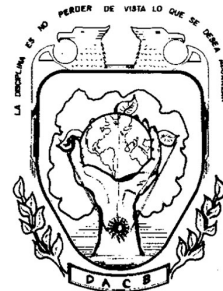




UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
División Académica de Ciencias Biológicas



**Co-compostaje de suelo recién contaminado e
intemperizado por hidrocarburos: efecto del lirio acuático
(*Eichhornia crassipes*) como acondicionador**

TESIS

Para obtener el título de licenciatura en
Ingeniería Ambiental

Presenta

Sonia Thalía Notario Acosta

Asesores

Dr. Ildefonso Jesús Díaz Ramírez

Dra. Erika Escalante Espinosa

Villahermosa, Tabasco, agosto del 2019

Co-Compostaje De Suelo Recién Contaminado E Intemperizado Por Hidrocarburos: Efecto Del Lirio Acuático (Eichhornia Crassipes) Como Acondicionador

Por SoniaThalia Notario Acosta

Co-Compostaje De Suelo Recién Contaminado E Intemperizado Por Hidrocarburos: Efecto Del Lirio Acuático (Eichhornia Crassipes) Como Acondicionador

INFORME DE ORIGINALIDAD

14%
ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	ambiental.unam.mx Internet	1803 palabras — 10%
2	(5-25-15) http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI10493.pdf Internet	182 palabras — 1%
3	docplayer.es Internet	64 palabras — < 1%
4	cibnor.repositorioinstitucional.mx Internet	49 palabras — < 1%
5	colposdigital.colpos.mx:8080 Internet	46 palabras — < 1%
6	repositorio.cinvestav.mx Internet	45 palabras — < 1%
7	itp.edu.co Internet	43 palabras — < 1%
8	(12-17-13) http://200.77.231.100/work/normas/nmx/2007/nmx-ff-109-scfi-2008.pdf Internet	29 palabras — < 1%

9	Internet	29 palabras — < 1 %
10	genius.com Internet	22 palabras — < 1 %
11	repositorio.uap.edu.pe Internet	18 palabras — < 1 %
12	www.cofemersimir.gob.mx Internet	18 palabras — < 1 %
13	tesis.udea.edu.co Internet	17 palabras — < 1 %
14	assets.zyrosite.com Internet	16 palabras — < 1 %
15	cmas.siu.buap.mx Internet	16 palabras — < 1 %
16	fdocuments.es Internet	16 palabras — < 1 %
17	www.paot.org.mx Internet	15 palabras — < 1 %

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS < 15 PALABRAS



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

JULIO 11 DE 2019

**C. SONIA THALÍA NOTARIO ACOSTA
PAS. DE LA LIC. EN ING. AMBIENTAL
PRESENTE**

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: **"CO-COMPOSTAJE DE SUELO RECIÉN CONTAMINADO E INTEMPERIZADO POR HIDROCARBUROS: EFECTO DEL LIRIO ACUÁTICO (*EICHHORNIA CRASSIPES*) COMO ACONDICIONADOR"**, 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 Dra. Susana del Carmen de la Rosa García, M. en C. Reyna Lourdes Fócil Monterrubio, Dra. Erika Escalante Espinosa, Dra. Liliana Pampillón González y Q.B.P. Leonardo García Hernández.

**ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE**

**DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR**

UJAT
DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCIÓN

C.c.p.- Expediente del Alumno.
Archivo.

Consortio de
Universidades
Mexicanas
UNA RED DE CALIDAD PARA LA EDUCACIÓN SUPERIOR

KM. 0.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA
Tel. (993) 358-1500 Ext. 6400 y 6401, 337-9611, 337-9706, Fax (993) 354-4308 y 358-1579

Usar papel reciclado economiza energía, evita contaminación y desperdicio de agua y ayuda a conservar los bosques

www.ujat.mx

CARTA AUTORIZACIÓN

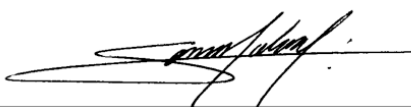
El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis denominado: **"CO-COMPOSTAJE DE SUELO RECIÉN CONTAMINADO E INTEMPERIZADO POR HIDROCARBUROS: EFECTO DEL LIRIO ACUÁTICO (*EICHHORNIA CRASSIPES*) COMO ACONDICIONADOR"**, 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 11 de Julio de 2019

AUTORIZO



SONIA THALIA NOTARIO ACOSTA

*Eres, por tu forma de ser conmigo lo que más quiero, eres, mi timón, mi
vela, mi barca, mi mar, mi remo.*

A Sonia y Miguel

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la vida, el entendimiento y la fuerza para concluir este proyecto. Por guiarme a lo largo de este camino y encontrar mi propósito de vida, porque de esa manera ha mostrado su bondad hacia mí y a mi familia. Porque la fe en ti estuvo, está y estará.

A la familia Notario-Acosta, por su apoyo incondicional. A mis padres, Sonia y Miguel Ángel, por creer en mí desde el inicio, por su paciencia y entendimiento infinito durante esta travesía, porque este logro es suyo y se ve reflejado en mí. Gracias por hacer de mí lo que día con día han sembrado, una vida no alcanzaría para agradecerles, los amo. A Carlos, gracias por ser más que un hermano, un amigo que siempre está para mí.

Al Dr. Ildefonso Díaz Ramírez y a la Dra. Erika Escalante Espinosa, porque en sus clases descubrí mi amor a la ciencia y el ánimo que mantiene mi curiosidad intacta. Gracias por permitirme ser parte del laboratorio Bioprocesos, por ser mis guías en esta etapa tan importante, gracias infinitas por sus enseñanzas académicas y de vida. Siempre los llevaré en el corazón porque su calidad humana me ha marcado desde el primer día.

A la Mtra. Reyna L. Fócil Monterrubio, por las pláticas que nos motivaban día con día, por sus consejos y observaciones para mejorar este trabajo. Muchas gracias.

A la Dra. Susana del C. De la Rosa García, por creer en mí, por sus sabios consejos para impulsarme a ser mejor, por su apoyo para enriquecer este trabajo y sobre todo, gracias por la amistad que me ha brindado.

A la Dra. Liliana Pampillón González y al Quím. Leonardo García por sus comentarios y observaciones para mejorar este trabajo.

Al laboratorio de Bioprocesos, desde mis inicios, gracias a todos por aceptarme a formar parte de esta gran familia. Melissa, Yani, Susi, Anita, Andy, Boli, Gaby, Reyna, Geny, Luis, Sele, Derci, Luz. Y a Jordy por cada día que estuvo apoyándome. Una parte de ustedes está aquí, por todo su apoyo les agradezco!

Con quien empecé a la par esta aventura, Andrés, gracias por todo lo que hemos realizado durante este proyecto y la solidaridad que me brindaste, que sin duda sin ti no hubiera sido lo mismo. A Diana, por amenizar las tardes de trabajo en el lab, tus chistes, y las diversiones que hemos vivido junto a los demás, hicieron de esta experiencia agradable. Gracias a los dos, por las aventuras, risas, molestias, estrés, y demás, que han forjado nuestra amistad.

A G. Itzel, gracias a esta experiencia que nos hizo coincidir porque es impreciso el momento en el que encontraremos una gran persona en el camino, gracias por esa manera tan peculiar que tienes de hacer sentir mejor a los demás incluso en momentos difíciles, tu amistad es invaluable.

A mis amigos, Nelly, Sully, Ybana, Jazmín, Cindy, Itzel Miranda, Jessica y Viri. Gracias a todos!

A CONACyT por la beca de tesis otorgada (Proyecto No. 247II)

i. TABLA DE CONTENIDO

i. TABLA DE CONTENIDO	i
ii. Resumen	iii
iii. Abstract	iv
1.INTRODUCCIÓN	1
2.MARCO TEÓRICO	3
2.1. Lirio acuático	3
2.1.1. Descripción de la especie	3
2.1.2. Reproducción	5
2.1.3. Problemática del lirio acuático en los cuerpos de agua	5
2.2. Suelo	6
2.3. Hidrocarburos del petróleo	7
2.4. Contaminación por hidrocarburos en México y el sureste	9
2.5. Tecnologías de biorremediación	12
2.6. Co-compostaje de suelo contaminado	13
2.7. Biodisponibilidad de contaminantes en el suelo	14
2.8. Microorganismos degradadores	15
3.ANTECEDENTES	17
4.JUSTIFICACIÓN	19
5.OBJETIVOS	21
5.1. OBJETIVO GENERAL	21
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
6.MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1. Estrategia experimental	22
6.2. Ubicación del sitio de muestreo	23
6.3. Área de colecta de suelo y lirio acuático	24
6.4. Co-composteo de suelo contaminado con lirio	25
6.5. Ajuste de la relación C/N para las mezclas de suelo – lirio acuático	26
6.6. Métodos analíticos	26
6.6.1. Parámetros fisicoquímicos del suelo y el lirio	26
6.6.1.1. Nitrógeno total	26
6.6.1.2. Carbono orgánico	27
6.6.1.3. Potencial de hidrógeno (pH)	28
6.6.1.4. Conductividad eléctrica	28
6.6.2. Extracción de HTP	28
6.6.3. Fraccionamiento de HTP	28
6.7. Análisis microbiológicos	30
6.7.1. Conteo de microorganismos heterótrofos del suelo	30
6.7.2. Cuantificación de microorganismos degradadores de alcanos	30
6.8. Análisis respirométrico del suelo contaminado	31
6.9. Determinación de la biomasa microbiana por el método de fumigación extracción	31
6.10. Determinación de enzima lipasa	34
6.11. Análisis estadísticos	34

7.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
7.1 Caracterización fisicoquímica del suelo.....	35
7.2 Relación carbono – nitrógeno de los tratamientos evaluados	36
7.3 Estimación del pH y la conductividad eléctrica del suelo y la composta	37
7.4 Estimación de los microorganismos heterótrofos (bacterias y hongos) y microorganismos degradadores del suelo	38
7.5 Biomasa microbiana	42
7.6 Actividad de la enzima lipasa.....	44
7.7 Biodegradación de hidrocarburos durante el proceso de co-compostaje	46
7.8 Fraccionamiento de hidrocarburos del suelo intemperizado	48
7.9 Respiración microbiana en suelos contaminados.....	49
7.10 Coeficiente respiratorio	52
7.11 Efecto del lirio acuático como acondicionador orgánico en el co-compostaje de suelo recién contaminado e intemperizado por hidrocarburos.....	54
8.CONCLUSIONES.....	56
9.RECOMENDACIONES	57
10.BIBLIOGRAFÍA.....	58
11. ANEXO FOTOGRÁFICO.....	64

ii. Resumen

En el presente trabajo se adicionó lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) en suelos con diferente historia de contaminación para comparar su efecto sobre la biodegradación de hidrocarburos y la actividad biológica durante el proceso de co-compostaje. Se diseñó un experimento a escala piloto con biopilas (10 Kg) divididas en los siguientes tratamientos: a) suelo recién contaminado (control, SRC), b) suelo intemperizado (control, SI), c) suelo recién contaminado más lirio acuático con C/N 25(SRC+L) y d) suelo intemperizado más lirio acuático con C/N 25 (SI+L). Las unidades experimentales se mantuvieron (50 días) en condiciones de invernadero (26-38°C) a un 65% de la capacidad de campo. Se cuantificó la biomasa microbiana, el número de microorganismos degradadores, heterótrofos totales, perfil respirométrico y actividad de la enzima lipasa. Adicionalmente, se determinaron: conductividad eléctrica, pH, contenido de hidrocarburos totales del petróleo (HTP), la composición de los hidrocarburos residuales, carbono orgánico y nitrógeno total. Los resultados obtenidos indicaron que la adición de lirio acuático en ambos suelos propició un incremento en el número de microorganismos heterótrofos (hasta 8×10^6 UFC g⁻¹); así como, en la biomasa microbiana hasta de 2,927.03 y 2,650.38 µg g⁻¹, para el suelo recién contaminado e intemperizado, respectivamente. También se registró una elevación estadísticamente significativa de la actividad lipasa con valores máximos de 3,241.75 µg de pNP g⁻¹ suelo 10 min⁻¹ para el SRC+L y 3,079.39 para el SI+L. Así mismo, se obtuvo una mayor remoción de los HTP de hasta 28.42% para el SRC+L y 23.80% para el SI+L, para este último se obtuvo una remoción significativa (50%) de las fracciones aromáticas y alifáticas respecto a su concentración inicial. Estos resultados se correlacionaron con valores elevados de mineralización y consumo de oxígeno en presencia del lirio, indicando una elevada oxidación de las fuentes de carbono disponibles respecto a los suelos no-adicionados. El lirio acuático como acondicionador durante el co-compostaje del suelo resulta ser una alternativa útil para mejorar significativamente la degradación de compuestos contaminantes incluso en el suelo intemperizado, a través del incremento de la actividad biológica.

iii. Abstract

This study compared the effect of the addition of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) on the biodegradation of hydrocarbons and the biological activity during the co-composting of soils with a different history of contamination. A pilot-scale experiment was carried out with biopiles (10 Kg) divided into the following treatments: a) freshly contaminated soil (control, SRC), b) weathered soil (control, SI), c) freshly contaminated soil added with water hyacinth with C/N 25 (SRC+L) and d) weathered soil added with water hyacinth with C/N 25 (SI+L). The experimental units were maintained (50 days) under greenhouse conditions (26-38°C) at 65% of their field capacity. It was determined the microbial biomass, the number of hydrocarbon-degrading microorganisms, total heterotroph, respirometric profile, and lipase enzyme activity. Additionally, the following were determined: electrical conductivity, pH, total petroleum hydrocarbons (TPH), the composition of the residual hydrocarbons, total organic carbon, and total nitrogen. The results obtained indicated that the addition of water hyacinth in both soils led to an increase in the number of heterotrophic microorganisms (up to 8×10^6 CFU g⁻¹); as well as in the microbial biomass up to 2,927.03 and 2,650.38 µg g⁻¹, for the freshly contaminated soil and weathered soil, respectively. Also, a significant rise in lipase activity was recorded being the maximum values of 3,241.75 µg of pNP g⁻¹ soil 10 min⁻¹ for SRC+L and 3,079.39 for SI+L. Likewise, water hyacinth addition caused TPH removal of up to 28.42% for the SRC+L and 23.80% for the SI+L. For the latter, the aromatic and aliphatic fractions removed significantly (50%), concerning its initial concentration. These results correspond to high values of mineralization and oxygen consumption in the presence of water hyacinth, which indicates high oxidation of available carbon sources concerning non-added soils. The use of water hyacinth as a bulking agent during the co-composting of the soil turned out to be a useful alternative that improved significantly the degradation of contaminating compounds even in the weathered soil, through the improvement of the biological activity.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la industria petrolera en los diversos estados del territorio mexicano, ha generado una problemática de contaminación debido a los diversos derrames de petróleo que ocurren. Una de las principales consecuencias es la contaminación del suelo, un sistema de importancia en el desarrollo de seres vivos de diferentes niveles tróficos, por lo que la presencia de sustancias tóxicas, pone en riesgo el equilibrio ecológico del suelo (Hentati *et al.* 2013). Entre los diversos efectos que provocan los hidrocarburos en el suelo, destaca la reducción de la capacidad de retención de agua, la disminución de la porosidad del suelo ya que tienden a unir las partículas del suelo, además de limitar la disponibilidad de oxígeno para la respiración de los microorganismos presentes debido a la capa superficial que se forma durante un derrame. De esta manera se afecta su calidad y su fertilidad, por lo cual también disminuye su capacidad para sostener el crecimiento de las plantas (Ezeji *et al.* 2007; Ndimele *et al.* 2018). Un proceso que típicamente se lleva a cabo en el suelo es la biodegradación, la cual puede definirse como la transformación química de los compuestos orgánicos, como los hidrocarburos, realizada por microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos, etc.) y plantas (Singh y Ward, 2004). Cabe destacar que para que este proceso se lleve a cabo de manera eficiente intervienen diversos factores como la biodisponibilidad del contaminante, su concentración, la disponibilidad de nutrientes y condiciones ambientales adecuadas como el pH, temperatura, contenido de agua y potencial redox (Das y Dash *et al.* 2014; Speight *et al.* 2012). Lim *et al.* (2016) han reportado que la biorremediación es una vía sustentable por la que se pueden acelerar los procesos naturales de biodegradación, añadiendo los nutrientes requeridos por la biota del suelo a través de tratamientos controlados, para mejorar y maximizar la rápida degradación de los compuestos en cuestión. Particularmente, el co-compostaje es una tecnología que consiste básicamente en la adición de materiales orgánicos, como plantas, aserrín, bagazo, cáscaras, entre otros, para proveer nutrientes, aireación y consecuentemente mejorar la degradación potencializando la actividad biológica en el suelo (Kastner y Miltner, 2016). Una de las principales limitantes en los procesos de biorremediación, es el

costo y disponibilidad de los acondicionadores o nutrientes a utilizar en las diversas técnicas de esta tecnología, sin embargo de acuerdo a Rezania *et al.* (2015) algunas malezas acuáticas de preocupación mundial como el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) pueden ser aprovechadas de numerosas formas como en la producción de bio-combustibles, biomasa en el tratamiento de aguas residuales, composta, ensilaje de ganado y como acondicionador orgánico, debido a su contenido de tejido fibroso y nutrientes (Su *et al.* 2018). De acuerdo a lo anterior, en el presente estudio se evaluó el efecto del lirio acuático sobre la biodegradación de los hidrocarburos durante el proceso de co-compostaje de suelo intemperizado y suelo recién contaminado.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Lirio acuático

El lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) es una planta libre flotadora macrófita originaria de la región amazónica de Brasil que se ha esparcido a las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Debido a su flor tan llamativa se ha potenciado su uso ornamental (Moyo *et al.* 2013). Es una planta que florece durante todo el año, está presente en ríos, canales, lagos, lagunas, arroyos, pantanos e incluso presas. La presencia de contaminantes en el agua provoca su proliferación y por lo tanto cubre grandes extensiones en los cuerpos de agua (Ortiz *et al.* 2015).

La introducción del lirio acuático a México según (Camarena *et al.* 2013) data de principios del siglo XX por algunas familias de los estados de Jalisco, Michoacán y Ciudad de México, Pero la presencia de esta planta se reportó desde la época del porfirismo sin embargo, se consideró un problema hasta 1962.

2.1.1. Descripción de la especie

Es una planta acuática perenne flotante que se encuentra principalmente en aguas lénticas, es herbácea y consta de varias hojas anchas y con flores color púrpura. Las hojas son color verde brillante, lisas, gruesas y constan de dos partes, un peciolo que se encuentra en el tallo de la hoja y otra hoja arriba. La hoja puede llegar a medir hasta 30 cm de diámetro y cuenta con dos tipos, las que poseen peciolos bulbosos y aquellos que no son bulbosos, los cuales permiten que la planta flote (Figura 1a). Los tallos pueden llegar a medir hasta 60 cm de largo, con estolones horizontales de unos 10 cm de largo que pueden producir nuevas plantas. Las raíces son de color negro, fibrosas y parecidas a las plumas, que pueden llegar a medir hasta un metro de largo en aguas profundas, también puede adherirse al fondo, lo que permite que la planta persista en el cuerpo de agua (Figura 1b) (Osmond y Petroeschovsky, 2013).

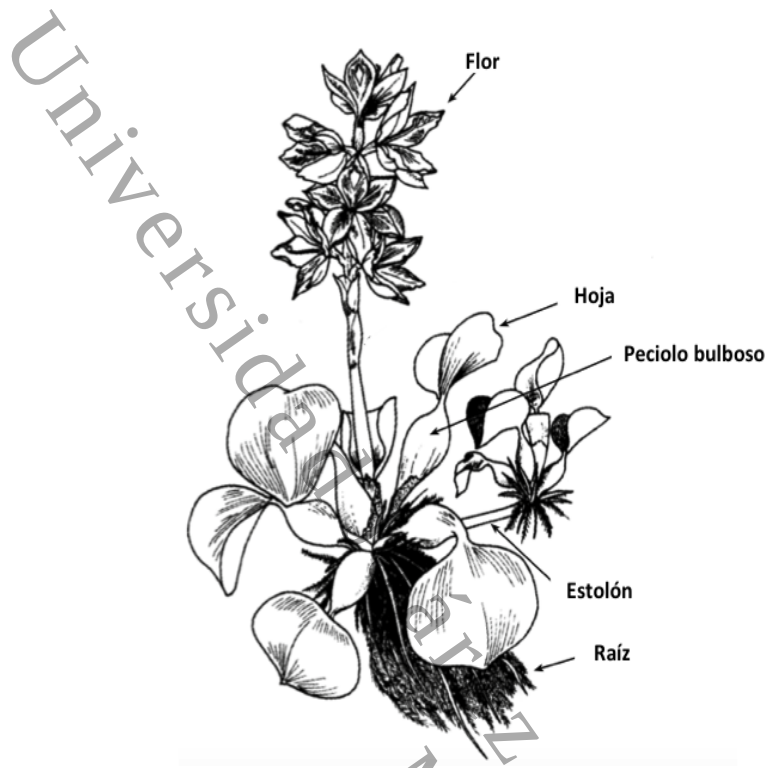


Figura 1a. Morfología de la planta de lirio acuático (sp)

Fuente: NWS, Department of Primary Industries. Weeds of National Significance. Australia, 2013.

