



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

División Académica de Ciencias Biológicas

Evaluación de la actividad metabólica a través de la medición de actividad lipasa y deshidrogenasa de dos suelos bajo la influencia de la industria petrolera

TESIS

Para obtener el título de la licenciatura en

Ingeniería Ambiental

P R E S E N T A

Rodrigo Alexander Pérez Pérez

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Ildelfonso Jesús Díaz Ramírez

CO-DIRECTORA

Dra. Erika Escalante Espinosa



DACBIOL

División Académica
de Ciencias Biológicas

Villahermosa, Tabasco. Mx., abril de 2024



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



2024
Felipe Carrillo
PUERTO
GOBIERNO FEDERAL
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN
PÚBLICA Y PROFESIONES
COMANDO EN JEFE
EJERCITO NACIONAL

**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN**

Villahermosa, Tab., a 11 de Abril de 2024

ASUNTO: Autorización de Modalidad de Titulación

**C. LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON
JEFE DEL DEPTO. DE CERTIFICACIÓN Y TITULACION
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E**

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado, informo a usted, que en base al reglamento de titulación vigente en esta Universidad, ésta Dirección a mi cargo, autoriza al **C. RODRIGO ALEXANDER PÉREZ PÉREZ** egresado de la Lic. en **ING. AMBIENTAL** de la División Académica de **CIENCIAS BIOLÓGICAS** la opción de titularse bajo la modalidad de Tesis denominado: "**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA A TRAVÉS DE LA MEDICIÓN DE ACTIVIDAD LIPASA Y DESHIDROGENASA DE DOS SUELOS BAJO LA INFLUENCIA DE LA INDUSTRIA PETROLERA**".

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para saludarle afectuosamente.

A T E N T A M E N T E

**DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

C.c.p.- Expediente Alumno de la División Académica
C.c.p.- Interesado

UJAT.
DIRECCIÓN ACADÉMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



2024
Felipe Carrillo
PUERTO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN

ABRIL 11 DE 2024

**C. RODRIGO ALEXANDER PÉREZ PÉREZ
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 le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis denominado: **"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA A TRAVÉS DE LA MEDICIÓN DE ACTIVIDAD LIPASA Y DESHIDROGENASA DE DOS SUELOS BAJO LA INFLUENCIA DE LA INDUSTRIA PETROLERA"**, asesorado por el Dr. Idefonso Jesús Díaz Ramírez, sobre el cual sustentará su Examen Profesional, cuyo jurado está integrado por el Dr. José Ramón Laines Canepa, MIA. Jesús Manuel Carrera Velueta, Dr. Idefonso Jesús Díaz Ramírez, MISA. Elizabeth Magaña Villegas y Dra. Ena Edith Mata Zayas.

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


**DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR**

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



KM. 0.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA
Tel. (993) 358-1500 Ext. 6400 y 6401, e-mail: direccion.dacbiol@ujat.mx

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

www.ujat.mx



**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



2024
**Felipe Carrillo
PUERTO**
SECRETARIO DEL GOBIERNO FEDERAL
1893-1920
GOBIERNO DE
MÉXICO

**DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN**

09 de abril de 2024

C. Rodrigo Alexander Pérez Pérez
Pasante de la Lic. en Ingeniería Ambiental
PRESENTE

En cumplimiento de los lineamientos de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, se implementó la revisión del trabajo recepcional (**Tesis**), a través de la plataforma Turnitin iThenticate para evitar el plagio e incrementar la calidad en los procesos académicos y de investigación en esta División Académica. Esta revisión se realizó en correspondencia con el Código de Ética de la Universidad y el Código Institucional de Ética para la Investigación.

Por este conducto, hago de su conocimiento las observaciones, el índice de similitud y el reporte de originalidad obtenido a través de la **revisión en la plataforma iThenticate** de su documento de tesis "**Evaluación de la actividad metabólica a través de la medición de actividad lipasa y deshidrogenasa de dos suelos bajo la influencia de la industria petrolera**".

OBSERVACIONES:

Se incluyeron citas, se excluyeron referencias bibliográficas, fuentes pequeñas y se limitó el número de coincidencias a 15 palabras.

RESULTADO DE SIMILITUD	0 %
	13289 palabras, <15 coincidencias, <10% fuentes

Finalmente, se le solicita al **C. Rodrigo Alexander Pérez Pérez** integrar en la versión final del trabajo recepcional (tesis), este oficio y el informe de originalidad con el porcentaje de similitud de Turnitin iThenticate.

Sin otro particular al cual referirme, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.


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


DR. ARTURO GARRIDO MORA
DIRECTOR

C.c.p. Dr. Idefonso Jesús Díaz Ramírez. Director de tesis.
C.c.p. Dra. Erika Escalante Espinosa. Codirectora de tesis
C.c.p. Archivo



KM. 0.5 CARR. VILLAHERMOSA-CÁRDENAS ENTRONQUE A BOSQUES DE SALOYA
Tel. (993) 358-1500 Ext. 6400 y 6401, e-mail: direccion.dacbiol@ujat.mx

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

www.ujat.mx

Evaluación de la actividad metabólica a través de la medición de actividad lipasa y deshidrogenasa de dos suelos bajo la influencia de la industria petrolera

INFORME DE ORIGINALIDAD

0%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

< 10%

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS

< 15 PALABRAS

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
México

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 de Licenciatura denominado: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA A TRAVÉS DE LA MEDICIÓN DE ACTIVIDAD LIPASA Y DESHIDROGENASA DE DOS SUELOS BAJO LA INFLUENCIA DE LA INDUSTRIA PETROLERA”**, 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 Abril de Dos Mil Veinticuatro.

AUTORIZO



RODRIGO ALEXANDER PÉREZ PÉREZ

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a la memoria de mi abuela, Alicia Rodríguez. Este logro es en honor a su legado y al impacto perdurable que ha tenido en mi vida.

*“..Is there sunshine where you are?
the way there was when you were
here..”*

Agradecimientos

A mis padres. Les agradezco su amor infinito, su constante aliento y su gran paciencia durante todos estos años de estudio. Sus sacrificios y valores han sido mi mayor inspiración. Este logro es también de ustedes

A mi familia. Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi familia por su apoyo incondicional y por jamás dejarme solo durante todo este proceso, cada página de esta tesis lleva impreso el cariño y el apoyo de toda mi familia.

Al Dr. Ildefonso J. Díaz Ramírez y a la Dra. Erika Escalante Espinosa. Gracias por toda su dedicación, sus enseñanzas, consejos, anécdotas y su enorme apoyo durante todo este proceso. Gracias por creer en mí y hacerme sentir como en familia dentro del laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio. En especial a Esmeralda, Andrea y Aldair. Gracias por todo su tiempo, paciencia y por tantas horas de risas que aliviaban estrés.

Agradezco a todos los que han sido parte de esta aventura.

Agradecimiento al CONAHCyT

Este proyecto de investigación fue financiado por CONAHCyT con recursos del Proyecto: “Fortalecimiento de la capacidad analítica para la caracterización de matrices ambientales, diagnóstico y desarrollo de alternativas de biorremediación para atender la contaminación por hidrocarburos y deterioro de los suelos del sureste” (Proyecto No. 321814), de la convocatoria de apoyo al fortalecimiento de infraestructura y desarrollo de capacidades científicas convocatoria 2022.

Rodrigo Alexander Pérez Pérez. Recibió apoyo financiero como estudiante vinculado al proyecto.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México

Índice.

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	4
3.1. Contaminación del suelo por derrame de hidrocarburos	4
3.2. Biorremediación de suelos contaminados.....	5
3.3. Factores que limitan la biorremediación.....	5
3.4. Bioaumentación y bioestimulación	8
3.4.1. <i>Bioaumentación</i>	8
3.4.2. <i>Bioestimulación</i>	8
3.5. Indicadores del suelo.....	9
3.5.1. <i>Indicadores biológicos del suelo</i>	9
3.5.2. <i>Biodiversidad microbiana</i>	11
3.5.3. <i>Actividad enzimática</i>	11
4. Antecedentes	14
5. Justificación	17
6. Objetivos.	18
6.1. General	18
6.2. Específicos	18
7. Materiales y métodos	19
7.1. Estrategia experimental.....	19
7.2. Selección de áreas de estudio.....	20
7.1. Muestreo y recolección.....	21
7.2. Preparación de las muestras para bioestimulación.....	21
7.3. Diseño experimental.....	22
7.4. Métodos analíticos.....	23
7.4.1. <i>Indicadores físicos y químicos</i>	23
7.4.2. <i>Indicadores biológicos</i>	28
7.5. Análisis estadístico	31
8. Resultados y discusión	32
8.1. Relación carbono nitrógeno.....	32
8.2. pH y Conductividad eléctrica	33
8.3. Contenido de hidrocarburos totales del petróleo (HTP).....	36
8.4. Microorganismos degradadores de hidrocarburos (NMP).....	37
8.5. Actividad enzimática lipasa	38
8.6. Actividad de la enzima deshidrogenasa	40
9. Conclusiones	43
10. Referencias bibliográficas	44
11. Anexos	52
11.1. Productos derivados del proyecto	52
11.1.1. <i>Presentación de resultados en eventos científicos.</i>	52

1. Resumen

Las actividades petroleras, el deterioro de ductos y actos delictivos generan derrames de hidrocarburos, impactando la calidad y la salud de los suelos, principalmente en regiones petroleras como el Sureste de México. La respuesta de indicadores biológicos permite evaluar la afectación que sufren los suelos contaminados. El presente trabajo evaluó la presencia de microorganismos degradadores y la respuesta de la actividad enzimática lipasa (LPS) y deshidrogenasa (DHS) en dos suelos contaminados y en condiciones de bioestimulación: 1) Miahuatlán, Cunduacán (MH) y 2) El paraíso, Huimanguillo (LV), pertenecientes al estado de Tabasco. Para ambos suelos se tomaron hasta 4 puntos de muestreo de suelo contaminado (SC), más un punto control (suelo no contaminado, SNC). Para la evaluación de la actividad enzimática se diseñó un experimento donde se bioestimuló el suelo contaminado mediante la adición de nitrógeno, proveniente del fertilizante triple 17 (T17). El experimento consistió de 6 tratamientos: SNCMH, SCMH, SCMH+T17, SNCLV, SCLV y SCLV+T17, teniendo una duración de 15 días. Para el experimento se seleccionó un punto contaminado de cada sitio (P1), con base en un análisis previo del perfil respirométrico de cada muestra. Se determinó el pH, CE, microorganismos degradadores (iniciales y finales), contenido de HTP (iniciales y finales). Para la actividad enzimática LPS y DHS se realizó una cinética. Al finalizar la experimentación se observó que el contenido de microorganismos degradadores, aumentaron en un 183% y 218%, en los en los tratamientos SCMH+T17 y SCLV+T17, respectivamente. La respuesta de la actividad LPS fue mayor en los tratamientos SCMH y SCLV alcanzando valores de 381.03 ± 50.56 y 510.02 ± 68.04 μg de pNP g^{-1} de suelo seco 10 min, respectivamente. La mayor respuesta de la actividad DHS observada en el tratamiento SCMH fue de 256.00 ± 33.35 μg de INF g^{-1} de suelo, para el tratamiento SCLV+T17 fue de 803.51 ± 12.08 μg de INF g^{-1} de suelo. Los tratamientos SCMH y SCLV presentaron la mayor degradación (15.70% y 6.85%) al final del experimento. Los resultados demuestran la elevada sensibilidad de respuesta que tienen las actividades enzimáticas y el contenido de microorganismos degradadores al ser usadas como indicadores biológicos en suelos contaminados y en procesos de biorremediación. También demuestran la capacidad de adaptación y potencial de degradación por parte de los microorganismos autóctonos.

2. Introducción

La contaminación de suelos por derrames de hidrocarburos es un problema ambiental importante en todo el mundo, especialmente en las zonas petroleras como el sureste de México. De acuerdo con el reporte de la Unidad de Transparencia Petróleos Mexicanos (Petróleos Mexicanos, 2022), durante el periodo 2018-2021, en Tabasco se han registrado el 50% de derrames ocurridos en el sureste de México, seguido de Veracruz con el 32.3%, sin contar derrames originados por actos delictivos. El desarrollo de la industria petrolera ha sido una de las principales causas de la contaminación de suelo en esta región, debido a derrames originados durante la extracción, transporte, refinamiento y recientemente por el deterioro de ductos, fallos técnicos y actos delictivos (Imam et al., 2019; Udom & Nuga, 2011; Imam et al., 2019). Estos derrames afectan gravemente la calidad y la salud del suelo alterando las características físicas, químicas y biológicas, lo que genera un impacto negativo en el medio ambiente y en la salud de la población y de más seres vivos (Torres *et al.*, 2019).

Los indicadores biológicos permiten conocer, evaluar y monitorear las condiciones y características actuales del suelo, gracias a que presentan una mayor sensibilidad de respuesta durante los cambios ocurridos en la matriz del suelo ante su alteración por contaminantes o por un proceso de remediación. Se han desarrollado y analizado diversos indicadores como lo son: la actividad enzimática (lipasa y deshidrogenasa), biomasa microbiana, estructura y función de las poblaciones de microorganismos (Udom & Nuga, 2011; Nielsen & Winding, 2002). También permiten evaluar el potencial de biorremediación de un suelo contaminado con hidrocarburos para establecer estrategias de biorremediación acordes a las condiciones y necesidades del sitio contaminado.

