



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Biorremediación de suelo intemperizado
contaminado con hidrocarburos mediante co-
compostaje con *Eichhornia crassipes* y un
inoculante experimental**

Para obtener el título de:
Ingeniero Ambiental

Presenta:

Andrés Angelito García

Directores:

Dr. Ildefonso J. Díaz Ramírez

Dr. Erika Escalante Espinosa

Villahermosa, Tabasco. Junio, 2019

Biorremediación de suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos mediante co compostaje con *Eichhornia crassipes* y un inoculante experimental

Por Andrés Angelito García

CANTIDAD DE PALABRAS 17275

HORA DE ENTREGA

30-JUN-2025 09:43A. M.

NÚMERO DE
IDENTIFICACIÓN DEL
TRABAJO

116994101

Biorremediación de suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos mediante co compostaje con Eichhornia crassipes y un inoculante experimental

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	ambiental.unam.mx Internet	2130 palabras — 14%
2	assets.zyrosite.com Internet	73 palabras — < 1%
3	core.ac.uk Internet	44 palabras — < 1%
4	repositorio.usfq.edu.ec Internet	41 palabras — < 1%
5	agrofaz.net Internet	35 palabras — < 1%
6	www.scielo.org.mx Internet	31 palabras — < 1%
7	www.revistadelcentrodegraduados.com Internet	28 palabras — < 1%
8	www.universidadpersonal.net Internet	22 palabras — < 1%
9	documentop.com Internet	21 palabras — < 1%
10	spanish.omicsonline.org Internet	21 palabras — < 1%

11	www.revistascca.unam.mx Internet	19 palabras — < 1 %
12	archive.org Internet	18 palabras — < 1 %
13	dehesa.unex.es:8080 Internet	16 palabras — < 1 %
14	mriuc.bc.uc.edu.ve Internet	16 palabras — < 1 %
15	(5-25-15) http://148.206.53.84/tesiuami/OAMI10493.pdf Internet	15 palabras — < 1 %

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

EXCLUIR COINCIDENCIAS < 15 PALABRAS



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCION

JUNIO 03 DE 2019

C. ANDRÉS ANGELITO GARCÍA
PAS. DE LA LIC. EN ING. AMBIENTAL
P R E S E N T E

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se les autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis denominado: **"BIORREMEDIACIÓN DE SUELO INTEMPERIZADO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS MEDIANTE CO-COMPOSTAJE CON *Eichhornia crassipes* Y UN INOCULANTE EXPERIMENTAL"**, asesorado por el Dr. Ildefonso Jesús Díaz Ramírez y Dra. Erika Escalante Espinosa, sobre el cual sustentará su Examen Profesional, cuyo jurado está integrado por la M. en C. Reyna Lourdes Fócil Monterrubio, Q.B.P. Leonardo García Hernández, Dr. Ildefonso Jesús Díaz Ramírez, M. en C. Rosa Martha Padrón López y M. en C. Israel Ávila Lázaro.

ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCION EN LA FE


DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

C.c.p.- Expediente del Alumno.

CARTA AUTORIZACIÓN

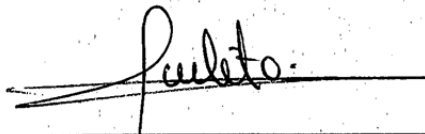
El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis denominado: **"BIORREMEDIACIÓN DE SUELO INTEMPERIZADO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS MEDIANTE CO-COMPOSTAJE CON *Eichhornia crassipes* Y UN INOCULANTE EXPERIMENTAL"**, de la 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 mencionada, 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 éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el Día 03 de Junio de 2019

AUTORIZO



ANDRÉS ANGELITO GARCÍA

DEDICATORIA:

Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay otros que luchan muchos años y son muy buenos. Pero hay quienes luchan toda la vida, esos son imprescindibles.

-Bertolt Brech

A Cleo y Cali, por ser imprescindibles en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Maximino Angelito Palma (QEPD), por preguntarme un día que quería ser de grande. A mis amados padres, por depositar en mi su confianza y esfuerzo, por haberme dado todo. Abranchi y Ale gracias por ser mis primeros maestros y mis primeros amigos.

Gracias al Polanco y a mi morenita, por escucharme y aconsejarme. A Chabelita, Chaquito, Franco, Ana, Maximito, Gabo y Mateito, cuando llegaron a mi vida solo quería ser mejor para ustedes, los amo.

Gracias Carmita, por brindarme de tu energía y amor. A mis Valtierra, por su apoyo incondicional y pláticas inspiradoras, por creer en mí.

A mis amigos, Christian y Gabriel. No me imagino “el sueño universitario sin ustedes”. Gabo te debo tanto hermano, sin ti no hubiera conocido a mi Martita Carrasco. Doña Marta, gracias por tantas atenciones, por los desayunos, por las novelas, el café y pláticas interminables, mil gracias por incluirme en su bonita familia. Familia Carrasco, ¡muchas gracias!

A Bioprocesos:

Taly, con quien inicié a la par este reto. Gracias por compartir conocimientos y anécdotas, por tu compañía y solidaridad. Te quiero mucho y me alegro por tu próximo logro. Y a ti Diana, que compartes con gusto lo aprendido. A mi amigo Mariano, por tu compañía y gran colaboración durante mi fase experimental. A Lucecita y Sele, quienes llegaron en el mejor momento, gracias por su valioso tiempo. A Gabi, por tus consejos y ayuda durante este trabajo. A los bio-compañeros que concluyeron su etapa en Bioprocesos, a Virginia, Luis, Yani, Susi, Reyna, Bolívar y a Jordita. Familia Bioprocesos ¡gracias!

A mis asesores, la Dra. Erika Escalante Espinosa y el Dr. Ildefonso J. Díaz Ramírez, por brindarme la confianza de trabajar en el equipo y aportar en mi formación con sus consejos y experiencias.

A la M. en C. Reyna L. Fócil Monterrubio, al Q. B. P. Leonardo García Hernández, el M. en C. Israel Ávila Lázaro y la M. en C. Rosa Martha Padrón López, por la disposición de contribuir con sus observaciones y enriquecer mi formación académica.

Tabla de contenido

i.	Resumen.....	3
1.	Introducción.....	4
2.	Marco teórico.....	7
2.1.	Contaminación de suelos por hidrocarburos.....	8
2.2.	Hidrocarburos del petróleo.....	9
2.3.	Degradabilidad de los hidrocarburos	9
2.4.	Microorganismos degradadores de hidrocarburos.....	12
2.5.	Estrategias de biorremediación.....	13
2.6.	Indicadores de biorremediación	14
2.7.	Eichhornia crassipes.....	15
3.	Antecedentes	17
4.	Justificación.....	20
5.	Objetivos e hipótesis	23
5.1.	Objetivo general.....	24
5.2.	Objetivos específicos	24
5.3.	Hipótesis	24
6.	Materiales y métodos	25
6.1.	Estrategia experimental.....	26
6.2.	Área de colecta de suelos y lirio acuático	27
6.3.	Inóculo.....	28
6.4.	Diseño experimental	28
6.5.	Preparación del inoculante sólido	28
6.6.	Métodos analíticos	29
6.6.1.	Parámetros fisicoquímicos del suelo.....	29
6.6.2.	Análisis microbiológicos	31
6.7.	Análisis estadísticos.....	32
7.	Resultados y discusión.....	34
7.1.	Suelo intemperizado altamente contaminado con hidrocarburos: caracterización fisicoquímica	35

7.2. Co-compostaje de suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos en adición de lirio y un inoculante experimental.....	38
7.2.1. Relación carbono-nitrógeno (C/N) durante el proceso de compostaje	38
7.2.2. pH y conductividad eléctrica (CE)	39
7.3. Biorremediación de suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos	41
7.3.1. Composición de los HTP residuales en el suelo	43
7.4. Análisis microbiológico	45
7.4.1. Microorganismos heterotróficos totales.....	45
7.5. Biomasa microbiana.....	49
7.6. Actividad de la enzima lipasa (LPS).....	50
7.7. Evaluación de la actividad respiratoria del suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos durante el co-compostaje con lirio y un inoculante experimental	52
7.7.1. Cinética de producción de CO ₂ durante el proceso de co-compostaje	52
7.7.2. Cinética del consumo de O ₂ durante el proceso de co-compostaje	54
7.7.3. Coeficiente respiratorio durante el proceso de co-compostaje	55
7.7.4. Coeficiente metabólico (Y _{CO2/X})	57
7.8. Análisis comparativo de la bioestimulación y bioaugmentación en el co-compostaje de suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos.	58
8. Conclusiones.....	59
9. Bibliografía	61
10. Anexo fotográfico	67

I. Resumen

En el presente trabajo se evaluó la eficiencia de la aplicación del lirio acuático durante el co-compostaje de un suelo intemperizado altamente contaminado con hidrocarburos del petróleo, bajo condiciones de bioestimulación y bioaumentación como parte de una alternativa para el aprovechamiento de lirio acuático aplicado a la biorremediación de suelos tropicales contaminados. La evaluación se basó en determinar diferentes indicadores relacionados a la actividad microbiana, enzimática y de biodegradación por microorganismos nativos y exógenos. Se realizó un ensayo de co-compostaje con un suelo altamente contaminado con hidrocarburos del petróleo (96,564 ppm) el cual fue afectado por condiciones de intemperismo, aplicando cuatro tratamientos analizados por triplicado (1.2 kg peso seco): a) lirio (10%), b) lirio-inoculante, c) inoculante y d) suelo intemperizado (control). Los resultados mostraron que la adición de lirio tuvo un efecto significativo, permitiendo alcanzar los niveles de biodegradación (50 días) más elevados (12.8%-15.8%) y contribuyó favorablemente en obtener la actividad enzimática más alta (1,371.5 μg de pNP g^{-1}). Además, la combinación lirio-inoculante resultó un factor significativo durante todo el proceso de co-compostaje por que incrementó la actividad de la enzima lipasa, la formación de biomasa microbiana (1,463-2,926 μg de biomasa g^{-1} de suelo), la mineralización, el consumo de oxígeno e incrementó el número de microorganismos degradadores de alcanos. La estrategia de co-compostaje planteada demostró que el uso de *Eichhornia crassipes* como acondicionador orgánico en conjunto con la bioaumentación con un inoculante bacteriano, puede ser aplicada como alternativa para el tratamiento de suelos tropicales intemperizados contaminados con hidrocarburos.

1. Introducción

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

La superficie de suelos intemperizados ha incrementado debido a las actividades de exploración, explotación y producción del petróleo, las cuales continúan exponiendo en riesgo el equilibrio de diversos ecosistemas. La Comisión Nacional de Hidrocarburos (CNH) reporta que durante el periodo del 2000 al 2014, en México ocurrieron 1,764 derrames de petróleo crudo y durante el periodo del 2015 al 2017, PEMEX reportó 624 derrames de hidrocarburos, lo que equivale a un incremento del 35.4% en tan solo tres años. En México, los sitios contaminados con hidrocarburos del petróleo, presentan diferentes grados de intemperización debido a la exposición prolongada a fuentes de contaminación. Así mismo, la efectividad de los tratamientos de biorremediación aplicados al suelo contaminado y la exposición a las condiciones ambientales imperantes de la región, aceleran la degradación de las fracciones más lábiles y concentran las recalcitrantes, restringiendo la biodisponibilidad de los contaminantes y limitando la actividad biológica, factores que definen a un suelo intemperizado.

La remediación de suelos con derrames de hidrocarburos se ha dificultado debido a elevados costos y a escasas tecnologías diseñadas acorde a cada tipo de suelo y contaminantes (Núñez *et al.* 2014). A pesar del impulso por generar fuentes de energías alternativas y el desarrollo de ecotecnologías, el papel del petróleo como proveedor de energía seguirá siendo importante durante las próximas décadas (Ivshina *et al.* 2017).

En los últimos años se han impulsado tecnologías las cuales emplean métodos químicos y son complementados con procesos biológicos, con el fin de recuperar sitios contaminados con hidrocarburos y que además de ser afín con el medio requiera de menor inversión. Como ejemplo están el empleo de sustratos o acondicionadores orgánicos los cuales enriquecen los suministros de calcio, magnesio, potasio, fósforo, nitrógeno y carbono (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} , P, N total y C) nutrientes necesarios para que los microorganismos nativos presentes en el suelo, biodegraden los compuestos del petróleo (Masto *et al.* 2013). Otra alternativa es la aplicación de microorganismos, previamente aislados, con potencial oxidativo de hidrocarburos o con el fin de incrementar la diversidad microbiana en el suelo.

El estado de Tabasco se encuentra cubierto en gran parte por las cuencas hidrológicas de mayor caudal en el país y se caracteriza por tener clima cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (INEGI, 2017). Estas condiciones favorecen la propagación de *Eichhornia crassipes* o lirio acuático, especie exótica considerada invasora, debido a su fácil reproducción y persistencia en los cuerpos de agua. Debido a su abundancia, se ha utilizado como materia prima en técnicas de compostaje y aplicada como abono orgánico (Vargas, 2018; Infante y Moreira, 2017; Mashavira *et al.* 2015; Osoro *et al.* 2014). Además, representa un recurso accesible que aporta nutrientes y microorganismos que mejoran las condiciones del bioproceso.

De acuerdo a lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la aplicación del *Eichhornia crassipes* como acondicionador orgánico en la biorremediación de un suelo intemperizado altamente contaminado con hidrocarburos. Con lo cual se busca el aprovechamiento del lirio acuático como parte de las estrategias de biorremediación.

2. Marco teórico

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

2.1. Contaminación de suelos por hidrocarburos

La liberación de sustancias no deseadas al medio ambiente más allá de los límites máximos permisibles, donde los efectos nocivos comienzan a manifestarse, se denomina contaminación (Shukla, 2014); y es uno de los problemas ambientales más importantes que se enfrentan en el planeta. El suelo se considera un sistema complejo, en donde, frecuentemente la velocidad con que los contaminantes ingresan al mismo, supera su capacidad de disipación (Torri *et al.*, 2018). En estos casos, en las áreas contaminadas son afectadas adversamente flora y fauna que pueden ser eliminadas o desplazadas del sitio, alterando el ecosistema e incluso la forma de vida de los humanos.

Como resultado de la explotación a gran escala de recursos naturales, especialmente petróleo y gas, en México se han producido contaminantes derivados del petróleo difíciles de cuantificar. En consecuencia, existen amplias superficies de suelo que perduran contaminadas con hidrocarburos. El petróleo es un recurso energético muy importante y una materia prima para diversas industrias. A pesar del empleo de biocombustibles y otras fuentes de energía (Ivshina *et al.* 2017), su uso no ha dejado de ser indispensable. Por lo tanto, la contaminación por hidrocarburos resulta inevitable. Adicionalmente, en México existe una severa crisis de vandalismo, el número de tomas clandestinas (TC) pasó de 1,361 en el 2011 a 6,873 en 2016, tan solo en seis años se incrementó 5 veces el número de TC a la cual es sometido el transporte de crudo y sus derivados, desencadenando impactos negativos en el ambiente (PEMEX, 2016).

Los hidrocarburos del petróleo son compuestos contaminantes, que pueden ser recalcitrantes y altamente tóxicos debido a la presencia de compuestos hemotóxicos, carcinogénicos y teratogénicos (tales como PAH), clasificados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los EE. UU (Wu *et al.* 2017). Debido a la biomagnificación de algunos de los productos químicos, estos pueden magnificarse y generar extensas afectaciones las cuales pueden ser permanentes.

2.2. Hidrocarburos del petróleo

El petróleo crudo es una mezcla de hidrocarburos simples y complejos, constituidos principalmente de carbono e hidrógeno, la concentración de nitrógeno, azufre y oxígeno varían de acuerdo con el sitio de su extracción (Varjani, 2017). Los hidrocarburos son moléculas relativamente estables y pueden proporcionar una fuente de carbono y energía a cualquier organismo capaz de asimilarlos. La energía liberada por hidrocarburos líquidos o sólidos, por unidad de masa oxidada en presencia de oxígeno, es más alta que la obtenida de la oxidación de otros compuestos químicos o elementos. Lo que explica el origen de su riqueza energética. Widdel y Musat (2010) explican, que lo anterior se debe a la alta afinidad del hidrogeno y carbono, por el oxígeno y a su carencia de grupos de carbono oxidado (C-OH o C=O) en su estructura.

El petróleo crudo se clasifica en cuatro fracciones: alifáticos, aromáticos, resinas (llamados también polares) y asfaltenos. Los alifáticos representan la fracción más alta entre los componentes de petróleo crudo. En comparación con las fracciones alifáticas y aromáticas, las resinas y los asfaltenos contienen grupos funcionales con carácter polar (aldehídos, cetonas y ácidos carboxílicos), con estructuras de carbono complejas con la adición de heteroátomos como: nitrógeno, azufre y oxígeno (Varjani, 2017). Dicha composición es un factor que influye en la biodegradabilidad de los hidrocarburos.

2.3. Degradabilidad de los hidrocarburos

Comprender los factores ambientales que intervienen en la degradación de los hidrocarburos es de gran interés en la investigación; así como, las vías catabólicas implicadas en su biodegradación, ya que permiten diseñar y seleccionar tecnologías específicas para biorremediar contaminantes derivados del petróleo. La biodegradación es un proceso de eliminación biológica de contaminantes orgánicos, que se caracteriza por el aumento de la abundancia relativa de fracciones polares y la pérdida de hidrocarburos saturados (alifáticos) y aromáticos (Birch *et al.*, 2017). El grado de biodegradación de los hidrocarburos en suelos contaminados depende críticamente de: condiciones ambientales óptimas para estimular la actividad biodegradadora, el tipo de hidrocarburos y su concentración en la matriz

contaminada, que éstos sean física y químicamente accesibles para los microorganismos (biodisponibles) (Das y Dash, 2014; Peebles, 2014). Los compuestos simples del petróleo crudo pueden ser degradados por diversos microorganismos, pero muy pocas especies cuentan con la capacidad para degradar compuestos complejos. Para que la biodegradación de los hidrocarburos se lleve a cabo, es necesario el contacto celular con él sustrato, ya que la biodegradación inicia con la oxidación catalizada por oxigenasas asociadas a la superficie celular. Los hidrocarburos del petróleo contaminantes son hidrófobos y habitualmente se encuentran fuertemente sorbidos a minerales y partículas de arcilla en el suelo. Para estar accesibles para la degradación microbiana, deben ser desorbidos y solubilizados previamente (Luthy et al., 1997; Varjani & Upasani, 2017). Los hidrocarburos de bajo peso molecular y menores valores de K_{ow} (coeficiente de partición octanol/agua, que establece la tendencia de un compuesto químico al dividirse en una fase orgánica y una acuosa) son más solubles, volátiles, y menos hidrofóbicos que los hidrocarburos de alto peso molecular (Okere y Semple, 2012). Como resultado estos son degradados más fácilmente en el ambiente. Sin embargo, alcanos de cadena corta (C5-C10) con una alta solubilidad en agua son más tóxicos para los microorganismos degradadores; mientras que los n-alcanos de longitud intermedia (C10-C25 o C13-C19) son preferidos por los microorganismos (Ivshina et al. 2017; Varjani y Upasani, 2017).