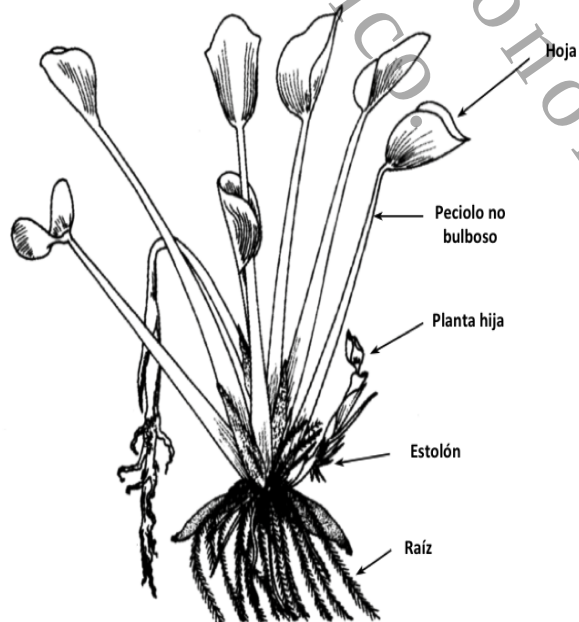


Figura 1b. Morfología del lirio acuático (sp)

2.1.2. Reproducción

El lirio acuático se puede reproducir sexualmente y de forma vegetativa, la reproducción sexual es escasa ya que las flores del lirio son profundas y son poco observadas sus semillas. La forma más común en la que esta planta prolifera es vegetativa, donde se desarrollan brotes de estolón con ramificaciones de yemas distribuyéndose de manera mas rápida por las corrientes de agua, su fructificación ocurre alrededor de un 90% de humedad y temperaturas entre los 22 y 35 grados Celsius (Global Invasive Species Database, 2015).

2.1.3. Problemática del lirio acuático en los cuerpos de agua

Uno de los principales problemas del lirio acuático es su rápida propagación, por esto es considerada maleza acuática invasiva a nivel mundial ya que puede duplicar su población en cuestión de 5 – 15 días (Moyo *et al.* 2013). Así mismo, por su capacidad de tolerar amplias temperaturas y pH, tiene una mayor ventaja sobre otras especies de malezas acuáticas nativas que tienen una baja tolerancia a los cambios en ambientes acuáticos (Osmond y Petroeschevsky, 2013). Las alteraciones que puede ocasionar en los hábitats dulceacuícolas van desde obstruir el flujo del agua de canales de irrigación, la destrucción de puentes hasta producir alteraciones en la tasa de evapotranspiración, incrementa la turbidez del agua, reduce la penetración de luz que por lo tanto afecta sus propiedades fisicoquímicas (Niño *et al.* 2006).

Algunas instituciones han mencionado que la presencia del lirio acuático puede causar diversos efectos en los ámbitos económicos, ecológicos, institucionales y de salud, los cuales se mencionan a continuación (TEMA, s/f):

- **Ecológico:** Pérdida de biodiversidad, disminuye el oxígeno disuelto, favorece la eutrofización y genera azolvamiento.
- **Económico:** Pérdida de agua, afectaciones a los canales y al turismo.
- **Salud:** Potencia las enfermedades relacionadas con el agua contaminada.
- **Institucionales:** Rebasa la capacidad de atención de los 3 niveles de gobierno, implica el direccionamiento de los recursos que se utilizan para la población e influye en el déficit ambiental del país.

2.2. Suelo

El suelo está formado por minerales, aire, agua y materia orgánica del suelo. Las proporciones en las que se encuentran estos componentes y su composición influyen en sus propiedades físicas como la textura, estructura, y porosidad, estas afectan el movimiento del aire y del agua en el suelo y por lo tanto, la habilidad del suelo para funcionar (McCauley *et al.* 2005). En México existen 25 de las 32 unidades de suelo que se presentan en la clasificación de la Base Referencial Mundial del Recurso Suelo, esto se puede atribuir a las diversas combinaciones de los componentes que forman el suelo del territorio nacional (SEMARNAT, 2016).

En la figura 2 se muestran las unidades de suelos que predominan en el territorio mexicano, en los que 6 son los que más destacan: Leptosoles, Regosoles, Feozems, Calcisoles, Luvisoles y Vertisoles, los cuales representan el 81.7% de la superficie total, las 19 unidades minoritarias cubren aproximadamente una superficie de 36 millones de hectáreas (Cruz *et al.* 2007)

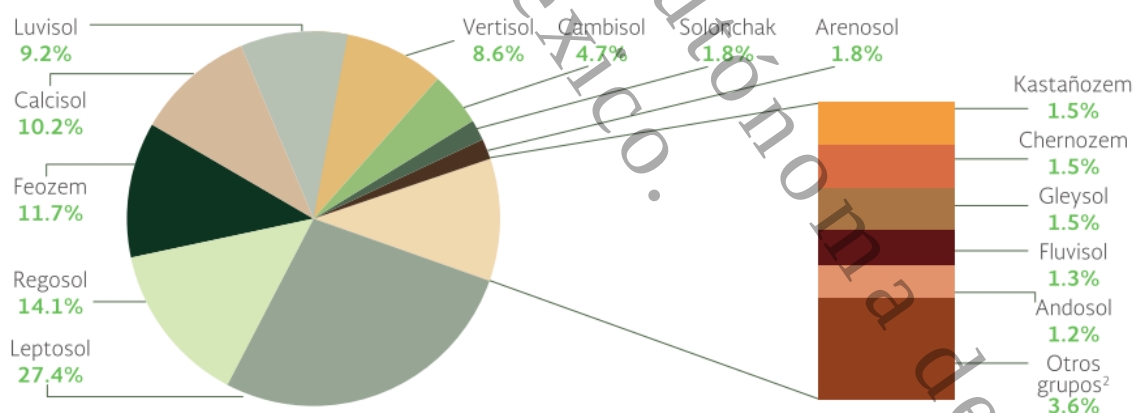


Figura 2. Superficie de los principales grupos de suelo en México

Fuente: SEMARNAT, Informe de la Situación del Medio Ambiente en México, Capítulo 3. Suelos, México, 2016.

De acuerdo a Palma *et al.* (2017) son 19 los grupos de suelos que se encuentran en el estado de Tabasco, destacando los gleysoles (20.5%), histosoles (13.4%), fluvisoles (10.4%), acrisoles (9.73%), vertisoles (7.48%), leptosoles (7.07%), alisoles (9.73%), luviosles (6.49%), cambisoles (5.77%), arenosoles (2.1%) entre otros (4.79%), con respecto a la superficie total del estado (466 100 ha). La mayoría son suelos que son ocupados con los cultivos más redituables del estado, como el cacao,

palma de aceite, papaya y caña de azúcar. El suelo es un cuerpo natural que conforma el hábitat de diversos organismos, como las bacterias, hongos, levaduras, plantas entre otros, esto le da soporte a los sistemas ecológicos ya que aportan componentes químicos y minerales como resultado de la biodegradación, por lo tanto el suelo representa un papel importante en la vida de todos los seres vivos (Fernández *et al.* 2006).

2.3. Hidrocarburos del petróleo

El petróleo es una mezcla de gases, líquidos y compuestos hidrocarbonados sólidos, también se puede definir como una mezcla de hidrocarburos que generalmente se encuentran en estado líquido y que puede llegar a contener compuestos metálicos entre otros elementos (Speight, 1998). Se le llaman hidrocarburos a aquellos compuestos que solamente contienen carbono e hidrógeno, y forman el grupo más grande de compuestos orgánicos (Riazi, 2005).

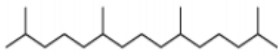
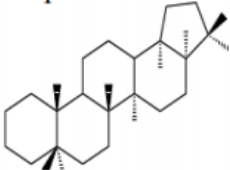
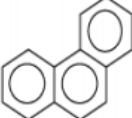
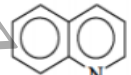
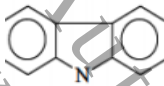
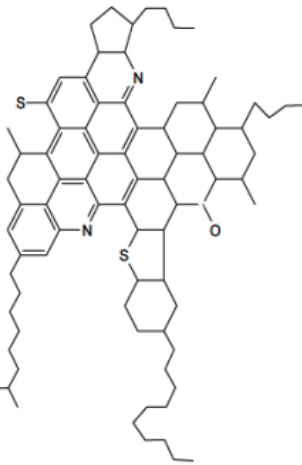
Varjani y Upasani, (2017) mencionan que los hidrocarburos del petróleo se clasifican en cuatro categorías (Tabla 1):

- Alifáticos
- Aromáticos
- Resinas
- Asfaltenos

Los hidrocarburos alifáticos pueden ser saturados o no saturados, de estructuras abiertas o cíclicas, que pueden ser gaseosos, con bajo peso molecular (C_8 - C_{16}), con peso molecular medio (C_{17} - C_{28}) o con un alto peso molecular ($>C_{28}$). Los aromáticos son una serie de hidrocarburos importantes que se pueden encontrar casi en cualquier mezcla de petróleo, estos son cíclicos y parten de la molécula del benceno (C_6H_6) y contienen dobles enlaces carbono-carbono (Riazi, 2005). Las resinas contienen numerosos grupos funcionales polares formados con N, S, O y traza de metales como el níquel, vanadio y hierro. También contienen compuestos aromáticos con cadenas largas de alcanos que mayormente son solubles en n-heptano y n-pentano. La fracción de asfaltenos se considera como recalcitrante y se conoce que

contiene nitrógeno, oxígeno, átomos de azufre, vanadio y níquel, por lo general son moléculas complejas que están coloidalmente dispersadas en compuestos aromáticos, también son viscosos y de alto peso molecular (Riazi, 2005; Varjani, 2017).

Tabla 1. Categorías en las que se dividen los hidrocarburos del petróleo.

ALIFÁTICOS	AROMÁTICOS	RESINAS	ASFALTENOS
<i>n</i>-alcanos  Isoprenoides  Cicloparafinas  Hopanos 	Monoaromáticos  Poliaromáticos    	Monómeros de : Piridinas  Quinolinas  Carbazoles  Tiofenos 	Moléculas de elevado peso molecular 

Fuente: Zuluaga-Montoya (2009).

2.4. Contaminación por hidrocarburos en México y el sureste

La contaminación del suelo representa uno de los problemas ambientales más comunes y serios debido en la mayoría de los casos, por accidentes relacionados con operaciones industriales como derrames, fugas, descargas de efluentes ó disposición de residuos peligrosos (Santos-Jallath, 2007). Estos procesos urbanos han provocado el deterioro del uso del suelo en diferentes aspectos como el valor económico de los predios, sus condiciones ambientales y su uso sustentable (SEMARNAT, 2010).

Respecto a los derrames de hidrocarburos en el estado de Tabasco, la Comisión Nacional de Hidrocarburos, (2014) señaló que durante el periodo 2000 – 2014, se derramó un total de 24.78 mbls^a de petróleo crudo en tierra, lo que representó 1,475 derrames cuantificados, situándose sólo por debajo de Veracruz, por lo que Tabasco se puede considerar como uno de los estados mayormente afectados (Figura 3).

De acuerdo al Anuario Estadístico de PEMEX, (2016a) México es el doceavo país en tener una alta producción de petróleo crudo con un total de 2,154 mbd; tomando en cuenta sólo el sureste del país, la producción de petróleo crudo es la siguiente: la región Marina Suroeste conformada por Abkatún-Pol-Chuc y Litoral Tabasco obtuvieron una producción total de 619 mbd^b, seguidamente la Región Marina Noreste

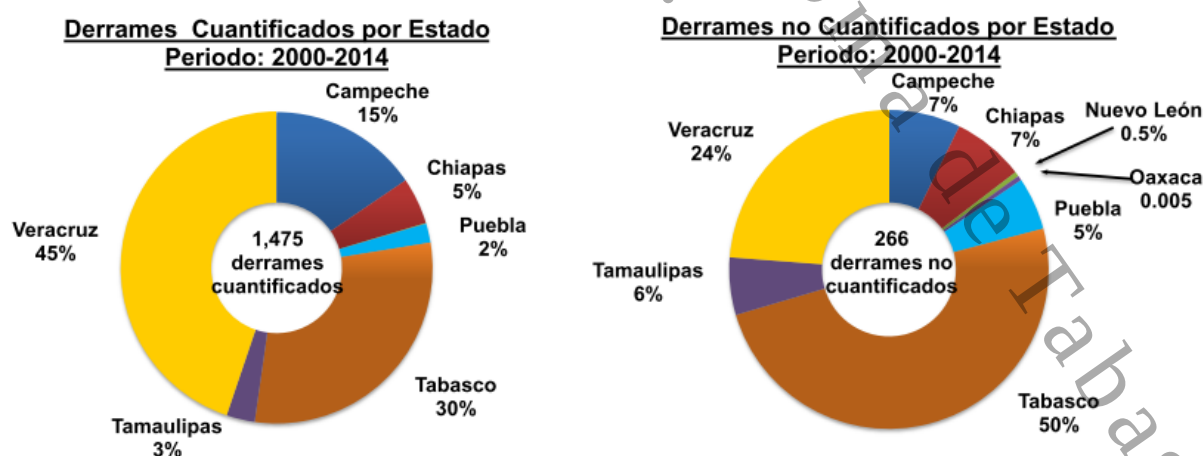


Figura 3. Derrames de petróleo crudo cuantificados y no cuantificados por estado durante el periodo 2000 – 2014 Fuente: Comisión Nacional de Hidrocarburos, Reporte de Derrames de Petróleo Crudo al Primer Semestre de 2014, México, 2014.

^ambls: millones de barriles

^bmbd: millones de barriles diarios

constituida por Cantarell y Ku-Maloob-Zaap produjeron un total de 1,082 Mbd, por último, la Región Sur integrada por los activos Cinco Presidentes, Bellota-Jujo, Macuspana-Muspac y Samaria-Luna lograron una producción total de 344 mbd, de los que en el año 2016 el estado de Tabasco figuró con una producción de 291 mbd en tierra.

PROFEPA, (2016) recibió 1,961 emergencias ambientales durante el año 2016, en las que 1,822 fueron provocadas por derrames de hidrocarburos, asimismo PEMEX, (2017) menciona que al cierre del año 2015, el inventario de sitios contaminados se elevó a 1,162 hectáreas (ha) y durante el año 2016 se añadieron 197 ha más de las cuales sólo 75.2 ha fueron remediadas, resultando un total de 1,283.8 ha contaminadas, presentándose un incremento del 10.5% en sólo un año, atribuyendo el motivo de los derrames principalmente a los actos vandálicos y al deterioro de los ductos. Por otra parte, PEMEX, (2016b) en su Informe de Sustentabilidad menciona que a lo largo del año 2016 se presentaron 192 eventos de fugas y derrames, sin embargo, el volumen derramado fue mayor en 6,956 barriles en comparación del año 2015, siendo la primordial causa, el aumento de tomas clandestinas identificadas (Figura 4).

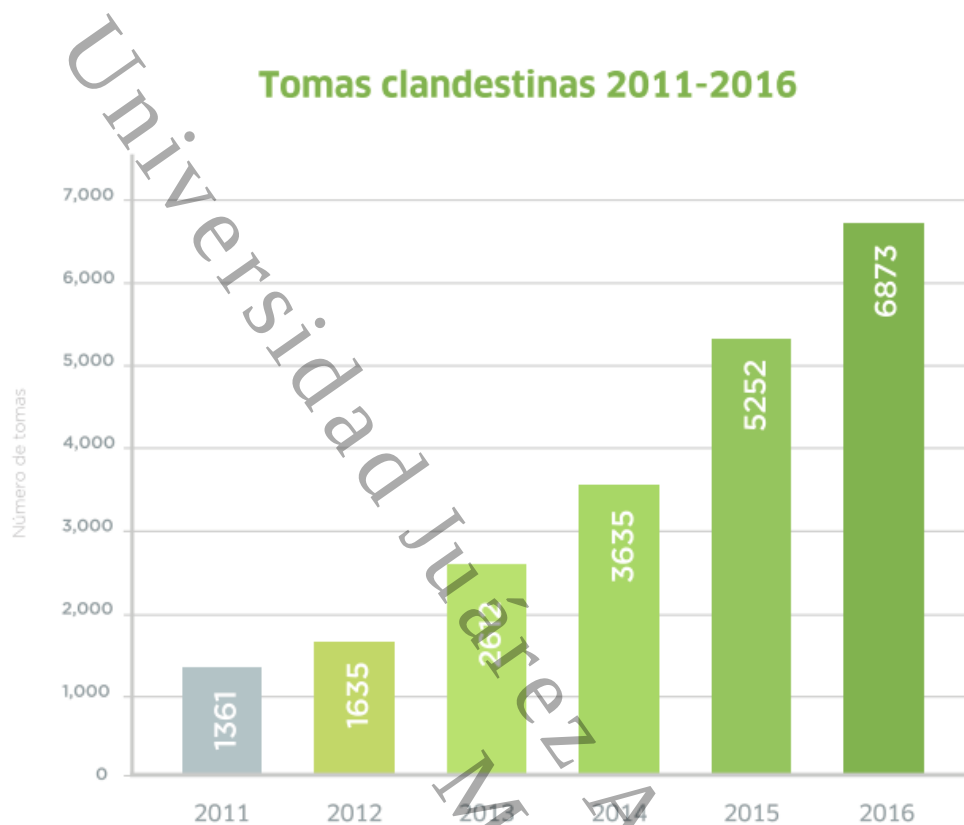


Figura 4. Tomas clandestinas identificadas en el periodo 2011-2016.

Fuente: PEMEX, Informe de Sustentabilidad 2016, Capítulo 4. Indicadores de Desempeño Ambiental, México, 2016.

Aún más recientemente, PEMEX, (2018) reportó una superficie de 2,041 ha de superficies contaminadas, equivalente a un 59% mayor a lo contabilizado en 2016. Al cierre de 2017, se sumaron 277 eventos de fugas y derrames en los ductos de Pemex, siendo asociados principalmente a eventos de corrosión y actos vandálicos como las tomas clandestinas. Sin embargo, el informe de sustentabilidad de 2017 publicado por PEMEX (2018b), difiere de su informe anual del mismo año (2017), ya que en este únicamente reportó 223 eventos, y sólo un 16.1% de aumento en fugas y derrames con respecto al 2016.

2.5. Tecnologías de biorremediación

Las tecnologías de remediación biológica o biorremediación hacen referencia a la variedad de sistemas que utilizan los organismos vivos como las bacterias, hongos, plantas, etc., para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos menos tóxicos. Esto depende principalmente de las actividades catabólicas de los organismos y consecuentemente de la capacidad que tienen para utilizar los contaminantes como fuente de carbono y de energía, lo que también se puede referir a la mineralización completa de contaminantes orgánicos a dióxido de carbono, agua, compuestos inorgánicos o ya sea a compuestos orgánicos más simples que no sean dañinos para el ambiente (Speight y Arjoon, 2012; Volke y Velasco, 2002). En la Tabla 2 se presentan los factores necesarios para que se pueda llevar a cabo de manera eficiente en los sistemas de biorremediación microbiana (Speight y Arjoon, 2012).

Tabla 2. Factores esenciales para la biorremediación microbiana.

Factor	Condición óptima
Población microbiana	Organismos capaces de biodegradar los contaminantes
Oxígeno	Lo suficiente para favorecer la biodegradación aeróbica (alrededor de 2% de oxígeno en fase de gas o 0.4 mg/litro en el suelo)
Agua	La humedad del suelo debe mantenerse alrededor del 50-70% de su capacidad de retención de agua
Nutrientes	Nitrógeno, fósforo, y otros nutrientes para soportar un buen crecimiento microbiano
Temperatura	Apropiada para el crecimiento microbiano 0-40 °C
pH	6.5 a 7.5

Trejo y Quintero, (2000) mencionan que son diversas las técnicas desarrolladas para llevar a cabo la biorremediación de sitios contaminados con compuestos orgánicos tóxicos (Tabla 3). Generalmente, la remediación puede ser llevada a cabo *in* o *ex situ*, en donde la mayoría de las veces es realizada *in situ* cuando el contaminante se encuentra muy saturado en la zona, caso contrario cuando es superficial se puede llevar a cabo *ex situ*; así también, para estos procesos se debe tener en cuenta la población microbiana, el tipo de contaminante, la estructura química y geológica del sitio para así poder determinar la manera de remediar el sitio en cuestión.