La degradación de hidrocarburos puede llevarse a cabo mediante el uso de técnicas de biorremediación en donde se aprovechan las capacidades metabólicas de los microorganismos para desintoxicar o eliminar contaminantes de la matriz del suelo, donde los hidrocarburos son transformados en compuestos menos tóxicos para el ambiente (Das & Chandran, 2011; Wilson & Jones, 1993; Iman *et al.*, 2021). Dentro de la biorremediación existen dos estrategias principales para llevar a cabo la degradación

de los hidrocarburos, las cuales son: bioestimulación y bioaumentación. En la bioestimulación se busca promover el desarrollo y crecimiento de los microorganismos nativos del sitio contaminado por la adición de nutrientes, mejorando las condiciones físicas y químicas del sitio. Por otro lado, la bioaumentación consiste en agregar microorganismos exógenos, aumentando la diversidad de microorganismos y con ello la degradación de los hidrocarburos (Cui *et al.*, 2020; Das & Chandran, 2011; Brown & Ulrich, 2014).

En el presente trabajo se evaluó la respuesta de indicadores biológicos basados en la actividad enzimática y la presencia de microorganismos degradadores de hidrocarburos en dos suelos contaminados del sureste de México. La respuesta de los indicadores biológicos también fue evaluada durante un proceso de bioestimulación con adición de nutrientes, así como también en muestras de suelo no contaminado (control) pertenecientes a los mismos sitios. Los resultados demuestran la efectividad de los indicadores biológicos en la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos y durante un proceso de biorremediación. La presencia de hidrocarburos elevó significativamente la respuesta de los indicadores biológicos, registrándose un incremento en el número de microorganismos degradadores y una mayor actividad enzimática respecto a los valores encontrados en las muestras control.

3. Marco teórico

3.1. Contaminación del suelo por derrame de hidrocarburos

El desarrollo de la industria petrolera en el sureste de México ha sido una de las principales fuentes de contaminación de suelos por hidrocarburos, tan solo en el periodo 2018-2021 la Unidad de Transparencia Petróleos Mexicanos (Petróleos Mexicanos, 2022) ha reportado 111 derrames de hidrocarburos en los estados de Tabasco (67) y Veracruz (44), sin contar los derrames generados por actos delictivos, por lo cual las cifras de derrames ocurridos en ese periodo pueden ser mayores. Estos estados albergan numerosas instalaciones petroleras con actividades dedicadas a la extracción, refinación, almacenamiento y transporte de petróleo y sus derivados, mismas que han generado los diversos derrames de hidrocarburos reportados (Díaz-Ramírez *et al.*, 2013). Diversos derrames han sido originados a partir de las actividades petroleras, en años recientes se pueden mencionar a las fallas técnicas, el deterioro de ductos y los actos delictivos como fuentes principales orígenes de derrames (Imam *et al.*, 2019; Udom & Nuga, 2011).

Cuando se depositan en el suelo, los hidrocarburos pueden adherirse a las partículas del suelo y persistir allí durante años, generando efectos adversos. Cavazos-Arroyo *et al.* (2014), clasificaron las afectaciones por hidrocarburos en tres grupos principales: Ecológicos, Humanos y Patrimoniales. En los ecológicos se afecta a la flora (disminución de cobertura vegetal), fauna y afecta a microorganismos claves para el procesamiento y fijación de nutrientes (nitrógeno, fósforo potasio) esenciales para el desarrollo de las plantas. Lo anterior puede derivar en una baja fertilidad de suelos, en donde se reduce el crecimiento de plantas y cultivos agrícolas (Cavazos-Arroyo *et al.*, 2014; Infante, 1998). Las afectaciones humanas ocurren debido a las características altamente tóxicas de los hidrocarburos, los cuales generan efectos mutagénicos y carcinogénicos para los seres vivos, condicionando un ambiente sano para la población humana y demás seres vivos (Castro, 2011; Adams *et al.*, 2008). Las afectaciones patrimoniales involucran la pérdida de casas y bienes materiales que se encuentran dentro de un sitio afectado por un derrame.

Aunado a lo anterior, se encuentra la afectación económica, por lo general los derrames suelen ocurrir en las zonas rurales, teniendo mayor efecto en las poblaciones dedicadas a la agricultura (Dettmer, 2002). Donde muchas veces los sitios no reciben un proceso de biorremediación adecuado, lo cual resulta en un suelo inutilizable para la producción de cultivos o ganadería (Infante, 1998).

3.2. Biorremediación de suelos contaminados

La biorremediación incluye técnicas desarrolladas para restaurar ambientes contaminados con petróleo, a partir de la necesidad de recuperar la calidad de los suelos, es una alternativa amigable con el medio ambiente y representa una de las principales vías por las que se pueden eliminar contaminantes como los hidrocarburos. Se basa en el empleo y estimulación de enzimas presentes en microorganismos como bacterias y hongos, permitiendo acelerar la degradación de los contaminantes. Las enzimas utilizan a los contaminantes (sustratos) como fuentes de energía y gracias a su versatilidad metabólica, éstas se encargan de modificar la estructura y reducir las propiedades tóxicas de los contaminantes orgánicos transformándolos o mineralizándolos en productos metabólicos inocuos, como dióxido de carbono, agua y ácidos grasos (Gianfreda *et al.*, 2005; Argüelles, 2014).

3.3. Factores que limitan la biorremediación

El éxito de la biorremediación depende de las condiciones ambientales del sitio contaminado, que limiten o faciliten el crecimiento microbiano y con ello la degradación de los contaminantes. Factores ambientales limitantes son: la disponibilidad de oxígeno, la humedad, el pH, la salinidad, la temperatura, el tipo de suelo y la baja biodisponibilidad de nutrientes (Tabla 1). La composición de las comunidades microbianas y la tasa de transformación de los contaminantes se encuentran influenciadas por estas condiciones ambientales (Brown & Ulrich, 2014; Azubuike *et al.*, 2016).

Tabla 1: Condiciones óptimas de los parámetros físicos y químicos que promueven la degradación.

Parámetros	Condiciones requeridas para la actividad microbiana	Valores óptimos para la degradación
Humedad del suelo	25 – 28% de la capacidad de campo	20 – 80%
pH del suelo	5.5 – 8.8	6,5 – 8,0
Contenido de nutrientes	Nitrógeno y fósforo para el crecimiento microbiano	C:N:P = 100:10:1
Temperatura °C	15 – 45	20 – 30

Fuente: Brown & Ulrich (2014).

Durante el proceso de degradación los microorganismos pueden carecer de suficientes nutrientes como fósforo y nitrógeno para usar contaminantes como fuente de carbono, ya que los hidrocarburos no presentan un balance nutricional óptimo para los microorganismos impidiendo su crecimiento. Sayed *et al.* (2021) compararon la composición elemental del petróleo crudo y el de los microorganismos (Tabla 2), observando que el petróleo crudo no contiene un equilibrio nutricional adecuado para los microorganismos. Este desbalance nutricional podría implicar que no ocurra una biorremediación efectiva.

Tabla 2: Comparación de la composición elemental entre una célula microbiana y petróleo crudo.

Elementos	Composición celular microbiana (%)	Composición de petróleo crudo (%)
Carbono	50	85-90
Nitrógeno	14	<0.1 – 2
Oxígeno	20	1 – 1.5
Hidrógeno	8	10 – 14
Fósforo	3	-
Azufre	1	0.2 – 3
Sodio	1	-
Calcio	0.5	-
Magnesio	0.5	-
Cloruro	0.5	-
Hierro	0.2	-
Otros	0.3	<1

Fuente: Sayed et al. (2021)

El nitrógeno (8%) y el fósforo (3%) son los nutrientes inorgánicos más importantes necesarios para los microorganismos, los cuales se encuentran escasos en el petróleo. Cuando existe un derrame de hidrocarburos en el ambiente se supone un aporte fundamental de carbono orgánico en donde se suelen producir incrementos en la relación Carbono/Nitrógeno (C/N), es decir, concentraciones bajas de nitrógeno, en cuyo caso no existiría una correcta relación C/N, siendo desfavorables para el crecimiento microbiano y con ello inhibir o limitar la degradación de los hidrocarburos, además de que el nitrógeno es necesario para formar ácidos nucleicos y el ATP. El fósforo a su vez es necesario para sintetizar fosfolípidos y los ácidos nucleicos (Castro, 2011; Shi *et al.*, 2017; Raffa *et al.*, 2021)

La Tabla 3 describe las funciones celulares de los micronutrientes del suelo, que favorecen el crecimiento de los microorganismos.

Tabla 3: Micronutrientes para el crecimiento celular y sus funciones celulares.

Micronutrientes	Función celular
Cobalto	Vitamina B12; transcarboxilasa (bacteria del ácido propiónico)
Cobre	Citocromo (citocromo c oxidasa), Fotosíntesis (plastocianina, superóxido dismutasas)
Manganeso	Actúa como activador de varias enzimas; ocurre en algunas superóxido-dismutasas y en la enzima foto lítica (divisora de agua) en los fotótrofos oxigénicos (fotosistema-II)
Molibdeno	Presente en algunas enzimas que contienen flavina, nitrogenasa, nitrato reductasas, sulfuro oxidasa, algunos formiatos deshidrogenasas
Níquel	Presentes en la mayoría de las enzimas hidrogenasas; coenzima de metanógenos; monóxido de carbono deshidrogenasa; ureasa
Selenio	Ocurre en formiato de deshidrogenasa; ciertas hidrogenasas; aminoácido selenocisteína
Tungsteno	En algunos formiatos de deshidrogenasas; oxotransferasas de hipertermófilos
Vanadio	Nitrogenasa de vanadio, bromo peroxidasa
Zinc	En anhidrasa carbónica; alcohol deshidrogenasa, ARN y ADN polimerasa, muchas proteínas de unión al ADN

Fuente: Sayed *et al.* (2021).

La bioestimulación es una de las estrategias de biorremediación que puede ser empleada para poder compensar este déficit de nutrientes generado durante un derrame de hidrocarburos.

3.4. Bioaugmentación y bioestimulación

Existen dos enfoques principales dentro de la biorremediación (Tabla 4): la bioaugmentación y bioestimulación, los cuales sustentan cualquier otra técnica de biorremediación (Das & Chandran, 2011; Argüelles, 2014).

Tabla 4: Estrategias aplicables en procesos de Bioaugmentación y bioestimulación.

Biorremediación	
Bioaugmentación <ul style="list-style-type: none">• Inoculación de células	Bioestimulación <ul style="list-style-type: none">• Nutrientes• Surfactantes• Metabolitos• Enzimas

3.4.1. Bioaugmentación

La Bioaugmentación implica inocular cultivos microbianos concentrados, los cuales son microorganismos exógenos previamente seleccionados por su alta capacidad de biodegradar los contaminantes presentes en el sitio, con el fin de complementar la población microbiana nativa y al mismo tiempo incrementar la tasa de degradación. Estos microorganismos degradan los hidrocarburos utilizando enzimas intracelulares que les permiten utilizar hidrocarburos como fuente de carbono (Singh *et al.*, 2011; El Fantroussi & Agathos, 2005; Nzila *et al.*, 2016).

3.4.2. Bioestimulación

Es el proceso en el cual se busca promover a los microorganismos nativos estimulando su crecimiento por medio de la modificación de los factores limitantes del desarrollo microbiano, adicionando nutrientes u otras sustancias como: aceptores de electrones, biosurfactantes, metabolitos, enzimas, etc. Favoreciendo un óptimo desarrollo microbiano y con ello una degradación más eficiente de los hidrocarburos (Singh *et al.*, 2011; Curiel-Alegre *et al.*, 2022).

Durante el derrame de hidrocarburos existe un rápido agotamiento de nutrientes orgánicos principales como el N y el P en el sitio (Adams *et al.*, 2008), en consecuencia, el suplemento de nutrientes se ha enfocado en la adición de nitrógeno y fósforo, orgánico o inorgánico.

3.5. Indicadores del suelo

Los indicadores son parámetros los cuales permiten conocer y monitorizar la calidad actual de un suelo permitiendo conocer y medir los cambios que ocurren en la matriz del suelo a corto, mediano y largo plazo. Se encuentran relacionados a su estado de conservación, contaminación, productividad o cualquier otra característica que proporcione alguna información sobre el estado actual del suelo y su potencial, a través de la recolección y el análisis de datos obtenidos a partir de mediciones realizadas durante un cierto periodo de tiempo (Llanga *et al.*, 2023). Para que los indicadores sean útiles deben ser: significativos, comprensibles, fáciles de usar e interrelacionar, tener dimensión espacial y temporal, permitiendo pronosticar y detectar situaciones de alerta ambiental (Lema Palaquibay *et al.*, 2023; Nannipieri *et al.*, 2018).

Los indicadores se clasifican en 3 grupos:

- Indicadores físicos
- Indicadores químicos
- Indicadores biológicos

Para evaluar la calidad de los suelos, generalmente se han empleado los indicadores físicos y químicos. Sin embargo, necesitan de periodos largos de tiempo para poder identificar cambios significativos en la calidad del suelo, debido a que presentan una lenta respuesta ante las perturbaciones del suelo (Riveroll-Larios *et al.*, 2015).

3.5.1. Indicadores biológicos del suelo

Los indicadores biológicos son variables u organismos que permiten inferir tempranamente la existencia de cambios bióticos y abióticos en un ambiente. Proporcionan información actual de la calidad de su entorno, así como niveles de contaminación (Luna Bautista *et al.*, 2023; Parmar *et al.*, 2016; Rabelo Rodrigues *et al.*,

2023). Su empleo surge a partir de la necesidad de contar con tecnologías de remediación y herramientas de monitoreo más rentables que hagan frente a los elevados costos de las tecnologías y herramientas usadas tradicionalmente como las físicas y químicas (Maila & Cloete, 2005).