Los hidrocarburos de alto peso molecular generalmente no se volatilizan ya que su punto de fusión es mayor a 100°C, son más difíciles de biodegradar debido principalmente a su baja solubilidad y limitada biodisponibilidad, dando lugar a una mayor persistencia en el suelo (Okere & Semple, 2012; Varjani & Upasani, 2017).

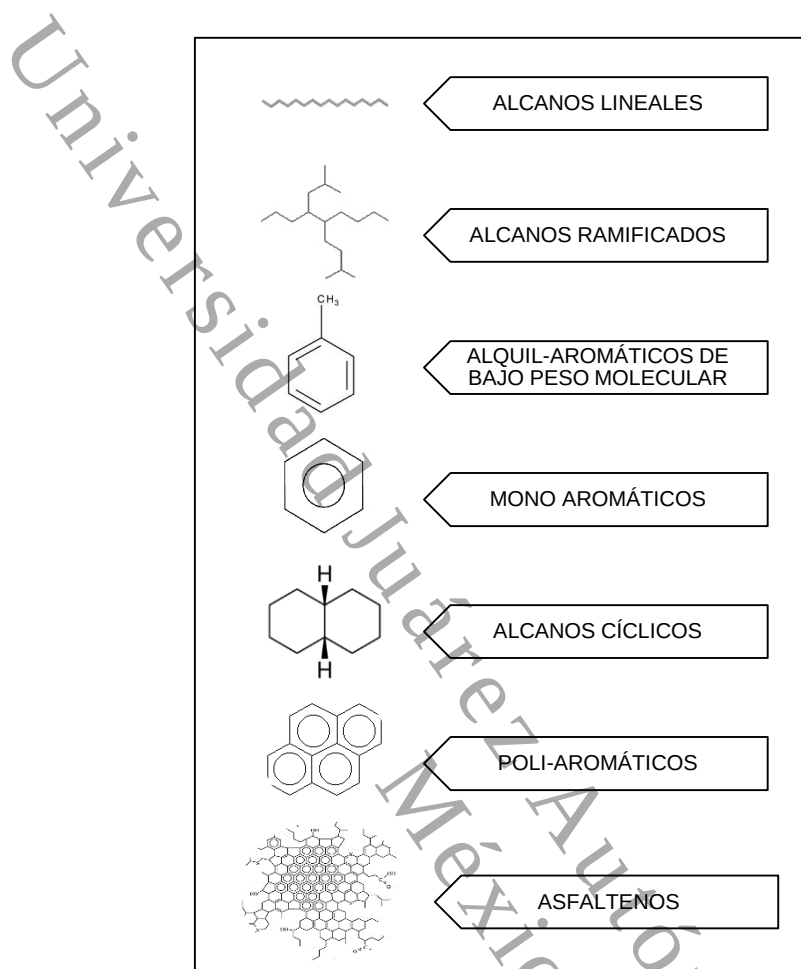


Figura 1. Lista de los hidrocarburos, del más al menos biodegradable (Birch et al. 2017; Varjani, 2017; Varjani y Upasani, 2017).

Debido a que el petróleo crudo presenta concentraciones bajas de nitrógeno fosforo y hierro, estos elementos llegan a ser limitantes para la biodegradación.

Los microorganismos a menudo los obtienen de especies químicas inorgánicas (NH_4^+ , NO_3^- , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , Fe^{2+} , Fe^{III} , etc.) (Widdel y Musat, 2010). Una misma muestra de petróleo podría presentar diferentes grados de biotransformación aplicando un mismo consorcio bacteriano y la razón podría ser la biodisponibilidad de un compuesto en particular existente en la muestra o en el medio y no su estructura química (Varjani, 2017).

2.4. Microorganismos degradadores de hidrocarburos

Los hidrocarburos representan sustratos ricos en energía para los microorganismos aerobios. La capacidad de diversos microorganismos para metabolizar compuestos hidrocarbonados implica su supervivencia a condiciones no favorables para otros organismos. Este potencial metabólico los hace protagonistas en la biorremediación de ecosistemas contaminados. Los suelos son sistemas complejos y heterogéneos, un gramo podría contener hasta 10 millones de células bacterianas, además de un gran número de otros microorganismos como hongos y protozoos (Van Elsas y Rutgers, 2006; Ivshina *et al.* 2017).

Debido a esto, anteriormente Atlas y Bartha (1992) consideran que “las bacterias juegan un papel importante en la degradación de HTP en el suelo”. Estos microorganismos intervienen en el ciclo global del carbono y disminuyen la acumulación de contaminantes hidrocarbonados en la atmósfera.

De forma natural, los microorganismos se organizan como consorcios multicomponentes que tienden a ser estables lo que les permiten transformar los compuestos complejos en metabolitos primarios y secundarios (Ivshina *et al.* 2017). De esta manera, los microorganismos que son incapaces de oxidar hidrocarburos utilizan los productos intermediarios de la oxidación para su desarrollo.

Como forma de adaptación, los microorganismos sometidos a concentraciones elevadas de hidrocarburos tienen la característica de transmitir la capacidad metabólica de hidrocarburos a partir del intercambio lateral de genes específicos de biodegradación conducidos a través del mobiloma (elementos genéticos móviles como los plásmidos, transposones, integrónes) (Prince *et al.* 2010; Shukla *et al.* 2014). Ivshina en 2017 señaló, que además de genes también se intercambian bioemulsificantes de bacterias productoras, en cuyo caso, tras dicha transferencia, la degradación de hidrocarburos recalcitrantes es posible debido a la actividad transformada del organismo aceptor. Lo anterior confiere una mayor eficiencia en la capacidad de asimilar hidrocarburos de una cepa con metabolismo adaptable. Otra capacidad de adaptación de bacterias es la mencionada síntesis de biosurfactantes, que pueden ser glicolípidos, lipopéptidos u otras biomoléculas, con alta actividad superficial e interfacial (Ivshina, 2017).

2.5. Estrategias de biorremediación

La biorremediación es una técnica basada en la capacidad metabólica de diversos microorganismos y la aplicación de plantas con el fin de mitigar, degradar o reducir contaminantes orgánicos peligrosos a compuestos inocuos como dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), agua (H_2O) y biomasa (Varjani, 2017). Esta se considera ambientalmente segura y económica (Das *et al.* 2014). La biorremediación de un suelo depende de diversos factores como: presencia de una población microbiana con potencial degradador, estructura, concentración y biodisponibilidad del contaminante; así mismo, disponibilidad de oxígeno, nutrientes, tipo de suelo, contenido de materia orgánica y minerales presentes en el mismo, entre otros (Peebles, 2014).

Las estrategias de biorremediación pueden ser *in situ*, cuando implica el tratamiento del material contaminado en el sitio, y *ex situ*, lo que implica el transporte del material contaminado para ser tratado en otro lugar. La biorremediación puede ocurrir por diferentes vías: a) a través del proceso natural de biodegradación (atenuación natural o biorremediación intrínseca), b) inoculando microorganismos exógenos (bioaumentación) en el suelo con el fin de incrementar la biocenosis microbiana (comunidad biótica) con capacidad degradadora, c) a través del suministro de nutrientes al suelo (bioestimulación) que proporcionan donantes de electrones o aceptores para activar la capacidad oxidativa de los microorganismos nativos (Ingle *et al.* 2014; Shukla, *et al.* 2014; Wu *et al.* 2017).

Las plantas también pueden ser aplicadas para remediar matrices contaminadas, a través de varios procesos como adsorción, transporte y translocación, hiperacumulación o transformación y mineralización (Pandey *et al.* 2015). La fitorremediación consiste en atenuar las concentraciones de los contaminantes aprovechando la capacidad remediadora de las plantas.

Una de las técnicas de biorremediación más común involucra el compostaje, el cual es un proceso donde residuos orgánicos son degradados por microorganismos, típicamente a temperaturas elevadas, en sistemas bajo control experimental (Das y Dash, 2014).

2.6. Indicadores de biorremediación

Las técnicas de biorremediación aceleran y optimizan las condiciones para la biodegradación natural de componentes del petróleo (Margesin *et al.* 2000) su evaluación requiere medir más que solo el contenido de hidrocarburos remanente en el suelo. La biocenosis con capacidad de oxidar hidrocarburos a menudo se dispara poco después de la contaminación de un ecosistema.

La microbiota es muy sensible a cualquier cambio en el ambiente, parámetros vinculados a la actividad biológica del suelo se consideran indicadores eficientes para evaluar el impacto y degradación de contaminante; así como, determinar la factibilidad del tratamiento de biorremediación (Guerrero *et al.* 2012; Torris *et al.* 2018). La respiración del suelo, la actividad enzimática y la biomasa son ejemplos de indicadores que permiten calificar o descartar la eficiencia de diversas técnicas de biorremediación (Riveroll, 2014; González, 2014).

Respiración del suelo

Fisiológicamente, la respiración se define como una serie de procesos metabólicos que rompen o catabolizan moléculas orgánicas para liberar energía, agua y CO_2 en una célula. En el suelo es estudiado principalmente en relación con el intercambio de CO_2 y O_2 . La respiración es utilizada principalmente para describir la tasa de producción de CO_2 de microorganismos, animales, partes de plantas como raíces y rizomas en el suelo (Luo y Zhou, 2010).

Durante la descomposición de compuestos orgánicos contaminantes una parte del carbono es devuelto a la atmósfera en forma de CO_2 , mientras que otra se transforma en otros compuestos más sencillos o son almacenados en estructuras microbianas (Guerrero *et al.* 2012). Aproximadamente el 10% de la respiración del suelo se deriva de la descomposición de compuestos de carbono más antiguos y más recalcitrantes (Ryan y Law, 2005). Al Kharusi *et al.* (2016) considera a la respiración microbiana un método accesible y eficiente para predecir la degradación de los hidrocarburos.

Actividad enzimática

Peebles (2014) considera que los microorganismos, para degradar compuestos de manera eficiente, utilizan enzimas específicas que sirven como catalizadores. Estas

aceleran las tasas de reacción disminuyendo la energía libre de activación. A menudo contienen grupos estructurales cargados que pueden cambiar las densidades electrónicas de los compuestos que reaccionan, lo que facilita la ruptura y la creación de nuevas uniones.

Una enzima puede estar presente de manera intracelular en una célula viable, liberarse en el ambiente del suelo después de la muerte celular y la lisis o bien ser adsorbida por los coloides del suelo o encapsuladas por moléculas húmicas incrementando su estabilidad y duración (Nannipieri *et al.*, 1996). La actividad enzimática del suelo es importante porque refleja el estado en el que se encuentran sus poblaciones microbianas y su relación con la biología del suelo, la producción de biomasa, la degradación de contaminantes y la conservación de ecosistemas (Montejo *et al.*, 2009). Las enzimas intracelulares y extracelulares pueden degradar los compuestos orgánicos (Shukla *et al.*, 2014), por tal razón, en biotecnología son usadas como medida de la eficiencia de los tratamientos biológicos al remediar suelos impactados por diferentes contaminantes, incluyendo hidrocarburos (Margesin *et al.*, 2000; Montejo *et al.*, 2009).

Biomasa microbiana

El ciclo de la mayoría de los elementos está determinado parcial o completamente por la cantidad y actividad de organismos que asimilan compuestos minerales o descomponen la materia orgánica presentes en los ecosistemas. Por lo tanto, la biomasa microbiana del suelo es un indicador importante del estado de la vitalidad del suelo, por lo tanto, se recomienda para la valoración de los efectos de compuestos orgánicos de diverso origen, incluyendo los derivados de petróleo, sobre la microflora del suelo. La biomasa, actualmente se determina a través del método como el de respiración inducida por el sustrato a corto plazo o por el de fumigación-extracción (Margesin *et al.* 2000).

2.7. *Eichhornia crassipes*

Lirio acuático o jacinto en algunos lugares, es uno de los nombres comunes de *Eichhornia crassipes*, una planta acuática de libre flotación que pertenece a la familia *Pontederiaceae*. Encabeza el listado de 665 plantas invasoras en México, llegando a cubrir hasta el 64% de la superficie en zonas infestadas (Martínez, 2014).

Esta especie exótica nativa de las amazonas fue introducida al país por el comercio de plantas ornamentales para acuarios o acompañando a peces también exóticos e importados a nuestro país (Bonilla y Santamaria, 2013).

Una especie invasora es una especie exótica que ha sido introducida accidental o intencionalmente fuera de su distribución natural, cuyo impacto implican problemas sanitarios, afectaciones a la economía, y a la biodiversidad (Aguirre *et al.*, 2009). En México la diversidad de ecosistemas acuáticos presenta características diferentes entre ellos, debido a que la topografía del país no es uniforme, generando diversos escenarios para la propagación del lirio. *Eichhornia crassipes* interviene en la captura, estabilización y formación de sedimentos debido a su sistema radicular, ya que tiene la capacidad de modificar la forma y tamaño de sus estructuras vegetativas de acuerdo a las condiciones ambientales en las que se encuentra (plasticidad morfológica) (Moreira e Infante, 2017). Su alto potencial de translocación permite distribuir los nutrientes minerales desde la raíz al tallo y hojas y finalmente cuando sus estructuras vegetativas decaen pasan a formar sedimentos ricos en nutrientes (Bonilla, 2009; Carrión *et al.* 2012). Sin embargo, debido a sus altas tasas de reproducción y alta permanencia reviste la superficie de cuerpos dulceacuícolas con tapetes de gran espesor, los cuales se ven involucrados en la perturbación de los mismos, obstruyendo la navegación, la pesca, actividades agrícolas y de recreación (Bonilla, 2009).

3. Antecedentes

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

El compostaje es uno de los métodos más aplicados en el manejo de residuos orgánicos, aunque es un método sencillo requiere de múltiples estudios los cuales permitan su repetibilidad y eficiencia. Además, las condiciones varían con respecto al material a compostear. Por ejemplo, Umsakul *et al.* (2010) compostearon lirio acuático durante 11 semanas y realizaron el análisis de los cambios físicos y químicos obteniendo una temperatura máxima de 40°C desde que inició y el incremento de la relación C/N de 17.61 hasta 18.12 al finalizar el proceso. Sus resultados demostraron que la aplicación del jacinto de agua facilita el desarrollo de una fase termófila y que además mejora el producto aplicando *Bacillus sp. cepa B4*. Otros parámetros importantes durante el compostaje son la evolución del CO₂, las tasas de absorción de O₂ y los nutrientes. Estas últimas variables fueron consideradas relevantes por Prasad *et al.* (2013) al realizar compostaje de lirio acuático mediante pilas agitadas. Los resultados obtenidos demostraron que Na⁺, K⁺, Ca⁺², Mg⁺², P y N total aumentaron significativamente y que la tasa de producción de CO₂ y absorción de oxígeno, DBO y DQO disminuyeron durante el proceso del tratamiento, consistente en la adición de lirio, aserrín y estiércol (90:15:45 Kg). Además, recalcaron que adicionar demasiado o muy poco estiércol reduce la actividad metabólica de los microorganismos.

Es importante señalar que, los múltiples estudios del compostaje permiten determinar aplicaciones potenciales. Una de sus aplicaciones relevantes es en la agricultura, Osoro *et al.* (2014) y Mashavira *et al.* (2015) aplicaron composta de lirio acuático sobre maíz y tomate y determinaron que el jacinto se puede aplicarse como abono, con el fin de incrementar el rendimiento de la planta. En los resultados de Mashavira *et al.* (2015) las concentraciones de metales pesados aumentaron a 85%, 93% y 86% aunque inferiores a los niveles permitidos mostrando que la aplicación del lirio sobre el cultivo de tomate no expone a los consumidores a toxicidad por metales pesados.

Además, el lirio ha sido estudiado para descontaminar madera tratada con creosota (CTW) por Covino *et al.* (2016), utilizando además dos agentes de volumen: a) esquejes de hierba (GC) y b) hojarasca (BL). La concentración inicial de HAP en CTW (26,500 mg kg⁻¹) se redujo a 3 y 19% después de 240 días en compostaje con

GC y BL, respectivamente. La degradación de PAH excedió el umbral bioaccesible predicho, estimado a través de la extracción secuencial supercrítica de CO₂, junto con la detoxificación significativa, evaluada mediante pruebas de contacto usando *Vibrio fischeri* y *Hordeum vulgare*.

Además, ya que el lirio acuático es una especie que se reproduce con facilidad representa una solución sustentable a problemas que requieren de poca inversión. Por ejemplo, Ramírez *et al.* (2017) utilizó una mezcla de viruta de madera y lirio acuático (5, 10, 15 20 %) con el fin de tratar residuos orgánicos con alto contenido de humedad y bajo contenido de lignina y celulosa. Los tratamientos incluían una mezcla de los seis residuos generados en mayor cantidad en la central de abasto de Cd. de México (1200 g por celda). Los resultados determinaron que el material estructurante seco permitió regular el exceso de humedad aportado por los residuos, absorbiendo parte de los lixiviados y mejorando la porosidad de las pilas. De modo que, el aprovechamiento de una materia prima que existe en abundancia representa una oportunidad en múltiples campos y además de no ser un elemento difícil de adquirir, su costo no representa un obstáculo para resolver el problema.