Tabla 3. Tecnologías de tratamiento de biorremediación

Bioaumentación	Es la adición de cultivos bacterianos al medio contaminado; frecuentemente usado en bioreactores y sistemas <i>ex situ</i> .
Bioestimulación	Estimulación de la población microbiana endógena en suelo o aguas subterráneas; puede ser <i>in situ</i> o <i>ex situ</i> .
Bioreactores	Es llevar a cabo la biodegradación en contenedores o reactores; ya sea para líquidos o lodos.
Bioventeo	Método para tratar suelos contaminados inyectando oxígeno para estimular el crecimiento y actividad microbiana.
Composteo	Proceso termofílico aerobio en el que el material contaminado se mezcla con acondicionadores orgánicos, en forma de pilas, pilas aireadas o reactores.
Bio-labranza	Tratamiento en fase sólida para suelos contaminados, puede ser <i>in situ</i> o <i>ex situ</i> en celdas.

2.6. Co-compostaje de suelo contaminado

La eficiencia de la biodegradación de compuestos orgánicos tóxicos se ve influenciada por diferentes factores (oxígeno, nutrientes, relación C/N, etc.) que son importantes para el crecimiento microbiano, proporcionándoles condiciones favorables

para mejorar la degradación de los contaminantes presentes en el suelo. La adición de acondicionadores orgánicos y la aplicación de composta, es una manera competente de modificar las limitantes antes mencionadas y así mejorar el proceso de la remediación de suelos contaminados; el proceso de compostaje, o el añadir compost de algún acondicionador orgánico, es un proceso bioquímico en el que se ve envuelta la mineralización de compuestos orgánicos, en formas humificadas y en compuestos inorgánicos (Potter, 1993; Ren *et al.* 2017). Una de las tecnologías de composteo más utilizadas para tratar grandes áreas de suelo contaminado, principalmente por hidrocarburos, se lleva a cabo en condiciones aerobias y se le puede llamar biopilas, bioceldas, pilas de composteo o sistemas de co-composteo (Iturbe *et al.* 2002). Las biopilas son una forma de compostaje en el cual se forman pilas con suelo contaminado y agentes orgánicos en el que el sistema puede ser abierto o cerrado y se coloca en áreas de tratamiento que puede incluir sistemas para colectar lixiviados y alguna forma de aireación (Volke y Sepúlveda, 2003).

2.7. Biodisponibilidad de contaminantes en el suelo

Uno de los factores más importantes para la degradación de contaminantes en el suelo es su biodisponibilidad en el medio para ser degradados por los microorganismos, este proceso se ve influenciado por la tasa de absorción de los contaminantes, la transferencia de masa, desorción, difusión y disolución. La estructura molecular del contaminante y su hidrofobicidad también afectan la biodisponibilidad de éste, ya que estos factores pueden volver más selectivo su consumo por los microorganismos (Singh y Ward, 2004). La biodisponibilidad se puede definir como las interacciones físicas, químicas y biológicas que determinan la exposición de los microorganismos a los compuestos en el suelo (Ehlers y Luthy, 2003). Riveroll-Larios (2015) señala que entre más sea el tiempo de residencia de los hidrocarburos en el suelo, menos biodisponibles son, lo que provoca que las diferentes poblaciones microbianas nativas del suelo cambien y que sólo aquellas que son capaces de subsistir persistan, a este proceso de envejecimiento se le llama intemperización. Por lo tanto se puede decir que la biodisponibilidad de los contaminantes decrece con el tiempo debido a la sorción irreversible o secuestro en el suelo (Luthy *et al.*, 1997).

2.8. Microorganismos degradadores

La presencia de microorganismos en el suelo es un factor clave para la degradación de compuestos orgánicos como los hidrocarburos, por sus capacidades metabólicas para degradar, transformar o acumular compuestos tóxicos, así como la cantidad en la que se encuentran son importantes en ecosistemas contaminados (Díaz-Ramírez, 2000). Gracias a los recientes avances tecnológicos se ha facilitado la identificación de bacterias y hongos que se involucran en la biodegradación de compuestos orgánicos contaminantes, y así aplicar su potencial de biodegradación en biotecnologías para la remediación de sitios contaminados (Philp y Atlas, 2017). La existencia de microorganismos degradadores no se restringe solo a unos cuantos tipos de géneros, por el contrario existe una gran diversidad de ellos. En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos de microorganismos aislados de sitios contaminados con hidrocarburos.

Ramadass *et al.* (2018) probaron dos cepas de *Pseudomonas*, (*P. putida* Y *P. aeruginosa*) para la remoción de HTP de un suelo intemperizado con altas concentraciones (39,000 mg TPH kg⁻¹ de suelo), en diferentes tratamientos de biorremediación mediante bioestimulación y bioaugmentación, encontrando que estas dos cepas tienen un gran potencial para remediar suelos intemperizados contaminados ya que mostraron una alta remoción en los tratamientos adicionados sólo con estas especies. Por otra parte, Xu *et al.* (2019) probaron el uso del sobrenadante proveniente de residuos de comida fermentada para la bioestimulación de suelos contaminados con petróleo (C₂₉ – C₂₄), resultando en una alta remoción por parte de las bacterias indígenas, motivo por el cual identificaron los géneros que predominaron en todo el proceso, siendo estos *Acinetobacter* y *Aquabacterium*. Sin embargo, no solo las bacterias son capaces de degradar compuestos derivados del petróleo, diversos géneros de hongos han sido reportados como degradadores de hidrocarburos, tales como *Aspergillus spp*, *Paecilomyces*, *Mucor* y *Aspergillus fumigatus* entre otros (Atlas y Bartha 1992; Zhang *et al.* 2016). De manera que, la participación de los microorganismos en procesos de biorremediación de suelos contaminados es de vital importancia ya que estos poseen enzimas capaces de degradar y usar diferentes hidrocarburos como fuente de carbono y de energía, en

donde factores como los nutrientes, la diversidad microbiana, la biodisponibilidad y las condiciones físicas del medio juegan un rol clave para su desarrollo durante el proceso de descontaminación (Al-Hawash *et al.* 2018). Los hidrocarburos son compuestos orgánicos naturales, por lo que es común que existan microorganismos capaces de utilizar estos compuestos como fuente de energía y que se extienda ampliamente entre diversas poblaciones microbianas (Tabla 4) (Atlas, 1981).

Tabla 4. Géneros reportados degradadores de hidrocarburos

Género	
Bacterias	Hongos y levaduras
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Eupenicillium hirayamae</i>
<i>Bacillus cibi</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Alternaria alternata</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>
<i>Polaromonas vacuolata</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	<i>Fusarium solani</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Candida maltosa</i>
<i>Marinococcus</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Nocardia</i>	
<i>Rhodococcus</i>	
<i>Streptomyces</i> sp.	
<i>Vibrio</i> sp.	

Das, (2014); Ivshina *et al.*, (2017); Vipin *et al.*, (2017)

3. ANTECEDENTES

El co-compostaje es considerado como una estrategia competitiva en términos de costos y del impacto que causa este proceso en el suelo contaminado, también se ha destacado por su eficiencia en la biodegradación de compuestos orgánicos en el suelo tales como: benceno, tolueno, explosivos [2,4,6-trini-trotolueno (TNT)], pesticidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), entre otros (Semple *et al.* 2001). Actualmente se han realizado investigaciones, en las que se evalúa el proceso de co-compostaje y el uso de acondicionadores orgánicos como estrategia para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos mediante la determinación de parámetros fisicoquímicos y biológicos (Orji *et al.* 2013; Udeh *et al.* 2013)

Udeh *et al.* (2013) realizaron un estudio en el cual evaluaron el efecto de la adición de lirio acuático a un suelo contaminado con petróleo crudo a través del compostaje, donde demostraron que la adición de esta planta fue un factor clave en la remediación de suelos altamente contaminados, debido a que la concentración de hidrocarburos decreció con respecto al tiempo con una concentración inicial de 4,200 ppm hasta 1,400 ppm al final de la experimentación, concluyendo así que se mejoró la degradación de los contaminantes de manera significativa. De igual manera Orji *et al.* (2013) realizaron un estudio en el que evaluaron parámetros biológicos (microorganismos degradadores y heterotróficos) y fisicoquímicos (contenido de HTP, conductividad eléctrica y pH) durante la biorremediación de un suelo de manglar contaminado con petróleo, adicionado con lirio acuático como acondicionador orgánico. Los resultados de este estudio demostraron que la adición del lirio fue positiva para la presencia de microorganismos heterotróficos, así como de los degradadores de hidrocarburos, ya que aumentaron progresivamente conforme al tiempo. Paralelamente, los autores observaron un decaimiento gradual en el contenido de HTP en el suelo, partiendo de 12,517 ppm hasta 3,083 ppm en 70 días de estudio, concluyendo que el uso del lirio acuático es efectivo en bioprocesos de remediación y para mejorar la actividad biológica en suelos contaminados.

En otro estudio realizado por González-Díaz, (2014) se evaluó la actividad biológica y el potencial de biodegradación de dos suelos contaminados artificialmente provenientes de una zona tropical, uno intemperizado y otro recientemente contaminado, demostrando que la adición de nutrientes al suelo mejoró la actividad biológica y la capacidad para degradar hidrocarburos. Así mismo, se registraron valores elevados de biomasa microbiana ($> 2.5 \text{ mg de biomasa g}^{-1}$) en los suelos estimulados. Por otra parte, se demostró que el uso de variables biológicas como la respiración, la biomasa microbiana, la actividad de la enzima lipasa y la cuantificación de microorganismos heterotróficos y degradadores son indicadores adecuados para el análisis y monitoreo de descontaminación de suelos tropicales con hidrocarburos. A la vez, la correlación de las variables microbiológicas y fisicoquímicas permitieron analizar la respuesta por parte de los microorganismos a lo largo del proceso mientras ocurría la biodegradación de los contaminantes.

Recientemente, Onwosi *et al.* (2017) probó el uso de diferentes acondicionadores orgánicos (cáscara de arroz, aserrín y retazos de madera) para la remediación de suelo contaminado con diésel mediante el compostaje, lo que resultó en una alta remoción de los HTP del suelo, con una rápida degradación de hasta 98.2% para la mezcla de todos los sustratos utilizados, concluyendo que la adición de nutrientes incrementó la cantidad de microorganismos presentes y por lo tanto la actividad microbiana, lo que llevó a un proceso eficiente de degradación de los contaminantes, ya que obtuvieron una reducción de 250 mg Kg^{-1} hasta 5 mg Kg^{-1} de hidrocarburos totales del petróleo.

4. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de la industria petrolera en México, ha generado una problemática de contaminación que se debe a los diversos derrames de hidrocarburos que se presentan, específicamente en Tabasco la Comisión Nacional de Hidrocarburos (2014), cuantificó hasta el 2014, un total de 24.78 mbls de petróleo crudo derramado en tierra, por lo que el alto número de reportes de derrames lo ubican como uno de los estados de la república mexicana más impactados por este fenómeno, constituyendo una problemática ambiental regional cada vez más difícil de superar, considerando los elevados costos de los insumos comerciales que se utilizan en las diversas tecnologías aplicadas para la remediación de suelos contaminados. En general, en cuanto a los sitios contaminados, se presentan dos condiciones diferentes, una donde los suelos han sido sujetos a los factores bióticos y abióticos por largo tiempo, dando lugar a suelos contaminados intemperizados ó “añejados”, donde los contaminantes residuales persisten, siendo de gran preocupación ya que la biodisponibilidad de los mismos es menor debido al posible secuestro de estos componentes dentro de la matriz sólida, limitando así la actividad de los microorganismos nativos (Gutiérrez-Rojas, 2000). Otra situación es la que se presenta en los suelos recientemente contaminados (<1 año), donde el grado de transformación de las fracciones más lábiles es reducido dejando compuestos degradables disponibles, pero a la vez confiriéndoles una mayor toxicidad y riesgo de exposición.

Una situación semejante ocurre con la presencia del lirio acuático, puesto que es catalogado a nivel mundial como una maleza acuática invasiva que se ha presentado en más de 80 países en los cinco continentes en los últimos 100 años (Feng *et al.* 2017). Según la UNEP *et al.* (2013) en México más de 40,000 hectáreas están infestadas, principalmente cuerpos de agua; es por esto que Tabasco, al ser un estado que destaca en éste ámbito se encuentra infestado por esta planta. Como opciones ante esta problemática, se ha optado por alternativas de remediación biológicas basadas en el aprovechamiento de las capacidades metabólicas de los microorganismos y/o plantas para la remoción o transformación de los compuestos contaminantes. En particular el co-compostaje es un proceso donde se adicionan

materiales orgánicos que actúan como mejoradores de las condiciones de oxidación biológica permitiendo a los microorganismos transformar o incluso mineralizar la materia orgánica y los contaminantes orgánicos simultáneamente. Esto favorece el proceso de biorremediación y mejora las características del suelo e incrementa el aporte de nutrientes necesarios para la actividad biológica y posterior uso del suelo (Mathur *et al.* 2018). Sin embargo, en la mayoría de estos procesos, entre las limitantes se encuentran el costo y la disponibilidad de los acondicionadores orgánicos a utilizar, es por esto que el uso de plantas como el lirio acuático, tiene interés particular, debido a su presencia extendida en cuerpos de agua, con efectos principalmente adversos para los sitios donde se presenta. Su uso como agente sorbente se ha reportado; sin embargo, su aplicación para el tratamiento de suelos recién contaminados e intemperizados de zonas tropicales, es limitada.

Considerando los diferentes usos que se la han dado al lirio acuático como fuente de nutrientes y aporte de biomasa, en conjunto con su eficiencia en diferentes procesos biotecnológicos, en el presente trabajo, fue utilizado como un acondicionador orgánico en el proceso de co-compostaje de suelos tropicales, con la finalidad de comparar el efecto de la adición del lirio acuático sobre la biodegradación de los contaminantes y la actividad biológica durante el proceso. La actividad microbiana se monitoreó mediante la determinación de variables biológicas como la actividad de la enzima lipasa, el perfil respirométrico, la biomasa microbiana y el número de microorganismos degradadores. A través de esta estrategia se pretende coadyuvar a solucionar la problemática de la presencia de suelos contaminados con hidrocarburos en el estado de Tabasco y a la vez contribuir al aprovechamiento del lirio presente en exceso en los cuerpos de agua, proporcionando así, una alternativa menos costosa y sustentable para la biorremediación de suelos contaminados.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

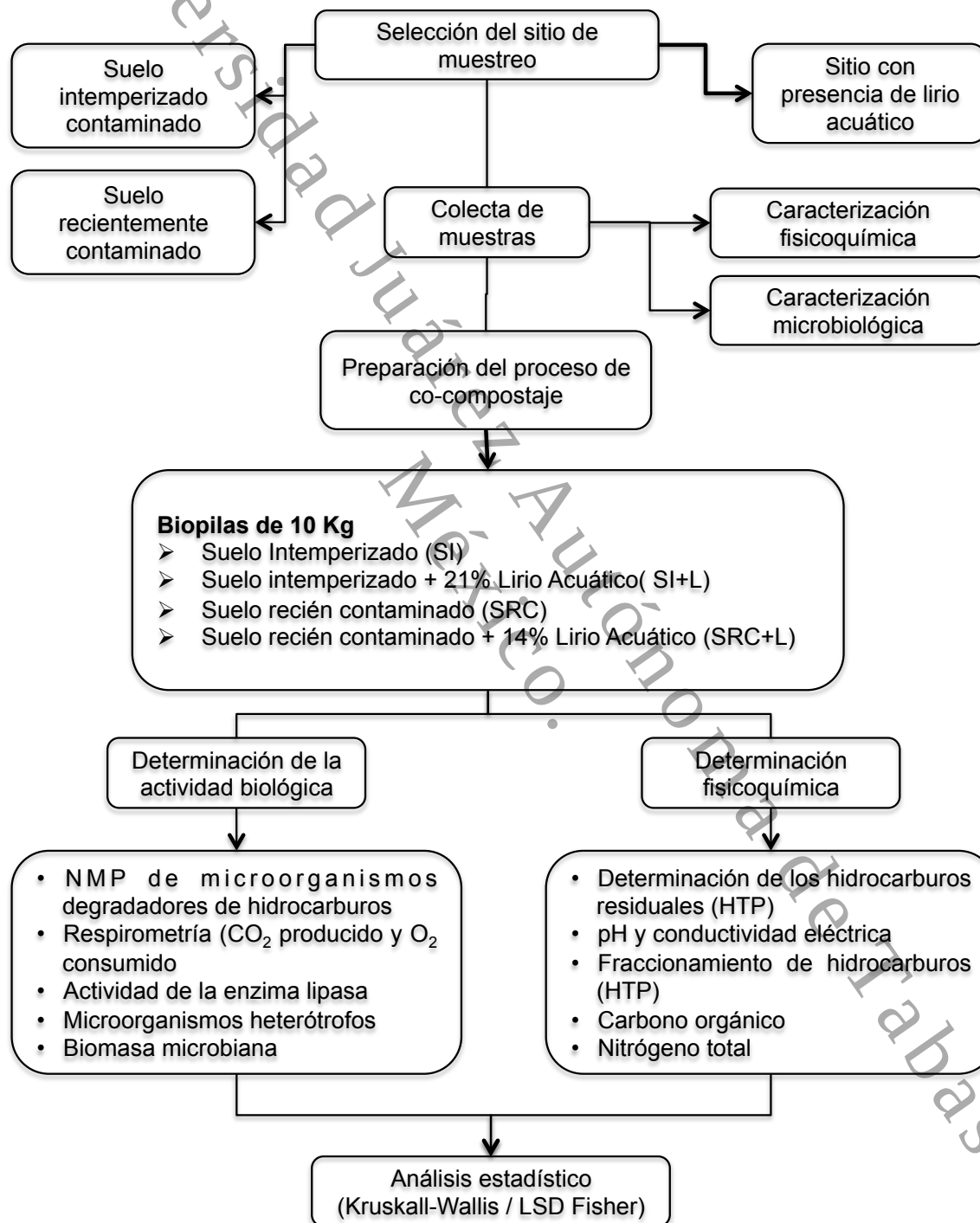
Comparar el efecto del lirio acuático sobre la biodegradación de hidrocarburos y la actividad biológica durante el proceso de co-compostaje, en un suelo intemperizado y recién contaminado.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las características fisicoquímicas y microbiológicas iniciales (día 0) y finales (día 50) de los suelos con diferente historia de contaminación en 50 días.
- Cuantificar la biodegradación de los hidrocarburos durante el proceso de co-compostaje utilizando lirio acuático como acondicionador orgánico, considerando una relación C/N de 25.
- Evaluar la actividad biológica mediante la respiración microbiana, la actividad lipasa y la biomasa microbiana, como indicadores de la biodegradación de hidrocarburos en el suelo durante el co-compostaje.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Estrategia experimental



6.2. Ubicación del sitio de muestreo

En la Figura 5 se muestra el sitio de muestreo del suelo recientemente contaminado (SRC) (Figura 6), se recolectó en un punto afectado por la presencia de hidrocarburos dentro de un manglar altamente contaminado (<tres meses) derivado de actividades petroleras en las cercanías del activo cinco presidentes (coordenadas 18°11'44.90" N, 94°01'25.60" O), situado a las orillas del río Chicozapote (tributario del Río Tonalá) y la laguna El Yucateco, en el municipio de Huimanguillo, Tabasco. El suelo intemperizado (SI) (Figura 6), ubicado en un área históricamente impactada por derrames de hidrocarburos, con más de 10 años de afectación (coordenadas 18°05'17.54" N, 94°03'24.04" O). El sitio se encuentra en las cercanías del Complejo Procesador de Gas La Venta, en el municipio de Huimanguillo, Tabasco y se trata de un suelo inundable en la época de lluvias. Por otra parte, el lirio acuático se recolectó en un dren con abundante presencia de la planta, localizado en la Ranchería Benito Juárez, Jalpa de Méndez, Tabasco (coordenadas 18°00'01.70" N, 93°43'15.76" O). Se trata de un sitio con actividad ganadera, que al momento del muestreo se encontraba con flujo continuo de agua.



Figura 5. Ubicación del sitio de muestreo del suelo intemperizado contaminado (SI), suelo recientemente contaminado (SRC) localizados en Villa la Venta, Huimanguillo, Tabasco.



Figura 6. Sitio de muestreo del suelo recientemente contaminado (< 3 meses A) Zona de manglar en las cercanías de la carretera, impactada por el derrame de petróleo, B) Zona de manglar contaminada por petróleo, a las orillas del río Chicozapote.) y del intemperizado contaminado (>10 años), C) Zona de manglar inundada impactada. y D) Capa superficial del suelo muestreado (0-30 cm), con un capa de asfalto de gran espesor.