Los indicadores biológicos son utilizados como una herramienta metodológica para evaluar el impacto ambiental de una zona específica, con el fin de encontrar una relación de causa y efecto entre una perturbación humana y los impactos directos o indirectos dentro del ecosistema del suelo (Artigo, 2023). Proporcionando una estimación directa e integral de la biodisponibilidad y de la toxicidad de los contaminantes presentes en el sitio. Aunado a esto presentan una elevada sensibilidad de respuesta ante perturbaciones generadas en el suelo, por lo cual son considerados indicadores tempranos de la calidad del suelo (Maila & Cloete, 2005).

De acuerdo con Parmar *et al.* (2016), los indicadores biológicos se agrupan en 3 grupos principales:

- Plantas
- Animales
- Microbiológicos

Los indicadores microbiológicos se encuentran directamente relacionados con la estructura y funciones de los microorganismos presentes en el suelo, muestran una medida integrada de la calidad de suelo (Maila & Cloete, 2005; Nielsen & Winding, 2002). Dentro de los indicadores microbiológicos que se han utilizado como una herramienta potencial de monitoreo para la remoción de hidrocarburos se encuentran: la actividad enzimática (lipasa y deshidrogenasa), biomasa microbiana, respiración microbiana, estructura y función de las poblaciones de microorganismos (Udom & Nuga, 2011; Nielsen & Winding, 2002; Llanga *et al.*, 2023).

3.5.2. Biodiversidad microbiana

La diversidad microbiana del suelo tiene la capacidad de representar la calidad y la estabilidad del suelo, regulan muchos procesos ecológicos (Yusuf *et al.*, 2021), por lo cual, los indicadores biológicos pueden basarse en la diversidad y la actividad microbiana, pues cambios en ellos suelen anteceder cambios en las propiedades físicas y químicas del suelo, lo cual provee una señal temprana de mejoras o advertencias acerca de la degradación del suelo (Udom & Nuga, 2011).

El suelo al estar en contacto con hidrocarburos sufre alteraciones físicas y químicas, como pueden ser cambios en su pH y disminución de nutrientes, los cuales se encuentran altamente relacionados a la diversidad microbiana (Yusuf *et al.*, 2021). Estas alteraciones modifican la comunidad heterótrofa microbiana propiciando una eliminación gradual de microorganismos relevantes para el mantenimiento del suelo, como las bacterias fijadoras de nitrógeno. Por otro lado se genera un cierto incremento o prevalencia de bacterias como *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.*, las cuales presentan capacidades para degradar hidrocarburos (Maila & Cloete, 2005).

3.5.3. Actividad enzimática

La degradación de hidrocarburos por parte de los microorganismos involucra una variedad de enzimas las cuales son capaces de descomponer hidrocarburos complejos en compuestos más simples, los cuales pueden ser metabolizados por las células microbianas (Radhakrishnan *et al.*, 2023).

Las enzimas son proteínas las cuales se encargan de catalizar las reacciones químicas en el medio ambiente, actúan sobre sustratos específicos transformándolos en productos necesarios para los ciclos biológicos (Ochoa *et al.*, 2010). Se originan principalmente a partir de microorganismos y algunas a partir de residuos de plantas o animales, se van acumulando como enzimas libres en superficies arcillosas o en la materia orgánica del suelo.

Debido a su importante relación con la biología del suelo, proporcionan una evaluación biológica integral de las funciones del suelo, son rápidos, precisos y fáciles de medir (Nannipieri *et al.*, 2018), presentan una gran sensibilidad a los cambios (Uboto & Tewari, 2015). Las actividades enzimáticas se consideran como indicadores biológicos atractivos para el monitoreo de cambios en las actividades microbianas y revelar perturbaciones ocurridas en los ecosistemas. Las actividades enzimáticas han sido probadas durante la contaminación de suelos con hidrocarburos, metales pesados y pesticidas. Además, se han utilizado como indicadores de los ciclos biogeoquímicos, la degradación de la materia orgánica y durante procesos de remediación del suelo (Lee *et al.*, 2020; Maila & Cloete, 2005).

Las enzimas utilizadas con frecuencia para evaluar y monitorizar los efectos de los hidrocarburos en el suelo se dividen en dos grupos: las oxidorreductasas y las hidrolasas (Lee *et al.*, 2020). De las cuales enzimas como la lipasa, deshidrogenasa, catalasas y ureasas del suelo, han sido probadas para monitorizar la eliminación de los hidrocarburos contaminantes (Maila & Cloete, 2005; Angelito-García *et al.*, 2018; Karigar & Rao, 2011; Ajao *et al.*, 2011).

3.5.3.1. Enzimas Lipasas

Pertencen al grupo de enzimas hidrolasas carboxílicas, se encuentran en animales, plantas, algunos protozoos, bacterias, levaduras y hongos. Se encargan de romper los enlaces éster, catalizando la hidrólisis de cadenas largas de acilglicéridos y ácidos grasos, mediante la adición de una molécula de agua, dando lugar a ácidos grasos libres y glicerol. Los hidrocarburos se encuentran clasificados dentro del grupo de lípidos simples, por lo que en teoría pueden ser hidrolizados por enzimas lipolíticas (Cervantes González *et al.*, 2013; Ortellado, 2022; Fatima *et al.*, 2021).

Además, los suelos contaminados con petróleo, aceite y productos derivados son fuentes potenciales para reproducción de la enzima lipasa microbiana las cuales poseen propiedades catalíticas deseables y únicas. Aprovechan a los hidrocarburos como fuente

de carbono, mediante la bioconversión de los lípidos (Mathew & Izomor, 2023; Cervantes González *et al.*, 2013).

3.5.3.2. Enzimas Deshidrogenasas

Las enzimas deshidrogenasas son producidas por bacterias del suelo como las *pseudomonas*, pertenece a un grupo de enzimas oxidorreductasas, las cuales desempeñan un papel muy importante al oxidar la materia orgánica del suelo. Emplean la transferencia de hidrógenos provenientes de sustratos orgánicos hacia los aceptores inorgánicos (Kaczyńska *et al.*, 2015; Uboto & Tewari, 2015; MICUȚI *et al.*, 2017).

El uso de la actividad de la enzima deshidrogenasa permite conocer de manera general los procesos microbiológicos del suelo, debido a que solo se encuentran presentes en microorganismos vivos, siendo parte integral de células intactas. Por lo tanto, no tiene la capacidad de acumularse de manera extracelular en el suelo, lo cual ayuda en la medida directa e indirecta de la actividad microbiológica (Furtak & Gajda, 2017; Henríquez *et al.*, 2014). Su uso como indicador de la calidad y recuperación de los suelos contaminados, radica en procesos de degradación y detoxificación de compuestos xenobióticos, debido a que son enzimas que están muy involucradas en la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Arguijo Portillo, 2017).

4. Antecedentes

Recientemente diversos estudios han evaluado la alteración en la actividad enzimática y de microorganismos degradadores, para su empleo como indicadores biológicos del suelo con presencia de contaminantes derivados del petróleo y el efecto que tienen estos sobre dichos indicadores.

Nyoyoko *et al.* (2019), evaluaron los cambios de la actividad deshidrogenasa y ureasa en suelos contaminados con hidrocarburos, contaminaron suelo con aceite de crudo ligero y aceite de queroseno a diferentes concentraciones (0, 1, 5, 10, 15 y 20 %) respecto al volumen por peso. Sus unidades experimentales fueron matraces, los cuales incubaron a 28°C durante 28 días, teniendo 5 tiempos de análisis (0, 7, 14, 21 y 28 días).

La mayor respuesta deshidrogenasa en el suelo contaminado con petróleo crudo, la obtuvieron a los 21 días de incubación con 1.19 ± 0.01 mg/g 24hrs, para el suelo contaminado con queroseno la mayor actividad deshidrogenasa la obtuvieron los 7 días con 0.78 ± 0.01 mg/g/24hrs. Este comportamiento se repitió para la actividad ureasa, donde la mayor respuesta se observó a los 21 días para suelo contaminado con aceite con 1.34 ± 0.01 mg/g/24hrs, para el suelo contaminado con queroseno la mayor respuesta la observaron los 7 días con 1.25 ± 0.01 mg/g 24hrs.

Sus resultados demostraron que la actividad enzimática se ve alterada en presencia de contaminantes como petróleo crudo y queroseno. La producción enzimática se vio aumentada de manera proporcional a la concentración del contaminante, donde las mayores respuestas enzimáticas las encontraron a concentraciones de 20% de petróleo crudo y queroseno. Esta alteración en la actividad enzimática puede ser una opción viable para predecir, evaluar y remediar el efecto del petróleo crudo y queroseno en el suelo.

En otro estudio Ogbolosingha *et al.* (2015), evaluaron los cambios en la actividad enzimática (lipasa, catalasa y deshidrogenasa) en suelos contaminados con petróleo crudo remediados con especies de *arthrobacter* y *bacillos aislados*. Sus unidades experimentales fueron 3 bolsas de polietileno las cuales contenían 10 kg de suelo contaminados con petróleo crudo (100, 200 y 400 ml) y una bolsa con suelo sin

contaminar. Con los siguientes tratamientos: a) suelo sin contaminar, b) suelo sin remediar, c) suelo remediado con *arthrobacter* y d) suelo remediado con *bacillos*. La cinética se llevó a cabo durante 90 días, haciendo análisis de la actividad enzimática cada 30 días.

Encontraron que la actividad lipasa incrementó en relación con el volumen del contaminante, disminuyendo con el tiempo, el suelo remediado con *arthrobacter* presentó la mayor actividad lipasa. La actividad deshidrogenasa fue disminuyendo con el tiempo en el suelo remediado con *bacillos*, para el resto de tratamientos la actividad deshidrogenasa fue mayor al finalizar la cinética respecto al inicio. La actividad catalasa disminuyó a los 30 días y fue incrementando con el tiempo, este comportamiento se repitió para diferentes volúmenes de petróleo crudo. Concluyeron que el petróleo crudo modifica el comportamiento de la actividad enzimática lipasa, deshidrogenasa y catalasa del suelo, en relación con la concentración y el tiempo.

Jihai Zhou *et al.* (2022), evaluaron la degradación de petróleo de tres especies de nematodos bacterivoros y el efecto que estos tienen en la actividad microbiana y la estructura comunitaria en suelos contaminados con petróleo. El experimento tuvo una duración de 168 días, teniendo 7 tiempos de análisis (0, 7, 14, 28, 56, 112 y 168 días) se analizaron 6 tratamientos: suelo contaminado esterilizado, suelo libre de nematodos, suelo contaminado, suelo contaminado + *Caenorhabditis elegans*, suelo contaminado + *Cephalobus persegnis*, suelo contaminado + *Rhabditis marina*, utilizando matraces de 250 ml como unidades experimentales.

De acuerdo con sus resultados de la degradación del petróleo contaminante, los nemátodos empleados promueven de manera eficiente la degradación de petróleo, donde en los tratamientos inoculados redujeron la concentración de petróleo en un 38.2% *Caenorhabditis elegans*, 42.8% *Cephalobus persegnis*, y 40.2% *Rhabditis marina*, a los 168 días.

Sus resultados demuestran que cada especie de nematodo afecta de manera única la actividad microbiana y la estructura de la comunidad. También se aprecia que la estructura de la comunidad bacteriana se ve alterada por la presencia del petróleo contaminante, donde hay crecimiento de bacterias degradadoras Gram negativas, sobre

las positivas, afectando la relación Gram positiva/Gram negativa y la relación Hongos/Bacterias.

Respecto a la actividad microbiana, se analizó la actividad de la enzima deshidrogenasa en donde se exhibe una tendencia de aumento de deshidrogenasa en presencia de petróleo crudo y una disminución en la actividad conforme disminuye la concentración de petróleo con respecto al tiempo. También la actividad deshidrogenasa tiene variaciones significativas de acuerdo con la especie de nematodo empleado, donde la mayor actividad se encuentra en los suelos inoculados con nemátodos *Cephalobus persegnis* y *Rhabditis marina*, con respecto a los demás tratamientos donde la menor actividad se encontró en el suelo libre de nemátodos.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México

5. Justificación

En Tabasco, hay extensas áreas de suelo con problemas de contaminación por los incidentes relacionados con derrames de hidrocarburos y las actividades propias de la industria petrolera. En años recientes (2018-2021) la Unidad de Transparencia Petróleos Mexicanos, ha reportado 67 derrames en Tabasco, sin considerar los provocados por actos delictivos. Los derrames impactan gravemente la calidad y la salud del suelo alterando sus características físicas, químicas y biológicas y por su naturaleza tóxica afectan la salud de la población y de más seres vivos (Torres *et al.*, 2019).

Por lo cual, es necesario implementar herramientas que permitan conocer el grado de afectación de los suelos y con ello poder establecer estrategias de biorremediación adecuadas a las necesidades de cada sitio, permitiendo recuperar los suelos contaminados con hidrocarburos en el sureste de México.