4. Justificación

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Actualmente, la creciente necesidad de alimentos, servicios y combustibles demanda la continuidad de la explotación de hidrocarburos en el sureste de nuestro país. A pesar de los esfuerzos por impulsar el uso de biocombustibles y otras fuentes de energías alternas, la información disponible indica que la contaminación generada durante las actividades de extracción, transporte y procesamiento de hidrocarburos no solo prevalecerá, si no que muy probablemente irá en aumento (Ivshina *et al.* 2017), acelerando el deterioro y contaminación de los ecosistemas tropicales. En los estados de Veracruz y Tabasco, durante el periodo comprendido entre los años 2000 al 2014 (CNH, 2014) se concentró el 58% del volumen total de hidrocarburos derramados en tierra. La mayoría de los sitios contaminados permanece sin tratamiento o no reciben atención inmediata y en otros casos se ha demostrado que las técnicas de remediación aplicadas no son adecuadas, persistiendo la afectación al suelo aún después de su tratamiento.

Tabasco se encuentra cubierto en gran parte por las cuencas hidrológicas de mayor caudal en el país, cuenta con 62 corrientes y 20 lagos de gran importancia para la región. Al menos el 79.97% de la superficie estatal se caracteriza por tener clima cálido húmedo con abundantes lluvias en verano y el 19.64% presenta clima cálido húmedo con lluvias todo el año (INEGI, 2017). Estas condiciones favorecen la propagación de flora y fauna nativos de la región; así como, de especies exóticas que se han establecido y dispersado con gran facilidad. Ejemplo de ello, es el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*), planta considerada como una de las 100 especies exóticas invasoras más dañinas del mundo (Lowe *et al.*, 2000). Esta especie ya se ha probado como abono agrícola a través del compostaje, técnica ampliamente estudiada; sin embargo, su aplicación en la biorremediación aún requiere de experimentación, puesto que sus resultados dependen directamente de las propiedades fisicoquímicas de los materiales utilizados, su proporción y las condiciones del medio en el cual se utilice. Tales factores determinan condiciones óptimas para el crecimiento de diversas especies de hongos y bacterias capaces de degradar contaminantes orgánicos como los derivados del petróleo. La aplicación del lirio acuático como acondicionador orgánico, en el co-compostaje de suelos contaminado, representa el uso de un recurso accesible de aporte de nutrientes y

microorganismos que podrían mejorar la biodegradación de hidrocarburos, a través de la bioestimulación y bioaumentación del bioproceso. Además, de que contribuiría en la recuperación de los cuerpos de agua perturbados por la propagación inmoderada de esta planta acuática. De acuerdo a lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la eficiencia de la aplicación del lirio acuático durante el co-compostaje, bajo condiciones de bioestimulación y bioaumentación, de un suelo intemperizado altamente contaminado con hidrocarburos. La evaluación se basó en la determinación de diferentes indicadores relacionados a la actividad microbiana y biodegradación por microorganismos nativos y exógenos.

5. Objetivos e hipótesis

5.1. Objetivo general

Evaluar la aplicación de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) como acondicionador orgánico y promotor de la biodegradación de hidrocarburos en suelos intemperizados en procesos de biorremediación acelerada en sistemas de co-compostaje.

5.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del lirio acuático sobre la biodegradación de hidrocarburos totales del petróleo en un suelo intemperizado.
- Comparar el efecto de un inoculante experimental en la biodegradación de hidrocarburos en presencia de lirio acuático como acondicionador orgánico.
- Evaluar la actividad respiratoria (producción de CO₂ y consumo de O₂) durante el co-compostaje de suelo contaminado.
- Analizar parámetros cinéticos de biodegradación asociados a la actividad metabólica durante el bioproceso de co-compostaje.

5.3. Hipótesis

El lirio acuático favorece el estado oxidativo en el proceso de co-compostaje, derivado del incremento de la actividad biodegradadora (remoción de hidrocarburos), metabolismo respiratorio y de actividad enzimática vinculada, lo cual se reflejará en una mayor eficiencia del bioproceso.

6. Materiales y métodos

6.1. Estrategia experimental

La experimentación se realizó de la siguiente manera:

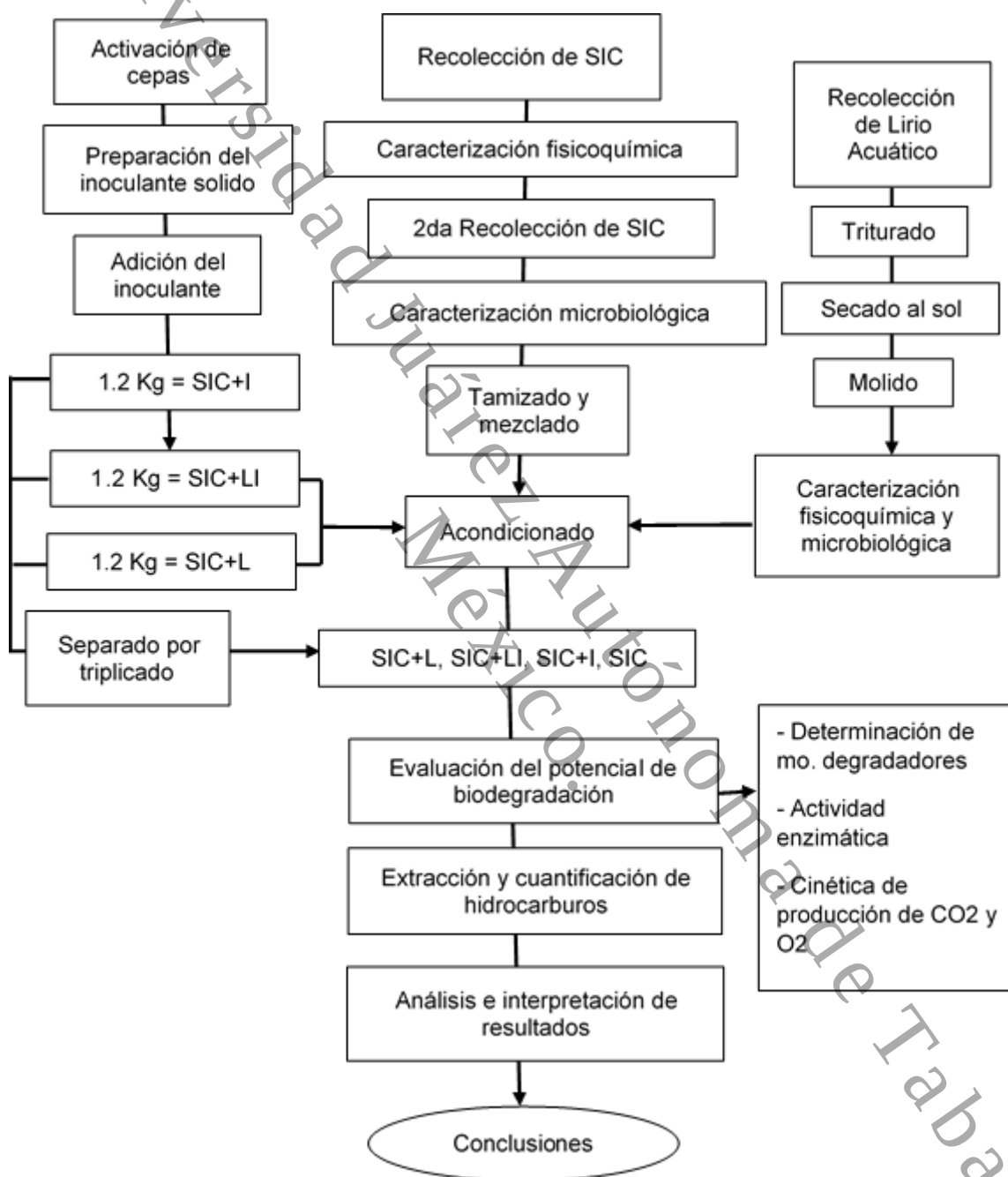


Figura 2. Estrategia experimental: SIC: Suelo Intemperizado Contaminado, SIC+L: Suelo intemperizado Contaminado más Lirio, SIC+LI: Suelo Intemperizado Contaminado más Lirio e Inoculo, SIC+I: Suelo Contaminado más Inoculo

6.2. Área de colecta de suelos y lirio acuático

El suelo se obtuvo de un sitio contaminado ubicado en Villa la Venta, Huimanguillo Tabasco, ubicado en las coordenadas 18°g'25.2"N y 94°3'11.6" O. La recolección de las muestras consistió en un muestreo dirigido, basado en las observaciones del derrame (patrón de dispersión de hidrocarburos, manchas características, etc.). Se seleccionaron los puntos de muestreo en los cuales se recolectaron muestras a una profundidad de 0 a 30 cm. El suelo fue transportado (a temperatura ambiente) al invernadero de la División de Ciencias Biológicas de la UJAT, posteriormente se tamizó (malla 4) para su homogenización y mezclado.



Figura 3. Localización del área de estudio en Villa La Venta, Huimanguillo, Tabasco. Suelo Intemperizado Contaminado con hidrocarburos (SIC), Zona arqueológica (ZA), Complejo Procesador de Gas (CPG).

Para la recolección del lirio acuático, se ubicó un cuadrante en un canal de aguas pluviales en la ranchería Benito Juárez, Jalpa de Méndez Tabasco, donde existía acumulamiento de la especie con el menor impacto de actividades humanas, de acuerdo a lo realizado por Moreira e Infante (2017). Fue retirado manualmente y posteriormente el lirio se trituyó con equipo mecánico (cosechadora-picadora). El material se trasladó a la División Académica de Ciencias Biológicas y se secó al sol, hasta que alcanzó una humedad aproximada del 30%. Posteriormente, se molió para obtener un granulado fino (<2 mm). Se mantuvo húmedo el material hasta que fue utilizado en el co-composteo con suelo contaminado.

6.3. Inóculo

El inóculo bacteriano se integró por las siguientes cepas bacterianas: a) *Bacillus cereus* (Bc1A), b) *Bacillus subtilis* (Bs7A), *Bacillus subtilis* (Bs9A), c) *Gordonia rubripertincta* (Gr3A) y UAM10AP (no identificada), aisladas previamente de la rizosfera de *Cyperus laxus*, una planta que crece naturalmente en suelos contaminados con petróleo, y caracterizadas por Díaz-Ramírez et al. (2000).

6.4. Diseño experimental

Se realizó un experimento factorial 2x2 con unidades experimentales compuestas por diferentes mezclas de 1.2 Kg (peso seco) constituidas con: un suelo intemperizado contaminado con HTP (58,592 ppm) – lirio acuático. El experimento consistió de cuatro tratamientos con tres réplicas cada uno, estudiados durante 50 días del proceso de co-compostaje, las unidades experimentales se dividieron como sigue: a) Suelo Intemperizado Contaminado más Lirio (SIC+L), b) Suelo Intemperizado Contaminado más Lirio e Inóculo (SIC+LI), c) Suelo Intemperizado Contaminado más inóculo (SIC+I) y d) Suelo Intemperizado Contaminado (SIC) como control. La proporción de lirio utilizada en todas las mezclas fue equivalente al 10% y se añadió el agua necesaria para mantener la humedad al 50%. El experimento se llevó a cabo dentro del invernadero (26-38°C) de la DACBiol -UJAT, en charolas con capacidad de 10 L que fueron cubiertas con bolsas de plástico. Las unidades experimentales se airearon manualmente cada tres días y se recolectaron muestras para su análisis cada cinco días.

6.5. Preparación del inoculante sólido

La preparación se realizó mediante el método aplicado por Zentella en el 2018, el cual consistió en la activación de cada una de las cepas bacterianas previamente mantenidas en refrigeración. Seguidamente, se verificó su pureza mediante cultivo en placas Petri con medio sólido (agar de soya y tripticaseína, 48h, 30°C). Posteriormente, se inocularon matraces de 500 ml con 50 ml de caldo nutritivo y se incubaron durante 72 horas en agitación (200 rpm). Se determinó la densidad óptica de las suspensiones celulares, en un espectrofotómetro a 600nm (ThermoScientific, Evolution 220). Una vez alcanzada la densidad óptica adecuada (~0.6A). Se integró el volumen total del cultivo mixto definido (CMD), el cual se adicionó a una mezcla

de agrolita y alginato de sodio previamente estéril para posteriormente solidificar en una solución de cloruro de calcio (0.2 M).

6.6. Métodos analíticos

6.6.1. Parámetros fisicoquímicos del suelo

Potencial de hidrógeno (pH)

La medición del pH de los tratamientos se realizó mediante el método aplicado por Santos (2017). Se pesó 10 g de muestra y se colocó en vasos de precipitados de 50 ml. Se adicionaron 20 ml de agua destilada a cada uno, se agitaron y dejaron reposar durante 24 hrs para después realizar la extracción del líquido mediante filtrado a vacío (bomba de vacío modelo EVANS 5HP) utilizando papel filtro (Wattman No. 42). Finalmente se midió utilizando un potenciómetro (ThermoElectron, modelo Versa B40) previamente calibrado.

Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica (dS/m) se midió en el líquido extraído en la medición del pH (Carter y Gregorich, 2008). Se utilizó el medidor multiparamétrico (ThermoElectron, modelo Versa B40) equipado con electrodo de conductividad (Orion DuraProbe conductivity cell. Modelo 013005MD) previamente calibrado (KCl 1.412 dS/m).

Determinación de Carbono Orgánico Total (COT)

Se calculó usando el método aplicado por Moreira e Infante (2017), el cuál consistió en llevar 1 g de muestra en un crisol a peso constante (PC) a 550°C en una mufla durante dos horas, posteriormente se pesaron los crisoles fríos con la ceniza (PCC). A partir de los datos obtenidos se calculó %Ceniza, necesaria para obtener el porcentaje de materia orgánica (%MO) y finalmente el porcentaje de Carbono Orgánico (%CO).

A continuación las ecuaciones para los cálculos de los parámetros anteriores:

$$\text{Ecuación 1} \quad \%Ceniza = \frac{PCC-PC}{muestra} * 100$$

$$\text{Ecuación 2} \quad \%MO = (100)(\%Ceniza)$$

$$\text{Ecuación 3} \quad CO\% = \% \frac{MO}{1.724}$$

Determinación de nitrógeno total

Se determinó conforme al método AS-25, descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Brevemente, consistió en la digestión de 0.5 g ó 0.1 g de muestra de suelo o lirio respectivamente, con mezcla de catalizadores y ácido sulfúrico concentrado, calentando a temperatura media hasta que el digestado obtuvo color verde claro, destilándose y colectándose el amonio liberado, éste se tituló finalmente con álcali.

Extracción de hidrocarburos totales de petróleo

Se realizó usando el método de extracción Soxhlet (EPA 3540). Fueron necesarios 10 g de la muestra (base seca). La extracción se realizó con una mezcla (160 ml) Acetona: Hexano (1:1), y se mantuvo a reflujo durante 8 horas en el extractor Soxhlet. Posteriormente se utilizó un rotavapor para la eliminación del solvente. Los hidrocarburos residuales (mg kg^{-1}) fueron cuantificados gravimétricamente.

Precipitación de asfaltenos

Se llevó a cabo filtrando a vacío 0.5 g de http (Whatman No. 42) previamente obtenidos mediante la extracción Soxhlet, el precipitado se obtuvo con ayuda de hexano frío el cual fue colectado en un matraz Kitazato. Se realizaron de 3 a 5 lavados cada uno con 10 mL de hexano frío y el filtrado se transfirió a una charola de aluminio (100 mL), finalmente se evaporó el solvente en campana de extracción (Díaz-Ramírez, 2000; Pérez, 2012).

Fraccionamiento de los hidrocarburos sin asfaltenos

Se realizó el fraccionamiento basado en la separación por cromatografía en columna utilizando sílica gel como fases estacionarias y solventes orgánicos como agentes de elución descritos por Díaz-Ramírez, 2000 y Pérez, 2012. Se adicionaron 0.2 g de hidrocarburos (sin asfaltenos) disueltos en n-hexano a una columna previamente empacada con sílica gel (malla 60-200, Baker) y preacondicionada con n-hexano. Posteriormente, se hicieron eluciones (10 ml) en el siguiente orden: 1) n-hexano 2) tolueno-hexano, 3) tolueno, 4) tolueno-metanol y 5) acetona-metanol. Cada fracción se recolectó en viales de vidrio a peso constante, para posteriormente realizar la determinación gravimétricamente.

6.6.2. Análisis microbiológicos

Conteo de microorganismos heterótrofos del suelo

Se realizó la cuantificación de microorganismos heterótrofos totales por el método de diluciones seriadas y conteo en placa (Lorch et al., 1995). Se usó Agar Soya Trypticaseína (AST, DIBICO) para bacterias y Agar Papa Dextrosa para hongos (PDA, DIBICO). Las placas se incubaron a una temperatura de 32°C, para después realizar los conteos de las unidades formadoras de colonias (UFC g⁻¹) a las 24 y 48 horas.

Cuantificación de microorganismos degradadores

Para la cuantificación de microorganismos degradadores de hidrocarburos (hexadecano, HXD) se utilizó el método de Número más Probable (NMP g⁻¹ suelo seco) descrito por Wrenn y Venosa, 1996, modificado como sigue: Se usaron las mismas diluciones que las preparadas para el método anterior y se transfirieron alícuotas (20 µl) de cada una (hasta 10⁻⁹) a microplacas, para su incubación en medio mineral con hexadecano como fuente de carbono. Las microplacas se incubarán durante 1 semana a 35°C. Finalmente, se adicionó iodonitrotetrazolio (INT, 3 g/l) a cada pocillo y se dejó incubar 24 horas más. Se registraron los resultados positivos y se realizó el cálculo del NMP de los microorganismos degradadores, utilizando el software MPN-calculator (EPA V 4.04).

