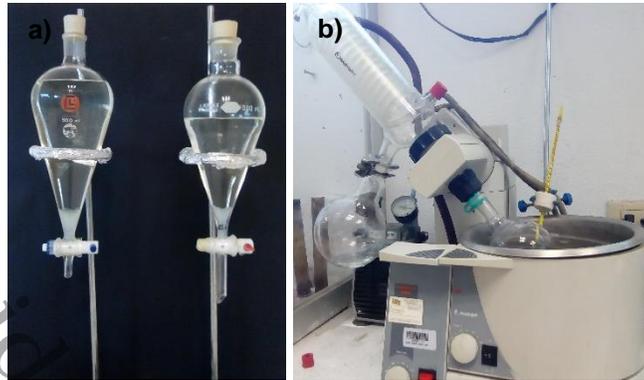


Figura 38. a) Precipitación de los sólidos mezcla, caldo-acetona; b) Eliminación de la acetona en el evaporador rotatorio

Extracción con cloroformo/metanol

El lavado del caldo libre de biomasa y sustancias no tensioactivas se realizó mediante tres extracciones sucesivas con una mezcla de solventes cloroformo/metanol usando una relación de 2:1 (Almazán *et al.*, 2000).

La mezcla de solventes se añadió al caldo con una relación 1:1 lentamente a flujo constante (Mulligan *et al.*, 1989), donde se mezcló homogéneamente con ayuda de un Termo-agitador marca CIVEQ a 885 rpm durante 15 min. Posteriormente, la mezcla homogénea se dejó reposar durante 30 min en embudos de separación de 1000 mL marca PYREX (figura 39). El caldo se separó del sobrenadante por diferencia de densidades. El precipitado fue recuperado para posteriormente ser purificado en un rotavapor ECISHEL a una temperatura de 30 °C a 30 rpm, eliminando la mezcla de solventes, hasta llegar a sequedad.



Figura 39. Separación de primera fracción extraída mezclada con metanol

3.4.3. Identificación de lípidos polares

Se determinó la presencia de los lípidos polares de interés: glicolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos, ya que éstos son los que principalmente presentan propiedades tensioactivas. Se emplearon tres placas de cromatografía de vidrio cubiertas de sílica gel, las cuales fueron preparadas con un espesor de 0.25 mm de 3.5 x 10 cm, una para cada determinación, se le agregaron a cada placa 5 µL de biosurfactante, a 1 cm del borde inferior de éstas, cada placa fue rociada con una solución reveladora: difenilamina, ninhidrina y azul de bromotimol y después aproximadamente a 5 mm de profundidad se sumergieron en una solución disolvente (Hamilton y Hamilton, 1992).

Preparación de soluciones

La solución disolvente se preparó con cloroformo/acetona/metanol/ácido acético/agua destilada usando la relación de 6:8:2:2:1 v/v, lo suficiente para que las placas de cromatografía quedaran en contacto con la solución y esta pudiera ascender por capilaridad y arrastrar los componentes a lo largo de la placa produciendo “manchas” de los lípidos presentes en la muestra.

Solución reveladora de glicolípidos

2 g de difenilamina se disolvieron en 20 mL de etanol, y se agregaron 100 mL de ácido clorhídrico al 38 % de pureza y 80 mL de ácido acético a la solución; la placa se roció con difenilamina y después se calentó a 105 °C en una estufa marca MEMMERT por espacio de 25 y 30 min, los glicolípidos aparecieron como zonas azul-grises sobre un fondo ligeramente gris (Hamilton y Hamilton, 1992).

Solución reveladora de lipopéptidos

Una solución de ninhidrina se preparó al 2 % en etanol. La placa cromatográfica se roció con esta solución y después se calentó a 100 °C en una estufa marca MEMMER por espacio de 5 a 10 min. Fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y sus derivados aparecieron como manchas rojo-violeta.

Solución reveladora de fosfolípidos

0.01 g de azul de bromotimol se disolvió en 100 mL de una solución de NaOH 0.01 M. La placa se roció con esta solución y después se calentó la placa a 100 °C en una estufa marca MEMMER por espacio de 5 a 10 min. Los fosfolípidos aparecieron como zonas amarillas sobre un fondo azul (Hamilton y Hamilton, 1992).

3.4.4. Determinación de grupos funcionales por Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR)

Las muestras del extracto del biotensioactivo producido por la cepa B3 se mezclaron con KBr a una concentración de 10 % p/p. Después fueron prensadas para obtener pastillas que se analizaron en espectrofotómetro FT-IR Shimadzu IRAffinity-1 en un intervalo de 750 a 4500 cm^{-1} y una resolución de 2 cm^{-1} en 40 escaneos.

3.5. ETAPA V: Análisis estadístico

Los datos serán evaluados mediante un análisis de varianza y prueba de medias al 95 % de límite de confianza (SAS Inst, Inc., 2003). El análisis de varianza será para determinar las diferencias significativas de la producción de biomasa bacteriana a las dos relaciones de C/N= 20 y 25, la degradación de hidrocarburos sometidos a diferentes tratamientos y la prueba de medias para determinar el tratamiento que hace tal diferencia.

CAPITULO 4. Resultados y discusión

La sección de resultados y discusiones se divide en tres etapas: la etapa I consiste en la clasificación del suelo de estudio y la caracterización del suelo impactado con petróleo; la etapa II consiste en la obtención de las bacterias petrofilicas presentes en el suelo impactado con petróleo, caracterización morfológica de las bacterias, el crecimiento de biomasa bacteriana con fertilizante Nitrofoska a dos relaciones de C/N= 20 y 25, la detección de las cepas productoras de biosurfactantes; la etapa III la biorremediación del suelo contaminado con la aplicación de las bacterias seleccionadas en la etapa II y la identificación de los principales grupos funcionales que caracterizan al biosurfactante obtenido de la cepa con mayor degradación de hidrocarburos.

4.1. Estudio de las características fisicoquímicas del perfil edafológico

El sitio experimental se encuentra ubicado en la ranchería Huapacal 2da sección del municipio de Cunduacán Tabasco. Fisiográficamente estos suelos se localizan sobre bordos aluviales recientes, los cuales son especies de camellones paralelos a la dirección del cauce, con pendientes convexas inferiores al 3 %. El material parental de estos suelos está conformado por sedimentos aluviales del cuaternario reciente, en una buena parte de los casos aun activos (Palma-López *et al.*, 2016). Según Zavala-Cruz *et al.*, 2012 estos suelos tienen contenidos de carbono orgánicos que decrecen irregularmente con forme aumenta la profundidad y se mantienen superiores a 0.20 % a una profundidad de 125 cm; presentan contenidos menores de estratos finos de arena. Mantienen una estratificación en al menos 25 % del volumen de suelos entre la superficie y los 125 cm de espesor. Estos suelos solo presentan horizontes diagnósticos; A ócrico, mólico o úmbrico, un H hístico o un horizonte sulfúrico o materiales sulfídicos a menos de 125 cm de profundidad.

4.1.1. Propiedades físicas y químicas del suelo

Los contenidos de humedad en los cinco horizontes del perfil oscilan desde 19 a 22 %, indicador de buen contenido de humedad de campo adecuada para el establecimiento y desarrollo de la flora (Zavala-Cruz *et al.*, 2012).

El suelo es mineral debido a que contiene menos del 20 % de materia orgánica y su contenido de carbón orgánico es menor al 11 % (IUSS Working Group WRB, 2014), los contenidos en los diferentes horizontes del perfil varían en forma decreciente conforme aumenta la profundidad. La tabla 9 muestra en el horizonte A1um y E1ir 2.92 % de MO de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 es considerado como medio y bajo en los horizontes C1fl, C2fl y C3fl, este tipo de comportamientos es esperado dado que las contribuciones del material orgánico están dadas mayormente por los aportes de la hojarasca de los árboles, no obstante, los aportes de la biomasa radical al parecer son importantes al menos en los horizontes intermedios.

La reacción del suelo medida en unidades de pH, descrito por la NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelo estuvo ubicada en los horizontes A1um, E1ir, C1fl, C2fl y C3fl como suelo medianamente alcalino con pH de 7.46, 7.83, 8.02, 8.06 y 7.58 respectivamente, como se observa en la tabla 9, el pH incrementa conforme aumenta la profundidad del perfil hasta el horizonte C2fl donde se encontró un decrecimiento lo cual se asocia a la presencia de CaCO_3 y la residualidad de los aluviones.

Los valores obtenidos para la Conductividad eléctrica (dS/m) en todos los horizontes se encuentran en concentraciones < 1.0 dS/m, lo cual corresponde a efectos despreciables de la salinidad. De acuerdo con SAGARPA, 2012 los suelo con una CE cercada a 2.3 dS/m no representan rangos que los catalogue como de alto riesgo. Esto implica que existen condiciones adecuadas en cuanto a concentraciones de solutos que no representan impedimento para el adecuado desarrollo de los cultivos.

Tabla 9. Composición química de los diferentes horizontes de un suelo cultivado con plátano macho (*Musa balbisiana*), en la rancharía Huapacal 3ra sección, Cunduacán, Tabasco

Horizontes	Humedad %	pH (H ₂ O) rel. 1:2	CE dS m ⁻¹	MO	N -----(%)-----	CaCO ₃	P mg.kg ⁻¹
A1um 0-16	20.6	7.4	0.33	2.92	0.14	1.17	17.04
E1ir 16-34	22.83	7.8	0.35	2.92	0.15	0.95	14.59
C1fl 34-59	19.72	8.0	0.29	1.38	0.05	0.29	5.92
C2fl 59-96	22.54	8.0	0.28	1.04	0.02	0.22	2.89
C3fl 96-112	24.47	7.5	0.26	0.71	0.01	0.22	2.24

pH: potencial hidrogeno; CE: conductividad eléctrica; MO: materia orgánica; N: nitrógeno; CaCO₃: carbonato de calcio; P: fósforo.

Los contenidos de nitrógeno en el horizonte A1um y E1ir se encuentran en el nivel medio de contenido de Ntotal (0.10-0.15 %) con 0.14 y 0.15 % respectivamente, considerados como nivel estable por la norma, estos valores son normales de una capa arable para suelos con sistema de riego y uso de fertilizantes nitrogenados, así como la eficiencia en su asimilación, en función del tipo de suelo y de las condiciones climatológicas. De acuerdo con SAGARPA, 2012 los suelos arables tienden a disminuir el contenido de nitrógeno a medida que incrementa la profundidad, esto confirma el contenido de nitrógeno de los horizontes bajos: C1fl, C2fl y C3fl con 0.05, 0.02 y 0.01 %, clasificados con niveles muy bajos (< 0.05 %) (tabla 9).

El CaCO₃ está presente en todo el perfil, varía de 1.17 a 0.22 % y disminuye con el aumento de la profundidad, la mayor concentración en los horizontes A1um y E1ir con 1.17 y 0.95 %, considerado como baja por la NOM-021-SEMARNAT-2000 la cual establece un rango de 0.5 a 2.0 % mientras que en los horizontes C1fl, C2fl y C3fl muestra el 0.29, 0.22 % respectivamente, considerado como porcentajes bajos de CaCO₃, esta acumulación en los tres horizontes subyacentes se da por mecanismos de transporte eluvial-iluvial a través de los poros-canales de las raíces.

La concentración de fósforo disponible para los horizontes muestreados presentaron niveles altos de 17.04 y 14.59 mg.kg⁻¹ para el horizonte A1um y E1ir, mientras que el horizonte C1fl con 5.92 mg.kg⁻¹ considerado como nivel medio de fósforo, el horizonte

C2fl y C3fl mostró niveles bajo. La presencia de niveles altos de fósforo en los primeros dos horizontes se debe a la aplicación de fertilizantes.

En lo que respecta a los cationes intercambiables existe de manera general contenidos suficientes de estos nutrientes no obstante cada uno de ellos presentó características (tabla 10) particulares.

Tabla 10. Composición química de los diferentes horizontes de un suelo cultivado con plátano macho (*Musa balbisiana*), en la ranchería Huapacal 3ra sección, Cunduacán, Tabasco

Horizontes	K	Na	Ca	Mg	CIC	HFP mgKg ⁻¹
-----Cmol (+) kg ⁻¹ -----						
A1um						
0-16	0.56	0.19	38.96	6.22	24.83	56.21
E1ir						
16-34	0.40	0.31	37.60	6.81	26.31	64.51
C1fl						
34-59	0.36	0.39	30.36	7.89	23.34	37.18
C2fl						
59-96	0.31	0.21	29.68	6.66	26.61	57.61
C3fl						
96-112	0.32	0.41	29.43	8.02	25.82	32.72

K: potasio; Na: sodio; Ca: calcio; Mg: magnesio; CIC: capacidad de intercambio catiónico; HFP: hidrocarburo fracción pesada.

El K⁺ estuvo presente en todos los horizontes del perfil en un rango de $0.3 \leq K < 0.6$ clasificado por la NOM-021-SEMARNAT-2000 como niveles medios de contenido de potasio intercambiable, la presencia del potasio en los horizontes se mostró de manera decreciente conforme aumentaba la profundidad del perfil, la concentración de K⁺ en el horizonte A1um se debe a la aplicación de fertilizantes suministrados al cultivo de plátano, el cual mediante mecanismos de transporte eluvial-iluvial se va depositando hacia los horizontes más bajos.

El Na⁺ intercambiable se encontró en un rango muy bajo en todos los horizontes del perfil, esto se debe a que el suelo está cultivado y las plantas cuentan con mecanismos que reducen la absorción y translocación del sodio a las hojas.

Entre los cationes intercambiables relacionados directamente con cambios en la degradación del suelo por el fenómeno de la salinización, se encuentra el calcio. Este

elemento se halló de manera abundante en todos los horizontes del perfil, en el primer horizonte A1um 38.96 Cmol(+) kg⁻¹ y decreciendo conforme aumentaba la profundidad del perfil. Las concentraciones de Ca⁺ en todo el perfil se clasificaron en el rango de alta (Ca⁺ ≥ 10).

Los resultados sobre la concentración de Mg⁺ en el horizonte A1um al C1fl aumentaron conforme la profundidad del perfil, en el horizonte C2fl (6.66 Cmol(+) kg⁻¹) disminuyó la concentración y aumento en el C3fl (8.02 Cmol(+) kg⁻¹). En todo el perfil se encontraron las concentraciones en el rango alto de Mg⁺, esta alta concentración se debe a que el suelo se encuentra bajo condiciones de riego. La predominancia de magnesio en estos suelos bajo riego, podría estar asociada con la característica y composición química del agua empleada para riego, de ahí que se detecten amplias concentraciones tanto de sodio, calcio y de magnesio (SAGARPA, 2012).

La capacidad de intercambio catiónico entre los horizontes correspondió a clase media, el horizonte A1um (24.83 Cmol(+) kg⁻¹) y C1fl (23.34 Cmol(+) kg⁻¹), mientras que el horizonte E1ir (26.31 Cmol(+) kg⁻¹), C2fl (26.61 Cmol(+) kg⁻¹) y C3fl (25.82 Cmol(+) kg⁻¹) presentaron valores altos de CIC, esta corresponde a la cantidad de arcilla presente en el suelo.

El contenido de HFP encontrado en los horizontes del perfil están por debajo de los límites máximos permisibles que establece la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 para considerarse como suelo contaminado.

La textura de estos horizontes del suelo (tabla 11), indica que la fracción predominante es el limo, el horizonte A1um expuso una textura franco limosa al igual que el C1fl con 67.18 y 62.22 % limo. El E1ir y C2fl con una textura franco arenosa con 58.14 y 50.57 % arena, en cuanto al horizonte C3fl este mostró una textura franco, este se debe a que contiene en proporciones adecuadas los tres elementos que constituyen la textura. De acuerdo con Amézquita, 2008; Montenegro y Malagón, 1990 en un suelo ideal, el 50 % de su volumen debe estar ocupado por poros sin considerar su distribución y/o tamaño. Para este caso particular la porosidad de los horizontes fue de 44.79 % para el A1um de ahí continuó disminuyendo hasta 20.06 % para C3fl, lo cual puede tener relación con el predominio de las arenas, ya que los suelos de textura gruesa tienden

a tener menos porosidad que los suelos de textura fina, aunque el tamaño medio de los poros individuales sea mayor en los primeros que en los segundos.

Tabla 11. Propiedades físicas de los diferentes horizontes del perfil

Horizontes	pa g.cm ⁻³	pr g.cm ⁻³	Porosidad	Arcilla	Limo	Arena	Textura
				------(%)-----			
A1um 0-16	1.07	1.94	44.69	18.21	67.18	14.60	Franco limoso
E1ir 16-34	1.07	1.73	37.72	12.31	29.54	58.14	Franco arenoso
C1fl 34-59	1.08	1.72	36.76	16.03	62.22	21.54	Franco limoso
C2fl 59-96	1.31	1.84	28.64	9.77	39.65	50.57	Franco arenoso
C3fl 96-112	1.27	2.56	20.06	9.66	41.28	49.05	Franco

pa: densidad aparente; pr: densidad real

Como se observa en la tabla 11, la densidad real de los horizontes ostentó valores que entran en la clasificación de suelos minerales (2.65 g.cm⁻³), debido a que presentan valores cercanos a la densidad real de los suelos minerales.

En cuanto a la densidad aparente que tiene en cuenta el volumen total del suelo incluyendo el espacio poroso y que en este caso fue de 1.07 y 1.08 g.cm⁻³ para los horizontes A1um y C1fl, lo cual corresponde a suelos franco limosos para valores < 1.4 g.cm⁻³. El horizonte E1ir y C2fl con una densidad aparente de 1.07 y 1.31 g.cm⁻³ que corresponde a suelos con textura franco arenosa < 1.4 g.cm⁻³. El último horizonte con valores de 1.27 g.cm⁻³ se encuentra en el rango < 1.6 g.cm⁻³ el cual es propio de los suelos franco. Todos los horizontes del perfil presentaron de acuerdo con SAGARPA, 2012 una densidad aparente ideal, lo que corresponde a suelos con buena calidad cuyos valores de densidad aparente resultan bajos, estos valores de densidad se reflejan en suelos porosos, bien aireados con adecuado drenaje y adecuado desarrollo de las raíces, lo cual favorece al desarrollo vegetal. Cuando hay un incremento de la densidad aparente, la resistencia mecánica tiende a aumentar y la

porosidad del suelo disminuye, lo cual limita el crecimiento de las raíces a valores críticos.

4.1.2. Designación de horizontes genéticos

El perfil agrológico se identifica principalmente por color y textura, presentó cinco horizontes, todos minerales, debido a que contienen entre 1.724 y 0.411 % de carbón orgánico (Tabla 12).

El perfil de suelo mostró evidencias de alteración por actividad del hombre principalmente de laboreo en los primeros horizontes, a los cuales se les asignó la letra A1um (0-16 cm), debido a que es un suelo agrícola, usado para la producción de banano, con 1.69 % de carbón orgánico y el horizonte E1ir (16-34 cm) con un contenido ≥ 2.5 % con muestras ligeramente apelmazadas, color Munsell con brillo ≤ 5 y cromo ≤ 3 , ambos consistencia húmeda, también presentó un espesor ≥ 20 cm. Los horizontes C del cual se ha formado el *solum*; están poco afectados por los procesos edafogénicos y están compuestos de material fino de origen aluvial. El C1fl (34-59 cm) y C2fl (59-96 cm) reveló una textura franco arenosa o más fina, con una CIC < 24 Cmol (+) kg^{-1} . También encontró ≥ 1.4 % de carbón orgánico, con una presencia de nódulos de color negro. El último horizonte C3fl (96-112 cm) mostró una textura franco con CIC < 24 Cmol (+) kg^{-1} , con una arcilla $> 10\%$.

4.1.3. Horizontes y propiedades de diagnóstico

Existe un horizonte de diagnóstico superficial úmbrico, café claro en seco y café rojizo en húmedo con un porcentaje de saturación de bases del 50 % y características primarias *eutricas* (*eu*) y secundarias *gléyicas* (*gl*) y *ántricas* (*an*), por tener un porcentaje de saturación de bases de 50 % hasta 112 cm de profundidad y los contenidos de carbón orgánico decrecen irregularmente con la profundidad. También se encontró un horizonte subsuperficial ferrálico con propiedades ántricas debido a que presenta un límite inferior abrupto a la profundidad de arado y evidencia de mezclado de capas de material de suelo más ricas en humus y más pobres en humus, debido a la labranza. Datos parecidos fueron encontrados por (Córdova-Bautista *et al.*, 2009) donde se estudió y clasificó un suelo *Fluvisol Èutrico*.

4.1.4. Clasificación del suelo

Después de haber realizado la evaluación de las propiedades físico-químicas de los horizontes y propiedades de diagnóstico, estos indicaron que se trata de un *Fluvisol éutrico (Fleu)* (IUSS Working Group WRB, 2014). Este suelo presenta un horizonte superficial *úmbrico (A1_{um})*, que consiste de material mineral, y que tiene una proporción de saturación de bases (por NH₄OAc 1M) menor del 50 %.