Es posible conocer la afectación de suelos contaminados con hidrocarburos analizando y monitoreando indicadores biológicos de la calidad del suelo. Los indicadores biológicos representan una alternativa más efectiva frente a los indicadores físicos y químicos (pH, conductividad eléctrica, contenido de materia orgánica, capacidad de campo), pues presentan una mayor sensibilidad de respuesta ante los cambios ocurridos en el suelo. De igual manera, en este sentido los indicadores biológicos permiten evaluar la efectividad de procesos de biorremediación (ej. Bioestimulación y Bioaumentación) valorando la respuesta de los microorganismos nativos y exógenos durante la biodegradación de los contaminantes. Entre los indicadores más empleados se encuentran: la actividad enzimática (lipasa y deshidrogenasa), biomasa microbiana, contenido de microorganismo degradadores (Udom & Nuga, 2011; Nielsen & Winding, 2002; Llanga *et al.*, 2023).

En este sentido el presente proyecto evaluó la respuesta de indicadores biológicos basados en la actividad enzimática lipasa, deshidrogenasa y la presencia de microorganismos degradadores de hidrocarburos en dos suelos contaminados del sureste de México y durante un proceso de bioestimulación.

6. Objetivos.

6.1. General

Evaluar indicadores biológicos de actividad metabólica y presencia de microorganismos degradadores de hidrocarburos en dos suelos contaminados con hidrocarburos.

6.2. Específicos

- Calcular la actividad basal de las enzimas lipasa y deshidrogenasa de dos suelos contaminados.
- Analizar el número de microorganismos degradadores de hidrocarburos presentes en dos suelos contaminados.
- Evaluar la respuesta de la actividad enzimática lipasa y deshidrogenasa en dos suelos contaminados durante un proceso de bioestimulación.

7. Materiales y métodos

7.1. Estrategia experimental

La Figura 1 presenta la estrategia experimental de esta investigación.

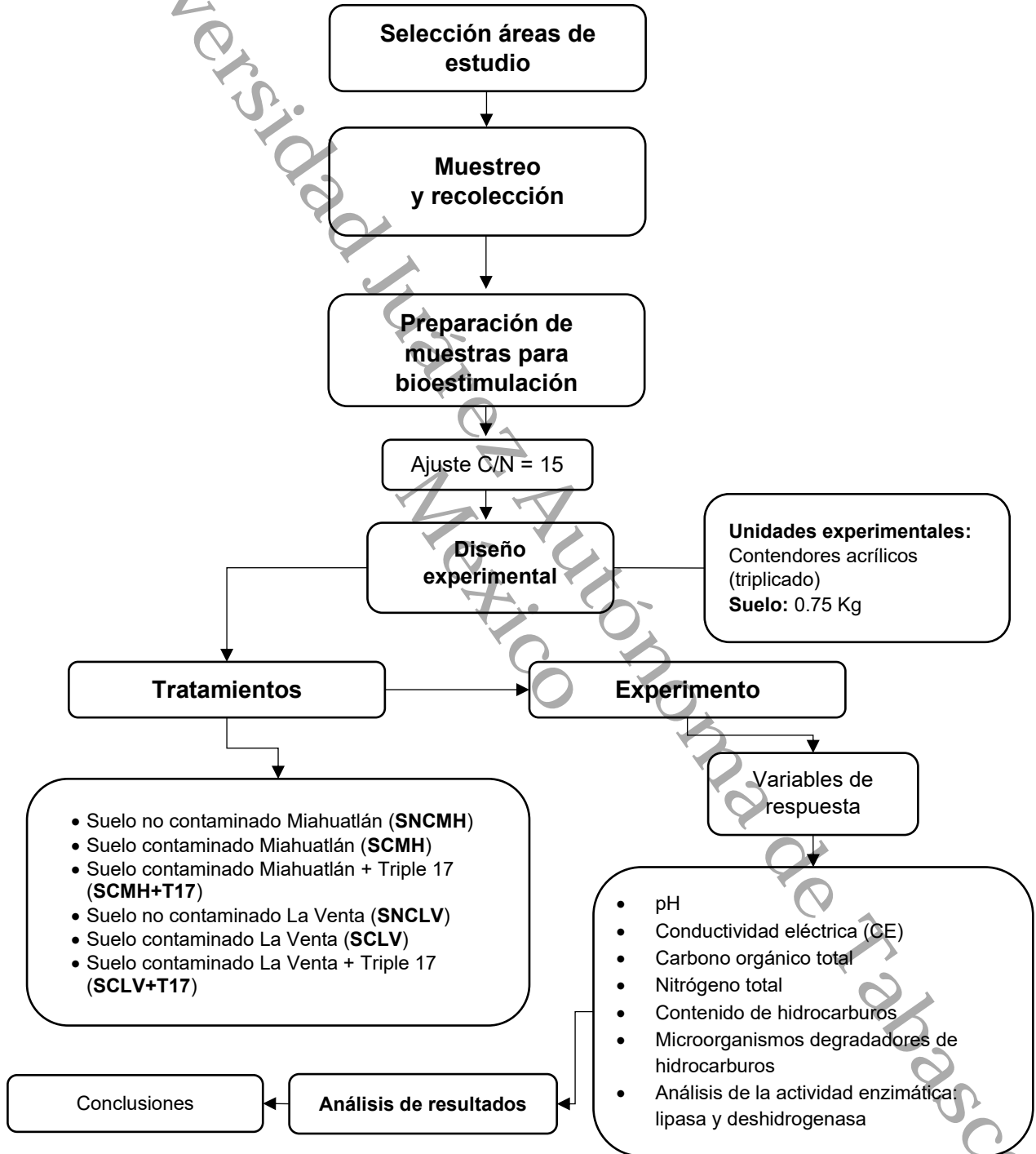


Figura 1: Estrategia experimental para la evaluación de indicadores biológicos en diferentes suelos contaminados con hidrocarburos

7.2. Selección de áreas de estudio

Se identificaron dos áreas de estudio, con reportes de derrames de hidrocarburos los cuales pertenecen al estado de Tabasco:

- Miahuatlán 2da Sección, Cunduacán (SCMH (Suelo contaminado Miahuatlán): 0.35 Ha de sitio afectado por hidrocarburos intemperizados, ubicado dentro de una finca platanera (Figura 2).



Figura 2: Sitio de muestreo de suelo contaminado con hidrocarburos, ubicado en Miahuatlán 2da Sección, Cunduacán, Tab., Suelo recién contaminado (SCMH).

- El Paraíso 2da. Sección, Huimanguillo (SCLV (Suelo contaminado La Venta): Sitio contaminado con hidrocarburos intemperizados y aceite libre, afectando 5Ha pastizal de uso ganadero desde 2017 (Figura 3).



Figura 3: Sitio de muestreo de suelo contaminado con hidrocarburos, ubicado en El Paraíso 2da Sección, Huimanguillo, Tab., Suelo intemperizado (SCLV).

7.1. Muestreo y recolección

Se realizó un muestreo dirigido mediante la percepción hidrocarburos presentes en el sitio, empleando como referencia técnica la NOM-138-SEMARNAT/SS-2012

Se seleccionaron hasta cuatro puntos de muestreo para el suelo contaminado SC (Figura 4a y 4d), tomando muestras a una profundidad de 0 a 50 cm para análisis fisicoquímicos y de 0 a 15 cm para análisis microbiológicos y enzimáticos (Figura 4b). Adicionalmente se recolectó una muestra de suelo no contaminado SNC en un punto adyacente al área afectada (Figura 4c). Las muestras se almacenaron en tubos estériles de 50 ml (análisis microbiológicos y enzimáticos) y en contenedores plásticos (cubetas 19 L). Finalmente fueron transportadas a temperatura ambiente al laboratorio de Bioprocesos y Tecnología Ambiental (División de académica de ciencias biológicas de la UJAT) donde fueron preparadas para su posterior análisis.



Figura 4: Se observa el muestreo realizado en los sitios contaminados; a) recolecta de muestra contaminada SCM_H, b) recolecta de muestra microbiológica SCM_H, c) recolecta de muestra microbiológica de suelo no contaminado SNC_{LV} y d) recolecta de muestra contaminada SCL_V.

7.2. Preparación de las muestras para bioestimulación

Una vez recolectadas las muestras de suelo, se homogeneizaron y tamizaron (malla #8) y se clasificaron para los diferentes análisis basales.

Para los análisis físicos y químicos, el suelo fue secado al aire (Figura 5a). Para los análisis biológicos (enzimáticos y microbiológicos), las muestras solo fueron

tamizadas en húmedo (Figura 5b) y posteriormente se almacenaron en tubos estériles de 50 ml, para su uso se considerará su peso en base seca.



Figura 5: preparación de las muestras recolectadas: a) secado al aire de las muestras de suelo contaminado y b) tamizado de muestras de suelo.

7.3. Diseño experimental

Para el experimento se seleccionó un punto contaminado de cada sitio (P1), con base en un análisis previo del perfil respirométrico de cada muestra recolectada. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado multifactorial, teniendo como variables independientes el tiempo (0,3,7,11 y 15 días) y los tratamientos: a) suelo contaminado bioestimulado (SC + T17) con ajuste de C/N 15 por adición de T17, b) suelo contaminado no bioestimulado y c) suelo no contaminado (control). Las variables de respuesta fueron: a) actividad enzimática lipasa, b) actividad enzimática deshidrogenasa, c) microorganismos degradadores, d) contenido de HTP residuales y e) pH. Para las unidades experimentales se usaron contenedores acrílicos los cuales se les agregó 0.75 Kg de suelo (Figura 6a), se usaron triplicados por cada tratamiento. Las unidades experimentales permanecieron dentro del laboratorio, estando cubiertas y bajo condiciones controladas.

El experimento duró 15 días y consto de 6 tratamientos (Figura 1) con triplicados cada uno, las unidades experimentales fueron divididas de la siguiente manera: Suelo no contaminado Miahuatlán (SNCMH), Suelo contaminado Miahuatlán + Triple 17 (SCMH + T17), Suelo no contaminado La Venta (SNCLV) y Suelo contaminado Miahuatlán + Triple 17 (SCLV).

Se tomaron muestras cada 3 a 5 días por cada unidad experimental para realizar los análisis. Para asegurar la representatividad durante el experimento, el contenido de cada unidad experimental se homogeneizó y se subdividió al tomar muestras para los diferentes tiempos de muestreo (Figura 6b).



Figura 6: Unidad experimental: a) pesado de muestras para las unidades experimentales y b) toma de muestras para análisis de variables.

7.4. Métodos analíticos

7.4.1. Indicadores físicos y químicos

7.4.1.1. Porcentaje de humedad (%Humedad)

Para determinar el porcentaje de humedad se empleó una termobalanza (Figura 7), la cual calcula la humedad mediante la diferencia en la pérdida de peso de una muestra de suelo (5 gramos), donde la muestra es sometida a un proceso de calentamiento a 160°C.



Figura 7: Determinación del porcentaje de humedad utilizando termobalanza

7.4.1.2. pH y Conductividad eléctrica

Se utilizó el método descrito en la NOM-021-SEMARNAT-2000, con las modificaciones siguientes: se hará una mezcla con 5 gramos de suelo y 50 ml de agua destilada, se agitó durante 30 minutos y dejando reposar durante 24 horas, posteriormente se tomaron lecturas de pH en el sobrenadante (Figura 8). Se empleó un multiparamétrico de la marca Thermo modelo Orion 8172BNWP, el cual se encontraba previamente calibrado.

Para la medición de conductividad eléctrica se utilizó el mismo filtrado del pH, tomando lecturas en un tubo de 30 ml, introduciendo un electrodo de conductividad con detector de temperatura (Thermo modelo Orion 8172BNWP), calibrado previamente con soluciones estándar de KCl a dos diferentes concentraciones (1.4 y 12.9 mS cm⁻¹).



Figura 8: Determinación de pH empleando equipo multiparamétrico Thermo modelo Orion 8172BNWP

7.4.1.3. Contenido de hidrocarburos totales de petróleo (HTP)

La determinación de hidrocarburos totales de petróleo se realizó mediante el método de extracción Soxhlet EPA-3540C (Figura 9a), se pesaron triplicados de muestras de suelo (10g) y sulfato de sodio anhidro en relación 1:1, fueron puestos y mezclados en cartuchos de celulosa. Para la extracción se usaron 160 ml de una mezcla solvente hexano/acetona en relación 1:1 y se mantuvo en reflujo durante 8 horas (Figura 9a).

Una vez extraídos los hidrocarburos se recuperó el solvente por evaporación con un rotavapor (Figura 9b), colocando el extracto de hidrocarburos en charolas de aluminio a peso constante, las charolas fueron calentadas, donde el solvente restante se evaporó (Figura 9c). La concentración de hidrocarburos (mg kg^{-1}) fue determinado por gravimetría.



Figura 9: Se muestra la extracción de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) del suelo: a) Sistema de extracción soxhlet puesto a reflujó por 8 horas, b) recuperación de solvente y c) evaporación de solvente residual en HTP.

7.4.1.4. Carbono orgánico total

La determinación del carbono orgánico total se determinó de acuerdo con la NMX-FF-109-SCFI-2007, para lo cual se debe determinar el porcentaje de cenizas y de materia orgánica. Se pesó un gramo de suelo en un crisol (debe estar a peso constante) y posterior se calentó a 550°C durante 2 horas (Figura 10a y 10b), posteriormente se enfriaron dentro de un desecador y finalmente se pesaron para hacer los cálculos correspondientes con las siguientes fórmulas:

% de Cenizas

Donde:

PCC: Peso del Crisol con Cenizas

PC: Peso del Crisol

Pm: Peso de la Muestra (g)

100: Factor de conversión a porcentaje

% de Materia orgánica

% de Carbono orgánico total

Donde:

COT: Porcentaje de carbono orgánico total

%MO: porcentaje de Materia orgánica

1.724: constante de Van Bemmelen



Figura 10: Se muestra la determinación de carbono orgánico: a) uso de mufla para calentar las muestras de suelo y b) cenizas obtenidas después del calentamiento a 550 °C.