Análisis respirométrico

Se cuantificó el consumo de O₂ y la producción de CO₂ para cada uno de los tratamientos, utilizando un sistema semi-automatizado de respirometría (Sistema SS4, Sable System International Co.). Se usaron frascos de vidrio con tapas de rosca (500 ml) como unidades experimentales conteniendo 30 g de muestra (base seca). Las botellas se cerraron herméticamente y se determinó el O₂ consumido y el CO₂ producido durante 24 horas, realizando lecturas cada 8 horas. Los datos de la tasa de respiración fueron calculados usando el software Expedata (SableSys Versión 1.6.2) y se expresaron como: mg O₂ kg⁻¹h⁻¹ y mg C-CO₂ kg⁻¹ h⁻¹. Las condiciones de operación del sistema y la calibración de los sensores se hicieron siguiendo el protocolo estandarizado previamente (Riveroll-Larios et al. 2015).

Determinación de la biomasa microbiana por el método de fumigación-extracción

Se determinó la biomasa microbiana del suelo por el método propuesto por Vance et al., (1987) y modificado por Joergensen y Brookes (2005). Se utilizaron 25 g de cada muestra (base seca) previamente homogenizados y tamizados ($\varnothing$ 2.38 mm). Se analizaron dos grupos de muestras: fumigadas y no fumigadas (control). Se usó cloroformo (15 ml) libre de etanol (CHCl_3) para la fumigación (24 h) en atmósfera libre de CO_2 . Posteriormente, las muestras de suelo-lirio fueron transferidas a matraces (250 mL) con el fin de extraer la biomasa microbiana con K_2SO_4 0.5 M. La determinación se realizó sometiendo un volumen (5 ml de cada muestra) a reflujo en presencia de dicromato de potasio. Finalmente, se registró la concentración de C de la biomasa volumétricamente usando sulfato-ferroso como agente titulante. Se calculó el contenido de C de la biomasa de acuerdo con la ecuación propuesta por Vance et al. 1987.

Determinación de enzima lipasa

La actividad de la enzima lipasa se determinó utilizando el método propuesto por Margesin (2005). Brevemente, se empleó p-nitrofenol butirato (pNPB) como sustrato y 0.1 g de cada muestra de suelo más lirio acuático (por triplicado). La determinación se realizó incubando por 10 minutos y posteriormente separando por centrifugación (3500 rpm durante 7 minutos). Se determinó la actividad enzimática espectrofotométricamente ($\lambda=400$ nm). Al mismo tiempo se preparó una curva de calibración utilizando p-nitrofenol (0, 25, 50, 75, 100 y 125 μg /pNP/5 ml de solución amortiguadora). Los resultados se expresaron en μg pNP g^{-1} suelo seco min^{-1} (unidades enzima).

6.7. Análisis estadísticos

Para el análisis de los resultados de las variables de la caracterización fisicoquímica del suelo contaminado intemperizado (relación C/N, pH, C.E.) y del contenido de los hidrocarburos residuales (biodegradación) y composición de los hidrocarburos residuales por fracciones, se realizó un ANOVA simple para la comparación de las medias para los diferentes tratamientos y cada una de las fracciones de los hidrocarburos. Para los análisis microbiológicos (UFC g^{-1}), biomasa microbiana,

actividad respiratoria y enzimática lipasa se compararon las medias entre los tratamientos con respecto al tiempo, se realizó un ANOVA simple.

Para llevar a cabo el análisis estadístico de los hidrocarburos residuales (biodegradación), biomasa microbiana, lipasa, actividad respiratoria (CO_2 producido y consumo de O_2) se realizó un ANOVA multifactorial. Los factores evaluados fueron: a) lirio, b) inoculante y c) interacción lirio-inoculante.

7. Resultados y discusión

7.1. Suelo intemperizado altamente contaminado con hidrocarburos: caracterización fisicoquímica

La determinación de nitrógeno (N) y carbono orgánico total (COT) se llevó a cabo en el laboratorio de Bioprocesos en la División Académica de Ciencias Biológicas de la UJAT. Otras propiedades físicas y los componentes del suelo fueron determinadas por un laboratorio certificado (Fertilab S.A. de C.V.) y sus resultados fueron comparados con la NOM-021-RECNAT-2000. En la Tabla 1 se muestran los valores de la composición elemental del suelo intemperizado altamente contaminado con hidrocarburos. El suelo se clasificó como de textura franco, moderadamente ácido y con elevados niveles de salinidad (35.5 dS/m), punto de saturación (82%) y capacidad de campo (44.1%).

El contenido de materia orgánica (MO) en el suelo fue de 30.3%, lo que probablemente se debió a la abundante vegetación en el sitio donde se recolectó el suelo. Además, el contenido de nitrógeno total (0.76%) resultó alto; mientras que la concentración de COT fue de 22.9%. Con estos valores se estimó una C/N de 30 en el suelo contaminado intemperizado.

En cuanto a los nutrientes, el suelo presentó un contenido elevado de iones como magnesio, moderadamente alto de fósforo disponible y un elevado nivel de sodicidad (Tabla 1). En cuanto a la disponibilidad de micronutrientes, el contenido de cobre, zinc y boro fue de moderadamente bajo a alto. Estos resultados probablemente reflejan el grado de intemperización del suelo y la recurrente contaminación a la que ha estado sujeto por muchos años, lo que probablemente ha llevado a la concentración de algunos iones abundantes en el petróleo.

Se determinó el contenido de diversos cationes en el suelo contaminado intemperizado. En general la capacidad de intercambio catiónico resultó muy alta (Tabla 2). En particular el contenido de calcio y magnesio, como cationes intercambiables en el suelo, resultó moderadamente bajo y moderadamente alto, respectivamente. Así mismo, el sodio presentó una alta capacidad de intercambio, lo cual puede explicar el alto grado de salinidad (sodicidad) del suelo. Cabe mencionar que el área de donde se recolectó el suelo está sujeta a inundación y entrada de agua salobre a través del arroyo La Venta que comunica con el Río Tonalá y la costa cercana. La alta capacidad de intercambio catiónico, del suelo estudiado, probablemente se deben a un elevado carácter coloidal, gran área superficial y

carga negativa, debido a las cuales puede actuar como un almacén de nutrientes para los microorganismos (Muñoz-Iniestra *et al.* 2000) y a la vez una elevada salinidad.

El contenido de estos elementos (Tabla 2) es importante ya que mejoran la estructura del suelo, aumentan la estabilidad de los agregados y neutralizan la acidez. En contraparte el elevado contenido de sodio intercambiable (Tabla 2), puede propiciar que el suelo no sea capaz de sostener el desarrollo de plantas en virtud de la elevada presión osmótica que causa la presencia de este ion.

Tabla 1. Diagnóstico de la fertilidad del suelo contaminado usado en el co-compostaje.

Elemento	Composición elemental ¹ (mg Kg ⁻¹)												
	P	K ⁺	Ca ⁺²	Mg ⁺	Na ⁺⁺	Fe ⁺³	Zn ⁺²	Mn ⁺²	Cu ⁺²	B ⁺	Al ⁺³	S ⁻	N-NO ₃
	40	222	5,692	1,197	2,600	129	137	11.8	0.53	11.6	6.86	3,237	0.14
Clasificación	Modte. ² alto	Medio	Alto	Alto	Muy alto	Muy alto	Muy alto	Medio	Modte. bajo ²	Muy alto	Muy bajo	Muy alto	Muy bajo

¹Resultados obtenidos por Fertilab S.A. de C.V. e interpretados de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000.

² Modte.= moderadamente

Tabla 2. Cationes intercambiables en el suelo intemperizado Contaminado con hidrocarburos (SIC)

	Cati3n						CIC
	Ca ⁺²	Mg ⁺	K ⁺	Na ⁺⁺	Al ⁺³ *	H ⁺ *	
meq/100g	28.4	9.85	0.57	11.3	0.08	0	50.2
Saturaci3n (%)	56.6	19.6	1.14	22.5	0.16	0	---
Capacidad de intercambio**	Modte. bajo	Modte. alto	Bajo	Muy alto	Muy bajo	----	Muy alto

Resultados obtenidos por Fertilab y comparados con la NOM-021-RECNAT-2000.

*Es deseable que estos elementos tengan un bajo contenido

7.2. Co-compostaje de suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos en adición de lirio y un inoculante experimental

En los procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, no es suficiente monitorear la concentración de contaminantes con el tiempo (Gandolfi *et al.* 2010). Con el fin de lograr los objetivos planteados y evaluar las mejoras durante el proceso de co-compostaje de suelo intemperizado altamente contaminado con hidrocarburos, adicionando lirio y un inoculante experimental, se analizó el pH, la conductividad eléctrica, el contenido de hidrocarburos residuales y su composición, la biomasa microbiana, la actividad de la enzima lipasa y la respiración del suelo.

7.2.1. Relación carbono-nitrógeno (C/N) durante el proceso de compostaje

En los suelos, durante su biodegradación de hidrocarburos, la composición de éstos puede afectar la relación C/N (Meng *et al.* 2018). En el experimento de co-compostaje, se añadió solo el 10% de lirio como parte de la mezcla con el suelo al inicio de los tratamientos. Relaciones C/N menores a 30 se han señalado como favorables para el co-compostaje. En el caso del experimento, debido a que el COT del suelo resultó muy alto, para ajustar valores de C/N cercanos a 25 se requerirían cantidades muy altas de lirio (peso seco).

Tabla 3. Relación carbono/nitrógeno (C/N) durante el proceso de co-compostaje adicionando lirio acuático y un inoculante experimental.

Tiempo (d)	Relación C/N			
	SIC	SIC+L	SIC+LI	SIC+I
0	29.79±0.46a	27.93±0.25b	27.93±0.25b	29.79±0.46a
30	30.28±0.14a	29.07±0.72b	34.78±1.35c	33.84±2.74c
50	29.62±0.81a	28.84±0.62b	27.72±2.02b	26.86±0.09b

En la tabla se presentan los valores promedio de las muestras analizadas por triplicado. Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias estadísticamente significativas (LSD, $P < 0.05$) entre cada una de las muestras analizadas en los diferentes tiempos de análisis.

El lirio acuático usado en los experimentos, registró un contenido de nitrógeno de $1.65 \pm 0.09\%$, este contenido permitió que su aporte en las mezclas propiciara la disminución de la C/N respecto al suelo control (Tabla 3), representando $1.98 \times 10^{-3} \text{ g N g}^{-1}$ de suelo al inicio del experimento. Por ello, los suelos que incluyeron lirio en su tratamiento resultaron tener un C/N menor que SIC y SIC+I (LSD, $P < 0.05$). Sin embargo, al transcurrir 30 días del co-compostaje, se incrementó la relación C/N únicamente en los tratamientos con adición

de inoculante (SIC+LI y SIC+I) (LSD, $P < 0.05$). Este incremento indicó una limitación en el nitrógeno, al mismo tiempo en que la biomasa microbiana disminuyó. Por lo cual se añadió fertilizante (T17; 12.4 g Kg⁻¹ de suelo) a los suelos tratados con lirio, lirio-inoculante e inoculante, dosificándose a los 35 y 40 días del co-compostaje.

Al final del proceso, solo los suelos SIC+LI y SIC+I presentaron diferencias significativas después de la adición del fertilizante (LSD, $P < 0.05$), sin embargo solo, los tratamientos SIC+L y SIC+LI fueron similares al control.

7.2.2. pH y conductividad eléctrica (CE)

Los resultados presentados en la Figura 4 representan el comportamiento del pH a lo largo del proceso de co-compostaje. La adición del lirio en los tratamientos SIC+L y SIC+LI propició diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos y entre sí a través del tiempo de co-compostaje, (LSD, $P < 0.05$).

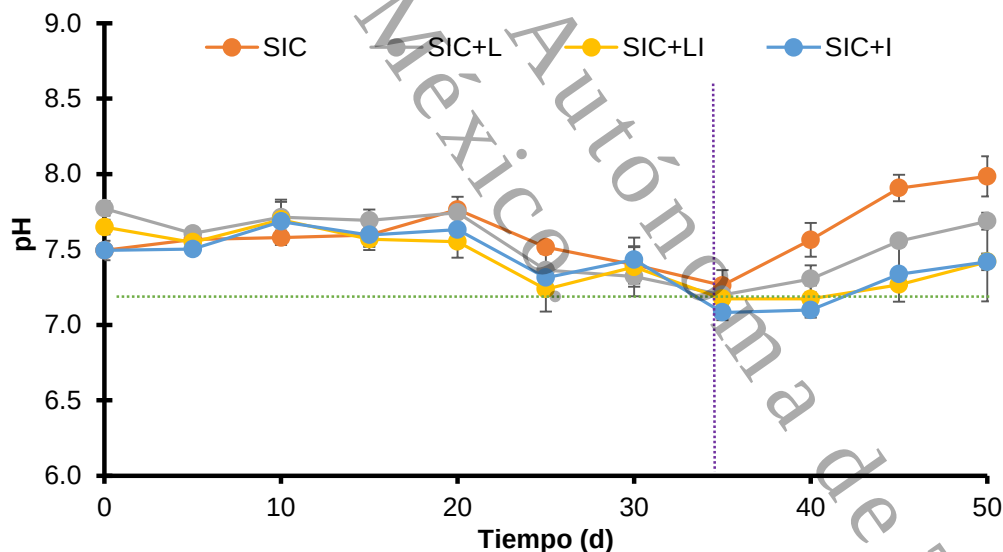


Figura 3. Promedio de los valores de pH durante el proceso de co-compostaje. La línea verde establece el límite máximo para suelos neutros (NOM-021-RECNAT-2000) y la línea vertical color morado señala el día en que se adicionó el fertilizante inorgánico (triple 17).

Aunque los tratamientos se mantuvieron sin variaciones significativas hasta el día 25 donde alcanzaron valores de 7.2 a 7.5 unidades de pH (~pH 6.6 - 7.3 rango de neutralidad). Entre el día 25 al 35 no se observaron variaciones relevantes entre estos. Posteriormente, el pH se incrementó significativamente en las unidades de los tratamientos control (SIC) y en

presencia de lirio (SIC+L) hasta el día 50. Esto probablemente está relacionado con la adición del fertilizante (Triple17, 2.1 g N kg⁻¹ de suelo).

Respecto a la conductividad registrada (Fig. 5), al inicio del proceso ésta presentó, valores que corresponden a suelos muy fuertemente salinos (>16 dS m⁻¹, NOM-021-RECNAT-2000). Los mayores valores de CE se presentaron en el suelo intemperizado (SIC) durante todo el bioproceso. En general, los valores de CE disminuyeron durante los primeros 25 días para todos los tratamientos, en particular es en el periodo comprendido entre los 15 y 25 días que se observó una reducción en la CE que concuerda con un periodo de alta actividad biológica (mayor consumo de O₂, alta actividad enzimática, mayor formación de biomasa) en presencia de lirio y/o inoculante (SIC+L, SIC+LI, SIC+I). Posteriormente, se adicionó fertilizante (35 días), causando un incremento en la CE (>20 dS m⁻¹). De acuerdo a los resultados, no se aprecian diferencias significativas entre los tratamientos; sin embargo, el comportamiento indica que la adición de lirio y la combinación lirio-inoculante redujeron el nivel de CE en los primeros 25 días del co-compostaje.

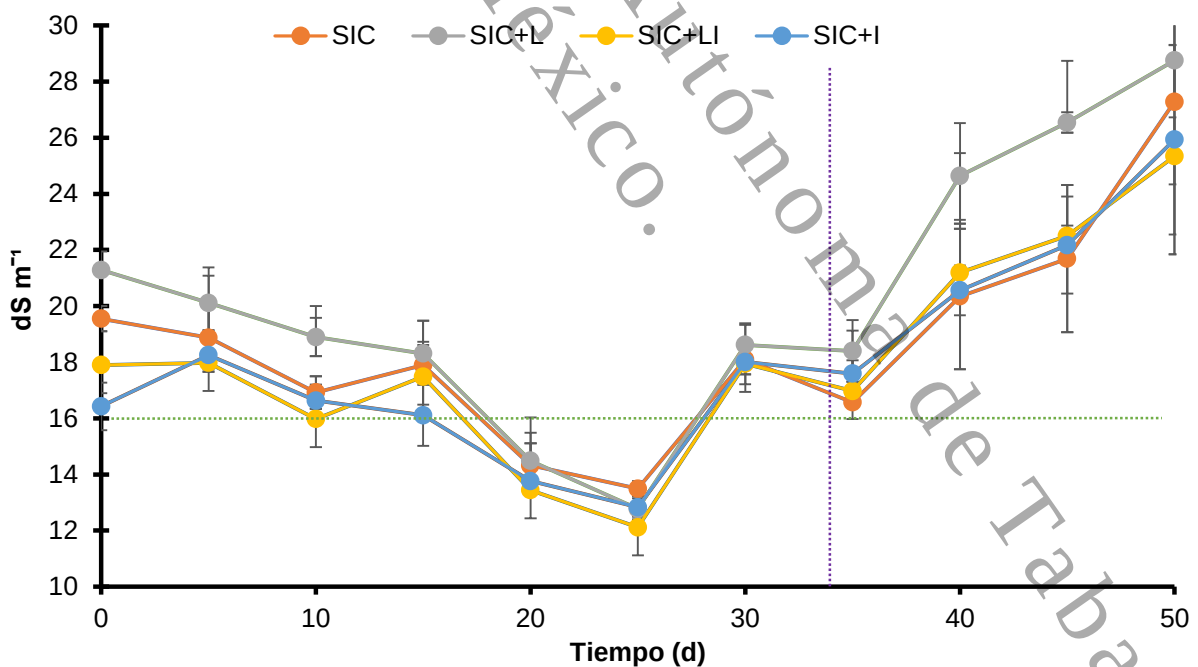


Figura 4. Promedio de los valores de Conductividad Eléctrica (CE) durante el proceso de co-compostaje. La línea verde horizontal señala el límite inferior de los suelos muy fuertemente salinos (NOM-021-SEMARNAT-2001) y la línea vertical color morado el día que se añadió T17

De acuerdo a los resultados, el inoculante añadido (SIC+LI y SIC+I) resultó resistente a la sales presentes en las mezclas suelo:lirio. Además, la adición de N, P, K mediante la incorporación de fertilizante (Triple17) elevó la CE, pero presumiblemente permitió el mantenimiento de la actividad microbiana (como se presentará más adelante).

7.3. Biorremediación de suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos

La cuantificación de hidrocarburos residuales en el suelo durante los procesos de biorremediación, permite evaluar la eficiencia de los tratamientos en la biodegradación de los hidrocarburos. En la Figura 5 se presentan las concentraciones de hidrocarburos residuales con respecto al tiempo, durante el co-compostaje con *Eichhornia crassipes*.