6.3. Área de colecta de suelo y lirio acuático

El plan de muestreo consistió en un muestreo dirigido basado en las observaciones del derrame (patrón de dispersión de hidrocarburos, manchas características, entre otros). Se seleccionaron los puntos de muestreo en los cuales se recolectaron las muestras a una profundidad de 0 a 30 cm. El suelo fue transportado (a temperatura ambiente) al invernadero de la División Académica de Ciencias Biológicas de la UJAT, donde se tamizó (malla 4) para su homogenización y mezclado.

Para la recolecta del lirio acuático que se empleó como acondicionador orgánico del suelo, se identificaron sitios donde se presentaba acumulamiento de la especie con el menor impacto de actividades humanas. El lirio se retiró manualmente y se picó con una cosechadora-picadora (John-Deere). El material se trasladó y se secó al sol,

hasta una humedad alrededor del 30% (Hernández-Pérez, 2015). Posteriormente, se molió (para obtener un granulado fino (<2 mm)) y se mantuvo el material húmedo para su uso en el co-composteo con los suelos contaminados.

6.4. Co-composteo de suelo contaminado con lirio

Se realizó un experimento con dos tipos de suelo contaminado (suelo recién contaminado y suelo intemperizado) y la adición de lirio acuático. La proporción de lirio que se adicionó se definió en función del contenido de nitrógeno y carbono del suelo y del lirio; para alcanzar una relación C/N de 25. El ensayo se realizó a escala piloto con unidades experimentales (pilas de 10 Kg) divididas en los siguientes tratamientos: a) suelo recién contaminado (control, SRC), b) suelo intemperizado (control, SI), c) suelo recién contaminado más lirio acuático (SRC+L) y d) suelo intemperizado más lirio acuático (SI+L). Las unidades experimentales se mantuvieron tapadas en condiciones de invernadero (26-38°C) con adición periódica de agua (tres veces por semana), para mantener la humedad a un 65% de la capacidad de campo (Tabla 5). El experimento tuvo una duración de 50 días, se tomaron muestras cada cinco días, evaluándose la actividad biológica y parámetros fisicoquímicos. La actividad biológica se determinó a través de las variables de respuesta de biomasa microbiana, cuantificación de microorganismos degradadores de alcanos (hexadecano), microorganismos heterótrofos del suelo, perfil respirométrico y actividad de la enzima lipasa.

Adicionalmente, se evaluaron propiedades fisicoquímicas como: conductividad eléctrica, pH, contenido de HTP, composición de los hidrocarburos residuales, carbono orgánico y nitrógeno total.

Tabla 5. Co-compostaje de suelos contaminados con hidrocarburos, relación C/N y proporciones de suelo-lirio en las diferentes unidades experimentales.

Tratamiento	Relación C/N	Pilas de 10 Kg		CC
		LA (Kg)	Suelo (Kg)	
SI (control)	-	-	10	65%
SRC (control)	-	-	10	
SI + LA	25	2.1	7.9	
SRC + LA	25	1.4	8.6	

SI: Suelo intemperizado, SRC: Suelo recién contaminado, LA: Lirio acuático, CC: Capacidad de campo.

Se tomaron muestras iniciales y finales para la cuantificación de los HTP y determinación de la composición de los hidrocarburos residuales (suelo intemperizado) por cromatografía en columnas de permeación en gel; así como contenido de nitrógeno total y de carbono orgánico.

6.5. Ajuste de la relación C/N para las mezclas de suelo – lirio acuático

El ajuste de la relación carbono/nitrógeno (C/N) se realizó mediante la determinación del carbono total de las muestras de suelo y lirio, basado en la NMX-109-SCFI-2000, la cual se describe más adelante. De igual manera, se determinó el nitrógeno total de las muestras (SRC, SI y Lirio acuático) a través de la metodología descrita en la NOM-021-SEMARNAT-2000 presentada en la siguiente sección. Una vez obtenido el contenido de nitrógeno y carbono total de los materiales a utilizar, se realizó la conversión de contenido fraccional (%) a kilogramos y posteriormente el ajuste, tomando en cuenta la cantidad de nitrógeno y carbono presentes por kilogramo de suelo y de lirio (Tabla 6).

Tabla 6. Carbono orgánico y nitrógeno total (%) de cada material orgánico para realizar las mezclas de suelo contaminado y lirio acuático con una C/N ~25

Biopilas de 10 Kg		
Materiales orgánicos	%N	%COT
Lirio Acuático	1.65	33.94
Suelo intemperizado	0.19	6.81
Suelo recién contaminado	0.09	3.48

6.6. Métodos analíticos

6.6.1. Parámetros fisicoquímicos del suelo y el lirio

6.6.1.1. Nitrógeno total

Se determinó nitrógeno total de las mezclas mediante el método AS-25 descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Brevemente, este procedimiento consistió en dos pasos, a) digestión de la muestra para convertir el nitrógeno a amonio y b) determinación del amonio formado en la digestión. Se utilizaron 0.5 g de muestra de suelo la cual se calentó con ácido sulfúrico concentrado y una mezcla de catalizadores que promueven la oxidación de la materia orgánica,

seguidamente al observar un color verde-turquesa se procedió a destilar la muestra en un aparato de digestión semi-micro Kjeldahl y finalmente se determinó el nitrógeno total titulando con ácido sulfúrico 0.05 N.

6.6.1.2. Carbono orgánico

Se determinó ceniza, materia orgánica y carbono orgánico de acuerdo a la NMX-109-SCFI-200. Donde se pesó un gramo de muestra y se colocó en un crisol de porcelana llevado a peso constante. Se calcinó a 550°C por dos h y transcurrido el tiempo, se enfrió en el desecador, se pesó y se realizaron los cálculos a partir de las siguientes fórmulas:

$$\%Cenizas = \frac{(PCC - PC)}{muestra (g)} \times 100$$

Donde:

PCC: peso del crisol con cenizas

PC: peso del crisol

100: para referirlo a porcentaje

Determinación de materia orgánica (MO)

$$\%MO = (100)(\%Cenizas)$$

Donde:

%MO: es la materia orgánica expresada en porcentaje.

%Cenizas: es la ceniza calculada en la determinación anterior.

Determinación de carbono orgánico

$$\%CO = \frac{\%MO}{1.724}$$

Donde:

%CO = es el porcentaje de carbono orgánico.

%MO = es la materia orgánica calculada a partir del % de cenizas y 1.724 es el factor Van Benmelen.

6.6.1.3. Potencial de hidrógeno (pH)

La medición del pH de las mezclas y los controles, se realizó a través del método descrito por Santos-Zúñiga, 2017. Se pesaron muestras de 10 g de cada mezcla y se colocaron en vasos de precipitados de 50 ml. Se adicionaron 20 ml de agua destilada a cada uno y se dejó reposar durante 24 h para posteriormente extraer el sobrenadante con una bomba de vacío en un embudo de porcelana con papel filtro Whatman 42. Seguidamente se procedió a realizar las lecturas utilizando un potenciómetro (Thermo Electron Corporation modelo Versa B40) previamente calibrado.

6.6.1.4. Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica (dS/m) se midió en el líquido sobrenadante utilizado en la medición del pH (Carter y Gregorich, 2008) y se utilizó un medidor multiparamétrico ThermoScientific Versa B40 previamente calibrado (KCl 1.412 dS/m).

Cabe mencionar que, sólo los análisis de la composición del suelo (Tabla 7), los cuales se mostrarán en la sección de resultados, fueron realizados por el laboratorio de análisis de suelo Fertilab basándose en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000.

6.6.2. Extracción de HTP

La extracción de hidrocarburos se realizó usando el método de Extracción Soxhlet (EPA 3540). En donde se utilizaron 10 g de la mezcla y los controles (base seca) y sulfato de sodio anhidro 1:1 que fueron colocados en cartuchos de celulosa con algodón. La extracción se realizó con una mezcla (160 ml) Acetona: Hexano (1:1) en matraces de 250 ml, y se mantuvo a reflujo durante 8 h en el extractor Soxhlet. Posteriormente se utilizó un Rota-Vapor (Buchi R-210) para la eliminación y recuperación del solvente. Los hidrocarburos residuales (mg kg^{-1}) fueron cuantificados gravimétricamente.

6.6.3. Fraccionamiento de HTP

El método se basa en la separación de los hidrocarburos mediante cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria sílica gel (malla 60-200) y solventes orgánicos como agentes de elución (Wang *et al.* 1994). Para el análisis se emplearon columnas de vidrio con llave de paso así como viales previamente pesados; la sílica

gel se activó secándose en una estufa a 105°C durante 24 h. La separación de las diferentes fracciones de hidrocarburos está basada en su solubilidad en cada uno de los solventes, realizándose en el siguiente orden utilizando viales para la colección de cada fracción:

- a. **Hexano:** se coloca la muestra en la parte superior de la columna, se colectan las fracciones (eluciones de 15 ml) hasta que la mancha amarilla alcance la parte inferior de la columna.
- b. **Tolueno-Hexano:** una elución de 15 ml (1:1)
- c. **Tolueno:** se adicionan volúmenes de 15 ml hasta que la mancha amarilla abandone completamente la columna.
- d. **Tolueno-Metanol:** se realiza una elución con 15 ml (1:1).
- e. **Acetona-Metanol:** una elución con 15ml (1:1).

La determinación se realizó gravimétricamente. La primera fracción con el solvente *hexano* corresponde a los hidrocarburos alifáticos. Las fracciones con la mezcla *hexano-tolueno* y *tolueno*, se consideran como hidrocarburos aromáticos. Las dos últimas fracciones con las mezclas de *tolueno-metanol* y *acetona-metanol* contienen a los hidrocarburos polares. Posteriormente los viales se evaporaron bajo una campana de extracción y se colocaron en un desecador por 24 h para finalmente pesarlos y realizar el cálculo de cada fracción (Díaz-Ramírez, 2000).

6.7. Análisis microbiológicos

6.7.1. 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), utilizando 3 g (peso seco) de muestra en 27 ml de solución salina, los cuales se homogeneizaron en el vórtex. Se utilizó Agar Soya Trypticaseína (AST, DIBICO) como medio de cultivo para la cuantificación de las bacterias y Agar Papa Dextrosa para los hongos (APD, DIBICO). Las placas se incubaron a una temperatura de 32°C para bacterias y 28°C para hongos, realizando después los conteos de unidades formadoras de colonias (UFC g⁻¹) a las 24 y 48 h. Las UFC se calcularon mediante la siguiente fórmula (Madigan *et al.* 2008).

$$UFC * ml : \frac{\text{num. de colonias}}{0.1 \text{ ml}} \times (\text{factor de dilución})$$

6.7.2. Cuantificación de microorganismos degradadores de alcanos

Para la cuantificación de microorganismos degradadores de alcanos se utilizó el método de Número más Probable (NMP g⁻¹ suelo seco) con modificaciones, descrito por Wrenn y Venosa, (1996). Éste se basa en la determinación de microorganismos en condiciones específicas mediante el uso de diferentes sustratos (Frieder *et al.* 1994). Se realizó descrito como sigue: Se emplearon diluciones seriadas (de 10⁻¹ hasta 10⁻⁹) que contenían 3 g de muestra (base seca) en 27 ml de medio mineral, posteriormente se transfirieron alícuotas (20 µl) de cada dilución (se realizaron cuatro réplicas por dilución), a pocillos de microplacas para su incubación en 120 µl de medio mineral con 5 µl de hexadecano como única fuente de carbono. Las microplacas se incubaron a 35°C por una semana. Después del tiempo de incubación, se adicionó violeta de iodonitrotetrazolio (INT, 3 g/l) a cada pocillo y la placa se incubó 24 h más. Cabe mencionar que los constantes cambios en la actividad de los microorganismos en sus variados hábitats típicamente se puede ver reflejado en su actividad respiratoria, de modo que el uso de sales como el INT se utilizan comúnmente para determinar la actividad respiratoria, ya que está relacionada con la cadena de transporte de electrones bajo condiciones aerobias, debido a que estas son reducidas mayormente por enzimas deshidrogenasas (Vallejo *et al.* 2010), tal reducción causa un precipitado de color rojo intenso llamado formazán. De esta manera, se utilizó

medio mineral como control en presencia del hexadecano y se registraron los resultados positivos (rojo - formazán) y se realizó el cálculo del NMP de los microorganismos degradadores, utilizando el software MPN-calculator (EPA V 4.04).

6.8. Análisis respirométrico del suelo contaminado

Se cuantificó el consumo de O_2 y la producción de CO_2 para cada una de los tratamientos, utilizando un sistema semi-automatizado de respirometría (Sistema SS4, Sable System International Co.). Se utilizaron frascos de vidrio con tapas de rosca (500 ml) como unidades experimentales con 20 g (base seca) de la mezcla de los tratamientos adicionados con lirio y 30 g (base seca) para los controles suelo recién contaminado y suelo intemperizado. Posteriormente, se colocaron en las botellas y se cerraron herméticamente. La determinación del consumo de O_2 y el CO_2 producido acumulados durante 24 h, se realizó programando lecturas en ciclos de 8 h. Los datos de la tasa de producción de CO_2 y la tasa de consumo de O_2 , fueron calculados mediante el software ExpeData (SableSystem, Versión 1.9.27) utilizando la cantidad acumulada a las 24 h, estos valores se expresaron como: $mg\ O_2\ kg^{-1}\ d^{-1}$ y $mg\ C-CO_2\ kg^{-1}\ d^{-1}$. Las condiciones de operación del sistema y la calibración de los sensores se realizaron de acuerdo al protocolo previamente estandarizado por Riveroll-Larios *et al.* (2014).

6.9. Determinación de la biomasa microbiana por el método de fumigación extracción.

Se determinó y calculó la biomasa microbiana del suelo por el método propuesto por Vance *et al.* (1987) y modificado por Joergensen y Brookes (2005). Los valores obtenidos se expresaron en μg de biomasa microbiana g^{-1} de suelo. A continuación, se describe el método.

6.9.1. Preparación de las muestras de suelo y suelo-lirio

Se utilizaron alícuotas de 15g b/s de cada tratamiento previamente picados, homogenizados y tamizados ($\varnothing$ 2.38 mm). Se humedecieron y se ajustaron al 40% de su capacidad de campo. Cada muestra se realizó por triplicado, las cuales se colocaron en placas Petri de vidrio.

6.9.2. Proceso de Fumigación-Extracción

Seguidamente, se trataron dos grupos de muestras: fumigadas y no fumigadas (control), las muestras fumigadas se colocaron dentro de un desecador de vidrio que actuó como una cámara que dentro contenía papel húmedo, óxido de calcio/hidróxido de sodio (lima de sodio) y un vaso de precipitado con 15 ml de cloroformo (CHCl_3 , libre de etanol) caliente para la fumigación en oscuridad (24 h) en una atmósfera libre de CO_2 . Transcurridas las 24 h, se liberó el cloroformo abriendo el desecador de las muestras fumigadas bajo campana de extracción por periodos de una hora. Posteriormente, las muestras de suelo-lirio (fumigadas y no fumigadas) se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 250 ml, a los cuales se le adicionaron 60 ml de K_2SO_4 0.5 M en una relación 4:1 v/w (base seca), colocándose en un agitador oscilatorio por 30 min a 200 rpm, a continuación se extrajeron a vacío mediante papel filtro Whatman 42 para la extracción de la biomasa microbiana.

6.9.3. Estimación del C de la biomasa

La determinación se realizó sometiendo un volumen de 8 ml de cada muestra en un matraz (250 ml) a reflujo por 30 minutos en presencia de 5 ml dicromato de potasio 0.4 N y 15 ml de una mezcla de ácidos (H_2SO_4 y H_3PO_4 relación 2:1, V:V). En segunda instancia, se determinó la concentración de C de la biomasa volumétricamente usando sulfato-ferroso amoniacal (40 mM) previamente acidificado como agente titulante y utilizando 1,10-fenentrolina-ferrosa 0.1% como indicador. Los blancos se prepararon de la manera previamente descrita colocando agua en el lugar de la muestra. Se calculó el contenido de C orgánico extraíble de acuerdo a las siguientes ecuaciones propuestas por Joergensen, 1995; Joergensen 1996 y Vance *et al.* 1987.

$$C(\mu g/g \text{ suelo}) = \frac{(HB - S) \times N \times E \times VD \times (VK + SW) \times 100}{CB \times VS \times DM}$$

Donde:

HB: Consumo de la solución de valoración por el blanco con reflujo (ml).

S: Consumo de la solución de valoración por la muestra (ml).

N: Normalidad de la solución de $K_2Cr_2O_7$.

E: 3, refiriéndose a la conversión de Cr (+VI) a Cr (III+).

VD: Volumen añadido de la solución de $K_2Cr_2O_7$ (ml).

VS: Volumen de la muestra (ml).

VK: Volumen del extractante K_2SO_4 (ml).

CB: Consumo de la solución de valoración por el blanco sin reflujo (ml).

SW: Cantidad total de agua en la muestra (ml).

DM: Masa total de la muestra de suelo (g)

Posteriormente, el C de la biomasa microbiana se calculó a partir de los datos obtenidos de la estimación del C orgánico extraíble, mediante la siguiente ecuación:

$$C \text{ de la biomasa} = E_c / k_{EC}$$

En donde:

E_c = Carbono orgánico extraíble del suelo fumigado – Carbono orgánico extraíble en el suelo no fumigado. El valor de k_{EC} es 0.38 y representa la fracción extraíble del C de la biomasa microbiana después de la fumigación.

6.10. Determinación de enzima lipasa

La actividad de la enzima lipasa se determinó utilizando el método propuesto por Margesin (2005). Brevemente, se emplearon 175.8 μ l de p-nitrofenol butirato (pNPB) como sustrato y 0.1 g (base seca) de cada muestra de suelo más lirio acuático (por triplicado). La determinación se realizó mediante incubación a 30 °C por 10 minutos y posteriormente centrifugación (3500 rpm durante 7 minutos) para extraer el sobrenadante y determinar el pNPB liberado. 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 μ g pNP de 5 ml con solución amortiguadora). Los resultados se expresaron en μ g pNP g⁻¹ suelo seco min⁻¹ (Unidades enzima).

6.11. Análisis estadísticos

De acuerdo a las características de homocedasticidad y normalidad de los datos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con los resultados obtenidos, determinando las diferencias entre tratamientos mediante la prueba de comparación múltiple LSD de Fisher y Kruskal-Wallis, utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVI.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización fisicoquímica del suelo

La composición de los suelos estudiados se presenta en la Tabla 7. Las interpretaciones presentadas se basan en la revisión de Hazelton y Murphy (2007). De acuerdo a los resultados, el SI corresponde a un suelo moderadamente alcalino el cual posee una muy alta cantidad de materia orgánica (>3) y un bajo contenido de nitrógeno (0.05 - 0.15).

Tabla 7. Composición de los suelos utilizados para el proceso de co-compostaje, donde SI: suelo intemperizado y SRC: Suelo recién contaminado.

Muestra	MO (%)	CC	Na ⁺	Mg ⁺²	Ca ⁺²	K ⁺	NT-NO ₃	DA g/cm ³	CIC meq/100g	Textura
			mg kg ⁻¹							
SI	6.26	30	2237	1056	3981	219	0.14	1.14	38.9	F-A
SRC	4.20	30	794	297	737	158	0.14	0.99	9.98	F

F: Franco, A: Arcilloso

El contenido de bases intercambiables (Tabla 7) como (Ca⁺², K⁺, Mg⁺² y Na⁺) en SI, son considerablemente altos lo que le proporciona una considerable heterogeneidad al suelo. La capacidad de intercambio catiónico del SI es alta (25 – 40), por lo que puede esperarse que tenga buena resistencia a la lixiviación y a la posible pérdida de nutrientes, lo que resulta benéfico para las plantas.

Por otra parte, ambos suelos (SI y SRC), presentaron un contenido de MO muy alto, lo cual le provee una buena estabilidad y estructura al suelo. Sin embargo, los altos niveles de materia orgánica, pueden incrementar la capacidad de sorción de hidrocarburos en el suelo, decreciendo consecuentemente la movilidad de estos (Luthy *et al.* 1997). El SRC presenta una CIC baja (6 - 12), característico de este tipo de suelo franco, lo que limita la capacidad de crecimiento de las plantas. De acuerdo a Zavala et al. (2005), los suelos de esta zona se encuentran mayormente intemperizados (sujetos a procesos de degradación fisicoquímica y procesos biológicos) y se clasifican como acrisoles y gleysoles, lo cual concuerda con el SI estudiado en el presente trabajo. Además, Ortiz (2007), reporta que los suelos de esta zona pueden variar de arcilloso a arenoso-limoso debido principalmente a su

permanencia casi constante en el agua; lo cual provoca un cambio de textura en los horizontes del suelo.