7.4.1.5. Nitrógeno total

La medición del nitrógeno total se realizó mediante el método de Kjeldahl para N-total (TKN) tomando como referencias técnicas la norma NOM-021-SEMARNAT-2000 y la norma ISO 11261. Se empleó un equipo semiautomatizado para la determinación de nitrógeno (marca Büchi) (Figura 11), se pesaron 0.3g de suelo seco (triplicados), poniéndolo dentro de tubos Kjeldahl (300 ml) mezcla de catalizadores y 10 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4).



Figura 11: Sistema semiautomatizado para determinación de Nitrógeno de la marca Büchi

Posteriormente los tubos fueron sometidos a un proceso de digestión (alrededor de 2 h) con temperatura controlada (Büchi K-425) (Figura 12a). Una vez concluido el proceso de digestión los tubos fueron trasladados a la unidad destiladora (Büchi K-365) (Figura 12b). La destilación se llevó a cabo de manera automática y simultáneamente se

realizó la determinación por titulación potenciométrica con ácido clorhídrico (HCl, 0.1 M), con la ayuda de un titulador (Metrohm) (Figura 12c). Se registraron los valores obtenidos del consumo de HCl para las muestras y blancos y se empleó la siguiente fórmula para poder determinar el contenido de nitrógeno total:

Donde:
%NT: contenido de nitrógeno total en porcentaje
P: peso de la muestra
Vm: volumen de ácido sulfúrico gastado en la titulación de la muestra

Vb: volumen de ácido sulfúrico gastado en la titulación del blanco
N: normalidad del ácido sulfúrico (0.05)
14: peso equivalente del nitrógeno
10: factor de conversión a porcentaje



Figura 12: Se muestra la determinación de nitrógeno: a) Proceso de digestión, b) Proceso de destilación y c) Titulación potenciométrica.

7.4.1.6. Ajuste de la relación carbono/nitrógeno (C/N)

Para el ensayo de bioestimulación se ajustó la relación Carbono/Nitrógeno (C/N), la determinación del carbono total de suelo se basó en el método descrito anteriormente (la NMX-FF-109-SCFI-2007), la determinación del nitrógeno se realizó de acuerdo con lo descrito en la NOM-021-SEMARNAT-2000 y la ISO 11261. Una vez obtenido el contenido de carbono total y de nitrógeno del suelo, se convirtió el contenido fraccional (%) a kilogramos y luego se ajustó la relación C/N, considerando la cantidad de nitrógeno por kilogramo de suelo. Se adicionó el fertilizante comercial Triple 17 (disuelto en agua), como fuente de Nitrógeno (Figura 13).



Figura 13: Adición de fertilizante T17 a las unidades experimentales para el ajuste de C/N

7.4.2. Indicadores biológicos

7.4.2.1. Microorganismos degradadores de hidrocarburos

Para determinar los microorganismos degradadores (hexadecano), se empleó el método del número más probable (NMP) propuesto por Wrenn & Venosa, (1996). Se emplearon microplacas con 98 pocillos, en los cuales se les agregaron: hexadecano (previamente filtrado, 0.22 μm) funcionando como fuente de carbono, 20 μL de inóculo provenientes de diluciones seriadas hasta 10^{-8} (Figura 14a), realizando triplicado por cada dilución.

Las microplacas fueron incubadas durante 7 días a 35°C, posteriormente se adicionó Iodo-nitro Tetrazolio (INT, Figura 14b) en cada pocillo inoculado y se dejó incubar por 24 horas más. La reducción del INT en iodo-nitro Formazan (INF) genera una tonalidad violeta, este cambio es utilizado como indicador de respuesta positiva a presencia de microorganismos degradadores de hexadecano existentes en cada dilución (Figura 14c).

Para cuantificar el número de microorganismos degradadores por gramo de suelo seco, se usó el software en línea “Most Probable Number (MPN) Calculator” de la EPA, con un 95% de confianza en la prueba de Cornish & Fisher.

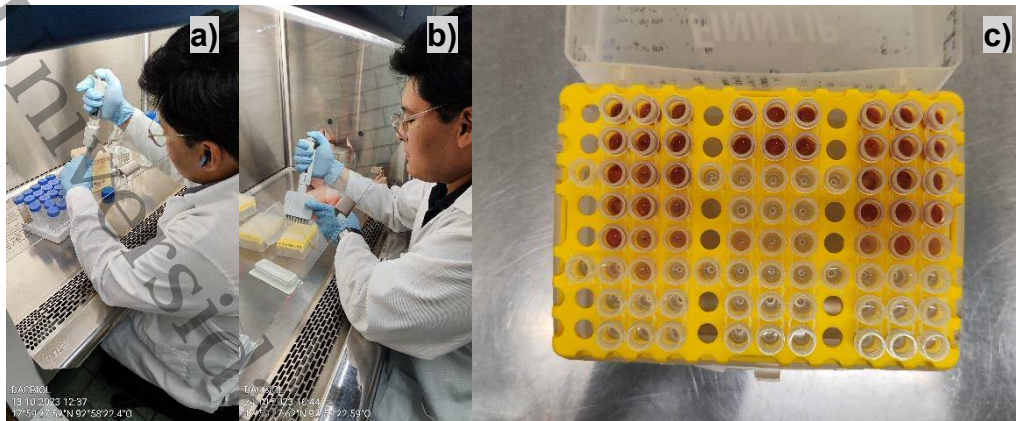


Figura 14: Se muestra la determinación de microorganismos degradadores: a) Diluciones seriadas, b) Adición de INT en microplacas y c) Microplacas después de incubación, pozos con tonos rojizos indican presencia de microorganismos degradadores.

7.4.2.2. Actividades enzimáticas

Enzima lipasa

La actividad de la enzima lipasa se determinó con el método propuesto por Margesin, (2005), en el cual se emplea p-nitrofenol butirato (p-NPB) como sustrato, diluido en alcohol isopropílico. Se emplearon tubos estériles para centrifuga de 15 ml en donde se pesaron 0.1 g de suelo seco y se le adicionó buffer de fosfatos pH 6.2 para una posterior incubación en agua a 35°C por 10 minutos. Al finalizar la incubación se agregó 50µL de sustrato (p-NPB) (Figura 15a), posteriormente se agitó con vortex por 2 minutos para homogeneizar la mezcla. Para comenzar la reacción se puso en una segunda incubación en agua por 10 minutos, para finalizar la reacción se sometió a un baño de agua fría a 4°C. Finalmente, se centrifugaron los tubos a 3,500 RPM a 4°C durante 10 minutos (Figura 15b), el sobrenadante se empleó para medir la absorbancia del p-nitrofenol (p-NP) a 405nm con ayuda de un espectrofotómetro (Figura 15c) de UV-Visible modelo Evolution 220 (ThermoScientific).

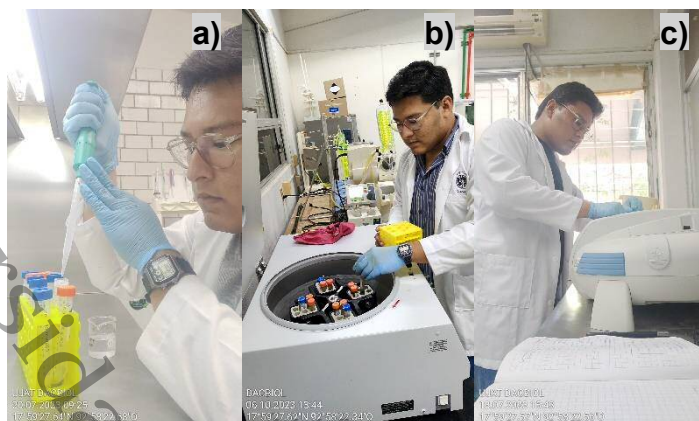


Figura 15: Se muestra la determinación de enzimática lipasa: a) Adición de p-NPB a las muestras, b) Centrifugado de las muestras y c) Lectura de las muestras a 405nm.

Enzima deshidrogenasa

La determinación de la enzima deshidrogenasa se basó en el método propuesto por Von Mersi & Schinner, 1991 y modificado por Neto *et al.*, 2007. Se pesaron 0.5 g de suelo seco y se colocaron en tubos para centrifuga estériles de 15 ml, se adicionaron 2 ml de buffer tris-base pH 7 (1M) y 2 ml de Iodonitrotetrazolio (INT, 5 mM, como sustrato), posteriormente se agitó con vortex durante 2 minutos, al finalizar se incubaron los tubos a 35°C durante 24 horas.

Finalizando el periodo de incubación los tubos se agitaron en vortex por 2 minutos e inmediatamente se centrifugaron durante 10 minutos a 3,500 rpm y a 10°C. Se desecho el primer sobrenadante obtenido de cada tubo, el sedimento fue lavado con 3 a 5 ml de acetona (Figura 16a), agitándolo con vortex durante 2 minutos y centrifugando durante 10 minutos a 3,500 rpm y a 10°C (Figura 15c). El sobrenadante obtenido en los lavados se guardó en tubos para centrifuga con capacidad para 50 ml. El proceso del lavado del sedimento se repitió hasta que el sobrenadante no presentara un tono violeta, como se muestra en la Figura 16b. Finalmente el sobrenadante fue leído a 493nm (Figura 16d y 16e) con la ayuda de un espectrofotómetro de UV-Visible modelo Evolution 220 (ThermoScientific).

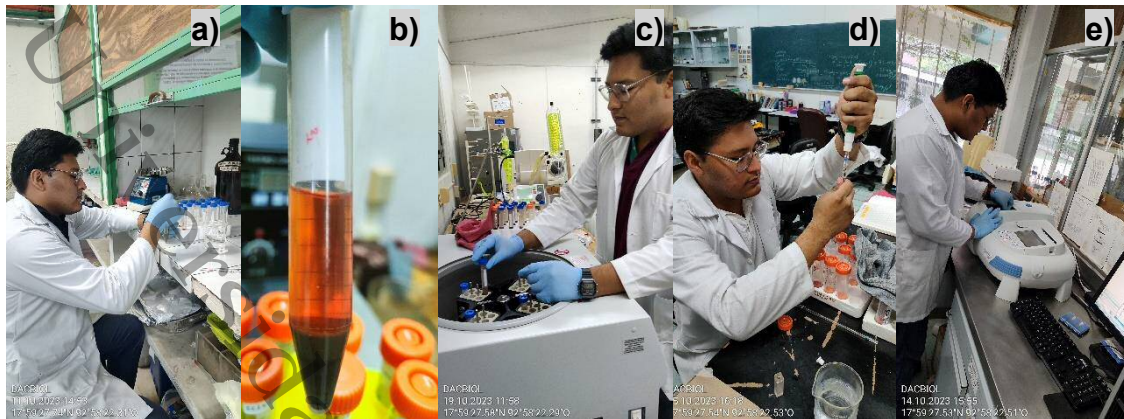


Figura 16: Se muestra la determinación de enzimática deshidrogenasa: a) Adición de acetona a las muestras para extracción de INF b) INF extraído del suelo, c) Centrifugado de muestras, d) Extracción de sobrenadante y e) Lectura de sobrenadantes a 493nm.

7.5. Análisis estadístico

Al finalizar con la experimentación se analizaron las diferencias estadísticas mediante un análisis de varianza (ANOVA multifactorial) haciendo uso del programa estadístico Statgraphics Centurión XVI. Donde se analizaron las variaciones en las medias de las actividades enzimáticas lipasa y deshidrogenasa respecto a cada tratamiento y por tiempo (ANOVA multifactorial).

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre las medias de las variables de nitrógeno, pH, actividad lipasa y actividad deshidrogenasa durante tiempos de muestreo específicos.

8. Resultados y discusión

8.1. Relación carbono nitrógeno

En el desarrollo de la experimentación para la evaluación de los indicadores biológicos en los suelos contaminados con hidrocarburos bajo condiciones de bioestimulación (adición de del fertilizante triple 17), se determinó el contenido de carbono y nitrógeno inicial y final. Esto permitió calcular la relación C/N y estimar el balance nutricional y los efectos de los tratamientos ensayados. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultado del ajuste de la relación C/N. Donde **C_i**: carbono inicial promedio, **N_i (%)**: porcentaje de nitrógeno inicial, **C/N_i**: C/N promedio inicial, **C_f**: carbono final promedio, **N_f (%)**: porcentaje de nitrógeno promedio final y **C/N_f**: C/N final promedio.

Tratamiento	C _i	N _i (%)	C/N _i	C _f	N _f (%)	C/N _f
SNCMH	5.94	0.22	26.89	5.71	0.19	29.44
SNCLV	2.66	0.07	35.89	3.66	0.08	46.28
SCMH	7.76	0.15	54.76	7.85	0.23	34.98
SCLV	19.35	0.53	37.73	18.71	0.62	30.03
SCMH+T17	7.31	0.42	17.68	7.43	0.40	18.68
SCLV+T17	19.48	1.10	17.67	18.85	0.99	19.12

Con la adición del fertilizante T17, se logró incrementar el contenido de nitrógeno en un 35% y 0.48% para los tratamientos SCMH+T17 y SCLV+T17. Este incremento en el contenido de nitrógeno permitió ajustar la relación C/N para estos tratamientos (SCMH+T17 y SCLV+T17), resultando con valores iniciales de 17.68 y 17.67 respectivamente. La C/N ajustada inicial en los tratamientos bioestimulados fue 3.1 y 2.14 veces menor que en los tratamientos sin adición de fertilizante (SCMH y SCLV), respectivamente, en los cuales la relación C/N tuvo un nivel entre 37 a 55, respectivamente.