Estos resultados permitieron determinar que el 10% de lirio presente en las mezclas (SIC+L y SIC+LI) tuvo el efecto de disminuir la concentración de HTP presentes en el suelo alrededor de un 7.3%. En los primeros 20 días del experimento, se registró la mayor parte de la biodegradación resultando en concentraciones residuales entre $79,674.7 \pm 4,422 \text{ mg Kg}^{-1}$ a $90,092.6 \pm 1,060 \text{ mg kg}^{-1}$ de suelo. Los tratamientos que se encontraron en el extremo inferior de este rango presentaron diferencias significativas con los tratamiento SIC y SIC+I, pero no se diferenciaron entre sí (LSD, $P < 0.05$). Posteriormente, la degradación en los diferentes tratamientos fue limitada. Sin embargo; la concentración alcanzada al final del proceso presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a las iniciales en todos los tratamientos (LSD, $P < 0.05$). Al final del bioproceso, los tratamientos con lirio alcanzaron las concentraciones más bajas de los cuatro tratamientos analizados (Fig. 5).

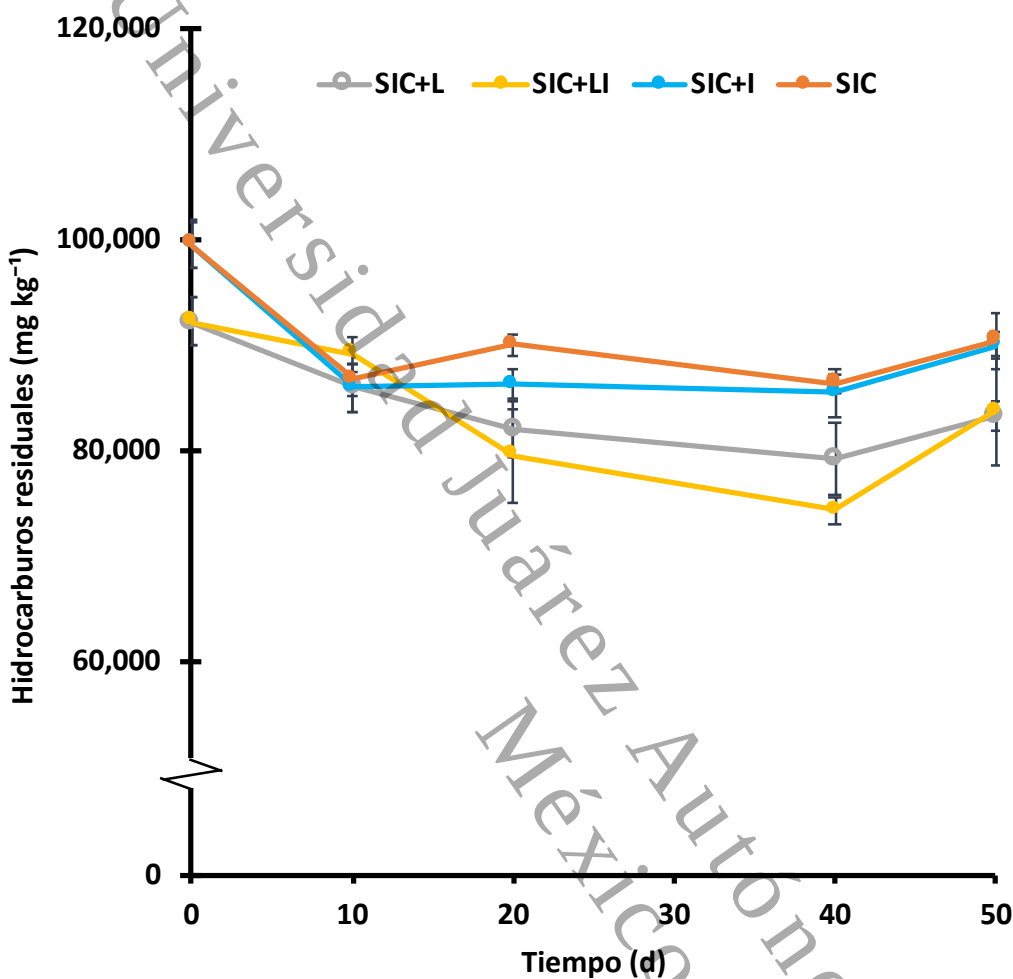


Figura 5. Promedio de las concentraciones de Hidrocarburos residuales durante el proceso de co-compostaje en los tratamientos Suelo Intemperizado Contaminado más Lirio (SIC+L), Suelo Intemperizado Contaminado más Lirio e Inoculante (SIC+LI), Suelo Intemperizado Contaminado más Inoculante (SIC+I).

En la Tabla 4 se presenta la comparación de la biodegradación alcanzada durante el co-compostaje del suelo intemperizado con lirio acuático y bajo condiciones de bioestimulación y bioaumentación. Los tratamientos SIC+L y SIC+LI los cuales duplicaron el nivel de biodegradación registrado en el tratamiento control (SIC), sobresalen significativamente. El inoculante en presencia de lirio (SIC+LI) superó el valor obtenido cuando se aplicó solo (SIC+I).

Tabla 4. Porcentaje de Biodegradación y Tasas de Consumo Global de los diferentes tratamientos

	SIC	SIC+L	SIC+LI	SIC+I
%B	7.41 ±1.93	12.83 ±5.84	15.80 ±5.25	9.53 ±2.76
TCG (mg Kg ⁻¹ d ⁻¹)	143.74 ±36.05	250.57 ±128.75	248.81 ±53.53	190.13 ±59.13

Wu *et al.* (2016), en un suelo contaminado con HTP (46,600 mgKg⁻¹) registraron un 34% de biodegradación inoculando con *Acinetobacter* SZ-1 (10⁸ UFC g⁻¹ de suelo) cepa KF453955. En el presente estudio, al comparar la biodegradación observada en el suelo control (SIC) y en el suelo con inoculante (SIC+I), éstos no presentaron diferencias significativas; sin embargo, de acuerdo a las variables determinadas adicionalmente, el inoculante influyó positivamente causando mejoras de las propiedades del suelo que se discutirán en los siguientes apartados.

7.3.1. Composición de los HTP residuales en el suelo

El estudio de la biodegradación de hidrocarburos intemperizados requiere considerar diversos factores que incluyen su limitada biodisponibilidad en el suelo y el aumento de la concentración de productos intermediarios o productos de biodegradación durante el tratamiento de biorremediación (Jiang *et al.* 2016). Por ello, con el propósito de determinar la composición de los hidrocarburos residuales se realizó el fraccionamiento de éstos por cromatografía en columna al inicio y final del co-compostaje.

En la Figura 7 se presentan el contenido inicial y final de las fracciones: a) alifática, b) aromática, c) polar y d) asfaltenos, para cada uno de los tratamientos probados en el co-compostaje de suelo intemperizado.

La concentración inicial de la fracción alifática fue de 15,000 a 22,133 mg Kg⁻¹. Al inicio del experimento, los tratamientos adicionados con lirio (SIC+L y SIC+LI) presentaron un contenido inicial de alifáticos 47% mayor que en los tratamiento SIC y SIC+I. Este elevado contenido puede ser atribuido a grasas aportadas por el lirio. En este sentido, es importante mencionar que el contenido de grasas extraíbles en el lirio con hexano-acetona fue de 8,537±623 mg Kg⁻¹ de lirio.

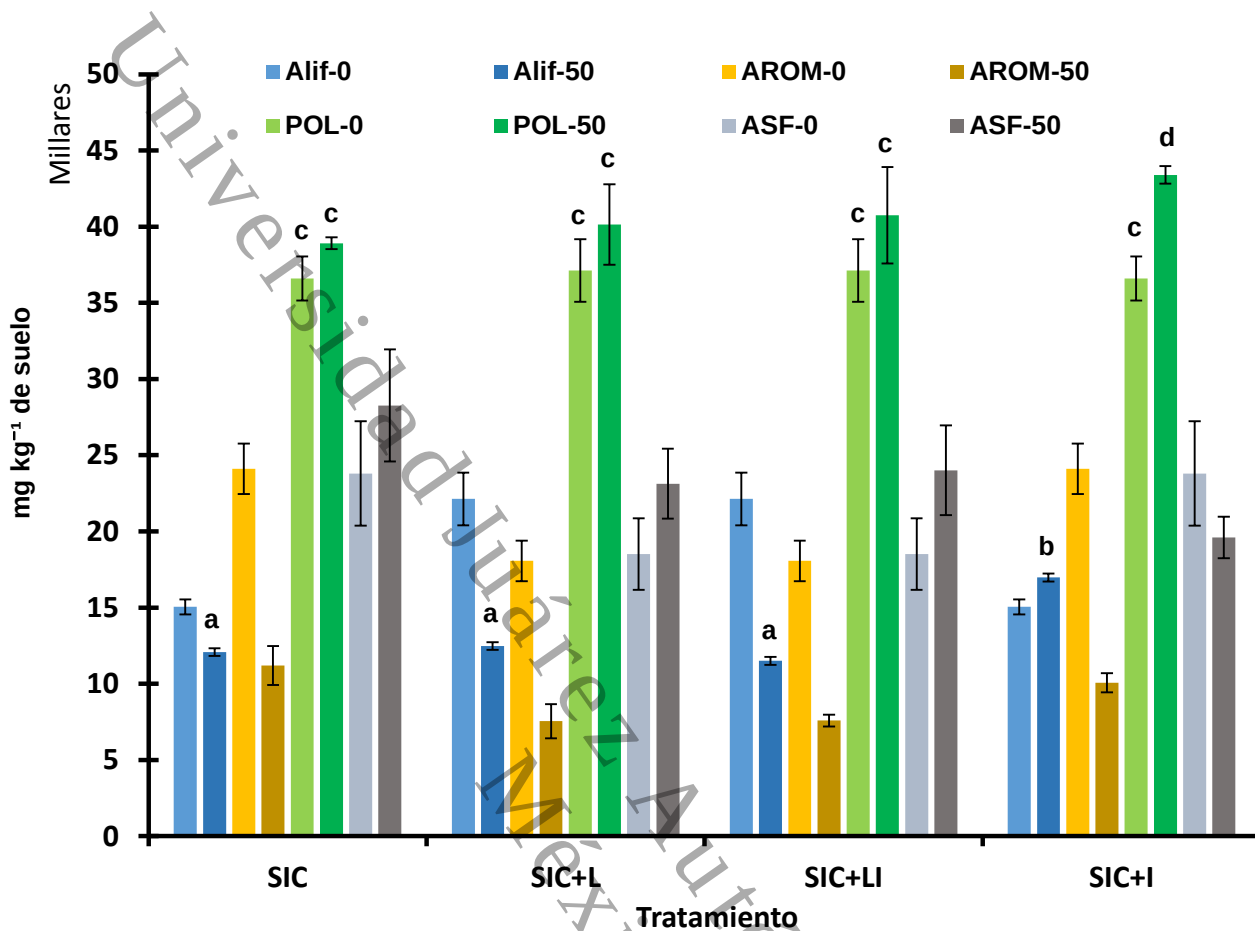


Figura 6. Promedio del contenido inicial(0 días) y final (50 días) de hidrocarburos totales de petróleo residuales por fracciones: a) Alifática (Alif), b) Aromáticas (Arom), c) Polares (Pol) y d) Asfaltenos (Asf); para los diferentes tratamientos: 1) suelo intemperizado contaminado (SIC), 2) suelo intemperizado contaminado + lirio, 3) suelo intemperizado contaminado + lirio + inóculo (SIC+LI), 4) suelo intemperizado contaminado + inóculo (SIC+I). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias estadísticamente significativas (LSD, $P < 0.05$) entre cada una de las muestras analizadas en los diferentes tiempos de análisis.

Después de 50 días de co-compostaje, la concentración de hidrocarburos alifáticos, en el SIC (suelo control), SIC+L y SIC+LI decreció un 20%, 44% y 48% respectivamente, respecto al valor inicial. Al finalizar el experimento no se presentaron diferencias significativas entre estos tratamientos. En cambio, el suelo con la adición del inoculante (SIC+I) se registró un incremento en el contenido de la fracción alifática del 13% (Fig. 7).

En cuanto a la fracción aromática, la concentración inicial fue de $24,104 \text{ mg Kg}^{-1}$ de suelo, en los tratamientos SIC+L y SIC+LI, esta concentración inicial se redujo a $18,777.8 \text{ mg Kg}^{-1}$ de suelo, esto probablemente se debió a un efecto de dilución, causado por la adición de lirio (10%) al suelo. Posteriormente, el proceso de co-compostaje redujo unos 58% en los

tratamientos con lirio, lirio-inoculante e inoculante respecto a la concentración inicial, equivalentes a 12,900, 10,515, 10,470 y 14,044 mg de hidrocarburos aromáticos Kg⁻¹ de suelo respectivamente. Este valor de remoción fue superior al alcanzado por Jiang *et al.* (2016), en un experimento de biodegradación, por bioaumentación con *Pseudomonas* sp. y *Klebsiella* sp. y bioestimulación con nitrato de amonio y orto fosfato de potasio, de suelo intemperizado contaminado con HTP, identificando las fracciones aromáticas predominantes (HPA, C12-C16 y C16-C21). Los autores concluyeron que a mayor concentración de nutrientes se optimizó la degradación de hidrocarburos poli-aromáticos (>90%).

De acuerdo al análisis de la composición de los hidrocarburos residuales, el contenido de la fracción polar se incrementó en todos los tratamientos adicionados con lirio (Fig. 7); sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los valores iniciales y finales de los tratamientos SIC+L y SIC+LI (LSD, P=0.009), mientras que ésta fue significativa en el tratamiento SIC+I.

En cuanto a la fracción de asfaltenos, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre tratamientos con respecto al tiempo (ANOVA, P>0.05); sin embargo, el comportamiento observado es de una elevación en su concentración final en los tratamientos SIC+L y SIC+LI, lo cual corresponde con lo observado para la fracción polar (Fig. 7). El incremento en estas fracciones puede ser atribuido a la elevada actividad microbiana registrada en estos tratamientos, como se explicará más adelante. Acumulación de la fracción polar y asfáltica se ha observado previamente por algunos autores durante la biodegradación de hidrocarburos en suelos intemperizados como consecuencia de la oxidación de las fracciones alifáticas y aromáticas (Oudot *et al.* 1987, Oudot *et al.* 1998).

7.4. Análisis microbiológico

Todos los ecosistemas dependen de una amplia diversidad de microorganismos que realizan numerosas funciones de producción, descomposición y transformación. Con el fin de conocer el funcionamiento y la evolución de los ecosistemas se estima la biomasa, diversidad metabólica y capacidad para adaptarse al medio ambiente (Bertrand *et al.* 2015; Normand *et al.* 2015).

7.4.1. Microorganismos heterotróficos totales

En la Tabla 5 se muestran el número de las poblaciones bacterianas y fúngicas determinadas durante el co-compostaje. Inicialmente, en el SIC+L, SIC+LI y SIC+I el número de bacterias fue 8.8, 10.4 y 4.3 veces mayor, respecto al SIC. Transcurridos 30 días, la población bacteriana en el SIC+LI y SIC+I presentó un descenso del 14.89% y 33.3%, respectivamente. Mientras que SIC+L incrementó el número de bacterias un 10%. Al finalizar el proceso los resultados mostraron que las bacterias presentes al inicio del proceso disminuyeron un 20%, 29.7% y 69% en los tratamientos SIC+L, SIC+LI y SIC+I respectivamente; sin embargo, las poblaciones bacterianas mantuvieron su nivel en el mismo orden de magnitud respecto a su valor inicial.

En el caso de las poblaciones fúngicas, al inicio (Tabla 4) el número de hongos fue dos órdenes de magnitud menores que el número de bacterias. En los tratamientos con SIC+L, SIC+LI y SIC+I se presentaron los niveles más elevados manteniéndose durante el co-compostaje sin diferencias significativas (LSD, $P < 0.05$) a excepción del SIC donde se obtuvieron los menores valores (< 1000 UFC g^{-1} de suelo). Los bajos valores en el número de microorganismos capaces de crecer en agar papa dextrosa, probablemente se deba al incremento del pH, en particular después de la adición de fertilizante (35 días), donde en el suelo control el pH fue de 8. Alrumman et al. (2014) cuantificaron bacterias en un rango de 2.19×10^6 a 3.62×10^6 UFC g^{-1} de suelo, y hongos de 1.91×10^3 a 7.99×10^3 UFC g^{-1} de suelo, en suelos contaminados con diésel intemperizado después de 10 semanas ($25^{\circ}C$). En un estudio similar, Jiang et al. (2016) cuantificaron microorganismos cultivables encontrando 1×10^6 en condiciones de estimulación y 1×10^9 UFC g^{-1} en tratamientos bioaumentados en suelo intemperizado contaminado con HTP.

De acuerdo a los resultados, en el suelo intemperizado en estudio, a pesar de contener una elevada concentración de HTP y alta conductividad eléctrica durante el co-compostaje en los diferentes tratamientos se presentó una cantidad elevada de microorganismos comparada a las características microbiológicas de los suelos tratados en los ejemplos explicados anteriormente

Tabla 5. Poblaciones bacterianas y fúngicas heterótrofas y degradadores de hexadecano presentes en el suelo durante el proceso de co-compostaje.