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE UN SUELO CONTAMINADO CON
PETRÓLEO DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Tabla 12. Perfil. Unidad representativa *Fluvisol Eútrico (FLeu)*

Perfil: 1
 Fecha: 19/02/2019
 Localización: 18.04°49'27.20" N 93.15°37'83.40" O
 Localidad: Ranchería Huapacal 2^{da} sección Cunduacán Tabasco.
 Elevación: 2.6 msnm
 Pendiente: <3% de inclinación
 Relieve: llanura aluvial
 Drenaje superficial: donador
 Drenaje de perfil: ligeramente drenado
 Material parental: sedimentos aluviales del cuaternario reciente
 Flora cultivada: plátano macho (*Musa balbisiana*)
 Fauna: variedad de insectos (chinchas, escarabajos, arañas)
 Aplicación de abonos orgánicos o fertilizantes: Urea
 Aplicación de riego o drenaje: drenaje
 Manto freático: visible en temporadas de lluvia
 Observaciones: soleado con presencia esporádica de nubes



Perfil 1	Horizonte (cm)	Descripción del perfil
	A1um 0-16	Transición marcada ondulada; húmedo; color 5 YR 4/3 café rojizo; con motas marcadas, pocas y medias de color 5 YR 5/4 café rojizo; textura franco limosa; sin pedregosidad; estructura débil; consistencia en seco suelto, en húmedo firme y muy húmedo ligeramente pegajoso y no plástico; poros pocos, finos, continuos, caóticos, dentro y fuera de agregados de forma tubular; permeabilidad muy rápida; raíces abundantes, finas y gruesas; pH 7.46; hormigas y lombrices.
	E1ir 16-34	Transición marcada horizontal; húmedo; color 5 YR 3/4 café oscuro; sin motas; textura franco arenoso; sin pedregosidad; estructura débilmente desarrollada; consistencia en seco suelto, húmedo friable y en muy húmedo pegajoso y ligeramente plástico; poros pocos, finos, muy finos, discontinuos, caóticos, dentro y fuera de agregados de forma tubular; permeabilidad lenta; raíces pocas, finas y delgadas; pH 7.83; lombrices.
	C1fl 34-59	Transición media irregular; húmedo; color 5 YR 5/3 café rojizo; con motas, marcada, pocas, finas y medias de color 5 YR 2.5/1 moteado negro; textura franco limoso; sin pedregosidad; estructura débilmente desarrollada; consistencia en seco suelto, en húmedo friable y en muy húmedo pegajoso y muy plástico; poros pocos, finos, continuos, caóticos, dentro y fuera de agregados de forma tubular; permeabilidad muy rápida; raíces pocas, finas y delgadas; pH 8.02; sin microorganismos.
	C2fl 59-96	Transición tenue horizontal; húmedo; color 5 YR 4/4 café rojizo; con motas marcadas, pocas, finas de color 5 YR 5/6 rojo amarillento y 5 YR 2.5/1 moteado negro; textura franco arenoso; sin pedregosidad; estructura débilmente desarrollada; consistencia en seco blando, en húmedo firme y en muy húmedo ligeramente pegajoso y muy plástico; poros pocos, continuos, caóticos, dentro y fuera de los agregados, de forma intersticial; permeabilidad rápida; raíces muy raras y finas; sin microorganismos; reacción al peróxido de hidrogeno (Mn) en presencia de nódulos de color negro; pH 8.06.
	C3fl 96-112	Transición tenue horizontal; húmedo; 5 YR café rojizo; sin motas; textura franco; sin pedregosidad; estructura débilmente desarrollada; consistencia en seco blando, en húmedo firme, y en muy húmedo ligeramente pegajoso, poros pocos, continuos, caóticos, dentro y fuera de los agregados, de forma intersticial; permeabilidad rápida; raíces muy raras y finas; sin microorganismos; reacción al peróxido de hidrogeno (Mn) en presencia de nódulos de color negro; pH 7.58.

4.2. Caracterización fisicoquímica del suelo contaminado

Inicialmente el suelo de estudio presentó un mayor contenido de hidrocarburos del petróleo tipo maya con °API de 14.1 que lo clasifica como hidrocarburos de fracción pesada. Se encontraron mayor concentración de fracción pesada y menor de fracción media que corresponden a 4607 mgkg⁻¹ y de 36.4726 mgkg⁻¹ suelo seco (Tabla 13) respectivamente, la fracción pesada se encontró dentro de los límites máximos permisibles de la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, considerado como suelo contaminado. La fracción media se registró en concentración baja la cual está por debajo de los límites máximos permisibles para considerarse contaminante.

Tabla 13. Propiedades fisicoquímicas del suelo contaminado

Parámetro	Resultado
pH	8.1 ±0.01
CE (dS.m ⁻¹)	1.22±0
ρ _a (g.cm ⁻³)	1.30±0.01
ρ _r (g.cm ⁻³)	1.28±0.01
°API	14.1
HFP (mgKg ⁻¹)	4607±11.26
HFM (mgKg ⁻¹)	36.4726
Textura (%)	Arcilla= 18.21
	Limo= 67.18
	Arena= 14.6

pH: potencial hidrogeno; CE: conductividad eléctrica; ρ_a: densidad aparente; ρ_r: densidad real; CC: capacidad de campo; HTP: Hidrocarburos Totales del Petróleo; °API: American Petroleum Institute.

Se registró un pH de 8.1 considerado como medianamente alcalino, en cuanto a la conductividad eléctrica se considera por la NOM-021-RECNAT-2000 muy ligeramente salino con 1.22 dS.m⁻¹. La densidad aparente se encuentra en el rango de los suelos minerales de textura francoso con 1.30 dS.m⁻¹ y la densidad real con 1.28 dS.m⁻¹, la relación que existen entre estas dos densidades determina la porosidad del suelo la cual fue de -1.79 % considerada como porosidad muy reducida de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000. De acuerdo con los análisis físicos realizados al suelo sus tres principales componentes fueron limo con 67.18 %, arcilla 18.21 % y arena con 14.60

%, como resultado se obtuvo una fracción franco limosa de acuerdo a la clasificación agronómica del triángulo de texturas.

4.3. Identificación de las bacterias degradadoras de petróleo

En el presente estudio, las poblaciones bacterianas indígenas que pudieron crecer en medio de sales minerales (MSM) con petróleo crudo como la única fuente de carbono fueron aisladas del sitio altamente contaminado con petróleo crudo (figura 40a). La detección del crecimiento bacteriano en medio de sales minerales líquido y en placas solidas de este mismo medio se tomó como una indicación de la capacidad de degradar el petróleo crudo. Se aislaron tres cepas bacterianas del suelo contaminado las cuales fueron codificadas como: B1, B3 y B5.



Figura 40. a) Cepas bacterianas cultivadas en MSM+Agar+petróleo, del sitio impactado con petróleo; b) Estriado de cepa bacteriana

El predominio de bacterias en suelos impactados con petróleo ha sido observado por varios autores. Estudios realizados por Morales-Guzmán *et al.*, 2017 encontraron trece cepas bacterianas en un suelo *Gleyso*/ altamente contaminado con petróleo (50,000 y 150,000 mgkg⁻¹). Otra investigación realizada por Ma, Yan y Ma, 2015 encontraron veintidós cepas degradantes de petróleo en el suelo de una refinería usando el MSM como medio de cultivo y petróleo como única fuente de carbono. Las poblaciones bacterianas presentes en las muestras de suelo pueden atribuirse a la capacidad metabólica bacteriana de resistir y adaptarse a altos niveles de contaminación. Sulaiman, Dominic y Graemel, 2015 afirman que el aumento en el número de bacterias degradantes de hidrocarburos cultivables demuestra la rapidez con la que los microorganismos autóctonos del suelo son capaces de adaptarse a nuevos sustratos,

por ejemplo, Christopher and Christopher, 2004 reportaron que *Flavobacterium spp* y *Pseudomonas spp* fueron las bacterias más predominantes en las primeras horas de incubación. En este trabajo la adición de petróleo al medio de cultivo permitió el crecimiento de bacterias, pero no se registró una gran diversidad.

4.3.1. Caracterización morfológica a nivel colonia

Las tres cepas fueron aisladas y caracterizadas en su morfología externa a nivel colonia en placa. El aislado B1 de color blanca mostró forma irregular, borde lobulado, elevación convexa y superficie lisa y convexa; la B3 de color café claro presentó una forma puntiforme de superficie rugosa con textura cremosa; la B5 de color blanca translúcida presentó forma irregular con borde lobulado y de superficie rugosa y textura brillante (Tabla 14).

Tabla 14. Caracterización macroscópica de las bacterias aisladas del suelo contaminado con petróleo

Bacteria	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Color
B1	Irregular	Lobulada	Convexa	Lisa/mate	Blanca
B3	Puntiforme	Ondulado	Convexa	Rugosa/crema	Café claro
B5	Irregular	Ondulado	Convexa	Rugosa/brillante	Blanca translúcida

4.3.2. Caracterización fenotípica de los aislados bacterianos

Los resultados de la caracterización e identificación de los aislamientos presentaron lo siguiente:

Las bacterias aisladas del suelo contaminado con petróleo crecieron en Medio de Sales Minerales (MSM). La cepa B1 se distinguió por ser Gram negativa con células en forma de bacilos bordes redondos con una longitud de 1.668 a 2.110 μm (figura 41a). Por el contrario, la cepa B3 presentó células en forma de cocobacilos con longitud de 1.203 μm y tinción de Gram negativa. Células en forma de cocobacilos con longitud de 1.320 a 1.582 μm de tinción de Gram negativa caracterizan a la cepa B5 (figura

41c). Bioquímicamente resultaron positivas para arginina, lisina, citrato sódico, ureasa, ornitina y gelatinaza. De acuerdo con características presentadas B1 y B3 corresponden a la especie de *Pseudomonas* (Mayz y Manzi, 2017) y B5 a la especie *Azotobacter* (León y Rojas, 2015).

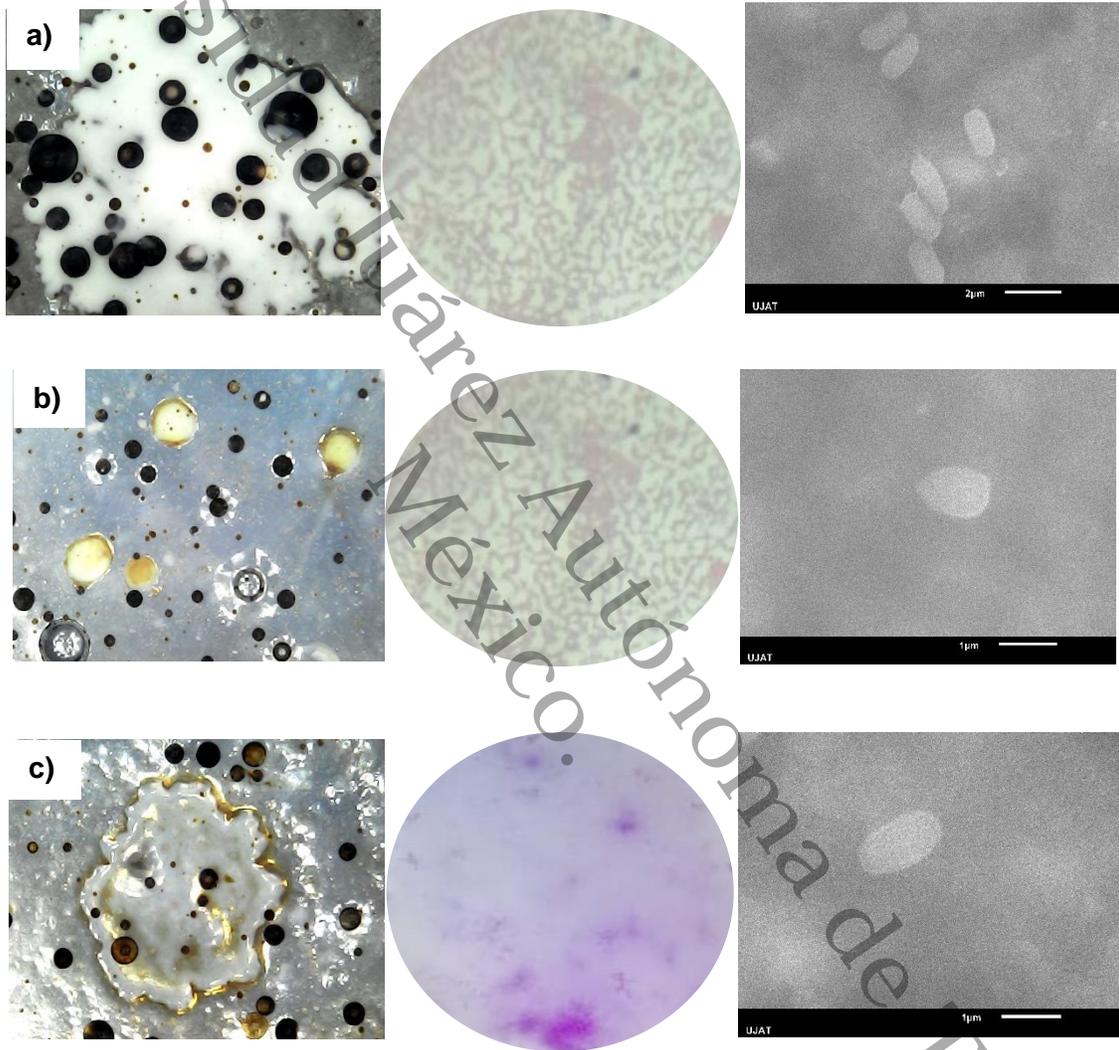


Figura 41. a) bacteria B1, Gram negativa, forma de bacilos bordes redondos; b) bacteria B3, Gram negativa, forma de cocobacilos; c) bacteria B5, Gram negativa, forma de cocobacilos

4.4. Evaluación de la cinética de crecimiento de las cepas bacterianas

El efecto de la relación C/N 20 y 25 sobre el crecimiento bacteriano en un biorreactor se modelaron utilizando el modelo de Gompertz modificado. Este modelo se ha aplicado para describir la forma sigmoide asimétrica del crecimiento microbiano en términos de precisión estadística como de facilidad de uso. El modelo consiste en tres fases de curvas de crecimiento microbiano; la fase de retraso inicial, seguida de un periodo de cambio acelerado y de desaceleración, por último, la fase del periodo estacionario. En este experimento los datos de crecimiento de las bacterias B1, B3 y B5 fueron ajustados mediante una regresión no lineal con el modelo de Gompertz modificado al 95 % de límite de confianza (figura 42).

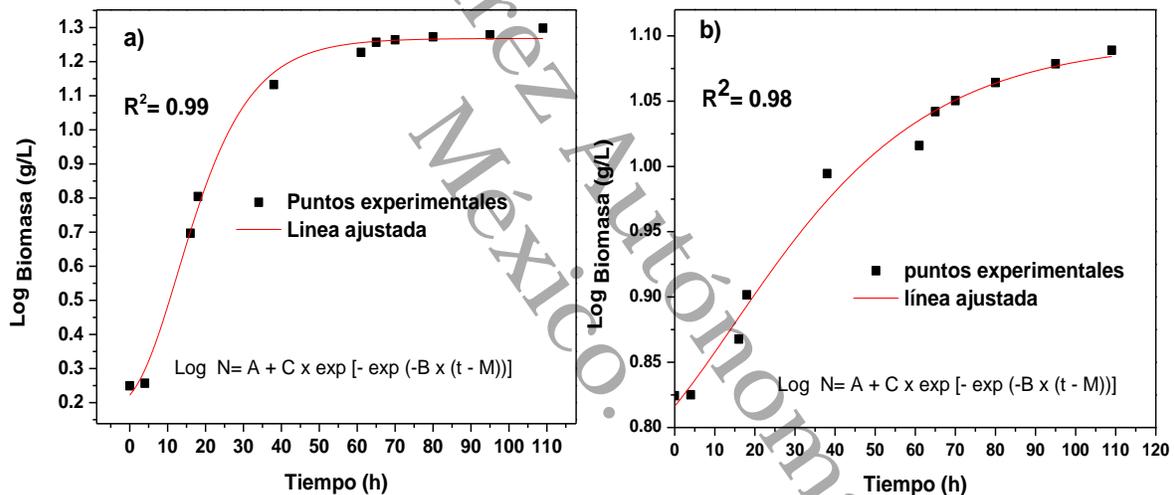


Figura 42. Ajuste de los datos del crecimiento; a) B520, b) B525

La tasa máxima de crecimiento (μ_{\max}) para los tratamientos a la relación C/N 20 fue de 0.032 ± 0.001 y 0.020 ± 0.003 g/L para B5 y B3, seguido de B1 con 0.011 ± 0.011 g/L de biomasa. Para los tratamientos con la relación C/N de 25 las μ_{\max} fueron de 0.017 ± 0.009 para la cepa B3, 0.014 ± 0.007 y 0.004 ± 0.0080 para B1 y B5 respectivamente. La regresión para el modelo de Gompertz mostró diferencias altamente significativas con $p \leq 0.01$ (Anexo A) y el coeficiente de determinación (R^2) mayor a 0.97. El tratamiento B5 presentó una mayor tasa de crecimiento en

comparación con los otros tratamientos a una relación C/N 20. La fase Lag presentó una duración de 5 h, después la fase exponencial se mantuvo durante 33 h, seguido de una fase estacionaria que duro 71 h, en la figura 42a se muestran la curva de crecimiento. En la relación C/N 25, B5 mantuvo una duración de 16 h en la fase Lag, en cuanto a la exponencial esta permaneció por 49 h (figura. 42b).

Para la bacteria B3 relación C/N 20 se observa que la fase Lag permaneció por 19 h, y la exponencial por 42 h, mientras que la fase estacionaria se mantuvo por 48 h. En la relación C/N 25 este tratamiento tuvo un comportamiento diferente como se muestra en la figura 43b la fase Lag se presentó en un lapso de 4 h, un periodo de tiempo aún más corto que en el tratamiento C/N 20. La fase exponencial permaneció por 39 h, con una fase estacionaria de 18 h.

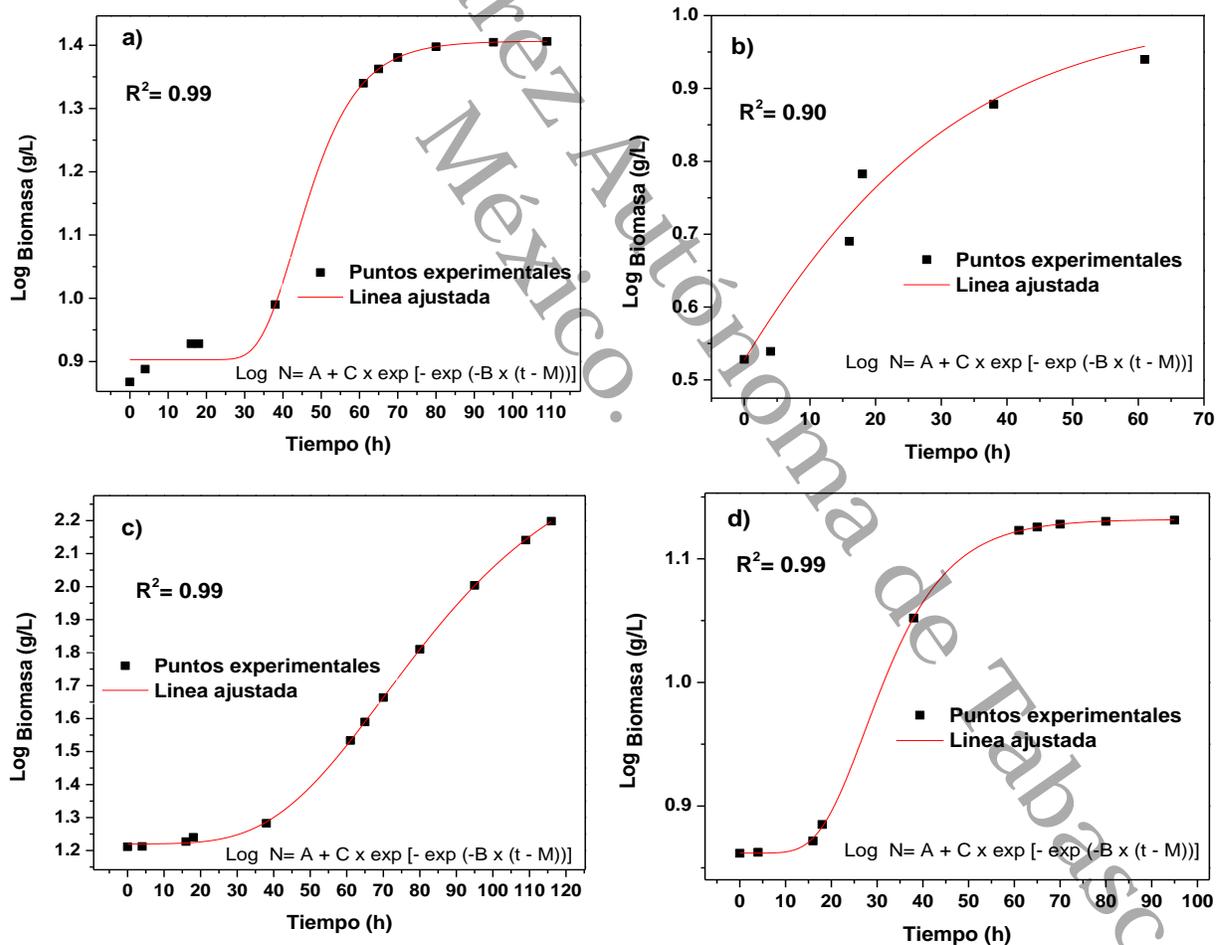


Figura 43. Ajuste de los datos del crecimiento; a) B320, b) B325, c) B125, d) B120

La fase Lag o el tiempo de retardo podría expresarse como el tiempo requerido para que las células bacterianas se adapten a la nueva condición ambiental y lleguen a la etapa reproductiva (Chatterjee *et al.*, 2015). De acuerdo a estudios realizados por Hengyuan (2017), la fase Lag duró poco tiempo en las relaciones C/N más altas dando como resultado mayores tasas de crecimiento. En este experimento la mayoría de las máximas tasas de crecimiento (μ_{\max}) se dieron a la relación más baja (C/N 20) donde la fase de retardo o fase Lag tuvo un periodo de tiempo más corto que en los tratamientos de la C/N 25, tal fue el caso del tratamiento B520 = 0.032 g/L con una fase Lag que permaneció 5 h y para el tratamiento B525 = 0.004 g/L con 16 h de fase Lag. Pero no fue el caso para el tratamiento B125 donde se obtuvo una máxima tasa de crecimiento de 0.014 g/L; y 0.011 g/L para B120 (figura 43c, d).