Al finalizar la experimentación se pudo apreciar un incremento en el contenido de nitrógeno para tratamientos sin bioestimulación SCMH y SCLV siendo 0.6 y 0.8 veces mayor respecto a los valores iniciales, de acuerdo con una comparación de medias ANOVA ($P > 0.05$), este aumento en el contenido de nitrógeno, para ambos tratamientos, no representa una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos SCMH

y SCLV. En el mismo sentido, en cuanto a los tratamientos SCMH+T17 y SCLV+T17 se pueden observar diferencias en el contenido de nitrógeno inicial y final; sin embargo, estas diferencias no son significativas ($P>0.05$). Mientras que el contenido inicial de nitrógeno en el tratamiento SCLV+T17 fue 4.76% mayor respecto al final, este incremento representa diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$).

8.2. pH y Conductividad eléctrica

La Figura 17 presenta el comportamiento del pH en los diferentes tratamientos durante el tiempo experimental. La Figura 17a corresponde a los tratamientos con suelo proveniente de Cunduacán, donde se observan valores de pH entre 5 y 6.80. El tratamiento SCMH presentó las lecturas iniciales más elevadas de pH, respecto a los demás tratamientos. Transcurridos 11 días, los tratamientos SCMH y SCMH+T17 presentaron las lecturas más altas de pH con valores de 6.67 y 6.33, respectivamente; mientras que el tratamiento SNCMH presentó su mayor lectura al inicio del experimento (pH~6.05). Los tratamientos SCMH y SCMH+T17 presentaron diferencias estadísticamente significativas en el tercer día de muestreo (HSD 95% de confianza y $P<0.05$), donde el SCMH+T17 alcanzó la lectura de pH más baja (5.07), respecto al SCMH.

La Figura 17b corresponde a los tratamientos con suelo proveniente de Cunduacán, donde se observan valores de pH entre 4.5 y 6.5. El tratamiento SCLV+T17 presentó las mayores lecturas de pH durante el experimento respecto a los demás tratamientos, registrando su mayor valor (6.33) a los 11 días del experimento. Todos los tratamientos presentaron una disminución en las lecturas de pH los 7 días del experimento, siendo más notable en el tratamiento SCLV+T17 con un valor de pH de 5.26.

De acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000 los valores de pH durante el experimento indican que ambos suelos son "Moderadamente ácidos" por presentar valores de entre 5 - 6.5; sin embargo, los valores finales de pH en los tres tratamientos se encuentran cercanos al rango de pH óptimo (6-6.5) donde existe una mayor

disponibilidad de nutrientes para la mayoría de los cultivos, de acuerdo a lo reportado por Osorio (2012). Al final del experimento existen diferencias significativas (HSD 95% de confianza y $P < 0.05$) entre los tratamientos SCMH y SNCMH.

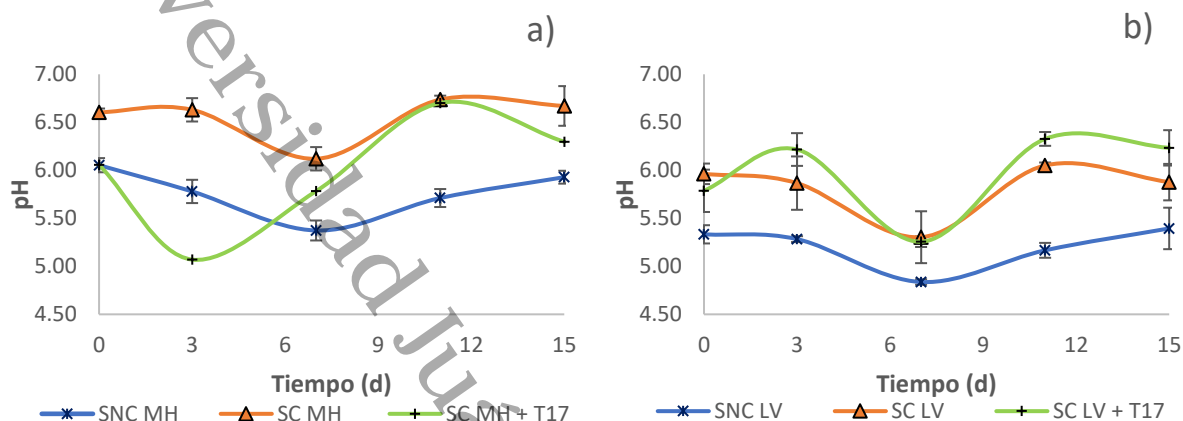


Figura 17. Valores de pH registrados para cada tratamiento con respecto al tiempo. Dónde: a): Suelo proveniente de Cunduacán y b) Suelo Proveniente de Huimanguillo. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas

El comportamiento de la conductividad eléctrica (CE) para los diferentes tratamientos durante el tiempo experimental se presentan en la Figura 18. Se puede apreciar un aumento significativo en los valores de CE para los tratamientos bioestimulados (SCMH+T17 y SCLV+T17); el aumento se puede atribuir a la adición del fertilizante T17, el cual incrementa el contenido de sales, siendo una de las principales causas de salinización en suelos (Jordan-López, 2009). Los resultados del suelo proveniente de Cunduacán se muestran en la Figura 18a, donde se puede ver que los valores de CE se mantienen dentro de 160 y 250 $\mu\text{s cm}^{-1}$ para los tratamientos SNCMH y SCMH, los cuales no tienen presencia de T17. Mientras que el tratamiento SCMH+T17 presentó valores iniciales de 2,912.37 $\mu\text{s cm}^{-1}$ el cual fue disminuyendo respecto al tiempo, hasta llegar a un valor de 1,071 $\mu\text{s cm}^{-1}$, al término del experimento.

La Figura 18b presenta los resultados obtenidos con el suelo proveniente de Huimanguillo, donde los mayores niveles de CE se presentaron en el tratamiento SCLV+T17, inicialmente el valor fue de 1,549.67 $\mu\text{s cm}^{-1}$, y al finalizar la experimentación presentó valores de 2,289 $\mu\text{s cm}^{-1}$, teniendo un comportamiento inverso respecto al tratamiento SCMH+T17, ambos bioestimulados. Los valores de CE en el tratamiento

SCLV se mantuvieron dentro de 100 - 270 $\mu\text{s cm}^{-1}$. Para el SNCLV la CE estuvo dentro de 40-70 $\mu\text{s cm}^{-1}$, siendo el tratamiento con los valores más bajos de CE.

De acuerdo con estos resultados el tratamiento SCLV+T17 se considera moderadamente salino según lo establecido en la NOM-021-RECNAT-2000, mientras que el SCM+T17 se considera muy ligeramente salino, lo cual se debe probablemente al incremento de sales por la adición del fertilizante T17. Mientras que, de acuerdo a los criterios establecidos en la NOM-021-RECNAT-2000, la salinidad para los tratamientos SCM, SCLV SNCMH y SNCLV se considera con efectos despreciables, debido a que presentan valores $<1000 \mu\text{s cm}^{-1}$.

Estos resultados son similares con los reportados por González-Díaz (2014), quien obtuvo valores de CE de $\sim 1,700 \mu\text{s cm}^{-1}$, en un suelo artificialmente contaminado ($30,000 \text{ mg HTP Kg}^{-1}$) bioestimulado con T17 y en uno bajo condiciones de intemperización (bioestimulado) de entre 1,600 a $3,000 \mu\text{s cm}^{-1}$. En ambos casos los valores de CE fueron significativamente mayores que en los suelos no adicionados con triple 17. En este trabajo las muestras analizadas fueron recolectadas en sitios con condiciones similares, uno recién contaminado (sitio ubicado en Miahuatlán, Cunduacán) y uno intemperizado (sitio localizado en La Venta, Huimanguillo) siendo el comportamiento de CE similar.

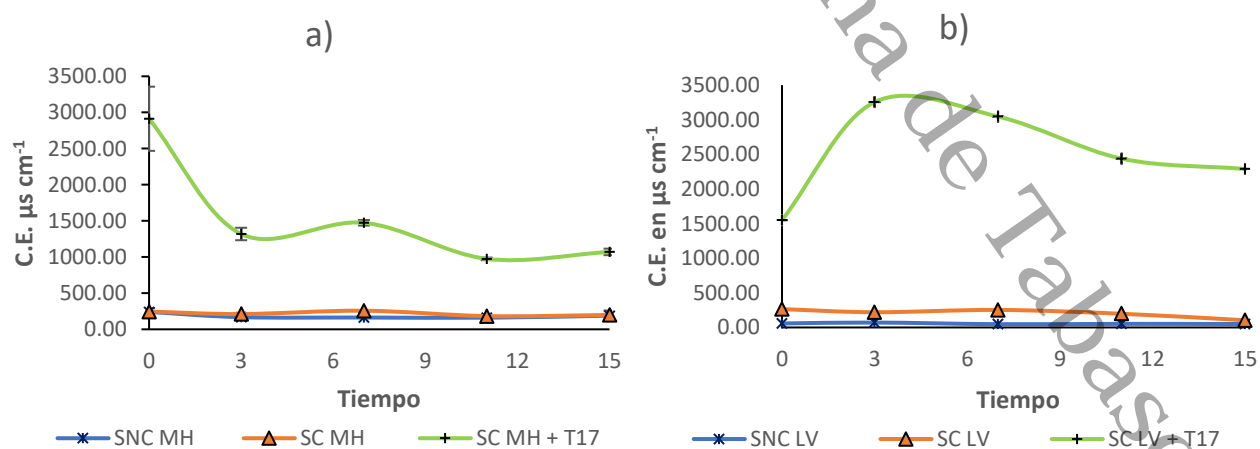


Figura 18 Valores de CE registrados para cada tratamiento con respecto al tiempo. Dónde: a) Suelo proveniente de Cunduacán y b) Suelo proveniente de Huimanguillo. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas

8.3. Contenido de hidrocarburos totales del petróleo (HTP)

Se realizó un análisis inicial y final para determinar la biodegradación alcanzada al término de la experimentación, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6. El suelo proveniente de Huimanguillo presentó las concentraciones iniciales más elevadas de hidrocarburos con valores que variaron en un rango dentro de 117,600 a 125,000 mg HTP Kg suelo⁻¹, mientras que en el suelo proveniente de Cunduacán la concentración varió entre 14,000 y 17,000 mg HTP Kg suelo⁻¹, para el suelo bioestimulado y no bioestimulado, respectivamente.

El mayor porcentaje de biodegradación se presentó en los tratamientos sin bioestimular SCMH y SCLV con 15.78 y 6.85% de biodegradación, al finalizar la experimentación (15 días). Los tratamientos bioestimulados SCMH y SCMH+T17 presentaron una degradación de 7.01% y 2.59%, respectivamente. Lo cual denota el alto potencial de biodegradación por parte de los microorganismos autóctonos sin bioestimular. En el caso de los suelos adicionados con T17, el bajo grado de biodegradación puede atribuirse al incremento en la salinidad registrada y en el caso del suelo de La Venta, además, debe considerarse que se trata de un suelo intemperizado con condiciones (ej. elevado contenido de materia orgánica altamente humificada) que limitan la biodisponibilidad de los compuestos contaminantes (Velázquez-Vázquez *et al* 2022).

Tabla 6. Contenido de hidrocarburos iniciales y finales para los tratamientos con suelo contaminado. %B: porcentaje de biodegradación, TCG: Tasa de consumo global. Se presenta el contenido de hidrocarburos promedio de 3 réplicas.

Contenido de hidrocarburos				
Tratamiento	Tiempo	Contenido de HTP [mg HTP Kg suelo ⁻¹]	%B	TCG [mg * Kg ⁻¹ d ⁻¹]
SCMH	0	16,906.43 ± 823.01	15.78	177.87
	15	14,238.31 ± 702.91		
SCMH+T17	0	14,107.27 ± 650.57	7.01	65.96
	15	13,117.84 ± 1,220.96		
SC LV	0	124,947.01 ± 5,917.13	6.85	570.30
	15	116,392.47 ± 4,884		
SCLV+T17	0	117,690.68 ± 673.50	2.59	202.97
	15	114,646.09 ± 2,784.48		

Perdomo & Pardo (2004), evaluaron la degradación de petróleo crudo en un suelo contaminado (23,280 mg HTP Kg suelo⁻¹), para lo cual llevaron a cabo un proceso de biolabranza con bioestimulación adicionando fertilizante T15. Reportaron una degradación promedio del 7.6% durante su primer mes de análisis en sus tratamientos bioestimulados con T15, en contraste con sus tratamientos sin bioestimar, en donde obtuvieron una degradación promedio del 2.3% durante el primer mes de análisis. Al finalizar la experimentación (4 meses) los tratamientos bioestimulados alcanzaron una remoción de HTP del 91% en comparación a los tratamientos sin bioestimar con un 65%. En el presente trabajo la degradación promedio, en un periodo de 15 días, fue similar a los reportados por Pardo Castro y Perdomo Rojas, los tratamientos bioestimulados con T17 alcanzaron una degradación del 7.01% en el suelo perteneciente a Cunduacán y 2.59% para el suelo de Huimanguillo.