Trat.	Día 5			Día 30			Día 50		
	Bacterias ($\times 10^5$)	Hongos ($\times 10^3$)	NMP ($\times 10^7$)	Bacterias ($\times 10^5$)	Hongos ($\times 10^3$)	NMP ($\times 10^7$)	Bacterias ($\times 10^5$)	Hongos ($\times 10^4$)	NMP ($\times 10^7$)
SIC	0.91 $\pm$ 0.05	14.57 $\pm$ 1.29	20.00	3.11 $\pm$ 0.34	46.42 $\pm$ 4.68	45.37	2.07 $\pm$ 0.37	<0.05	2,192.75
SIC+L	8.02 $\pm$ 0.41	87.58 $\pm$ 5.36	2,769.02	8.82 $\pm$ 1.08	62.37 $\pm$ 4.22	4,519.69	6.43 $\pm$ 1.55	20.06 $\pm$ 0.65	4,771.61
SIC+LI	9.43 $\pm$ 1.45	81.33 $\pm$ 10.76	4,353.02	7.97 $\pm$ 0.68	72.05 $\pm$ 5.36	5,393.00	6.62 $\pm$ 0.52	18.47 $\pm$ 0.024	<0.10
SIC+I	3.89 $\pm$ 0.35	81.13 $\pm$ 15.48	379.31	2.55 $\pm$ 0.11	21.02 $\pm$ 3.01	4,680.26	1.19 $\pm$ 0.14	1.09 $\pm$ 0.19	<0.010

En la tabla se presentan los valores promedio de las unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC g⁻¹) de las muestras analizadas por triplicado, y de número más probable (NMP g⁻¹), determinado mediante el Software: Most Probable Number Calculator versión 4.04 con un 5% de incertidumbre.

7.7.1. Microorganismos degradadores

Con la finalidad de determinar la fracción de microorganismos degradadores, se determinó el NMP de microorganismos degradadores de hidrocarburos (hexadecano) durante el co-compostaje. Al inicio del experimento el NMP de microorganismos degradadores en el SC fue de 20.00×10^7 NMP/g de suelo seco. Mientras que en presencia de lirio (SIC+L) el número de degradadores fue 139 veces mayor y 218 veces mayor cuando se adicionó el inoculante en presencia de lirio (SIC+LI) respecto al control.

Después de 30 días de co-compostaje, los tratamientos SIC+L y SIC+LI registraron un incremento del 63.17% y 23.90% respectivamente. Mientras que en el tratamiento SIC+I se incrementó 12.31 veces el número de microorganismos degradadores, respecto al valor inicial, registrado al inicio del proceso (379.31×10^7 NMP/g de suelo seco). El NMP de microorganismos degradadores se redujo tres órdenes de magnitud entre el día 30 y 50 del co-compostaje en el SIC+LI y SIC+I.

El incremento significativo en el número de los microorganismos degradadores en el tratamiento SIC+I (no adicionado con lirio) entre los 5 y 30 días del co-compostaje indica el potencial de adaptación del cultivo mixto definido estandarizado compuesto por cepas bacterianas degradadoras (Díaz-Ramírez et al. 2008). Este inoculante desarrollado para su aplicación en forma de gránulos, se adicionó a los 6 días de iniciado el co-compostaje, de acuerdo al protocolo propuesto por Zentella (2018). Wu et al. (2017) observaron los efectos de la bioestimulación (BS) y bioaumentación (BA) en un suelo intemperizado contaminado con HTP (20,000 mg/Kg). El tratamiento BS registró 5.01×10^6 y 3.16×10^6 NMP g⁻¹ después de la primera y cuarta semana de incubación. Mientras que con la BA se obtuvieron 6.3×10^6 y 7.5×10^6 MPN g⁻¹ en los mismos tiempos de incubación. Comparando los resultados de presente trabajo, con los datos registrados en el estudio anterior (58% de biodegradación de HTP) en suelos bajo condiciones de bioaumentación, la combinación de lirio acuático e inoculante (SC+LI) incrementaron exponencialmente la población degradadora en el suelo estudiado. Ortiz-Maya (2013), estudió la dinámica de poblaciones bacterianas durante ensayos de biorremediación de hidrocarburos en condiciones de intemperización, dicho estudio se basó en el análisis de perfiles genómicos obtenidos por electroforesis en gel con gradientes de desnaturalizantes, obtenidos inoculando el suelo con el mismo CMD,

encontrando que la adición del inoculante incrementó la riqueza de especies (nativas) en los tratamientos inoculados, en comparación con los no-inoculados; es decir, uno de los beneficios de la adición del inoculante es el favorecimiento del desarrollo de poblaciones nativas con actividad biodegradadora, lo que podría explicar el mejor desempeño tanto en el SC+LI y SC+I.

7.5. Biomasa microbiana

La biomasa microbiana del suelo representa la masa de los microorganismos del suelo y es responsable de llevar a cabo la descomposición de la materia orgánica disuelta y eliminar los contaminantes orgánicos del suelo. Por su rápida respuesta a las perturbaciones del suelo, es considerada como indicador del deterioro de la calidad del suelo (Franco et al., 2004). En la Figura 8 se muestra el comportamiento de la biomasa microbiana durante el proceso de co-compostaje. Se observa que al inicio del experimento, los diferentes tratamientos registraron entre 1,463-2926 μg de biomasa g^{-1} de suelo, sobresaliendo los tratamientos con lirio y lirio-inoculante (SIC+L y SIC+LI) con el contenido más elevado de biomasa; los cuales no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí en al inicio de co-compostaje (LSD, $P = 0.037 < 0.05$).

El tratamiento control, alcanzó hasta el día 50 su máxima concentración 3,095.42 μg de Biomasa g^{-1} de suelo, similar a la obtenida por los tratamientos adicionados con lirio (SIC+L y SIC+LI) al inicio del proceso. Hernández-Pérez (2015) registró 1,250 μg de Biomasa g^{-1} de suelo, a los 60 días de tratamiento de un suelo contaminado con diésel (20,000 ppm); mientras que González-Díaz (2014), observó en un suelo intemperizado contaminado con HTP (26,000 ppm) alrededor de 1,800 μg de biomasa g^{-1} de suelo en 30 días de estudio. Alrumman et al. (2014) registró la biomasa microbiana en tres suelos de Arabia Saudita contaminados con diésel, después de incubarlos 10 semanas a 25°C, registrando entre 183.35 a 753.5 μg biomasa g^{-1} de suelo.

Transcurridos 30 días del proceso, la biomasa microbiana disminuyó (1,356.71– 1,987.05 μg de biomasa g^{-1} de suelo) en los diferentes tratamientos, de manera que no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.377, > 0.05$ ANOVA). Sin embargo, para los tratamientos SIC+L y SIC+LI se observó una disminución estadísticamente significativa (LSD, $P < 0.05$), respecto al valor inicial (Fig. 8, SIC+L y SIC+LI).

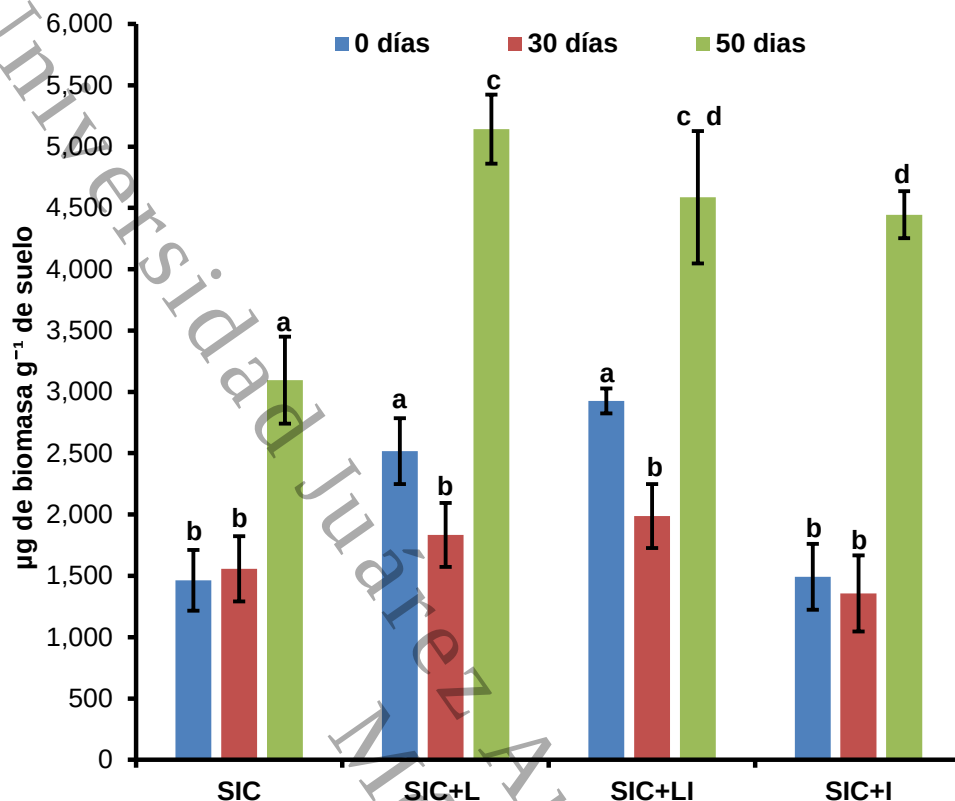


Figura 7. Promedios de las concentraciones de biomasa microbiana durante el co-compostaje de un suelo altamente contaminado con hidrocarburos intemperizados, para los diferentes tratamientos: 1) suelo intemperizado contaminado (SIC), 2) suelo intemperizado contaminado + lirio, 3) suelo intemperizado contaminado + lirio + inóculo (SIC+LI, 4) suelo intemperizado contaminado + inoculante (SIC+I). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias estadísticamente significativas (LSD, $P < 0.05$) entre muestras triplicadas de cada una de las muestras del mismo tratamiento con respecto al tiempo.

Debido a la disminución de la biomasa microbiana, registrada durante el co-compostaje, se adicionó fertilizante a los 35 días de iniciado el bioproceso ($12.37 \text{ g T17 Kg}^{-1}$ de suelo). Como consecuencia, al final del proceso los tratamientos SIC+L, SIC+LI y SIC+I incrementaron 2.8, 2.31 y 3.28 veces el contenido de biomasa registrado a los 30 días. Comparando estos resultados con los obtenidos por Alrumman et al. (2014), previamente descritos, los valores de la biomasa microbiana en presencia de lirio e inoculante pueden considerarse alta (6.6 a 25 veces).

7.6. Actividad de la enzima lipasa (LPS)

Durante la biodegradación de los hidrocarburos, en particular en la ruta de oxidación de los alifáticos y algunos compuestos aromáticos, se generan intermediarios con grupos

funcionales ésteres, incluyendo triacilglicéridos y alquil-ésteres de cadenas cortas y/o ramificados, estos pueden ser usados como sustrato por esterasas para liberar ácidos grasos, glicerol y derivados carboxilados que son subsecuentemente biodegradados (Margesin y Schinner, 2005; Meng et al 2018). Por lo tanto, la inducción de estas enzimas (lipasas) se incrementa en el curso de la biodegradación a medida que se forman estas fuentes de carbono. Es por ello que la actividad LPS es un indicador valioso en la biodegradación de hidrocarburos. En la Tabla 6 se presenta la actividad enzimática en el suelo durante el co-compostaje en los diferentes tratamientos de bioestimulación y bioaumentación.

Tabla 6. Valores promedio de la actividad de la enzima lipasa (μg de pNP g^{-1} de suelo seco $\times 10$ min) durante el proceso de co-compostaje. En la tabla se presentan los valores promedio de las muestras analizadas por triplicado a cada tiempo de muestreo.

Tiempo	Tratamientos			
	SIC	SIC+L	SIC+LI	SIC+I
5	990.62 $\pm$ 47.38	1,294.04 $\pm$ 105.92	1,046.04 $\pm$ 37.42	997.84 $\pm$ 20.10
10	820.50 $\pm$ 15.83	1,371.53 $\pm$ 73.26	1,120.31 $\pm$ 113.20	1,176.11 $\pm$ 26.14
20	649.20 $\pm$ 27.39	1,080.61 $\pm$ 66.74	1,107.47 $\pm$ 90.89	883.11 $\pm$ 87.36
30	891.63 $\pm$ 61.76	985.89 $\pm$ 65.75	1,188.56 $\pm$ 115.76	866.43 $\pm$ 45.52
40	856.81 $\pm$ 65.03	935.06 $\pm$ 75.14	1,102.66 $\pm$ 94.23	812.64 $\pm$ 27.32
50	689.71 $\pm$ 104.35	729.66 $\pm$ 43.22	874.01 $\pm$ 85.15	595.53 $\pm$ 54.41

Diferentes tratamientos: 1) suelo intemperizado contaminado (SIC), 2) suelo intemperizado contaminado + lirio, 3) suelo intemperizado contaminado + lirio + inóculo (SIC+LI), 4) suelo intemperizado contaminado + inoculante (SIC+I).

Durante el co-compostaje del suelo contaminado intemperizado en los tratamientos aplicados la actividad enzimática a los 5 días de iniciado el bioproceso fue entre 990 a 1,294 μg de pNP g^{-1} de suelo seco $\times 10$ min. La adición de lirio acuático (SIC+L) generó la actividad lipasa más alta al inicio del proceso, siendo estadísticamente significativa la diferencia (LSD $p=0.0009 < 0.05$) con respecto a los tratamientos SIC, SIC+LI y SIC+I (Tabla 6).

Con excepción del SIC, los demás tratamientos registraron su actividad más elevada al décimo día de tratamiento. Posteriormente, en los tratamientos SIC+L y SIC+I la actividad enzimática fue decreciendo a partir del día 20 al 40 y se mantuvo sin diferencias significativas (LSD, $P=0$). En contraste, la combinación lirio-inoculante (SIC+LI) permitió

mantener la actividad LPS desde el día 5 al 40 con variaciones despreciables (LSD, $P=0.0226 < 0.05$). Estos resultados indican que a pesar de que el lirio permitió incrementar la actividad enzimática, esta disminuyó con rapidez. Sin embargo, su efecto en presencia del inoculante permitió observar que la actividad se mantiene estable por un tiempo más prolongado, o tiende a disminuir muy lentamente, efecto que puede explicar el que el SIC+LI resultó el tratamiento con el porcentaje de biodegradación más alto (15%).

Por otra parte, la estabilidad observada en la actividad enzimática entre el día 30 al 40 pueda ser atribuido a la adición del fertilizante el día 35, ya que los tratamientos bioestimulados (SIC+L, SIC+LI y SIC+I) no registraron diferencias significativas en este periodo.

En el caso del tratamiento que incluyó la combinación lirio-inoculante, aunque a partir del día 30 la actividad enzimática ya era baja comparada al inicio del bioproceso, ésta fue más alta que en los demás tratamientos (LSD, $P < 0.05$), en tanto los tratamientos SIC, SIC+L y SIC +I no mostraron diferencias relevantes entre sí en el mismo periodo.

7.7. Evaluación de la actividad respiratoria del suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos durante el co-compostaje con lirio y un inoculante experimental

La respirometría del suelo es un parámetro sensible para determinar la actividad microbiana en los suelos y está relacionada con las transformaciones del carbono orgánico y las características de la calidad del suelo (Aloitabi et al., 2018, Aspray y Carvalho, 2008); como tal, es una técnica valiosa para las pruebas de tratamiento de biorremediación (Hollender et al. 2003, Plaza et al. 2005).

7.7.1. Cinética de producción de CO₂ durante el proceso de co-compostaje

En la Figura 9 se presentan los valores del CO₂ (expresado como los mg de C-CO₂ Kg⁻¹ de suelo) producido acumulado durante el co-compostaje con los diferentes tratamientos. Al inicio del experimento, se observó que la combinación lirio-inoculante (SC+LI) registró la concentración de C-CO₂ más elevada. En cambio, el suelo control registró concentraciones en un intervalo de 96.8 – 184.3 mg C-CO₂ Kg⁻¹ de suelo durante el proceso del co-compostaje. Seguido por SIC+L y SIC+I los cuales no presentaron diferencias significativas entre sí ($P < 0.05$).

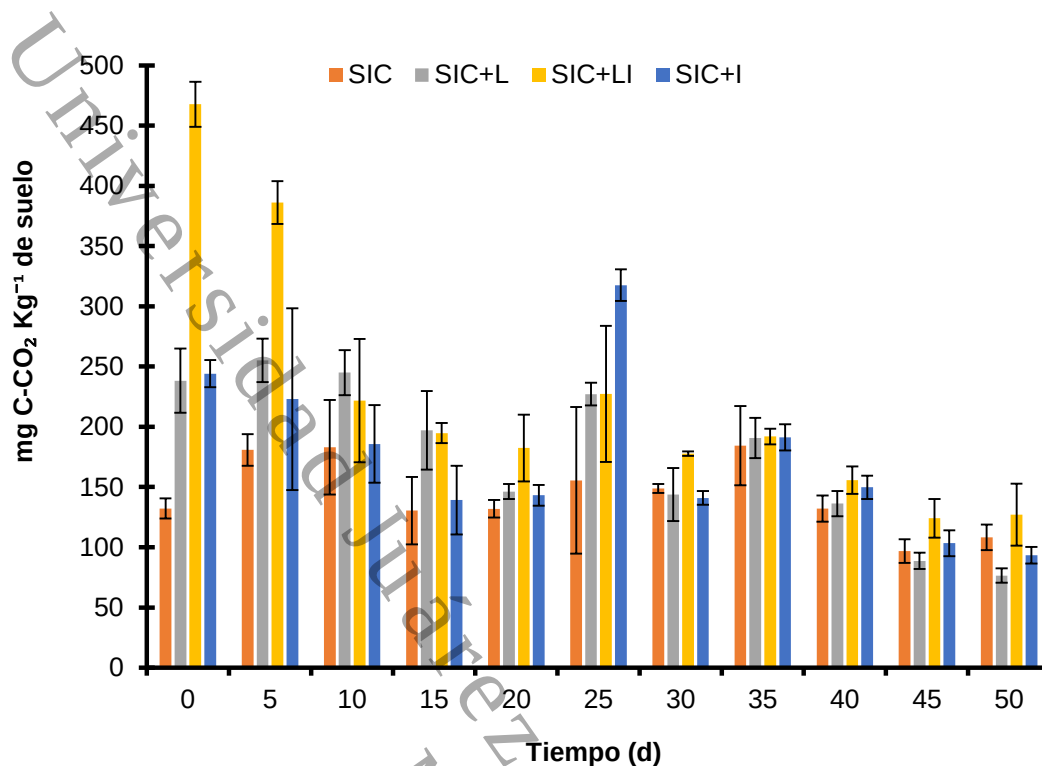


Figura 8. Dióxido de carbono ($\text{C-CO}_2 \text{ Kg}^{-1}$) producido durante el bioproceso de co-compostaje con los tratamientos: a) suelo intemperizado contaminado (SIC), b) suelo intemperizado contaminado + lirio (SIC+L), c) suelo Intemperizado contaminado + lirio + inoculante (SIC+LI) y d) suelo Intemperizado contaminado + inoculante (SIC+I). Los valores representan el promedio de triplicados de cada muestra en los diferentes tiempos de análisis.