7.2 Relación carbono – nitrógeno de los tratamientos evaluados

La relación C/N al inicio del compostaje, es uno de los factores más importantes en un proceso para la remediación de suelos. En general, la relación C/N de alrededor de 25-30 es considerada como adecuada para empezar un tratamiento de biorremediación; no obstante, algunos autores han realizado procesos exitosos con valores menores de relación C/N (Guo *et al.* 2012). Así, por ejemplo, Wang *et al.* (2011) reportó que el ajustar la C/N a diferentes relaciones (10:1, 15:1 y 20:1) en el proceso de compostaje, fue benéfico para la remoción potencial de los HTP presentes en el suelo, promoviendo su degradación por los nutrientes añadidos de más fácil asimilación disponibles para los microorganismos. Por lo que en este estudio se decidió ajustar a una C/N de ~25 (Tabla 8).

Tabla 8. Relación carbono/nitrógeno al inicio y al final del proceso de todos los tratamientos evaluados, donde SI: suelo intemperizado, SI+L: suelo intemperizado adicionado con lirio, SRC: suelo recién contaminado, SRC+L: suelo recién contaminado adicionado con lirio. Datos correspondientes al promedio de triplicados por cada tiempo de muestreo.

TX	T0	T50
	Relación C/N	
SI	35	38
SI+L	25	23
SRC	36	29
SRC+L	25	17

En la Tabla 8 puede observarse que la relación C/N disminuyó a los 50 días de estudio; sin embargo, la diferencia no fue significativa (LSD $p>0.05$), exceptuando en el suelo intemperizado, donde la relación C/N se incrementó. Wu *et al.* (2013) reportó un comportamiento similar, en el que durante el co-compostaje de suelo contaminado con HAP, la relación C/N decrece al final del experimento, atribuyendo este comportamiento a la eficiente degradación de los compuestos presentes en el sistema de co-compostaje.

7.3 Estimación del pH y la conductividad eléctrica del suelo y la composta

Durante el experimento se observó que en los controles SI y SRC, el pH se mantuvo con valores constantes (Tabla 9). Por otra parte, en los tratamientos SRC+L y SI+L se observó un leve incremento en el pH, con respecto al control (Tabla 9). Kästner y Miltner (2016), mencionaron que la adición de un material orgánico para la descontaminación del suelo, generalmente ajusta o cambia el pH del medio debido a la formación de metabolitos provenientes de la fuente de nutrientes. Por esto, el aumento en el valor de pH en los tratamientos SRC+L y SI+L se puede atribuir a la adición del lirio acuático, por la presencia de metabolitos provenientes del lirio y de la actividad de los microorganismos. De manera general, de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000, podemos decir que los suelos estimulados (SI+L, SRC+L) se consideran medianamente alcalinos; en cuanto a los no estimulados (SI, SRC) pueden considerarse neutros a medianamente alcalinos. Cabe mencionar que ambientes alcalinos pueden llegar a inhibir el desarrollo microbiano debido a que se propicia la precipitación de compuestos insolubles como el Mg^{+2} , Cu^{+2} y Zn^{2+} de manera que estos micronutrientes se vuelven difíciles de absorber (Osorio, 2012); sin embargo, en este trabajo no se presentaron ambientes extremos de alcalinidad o de acidez.

Tabla 9. Valores de pH y Conductividad Eléctrica (CE) (inicial y final) de todos los tratamientos estudiados.

TX	T0		T50	
	pH	CE (dS m ⁻¹)	pH	CE (dS m ⁻¹)
SI	7.7±0.11	15.47±0.22	7.9±0.03	14.95±1.07
SI+L	8.2±0.02	22.43±1.98	8.2±0.03	18.98±1.50
SRC	7.5±0.11	1.77±0.20	7.7±0.11	1.11±0.23
SRC+L	8.0±0.02	9.94±0.38	8.4±0.02	6.69±0.30

Un factor clave en la calidad y desarrollo de los suelos es la salinidad, ya que esta puede indicar su fertilidad, debido a que un exceso de sales tiene efectos adversos en sus características físicas, químicas y microbiológicas como la actividad enzimática y la respiración microbiana (Tejada *et al.* 2006). Se evaluó la conductividad eléctrica de las biopilas, determinando que el SRC presentó los valores más bajos de

conductividad eléctrica (Tabla 9), manteniéndose sin cambios significativos durante el co-compostaje. En cambio, el tratamiento SRC+L, registró un valor inicial de 9.94 dS m^{-1} , por lo que la aplicación del lirio alteró la concentración de las sales solubles provocando un efecto inmediato después de su adición al suelo; sin embargo, ésta decreció al final del experimento (Tabla 9).

En contraste, para el SI se registraron valores altos de CE, lo que pudo deberse a la acumulación de sales en el suelo por las condiciones de intemperización e influencia de agua salobre a la que está sometido con frecuencia. Así mismo, el SI+L mostró una alta CE (22.43 dS m^{-1}) desde el inicio; sin embargo, presentó variaciones a lo largo del experimento, siendo este muy fuertemente salino. De manera que, la aplicación del lirio acuático propició una elevación en la CE, tanto en suelos recientemente contaminados como en suelos intemperizados, siendo mayor el efecto en este último; posiblemente por las sales provenientes del lirio acuático y la mayor proporción que contenía de éste. Cabe mencionar que la CE en los suelos estimulados, decreció al final del muestreo, lo que demuestra un efecto positivo en la estabilidad de la composta.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Taiwo *et al.* (2015) donde reportaron que en un proceso de compostaje de suelo contaminado adicionado con lirio acuático y aserrín, la conductividad eléctrica decreció al último tiempo de muestreo, los autores consideraron que la CE es un factor clave en la biorremediación de suelos contaminados ya que un exceso de sales trae como consecuencia un bajo rendimiento en el crecimiento de plantas y la afectación de la actividad de los microorganismos en el suelo. Sin embargo, en este experimento, los altos valores de CE parecieron no afectar el proceso de degradación de los contaminantes, como se explicará mas adelante.

7.4 Estimación de los microorganismos heterótrofos (bacterias y hongos) y microorganismos degradadores del suelo

Se determinó el número de microorganismos heterótrofos (UFC g^{-1} de suelo) inicial y final. En los tratamientos adicionados con lirio los valores iniciales de las UFC g^{-1} de las poblaciones bacterianas fueron mayores, mostrando diferencias significativas

(LSD, $P \geq 0.05$) respecto a los suelos no estimulados (Tabla 10). Cabe mencionar que esto pudo deberse al aporte de la microbiota nativa presente en la rizósfera del lirio acuático, incorporado en el co-compostaje de los suelos. Sin embargo, después de 50 días la cantidad de bacterias decreció en el suelo en condiciones de intemperización (SI) debido posiblemente a la carencia de nutrientes para los microorganismos y a la intolerancia de las poblaciones microbianas a los hidrocarburos, resultando en una selección en la que solo persisten los que son capaces de tolerar o degradar los contaminantes. En el control SRC el número de bacterias (UFC g^{-1}) se incrementaron ligeramente al final del experimento, posiblemente debido a la capacidad que tienen algunas poblaciones de permanecer en ambientes contaminados y en este caso a la composición de los hidrocarburos presentes (Varjani *et al.* 2017). El conteo del número de hongos presentes al inicio de los experimentos, fue mayor en SI+L respecto a los demás tratamientos, como se puede observar en la Tabla 10. Sin embargo, este fue sólo 1.93 veces mayor con respecto al tratamiento SRC+L.

Tabla 10. Cuenta total de microorganismos heterótrofos (UFC G^{-1} de suelo) y degradadores de hexadecano (HXD) de la muestras de los tratamientos estudiados (inicial y final). SI: Suelo Intemperizado, SI+L: Suelo intemperizado adicionado con lirio, SRC: Suelo recién contaminado y SRC+L: Suelo recién contaminado adicionado con lirio. (** indica diferencias estadísticamente significativas LSD, $P \leq 0.05$).

TX	T0			T50		
	UFC g^{-1}		NMP g^{-1}	UFC g^{-1}		NMP g^{-1}
	Bacterias ($\times 10^6$)	Hongos ($\times 10^5$)	microorganismos degradadores de HXD ($\times 10^6$)	Bacterias ($\times 10^6$)	Hongos ($\times 10^5$)	microorganismos degradadores de HXD ($\times 10^3$)
SI	1.96±0.12	1.04±0.32	32.4	0.32±0.05	0.07±0.02	0.228
SI+L	8.61±0.80**	26.90±6.24**	0.523	8.50±1.25**	20.60±2.20**	2.37
SRC	0.98±0.32	4.12±0.24	28.1	1.70±0.48	1.48±0.11	357
SRC+L	8.69±1.07**	13.70±1.20**	0.344	7.67±0.80**	23.70±0.98**	35.7

NMP: Número más probable de microorganismos degradadores de hexadecano (HXD).

En general, al inicio del experimento los tratamientos en los cuales se añadió lirio, el número de hongos (UFC g^{-1}) fue significativamente mayor (LSD, $P \geq 0.05$), en comparación con los controles (SI, SRC). Posteriormente, la cantidad de hongos decreció (50 días) en el SI y SRC, mientras que, en SI+L se mantuvo en el mismo orden de magnitud. En cambio, la cantidad de hongos en el suelo recién contaminado

adicionado con lirio acuático aumentó al final del experimento. De forma similar, Orji *et al.* (2013) evaluando el uso de lirio acuático para remediar un suelo de manglar con hidrocarburos, observaron que la cantidad de bacterias heterotróficas en el suelo adicionado con el lirio aumentó dos ordenes de magnitud mientras que el suelo sin adición de lirio aumentó solo una vez, así también para los hongos heterotróficos del suelo, mostraron un comportamiento similar en el suelo estimulado, manteniéndose dos ordenes de magnitud mayor a 10^7 UFC/g que en el suelo control. Las comunidades bacterias y fúngicas no mostraron una tendencia a decrecer con el tiempo, atribuyendo este comportamiento a una respuesta adecuada por parte de los microorganismos y su adaptación al tratamiento de remediación, aumentando progresivamente conforme al tiempo.

Por otra parte, respecto a los valores del contenido de los microorganismos degradadores (Tabla 10), los resultados indicaron que, al inicio del experimento, los suelos sin adición de lirio obtuvieron un mayor número de microorganismos respecto a los estimulados, posiblemente debido a las diferencias en los hábitats de los cuales provienen los microorganismos tanto del suelo como el lirio. Sin embargo, para el día 50 las poblaciones microbianas descendieron en todos los tratamientos, exceptuando el suelo recientemente contaminado que al final del tratamiento fue mayor, posiblemente por a la presencia de hidrocarburos biodisponibles y utilizables por los microorganismos en comparación con el suelo intemperizado. Adicionalmente la menor cantidad de microorganismos degradadores presentes en los suelos estimulados (SI+L, SRC+L) se puede atribuir al efecto de dilución que provocó la adición del lirio, como se verá más adelante (Figura 9). Gandolfi *et al.* (2010) cuantificaron los microorganismos degradadores de naftaleno en un suelo contaminado con diesel remediado por compostaje, reportando un aumento inicial de un orden magnitud de los microorganismos en las biopilas tratadas respecto a las que no recibieron tratamiento. De esta manera, los microorganismos degradadores mostraron valores similares en el suelo tratado y no tratado (10^5), deduciendo que el compostaje no contribuyó de manera notable al aumento de microorganismos degradadores de naftaleno (2.2×10^4), los cuales es evidente por su disminución al

final del experimento. Este comportamiento coincide con los valores obtenidos para los tratamientos adicionados con lirio, posiblemente debido a la limitada presencia de microorganismos capaces de degradar compuestos hidrocarbonados como el hexadecano; siendo mayor en los suelos controles debido a la presencia de microbiota autóctona del suelo capaz de mantener su actividad en suelos contaminados. Estas observaciones se relacionan también con lo reportado por Nwankwegu *et al.* (2016) en un estudio con diferentes lotes de suelo estimulados para remover hidrocarburos, donde se registran una mayor cantidad de microorganismos heterotróficos que microorganismos degradadores, sugiriendo que no todas las bacterias heterotróficas pueden utilizar hidrocarburos, ya que algunos permanecen neutrales ante la presencia de estos compuestos y otros pueden ser positiva o negativamente afectados por los contaminantes.

7.5 Biomasa microbiana

La comunidad microbiana en el suelo impacta de gran manera su calidad, su conservación y su condición de fertilidad, por lo que esta juega un papel importante en diversas funciones ecosistémicas para mantener una alta y diversa biomasa microbiana (Bai *et al.* 2018; Ju *et al.* 2016; Pose-Juan *et al.* 2015). Considerando que los microorganismos son sensibles a los diferentes ambientes que se presentan en el ecosistema, cualquier alteración se puede ver reflejada en la comunidad microbiana, de manera que la biomasa microbiana se ha utilizado como un indicador potencial para evaluar la influencia de cualquier perturbación en el medio por su rápida respuesta a estos cambios, ya que la presencia de compuestos contaminantes puede tanto estimular como inhibir el crecimiento de los microorganismos debido a que los contaminantes pueden llegar a ser tóxicos (Singh *et al.* 2018; Tashiro *et al.* 2017).

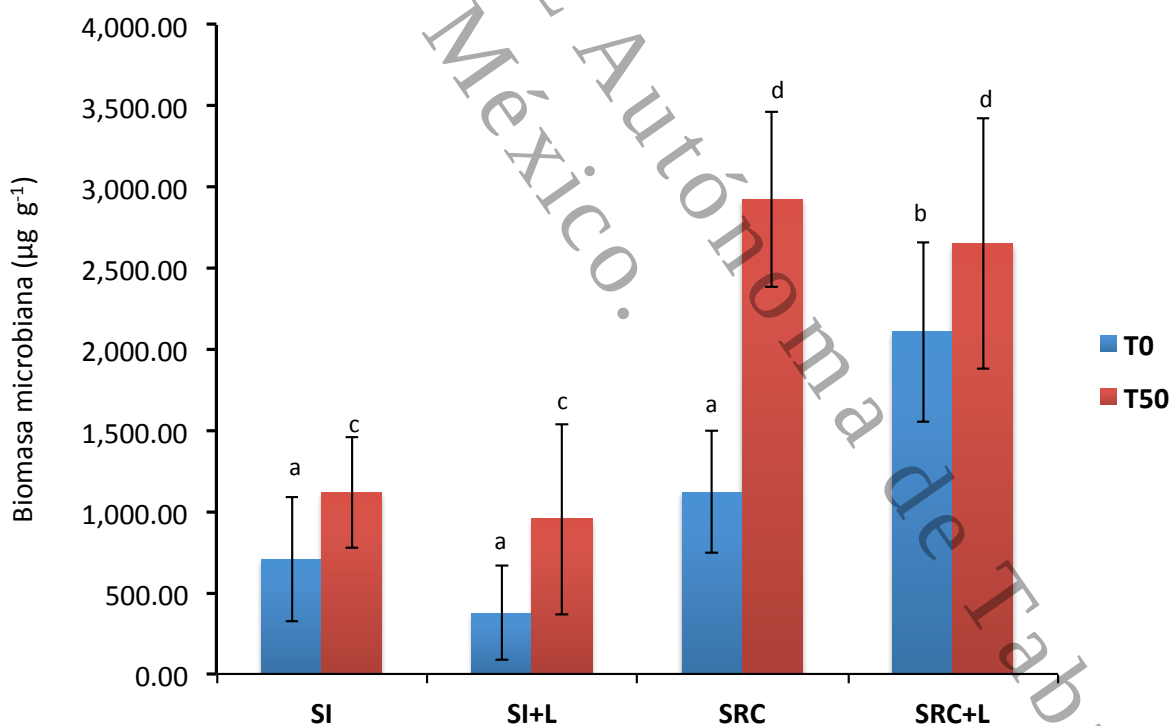


Figura 7. Biomasa microbiana ($\mu\text{g g}^{-1}$ de suelo) inicial (T0) y final (T50) de los tratamientos evaluados. SI: Suelo Intemperizado, SI+L: Suelo Intemperizado adicionado con lirio, SRC: Suelo recién contaminado y SI+L: Suelo Intemperizado adicionado con lirio. Diferentes letras (a, b, c, d) indican diferencias estadísticamente significativas LSD, $P \leq 0.05$, entre tratamientos.

Como se puede observar en la Figura 7, la biomasa microbiana incrementó en todos los tratamientos a los 50 días de estudio, siendo mayor en el SRC y SRC+L con

valores de 2,927.03 y 2,650.38 μg de biomasa microbiana g^{-1} de suelo, respectivamente. Esto indica que la estimulación con lirio acuático aumentó notoriamente la biomasa en suelos recientemente contaminados, posiblemente por la presencia de nutrientes provenientes del lirio como una fuente de carbono de más fácil asimilación en el suelo. Por otra parte, los valores iniciales y finales de SI y SI+L no mostraron diferencias significativas (LSD, $P \geq 0.05$), lo cual se puede deber a las condiciones de intemperización del suelo y las fracciones más pesadas presentes en éste; sin embargo, esto parece no haber afectado el proceso de degradación de los hidrocarburos. Adicionalmente, en el suelo intemperizado estimulado con lirio se muestra claramente que la cantidad de biomasa inicial fue menor comparado con el suelo recién contaminado adicionado con lirio, la cual fue 0.5 veces mayor, encontrando diferencias significativas entre ellos (LSD, $P \leq 0.05$), que se puede deber a los compuestos recalcitrantes presentes en los suelos hace que los microorganismos necesiten pasar por un mayor tiempo de adaptación y/o selección para ser capaces de utilizar una fuente de carbono más compleja (Boonchan *et al.* 2000). De la misma forma, los tratamientos estudiados no mostraron tendencia a decrecer con el tiempo, a los 50 días de iniciado el co-compostaje. González-Díaz, (2014) obtuvo un comportamiento similar en la evaluación de un suelo recientemente contaminado estimulado (SRC-E) y no estimulado (SRC), registrando un aumento inicial 1.5 veces mayor en el SRC-E con respecto al SRC con un valor de 2,927 μg de biomasa microbiana g^{-1} de suelo. Caso similar, fueron los resultados obtenidos de la evaluación de un suelo intemperizado (SIC) y un suelo intemperizado estimulado (SIC-E), mostrándose un aumento inicial mayor en SIC-E de hasta 1,100 μg de biomasa microbiana g^{-1} de suelo, concluyendo que los microorganismos fueron capaces de crecer aun en condiciones de intemperismo, donde no se presentaron efectos de toxicidad que inhibieran su crecimiento. Finalmente, cabe mencionar que los valores de biomasa registrados corresponden a los valores mayores de microorganismos viables cuantificados (Tabla 10) en presencia de lirio acuático (SI+L y SRC+L).

7.6 Actividad de la enzima lipasa

La degradación de hidrocarburos a moléculas más simples involucra diversos procesos químicos, donde participan proteínas catalíticas, por lo que es usual que las enzimas sean indicadores potenciales durante la biorremediación de suelos, por esto, dependiendo de la eficiencia del proceso, su actividad puede aumentar o decrecer (Maila y Cloete, 2005).

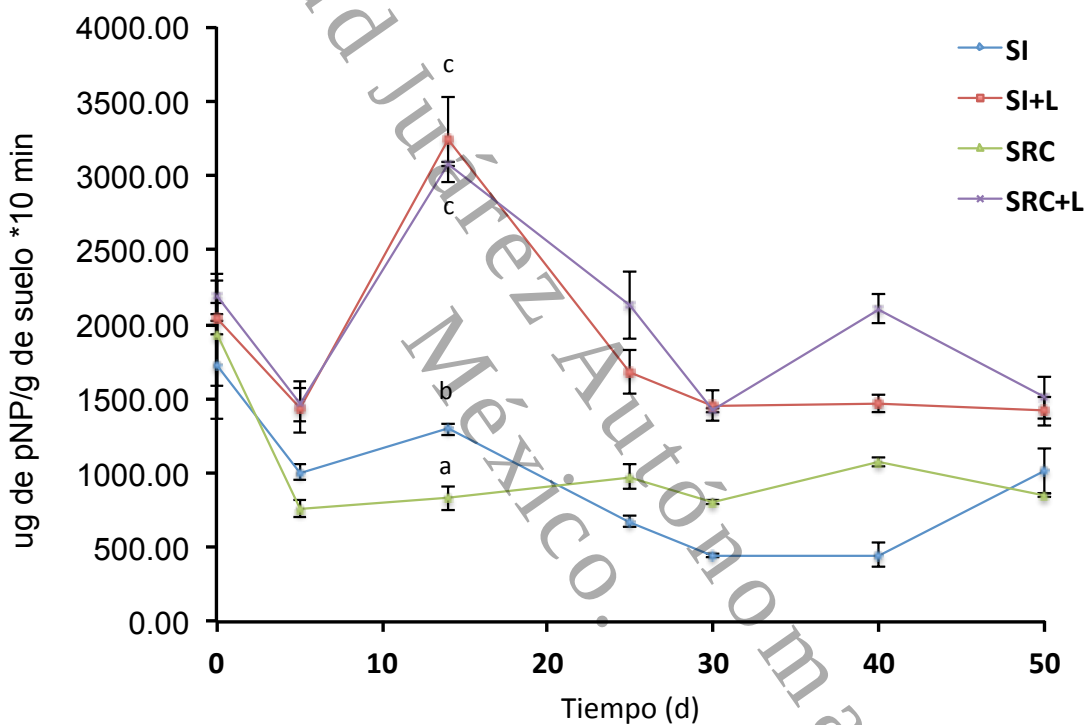


Figura 8. Actividad de la enzima lipasa durante el proceso de co-compostaje de los diferentes tratamientos evaluados. SI+L: Suelo intemperizado adicionado con lirio, SRC: Suelo recién contaminado y SRC+L: Suelo recién contaminado adicionado con lirio.). Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias estadísticamente significativas (LSD, $P \leq 0.05$), entre tratamientos estimulados y no estimulados (sólo se muestran los valores a los 14 y 50 días).