4.4.1. Efecto de las relaciones C/N sobre la tasa máxima de crecimiento microbiano

Los microorganismos productores de biosurfactantes suelen ser heterótrofos, por lo que consumen un componente orgánico de la fuente de carbono para crecer y producir sus metabolitos (George y Jayachandean, 2013). El nitrógeno es necesario para el crecimiento microbiano y la producción de ciertos metabolitos primarios y secundarios (Saharan *et al.*, 2012).

Las tasas máximas de crecimiento fueron obtenidas en función de la relación C/N a la que fue estimulada la bacteria. El ANOVA indicó que existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) (Anexo B) en cuanto a la relación C/N aplicada a cada medio de cultivo. Con el método Tukey se generaron seis grupos (A, B, BC, CD, D y E), siendo el grupo principal el tratamiento B520 con 0.032 g/L \pm 0.001 de tasa máxima de crecimiento (figura 44) seguido del B320 (0.020 g/L \pm 0.003).

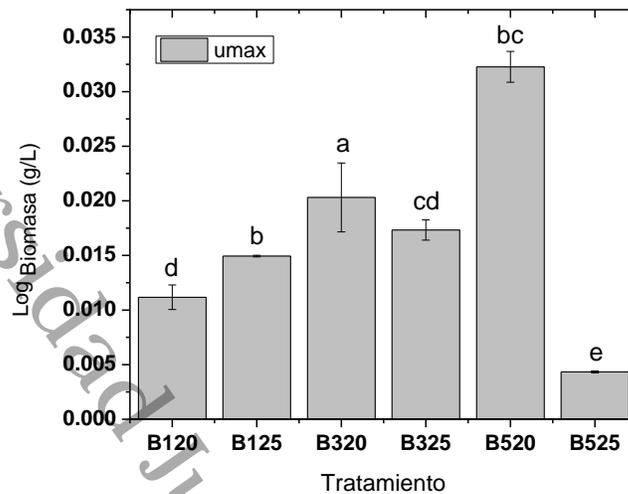


Figura 44. Tasas máximas de crecimiento (μ_{max})

Las altas tasas de crecimiento fueron dadas por la relación C/N20, pudo deberse a que el microorganismo tubo preferencia por los nitratos como es el caso de la cepa *P. aeruginosa* estudiada por Mulligan y Gibbs (1989), la cual tuvo un mayor crecimiento a niveles altos de nitrógeno. Esto confirma lo descrito por Rashedi (2005) donde a relaciones C/N altas, es decir, niveles bajos de nitrógeno como es el caso de la relación C/N25 restringen el crecimiento bacteriano.

En el caso del tratamiento B125 donde se dio mayor tasa de crecimiento que el B120 se debe a que en ciertos microorganismos la biomasa y la formación de productos suelen estar controladas por la tasa de consumo de carbono durante el cultivo (Singh *et al.*, 2017). En este caso el uso de la glucosa como fuente de carbono esta reportado por Tomar, 2016 como la mejor fuente de carbono para las *Pseudomonas* al producir las cantidades más altas de biosurfactante (0.3-3.88 g/L) y biomasa (1.4-5.67 g/L).

Las relaciones C/N requeridas por el cultivo microbiano depende de los diferentes tipos de microorganismos utilizados, del nitrógeno y del carbono, en este caso tenemos géneros y especies diferentes por lo tanto observamos un comportamiento diferente en los tratamientos.

4.5. Cepas con capacidad biotensioactiva y propiedad emulsificante

Investigaciones recientes han implementado la búsqueda de microorganismos con capacidad para degradar hidrocarburos como una alternativa para atenuar los problemas de contaminación ambiental. Dada la baja solubilidad de estos compuestos en soluciones acuosas, una característica deseable en estos microorganismos es su capacidad para producir biotensioactivos con propiedades emulsificantes con la finalidad de aumentar la solubilidad y biodisponibilidad de los hidrocarburos.

Como determinación preliminar de las cepas productoras de biotensioactivo, se realizó el ensayo hemolítico. La presencia de un halo de hemólisis alrededor de la cepa indica la lisis de los eritrocitos y, por lo tanto, la presencia del biosurfactante (Lara et al., 2017). En la figura 45 se aprecian halos alrededor de la cepa B5 en las últimas 32 h de la fase estacionaria. En la tabla 15 se muestran los resultados positivos para la cepa B1 a las 104, 112 y 120 h, en cuanto a la B3 se presentó hemólisis de las 72 a las 96 h (tabla 16), los resultados permitieron observar la formación de halos de color verdoso transparentes provocados por la disminución de la tensión superficial y el rompimiento de la membrana de los hematíes del medio a causa de los biosurfactantes secretados. De acuerdo a Becerra y Horna (2016); Lara (2017) este método no se considera como método específico debido a que algunas enzimas líticas también pueden provocar halos de hidrólisis. Para complementar estos resultados se desarrollaron otros métodos más sensibles para detectar la capacidad de producir biotensioactivos.

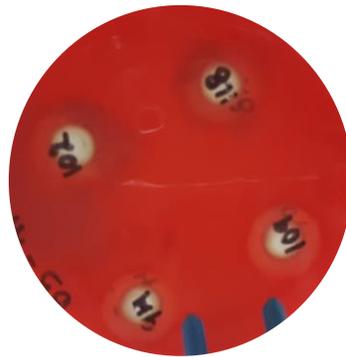


Figura 45. Hemólisis beta en la cepa B5

Tabla 15. Capacidad para producir biotensioactivo cepa B1

Tiempo (h) de la fase estacionaria	Capacidad para producir biotensioactivo			Propiedad emulsificante
	Actividad hemolítica	Gota colapsada	Difusión de la gota (mm)	I.E %
88	-	+	0±0	79.6±0.57
96	-	-	0±0	64.3±0.57
104	+	+	7.42±0.01	64±0.005
112	+	-	2.75±0.01	64.3±0.057
120	+	+	0±0	60.6±1.15

Tabla 16. Capacidad para producir biotensioactivo cepa B3

Tiempo (h) de la fase estacionaria	Capacidad para producir biotensioactivo			Propiedad emulsificante
	Actividad hemolítica	Gota colapsada	Difusión de la gota (mm)	I.E %
72	+	+	3.6±0.1	100±0
80	+	-	0±0	100±0
88	+	+	4.73±0.005	100±0
96	+	-	0±0	100±0
104	-	+	0±0	72.73±0.01
109	-	+	3.71±0.005	62.33±0.57
118	-	+	0	50.33±0.57

El método de la gota colapsada y difusión del diámetro de la gota de aceite se consideran los más sensibles para detectar la capacidad de producir biosurfactante (Youssef *et al.*, 2004; Satpute *et al.*, 2008). En la tabla 16 y 17 se muestran los resultados de la cepa B3 y B5 la cual presentaron valores más altos en la difusión del diámetro de la gota y positivo para gota colapsa al final de la fase estacionaria.

Se considero un criterio para seleccionar cepas con actividad surfactante las que mostraron capacidad emulsificante. La actividad emulsificante se correlaciona con la concentración de biotensioactivo, por lo cual este método es útil para indicar la presencia de biotensioactivos. Los resultados mostraron que la cepa B5 (tabla 17) presentó valores más altos de IE% que van desde el 100 % al inicio de la fase estacionaria hasta la hora 94, bajando al 83.32 % en las 102 h, permaneciendo en aumento hasta las 118 h tiempo que duró la fase estacionaria. En cuanto a la cepa B3

en la tabla 16 se muestra el índice de emulsificación de 100 % al inicio de la fase (72 h) manteniéndose constante hasta la hora 96, después de las 104 h disminuyó a 72.73 % hasta llegar al 50.33 % al término de la fase. Para la B1 se presentaron porcentajes de 79.6 % en las 88 h hasta 60.6 % a las 120 h. Se consideraron emulsiones estables al transcurrir las 48 horas, lo cual permite que los hidrocarburos se encuentren biodisponibles durante la biodegradación.

Investigaciones realizadas por Kiran (2010) y Lara (2017) reportaron especies del género *Nocardiopsis alba* y *Kocuria rosea* con capacidad para producir biotensioactivos con propiedades emulsificantes y la capacidad de degradar hidrocarburos. Nurfarahin, Mohamed, & Phang, 2018 registraron que la *Pseudomonas sp* produce IE al 79 %, datos parecidos a los registrados por las cepas B1 y B3 consideradas del género *Pseudomonas*. Por otro lado, *Azotobacter* tiene la capacidad no solo para consumir hidrocarburos sino también para producir sustancias biológicamente activas (Gradova, Gornova, Eddaoudi, & Salina, 2003).

Los resultados positivos en las cepas B3 y B5 para gota colapsada, difusión de la gota de aceite e IE% tiene correlación con las tasas máximas de crecimiento dadas a las relaciones de C/N 20 donde a niveles limitado de nitrógeno los microorganismos tienen una mayor producción de biosurfactantes.

Tabla 17. Capacidad para producir biotensioactivo cepa B5

Tiempo (h) de la fase estacionaria	Capacidad para producir biotensioactivo			Propiedad emulsificante
	Actividad hemolítica	Gota colapsada	Difusión de la gota (mm)	I.E %
70	-	+	0±0.0	100±0
78	-	+	2.51±0.005	100±0
86	-	-	0±0	100±0
94	+	-	2.93±0.05	100±0
102	+	+	7.08±0.005	83.32±0.005
109	+	+	5.97±0.005	100±0
118	+	+	7.46±0.05	100±0

4.6. Biodegradación del petróleo

Para la degradación del petróleo se establecieron cinco tratamientos (B1, B3, B5, Con y Testg) a los cuales se les midió la eficiencia de degradación la cual se aprecia en la figura 46, la eficiencia de degradación a los 60 días vario de 77.7 a 96.3 %. Al día 15 la eficiencia se mantuvo al 30 % para el tratamiento “B3”, seguido de un 27.2 % correspondiente al tratamiento “Con”. Para el día 30 el tratamiento B1 superó el 50 % de la eficiencia y continuó en aumento hasta el día 45 con el 70 % al igual que Con y B3. Al día 60, B3 y B5 tuvieron una eficiencia por encima del 95 % seguido de B1 con 92 %. Estudios realizados por Ebadi *et al.*, 2017 para *Pseudomonas aeruginosa* demuestran mediante ensayos de difusión de aceite, halos de 1.85 hasta 3 mm y emulsiones que van desde 22.2 al 38 % su capacidad para producir biosurfactantes y la eficiencia para degradar hidrocarburos de 33 hasta 39.2 % en un proceso de biorremediación de 120 días. En este trabajo el proceso duró 60 días y en comparación con el estudio mencionado anteriormente los resultados de eficiencia de degradación (%) fueron más altos, esto puede deberse a que la dispersión de aceite presentó valores de 4.73 y 7.42 mm para B1 y B3 consideradas del género *pseudomonas* y los índices de emulsificación fueron aún más altos con 67 y 100 %, esto demuestra la capacidad que tienen estas cepas para producir mayor cantidad de biosurfactantes y altos porcentajes de eficiencia en la degradación de petróleo.

Los resultados de B5 fueron favorables considerándose del género *Azotobacter*, otros estudios realizados por Gradova, 2003 con este género encontraron que tiene una eficiencia del 69 % en la degradación de hidrocarburos del petróleo en 14 días de haber introducido la bacteria al suelo, además de recuperar la actividad biológica del suelo. La introducción de *Azotobacter* en suelos contaminados con aceite acelera la tasa de autopurificación, ya que las bacterias pueden asimilar los hidrocarburos del aceite tanto en presencia de nitrógeno fijo como durante la fijación de nitrógeno (Sumbul, Ansari, Rizvi, & Mahmood, 2020)

Por otro lado, Popoviciu *et al.*, 2014 encontraron que la adición de nitrógeno y fosforo contrario a promover la actividad metabólica en el suelo contaminado, inhibió la biodegradación de los hidrocarburos, sin embargo, en este experimento los

tratamientos que presentaron mayor eficiencia (B3 y B5) fueron los que contenían la relación C/N= 20, donde hubo una mayor tasa de crecimiento microbiano.

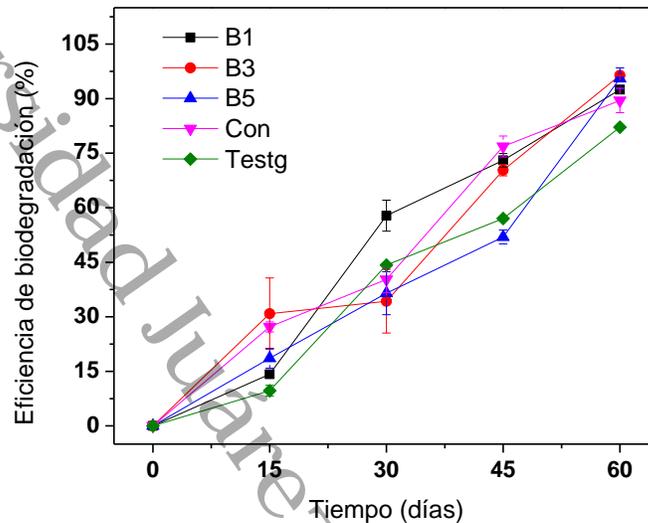


Figura 46. Eficiencia de biodegradación (%) de los tratamientos B1, B3, B5, Con y Testg

El análisis de varianza mostró los valores de $R^2 = 99.27\%$, $R_{ajustada} = 98.93\%$ y un error estándar = 50 (Anexo C), se observó que los tratamientos del día 15 al 45 presentaron el mismo comportamiento, es decir aumentaron la eficiencia conforme aumentaba el tiempo. En el tiempo 60 el ANOVA indicó que existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$), con una $R^2 = 94.39\%$ y $R_{ajustada} = 92.14\%$, con un error = 10 (Anexo D). La prueba de medias Tukey presentó cuatro grupos importantes A, AB, B y C. Siendo el tratamiento B3 y B5 significativamente iguales ya que presentan datos de eficiencia cercanos, sin embargo, el tratamiento B3 presenta menor variación en los datos (figura 47).

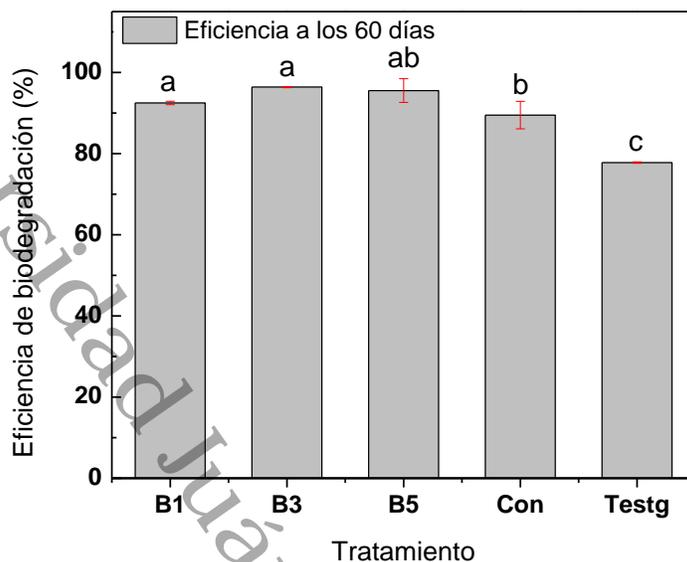


Figura 47. Eficiencia (%) de los tratamientos a los 60 días de la biorremediación

4.6.1. Identificación de Hidrocarburos Fracción pesada mediante análisis FT-IR

Se realizó la comparación de la banda característica de los hidrocarburos de fracción pesada de la cepa B3 a los cero y 60 días de la biodegradación. En la figura 48 se observa la absorbancia en la banda característica de la fracción pesada (2930 y 2854 cm^{-1}) correspondiente al grupo funcional de los alcanos, debido al estiramiento del enlace C-H, del tiempo inicial (cero días), en tanto, para el tratamiento B360 se observó una disminución en la intensidad de la banda del grupo funcional de los alcanos (2967 cm^{-1}) del enlace C-H esta señal indica la presencia de carbonos saturados. En la banda 3429 cm^{-1} del tiempo inicial se observa un estiramiento del grupo O-H. Asumimos grupos OH en la fracción de asfaltenos posiblemente por la presencia de fenoles o ácidos carboxílicos. La presencia de alcoholes primarios indica la biodegradación de hidrocarburos de mayor peso molecular (Jiménez Hernández, 2018). En la banda a 3451 cm^{-1} del tratamiento B360 también presentó el mismo estiramiento de O-H, pero a una mayor intensidad. La banda de absorción a 1714 (cero días) y 1732 cm^{-1} (B360) corresponden a compuestos carbonílicos. La banda de 1714 cm^{-1} corresponde a las cetonas saturadas y la banda a 1732 cm^{-1} aldehídos saturados. En el tratamiento B360 a partir de 1490 cm^{-1} los picos de absorción fueron menos notables, mientras que para

el tratamiento a los cero días se presentaron con intensidad los picos a 1492 y 1462 cm^{-1} los cuales corresponden a compuestos aromáticos debido al estiramiento del enlace C-H. La banda de absorción de 1187 cm^{-1} corresponde al grupo amina (C-N), a 1079 cm^{-1} (C-O). Las señales de 969 a 742 corresponde a los hidrógenos de los anillos aromáticos.

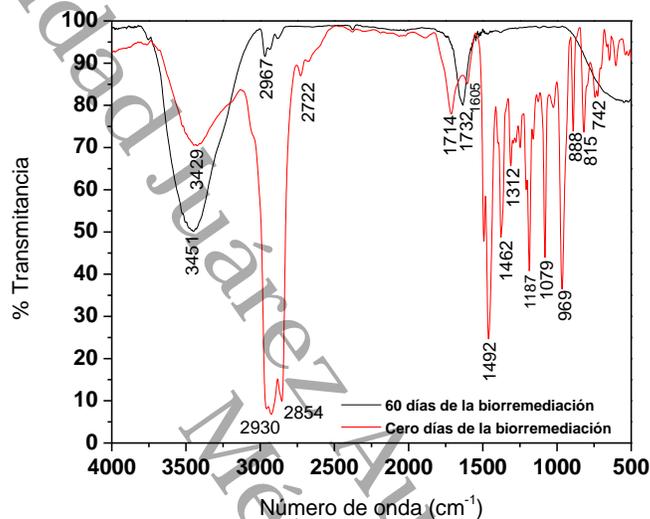


Figura 48. FT-IR de hidrocarburos fracción pesada del tratamiento B360 Vs cero días

Los resultados del tratamiento B360 a diferencia de los otros tratamientos este presenta mayor eficiencia de degradación y se demostró con el análisis cualitativo FT-IR, donde se observó la generación de ácidos grasos y alcoholes los cuales son productos de enzimas de microorganismos hidrocarbonoclastas, que contribuyen a la biotransformación de compuestos recalcitrantes. Estos compuestos generados influyen en la desorción y solubilización de hidrocarburos, así como, la transferencia de masas a través de matriz del suelo incluyendo aquellos minerales que se encuentran atrapados en la fracción mineral del suelo, los cuales son asimilados por los microorganismos como fuente de energía. En la figura 48 se muestra la baja intensidad de las bandas de absorción a los 60 días en comparación a los cero días de la biorremediación.