En la Figura 8 se observa que en los tratamientos con SIC+L, SIC+LI y SIC+I el contenido de C-CO_2 decreció transcurridos 15 días del proceso, registrando entre 139.1-194.8 $\text{mg C-CO}_2 \text{ Kg}^{-1}$ de suelo. En el mismo periodo los valores de mineralización en el SIC+L y SIC+LI fueron superiores al SIC y SIC+I ($P < 0.05$). Posteriormente, a los 25 días de iniciado el co-compostaje la mineralización se incrementó significativamente en el SIC+L, SIC+LI y SIC+I ($P < 0.05$). Siendo la concentración de C-CO_2 más alta para el SIC+I, respecto a los otros tratamientos (SIC+L y SIC+LI) con lirio ($P < 0.05$).

Estos resultados son comparables con los reportados por González-Díaz (2014) donde registró la actividad respiratoria de un suelo intemperizado contaminado con diésel estimulado con bagazo de caña. Observando al inicio de su experimento una concentración de $\sim 266 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1}$ de suelo, la cual fue disminuyendo. Transcurridos 56 días de experimentación, la concentración detectada fue de $< 50 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1}$. El perfil respiratorio reportado en el trabajo mencionado fue similar al registrado en la presente evaluación; sin embargo, la adición de lirio y el inoculante experimental durante el co-compostaje de suelo

intemperizado contaminado con hidrocarburos aparentemente favoreció la mineralización de una mayor concentración de C-CO₂.

La segunda bioestimulación a los 35 días de iniciado el co-compostaje propició un incremento del 32.7%, 8.0% y 35.7% respecto al día 30 en los tratamientos compuestos por SIC+L, SIC+LI y SIC+I, respectivamente (Fig. 8), llevando a que los tres tratamientos alcanzaran niveles sin diferencias significativas entre sí ($P>0.05$). Al finalizar el co-compostaje el C-CO₂ registrado en los diferentes tratamientos se encontró en un intervalo de 93.49-127.05 mg C-CO₂ Kg⁻¹.

7.7.2. Cinética del consumo de O₂ durante el proceso de co-compostaje

El consumo de oxígeno (Fig. 9) al inicio del co-compostaje fue significativamente mayor en presencia del inoculante (SIC+LI) respecto al SIC+L y SIC+I ($P<0.05$). En el caso del SIC (control) no se presentaron variaciones durante los primeros 30 días del co-compostaje.

Posteriormente, todos los tratamientos registraron una disminución en el consumo de oxígeno (<720.3 mg O₂ Kg⁻¹ de suelo) hasta el día 15 sin diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$). Seguidamente, los tratamientos registraron un incremento significativo entre los 20 y 25 días, alcanzándose un máximo de 1,480.7 mg O₂ Kg⁻¹ de suelo con el SIC+I.

Con el fin de estimular la actividad microbiana se añadió fertilizante el día 35 del co-compostaje. En consecuencia hacia el final del proceso el fertilizante adicionado estimuló el consumo de O₂ (respecto al día 30) en los tratamientos SIC+L, SIC+LI y SIC+I, favoreciendo un 44.7%, 5.0% y 66.16%, respectivamente.

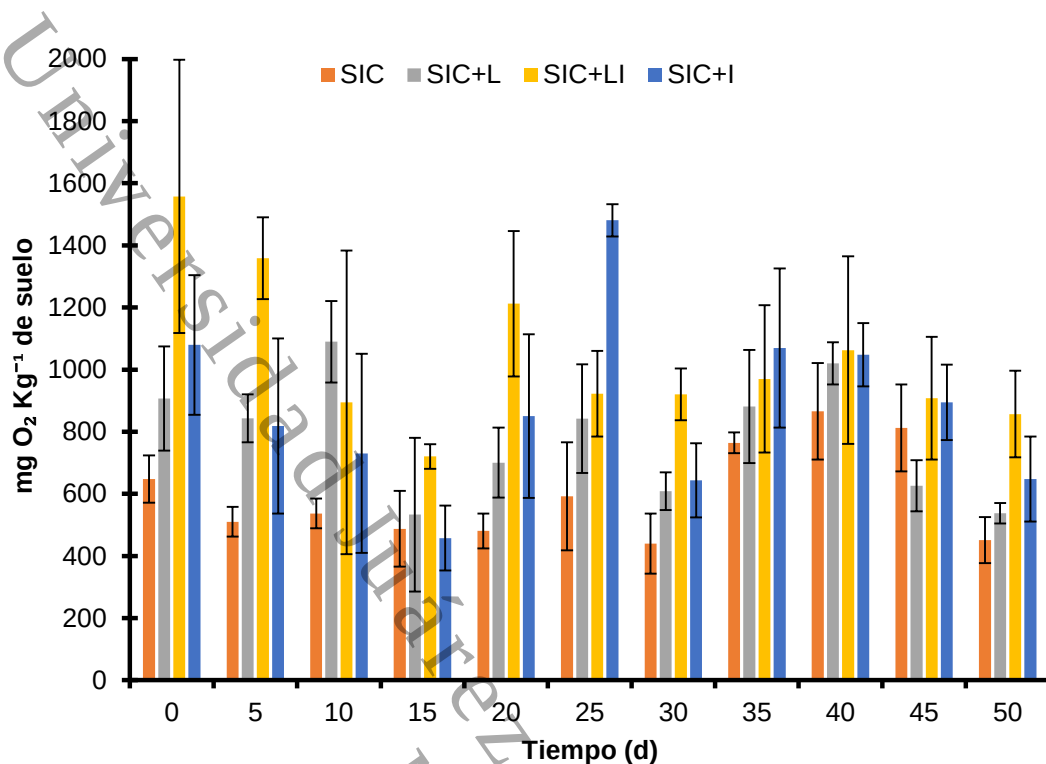


Figura 9. Oxígeno consumido durante el bioproceso de co-compostaje con los tratamientos: a) suelo intemperizado contaminado (SIC), b) suelo intemperizado contaminado + lirio (SIC+L), c) suelo Intemperizado contaminado + lirio + inoculante (SIC+LI) y d) suelo Intemperizado contaminado + inoculante (SIC+I). Los valores representan el promedio de triplicados de cada muestra en los diferentes tiempos de análisis.

En general, en esta etapa (día 35 a 50) se observó que el consumo de oxígeno fue constante en los tratamientos adicionados con inoculante (SIC+LI y SIC+I) los días 35, 40 y 45 ($p > 0.05$), no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). De manera similar, Hernández Pérez analizó la respiración en un suelo contaminado con diésel y registró un consumo de $< 800 \text{ mg de O}_2 \text{ kg}^{-1}$ de suelo; sin embargo, después de 60 días el consumo de oxígeno disminuyó un 37.5%.

7.7.3. Coeficiente respiratorio durante el proceso de co-compostaje

El cociente o coeficiente de respiración (QR) es una medida de la relación molar entre la producción de CO_2 y el consumo de O_2 , que depende de la naturaleza, biodisponibilidad y composición química de los sustratos asimilables para la actividad metabólica microbiana, la fisiología de las comunidades microbianas del suelo y su adaptación a las condiciones nutricionales (Chang, 2014; Dilly, 2001, Dilly, 2003). Como resultado, ofrece información útil entre la relación de la actividad microbiana y la biodegradación de hidrocarburos, basándose en relaciones estequiométricas involucradas en la biodegradación de compuestos orgánicos

(Chang y Ghoshal, 2014). En la Figura 10 se presentan los valores de QR calculados durante el co-compostaje de suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos adicionando lirio y el inoculante experimental, en general se registraron valores promedio de QR <1 (0.30 a 0.95). Para el SC+L, SC+I y el SC+LI se obtuvieron valores de 0.40 a 0.89, los cuales son comparables con los obtenidos para la mineralización de compuestos alifáticos (QR entre 0.65 y 0.80) reportados por Chang y Ghoshal, (2014). Además, éstos resultados son consistentes con los reportados por Beaudin et al. (1996) para la mineralización completa, durante el co-compostaje de hidrocarburos presentes en suelo, (QR~0.69) usando residuos vegetales como sustrato de crecimiento.

El QR puede ser usado para valorar el metabolismo respiratorio predominante, en este caso durante el co-compostaje. Valores como los obtenidos en el presente trabajo corresponden con la mineralización de compuestos con bajo contenido de oxígeno o que están predominantemente mineralizados (Luo y Zhou, 2010; Dilly, 2001).

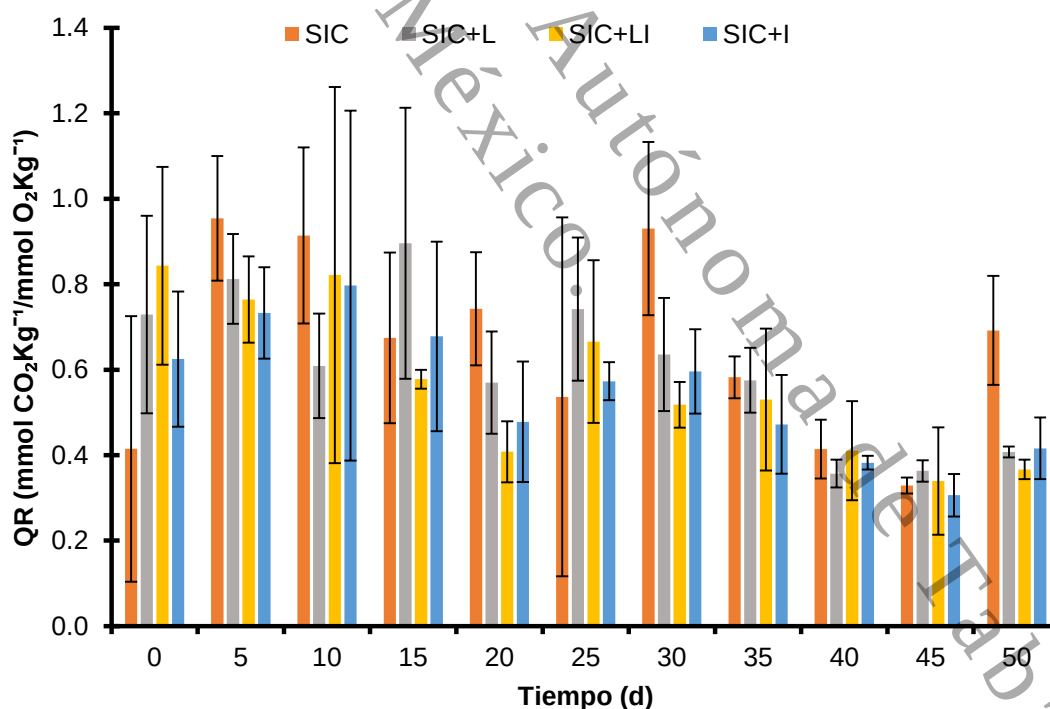


Figura 10. Variación del coeficiente respiratorio (QR) durante el proceso de co-compostaje con los tratamientos: a) suelo intemperizado contaminado (SIC), b) suelo intemperizado contaminado + lirio (SIC+L), c) suelo Intemperizado contaminado + lirio + inoculante (SIC+LI) y d) suelo Intemperizado contaminado+ inoculante (SIC+I). Los valores representan el promedio de triplicados de cada muestra en los diferentes tiempos de análisis.

En ensayos de co-compostaje de suelos contaminados con diésel, Moller et al. (1996) reportaron un QR promedio de 0.4; lo cual es similar a los valores más bajos obtenidos durante el co-compostaje con lirio y el inoculante entre los días 40 a 45, posterior a la adición de fertilizante. Los autores concluyeron que la actividad eco-fisiológica de la microbiota estaba dominada por la biodegradación de sustratos altamente reducidos.

7.7.4. Coeficiente metabólico ($Y_{CO2/X}$)

La biomasa microbiana (BM) es un importante compartimento en relación con los flujos de elementos y energía en los ecosistemas terrestres (Anderson y Domsch, 1985). Ya que los microorganismos del suelo son muy sensibles a los cambios de su entorno, la concentración y estado fisiológico de la BM sufren variaciones a través del tiempo. Como consecuencia la respiración específica o coeficiente metabólico de la biomasa microbiana, definido como el rendimiento (Y) del CO_2 respecto la cantidad de biomasa (X), es particularmente afectado y por tanto usado como medida de la actividad metabólica, basado en la proporción entre el flujo del C- CO_2 y el C-BM del suelo (Anderson y Domsch, 2010).

Tabla 7. Cociente metabólico $Y_{CO2/X}$ durante el bioproceso de co-compostaje con los tratamientos: a) suelo intemperizado contaminado (SIC), b) suelo intemperizado contaminado + lirio (SIC+L), c) suelo Intemperizado contaminado + lirio + inoculante (SIC+LI) y d) suelo Intemperizado contaminado + inoculante (SIC+I). En la tabla se registraron los valores promedio de las muestras analizadas por triplicado.

Tratamiento	$Y_{CO2/X}^* \text{ (mg C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ /mg BM g}^{-1} \text{)}$		
	0	30	50
SIC	0.193 ±0.096	0.193 ±0.066	0.067 ±0.013
SIC+L	0.178 ±0.002	0.149 ±0.031	0.028 ±0.003
SIC+LI	0.301 ±0.011	0.170 ±0.023	0.052 ±0.009
SIC+I	0.352 ±0.086	0.184 ±0.043	0.040 ±0.003

*Datos calculados a partir de los datos de mg C- CO_2 producidos g^{-1} de suelo o mezcla suelo-lirio y de los mg de la biomasa g^{-1} de suelo o mezcla suelo-lirio producidos en 24 h de incubación.

El coeficiente metabólico al inicio del co-compostaje (Tabla 7), mostró diferencias entre el suelo al cual se le añadió lirio (SIC+L) y los tratamientos compuestos por la mezcla lirio-inoculante (SIC+LI) e inoculante (SIC+I), en los cuales el $Y_{CO2/X}$ se incrementó 1.56 y 1.82 veces más que en el control (SIC), respectivamente. Lo que se explica como una alta actividad microbiana (mayor formación de biomasa) comparada con el control y representa una propiedad positiva de acuerdo con Anderson y Domsch (2010).

Entre los 30 y 50 días de iniciado el experimento, el $Y_{CO_2/x}$ para el SIC+L, SIC+LI y SIC+I disminuyó, como consecuencia del incremento de la biomasa microbiana (Fig. 7) lo que fue inducido probablemente por la adición de fertilizante (día 35). Indicando, que hacia el final del proceso los microorganismos aún asimilaron C-orgánico disponible en el suelo incrementando en número, ya que al día 50 la liberación del C-CO₂ fue baja.

7.8. Análisis comparativo de la bioestimulación y bioaumentación en el co-compostaje de suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos.

De acuerdo a los resultados del análisis estadístico (ANOVA bifactorial) realizado, la interacción lirio-inoculante (SIC+LI) fue significativa ($p < 0.05$) en la biodegradación de los hidrocarburos en los primeros 10 días del co-compostaje. Sin embargo, de acuerdo al resultado obtenido a los 50 días de experimentación fue el lirio (SIC+L) el único factor estadísticamente significativo ($p < 0.05$) sobre la degradación de hidrocarburos.

Además, en la inducción de la actividad de la enzima lipasa resultó que el lirio y la interacción lirio-inoculante fueron los factores significativos estadísticamente ($p < 0.05$) durante todo el proceso de co-compostaje. Mientras que, ese efecto positivo sólo fue notado con el inoculante durante los días 20 y 30.

Además, la adición del inoculante y el lirio (de forma independiente) resultaron significativa sobre la producción del C-CO₂ (mineralización) y el consumo de O₂ entre los 20 a 40 días del co-compostaje. De acuerdo a lo anterior, los factores que influyeron significativamente en los resultados finales del proceso de co-compostaje fueron el lirio y la interacción lirio-inoculante.

Cabe señalar que aunque la adición del inoculante no resultó significativa en la biodegradación de hidrocarburos, es importante resaltar que interactuando con el lirio (SIC+LI) éste fue significativo sobre los resultados de otras variables como biomasa microbiana, actividad lipasa, producción de C-CO₂ y consumo de O₂, los cuales son indicadores biológicos relevantes en la biorremediación.

8. Conclusiones

El análisis de los resultados del co-compostaje bajo los diferentes tratamientos permitieron concluir que:

Valorando que la adición del lirio acuático (10%) para el co-compostaje de suelo intemperizado altamente contaminado con hidrocarburos del petróleo, fue capaz de incrementar la biomasa microbiana y la inducción de la enzima lipasa, su presencia fue significativa para alcanzar los porcentajes más altos de biodegradación 12.8 ± 5.8 y 15.8 ± 5.2 (SIC+L y SIC+LI, respectivamente).

El inoculante experimental compuesto por las cepas *Bacillus cereus* (Bc1A), *Bacillus subtilis* (Bs7A), *Bacillus subtilis* (Bs9A), *Gordonia rubripertincta* (Gr3A) y UAM10AP (no identificada) favoreció la actividad enzimática durante el co-compostaje (SIC+LI). Dado que en el tratamiento SIC+LI la actividad de la enzima lipasa se mantuvo sin cambios significativos durante los primeros 40 días del experimento ($1,046.04 \pm 37.42$ a $1,102.66 \pm 94.23$). La interacción lirio-inoculante al igual que SIC+L obtuvieron la mayor concentración de biomasa microbiana al inicio y final del experimento sin diferencias significativas entre estos ($< 2,500 \mu\text{g}$ de biomasa g^{-1} de suelo), estimularon la producción de C-CO_2 y consumo de O_2 , los cuales son indicadores biológicos relevantes en la biorremediación.