Durante el co-compostaje con lirio acuático, se monitoreó la actividad de la enzima lipasa, encontrando su máxima actividad en los tratamientos estimulados con lirio, a los 14 días (Figura 8), con valores máximos de 3,241.75 para el suelo recientemente contaminado y 3,079.39 μg de pNP $\text{g}^{-1}\text{suelo}10 \text{ min}^{-1}$ para el suelo intemperizado, disminuyendo gradualmente con el paso del tiempo, en donde se encontraron diferencias significativas (LSD, $P \leq 0.05$) de hasta un 50% mayor respecto a los suelos sin adición de lirio. Los valores antes mencionados fueron mucho mayores a los

obtenidos por González-Díaz (2014). Por otra parte, en los controles SI y SRC los valores máximos fueron los iniciales, partiendo de 1,719.76 y 1,938.59 μg de pNP⁻¹ suelo10 min⁻¹, respectivamente. Es por esto que, de manera general, podemos decir que los suelos estimulados con lirio mantuvieron una mayor actividad lipasa durante los 50 días de experimentación, mostrando diferencias significativas (LSD, $P \leq 0.05$) respecto a los suelos control (SI, SRC). Estos resultados sugieren que el lirio ocasionó una mejoría en la degradación de los hidrocarburos y consecuentemente la liberación de subproductos que pueden ser utilizados como sustrato para las hidrolasas como en este caso, por las lipasas. Riveroll-Larios *et al.* (2014) reportó un comportamiento similar en un suelo recientemente contaminado e intemperizado alcanzando valores máximos de 1,477 y 1,200 mg de pNP⁻¹ suelo10 min⁻¹ respectivamente, encontrando diferencias significativas entre ellos, por lo cual concluyó que la composición y la recalcitrancia de los compuestos residuales en el suelo, son factores que influyen la actividad lipasa, siendo notorio en los suelos intemperizados. Adicionalmente, se puede inferir que la máxima actividad observada a los 14 días de experimentación se puede correlacionar con el primer descenso en la concentración de los hidrocarburos presentes en las mezclas con lirio al mismo tiempo de muestreo, como se podrá observar en la siguiente sección.

7.7 Biodegradación de hidrocarburos durante el proceso de co-compostaje

La cuantificación de los hidrocarburos residuales en el suelo es una estrategia adecuada para el monitoreo de descontaminación, ya que nos puede indicar la rapidez y la cantidad en la que se degradan los compuestos en estudio, por esto, se determinaron los HTP residuales en todos los tratamientos durante el co-compostaje.

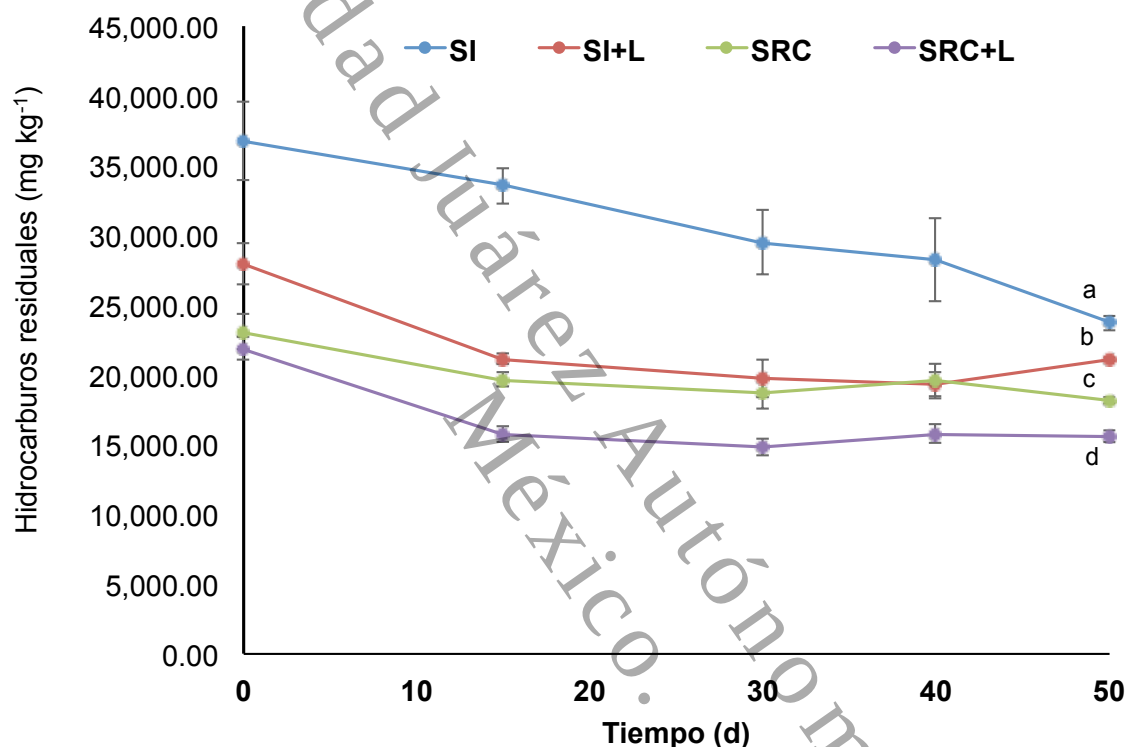


Figura 9. Hidrocarburos residuales (mg kg^{-1}) durante los días 0, 30, 40 y 50 de evaluación: Suelo Intemperizado (SI), Suelo Intemperizado acondicionado con lirio acuático (SI+L), Suelo Recientemente contaminado (SRC) y Suelo Recientemente contaminado estimulado con lirio acuático. Diferencias estadísticamente significativas (LSD, $P \leq 0.05$) entre tratamientos estimulados y no estimulados de tres replicas por cada tiempo de muestreo.

De esta manera, el control sin adición de lirio (SI) registró una biodegradación alrededor del 35.24% (50 días), mientras que SI+L tuvo una degradación del 23.80% al mismo tiempo de muestreo, con una diferencia del 11.44% respecto al control (SI) (Figura 9). En cuanto al suelo intemperizado sin adición de lirio (SI) la variabilidad observada se puede atribuir a la presencia de agregados en el suelo, causando una distribución heterogénea de los HTP residuales en combinación con la naturaleza arcillosa del suelo (Díaz-Ramírez *et al.* 2008). En cuanto a los HTP residuales del

suelo recientemente contaminado, el control sin adición de lirio (SRC) presentó un porcentaje de biodegradación del 21.23% a los 50 días de iniciado el bioproceso, habiendo iniciado de una concentración de 23,094.48 mg kg⁻¹. En contraste, en el tratamiento SRC+L, al adicionar el lirio acuático se obtuvo una mayor biodegradación (28.42%), con una diferencia del 7.19%, encontrando diferencias significativas (LSD, $P \leq 0.05$) con respecto al control (SRC), de acuerdo a esto, la adición de lirio mejoró notablemente la biodegradación de los compuestos presentes en el suelo recientemente contaminado. En un estudio realizado por Udeh *et al.* (2013), donde evaluaron la degradación de HTP en un suelo contaminado con petróleo crudo, encontraron que la adición de lirio fue un factor clave en el proceso de remediación de suelos contaminados con más de 4.5% de petróleo crudo, decreciendo de 43,000 mg kg⁻¹ hasta 14,000 mg kg⁻¹ después de diez semanas de estudio, mejorando también la cantidad de nutrientes presentes utilizables por los microorganismos.

En otro estudio realizado por Escobar-Alvarado *et al.* (2017) se utilizó el co-compostaje para remediar un suelo contaminado con hidrocarburos, mostrando que la adición de materiales orgánicos al suelo, mejora la capacidad de los microorganismos presentes para degradar los contaminantes y consecuentemente una remoción más alta de estos.

Adicionalmente, a partir de las concentraciones residuales, se calculó la tasa de consumo global (TCG) de los tratamientos evaluados, los cuales se registraron como siguen, a) SI con 290.95 mg de HTP consumidos Kg⁻¹ de suelo d⁻¹, b) SI+L con una TCG de 133.78 mg de HTP consumidos Kg⁻¹ de suelo d⁻¹, c) SRC+L registró 109.46 mg de HTP consumidos Kg⁻¹ de suelo d⁻¹ y d) SRC con una TCG de 87.76 mg de HTP consumidos Kg⁻¹ de suelo d⁻¹. Siendo el suelo intemperizado el que presentó el valor más alto, seguido por los tratamientos estimulados con lirio.

De acuerdo a estos resultados, a pesar de que la cantidad de los microorganismos degradadores cuantificados fue menor en las mezclas adicionadas con lirio, esto no representó una limitante para la biodegradación de los contaminantes, siendo notable en el suelo recientemente contaminado, deduciendo que la adición del lirio actuó como fuente de nutrientes y promotor de procesos como la co-oxidación y cometabolismo para la remoción de los hidrocarburos.

7.8 Fraccionamiento de hidrocarburos del suelo intemperizado

Los resultados del fraccionamiento de los hidrocarburos sin asfaltenos presentes en el suelo intemperizado (SI) y suelo intemperizado adicionado con lirio (SI+L) se presentan en la Figura 10. En el SI, la fracción alifática presentó una remoción 1.3 veces al día 50 respecto al valor inicial, mostrando diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $P=0.0186$). Caso similar con la fracción aromática, la cuál mostró una remoción tres veces mayor en contraste a los alifáticos.

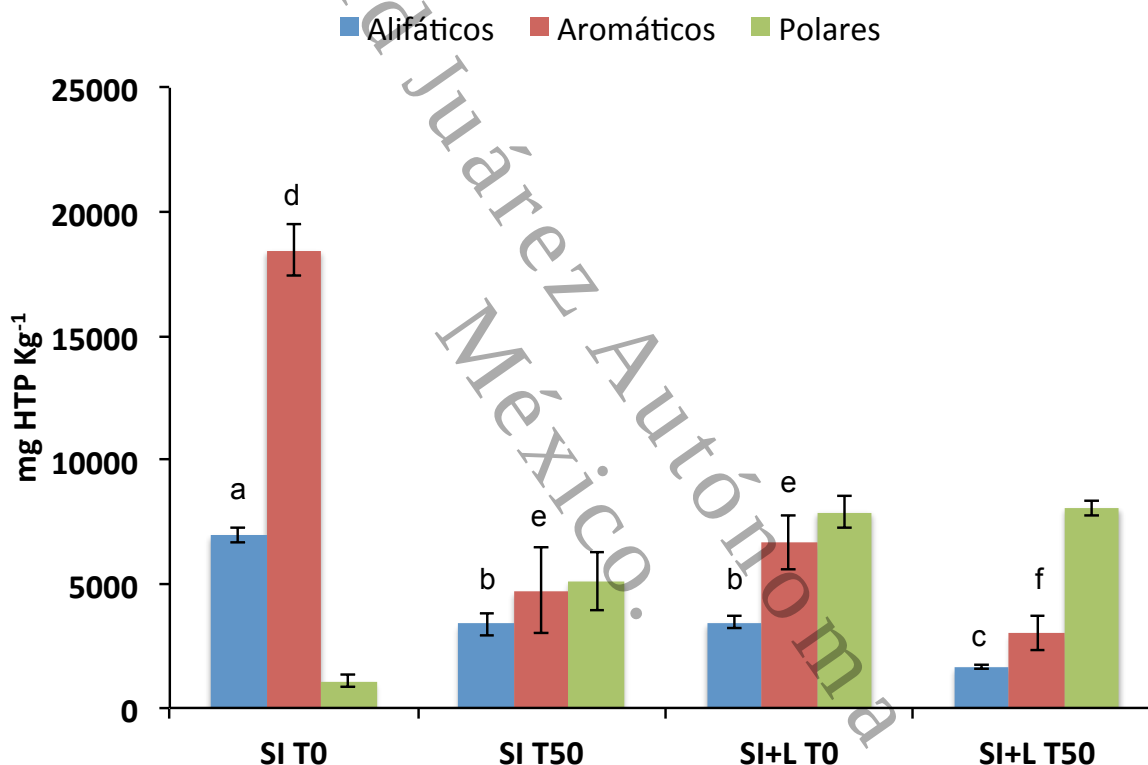


Figura 10. Composición (mg hidrocarburos Kg⁻¹) al inicio (T0) y al final (T50) del experimento, donde SI: Suelo Intemperizado, SI+L: Suelo Intemperizado adicionado con lirio acuático. (Diferentes letras (a, b, c, d, e, f) indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA, $P \leq 0.05$).

Por otra parte, el suelo intemperizado estimulado presentó una cantidad menor de compuestos alifáticos y aromáticos, mostrando una disminución de 1.6 veces para las dos fracciones, con diferencias significativas a los 50 días de estudio (ANOVA, $P \leq 0.05$). Huesemann *et al.* (2004) reportaron un comportamiento similar en un suelo intemperizado por 10 años, en el cual monitoreó la degradación y desorción de alcanos e hidrocarburos aromáticos, en donde la fracción alifática fue degradada más

rápidamente de lo que se desorbía del suelo, encontrando que estos componentes no necesariamente necesitan ser disueltos en fase acuosa para ser degradados por los microorganismos, caso contrario con los hidrocarburos aromáticos, los cuales se desorbieron mientras se llevaba a cabo la biodegradación; sin embargo, mencionan que los diferentes tipos de compuestos aromáticos como el fenantreno y benzo[a]pireno necesitan del cometabolismo, es decir, la presencia de otro sustrato como fuente de carbono para removerlos vía biodegradación.

En cuanto a la fracción polar, se observó un aumento cuatro veces mayor en SI, este comportamiento puede ser a causa de la disminución de la fracción alifática y aromática que son de más fácil asimilación, lo que conlleva a que las fracciones más difíciles de degradar se concentren en el extracto de hidrocarburos del suelo. En este sentido, Cipullo *et al.* (2019) mencionan que después de un proceso de compostaje de suelo contaminado, la fracción de hidrocarburos que reside al final del tratamiento, se compone principalmente por compuestos aromáticos más recalcitrantes, de grandes cadenas hidrocarbonadas ($>C_{35}$), que tienden a formar agregados en el suelo y por lo tanto, ser retenidos dentro de la matriz del suelo reduciendo así su biodisponibilidad.

7.9 Respiración microbiana en suelos contaminados

Las mediciones respirométricas en procesos de recuperación de los suelos, son consideradas indicadores que puede proveer una vista clara de las variaciones en los procesos bioquímicos que se llevan a cabo durante el proceso además de estimar la actividad microbiana del suelo, puesto que los microorganismos pueden llegar a presentar diferentes comportamientos debido al estrés por los ambientes contaminados en los cuales se encuentran. Diversos autores han utilizado esta variable para relacionar algunos parámetros físicos como el contenido de agua, y la temperatura. También se ha utilizado para monitorear los efectos que puede provocar sobre la respiración la adición de fertilizantes y/o nutrientes como el fósforo y nitrógeno y de esta manera interpretar la respuesta de los microorganismos a estos eventos (Chang *et al.* 2013; Romero-Freire *et al.* 2016).

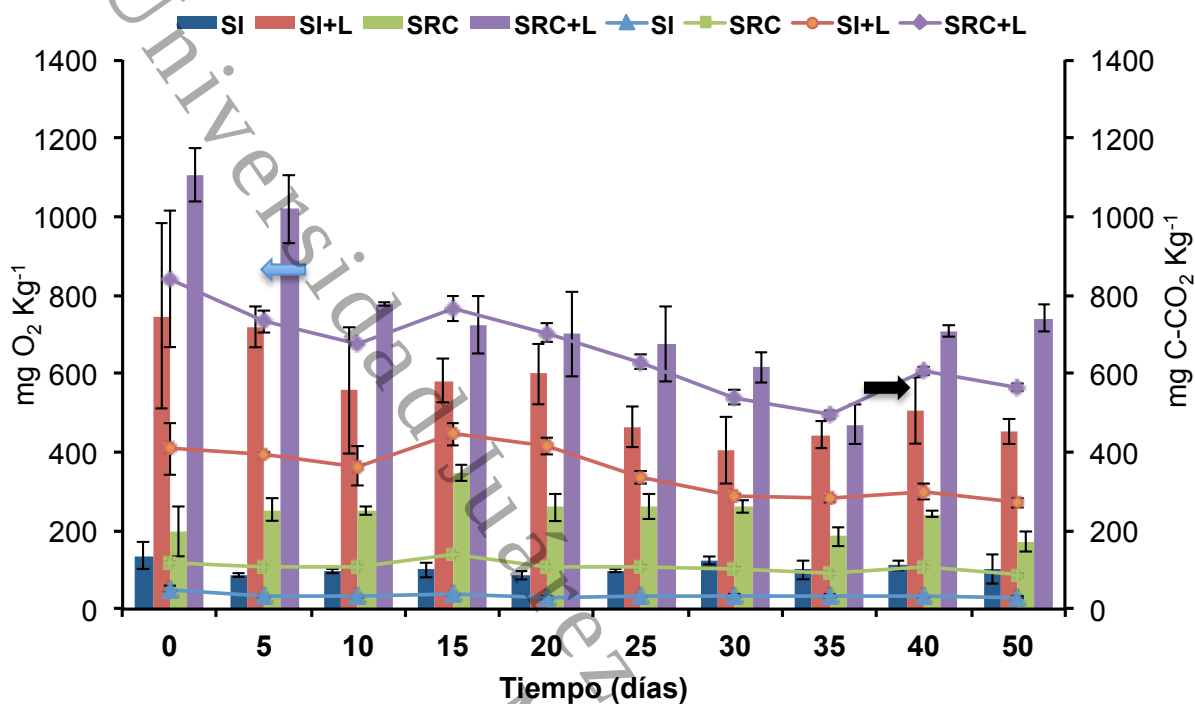


Figura 11. Valores de consumo de O₂ (■ SI ■ SI+L ■ SRC ■ SRC+L) y cinética de la producción de C-CO₂ (▲ SI ▲ SRC ▲ SI+L ▲ SRC+L) de las muestras analizadas, obtenidos en una cinética de 24 hrs en cada tiempo de muestreo, donde SI: Suelo intemperizado, SI+L: Suelo intemperizado adicionado con lirio acuático, SRC: Suelo recién contaminado y SRC+L: Suelo recién contaminado adicionado con lirio acuático. Diferencias estadísticamente significativas (Kruskal-Wallis, $P \leq 0.05$), entre tratamientos estimulados y no estimulados. Datos correspondientes al promedio de triplicados a las 24 horas en cada tiempo de muestreo.