4.6.2. Cromatografía de los hidrocarburos fracción media

La biodegradación redujo significativamente el número total de contaminantes y cambiando su composición, esto se corroboró con los datos de concentración de los compuestos reportados en el cromatograma, sugiriendo que la bioaumentación autóctona es una técnica de remediación efectiva. La figura 49 y 50 muestra el cromatograma de iones totales de los extractos (cero días y 60 días) del tratamiento B3. El cronograma a los cero días muestra alta presencia de compuestos por los picos de mayor área, del decano ($C_{10}H_{22}$) hasta heptacosano ($C_{10}H_{56}$), al minuto 19.2 se presentó el pico del heptacosano ($C_{27}H_{56}$) ($51.6748 \text{ mgkg}^{-1}$) con un área de 417264.2, seguido al minuto 10.2 un área relativa de 360009.5 perteneciente al pentadecano ($C_{15}H_{32}$) ($45.9331 \text{ mgkg}^{-1}$) y el heptadecano ($C_{17}H_{36}$) ($44.9684 \text{ mgkg}^{-1}$) al min 12.11, área de 351130.1 en la Tabla 18 se muestran las concentraciones.

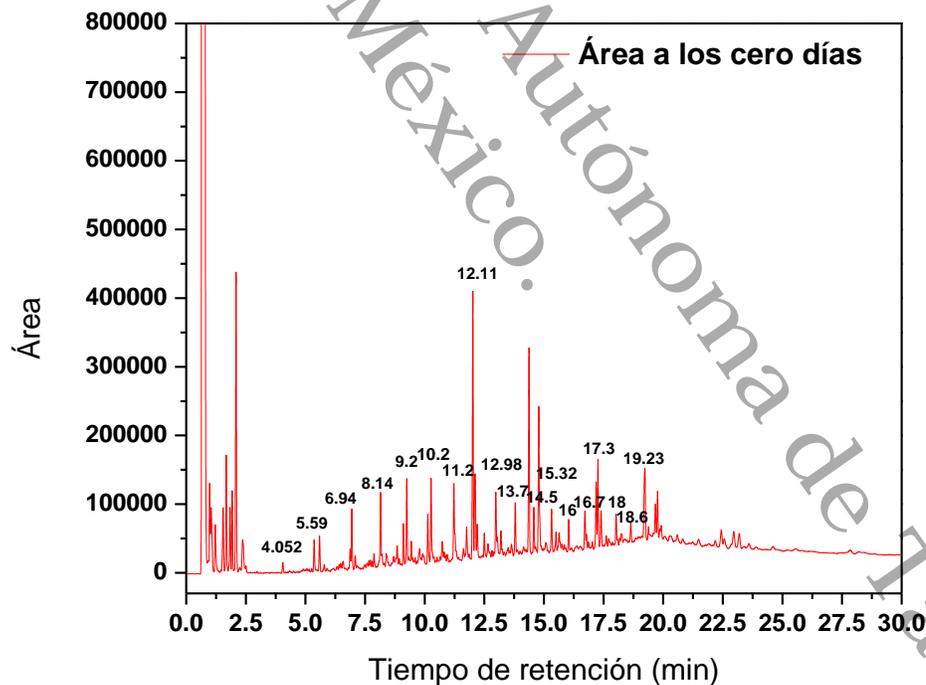


Figura 49. Cromatograma del tratamiento B3 a los cero días

Tabla 18. Concentraciones de hidrocarburos identificados en la muestra B3 a los cero días

Hidrocarburo identificado	Tiempo de retención	Concentración (mgkg ⁻¹)
Decano	4.052	7.842
Undecano	5.59	18.82
Dodecano	6.94	24.05
Tridecano	8.14	6.943
Tetradecano	9.2	37.8108
Pentadecano	10.2	45.9331
Hexadecano	11.2	53.6509
Heptadecano	12.11	44.9684
Octadecano	12.98	41.4518
Nonadecano	13.7	24.5848
Eicosano	14.5	19.3722
Heneicosano	15.32	23.4022
Docosano	16	15.2488
Tricosano	16.7	17.4894
Tetracosano	17.3	19.5278
Pentacosano	18	19.3722
Hexacosano	18.6	12.5414
Heptacosano	19.23	51.6748

En cuanto a los 60 días el cromatograma muestra la disminución del área relativa del pico al minuto 10.2 correspondiente al pentadecano (16.1202 mgkg⁻¹) con un área de 116468.7, el heptacosano (C₂₇H₅₆) mostró una disminución de 51.67 a 5.6327 mgkg⁻¹. En la tabla 19 se muestran los compuestos presentados en los principales picos del cromatograma (figura 50) a los 60 días la desaparición del decano, undecano y dodecano y la presencia de un nuevo compuesto el octacosano (C₂₈H₅₈) aunque se considera de menor concentración. Benedek *et al.*, 2012, encontraron que *Pseudomonas fluorescens* alcanza tasas de degradación del 95 % del dodecano. Al final del proceso también se presentó el octadecano (C₁₈H₃₈) con una concentración de 41.4518 mgkg⁻¹ a los cero días y 12.0746 mgkg⁻¹ al día 60, en estudio realizados por Hambrick *et al.*, 1980 y Al-Hawash *et al.*, 2018 describen que las tasas de mineralización del octadecano aumentan notablemente cuando el pH se encuentra de 6.5 a 8.0 en este trabajo los tratamientos presentaron el mismo rango de pH.

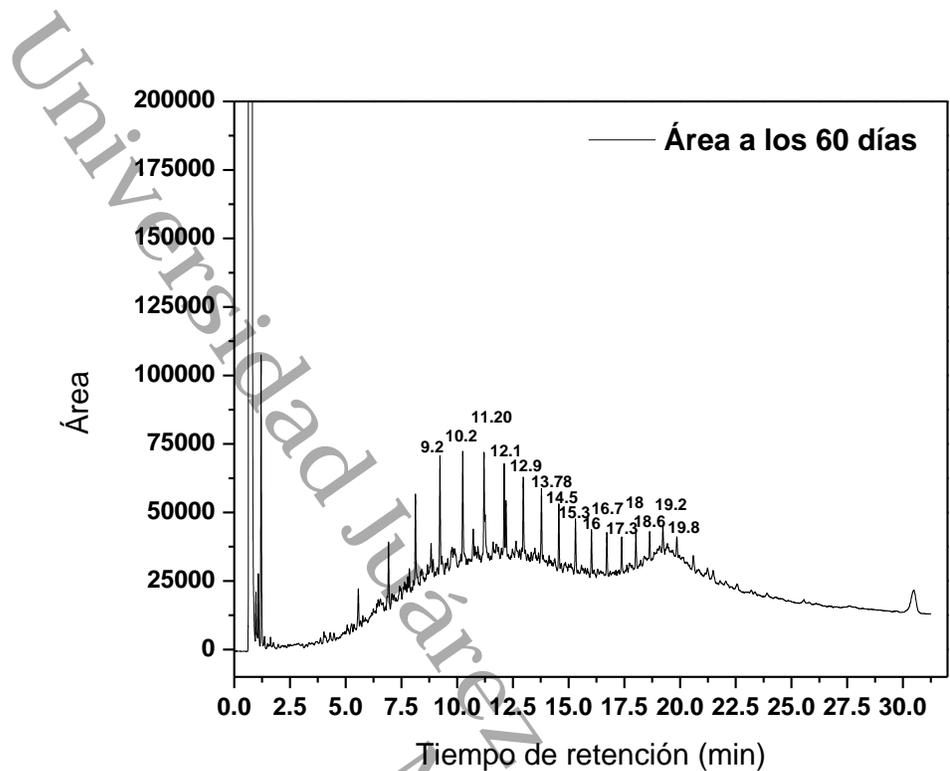


Figura 50. Cromatograma del tratamiento B3 a los 60 días

Tabla 19. Concentraciones de hidrocarburos identificados en la muestra B3 a los 60 días

Hidrocarburo identificado	Tiempo de retención	Concentración (mgkg ⁻¹)
Tetradecano	9.2	14.5642
Pentadecano	10.25	16.1202
Hexadecano	11.20	9.3982
Heptadecano	12.11	10.7675
Octadecano	12.96	12.0746
Nonadecano	13.78	10.1918
Eicosano	14.5	9.2115
Heneicosano	15.3	8.7447
Docosano	16	7.0487
Tricosano	16.7	6.9709
Tetracosano	17.3	6.4730
Pentacosano	18	6.1306
Hexacosano	18.6	4.9170
Heptacosano	19.23	5.6327
Octacosano	19.8	4.9636

En este estudio la biodegradación redujo la abundancia del área relativa del pico de cadena de carbonos largos de C₁₀ - C₂₇. La biodegradación de los alcanos se efectúa cuando hay una alta demanda de oxígeno (DBO), la cual emplea dos rutas metabólicas. El más común es la incorporación directa de un átomo de oxígeno sobre el final de la cadena de carbonos del alcano mediante la enzima monoxigenasa. De acuerdo a Jiménez Hernández, 2018 los microorganismos degradan mejor las cadenas lineales de compuestos alifáticos de ocho a diez carbonos (C₈ - C₁₀) sin embargo, B₃ degradó en su totalidad cadenas de C₁₀ - C₁₃. Las cadenas largas de carbonos que van de C₁₄ a C₂₇ disminuyeron al final de la biorremediación, su concentración no se considera contaminante, aunque se consideran difíciles de asimilar por las bacterias, debido a su baja solubilidad ya que esta decrece con el incremento del número de carbonos.

Estudios por Gunasekera *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Salgado-Brito *et al.*, 2007; Yuste *et al.*, 2000 demostraron que las pseudomonas son capaces de degradar n-alcanos más largos que C₂₀. Salgado-Brito *et al.*, 2007 encontró que la cepa pseudomona aeruginosa degradaba el eicosano (C₂₀) eficazmente que otros n-alcanos, eliminando el 60 % en 16 días. Las cepas Streptomyces se han caracterizado por metabolizar alcanos C₁₈ y C₂₀ (Radwan *et al.*, 1998 y Barajas *et al.*, 2001).

4.6.3. Análisis elemental del suelo biorremediado

El análisis elemental del suelo contaminado a cero días indicó una composición mayoritaria en porcentaje masa de oxígeno (48.37%), carbono indicó (23.04 %) y silicio (16.67 %) para los cero días (Tabla 20) solo hubo pequeña disminución a los 60 días de la biorremediación a excepción del silicio que continuó en aumento como se muestra en la tabla 21. En este sentido el silicio y el oxígeno son componentes del cuarzo, mientras que el carbono es común debido a la presencia de hidrocarburo en el suelo, también se asocia a la presencia de partículas finas de calcita depositadas sobre la superficie de dicho mineral. La presencia de Aluminio (7.80 %) está asociado a diversos orígenes: actividades industriales, el tipo de roca ígnea, la presencia de hidrocarburo y en este caso al tipo de arcilla presente en el suelo.

Tabla 20. Elementos presentes en el suelo a los cero días

Elemento químico	Composición en masa (%)
C	23.04
O	48.37
Na	0.76
Mg	1.38
Al	7.80
Si	16.67
K	1.26
Ca	0.71

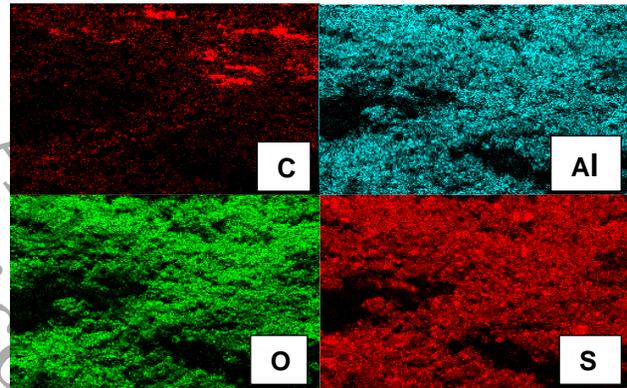


Figura 51. Micrografías de los elementos con mayor masa (%) en el suelo a los cero días

Tabla 21. Elementos presentes en el suelo a los 60 días de la biorremediación

Elemento químico	Composición en masa (%)
C	14.85
O	48.17
Na	0.83
Mg	1.58
Al	9.85
Si	21.91
K	1.87
Ca	0.94

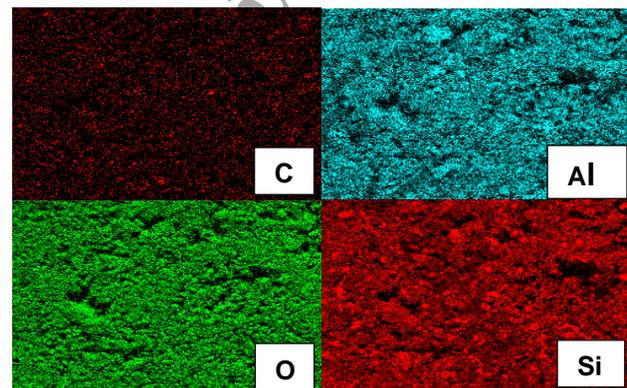


Figura 52. Micrografías de los elementos con mayor masa (%) en el suelo a los 60 días

4.6.4.1. Temperatura de biorremediación

La temperatura es uno de los factores ambientales que afecta la actividad metabólica de los microorganismos, por lo tanto, influyen en la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo al afectar la composición física y química de los HTP (Al-Hawash *et al.*, 2018; Menn *et al.*, 2000). En esta investigación la temperatura se tomó con un termómetro de mercurio de 400 °C que se introdujo en la unidad experimental de modo que el termómetro quedara a la mitad del suelo almacenado en la charola es decir sin tocar el fondo, la toma se realizó tres veces por cada unidad experimental todos los días durante el proceso de biorremediación.

Para los resultados obtenidos de la medición de temperatura durante el proceso de biorremediación de los cinco tratamientos, la temperatura que se registró a los cero días fue de 26 ± 0 °C. Para el día 15 el tratamiento B3 tuvo una disminución en la temperatura a 24 ± 0 °C como se muestra en la Figura 53. También se reporta una eficiencia de degradación mayor al 30 %, mientras que los otros tratamientos siguieron la misma tendencia (25°C) y una eficiencia del 9 al 27 % (figura 46). Para el día 30 los datos mostraron un aumento de temperatura en el tratamiento Testg (sin bacterias) de 28 ± 0 °C, para B1 y B5 la temperatura fue de 27 ± 0 °C y para B3 y Con de 26 ± 0 °C. A los 60 días los resultados de eficiencia de biodegradación (apartado 4.6) mostraron diferencias significativas entre tratamientos y al comparar los datos de eficiencia con la temperatura registrada a los 60 días B3, Con y B1 presentaron la temperatura más alta de 29 ± 0 °C siendo los tratamientos con mayor eficiencia (%), en la tabla 22 se muestran la comparación de los datos. En el caso del tratamiento B5 y Testg presentaron una temperatura de 28 ± 0 °C. Estos datos concuerdan con los descrito por Bisht (2015), a bajas temperaturas, generalmente se observa que la tasa de degradación disminuye, lo que se cree que es el resultado de la reducción de las tasas de actividad enzimática. La mayor parte de los estudios indican que las tasas más altas de degradación ocurren en el rango de 20-30 °C (Menn *et al.*, 2000). A pesar de que la biodegradación de los hidrocarburos puede tener lugar en un amplio dominio de temperaturas, la tasa de degradación se reduce al disminuir la temperatura.

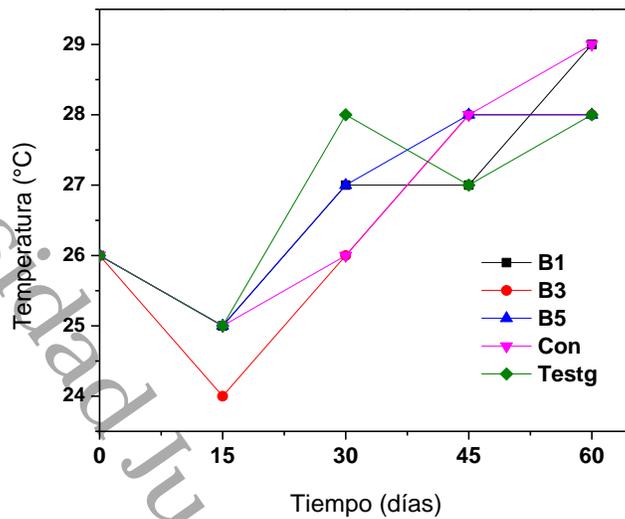


Figura 53. Valores de temperatura durante la biorremediación de los cinco tratamientos (B1, B3, B5, Con y Testg)

Tabla 22. Datos de temperatura Vs eficiencia de biodegradación de los cinco tratamientos durante la biorremediación.

Día	B1		B3		B5		Con		Testg	
	T °C	EB %	T °C	EB %						
0	26±0	0±0	26±0	0±0	26±0	0±0	26±0	0±0	26±0	0±0
15	25±0	14.206±0.1	24±0	30.868±9.8	25±0	18.614±2.7	25±0	27.235±1.3	25±0	9.673±1.5
30	27±0	57.816±4.2	26±0	34.287±8.7	27±0	36.482±5.9	26±0	40.281±3.6	28±0	44.248±0.2
45	27±0	73.043±1.8	28±0	70.312±1.5	28±0	51.951±1.9	28±0	76.840±2.8	27±0	57.027±0.1
60	29±0	92.476±0.4	28±0	96.394±0.1	28±0	95.537±2.9	29±0	89.491±3.3	28±0	82.140±0.1

T °C = Temperatura; EB %= Eficiencia de biodegradación

4.6.4.2. pH de biorremediación

Por otra parte, los datos obtenidos del potencial de hidrógeno monitoreado durante la biorremediación variaron entre tratamiento. A los cero días todos los tratamientos mostraron pH medianamente alcalino. Al día 15 la gráfica de la figura 54 muestra una disminución en los tratamientos; Testg (8.0 ± 0.03 a 7.6 ± 0.01), B1 (7.7 ± 0.20 a 7.4 ± 0.02), Con (7.9 ± 0.07 a 7.6 ± 0.07). En el tratamiento B5 se aprecia un aumento de 7.8 ± 0.07 a 8.1 ± 0.03 , B3 se mantuvo de 8.0 ± 0.05 a 8.04 ± 0.005 , al día 30 y 45 continuaron disminuyendo, pero manteniéndose en el rango de medianamente alcalino hasta el día 60 con pH de 7.5 a 7.6. Con relación a la temperatura y la eficiencia de degradación se observó que al aumentar la temperatura el pH descendía y por lo tanto había un incremento en la eficiencia de degradación (tabla 23). La mayoría de las bacterias heterótrofas prefieren crecer en un pH neutro o alcalino (Bossert y Bartha, 1984). Parwar (2015) observó que el pH del suelo 7.5 fue el más conveniente para la degradación de todos los hidrocarburos del petróleo, esto se confirma con los resultados obtenidos en este experimento. Otra relación con los pH presentados en los tratamientos, se relaciona con la formación de subproductos obtenidos durante la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo (figura 48) debido a la formación de estos subproductos como; ácidos carboxílicos, alcoholes, ésteres, los cuales determinan un ambiente ácido o alcalino en la fase líquida del suelo, influyendo en el desarrollo de especies microbianas capaces de degradar los hidrocarburos fuertemente absorbidos en los poros del suelo (Jiménez Hernández, 2018).