El análisis de los perfiles respirométricos reveló que la mineralización se incrementó significativamente al inicio y después de los 25 días de tratamiento en presencia del lirio, lirio-inoculante e inoculante experimental. Los coeficiente respiratorio (QR) y los coeficiente metabólico ($Y_{\text{CO}_2/\text{X}}$) permitieron identificar una primera etapa (primeros 20 días) donde la mineralización fue predominante ($\text{QR} \sim 0.9-0.6$) y una segunda (20 a 50 días) donde la formación de la biomasa se incrementó significativamente, en particular en los tratamientos adicionados con lirio, dando lugar a una condición de reducción del coeficiente metabólico ($Y_{\text{CO}_2/\text{X}} \sim 0.149 - 0.028$), lo que significa un metabolismo enfocado en la formación de biomoléculas y estructura celular a partir de las fuentes de carbono disponibles.

El análisis estadístico factorial realizado, permitió concluir que en el caso de la biodegradación, la interacción lirio-inoculante, fue el factor más significativo en los primeros 10 días del co-compostaje. Y posteriormente, la adición del lirio resultó el único factor

estadísticamente significativo. Así mismo, la adición de lirio y la interacción lirio-inoculante fueron los factores significativos estadísticamente ($p < 0.05$) durante todo el proceso de co-compostaje beneficiando la actividad de la enzima, la biomasa microbiana, perfil respiratorio y número de microorganismos degradadores.

9. Bibliografía

Aguirre Muñoz, A., Alfaro, M., Gutiérrez, E., & Morales, S. (2009). Especies exóticas invasoras impactos sobre las poblaciones de flora y fauna, los procesos ecológicos y la economía. Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio/Sarukhán, J.(Coord. gen.) p. 277-318.

Al Kharusi, S., Abed, R. M., & Dobretsov, S. (2016). EDTA addition enhances bacterial respiration activities and hydrocarbon degradation in bioaugmented and non-bioaugmented oil-contaminated desert soils. *Chemosphere*, 147, 279-286.

Alrumman, S. A., Standing, D. B., & Paton, G. I. (2015). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University-Science*, 27(1), 31-41.

Alvaro, C. E. S., Arocena, L. A., Martínez, M. Á., & Nudelman, N. E. S. (2017). Biodegradación aerobia de fracciones de hidrocarburos provenientes de la actividad petrolera en un suelo de la región patagonia norte, Argentina. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33(2), 247-257.

Anderson, T. H., & Domsch, K. H. (2010). Soil microbial biomass: the eco-physiological approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2039-2043.

Atlas, R. M., & Bartha, R. (1992). Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. In *Advances in microbial ecology* (pp. 287-338). Springer, Boston, MA.

Aspray, T., Gluszek, A., y Carvalho, D. (2008). Efecto de la enmienda de nitrógeno en la respiración y el cociente respiratorio (RQ) en tres suelos contaminados con hidrocarburos de diferente tipo. *Chemosphere*, 72(6), 947-951.

Baldrian, P. (2009). Procesos catalizados por enzimas microbianas en los suelos y su análisis. *Planta, suelo y medio ambiente*, 55(9), 370-378.

Bertrand, J. C., Caumette, P., Lebaron, P., & Normand, P. (2015). The Thematic Fields of Microbial Ecology. In *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications* (pp. 3-7). Springer, Dordrecht.

Beaudin, N., Caron, R. F., Legros, R., Ramsay, J., Lawlor, L. & Ramsay, B. 1996. Composting of hydrocarbon contaminated soil in a laboratory-scale reactor. *Compost Science & Utilization*, 4: 37–45. DOI: 10.1080/1065657X.1996.10701828

Birch, H., Hammershøj, R., Comber, M., & Mayer, P. (2017). Biodegradation of hydrocarbon mixtures in surface waters at environmentally relevant levels—Effect of inoculum origin on kinetics and sequence of degradation. *Chemosphere*, 184, 400-407.

Bonilla-Barbosa, J. R. (2009). Factores que afectan los ecosistemas Acuáticos y su influencia en la distribución y propagación de plantas acuáticas mexicanas. *Mesoamericana*, 37- 43.

Bonilla-Barbosa, J.R., y B. Santamaría. 2013. Plantas acuáticas exóticas y traslocadas invasoras, en R. Mendoza y P. Koleff (coords.), *Especies acuáticas invasoras en México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp. 223-247.

Capelli, S. M., Busalmen, J. P., & De Sanchez, S. R. (2001). Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 47(4), 233-238.

Carrión, C., Ponce-de León, C., Cram, S., Sommer, I., Hernández, M., & Vanegas, C. (2012). Aprovechamiento potencial del lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) en Xochimilco para fitorremediación de metales. *Agrociencia*, 46(6), 609-620.

Chang, W., y Ghoshal, S. (2014). Los cocientes respiratorios son un indicador útil de la mejora de la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en suelos contaminados envejecidos en el campo en climas fríos. *Región y ciencia de las regiones frías*, 106, 110-119.

Comisión Nacional de Hidrocarburos, Reporte Nacional de derrames de hidrocarburos 2000-2013.

Covino, S., Fabianová, T., Kresinová, Z., Cvancarová, M., Burianová, E., Filipová, A., ... & Cajthaml, T. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation and microbial community shifts during co-composting of creosote-treated wood. *Journal of hazardous materials*, 301, 17-26.

Das, S., & Dash, H. R. (2014). 1–Microbial Bioremediation: A Potential Tool for Restoration of Contaminated Areas. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 1-21.

Das, S., Raj, R., Mangwani, N., Dash, H. R., & Chakraborty, J. (2014). Heavy metals and hydrocarbons: adverse effects and mechanism of toxicity. In *Microbial biodegradation and bioremediation* (pp. 23-54).

de Mesa, J. B. L., Quintero, G., Vizcaíno, A. L. G., Cáceres, D. C. J., Riaño, S. M. G., & García, J. M. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5).

Díaz-Ramírez, I. J. 2000. Biodegradación de hidrocarburos por un consorcio microbiano de la rizósfera de una planta nativa de pantano. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, México. D. F.

Dilly, O. (2003). Regulation of the respiratory quotient of soil microbiota by availability of nutrients. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(3), 375-381.

Dilly, O. (2001). Cociente microbiano respiratorio durante el metabolismo basal y después de la modificación de la glucosa en suelos y basura. *Biología y bioquímica de suelos*, 33 (1), 117-127.

Franco, I., Contin, M., Bragato, G., & De Nobili, M. (2004). Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. *Geoderma*, 121(1-2), 17-30.

Guerrero-Ortiz, P. L., Quintero-Lizaola, R., Espinoza-Hernández, V., Benedicto-Valdés, G. S., & Sánchez-Colín, M. D. J. (2012). Respiración de CO₂ como indicador de la actividad microbiana en abonos orgánicos de *Lupinus*. *Terra Latinoamericana*, 30(4).

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (Mexico): Anuario Estadístico y Geográfico de Tabasco 2017.

Ingle, A. P., Seabra, A. B., Duran, N., & Rai, M. (2014). Nanoremediation: a new and emerging technology for the removal of toxic contaminant from environment. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation* (pp. 233-250).

Ivshina, I. B., Kuyukina, M. S., & Krivoruchko, A. V. (2017). Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria and Their Potential in Eco-Biotechnology and Bioremediation. In *Microbial Resources* (pp. 121-148).

Jiang, Y., Brassington, K. J., Prpich, G., Paton, G. I., Semple, K. T., Pollard, S. J., & Coulon, F. (2016). Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation. *Chemosphere*, 161, 300-307.

Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., & De Poorter, M. (2000). 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database (Vol. 12). Auckland: Invasive Species Specialist Group.

Luo, Y., & Zhou, X. (2010). Processes of CO₂ Production in soil. En Y. Luo, & X. Zhou, *Soil Respiration and the environment* (págs. 35-59). Berlington: Elsevier.

Luthy, R. G., Aiken, G. R., Brusseau, M. L., Cunningham, S. D., Gschwend, P. M., Pignatello, J. J., .y Westall, J. C. (1997). Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents. *Environmental Science & Technology*, 31(12), 3341-3347.

Margesin, R., & Schinner, F. (Eds.). (2005). *Manual for soil analysis-monitoring and assessing soil bioremediation* (Vol. 5). Springer Science & Business Media.

Margesin, R., Zimmerbauer, A., & Schinner, F. (2000). Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, 40(4), 339-346.

Margesin, R., Zimmerbauer, A., & Schinner, F. (1999). Soil lipase activity—a useful indicator of oil biodegradation. *Biotechnology Techniques*, 13(12), 859-863.

Martínez-Prado, A., PÉREZ-LÓPEZ, M., Pinto-Espinoza, J., Gurrola-Nevárez, B. A., & Osorio-Rodríguez, A. L. (2011). Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 27(3), 241-252.

Martínez Jiménez, M. 2014. Control biológico de plantas acuáticas exóticas invasoras, en R. Mendoza y P. Koleff (coords.), Especies acuáticas invasoras en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, pp. 249-255.

Mashavira, M., Chitata, T., Mhindu, R. L., Muzemu, S., Kapenzi, A., & Manjeru, P. (2015). The effect of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) compost on tomato (*Lycopersicon esculentum*) growth attributes, yield potential and heavy metal levels. *American Journal of Plant Sciences*, 6(04), 545.

Masto, R. E., Kumar, S., Rout, T. K., Sarkar, P., George, J., & Ram, L. C. (2013). Biochar from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and its impact on soil biological activity. *Catena*, 111, 64-71.

Montejo, M., Torres, C. P., Martínez, A., Tenorio, J., Cruz, M., Ramos, F., & Cuevas, M. (2009). Técnicas para el análisis de actividad enzimática en suelos. Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos, 20.

Moreira López, Y. E., e Infante Dzul, S. G. (2017). Evaluación del proceso de compostaje de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) utilizando diferentes inóculos. Villahermosa: UJAT.

Møller, A. P. (1996). Parasitism and developmental instability of hosts: a review. *Oikos*, 189-196.

Muñoz-Iniestra, D. J., Mendoza-Cantú, A., López-Galindo, F., Soler-Aburto, A., & Hernández-Moreno, M. M. (2000). Manual de métodos de análisis de suelos. UNAM, Mexico.

Nannipieri, P., Sequi, P., & Fusi, P. (1996). Humus and enzyme activity. In *Humic substances in terrestrial ecosystems* (pp. 293-328).

Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.

Núñez Cuartas, D. C., Paredes Cuervo, D., & Cubillos Vargas, J. (2014). Bioremediation for degradation of total hydrocarbons present in the sediments of a fuel service station. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 37(1), 20-28.

Okere & Semple (2012). Biodegradation in pristine soils.

Ortíz-Maya, J., Escalante-Espinosa, E., Fócil-Monterrubio, R. L., Ramírez-Saad, H. C., & Díaz Ramírez, I. J. (2017). Dinámica de poblaciones bacterianas y actividad deshidrogenasa durante la biorremediación de suelo recién contaminado e intemperizado con hidrocarburos. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33(2), 237-246.

Osoro, N., Muoma, J. O., Amoding, A., Mukaminega, D., Muthini, M., Ombori, O., & Maingi, J. M. (2014). Effects of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* [mart.] solms) compost on growth and yield parameters of maize (*Zea mays*). *British Journal of Applied Science & Technology*, 4(4), 617.

Oudot, J., Fusey, P., Abdelouahid, D. E., Haloui, S. y Roquebert, M. F. 1987. Capacités dégradatives de bactéries et de champignons isolés d' un sol contaminé par un fuel. Canadian Journal of Microbiology. 33: 232-243.

Oudot, J., Merlin, F. X. y Pinvidic, P. 1998. Weathering rates of oil components in a bioremediation experiment

Pandey, V. C., Pandey, D. N., & Singh, N. (2015). Sustainable phytoremediation based on naturally colonizing and economically valuable plants. Journal of cleaner Production, 86, 37-39.

Peeples, T. L. (2014). Bioremediation Using Extremophiles. In Microbial Biodegradation and Bioremediation (pp. 251-268).

PEMEX. (2016) Informe de sustentabilidad 2016. México, CDMX.

PEMEX. (2018) Informe de sustentabilidad 2017. México, CDMX.

Perez-Montero, S. 2013. Evaluación de la capacidad fitorremediadora de hidrocarburos en un sistema modelo por *Cyperus ligularis*. Tesis de maestría. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, México. Tabasco.

Prasad, R., Singh, J., & Kalamdhad, A. S. (2013). Assessment of nutrients and stability parameters during composting of water hyacinth mixed with cattle manure and sawdust. Research Journal of Chemical Sciences _____ISSN, 2231, 606X.

Prince, R. C., Gramain, A., & McGenity, T. J. (2010). Prokaryotic hydrocarbon degraders. In Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology (pp. 1669-1692). Springer Berlin Heidelberg.

Ramírez-Sánchez, I. M., Rios-Solis, M. E., Morales-Contreras, M., Colomer-Mendoza, F. J., Vargas-Soto, J. C., & Robles-Martínez, F. (2017). Uso de viruta de madera y Lirio Acuático (*Eichhornia crassipes*) como agentes estructurantes en tratamientos aerobios de residuos hortícolas. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 32, 153-160.

Riffaldi, R., Levi-Minzi, R., Cardelli, R., Palumbo, S., & Saviozzi, A. (2006). Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil. Water, air, and soil pollution, 170(1-4), 3-15.

Ryan, M. G., & Law, B. E. (2005). Interpreting, measuring, and modeling soil respiration. Biogeochemistry, 73(1), 3-27.

Santos Zuñiga, G. G. (2017). Evaluación de dos métodos de medición de la conductividad eléctrica en suelo y composta. Villahermosa: UJAT.

Shintani, M., Sugiyama, K., Sakurai, T., Yamada, K., & Kimbara, K. (2019). Biodegradation of A-fuel oil in soil samples with bacterial mixtures of *Rhodococcus* and *Gordonia* strains under low temperature conditions. Journal of bioscience and bioengineering, 127(2), 197-200.

Shukla, S. K., Mangwani, N., Rao, T. S., & Das, S. (2014). Biofilm-mediated bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In *Microbial biodegradation and bioremediation* (pp. 203-232).

Torri, S. I., Cabrera, M. N., & Alberti, C. (2018). Respiración potencial durante la bioestimulación de un suelo contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 34(1), 127-136.

Umsakul, K., Dissara, Y., & Srimuang, N. (2010). Chemical, physical and microbiological changes during composting of the water hyacinth. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13(20), 985-992.

Van Elsas, J. D., & Rutgers, M. (2006). Soil microbial diversity and community composition (pp. 183-227). CABI Publishing, Cambridge.

Vance, E. D., Brookes, P. C., & Jenkinson, D. S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil biology and Biochemistry*, 19(6), 703-707.

Vargas Roussel, D. K. (2018). Evaluación de la composta de lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) en el cultivo de rabano (*Raphanus savitus*) y pasto mombasa (*Panicum maximun*). Villahermosa: UJAT.

Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource technology*, 223, 277-286.

Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 71-83.

Widdel, F., & Musat, F. (2010). Energetic and other quantitative aspects of microbial hydrocarbon utilization. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 729-763). Springer Berlin Heidelberg.

Wright, A. L., Reddy, K. R., & Corstanje, R. (2009). Patterns of heterotrophic microbial activity in eutrophic and oligotrophic peatlands. *European journal of soil biology*, 45(2), 131-137.

Wu, M., Li, W., Dick, W. A., Ye, X., Chen, K., Kost, D., & Chen, L. (2017). Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination. *Chemosphere*, 169, 124-130.

Zentella Beltrán, J. B., (2018). Aplicación de un inoculante bacteriano experimental en suelo contaminado por hidrocarburos. Villahermosa: UJAT.

10. Anexo fotográfico



Figura 11. Recolección y secado del lirio



Figura 12. Recolección y tamizado de Suelo Intemperizado contaminado con hidrocarburos



Figura 13. Preparación del inoculante experimental en estado sólido

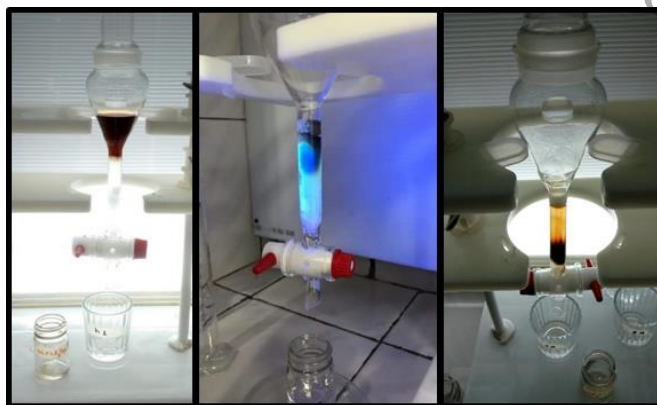


Figura 14. Fraccionamiento de hidrocarburos totales del petróleo



Figura 15. Calibración y determinación de la respiración durante el co-compostaje



Figura 16. Determinación de la biomasa microbiana

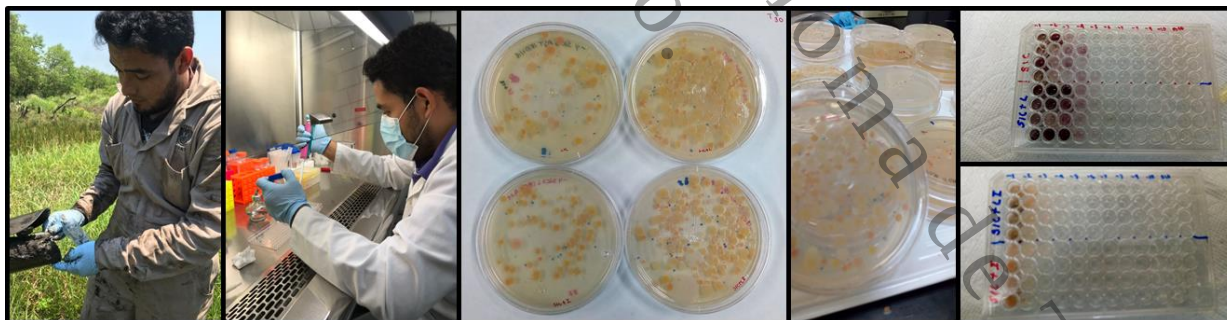


Figura 17. Recolección de muestra y cuantificación de microorganismos heterótrofos y degradadores de hexano