La cinética de producción de CO₂ para los tratamientos evaluados se muestra en las líneas correspondientes al eje derecho, como se puede observar en la Figura 11. Al inicio del proceso de co-compostaje, el tratamiento SI tuvo una producción de 49-30 mg C-CO₂ kg⁻¹ d⁻¹, la cual permaneció constante con respecto al tiempo, presentándose en SI, los valores más bajos de producción de CO₂ de las muestras evaluadas, esto posiblemente debido a que la mineralización decrece conforme el paso del tiempo, en suelos intemperizados (Hatzinger y Alexander, 1995). De manera semejante, el SRC permaneció con valores constantes entre 70-80 mg C-CO₂ kg⁻¹ d⁻¹ de suelo durante el tiempo de experimentación. Sin embargo, en la Figura 11, podemos notar que los tratamientos en los cuales se añadió lirio, la producción de CO₂ aumentó significativamente (Kruskal-Wallis, $P \leq 0.05$) desde el inicio del experimento presentando valores máximos de 433.3 y 287 mg C-CO₂ kg⁻¹ d⁻¹ de suelo para los tratamientos SRC+L y SI+L respectivamente. No obstante, la

cantidad de C-CO₂ producida por SRC+L decreció casi 200 mg C-CO₂ kg⁻¹ d⁻¹ al final del co-compostaje. Cabe mencionar, que el consumo en SRC+L fue significativamente mayor que en SI+L, debido posiblemente a la presencia de fuentes de carbono de más fácil asimilación que en el suelo intemperizado. Este comportamiento es similar al obtenido por Jiang *et al.* (2016), en el que evaluaron la adición de nutrientes en un suelo intemperizado (Suelo A) y un suelo recientemente contaminado (Suelo B) adicionado con nutrientes. En el que el suelo A y B sin adición de nutrientes registraron 200 y 275 mg CO₂ kg⁻¹ suelo d⁻¹ respectivamente, debido al alto contenido de hidrocarburos pesados en el suelo A y la presencia de cadenas de hidrocarburos más cortas y más fáciles de degradar en el suelo B. Adicionalmente los suelos estimulados mostraron a lo largo del experimento una producción de hasta 350 mg CO₂ kg⁻¹ suelo d⁻¹. Por otra parte, Birge *et al.* (2015) reportaron que el aumento en la respiración microbiana se debe a la adición de nutrientes y/o sustratos para mejorar el rendimiento y actividad de los microorganismos, mencionando que la respiración es mayor en suelos más recientes que los que han pasado por procesos de desgaste, simultáneamente observó que la respiración en suelos estimulados tiende a disminuir conforme el paso del tiempo. Por otra parte, en cuanto al consumo de oxígeno de los tratamientos estudiados, como se puede apreciar en la Figura 11 estos presentaron comportamientos similares a la producción de CO₂, donde el suelo intemperizado estimulado, presentó un valor inicial 746.6 mg de O₂ kg⁻¹ d⁻¹ producidos, el cual fue cinco veces más alto que la producción en SI, lo que nos señala una alta oxidación de las fuentes de carbono en SI+L. De la misma forma, podemos observar que SRC+L tuvo un comportamiento similar, con un consumo de 1,105.5 mg de O₂ kg⁻¹ d⁻¹ al inicio del experimento, el cual fue cinco veces mayor que en el suelo recién contaminado sin adición de lirio; sin embargo, el consumo de O₂ tanto en SI como en SRC mantuvieron valores casi constantes a lo largo del tiempo de experimentación, caso contrario con los suelos a los cuales se les añadió lirio que presentaron tendencia a decrecer con el tiempo, posiblemente debido al agotamiento de las fuentes de carbono fácilmente asimilables para los microorganismos. No obstante, los tratamientos estimulados con lirio, mostraron diferencias significativas (Kruskal-

Wallis, $P \leq 0.05$) en el consumo de O_2 respecto a los suelos no estimulados en los 50 días de experimentación. En un estudio realizado por Nocentini, *et al.* (2000) determinaron el consumo de oxígeno durante la remediación de diferentes suelos contaminados con diesel y keroseno estimulados con fertilizante, donde encontraron un incremento inicial en el consumo de oxígeno durante los primeros días de experimentación, sugiriendo que los microorganismos presentes encontraron condiciones favorables debido a la disponibilidad de oxígeno y a la presencia de algunas fracciones más biodegradables y relativamente solubles en agua; no obstante, el consumo de oxígeno decreció conforme el paso del tiempo.

7.10 Coeficiente respiratorio

Yiqi y Zhou (2006), de manera general mencionan que la respiración, se refiere a los procesos metabólicos de los organismos vivos que producen CO_2 y consumen O_2 . Por lo que la proporción de producción de CO_2 y consumo de O_2 de estos dos gases expresadas en moles, se puede definir como el coeficiente respiratorio (QR), lo cual puede indicar los cambios potenciales que ocurren durante la utilización del sustrato utilizado para la respiración, por lo que este parámetro es útil para el monitoreo de la biorremediación de suelos contaminados, ya que se puede relacionar con la presencia y/o consumo de hidrocarburos, tanto de otros compuestos, como los ácidos húmicos y carbohidratos. La fórmula para obtener el QR se presenta a continuación (Lipp y Anderson, 2003).

$$QR = \frac{CO_2 \text{ producido}}{O_2 \text{ consumido}}$$

En la Figura 12 se muestran los valores calculados del coeficiente respiratorio (QR) de los tratamientos evaluados. De manera general, se puede observar que los suelos adicionados con lirio (SI+L, SRC+L) presentaron valores de QR mayores respecto a los suelos sin adición de lirio (LSD, $P < 0.05$). En particular, en el SRC+L se incrementó el QR de forma gradual desde valores iniciales ≤ 1 durante los primeros 15 días. En el caso del SI+L el valor inicial fue cercano a 1 y este se incrementó hasta obtener un máximo (QR=1.4) a los 15 días de iniciado el co-compostaje. En contraste, el coeficiente respiratorio para el SI y el SRC decreció

manteniéndose en valores entre 0.9 a 0.71 durante los primeros 40 días. Al final el QR se incrementó (50 días) ligeramente en estos tratamientos. El comportamiento registrado indica una elevada mineralización para los suelos adicionados con lirio, probablemente producto de la mayor actividad microbiana registrada en estos tratamientos, indicando una elevada oxidación de las fuentes de carbono disponibles. No obstante, en los suelos no adicionados con lirio, los valores registrados son característicos de la actividad respiratoria (QR=0.69) en presencia de hidrocarburos en procesos de co-compostaje usando residuos vegetales como acondicionadores orgánicos (Beaudin *et al.* 1996). Khan y Joergensen, (2006) reportaron que los valores altos de QR (≥ 1), pueden deberse al aumento de carbono disponible derivado de la materia orgánica, mientras que, valores menores a uno pueden indicar mineralización de compuestos alifáticos (más reducidos).

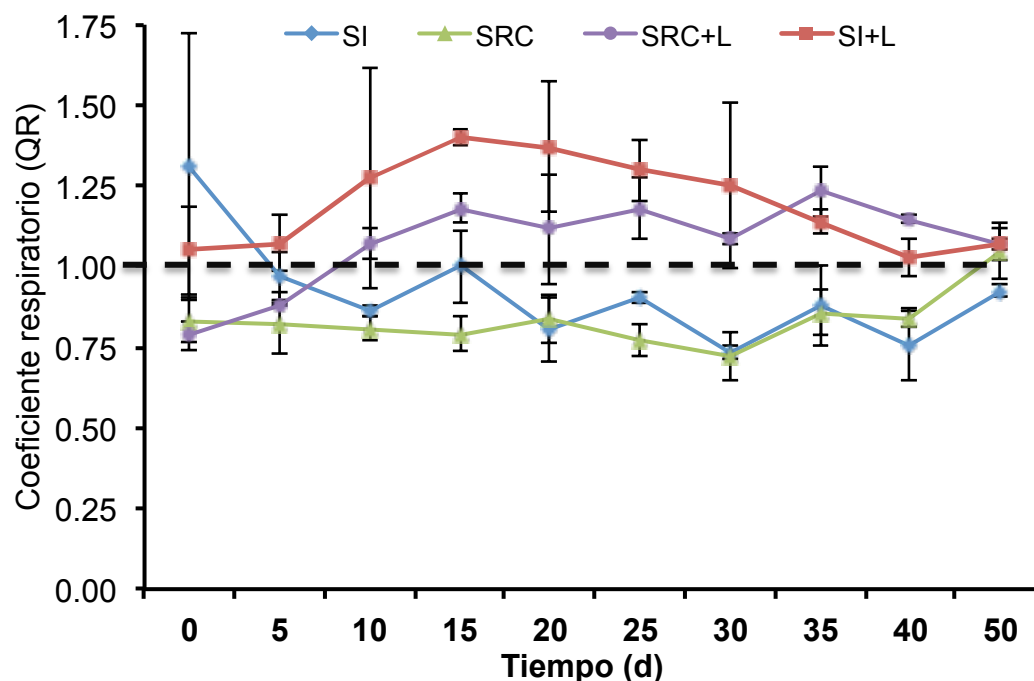


Figura 12. Coeficiente respiratorio durante el co-compostaje de suelo recién contaminado e interperizado con lirio acuático. En la figura: SI: Suelo interperizado, SI+L: Suelo interperizado adicionado con lirio, SRC: Suelo recién contaminado, SRC+L: Suelo recién contaminado adicionado con lirio. Datos correspondientes al promedio de triplicados obtenidos con los valores del cociente del CO_2 producido (mmoles de CO_2)/ O_2 consumido (mmoles de O_2), acumulados en 24 horas para cada tiempo de muestreo.

Por otra parte, a pesar de que, el SI presentó un QR ligeramente mayor que el obtenido en el SRC, esto no representó una mayor actividad biológica durante el proceso de co-compostaje, como se observó en las secciones anteriores.

Aún cuando no se aprecian diferencias estadísticas significativas (LSD, $P>0.05$) entre los valores a través del tiempo para los tratamientos adicionados con lirio, es notorio que en el SRC+L los valores del QR se mantuvieron entre 1.00 – 1.23, durante todo el proceso. Mientras que en el SI+L se identifican dos fases, una primera donde este se incrementó hasta obtener el máximo ya mencionado y posteriormente una segunda, donde los valores disminuyeron gradualmente (15-50 días). Esto corresponde con los resultados de la actividad lipasa (Fig. 8) donde los valores máximos se alcanzaron a los 15 días de iniciado el co-compostaje. Varios autores han señalado que los valores de $QR>1$ se pueden deber a la asimilación de algún sustrato y predominancia del metabolismo anabólico llevando a una degradación desbalanceada del carbono disponible (Theenhaus, 1997; Dilly 2005; Khan y Joergensen, 2006).

7.11 Efecto del lirio acuático como acondicionador orgánico en el co-compostaje de suelo recién contaminado e intemperizado por hidrocarburos

De acuerdo al análisis comparativo de los resultados de los diferentes tratamientos, en cuanto a las variables microbiológicas como la biomasa microbiana, el SRC+L mejoró significativamente respecto al SI+L, siendo en este último el contenido de biomasa hasta 2.5 veces menor que el SRC+L. De igual forma, la cantidad de microorganismos heterotróficos presentes en las mezclas adicionadas con lirio, fue hasta cuatro veces mayor en comparación de los controles, en particular para el caso de SI+L, debido posiblemente a que contenía la mayor proporción de lirio. Adicionalmente, a pesar de que el contenido de microorganismos degradadores en los tratamientos adicionados con lirio fue menor respecto a los suelos control, su contenido permitió una mejora en la remoción de los hidrocarburos, obteniendo hasta 28.42% para SRC+L y 23.80% para SI+L en 50 días de tratamiento. Esto probablemente se deba a que la adición de lirio promovió cambios en la estructura

de la comunidad microbiana y por tanto un incremento en la capacidad metabólica de la misma. Ortiz-Maya *et al.* (2017) reportó que durante la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos (recién contaminados e intemperizados) bioestimulados, la comunidad microbiana tuvo una estructura menos diversa que gradualmente se incrementó, mientras que en los suelos bajo atenuación natural (no-estimulados) se presentó una comunidad microbiana más estable y con menor potencial metabólico.

Un comportamiento similar se pudo observar, en el caso específico de la enzima lipasa, tuvo una actividad notable en los dos suelos estimulados con lirio (SRC+L, SI+L), incrementándose con valores de hasta $3,079.39 \mu\text{g de pNP g}^{-1} \text{ suelo } 10 \text{ min}^{-1}$, observándose que la adición del lirio, mantuvo la actividad de esta enzima conforme el paso del tiempo, ya que no tuvo tendencia a inhibirse ni a decrecer. Adicionalmente, en este experimento se pudo observar que el perfil respirométrico tuvo un comportamiento similar respecto a las demás variables, resaltando que los suelos adicionados con lirio tuvieron una tasa de asimilación de oxígeno significativamente mayor respecto a los suelos no estimulados, con valores de hasta $1,105.5 \text{ mg de O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Además, la relación entre el consumo de oxígeno y la producción de CO_2 demostró valores >1 del QR indicando una alta actividad metabólica aeróbica en los suelos con presencia de lirio acuático, lo que se refleja en los elevados niveles de mineralización y de la actividad biológica evaluada.

8. CONCLUSIONES

La adición del lirio acuático promovió significativamente la degradación de los hidrocarburos presentes, obteniendo una remoción 7.19% mayor en el suelo recientemente contaminado tratado con lirio, así como de los hidrocarburos complejos presentes en el suelo intemperizado, en particular las fracciones alifática y aromática que se redujeron significativamente hasta un 50% después de 50 días de co-compostaje.

Las pruebas estadísticas realizadas sobre las variables biológicas determinadas, reflejaron que la adición del lirio acuático mejoró significativamente la actividad biológica de los microorganismos presentes en ambos suelos contaminados.

La mejora en la actividad biológica fue más notoria en el suelo recientemente contaminado, debido a que aumentó y mantuvo altos niveles de variables como la actividad de la enzima lipasa, la biomasa microbiana y la respiración microbiana, obteniendo los valores más altos en cuanto a la producción de CO_2 y al consumo de O_2 durante el proceso de co-compostaje, con valores de $433.3 \text{ mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $1,105.5 \text{ mg de O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos decir que el lirio acuático es adecuado para utilizarse como acondicionador orgánico para el co-compostaje aplicándose en suelos tropicales con diferente historia de contaminación con hidrocarburos en el estado de Tabasco, ya que funge como un promotor de la biodegradación y del cometabolismo de fracciones aromáticas y alifáticas para la remoción de compuestos hidrocarbonados aún en condiciones limitantes de la biodisponibilidad.

9. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se plantean las siguientes recomendaciones:

- Realizar una investigación para conocer la diversidad y dinámica de la comunidad microbiana presente durante el co-compostaje de suelos con diferente historia de contaminación por hidrocarburos, para determinar las especies que predominen en los diferentes ambientes contaminados.
- Aislar diferentes cepas microbianas a partir de la determinación de los microorganismos heterotróficos para evaluar su potencial sobre la biodegradación de diferentes fracciones específicas de hidrocarburos (alifática, aromática, polar).
- Se recomienda realizar evaluaciones toxicológicas de los suelos sometidos al proceso de co-compostaje para su posible uso como sustrato de crecimiento o abono para plantas, y paralelamente llevar a cabo una evaluación cronológica para determinar la mejora de la calidad del suelo con respecto al tiempo.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-sabour, M. F. (2010). Water hyacinth: Available and renewable resource. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 9(11), 1746–1759.
- Aguilera HN & Domínguez VI. 1980. Metodología de análisis físicoquímicos de suelos. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Alexander, M. (2000). Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science and Technology*, 34(20), 4259–4265.
- Al-Hawash, A. B., Alkooranee, J. T., Abbood, H. A., Zhang, J., Sun, J., Zhang, X., & Ma, F. (2018). Isolation and characterization of two crude oil-degrading fungi strains from Rumaila oil field, Iraq. *Biotechnology reports*, 17, 104-109.
- Atlas, R. M. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*, 45(1). Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=281502&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://ezproxy.unal.edu.co/login?url=http://www.scopus.com/record/display.url>
- Atlas, R. M., & Bartha, R. (1992). Hydrocarbon Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. *Advances in Microbial Ecology*, 287–338.
- Bai, Y., Qu, J., Zhao, C., Liao, K., Huo, Y., Hu, W., & Jian, Z. (2018). Integrating microbial biomass, composition and function to discern the level of anthropogenic activity in a river ecosystem. *Environment International*, 116(April), 147–155.
- 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.
- Benavides López de Mesa, J., Guevara Vizcaíno, A. L., Jaimes Cáceres, D. C., Gutiérrez Riaño, S. M., & Miranda García, J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), 82.
- Birge, H. E., Conant, R. T., Follett, R. F., Haddix, M. L., Morris, S. J., Snapp, S. S., ... Paul, E. A. (2015). Soil respiration is not limited by reductions in microbial biomass during long-term soil incubations. *Soil Biology and Biochemistry*, 81, 304–310.
- Brookes, P. C., & Joergensen, R. G. (2005). 6.2 Microbial Biomass Measurements by Fumigation-Extraction. *Microbiological methods for assessing soil quality*, 77.
- Boonchan, S., Britz, M. L., & Stanley, G. A. (2000). Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(3), 1007-1019.
- Camarena, O., & Aguilar, J. (2013). Control biológico del lirio acuático en México: primera experiencia exitosa con neóquetinos en distritos de riego (I). Morelos: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- Comision Nacional de Hidrocarburos. (2014). Indicadores Anuales Reporte de Fugas de Gas Natural al Primer Semestre de 2014. México, D.F.
- Carter, M.R. and Gregorich, E.G., Eds. (2008) *Soil Sampling and Methods of Analysis*. 2nd Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Chang, W., Akbari, A., Snelgrove, J., Frigon, D., & Ghoshal, S. (2013). Biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated clayey soils from a sub-arctic site: The role of aggregate size and microstructure. *Chemosphere*, 91(11), 1620–1626. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.058>
- Cruz, C., C. Balbólin, F. Paz, J. Etchevers y P. Krasilnikov. 2007. Variabilidad Morfogenética de los Suelos de México y su relación con el Modelo Fisiográfico Nacional. XVII Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo. León Guanajuato. México. 17 al 21 de septiembre de 2007. Disponible en: www.madrimasd.org/blogs/universo/2007/06/22/68351.
- Das, S., & Dash, H. R. (2014). Microbial bioremediation: A potential tool for restoration of contaminated areas. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation* 1-21.
- Deppe, U., & Walter, Æ. H. R. Æ. (2005). Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium, 461–470.

- Díaz-Ramírez, I. J. (2000). Biodegradación de hidrocarburos por un consorcio microbiano de la rizósfera de una planta nativa de pantano. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Díaz-Ramírez, I. J., Escalante-Espinosa, E., Favela-Torres, E., Gutiérrez-Rojas, M., & Ramírez-Saad, H. (2008). Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(1), 21-30.
- Dilly, O. (2005). Microbial energetics in soils. In *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions* (pp. 123-138). Springer, Berlin, Heidelberg.
- EPA (1996). Method 3540C. Soxhlet extraction. Recuperado de: <http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf>
- Escobar-Alvarado, L. F., Vaca-Mier, M., López, R., & Rojas-Valencia, M. N. (2017). Hydrocarbon Degradation and Lead Solubility in a Soil Polluted with Lead and Used Motor Oil Treated by Composting and Phytoremediation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100(2), 1-6.
- Ehlers, L.J., Luthy, R.G., 2003. Peer reviewed: contaminant bioavailability in soil and sedi- ment. *Environ. Sci. Technol.* 37, 295A-302A.
- Ezeji, U., Anyadoh, S. O., & Ibekwe, V. I. (2007). Clean up of crude oil-contaminated soil. *Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology*, 1(2), 54-59.
- Fernández Linares, L. C., Rojas Avelizapa, N. G., Roldán Carrillo, T. G., Ramírez Islas, M. E., Zegarra Martínez, H. G., Uribe Hernández, R., ... Arce Ortega, J. M. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología.
- Feng, W., Xiao, K., Zhou, W., Zhu, D., Zhou, Y., Yuan, Y., ... & Zhao, J. (2017). Analysis of utilization technologies for *Eichhornia crassipes* biomass harvested after restoration of wastewater. *Bioresource technology*, 223, 287-295.
- Friedel, J. K., Mölter, K., & Fischer, W. R. (1994). Comparison and improvement of methods for determining soil dehydrogenase activity by using triphenyltetrazolium chloride and iodinitrotetrazolium chloride. *Biology and fertility of soils*, 18(4), 291-296.
- Gandolfi, I., Sicolo, M., Franzetti, A., Fontanarosa, E., Santagostino, A., & Bestetti, G. (2010). Influence of compost amendment on microbial community and ecotoxicity of hydrocarbon-contaminated soils. *Bioresource technology*, 101(2), 568-575.
- García-Rivero, M., Saucedo-Castañeda, G., De Hoyos, S. F., & Gutiérrez-Rojas, M. (2002). Mass transfer and hydrocarbon biodegradation of aged soil in slurry phase. *Biotechnology progress*, 18(4), 728-733.
- Global Invasive Species Database. (2015). 100 of the World's Worst Invasive Alien Species. *Invasive Species Specialist Group*, 12(3), 12.
- International Centre for Soil and Contaminated Sites. (2006). *Manual for Biological Remediation Techniques*. Techniques, 81.
- González-Díaz, V. (2014). Evaluación de la actividad biológica y potencial de biodegradación de un suelo contaminado por hidrocarburos. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Guo, R., Li, G., Jiang, T., Schuchardt, F., Chen, T., Zhao, Y., & Shen, Y. (2012). Effect of aeration rate, C/N ratio and moisture content on the stability and maturity of compost. *Bioresource Technology*, 112, 171-178.
- Gutiérrez-Rojas, M. (2000). Increasing Bioavailability of recalcitrant molecules in contaminated soils. *Environmental biotechnology and cleaner bioprocesses*. London: Taylor and Francis Limited, 167-177.
- Hatzinger, P. B., & Alexander, M. (1995). Effect of ageing of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental Science and Technology*, 29(2), 537-545.
- Hazelton, P., & Murphy, B. (2016). *Interpreting soil test results: What do all the numbers mean?*. CSIRO publishing.
- Hentati, O., Lachhab, R., Ayadi, M., & Ksibi, M. (2013). Toxicity assessment for petroleum-contaminated soil using terrestrial invertebrates and plant bioassays. *Environmental monitoring and assessment*, 185(4), 2989-2998.