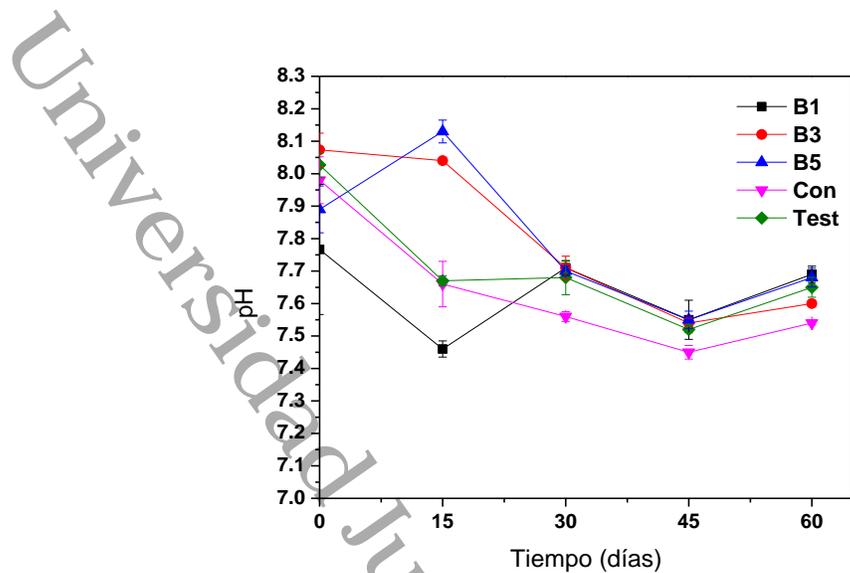


Figura 54. Valores de pH durante la biorremediación de los cinco tratamientos (B1, B3, B5, Con y Testg)

Tabla 23: Datos de pH Vs eficiencia de biodegradación de los cinco tratamientos durante la biorremediación

Día	B1		B3		B5		Con		Testg	
	pH	EB %	pH	EB %	pH	EB %	pH	EB %	pH	EB%
0	7.7±0.2	0±0	8±0.05	0±0	7.8±0.07	0±0	7.9±0.07	0±0	8±0.03	0±0
15	7.4±0.0	14.206±0.1	8±0	30.868±9.8	8.1±0.03	18.614±2.7	7.6±0.07	27.235±1.3	7.6±0.01	9.673±1.5
30	7.7±0.0	57.816±4.2	7.7±0.03	34.287±8.7	7.7±0.01	36.482±5.9	7.5±0.01	40.281±3.6	7.6±0.05	44.248±0.2
45	7.5±0.0	73.043±1.8	7.5±0.01	70.312±1.5	7.5±0.02	51.951±1.9	7.4±0.02	76.840±2.8	7.5±0.01	57.027±0.1
60	7.6±0.0	92.476±0.4	7.6±0.01	96.394±0.1	7.6±0.02	95.537±2.9	7.5±0	89.491±3.3	7.6±0.03	82.140±0.1

pH = potencial de hidrogeno; EB %= Eficiencia de biodegradación

4.6.4.3. Conductividad eléctrica (CE) durante la biorremediación

Existe una relación positiva entre la capacidad de degradación de los hidrocarburos y el cambio de la conductividad eléctrica al ser una característica fisicoquímica que es afectada por la concentración de iones solubles, los cuales interfieren en el crecimiento de microorganismos. En el caso de este proceso de biodegradación la conductividad eléctrica presentó niveles bajos a lo cero días para Testg (control) de 1.04 ± 0.10 y 1.33 ± 0.10 dS m⁻¹ para B1 (figura 55) reportado como el más alto de los cinco tratamientos, de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000 se encuentran en el rango de muy ligeramente salino. Se mantuvo disminuyendo a partir del día 15 hasta el día 60 presentando efectos despreciables de salinidad en primer lugar el tratamiento B1, seguido de B5 y B3, los cuales también dieron porcentajes altos de eficiencia de degradación (apartado 4.6). Qin (2012) sugirió que la salinidad tiene una gran influencia en el proceso de biorremediación y biodegradación, y también afecta el crecimiento y la diversidad microbiana. Es decir, entre más aumento de la conductividad eléctrica, más incremento de la salinidad y por lo tanto menor tasa de degradación. Ebadi (2017) describe que la salinidad tiene una influencia adversa sobre la actividad de algunas enzimas claves complicadas en el proceso de degradación de los hidrocarburos. En este proceso de biorremediación la conductividad eléctrica presentó valores muy bajos y por lo tanto hubo una mayor degradación conforme disminuía la salinidad como se muestra en la tabla 24.

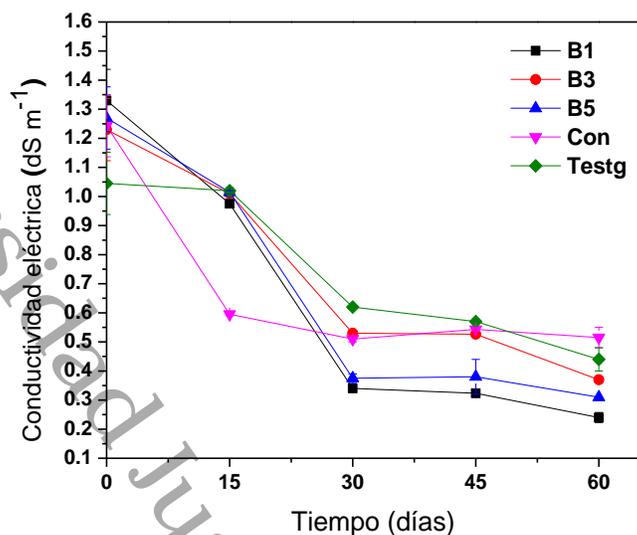


Figura 55. Valores de Conductividad Eléctrica durante la biorremediación de los cinco tratamientos (B1, B3, B5, Con y Testg)

Tabla 24: Datos de conductividad eléctrica Vs eficiencia de biodegradación de los cinco tratamientos durante la biorremediación

día	B1		B3		B5		Con		Testg	
	CE	EB %	CE	EB %	CE	EB %	CE	EB %	CE	EB %
0	1.33±0.1	0±0	1.23±0.1	0±0	1.27±0.1	0±0	1.24±0.01	0±0	1.04±0.01	0±0
15	0.97±0	14.206±0.1	1.01±0	30.868±9.8	1.01±0.0	18.614±2.7	0.59±0	27.235±1.3	1.02±0.01	9.673±1.5
30	0.34±0.1	57.816±4.2	0.53±0.01	34.287±8.7	0.37±0.01	36.482±5.9	0.51±0.01	40.281±3.6	0.62±0	44.248±0.2
45	0.32±0	73.043±1.8	0.52±0.0	70.312±1.5	0.38±0.06	51.951±1.9	0.54±0	76.840±2.8	0.57±0	57.027±0.1
60	0.24±0.1	92.476±0.4	0.37±0.01	96.394±0.1	0.31±0	95.537±2.9	0.51±0.3	89.491±3.3	0.44±0.04	82.140±0.1

CE= Conductividad Eléctrica (dS m⁻¹); EB %= Eficiencia de biodegradación

4.6.4.4. Densidad aparente / densidad real

La densidad aparente juega un papel importante para evaluar la calidad de un suelo como indicador de la estructura, la resistencia mecánica y la cohesión del mismo. Las variaciones de la densidad aparente en los tratamientos fueron mínimas esto se debe a que en la determinación por el método de la probeta se considera a las partículas del suelo tanto como al aire en los espacios porosos. En la figura 56 se muestra a los cero días una densidad aparente de 1.30 ± 0 g.cm⁻³. Al final de la biorremediación (60 días) los tratamientos presentaron mínima disminución de la densidad aparente en el caso de B3 y B1 con valores bajos de 1.05 ± 0.01 g.cm⁻³, el Testg (sin bacterias) con 1.12 ± 0.01 g.cm⁻³. Álvarez (2019) y SAGARPA (2012) señalan que, con el incremento de la densidad aparente, la resistencia mecánica tiende a aumentar y la porosidad del suelo disminuye. Los resultados en este análisis determinaron que la densidad aparente al día cero no fue afectada por el hidrocarburo al impactar el suelo ya que SAGARPA (2012) registra que para suelos francosos la densidad aparente ideal para el suelo se encuentra $D_{ap} < 1.4$ valores que aún se mantienen al día 60 de la biorremediación.

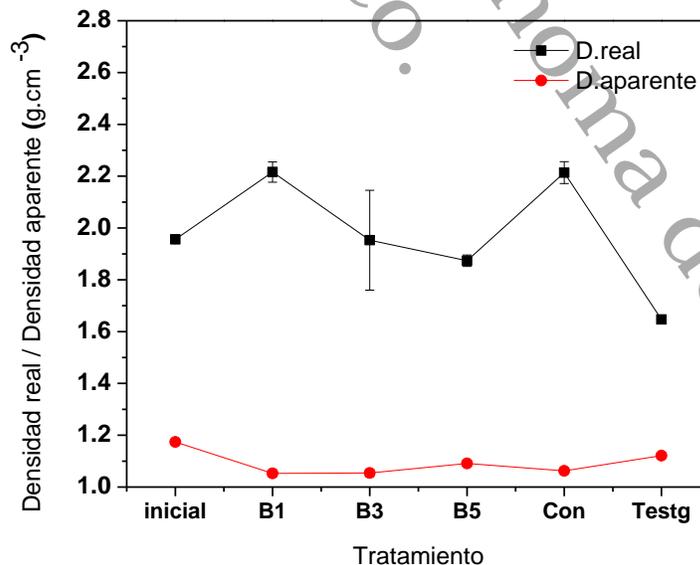


Figura 56. Valores de densidad real y aparente a los cero y 60 días de la biorremediación en los cinco tratamientos (B1, B3, B5, Con y Testg)

Sin embargo, en la densidad real los valores tuvieron variación, a los cero días el suelo presentó 1.28 ± 0 g.cm⁻³, el tratamiento B3 aumento a 1.95 ± 0.19 g.cm⁻³, B1 y Con presentaron aumento de 2.21 ± 0.03 g.cm⁻³ por otra parte el Testg mostró el valor más bajo con 1.64 ± 0 g.cm⁻³ a los 60 días. La relación entre la densidad real (1.28 ± 0 g.cm³) y la densidad aparente (1.30 ± 0 g.cm⁻³) a los cero días muestran una porosidad negativa de -1.79 % considerada como “muy reducida” de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000. En cuanto a los 60 días los valores de densidad real fueron favorables para obtener una porosidad mayor a la inicial. Para B3 el tratamiento con mayor eficiencia (%) en la biodegradación exhibió un aumento en la porosidad del suelo de 37.11 % considerada como “medianamente reducido”.

4.6.4.5. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) durante la biorremediación

Las unidades formadoras de colonias en los tratamientos fueron evaluadas durante el proceso de biorremediación. El tratamiento Testg al cual no se le adicionaron bacterias presentó 3.053 ± 0.02 Log UFC/mL, el B1 con bacterias exhibió los mismos valores. Por otro lado, el tratamiento Con reveló el valor más alto con 3.602 ± 0 Log UFC/mL seguido de B3 (3.430 ± 0.02 Log UFC/mL) y B5 (3.392 ± 0.01 Log UFC/mL) a los cero días. En cuanto al día 15 Con mostró una disminución de 2.823 ± 0.03 Log UFC/mL, de igual forma B5 siguió la misma tendencia, en cuanto a B1 (3.690 ± 0 Log UFC/mL), Testg (3.626 ± 0 Log UFC/mL) y B3 (3.514 ± 0 Log UFC/mL) continuaron en aumento.

En la figura 57 se aprecia al día 30 que los cuatro tratamientos muestran la misma tendencia al aumento de UFC a excepción del Testg (3.678 ± 0 Log UFC/mL) con menor crecimiento y mantuvo su incremento hasta el día 45, pero disminuyó a los 60 días.

A los 60 días se presentaron diferencias significativas en la eficiencia de degradación (%) (apartado 4.6) lo comparamos con los valores de UFC obtenidos en ese mismo día, el tratamiento B3 presentó 5.255 ± 0 Log UFC/mL, seguido de B5 (5.185 ± 0.1 Log UFC/mL) y B1 (4.819 ± 0.07 Log UFC/mL), estos tratamientos mostraron mayor eficiencia de degradación (%) al igual que el mayor crecimiento de microorganismos (tabla 25). El análisis de varianza indicó que existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$), con una $R^2 = 99.61$ % y $R_{ajustada} = 99.45$ %, con un error = 10. El método Tukey presentó cuatro grupos importantes: b, a, c y d, siendo el tratamiento B3 con mayor contenido

de UFC. Con y Testg se mostraron significativamente iguales, aunque Con presentó menor variación en los datos (Figura. 58). Esto se relaciona con lo descrito por Sulaiman (2015) los hidrocarburos en el suelo proporcionan una fuente de C para el crecimiento microbiano y esto explica la alta UFC. El aumento de UFC degradantes de hidrocarburos cultivables demuestra la rapidez con la que los microorganismos autóctonos del suelo son capaces de adaptarse a nuevos sustratos (Margesin *et al.*, 2000). El incremento de UFC como la tasa de degradación de los hidrocarburos fue favorecido por la disminución de la Salinidad y pH del suelo.

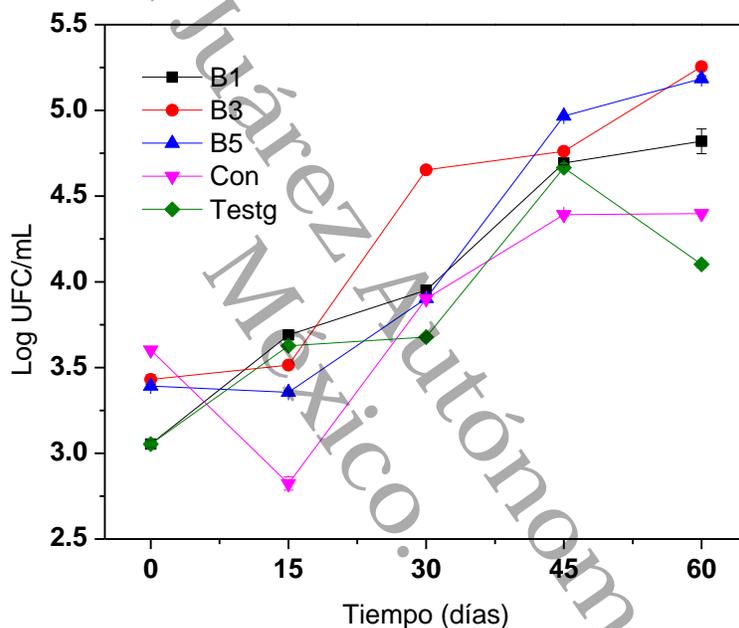


Figura 57. Unidades Formadoras de Colonias durante la biorremediación de los cinco tratamientos (B1, B3, B5, Con y Testg)

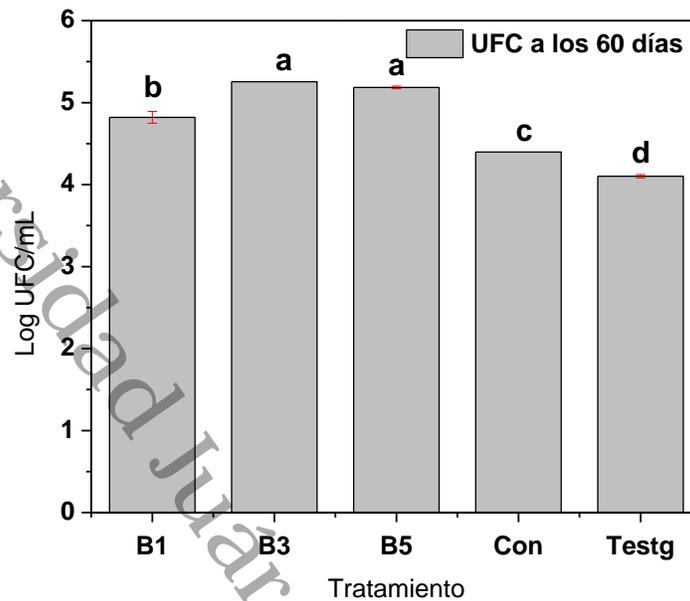


Figura 58. Unidades Formadoras de Colonias a los 60 días de la biorremediación

Tabla 25: Datos de UFC Vs eficiencia de biodegradación de los cinco tratamientos durante la biorremediación

Día	B1		B3		B5		Con		Testg	
	UFC	EB %	UFC	EB %	UFC	EB %	UFC	EB %	UFC	EB %
0	3.05±0.02	0±0	3.43±0.0	0±0	3.39±0.01	0±0	3.60±0	0±0	3.05±0.02	0±0
15	3.69±0	14.206±0.1	3.51±0	30.868±9.8	3.35±0.01	18.614±2.7	2.82±0.03	27.235±1.3	3.62±0	9.673±1.5
30	3.95±0	57.816±4.2	4.65±0	34.287±8.7	3.90±0	36.482±5.9	3.90±0	40.281±3.6	3.67±0	44.248±0.2
45	4.69±0.01	73.043±1.8	4.76±0	70.312±1.5	4.96±0	51.951±1.9	4.39±0.01	76.840±2.8	4.66±0	57.027±0.1
60	4.81±0.07	92.476±0.4	5.25±0	96.394±0.1	5.18±0.01	95.537±2.9	4.39±0	89.491±3.3	4.10±0.02	82.140±0.1

UFC= Unidades Formadoras de colonias (Log UFC/mL); E %= Eficiencia de biodegradación

4.7. FT-IR del biotensioactivo

La figura 59 muestra el espectro infrarrojo del biotensioactivo producido por la cepa B3. La banda de intensidad media a 3898 y 3857 cm^{-1} se atribuyó a la estructura de N-H en la molécula (Yun *et al.*, 2012) que indica la presencia de grupos peptídicos. Perteneciente al grupo de los hidroxilos se encuentra una banda de absorción a 3537 y 3419 cm^{-1} debido al estiramiento del enlace O-H, la intensidad de esta banda por lo general es amplia e intensa (McMurry, 2008). La cadena alifática fue evidenciada por la vibración del estiramiento de intensidad media del enlace C-H observada a 2955 cm^{-1} . La banda de absorción a 2843 y 2514 cm^{-1} se atribuyó a la estructura del grupo carboxílico por el estiramiento del enlace O-H de intensidad fuerte. El estiramiento del triple enlace C≡N a 2480 cm^{-1} indica la presencia de nitrilo. La banda de absorción intensa a 2074 cm^{-1} corresponde al estiramiento de C≡C perteneciente al grupo alquino. El grupo de los alquenos se presentó en la banda de absorción 1643 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace C=C. El estiramiento del enlace C-H a 1464 cm^{-1} indica la presencia de cadenas alifáticas (Kumar *et al.*, 2015). Sheshwtawy *et al.*, 2016 reporta que el estiramiento del enlace C-O en lactonas o ésteres cíclicos existen a 1050 y 1150 cm^{-1} . El biotensioactivo presenta características propias de los ramnolípidos, del grupo de los glicolípidos.

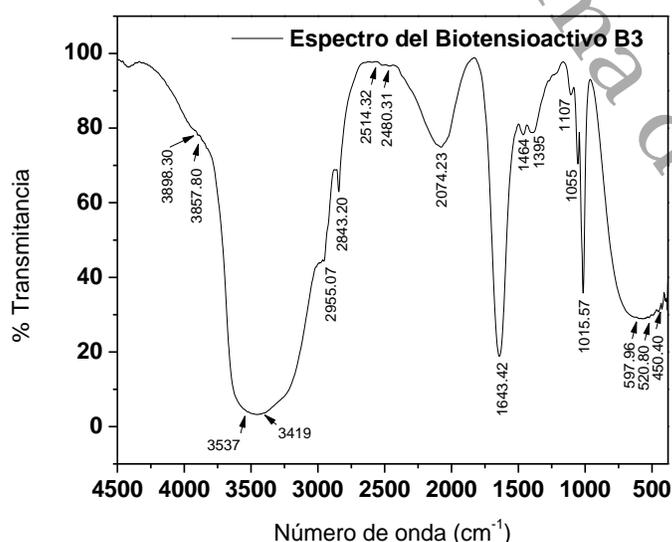


Figura 59. Espectro FT-IR de biotensioactivo producido por la cepa B3

4.7.1. Identificación de lípidos polares

La aplicación de cromatografía de capa fina, empleada para la identificación de lípidos polares, permitió detectar la presencia de glicolípidos (figura 60) en el biotensioactivo producido por la cepa B3. Estos compuestos han sido asociados a la acción tensioactiva de los biosurfactantes (Hamilton y Hamilton, 1992).

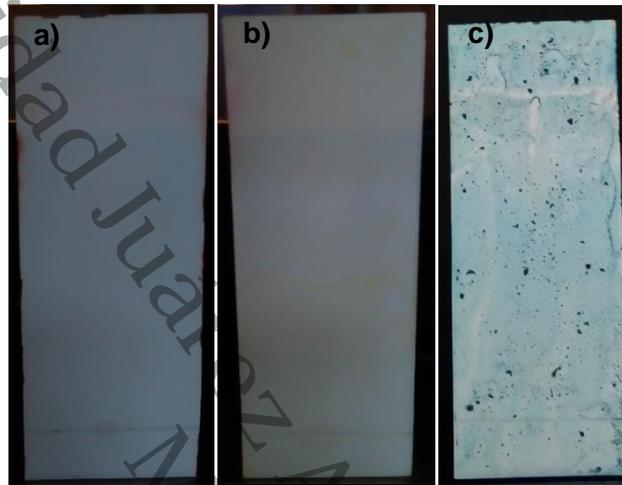


Figura 60. Lípidos polares asociados a la acción tensioactiva. a) Lipopéptidos; b) Fosfolípidos; c) glicolípidos

CAPITULO 5

Conclusiones

Como resultado de esta investigación podemos concluir que los suelos al ser impactados con petróleo las propiedades fisicoquímicas se alteran negativamente, pero al aplicar una restauración biológica dichas propiedades se modifican. Con el desarrollo metodológico aplicado en esta investigación se cumplieron los objetivos planteados, evaluando con respecto al tiempo la degradación de los hidrocarburos fracción pesada, fracción media y la variación de las propiedades fisicoquímicas aplicando bacterias petrofilicas aisladas del suelo contaminado, con capacidad de producir biotensioactivos. El desarrollo experimental implementado en este trabajo determinó con los siguientes resultados concluyentes:

1. Las características físico-químicas y propiedades de diagnóstico indicaron que el suelo de estudio se trata de un *Fluvisol eutrico (Fleu)*, con un horizonte superficial *umbrico (A1um)*, un subsuperficial *ferralico* con propiedades ánticas (IUSS Working Group WRB, 2014).
2. Las bacterias con potencial para degradar hidrocarburos del petróleo presentaron características morfológicas y bioquímicas pertenecientes a la especie *Pseudomonas* (B1 y B3) y *Azotobacter* (B5).
3. Las tasas máximas de crecimiento (μ_{max}) de los tratamientos C/N=20 fueron de 0.032 g/L para B5, 0.020 y 0.011 g/L para B3 y B1 respectivamente. En cuanto a los C/N=25 presentaron los valores más bajos de 0.017 g/L para B3, 0.014 y 0.004 para B1 y B5. El ANOVA indicó que existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$). El método Tukey selecciono al grupo principal, el tratamiento B520 con 0.030 g/L ± 0.001 .
4. Los métodos de detección para la producción de biotensioactivos colocan a la cepa B5 y B3 con el mayor % de emulsificación del 100 hasta el 50 %.
5. En la evaluación de la eficiencia de degradación de los hidrocarburos del petróleo el tratamiento B360 mostró porcentaje más alto con 96.3 ± 0.15 %, seguido de B5 (95.53 ± 2.9 %) y B1 (92.47 ± 0.4 %). La prueba de

medias Tukey presentó al tratamiento B3 y B5 significativamente iguales, sin embargo, el B3 presenta menos variación.