8.4. Microorganismos degradadores de hidrocarburos (NMP)

En la Tabla 7 se muestran los resultados del contenido de microorganismos degradadores para los tratamientos con suelo contaminado. Se observa que, los tratamientos SCMH+T17 y SCLV+T17 presentaron un incremento del 183% y 218% en el contenido de microorganismos degradadores. El mayor incremento de microorganismos degradadores se obtuvo en el suelo proveniente de Huimanguillo (SCLV+T17) con 9.33×10^5 NMP* g suelo⁻¹. Por otro lado, los tratamientos no bioestimulados SCMH y SCLV presentaron una disminución del en el contenido de degradadores.

Tabla 7. Contenido inicial y final del NMP de microorganismos degradadores de hidrocarburos por gramo de suelo, para los tratamientos con suelo contaminado. NMP: Número más probable. Cálculos realizados con el software en línea "Most Probable Number (MPN) Calculator" de la EPA, con 95% de confianza en la prueba de Cornish & Fisher. Se muestran el contenido de microorganismos degradadores promedio de 3 réplicas.

Tratamiento	Microorganismos degradadores [NMP * g suelo ⁻¹]	
	Iniciales (10 ⁵)	Finales (10 ⁵)
SCMH	4.27	0.24
SCMH+T17	2.40	4.38
SCLV	20.50	2.67
SCLV+T17	4.27	9.33

8.5. Actividad enzimática lipasa

En la Figura 19 se muestra el seguimiento de la actividad lipasa (LPS) para cada tratamiento durante la experimentación. Se observa que la actividad LPS en ambos suelos fue mayor durante los primeros 7 días del experimento, teniendo diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de rangos múltiples Tukey (HSD, 95% de confianza) del análisis multifactorial ($p < 0.05$) y posteriormente fue disminuyendo.

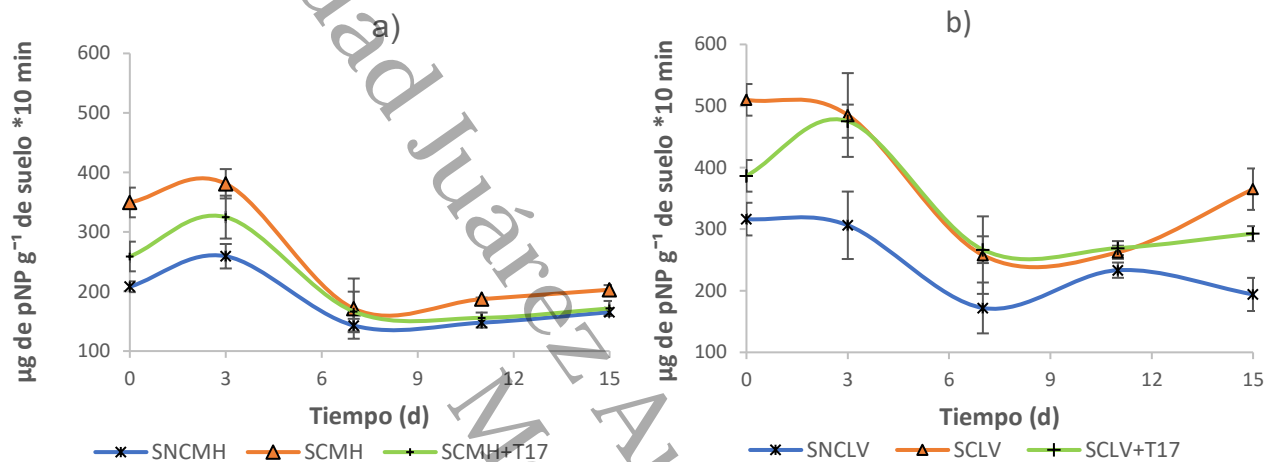


Figura 19. Actividad enzimática lipasa promedio para los diferentes tratamientos en los diferentes tiempos de análisis del experimento. Dónde: a) Suelo proveniente de Cunduacán y b) Suelo proveniente de Huimanguillo. p-NP: Para-Nitrofenol liberado durante la determinación. Cada punto representa el promedio de 3 réplicas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) (HSD 95% de confianza y $P < 0.05$).

La mayor actividad LPS para el suelo proveniente de Cunduacán se encontró en el tratamiento sin bioestimar SCMH (Figura 19a) durante el tercer día (381.03 ± 50.56 µg de pNP g⁻¹ de suelo seco 10 min). Los tratamientos SCMH+T17 y SNCMH también alcanzaron su producción máxima al tercer día con 259.32 ± 11.26 y 324.99 ± 33.37 g de pNP g⁻¹ de suelo seco 10 min, respectivamente. Durante este tiempo de muestreo (tercer día) se realizó un análisis de varianza (ANOVA) (HSD 95% de confianza y $P < 0.05$), encontrando que, el SCMH+T17 es estadísticamente diferente al SNCMH, mientras que no presentan diferencias significativas con el SCMH.

Para el séptimo día ocurrió una disminución en la actividad LPS en los tres tratamientos, siendo más notorio en el SCMH, posteriormente se mantuvieron en rangos de 140 y 175 µg de pNP g⁻¹ de suelo seco 10 min. Al finalizar el experimento (15 días) la mayor producción lipasa se mantuvo en el SCMH, presentando diferencias

estadísticamente significativas con el SNCMH, mientras que no presenta diferencias significativas con el SCM_H+17 (HSD 95% de confianza $P < 0.05$).

Se analizaron las medias de los tres tratamientos mediante un análisis ANOVA multifactorial (HSD 95% de confianza) donde se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos, donde la mayor tasa de producción enzimática LPS se encontró en el SCM_H. Para este suelo recién contaminado el efecto esperado de la bioestimulación no fue significativo, provocado posiblemente, por los valores de pH en el SCM_H+T17, los cuales fueron cercanos a pH 5 durante el tercer día. De acuerdo con lo reportado por Osorio (2012), valores de pH cercanos a 5 pueden generar toxicidad para microorganismos fijadores de N₂, por la elevada presencia de Aluminio soluble (Al³⁺), lo cual pudo retrasar el aprovechamiento del nitrógeno.

En la Figura 19b se puede observar que en el tratamiento SCLV se encontró las mayores respuestas en la actividad LPS al inicio y final del experimento, teniendo valores entre 510.02 ± 68.04 y 364.94 ± 34.49 μg de pNP g⁻¹ de suelo seco 10 min. El tratamiento SCLV+T17 alcanzó su mayor producción (475.33 ± 21.72) durante el tercer día, manteniendo ligeramente la mayor actividad LPS hasta el día 11. El análisis de varianza (ANOVA) ($P < 0.05$) demostró que no existen diferencias entre los tratamientos SCM_H y SCM_H+T17, durante el tercer día del experimento. El SNC tuvo la menor actividad LPS, alcanzando su producción más baja al séptimo día (194.05 ± 7.82 μg de pNP g⁻¹ de suelo seco 10 min). Al final de la experimentación se realizó un análisis de varianza (ANOVA) demostrando que existen diferencias significativas entre los tres tratamientos (HSD 95% de confianza y $P < 0.05$).

En 2014 Gonzales-Diaz evaluó la actividad biológica y potencial de biodegradación de un suelo contaminado, donde los valores más bajos encontrados durante su evaluación corresponden a un tratamiento bioestimulado con T17. Reportó un comportamiento similar en la actividad lipasa, hallando valores en un rango de 100 a 450 μg de pNP g⁻¹ de suelo seco 10 min.

Se analizaron las medias de los tres tratamientos mediante un análisis ANOVA multifactorial, (HSD 95% de confianza) demostrando que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos SCLV y SCLV+T17, lo cual indica que para este suelo con hidrocarburos intemperizados no existe diferencia estadística en la producción enzimática si se bioestimula con adición nutrientes (T17).

8.6. Actividad de la enzima deshidrogenasa

En la Figura 20 se muestra el seguimiento de la actividad deshidrogenasa (DHS) para cada tratamiento durante la experimentación. Donde se puede observar que existe una mayor respuesta DHS en los tratamientos con presencia de hidrocarburos respecto a los tratamientos no contaminados SNCMH y SNCLV.

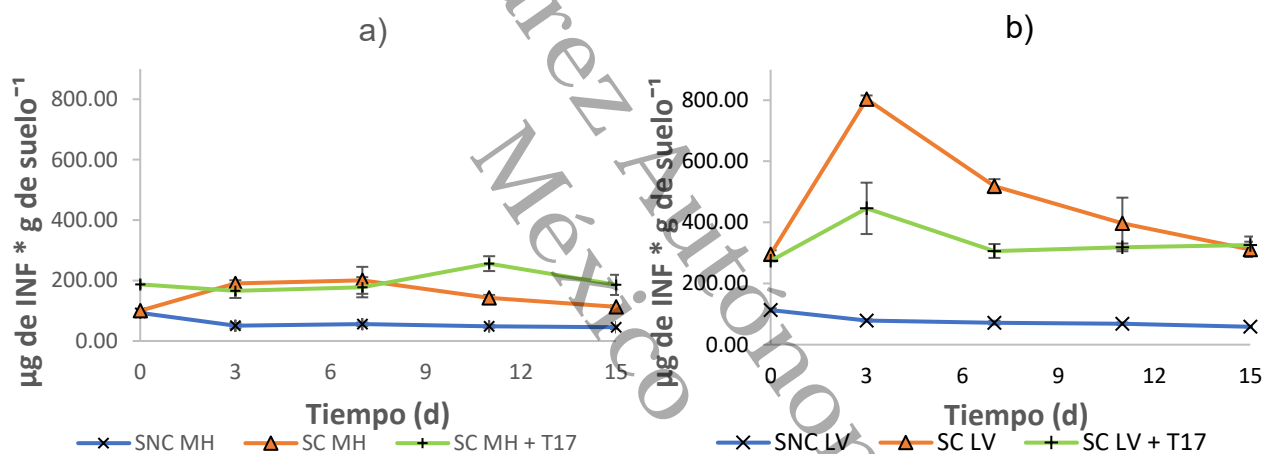


Figura 20. Actividad enzimática deshidrogenasa para los diferentes tratamientos en los diferentes tiempos de análisis del experimento. Donde: a) Suelo proveniente de Cunduacán y panel b) Suelo proveniente de Huimanguillo. INF: iodo-nitro-formazan liberado durante la determinación. Cada punto de representa el promedio de 3 réplicas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) (HSD 95% de confianza y $P < 0.05$).

La figura 20a presenta la actividad deshidrogenasa para el suelo proveniente de Cunduacán, donde la mayor actividad DHS se encontró en SCMH+T17 a los 11 días, alcanzando su mayor producción (256.00 ± 33.35 µg de INF/g de suelo). Al inicio de la cinética el SCMH+T17 presentó la mayor producción DHS respecto a los otros dos tratamientos (SCMH y SNCMH) en los cuales no se encuentran diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). El SCMH alcanzó su mayor producción DHS durante los días 3 y 7 con valores entre 190 y 200.70 µg de INF/g de suelo. La menor respuesta de la actividad DHS se encontró en el SNCMH con valores entre 40 y 110 µg

de INF/g de suelo. En el día 15 el SCM_H+17 presentó la mayor actividad DHS (185.76 µg de INF/g de suelo), también para ese tiempo de muestreo se realizó una comparación de medias, en el cual se demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas (HSD, $P < 0.05$), en comparación al inicio de la experimentación donde no existían diferencias significativas entre los tratamientos SCM_H y SNCM_H.

Al finalizar la experimentación se analizaron las medias de los tres tratamientos (ANOVA multifactorial HSD 95% de confianza). El análisis demostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos, lo cual indica que, para este suelo recién contaminado, la bioestimulación por adición de fertilizante T17 favorece la producción enzimática DHS.

La figura 20b muestra el resultado de la actividad DHS para el suelo proveniente de Huimanguillo en donde la mayor actividad se registró durante los primeros 7 días del experimento. Los tratamientos SCLV y SCLV+T17 alcanzaron su máxima producción de DHS al tercer día del experimento 79.31 ± 3.53 y 803.51 ± 12.08 µg de INF/g de suelo, respectivamente. Se realizó un contraste de medias (ANOVA) donde se pudo identificar que no existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos SCLV y SCLV+T17, durante el tercer día. Posteriormente la actividad DHS fue disminuyendo hasta finalizar el experimento donde no se aprecian diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos SCLV y SCLV+T17.

Cabe destacar que la mayor actividad DHS se encontró en SCLV (sin bioestimar) con valores entre 290 y 810 µg de INF/g de suelo. Por otro lado el SNCLV presentó la menor respuesta DHS durante toda la cinética, manteniendo valores por debajo de los 115 µg de INF/g de suelo. En un ensayo similar Ortiz-Maya *et al.*, (2017) registró valores ligeramente superiores de actividad DHS (~500 µg de INF/g de suelo) para un suelo no contaminado y entre 1,000 y 3,000 µg de INF/g para el mismo suelo contaminado artificialmente con hidrocarburos (~30 000 mg kg⁻¹), durante 28 días de cultivo.

Al finalizar la experimentación se analizaron las medias de los tres tratamientos (ANOVA multifactorial HSD 95% de confianza). El análisis demostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos. Sin embargo, los resultados de la cinética demostraron que el efecto de la bioestimulación para este suelo intemperizado no fue significativo para la producción enzimática DHS, durante la experimentación. El tratamiento no bioestimulado presentó la mayor actividad DHS hasta los 11 días experimentales donde disminuyó su producción, posteriormente no presentó diferencias significativas con el tratamiento bioestimulado SCLV+T17.