- Hernández-Pérez, L.M. (2015). Evaluación de la actividad microbiana a través de indicadores biológicos y enzimáticos en un suelo contaminado por diesel. Tesis de licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Iturbe, R., & Flores-Torres, C. (2002). Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas. *Ingeniería Investigación Y Tecnología*, 12.
- Ivshina, I., Kuyukina, M., & Krivoruchko, A. (2017). Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria and Their Potential in Eco-Biotechnology and Bioremediation. (I. Kurtboke, Ed.). Australia: Elsevier.
- Jiang, Y., Brassington, K. J., Prpich, G., Paton, G. I., Semple, K. T., Pollard, S. J. T., & Coulon, F. (2016). Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation. *Chemosphere*, 161, 300–307.
- Joergensen, R. G. (1995). The fumigation extraction method. En: Alef, K., y Nannipieri, P. (Eds). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. Great Britain: London, pp 382–387.
- Joergensen, R. G. (1996). The Fumigation-Extraction Method to Estimate Soil Microbial Biomass: Calibration of the K_{EC} Value. *Soil Biol. Biochem.*, 28(1): 25-31.
- Joergensen, R. G., & Brookes, P. C. (2005). Quantification of soil microbial biomass by fumigation-extraction. In *Monitoring and Assessing Soil Bioremediation* (pp. 281-295). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ju, C., Xu, J., Wu, X., Dong, F., Liu, X., & Zheng, Y. (2016). Effects of myclobutanil on soil microbial biomass, respiration, and soil nitrogen transformations. *Environmental Pollution*, 208, 811–820.
- Khan, K. S., & Joergensen, R. G. (2006). Decomposition of heavy metal contaminated nettles (*Urtica dioica* L.) in soils subjected to heavy metal pollution by river sediments. *Chemosphere*, 65(6), 981-987.
- Kästner, M., & Miltner, A. (2016). Application of compost for effective bioremediation of organic contaminants and pollutants in soil. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(8), 3433-3449.
- Lim, M. W., Lau, E. Von, & Poh, P. E. (2016). A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil — Present works and future directions. *Marine Pollution Bulletin*, 109(1), 14–45.
- Ling, C. C., & Isa, M. H. (2006). Bioremediation of oil sludge contaminated soil by co-composting with sewage sludge. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 65(4), 364–369.
- Lorch, H. J. (1995). Basic methods for counting microorganisms in soil and water. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*, 146-161.
- Lipp, C. C., & Andersen, C. P. (2003). Role of carbohydrate supply in white and brown root respiration of ponderosa pine. *New Phytologist*, 160(3), 523-531.
- Luthy, R. G., & Cunningham, S. D. (1997). Sequestration of Hydrophobic Organic Contaminants by Geosorbents, 31(12).
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2008). Brock biology of microorganisms 12th edn. *Int. Microbiol*, 11, 65-73.
- Maila, M. P., & Cloete, T. E. (2005). The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants - Perspective for monitoring hydrocarbon contamination: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 55(1), 1–8.
- Margesin, R., & Schinner, F. (Eds.). (2005). *Manual for soil analysis-monitoring and assessing soil bioremediation* (Vol. 5). Springer Science & Business Media.
- Martínez, M., Saldaña, P., & Gutiérrez, E. (2003). Control de malezas acuáticas en México, 5.
- Mathur, A., Mathur, S. K., Singh, A. B., & Rao, A. S. (2018). Enriched Compost Production Technique from Water Hyacinth. In *Water Quality Management* (pp. 465-482). Springer, Singapore.
- McCauley, A., Jones, C., & Jacobsen, J. (2005). Basic Soil Properties. *Soil and Water*, 1–12. Retrieved from http://landresources.montana.edu/SWM/PDF/Final_proof_SW1.pdf
- Moyo, P., Chapungu, L., & Mudzengi, B. (2013). Integrated Management Approach to the Control of Water Hyacinth: The Case of Shagashe River in. *Greener Journal of Oceanography and Marine Science*, 1(June 2014), 11to 22.
- 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.
- Namkoong, W., Hwang, E. Y., Park, J. S., & Choi, J. Y. (2002). Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental Pollution*, 119(1), 23–31.

- Ndimele, P. E., Saba, A. O., Ojo, D. O., Ndimele, C. C., Anetekhai, M. A., & Erundu, E. S. (2018). Remediation of Crude Oil Spillage. The Political Ecology of Oil and Gas Activities in the Nigerian Aquatic Ecosystem. Elsevier Inc.
- Niño Sulkowska, M., & Lot H, A. (2006). Estudio demográfico del lirio acuático *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms: Dinámica de crecimiento en dos localidades selectas de México. Boletín de La Sociedad Botánica de México, 9–20.
- Nocentini, M., Pinelli, D., & Fava, F. (2000). Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: The residual concentration problem. *Chemosphere*, 41(8), 1115–1123.
- NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis. D.F. 31 de diciembre del 2002.
- NMX-109-SCFI-200 que establece las especificaciones y métodos de prueba del humus de lombriz. D.F. 10 de junio del 2008.
- Nwankwegu, A. S., Orji, M. U., & Onwosi, C. O. (2016). Studies on organic and in-organic biostimulants in bioremediation of diesel-contaminated arable soil. *Chemosphere*, 162, 148-156.
- Onwosi, C. O., Odibo, F. J. C., Enebechi, C. K., Nwankwegu, A. S., Ikele, A. I., & Okeh, O. C. (2017). Bioremediation of Diesel-contaminated Soil by Composting with Locally Generated Bulking Agents. *Soil and Sediment Contamination*, 26(4), 42.
- Orji, F. A., Ibiene, A. A., & Okerentugba, P. O. (2013). Bioremediation of petroleum hydrocarbon-polluted mangrove swamps using nutrient formula produced from water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *American Journal of Environmental Sciences*, 9(4), 348–366.
- 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*, Vol.33, 1-21.
- Ortiz Rodriguez, A. E., Sosa, V., & Ruiz Sanchez, E. (2015). Flora Del Bajío Y De Regiones Adyacentes. Instituto de Ecología A.C, 24(10), 1–18.
- Ortíz-Salinas, R. (2007). Identificación de fuentes contaminantes de hidrocarburos en suelos en La Venta, Tabasco, México. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Osmond, R., & Petroeschovsky, A. (2013). Water Hyacinth, Control Modules. Australia: Department of Primary Industries. Retrieved from https://books.google.com/books?id=LzWEcgAACAAJ&pgis=1%5Cnhttps://books.google.nl/books/about/Water_hyacinth.html?id=ut4UAQAIAAJ&pgis=1
- Osorio, N. W. (2012). pH del Suelo y Disponibilidad de Nutrientes. *Revista Manejo integral del suelo y Nutrición Vegetal*, 1(4).
- Palma, D. J., & Zavala, J. (2017). UPDATING THE CLASSIFICATION OF SOILS IN, (January 2018).
- Philp, J., & Atlas, R. (2017). Microbial Resources for Global Sustainability. In *Microbial Resources* (pp. 77-101). Academic Press.
- PEMEX. (2016a). Anuario Estadístico. México, D.F.
- PEMEX. (2016b). Informe de Sustentabilidad 2016. México, D.F.
- PEMEX. (2017). Informe Anual 2016. México, D.F.
- PEMEX. (2018) Informe Anual 2017. México, CDMX.
- PEMEX. (2018b) Informe de Sustentabilidad 2017. México, CDMX.
- Pose-Juan, E., Sánchez-Martín, M. J., Herrero-Hernández, E., & Rodríguez-Cruz, M. S. (2015). Application of mesotrione at different doses in an amended soil: Dissipation and effect on the soil microbial biomass and activity. *Science of the Total Environment*, 536, 31–38.
- Potter, C. (1993). Biopile treatment of soils contaminated with hazardous waste. *Seminars on Bioremediation of Hazardous Waste Sites* ..., 1–5. Retrieved from http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=_dbQWU5-OjUC&oi=fnd&pg=SA10-PA1&dq=Biopile+Treatment+of+Soils+Contaminated+With+Hazardous+Waste
- Powers, L. E., & McSorley, R. (2001). Principios ecológicos en agricultura. Paraninfo,.
- PROFEPA. (2016). Informe de actividades 2016, 152. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/196266/Informe_de_actividades_2016.pdf
- Ramadas, K., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2018). Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil: Impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas* spp. on bioremediation. *Science of the Total Environment*, 636, 968-974.

- Ren, X., Zeng, G., Tang, L., Wang, J., Wan, J., Wang, J., ... Peng, B. (2017). The potential impact on the biodegradation of organic pollutants from composting technology for soil remediation. *Waste Management*, 12.
- Rezania, S., Ponraj, M., Din, M. F. M., Songip, A. R., Sairan, F. M., & Chelliapan, S. (2015). The diverse applications of water hyacinth with main focus on sustainable energy and production for new era: An overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 41, 943–954.
- Riazi, M. . (2005). *Characterization and Properties of Petroleum Fractions*. USA: American Society for Testing and Material.
- Riveroll-Larios, J. (2014). *Actividad microbiana en suelos tropicales con diferente historia de contaminación por hidrocarburos*. Tesis de Maestría. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Romero-Freire, A., Sierra Aragón, M., Martínez Garzón, F. J., & Martín Peinado, F. J. (2016). Is soil basal respiration a good indicator of soil pollution? *Geoderma*, 263, 132–139.
- Santos Jallath, J. E. (2007). *Caracterización de suelos contaminados con hidrocarburos en una empresa minera y desarrollo de un método biológico para su remediación*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Santos-Zúñiga G. G. (2017). *Evaluación de .* Universidad Nacional Autónoma de México.
- SEMARNAT. (2010). *Programa Nacional de dos métodos de medición de la conductividad eléctrica en suelo y composta. Caso práctico*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- SEMARNAT. (2016). Capítulo 3. Suelos. Informe de la situación del Medio Ambiente en México., 153–190. Retrieved from http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe15/tema/pdf/Cap3_Suelos.pdf
- Semple, K. T., Reid, B. J., & Fermor, T. R. (2001). Impact of composting strategies on the treatment of soil contaminated with diesel fuel.pdf. *Environmental Pollution*, 112, 269–283.
- Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Biotechnology and bioremediation—an overview. En: *Biodegradation and bioremediation* (pp. 1-17). Springer, Berlin, Heidelberg
- Singh, J. S., & Gupta, V. K. (2018). Soil microbial biomass: A key soil driver in management of ecosystem functioning. *Science of the Total Environment*, 634, 497–500.
- Speight, J. G. (1998). *The chemistry and technology of petroleum* (3rd ed.). USA: Marcel Dekker, Inc.
- Speight, J. G., & Arjoon, K. K. (2012). *Bioremediation of Petroleum and Petroleum Products*. Bioremediation of Petroleum and Petroleum Products. USA.
- Su, W., Sun, Q., Xia, M., Wen, Z., & Yao, Z. (2018). The Resource Utilization of Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes* [Mart.] Solms) and Its Challenges. *Resources*, 7(3), 46.
- Taiwo, A. M., Gbadebo, A. M., Oyedepo, J. A., Ojekunle, Z. O., Alo, O. M., Oyeniran, A. A., ... & Taiwo, O. T. (2016). Bioremediation of industrially contaminated soil using compost and plant technology. *Journal of hazardous materials*, 304, 166-172.
- Tashiro, Y., Shirai, Y., Hassan, M. A., Mohd-Nor, D., Sakai, K., Sharuddin, S. S., ... Ramli, N. (2017). Shift of low to high nucleic acid bacteria as a potential bioindicator for the screening of anthropogenic effects in a receiving river due to palm oil mill effluent final discharge. *Ecological Indicators*, 85(October 2017), 79–84.
- Tejada, M., Garcia, C., González, J. L., & Hernández, M. T. (2006). Use of organic amendment as a strategy for saline soil remediation: influence on the physical, chemical and biological properties of soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(6), 1413-1421.
- TEMA. Lirio acuático: Tesoro ambiental, [en línea], SEMARNAT, disponible en: ccds.semarnat.gob.mx/ciudadania/Presentaciones/tres/catorce.ppt, [Consultado el 19 de marzo de 2018]
- Theenhaus, A., Maraun, M., & Scheu, S. (1997). Substrate-induced respiration in forest and arable soils measured by O₂-microcompensation: moisture conditions and respiratory quotient. *Pedobiologia*, 41(5), 449-455.
- Trejo, M.; Quintero, R. (2000). Bioremediation of contaminated soils. En: *Environmental Biothecnology and cleaner bioprocesses*. Olguin, J. E. Sánchez, G.; Hernández, E. Eds. Taylor & Francis Limited. London, Great Britian. pp 179-189.
- Udeh, N. U., Nwaogazie, I. L., & Momoh, Y. (2013). Bio-remediation of a crude oil contaminated soil using water hyacinth (*Eichhornia crassipes*), 4(2), 362–369.
- United Nations Environment Programme, & Global Environmental Alert Service. (2013). *Water hyacinth – Can its aggressive invasion be controlled?* Environmental Development, 16.

- Vallejo, V. E., Yanine, H., & Roldán, F. A. (2010). Aplicación de sales de tetrazolio de nueva generación (XTT) para la estimación de la densidad de microorganismos degradadores de hidrocarburos empleando la técnica del número más probable. *Acta Biológica Colombiana*, 15(3), 75-89.
- 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.
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223(October), 277–286.
- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 120, 71–83.
- Vipin Chandra, K., & Prasun, K. (2017). *Microbial Applications* (Vol. 1). Switzerland: Springer.
- Volke-Sepúlveda, T. L., & Velasco, J. (2003). Biodegradación de Hidrocarburos del Petróleo en suelos Intemperizados mediante composteo. *Dirección de Investigación En Residuos Y Proyectos Regionales*, 33.
- Volke, T. L., & Trejo Velasco, J. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Jiménez Editores. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Wang, Z., Xu, Y., Zhao, J., Li, F., Gao, D., & Xing, B. (2011). Remediation of petroleum contaminated soils through composting and rhizosphere degradation. *Journal of hazardous materials*, 190(1-3), 677-685.
- Wang, Z., Fingas, M., & Li, K. (1994). Fractionation of a light crude oil and identification and quantitation of aliphatic, aromatic, and biomarker compounds by GC-FID and GC-MS, part II. *Journal of chromatographic science*, 32(9), 367-382.
- Wrenn, B. A., & Venosa, A. D. (1996). Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Canadian journal of microbiology*, 42(3), 252-258.
- Wu, G., Kechavarzi, C., Li, X., Sui, H., Pollard, S. J., & Coulon, F. (2013). Influence of mature compost amendment on total and bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soils. *Chemosphere*, 90(8), 2240-2246.
- Xu, J., Zhang, Q., Li, D., Du, J., Wang, C., & Qin, J. (2019). Rapid degradation of long-chain crude oil in soil by indigenous bacteria using fermented food waste supernatant. *Waste Management*, 85, 361-373.
- Yiqi, L., & Zhou, X. (2010). *Soil respiration and the environment*. Elsevier USA. 10: 0-12-088782-7. 17-55.
- Zavala-Cruz, J., Gavi-Reyes, F., Adams-Schroeder, R. H., Ferrera-Cerrato, R., Palma-López, D. J., Vaquera-Huerta, H., & Domínguez-Ezquivel, J. M. (2005). Derrames de petróleo en suelos y adaptación de pastos tropicales en el activo Cinco Presidentes, Tabasco, México. *Terra latinoamericana*, 23(3), 293-302.
- Zhang, J. H., Xue, Q. H., Gao, H., Ma, X., & Wang, P. (2016). Degradation of crude oil by fungal enzyme preparations from *Aspergillus* spp. for potential use in enhanced oil recovery. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(4), 865-875.
- Zuluaga, M. T. & Torres D. K. (2009) Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.

11. ANEXO FOTOGRÁFICO

Muestreo del suelo recién contaminado y suelo intemperizado



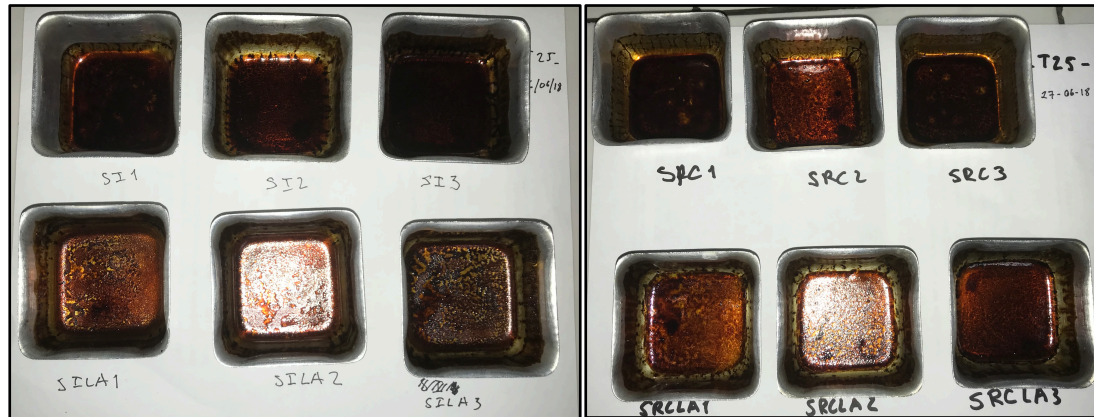
Toma de muestras y homogenización del suelo intemperizado contaminado



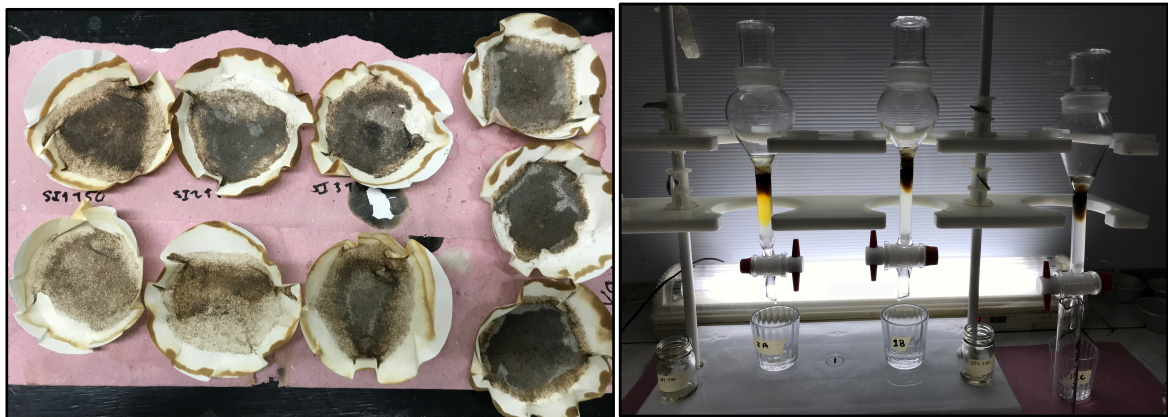
Muestreo y recolección del lirio acuático para el co-compostaje



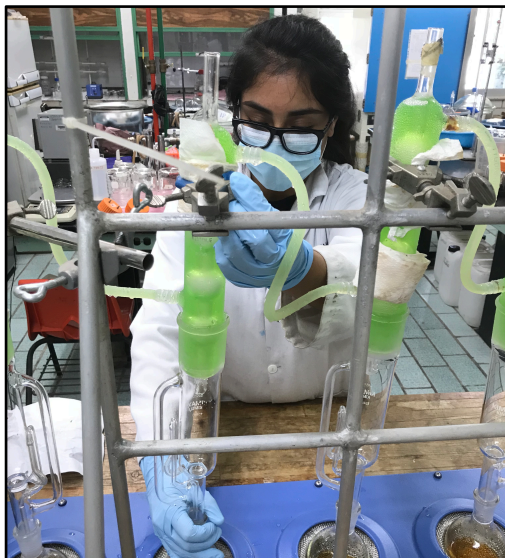
Extracción de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP)



Precipitación de asfaltenos y fraccionamiento en columna de los HTP residuales



Determinación del C de la biomasa microbiana del suelo



Programación del respirómetro SableSystem para la cuantificación del CO₂ producido y O₂ consumido



Cuantificación de la enzima lipasa y del NMP de microorganismos degradadores de alcanos