6. Las bacterias disminuyen la abundancia del área relativa de todos los hidrocarburos tanto de cadena largas y cortas de carbono.
7. Durante este estudio de la degradación de los hidrocarburos se observó un cambio de las propiedades del suelo y se encontró una estrecha correlación entre algunas variables: Temperatura, cambio de pH y conductividad eléctrica, actividad microbiana, densidad real, aparente y la porosidad del suelo.
8. El biotensioactivo producido por B3 (*Pseudomona*) de acuerdo al análisis FT-IR contiene grupos peptídicos, carboxílicos e hidroxilos, con presencia de glicolípidos la cual está asociada a la acción tensioactiva de los biosurfactantes.

Referencias bibliográficas

- Abbasi, M., Asl, N.R. (2008). Sonochemical degradation of basic blue 41 dye assisted by nano TiO₂ and H₂O₂. *J. Hard Mater.* 153 (3), 942–947.
- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt. J. Petrol.* 25, 107–123.
- Adam, G. (2001). A study into the potential of phytoremediation for diesel fuel contaminated soil In: *Environmental, Agricultural and Analytical Chemistry*. (Doctoral Thesis). University of Glasgow.
- Adam, G., Duncan, H.J. (2002). Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ. Pollut.* 120, 363–370.
- Adams, G.O., Fufeyin, P.T., Okoro, S.E., Ehinomen, I. (2015). Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: A review. *Int. J. Environ. Bioremediat. Biodegrad.* 3 (1), 28–39.
- Al-Hawash, A. B., Dragh, M. A., Li, S., Alhujaily, A., Abbood, H. A., Zhang, X., & Ma, F. (2018). Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(2), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>.
- Alvarez, V. M., Jurelevicius, D., Marques, J. M., de Souza, P. M., de Araújo, L. V., Barros, T. G., de Souza, R. A., Freire, D. G., Seldin, L. (2015). *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.08.046>.
- Álvarez-Jiménez, M. F., Jesús, M. De, Chávez, A., Mario, C., & Bautista, M. (2019). Evaluación del suelo contaminado con hidrocarburo e intemperizado en Cárdenas, Tabasco. 5, 27–38.

Almazán, V., Gonzalez, J., Perez J., Dieguez, F., Villaverde, M., Pérez, G., Joseph N. y Gan, R. (2000). Purificación e identificación de la naturaleza química de un tensioactivo producido por *Pseudomonas aeruginosa* Cepa Ido 330. *Revista Biología*. 14(2), 172-177.

Ang, L. Zhao, H. y Obbard, P. (2005). Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering, *Enzyme and microbial technology*, 37, 487-496.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2011). Total Petroleum Hydrocarbons. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, USA.

Azeez, O.M., Anigbogu, C.N., Akhigbe, R.E., Saka, W.A. (2015). Cardiotoxicity induced by inhalation of petroleum products. *J. Afr. Assoc. Physiol. Sci.* 3 (1), 14–17.

Barakat, A.O., Quian, Moonkoo, Kim, Yaorong, Kennicutt, M.C. (2001). Chemical characterization of naturally weathered oil residues in arid terrestrial environment in Al-Alamein. *Egypt Environ. Int.* 27 (4), 291–310.

Barabas, G., Vargha, G., Szabo, I. M., Penyige, A., Damjanovich, S., Szollosi, J., et al. (2001). n-Alkane uptake and utilisation by *Streptomyces* strains. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 79, 269–276.

Becerra, G. L. K., Horna, A. M. V. (2016). Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*. 7 (1), 23-31.

Beltrán, O., Berrío, L., Agudelo, E. y Cardona, S. (2013). Tecnologías de tratamiento para la tierra fuller contaminada con aceite dieléctrico, *Revista EIA*. 10 (19), 33-48.

Benyahia, F., Embaby, A.S. (2016). Bioremediation of crude oil contaminated desert soil: effect of biostimulation, bioaugmentation and bioavailability in biopile treatment systems. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 13 (2), 219 p.

Benedek, T., Máthé, I., Salamon, R., Rákos, Sz., Pásztohy, Z., Márialigeti, K. & Lány, Sz. (2012). Potential bacterial soil inoculant made up by *Rhodococcus* sp. and *Pseudomonas* sp. for remediation *in situ* of hydrocarbon - and heavy metal polluted soils. *Chemia*, 57(3), 199 – 211.

Bisht, S., Pandey, P., Bhargava, B., Sharma, S., Kumar, V., Sharma, K.D., 2015. Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology. *Braz. J. Microbiol* 46 (1), 7–21.

Bonilla CR. (1996). Notas preliminares sobre la biología del suelo. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, 74 p.

Bossert, I., Bartha, R. (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. USDA.

Cajaraville, M.P., Marigomez, J.A., Angulo, E. (1991). Automated measurement of lysosomal structure alterations in oocytes of mussels exposed to petroleum hydrocarbons. *Arch. Environ. Contamination Toxicol.* 21, 395–400.

Camenzuli, D., Freidman, B.L. (2015). On-site and in situ remediation technologies applicable to petroleum hydrocarbon contaminated sites in the Antarctic and Arctic. *Polar Res.* 34 (24492).

Chatterjee, T., Chatterjee, B.K., Majumdar, D., Chakrabarti, P. (2015). Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 299–306.

Centro Interamericano de Fotointerpretación (CIAF). (1980). Guía para la descripción de perfiles de suelo. Ministerio de obras Públicas. Subdirección de reconocimiento y fertilidad de suelos, Dirección de fomento de tierras y aguas, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación, Serie 1, Colombia, 132 p.

Córdova-Bautista, Y., Rivera-Cruz, MC., Ferrera-Cerrato, R., Obrador Olán, JJ., Córdova-Avalos, V. (2009). Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (*Mussa AAA Simmonds*) cultivar “Gram enano” y su potencial para integrar un biofertilizante. Universidad y ciencia trópico Húmedo. Colegio de postgraduados

campus Chontalpa. 25(3). 23-265.

Costa, A.S., Romao, L.P., Araujo, B.R., Lucas, S.C., Maciel, S.T., Wisniewski, Jr., A., Alexandre, M.R. (2012). Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresour. Technol.* 105, 31–39.

Cuanalo de la C, H. (1990). Manual para la descripción de perfiles de suelo en el campo. 3^{ra} edición. Centro de edafología. Colegio de posgraduados Chapingo, México.

Cho. S. J, Lee. K. S, Cha. J. B, Young. K. Y, S. S. K. (2003). Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiology Letters*.

Christopher W and Christopher L. (2004). Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Applied Environmental Microbiology* 7, 1777-1785.

Claves para la taxonomía de Suelos. (2014). Keys to Soil Taxonomy, 12th edition (Spanish translation).

Dalzell HW, Bliddlestone AJ, Gray KR, Thurairajan K. (1991). Manejo del suelo: producción y uso del composte en ambientes tropicales y subtropicales. Boletín de Suelos de la FAO 56. Servicio de Recursos, manejo y conservación de suelos. Dirección de fomento de Tierras y aguas, Roma, 177 p.

Dangi, A.K., Sharma, B., Hill, R.T., Shukla, P. (2019). Bioremediation through microbes: systems biology and metabolic engineering approach. *Crit. Rev. Biotechnol.* 39 (1), 79–98.

Das, N., Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Sage-Hindawi Biotechnol. Res. Int.* 2011, 941810. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/941810>, 13.

Domde, P., Kapley, A. y Purohit, H. (2007). Impact of bioaugmentation with a consortium of bacteria on the remediation of wastewater containing hydrocarbons, *Environmental science and pollution research*, 14 (1): 7-11.

DOF (2002). NOM-021-RECNAT-2000. Establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Segunda sección. Diciembre 2002.

DOF (2012). NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. Diario oficial de la federación. Mayo 2019.

Dzionic, A., Wojcieszńska, D., Guzik, U. (2016). Natural carriers in bioremediation: A review. *Electron. J. Biotechnol.* 23, 28–36.

Ebadi, A., Khoshkholgh Sima, N.A., Olamaee, M., Hashemi, M., Ghorbani Nasrabadi, R. (2017). Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *J. Adv. Res.* 8 (6), 627–633.

Esbaugh, A.J., Mager, E.M., Stieglitz, J.D., Hoenig, R., Brown, T.L., French, B.L., Linbo, T.L., Lay, C., Forth, H., Scholz, N.L., John, P., Incardona, J.P., Morris, J.M., Benetti, D.D., Grosell, M. (2016). The effects of weathering and chemical dispersion on Deepwater Horizon crude oil toxicity to mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) early life stages. *Sci. Total Environ.* 543, 644–651.

Ferraro, A., van Hullebusch, E.D., Huguenot, D., Fabbricino, M., Esposito, G. (2015). Application of an electrochemical treatment for edds soil washing solution regeneration and reuse in a multi-step soil washing process: Case of a Cu contaminated soil. *J. Environ. Manag.* 163, 62–69.

Ferrera-cerrato, Ronald, David J Palma-lópez, and Humberto Vaquera-huerta. (2005). "Derrames de Petróleo En Suelos y Adaptación de Pastos Tropicales En El Activo Cinco Presidentes, Tabasco, México." *Terra Latinoamericana* 23(3): 293–302.

Fedorak, P., Westlake, D. (1981). P. Fedorak, D. Microbial degradation of aromatics

and saturates in Prudhoe Bay crude oil as determined by glass capillary gas chromatography Can. J. Microbiol. 27 (4). 432-443.

Fritsche, W., Hofrichter, M. (2000). Aerobic degradation by microorganisms. In: Klein, J. (Ed.), Environmental Processes – Soil Decontamination. Wiley-Vch, Weinheim, Germany, pp. 146–155.

Fujiwara. H., Soda. S., Fujita. M., Ike. M. (2016). Kinetics of bisphenol a degradation by *Sphingomonas paucimobilis* FJ-4. Journal of Bioscience and Bioengineering. Japan, 1-4.

García-Rivero M. (2003). Transferencia de masa y biodegradación de hidrocarburos de un suelo intemperizado en un cultivo de suelo en suspensión. Tesis. Universidad Autónoma Metropolitana.

George, S., Jayachandran, K. (2013). Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. J. Appl. Microbiol. 114, 373–383.

Guarino, C., Spada, V., Sciarrillo, R. (2017). Assessment of three approaches of bioremediation (natural attenuation, landfarming and bioaugmentation – assisted landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. Chemosphere 170, 10–16.

Gunasekera, T. S., Striebich, R. C., Mueller, S. S., Strobel, E. M., & Ruiz, O. N. (2013). Transcriptional profiling suggests that multiple metabolic adaptations are required for effective proliferation of *Pseudomonas aeruginosa* in jet fuel. Environmental Science & Technology, 47, 13449–13458.

Gutzkow, K.B. (2015). Genetoxicity, Mutagenicity and Carcinogenicity and Reach. ICAW. Norwegian Institute of Public Health.

Gradova, N. B., Gornova, I. B., Eddaudi, R., & Salina, R. N. (2003). Use of Bacteria of the Genus *Azotobacter* for Bioremediation of Oil-Contaminated Soils. 39(3), 279–281.

Hamzah, A., Phan, C.W., Abu Bakar, N.F., Wong, K.K. (2013). Biodegradation of crude oil by constructed bacterial consortia and the constituent single bacteria isolated from Malaysia. *Bioremed. J.* 17 (1), 1–10.

Hamilton, R. y Hamilton, S. (1992). *Lipid Analysis*, IRL Press, the practical Approach Series, U.S.A. 65-93.

Hambrick, G. A., Delaunr, R. D., Patrick, W. (1980). Effect of estuarine sediment Ph and oxidation-reduction-potencial on microbial hydrocarbon degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 40 (2), 365-369.

Nurfarahin, A. H., Mohamed, M. S., & Phang, L. Y. (2018). Culture medium development for microbial-derived surfactants production—an overview. *Molecules*, 23(5), 1–26. <https://doi.org/10.3390/molecules23051049>.

Hawumba, J., Sseruwagi, P., Hung, Y. y Wang, L. (2010). Bioremediation, *En: Handbook of environmental engineering: Environmental bioengineering*. Wang, L., Tay, J., Tay, S. y Hung, Y. (Ed.). A product of human press, New York, USA. 277-316.

Hayat, S., Faraz, A., Faizan, M. (2017). Root exudates: composition and impact on plant–microbe interaction. In: *Biofilms in Plant and Soil Health*, Vol. 179.

Hengyuan, Liu., Nan, Chen., Chuanping, Feng., Shuang Tong., Rui Li. (2017). Impact of electro-stimulation on denitrifying bacterial growth and analysis of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model in a bio-electrochemical denitrification reactor. *Bioresource Technology*. Key Laboratory of Groundwater Circulation and Evolution (China University of Geosciences Beijing). 232, 344–353.

Hernández. C. (2015). Bacterias fijadoras de nitrógeno e hidrocarbonoclastas productoras de biotensoactivos. Tesis. Ujat. Cunduacan Tabasco. 53 p.

Hernandez, M., Ojeda, M., Martinez, J., Villegas, V., y Córdova, Y. (2011). Optimal parameters for the develop of the hydrocarbonoclastic Microorganismos *Proteus* sp. *J. Soil Sci. Plan Nutr.* 11 (1), 29-43.

Hu, G. (2016). Development of novel oil recovery methods for petroleum refinery oily sludge treatment (Ph.D Dissertation). University of Northern British Columbia.

IUSS Working Group WRB. (2014). World reference base for soil resources (2014). International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. In *World Soil Resources Reports No. 106*.
<https://doi.org/10.1017/S0014479706394902>.

Jiménez Hernández, V. (2018). Maestro en Ciencia y Tecnología en la Especialidad de Ingeniería Ambiental. 129 p.

Joutey, N.T., Bahafid, W., Sayel, H., El-Ghachtouli, N. (2013). Biodegradation: involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. In: *Biodegradation-Life Science*, vol. 11, INTECH, pp. 290–320.

Joy, S., Rahman, P. K. S. M., & Sharma, S. (2017). Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal*, 317, 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.054>.

Kim, J., Lee, A.H., Chang, W. (2018). Enhanced bioremediation of nutrient-amended petroleum hydrocarbon contaminated soil over a cold climate winter: The rate and extent of hydrocarbon biodegradation and microbial response in a pilot-scale biopile subjected to natural seasonal freeze-thaw temperatures. *Sci. Total Environ.* 612, 903–913.

Kiran, G. S., Thomas, T. A y Selvin J. (2010). Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardiopsis lucentensis* MSA04 in solid-state cultivation. *Colloids Surf. B* 78 (1), 8-16.

Koneman, E., Allen, S. (2008). Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana. Madrid, España. 11-115.

Kumar. N. P, Swapna. H. T, Khan. Y. M, Reddy. G, Hameeda. B. (2015). Statistical optimization of antifungal iturin a production from *Bacillus amyloliquefaciens* RHNK22

using agro-industrial wastes. Saudi Journal of Biological Sciences. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.014>. India.

Lara-Severino, R. del C., Gómez Olivan, L. M., Sandoval Trujillo, Á. H., Isaac-Olive, K., & Ramírez-Durán, N. (2017). Búsqueda de capacidad productora de biosurfactantes en actinobacterias haloalcalófilas y haloalcalotolerantes. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 33(3), 529–539. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.03.15>.

Lavelle P, Spain AV. (2005). Soil Ecology. 2nd. Ed. Kluwer Academic Publishers, Springer, Holanda, 654 p.

Lawal, A.T. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. *Cogent Environ. Sci.* 3, 1339841.

León, L. H., Rojas, L. M. (2015). Determinación del potencial promotor del crecimiento vegetal de *Azotobacter spp.* aislados de la rizósfera de malezas en cultivos de maíz (*Zea mays L.*) Determination of plant growth promoting potential of *Azotobacter spp.* isolated from the rhizosphere of weeds in maize crop (*Zea mays L.*). 6(4), 247–257.

Lim, M.W., Lau, E.V., Poh, P.E. (2016). A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil – present works and future directions. *Mar. Pollut. Bull.* 109, 14–45.

Liu, H., Xu, J., Liang, R. & Liu, J. (2014). Characterization of the medium- and long-chain n-alkanes degrading *Pseudomonas aeruginosa* strain SJTD-1 and its alkane hydroxylase genes. *Plos One.* 9.

Logan, N.A., Berkeley, C. W. (1984). Identificación of *Bacillus* Strains Using the API System. *Journal of general microbiology.* University of Bristol. 130, 1871-1882.

Ma, J., Yan, G., Ma, W., Cheng, C., Wang, Q., & Guo, S. (2015). Isolation and Characterization of Oil-Degrading Microorganisms for Bench-Scale Evaluations of Autochthonous Bioaugmentation for Soil Remediation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226(8). <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2491-6>.

Madigan, M., Martinko, M., Dunlap, P. and Clark, D. (2017). Brock Biology of Microorganisms. 15 ed. Pearson, San Francisco. 1600 p.

Maier Raina Pepper M, Ian L. and Gerba P Charles. (2000). Environmental Microbiology. Academic press.

Maletic, S.P., Dalmacija, B.D., Roncevic, S.D. (2013). Petroleum Hydrocarbon Biodegradability in Soil – Implications for Bioremediation. In: Hydrocarbon, vol. 3, INTECH, 43–64.

Maletic, S.P., Dalmacija, B.D., Roncevic, S.D. (2013). Petroleum Hydrocarbon Biodegradability in Soil – Implications for Bioremediation. In: Hydrocarbon, vol. 3, INTECH, 43–64.

Manobala, T., Shukla, S., Rao, T.S., Kumar, M.D. (2018). A New Uranium Bioremediation Approach using Radio-tolerant.

Margesin, R., Labbe, D., Schinner, F., Greer, C.W., Whyte, L.G. (2003). Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. Appl. Environ. Microbiol. 69 (6), 3085–3092.

Margesin, R., Zimmerbauer, A., Schinner, F. (2000). Monitoring of Bioremediation by soil biological activities. Chemosphere 40, 339-346.

May, J., Manzi, L. (2017). Bacterias hidrocarburoclásticas del género *Pseudomonas* en la rizosfera de *Samanea saman* (Jacq.) Merr. Revista colombiana de biotecnología. 21 (1).

Menn, F-M., Easter, J. P. y Sayler, G. S. (2000). Bacterial activity enhancement and soil decontamination. In H.J.Rehm, G.Reed, A.Pühler and P.Stadler, editors, Biotechnology. Environmental processes II. Soil decontamination. Wiley-VCH. Weinheim. 425-439.

Mendez-Natera, J.R., Roque, C., Zapata, K., Otahola-Gómez, V. (2004). Effect of concentration and time of soil contamination by oil on germination of maize seeds (*Zea mays* L.) Cv. Himeca 95. *Rev. UDO Agríc.* 4, 66–71.

Morales-Guzmán, G., Ferrera-Cerrato, R., Rivera-Cruz, M. del C., Torres-Bustillos, L. G., Arteaga-Garibay, R. I., Mendoza-López, M. R., ... Alarcón, A. (2017). Diesel degradation by emulsifying bacteria isolated from soils polluted with weathered petroleum hydrocarbons. *Applied Soil Ecology*, 121(October), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.003>.

Mishra, A.K., Kumar, G.S. (2015). Weathering of oil spill: modeling and analysis. *Aquat. Procedia* 4, 435–442.

Morillo, E., Villaverde, J., (2017). Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. *Sci. Total Environ.* 586, 576–597.

Moubasher, H. A., Hegazy, A. K., Mohamed, N. H., Moustafa, Y. M., Kabil, H. F., & Hamad, A. A. (2015). Phytoremediation of soils polluted with crude petroleum oil using *Bassia scoparia* and its associated rhizosphere microorganisms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 98, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.11.019>.

Mulligan, C.N., Gibbs, B.F. (1989). Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3016–3019.

McHughen, A. (2016). A critical assessment of regulatory triggers for products of biotechnology: Product vs. process. *GM Crops Food* 7 (3–4), 125–158.

McMurry, John. (2008). *Química Orgánica*. [Traducido al español de *Organic Chemistry*]. Cengage Learning. 7th Ed. México. DF.

Mnif, I., Sahnoun, R., Ellouz-Chaabouni, S., Ghribi, D. (2017). Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. *Pro. Saf. Environ. Prot.* 109, 72–81.

Nwankwegu, A.S., Onwosi, C.O. (2017). Bioremediation of gasoline contaminated agricultural soil by bioaugmentation. *Environ. Technol. Innov.* 7, 1–11. Nyer, E.K., 2000. *In Situ Treatment Technology*, second ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

Ogunneye, A.L., Omoboyowa, D.A., Sonibare, A.L., Adebusuyi, A.J., Faniran, T.P. (2014). Hepatotoxicity and nephrotoxic effects of petroleum fumes on petrol attendants in Ibadan, Nigeria. *Niger. J. Basic Appl. Sci.* 22 (3&8), 57–62.

Omoti, A.E., Waziri-Erameh, J.M., Enock, M.E. (2008). Ocular disorders in a petroleum industry in Nigeria. *Eye* 22, 925–929.

Ortíz, O., Ize, I. y Gavilán, A. (2003). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México, *Gaceta ecológica*, (69): 83-92.

Ossai, I. C., Ahmed, A., Hassan, A., & Hamid, F. S. (2020). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: A review. *Environmental Technology and Innovation*, 17, 100526. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100526>.

Paul, D., Pandey, G., Pandey, J., Jain, K. (2005). Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration, *Trends in biotechnology*, 23 (3), 114-135.

Palma-López, D., Cisneros, D. J., Moreno, C. E., & Rincón, R. J. (2016). *Suelos de Tabasco: Su uso y manejo sustentable*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/293958380_Suelos_de_Tabasco_Su_Uso_y_Manejo_Sustentable.

Pawar, R. (2015). The effect of soil pH on bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS). *J. Bioremediat. Biodegrad.*, 2015.

Popoviciu, D. R. and Bercu, R. (2014). Effects of nutrients and hydrogen peroxide on hydrocarbon biodegradation in marine sandy sediments microcosms. *Annals of R.S.C.B.* 19, 27-31.

- Qin, X., Tang, J., Li, D., Zhang, Q. (2012). Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline alkaline soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 55 (3), 210–217.
- Rashedi, H., Jamshidi, E., Mazaheri, M., Bonakdarpour, B. (2005). Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2, 121–127.
- Radwan, S. S., Barabas, G., Sorkhoh, N. A., Damjanovich, S., Szabo, I., Szollosi, J., et al. (1998). Hydrocarbon uptake by *Streptomyces*. *Fems Microbiology Letters*, 169, 87–94.
- Ramírez, R, Luna, B, Velásquez, O, Vierna, L, Mejía, A, Tsukuzi, G, Hernández, L, Muggenburg, I, Camacho, A, Urzúa, M. (2001). Manual de prácticas de Microbiología General. Facultad de Química, UNAM. México, D.F. 309 p.
- Rajasekar, A., Maruthamuthu, S., Muthukumar, N., Mohanan, S., Subramanian, P., Palaniswamy, N. (2005). Bacterial degradation of naphtha and its influence on corrosion. *Corrosion Science.* 47: 257-271.
- Reddy, K.R. (2013). Electrokinetic remediation of soils at complex contaminated sites: Technology status, challenges, and opportunities. In: *Coupled Phenomena in Environmental Geotechnics*. Francis & Taylor group. 131–147.
- Ren, X., Zeng, G., Tang, L., Wang, J., Wang, J., Deng, Y., Liu, Y., Peng, B. (2018). The potential impact on the biodegradation of organic pollutants from composting technology for soil remediation. *Waste Manage.* 72, 138–149.
- Riazi, M.R. (2005). *Characterization and Properties of Petroleum Fractions*, first ed. American Society for Testing and Material (ASTM), West Conshohocken, PA.
- Rodrigo, M.A., Oturan, N., Oturan, M.A. (2014). Electrochemically assisted remediation of pesticides in soil and water: A review. *Chem. Rev.* 114 (17), 8720–8745.
- Rusin, M., Gospodarek, J., Nadgórska-Socha, A. (2015). The effect of petroleum derived substances on the growth and chemical composition of *Vicia faba* L. *Pol. J. Environ. Stud.* 24 (5), 2157–2166.

Salgado-Brito, R., Neria, M. I., Mesta-Howard, A. M., Diaz Cedillo, F., & Wang, E. T. (2007). Oxidation of solid paraffin (C11-40) by *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1. *Annals of Microbiology*, 57, 321–328.

Sardrood, B., Goltapeh, E. y Varma, A. (2013). An introduction to bioremediation. pp. 3-28. *En: Fungi as bioremediation, soil biology*. E.M. Goltapeh et al., (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.

Saum, L., Jiménez, M.B., Crowley, D. (2018). Influence of biochar and compost on phytoremediation of oil-contaminated soil. *Int. J. Phytoremed.* 20 (1), 54–60.

Sumbul, A., Ansari, R. A., Rizvi, R., & Mahmood, I. (2020). Saudi Journal of Biological Sciences Azotobacter: A potential bio-fertilizer for soil and plant health management. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), 3634–3640. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.004>.

SAGARPA. (2012). Subíndice de Uso Sustentable del Suelo – Metodología de Cálculo. 1–66.

Satpute S. K., Bhawsar B. D., Dhakephalkar P. K. y Chopade B. A. (2008). Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. *Indian J. Mar. Sci.* 37 (3), 243-250.

Saharan, B.S., Sahu, R.K., Sharma, D. A. (2012). Review on biosurfactants: Fermentation, current developments and perspectives. *Genet. Eng. Biotechnol. J.* 2011, 1–14.

Shan, B.Q., Zhang, Y.T., Cao, Q.L. (2014). Growth responses of six leguminous plants adaptable in Northern Shaanxi to petroleum-contaminated soil. *Environ. Sci.* 35, 1125–1130.

SEMARNAT. (2006). NMX-AA-134-SCFI-2006. Para la determinación de hidrocarburos de fracción pesada por extracción y gravimetría- Método de Prueba. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Diario Oficial de la Federación. Marzo 2005.

SEMARNAT. (2008). NMX-AA-145-SCFI-2008. Para la de determinación de hidrocarburos fracción media por cromatografía de gases con detector de ionización de flama- Método de prueba. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Diario Oficial de la Federación. Marzo 2005.

Shukla, S.K., Rao, T.S. (2017). The first recorded incidence of *Deinococcus radiodurans* R1 biofilm formation and its implications in heavy metals bioremediation. bioRxiv. 234781.

Sheshtawy E, H. S., Aiad, I. I., Osma, M. E., Abo-E, A. A., Kobisy, A. S. (2016). Production of biosurfactants by *Bacillus licheniformis* and *Candida albicans* for application in microbial enhanced oil recovery. Egypt. 25. 293-298.

Speight, J.G. (2001). Handbook of Petroleum Analysis. John Wiley, New York.

Speight, J.G. (2007). The Chemistry and Technology of Petroleum, Vol. 114. CRC, Taylor and Francis, Boca Raton, Florida, U.S.A.

Speight, J.G. (2014). The Chemistry and Technology of Petroleum, fifth ed. CRC press, Boca Raton, Florida, USA.

Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A. (2017). Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. Front. Microbiol. 7, 1–16.

Srinivasan, A., Chowdhury, P., Viraraghan, T. (2008). Air stripping in industrial wastewater treatment. In: ELOSS – Waste Water Treatment Technologies.

Sriram, K., Lin, G.X., Jefferson, A.M., Goldsmith, W.T., Jackson, M., McKinney, W., et al. (2011). Neurotoxicity following acute inhalation exposure to the oil dispersant COREXIT EC9500A. J. Toxicol. Environ. Health A 74, 1405–1418.

Subba Rao, N.S. (2001). Soil Microbiology. United states of america. Science Publishers, Inc.

Sulaiman, A. A., Dominic, B. S., Graeme, I.P. (2015). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University Science*. 27, 31-41.

Tomar, G.S., Srinikethan, G. (2016). Studies on production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC7815) & its application in microbial enhanced oil recovery. *Res. J. Chem. Environ. Sci.* 4, 84–91.

Trulli, E., Morosini, C., Rada, E.C., Torretta, V. (2016). Remediation in situ of hydrocarbons by combined treatment in a contaminated alluvial soil due to an accidental spill of LNAPL. *Sustainability* 8, 1086.

Tylecote, A. (2019). Biotechnology as a new techno-economic paradigm that will help drive the world economy and mitigate climate change. *Res. Pol.* 48 (4), 858–868.

US EPA (U. S. Environmental Protection Agency). (2005). *Guideline: Soil bioremediation*, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1-9.

Varjani, S.J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresour. Technol.* 223, 277–286.

Vavrek, M.C., Campbell, W.J. (2002). Contribution of seed banks to freshwater wetland vegetation recovery. In: *Louisiana Applied and Educational Oil Spill Research and Development Program, OSRADP. Technical Report Series*. 0–12.

Vidali, M. (2001). Bioremediation. An overview, *Pure and Applied Chemistry*, 73 (7):1172-2001.

Volke- Sepúlveda, T. y Velasco- Trejo, J. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*, INE- SEMARNAT, México, 64.

Volke- Sepúlveda, T. y Velasco- Trejo, J. (2003). *Biodegradación de hidrocarburos del petróleo en suelos intemperizados mediante composteo*, SEMARNAT, INE y CENICA, México, 1-34.

Whelan, M.J., Coulon, F., Hince, G., Rayner, J., McWatters, R., Spedding, T., Snape, I. (2015). Fate and transport of petroleum hydrocarbons in engineered biopiles in polar regions. *Chemosphere* 131, 232–240.

White R. (2006). Principles and practice of soil science: The soil as a Natural Resource. 4th. Ed. Blackwell Publishing, USA, 363 p.

World Health Organization [WHO]. (1986). In, Immunotoxicology: Development of Predictive Testing for Determining the Immunotoxic Potential of Chemicals. United Nations Environment Programme International Labor Office, Report of a Technical Review Meeting, WHO Press, London, U.K.

Wu, M., Dick, W.A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., Xu, L., Zhang, M., Chen, L. (2016). Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 107, 158–164.

Yanti, M.D. (2018). Bioremediation of petroleum contaminated soil: A review. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 118.

Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M. y McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *J. Microbiol. Meth.* 56 (3), 339-347. DOI: 10.1016/j.mimet.2003.11.001

Yu K., Wong A., Yau K., Tam N. (2005). Natural attenuation, bioestmulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar Pollut Bull.* 51, 8-12.

Yun, F. Y., Qi, Q. L., Gang, F., Gao, Q. Y., Jian, H. M., We, L. (2012). Identification of Antifungal Substance (Iturin A2) Produced by *Bacillus subtilis* B47 and Its Effect on Southern.Corn Leaf Blight. *Science Direct. China.* 11(1). 90-99.

Yuste, L., Corbella, M. a. E., Turiégano, M. a. J., Karlson, U., Puyet, A., & Rojo, F. (2000). Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *Fems Microbiology Ecology*, 32, 69–75.

Zavala-Cruz J, Palma-López DJ, Fernández-Cabrera CR, López-Castañeda A, Shirma-Tórres E. (2012). Degradación y conservación de suelos en la cuenca del río Grijalva, Tabasco. Secretaría de Recursos Naturales y Protección Ambiental, Colegio de Postgraduados, PEMEX. Villahermosa, México. 90 p.

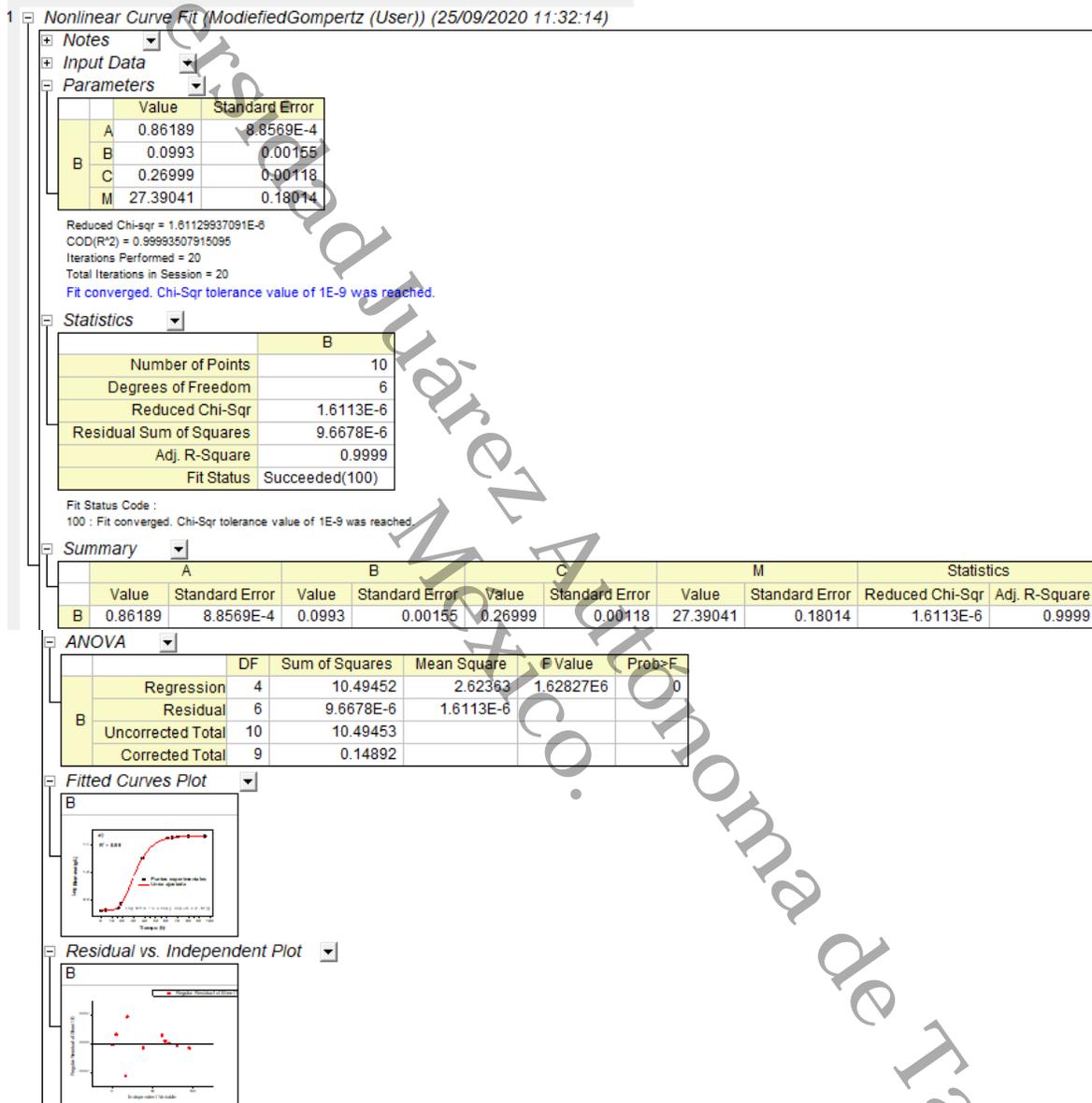
Zheng, M., Ahuja, M., Bhattacharya, D., Clement, T.P., Hayworth, J.S., Dhanasekaran, M. (2014). Evaluation of differential cytotoxic effects of the oil spill dispersant Corexit 9500. *Life Sci.* 95, 108–117.

Zhu, W. (2010). *Petroleum Polluted Soil and Sludge Bio-Treatment Technology*. China petrochemical press, Beijing. 26–29.

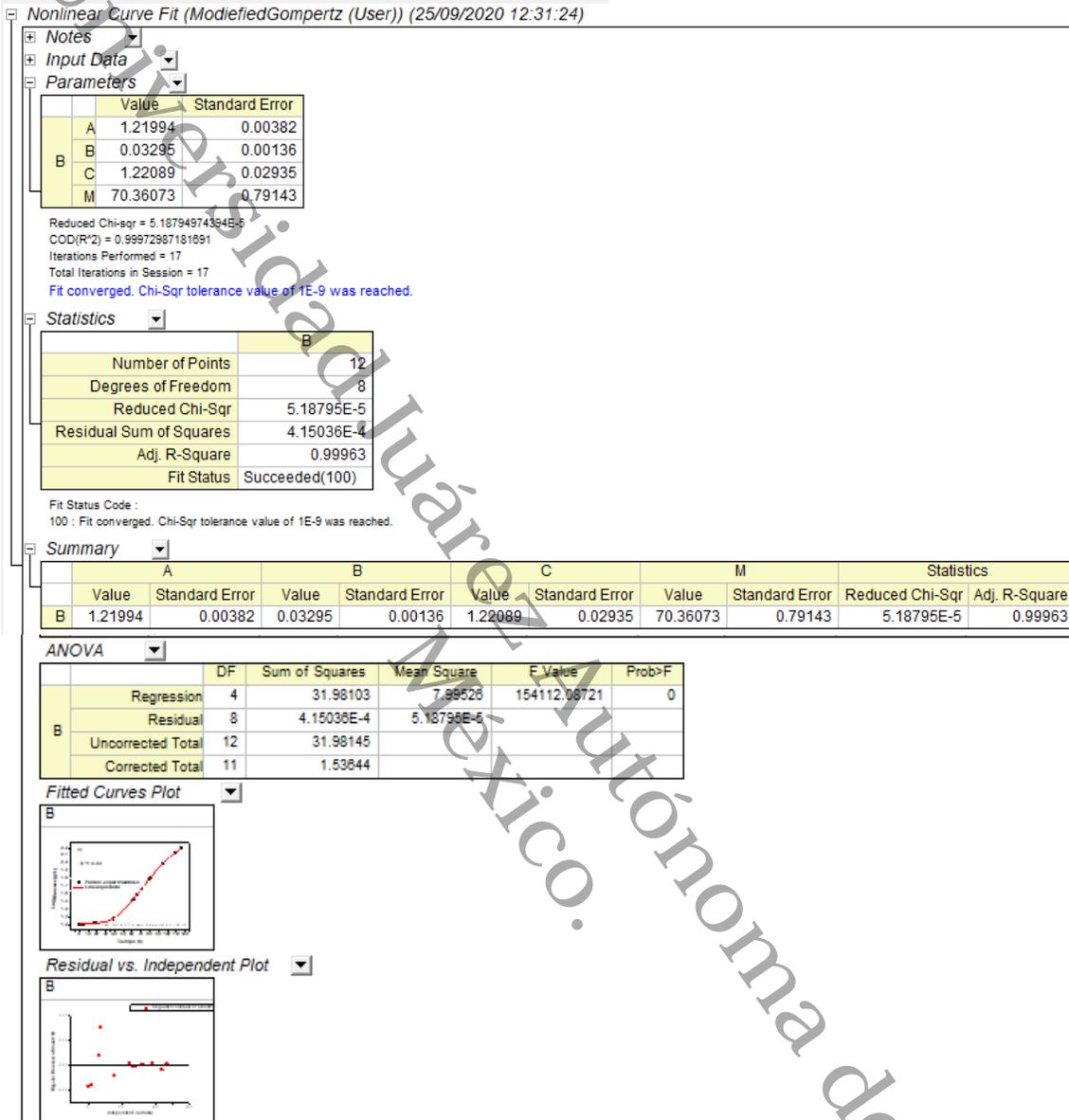
ANEXOS

Anexo A. Análisis de varianza: cinética de crecimiento

Tratamiento B120



Tratamiento B125



Tratamiento B320

1 Nonlinear Curve Fit (ModifiedGompertz (User)) (14/09/2020 17:39:07)

Notes

Input Data

Parameters

	Value	Standard Error
A	0.90296	0.00988
B	0.10941	0.01524
C	0.50357	0.01611
M	43.13816	1.2736

Reduced Chi-sqr = 3.90366E-4
 COD(R²) = 0.99539472342072
 Iterations Performed = 13
 Total Iterations in Session = 13
 Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Statistics

	B
Number of Points	11
Degrees of Freedom	7
Reduced Chi-Sqr	3.90366E-4
Residual Sum of Squares	0.00273
Adj. R-Square	0.99342
Fit Status	Succeeded(100)

Fit Status Code :
 100 : Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Summary

	A		B		C		M		Statistics	
	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square
B	0.90296	0.00988	0.10941	0.01524	0.50357	0.01611	43.13816	1.2736	3.90366E-4	0.99342

ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Regression	4	15.70388	3.92597	10057.16536	4.42424E-13
Residual	7	0.00273	3.90366E-4		
Uncorrected Total	11	15.70662			
Corrected Total	10	0.59335			

Fitted Curves Plot

Residual vs. Independent Plot

Tratamiento B325

Nonlinear Curve Fit (ModifiedGompertz (User)) (07/09/2020 00:59:51)

Notes

Input Data

Parameters

	Value	Standard Error
A	-0.05668	7.34341
B	0.04206	0.10206
C	1.06238	7.56161
M	-12.21268	245.2667

Reduced Chi-sqr = 0.00253424277749
 COD(R²) = 0.97744805394957
 Iterations Performed = 12
 Total Iterations in Session = 12
 Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

Statistics

	B
Number of Points	5
Degrees of Freedom	1
Reduced Chi-Sqr	0.00253
Residual Sum of Squares	0.00253
Adj. R-Square	0.90978
Fit Status	Succeeded(100)

Fit Status Code :
 100 : Fit converged. Chi-Sqr tolerance value of 1E-9 was reached.

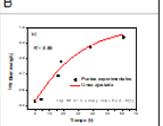
Summary

	A		B		C		M		Statistics	
	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Value	Standard Error	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square
B	-0.05668	7.34341	0.04206	0.10206	1.06238	7.56161	-12.21268	245.2667	0.00253	0.90978

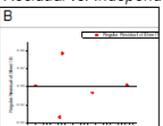
ANOVA

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Regression	4	3.06165	0.76541	302.02795	0.04227
Residual	1	0.00253	0.00253		
Uncorrected Total	5	3.06418			
Corrected Total	4	0.11236			

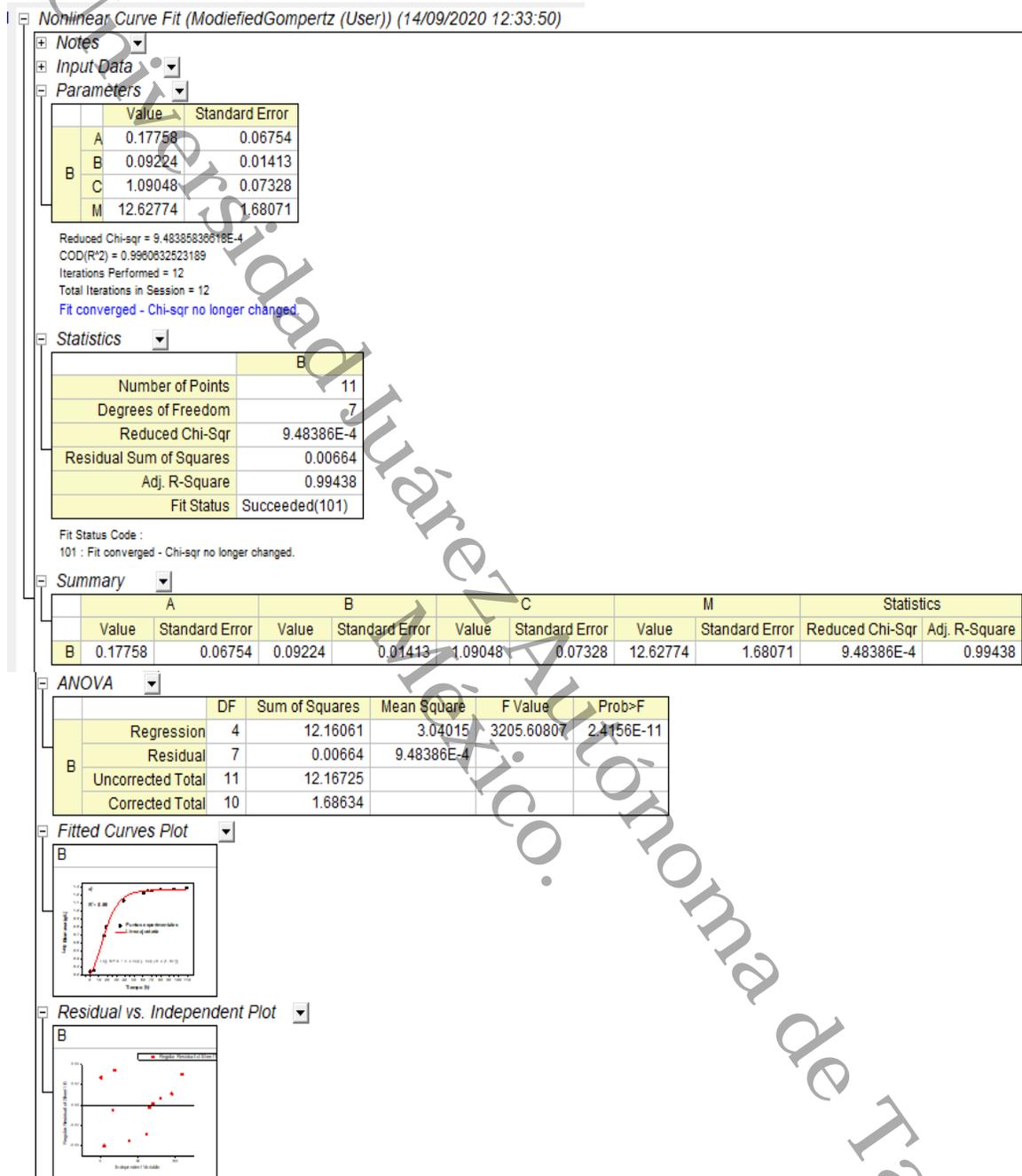
Fitted Curves Plot



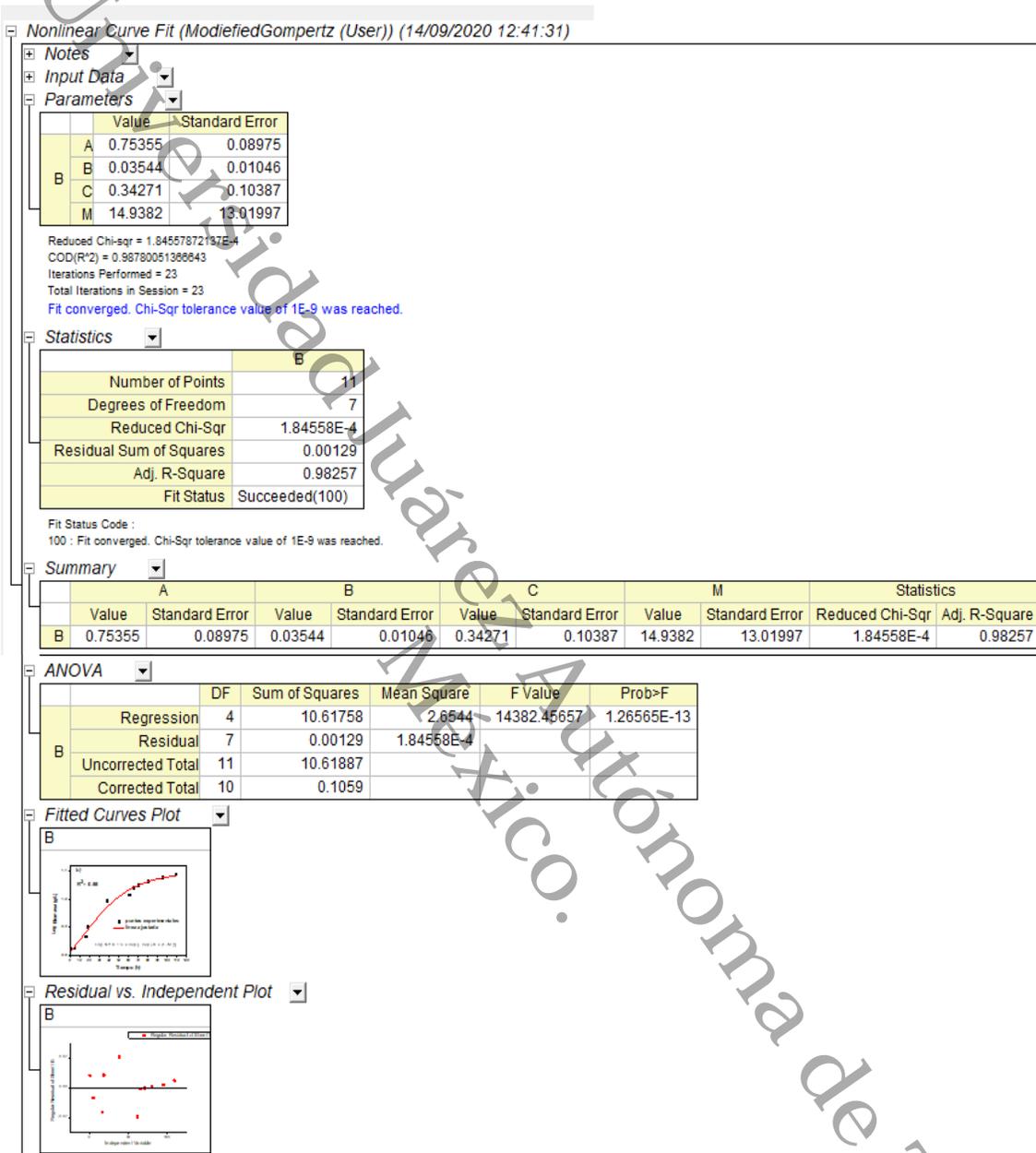
Residual vs. Independent Plot



Tratamiento B520



B525



ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE UN SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

3	0.007760	0.011962	0.016165	(-*)
4	-0.009568	-0.005366	-0.001163	(-*)
5	-0.007183	-0.002980	0.001222	(--*)
6	-0.020169	-0.015967	-0.011764	(-*)

-----+-----+-----+-----+-----
 -0.020 0.000 0.020 0.040

Trat = 3 subtracted from:

Trat	Lower	Center	Upper	
4	-0.021531	-0.017328	-0.013126	(-*)
5	-0.019145	-0.014943	-0.010740	(--*)
6	-0.032131	-0.027929	-0.023727	(-*)

-----+-----+-----+-----+-----
 -0.020 0.000 0.020 0.040

Trat = 4 subtracted from:

Trat	Lower	Center	Upper	
5	-0.001817	0.002386	0.006588	(-*)
6	-0.014803	-0.010601	-0.006398	(-*)

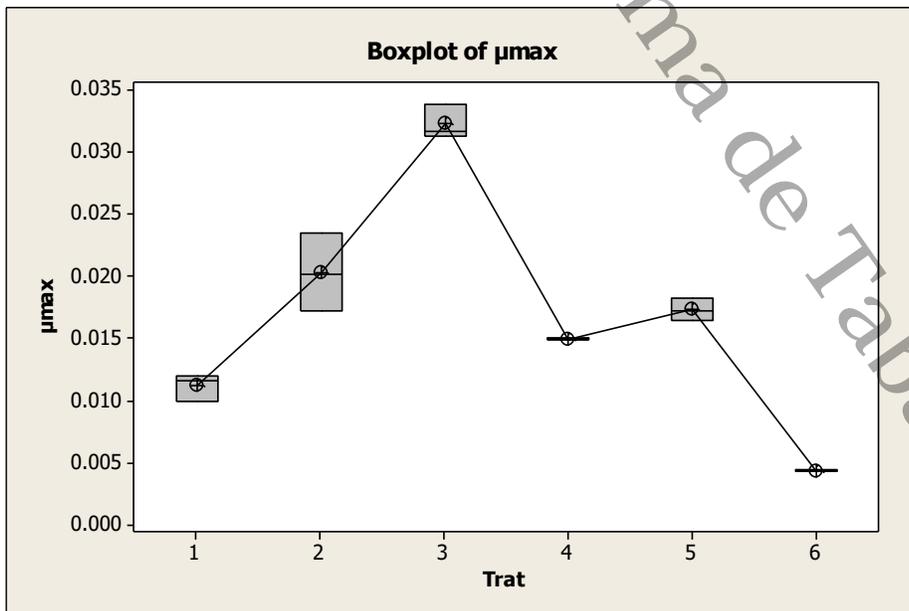
-----+-----+-----+-----+-----
 -0.020 0.000 0.020 0.040

Trat = 5 subtracted from:

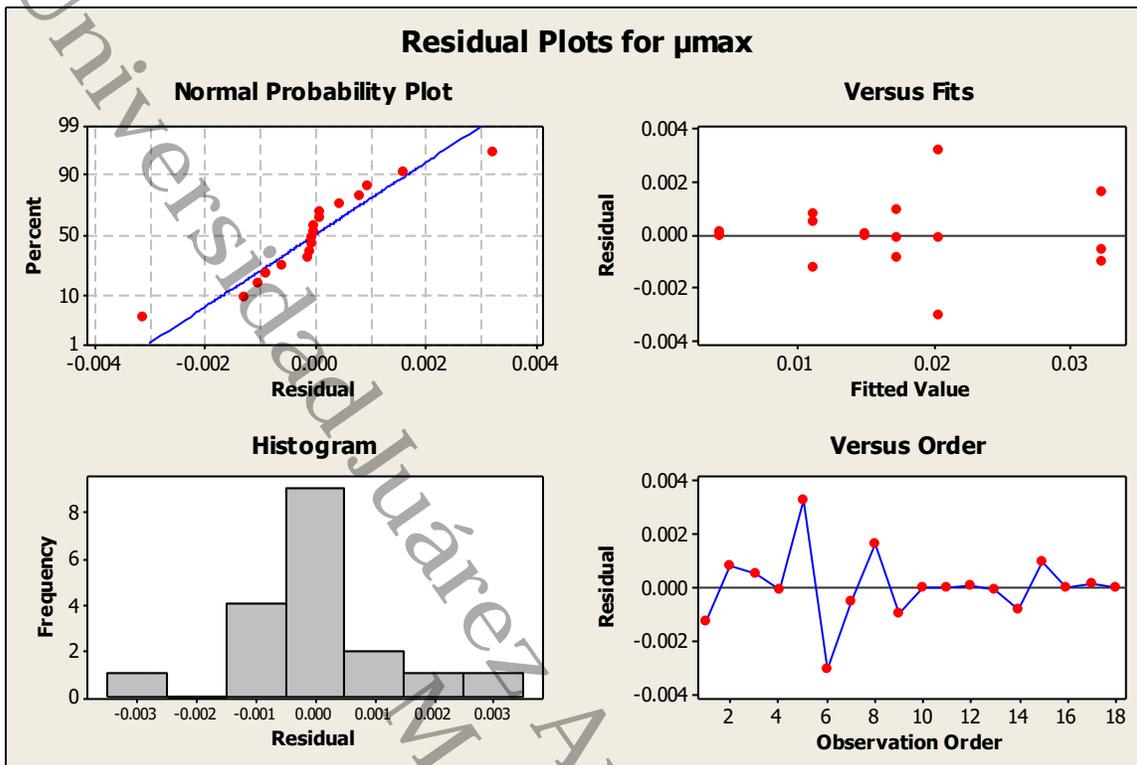
Trat	Lower	Center	Upper	
6	-0.017189	-0.012986	-0.008784	(--*)

-----+-----+-----+-----+-----
 -0.020 0.000 0.020 0.040

Boxplot of μ_{max}



Residual Plots for μ_{max}



ANEXO C. Eficiencia de degradación

Interaction Plot for % eficiencia

Two-way ANOVA: % eficiencia versus Tiempo, Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Tiempo	4	75205.7	18801.4	1624.73	0.000
Tratamiento	4	928.8	232.2	20.07	0.000
Interaction	16	2984.7	186.5	16.12	0.000
Error	50	578.6	11.6		
Total	74	79697.8			

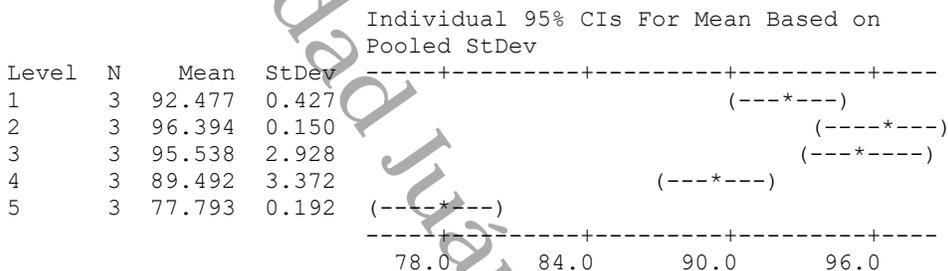
S = 3.402 R-Sq = 99.27% R-Sq(adj) = 98.93%

ANEXO D. Eficiencia de degradación del tiempo 60

One-way ANOVA: % eficiencia versus Tratamiento

Source	DF	SS	MS	F	P
Tratamiento	4	679.16	169.79	42.06	0.000
Error	10	40.37	4.04		
Total	14	719.53			

S = 2.009 R-Sq = 94.39% R-Sq(adj) = 92.14%



Pooled StDev = 2.009

Grouping Information Using Tukey Method

Tratamiento	N	Mean	Grouping
2	3	96.394	A
3	3	95.538	A
1	3	92.477	A B
4	3	89.492	B
5	3	77.793	C

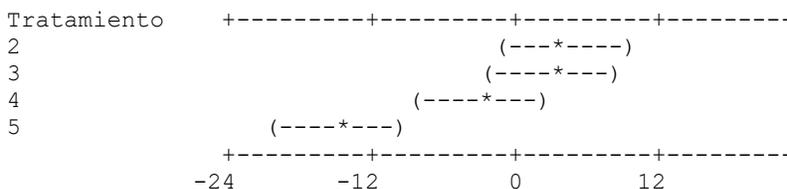
Means that do not share a letter are significantly different.

Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals All Pairwise Comparisons among Levels of Tratamiento

Individual confidence level = 99.18%

Tratamiento = 1 subtracted from:

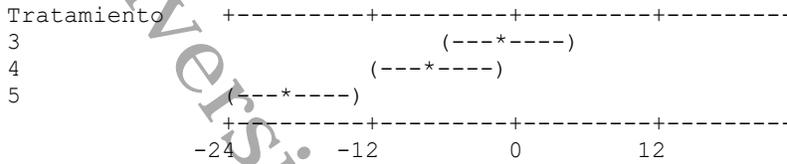
Tratamiento	Lower	Center	Upper
2	-1.477	3.917	9.311
3	-2.334	3.061	8.455
4	-8.380	-2.985	2.409
5	-20.079	-14.684	-9.290



Tratamiento = 2 subtracted from:

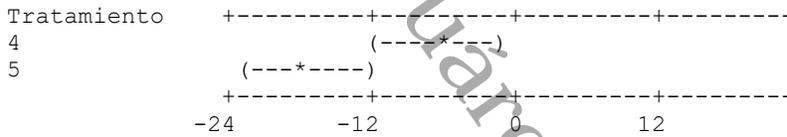
ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE UN SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Tratamiento	Lower	Center	Upper
3	-6.251	-0.856	4.538
4	-12.297	-6.902	-1.508
5	-23.996	-18.601	-13.207



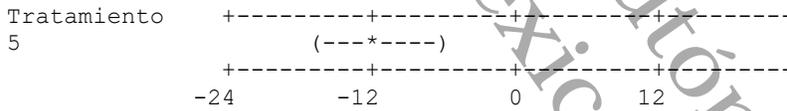
Tratamiento = 3 subtracted from:

Tratamiento	Lower	Center	Upper
4	-11.440	-6.046	-0.652
5	-23.139	-17.745	-12.351

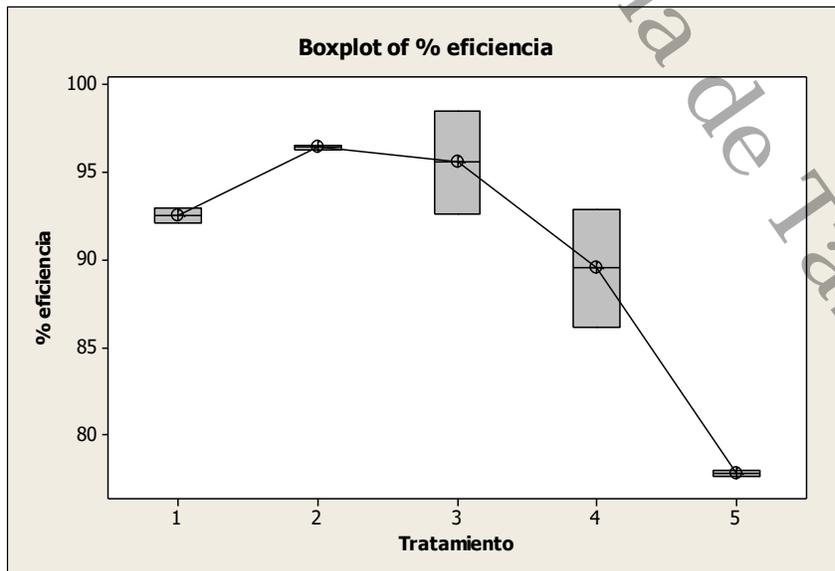


Tratamiento = 4 subtracted from:

Tratamiento	Lower	Center	Upper
5	-17.093	-11.699	-6.304



Boxplot of % eficiencia



Residual Plots for % eficiencia