El suelo proveniente de Huimanguillo registró las mayores producciones DHS con valores entre 50 y 810 μg de INF/g de suelo, mientras que el suelo proveniente de Cunduacán presentó valores entre 40 y 260 μg de INF/g de suelo, debido posiblemente a la mayor concentración de hidrocarburos presentes en el suelo de Huimanguillo, lo cual probablemente afectó significativamente el perfil de la enzima DHS, aumentando su actividad.

9. Conclusiones

Las actividades enzimáticas lipasa y deshidrogenasa mostraron una alta actividad en presencia de los hidrocarburos en los dos suelos estudiados, y de acuerdo a los resultados, la respuesta de las actividades enzimáticas se correlacionó a la concentración inicial de los hidrocarburos, observándose los mayores niveles en el suelo altamente contaminado proveniente de Huimanguillo ($\sim 124,947.01 \pm 5,917.13$ mg HTP Kg suelo⁻¹), en contraste, con los resultados registrados para el suelo recién contaminado localizado en Cunduacán. Además, esto coincidió con el mayor número de microorganismos degradadores cuantificados en los tratamientos con suelo de Huimanguillo (SCLV y SCLV+T17).

Al finalizar la experimentación se observó que la bioestimulación mediante la adición de nutrientes, incrementó el contenido de microorganismos degradadores, en un 183% y 218 para los tratamientos SCMH+T17 y SCLV+T17 respectivamente. Para los tratamientos no bioestimulados SCMH y SCLV, el contenido de microorganismos degradadores disminuyó.

Durante el periodo analizado (15 días) la influencia esperada de la adición de fertilizante sobre la biodegradación de hidrocarburos no fue significativa, registrándose los mayores niveles en los tratamientos no bioestimulados SCMH y SCLV. Sin embargo, los resultados, en el corto periodo estudiado, denota una elevada capacidad de adaptación por parte de los microorganismos nativos de los sitios contaminados, en respuesta a la presencia de hidrocarburos, en particular en el suelo intemperizado de La Venta Huimanguillo.

10. Referencias bibliográficas

- Adams, R. H., Zavala-Cruz, J., & Morales-García, F. (2008). Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico. II: afectación a la fertilidad y su recuperación. *Interciencia*, 33(7), 483-489.
- Ajao, A. T., Oluwajobi, A. O., & Olatayo, V. S. (2011). Bioremediation of Soil Microcosms from Auto-Mechanic Workshops. *J. Appl. Sci. Environ. Manage*, 15(3), 473-477.
- Angelito-García, A., Focil-Monterrubio, R., Mejia-Vera, H., Escalante-Espinosa, E., & Díaz-Ramírez, I. J. (2018). Adición de inoculante experimental y lirio acuático en la biorremediación de suelo contaminado intemperizado con hidrocarburos. *Revista del Centro de Graduados. Instituto Tecnológico de Mérida*, 33(73), 175-178.
- Argüelles, R. I. (2014). *Suelos y Acuíferos contaminados: Evaluación y Limpieza*. Trillas.
- Arguijo Portillo, N. V. (2017). *Actividad enzimática de un suelo agrícola contaminado con hidrocarburos*.
- Artigo, H. d. (2023). Bioindicadores: Uma Análise de sua Utilização. *Revista internacional de Ciências*, 13(1), 54-60. <https://doi.org/10.12957/ric.2023.69666>
- Azubuiké, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World J Microbiol Biotechnol*, 32(11), 180. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>
- Brown, L., & Ulrich, A. (2014). Bioremediation of oil spills on land. In *Handbook of oil spill science and technology* (pp. 395-406). Wiley.
- Castro, G. A. (2011). Tesis Doctoral. *Biorremediación en habitats contaminados con hidrocarburos. Estudio de los parámetros indicadores de la viabilidad de los procesos de biorremediación*. Granada, Andalucía, España.
- Cavazos-Arroyo, J., Pérez-Armendáriz, B., & Mauricio-Gutiérrez, A. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 11(4), 539-550.
- Cervantes González, E., Salazar Quintanilla, L. M., & Díaz Flores, P. E. (2013). Lipasa inducida por hidrocarburos del petróleo. *Revista Internacional De Contaminación*

<https://doi.org/https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/36522>

- Cui, J.-Q., He, Q.-S., Liu, M.-H., Chen, H., Sun, M.-B., & Wen, J.-P. (2020). Comparative study on different remediation strategies applied in petroleum-contaminated soils. *International journal of environmental research and public health*, 17(5), 1606. <https://doi.org/10.3390/ijerphh17051606>
- Curiel-Alegre, S., Velasco-Arroyo, B., Rumbo, C., Ali Khan, A. H., Tamayo-Ramos, J. A., Rad, C., R Gallego, J. L., & Barros, R. (2022). Evaluation of biostimulation, bioaugmentation, and organic amendments application on the bioremediation of recalcitrant hydrocarbons of soil. *Chemosphere*, 307(1), 135638. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135638>
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 13. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>
- Díaz-Martínez, M. E. (2012). *Casuarina equisetifolia en la fitorremediación de suelo contaminado con diesel y aplicación de bioestimulación y bioaumentación*.
- Díaz-Ramírez, I., Escalante-Espinosa, E., Adams Schroeder, R., Fócil-Monterrubio, R., & Ramírez-Saad, H. (2013). Hydrocarbon Biodegradation Potential of Native and Exogenous Microbial Inocula in Mexican Tropical Soils. In *Biodegradation of Hazardous and Special Productus*. InTech. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/56233>
- El Fantroussi, S., & Agathos, S. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr Opin Microbiol*, 8(3), 268-275. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.04.011>
- EPA-3540C. (s.f.). *Method 3540C. Soxhlet extrtaction*.
- Fatima, S., Faryad, A., Ataa, A., Ahmad Joyia, F., & Parvaiz, A. (2021). Microbial lipase production: A deep insight into the recent advances of lipase production and purification techniques. *Biotechnol Appl Biochem*, 68(3), 445-458. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bab.2019>

- Furtak, K., & Gajda, A. (2017). Activity of Dehydrogenases as an Indicator of Soil Environment Quality. *Polish Journal of Soil Science*, 50(1), 33. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17951/pjss.2017.50.1.33>
- Gianfreda, L., Rao, M. A., Piotrowska, A., Palumbo, G., & Colombo, C. (2005). Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. *Science of the Total Environment*, 341(1-3), 265-279. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.10.005>
- González-Díaz, V. (2014). *Evaluación de la actividad biológica y potencial de biodegradación de un suelo contaminado por hidrocarburos*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Henríquez, C., Uribe, L., Valenciano, A., & Nogales, R. (2014). Actividad enzimática del suelo -Deshidrogenasa , - β Glucosidasa , Fosfatasa y Ureasa - bajo diferentes cultivos. *Agronomía Costarricense*, 38(1), 43-54.
- Imam, A., Kumar Suman, S., Ghosh, D., & k. Kanaujia, P. (2019, September). Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 50-64.
- Iman, A., Kanaujia, P., Ray, A., & Suman, S. (2021). Removal of Petroleum Contaminants Through Bioremediation with Integrated Concepts of Resource Recovery: A Review. *Indian Journal of Microbiology*, 61, 250-261. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s12088-021-00928-4>
- Infante, C. (1998). Biorremediación de derrames de hidrocarburo en ambientes naturales. *In Memorias del IV Congreso Interamericano sobre el Medio Ambiente (Vol. 8, pp. 325-328)*. Caracas, Venezuela.
- Jihai Zhou, Xiaoyang Xu, Guomin Huang, Wei Li, Qian Wei, Jiyong Zheng, & Fengpeng Han. (2022). Oil degradation and variation of microbial communities in contaminated soils induced by different bacterivorous nematodes species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 229, 113079. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113079>
- Kaczyńska, G., Borowik, A., & Wyszowska, J. (2015). Soil Dehydrogenases as an Indicator of Contamination of the Environment with Petroleum Products. *Water Air*

- Soil Pollut*, 226(11), 372. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11270-015-2642-9>
- Karigar, C. S., & Rao, S. S. (2011). Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzyme Research*, 2011, 11. <https://doi.org/https://doi.org/10.4061/2011/805187>
- Ławniczak, Ł., Woźniak-Karczewska, M., P. Loibne, A., J. Heipieper, H., & Chrzanowski, Ł. (2020). Microbial Degradation of Hydrocarbons-Basic Principles Bioremediation: A Review. *Molecules*, 25(4), 856. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules25040856>
- Lee, S.-H., Kim, M.-S., Kim, J.-G., & Kim, S.-O. (2020). Use of Soil Enzymes as Indicators for Contaminated Soil Monitoring and Sustainable Management. *Sustainability*, 12(19), 8209. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/su12198209>
- Lema Palaquibay, L. F., Heredia Moreno, F. I., Esparza Parra, J. F., Carrasco López, D. C., Cruz Román, J. F., & Sinaluisa Pilco, A. M. (2023). Indicadores de calidad ambiental urbana, a partir de imágenes de satélite en la ciudad de Riobamba - Ecuador. *Dominio de las ciencias*, 9(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.23857/dc.v9i1>
- Llanga, L., Aviala-Salem, M. E., Montesdeoca, F., Aponte, H., Ron-Garridos, L., Espinosa, J., Rivera, M., Borie, F., Cornejo, P., & Albarado Ochoa, S. (2023). Efecto de la labranza y fertilización nitrogenada en los cultivos de frijol y maíz sobre indicadores biológicos de la calidad de un suelo andino del Ecuador. *Siembra*, 10(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.29166/siembra.v10i1.4261>
- Lorch, H., Benckieser, G., & Ottow, J. (1995). Basic methods for counting microorganisms in soil and water. En K. y. Aleff, *Methods in applied soil microbiology and biochemistry* (págs. 146-161). Academic Press.
- Luna Bautista, C. F., Gómez-Otamendi, E., Tamariz Flores, V., & Casteán Vega, R. (2023). Bioindicadores como herramientas para la evaluación de la contaminación ambiental. *RD-ICUAP*, 9(25), 202-207. <https://doi.org/http://rd.buap.mx/ojs-dm/index.php/rdicuap/article/view/1059>
- 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 & Biodegradation*, 55(1), 1-8.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2004.10.003>
- Margesin, R., & Schinner, F. (2005). *Manual for soil analysis-monitoring and assessing soil bioremediation*. Springer Science & Business Media.
- Mathew, C. E., & Izomor, R. N. (2023). SCREENING FOR LIPASE PRODUCING BACTERIA FROM ABATTOIR SOIL. *The Bioscientist Journal*, 11(2), 37-42.
- MICUȚI, M.-M., BĂDULESCU, L., & ISRAEL-ROMING, F. (2017). A REVIEW ON THE ENZYMATIC INDICATORS FOR MONITORING SOIL QUALITY. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 21, 223-228.
https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1301_147169
- Nannipieri, P., Trasar-Cepeda, C., & Dick, R. P. (2018). Soil enzyme activity: a brief history and biochemistry as a basis for appropriate interpretations and meta-analysis. *Biol and Fertility of Soils*, 54(1), 11-19.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00374-017-1245-6>
- Neto, M., Ohannessian, A., Delolme, C., & Bedell, J. P. (2007). Towards an optimized protocol for measuring global dehydrogenase activity in storm-water sediments. *Research Articles*, 7(2), 101-110.
- Nielsen, M. N., & Winding, A. (2002). *Microorganisms as indicators of soil health: Technical report No. 388*. National Environmental Research Institute.
- NMX-FF-109-SCFI-2007. (s.f.). *Humus de lombriz (lombricomposta) - especificaciones y métodos de prueba*.
- NOM-021-SEMARNAT-2000. (s.f.). *Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y calificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis*.
- Nyoyoko, V. F., Chukwudi U, A., & Christopher, M. A. (2019). Enzymes Activities As Bio Indicator of Soil Contaminated With Petroleum Hydrocarbon. *IMPACT: Journal of Research in Applied*, 7(5), 1-16.
- Nzila, A., Razzak, S. A., & Zhu, J. (2016). Bioaugmentation: An Emerging Strategy of Industrial Wastewater Treatment for Reuse and Discharge. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(9), 846.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijerph13090846>

- Ochoa, V., Hinojosa, B., Gómez-Muños, B., & García-Ruiz, R. (2010). Actividades enzimáticas como indicadores de calidad del suelo en agroecosistemas ecológicos. *Iniciación a La Investigación*(2).
- Ogboosingha, A. J., Essien, E. B., & Ohiri, R. C. (2015). Variation of Lipase, Catalase, and Dehydrogenase Activities during Bioremediation of Crude Oil Polluted Soil. *Journal of Environment and Earth Science* , 5(14).
- Ortellado, L. E. (2022). *Aplicación de lipasas de Penicillium sp. en la biodegradación de aguas residuales ricas en lípidos.*
- Ortiz-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. *Rev. Int. Contam. Ambie.* , 33 (2) 237-246. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.02.05>
- Osorio , N. (2012). pH del suelo y disponibilidad de nutrientes. *Manejo Integral del Suelo y Nutrición Vegetal, Vol. 1 No. 4* .
- Pardo Castro, J. L., & Perdomo Rojas, M. C. (2004). *Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo - a nivel laboratorio.* Bogotá.
- Parmar, T. K., Rawtani, D., & Agrawal, Y. K. (2016). Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontier in life science*, 9(2), 110-118. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1080/21553769.2016.1162753>
- Petróleos Mexicanos, U. (2022). *Número de derrames y fugas de combustible/hidrocarburos registrados y desglosados del 2010 al 2021.* <https://tinyurl.com/246hplop>.
- Rabelo Rodrigues, B. C., Maximo Gordinho, D. L., Fraia Alves, J. P., Vieira dos Santos, L. H., dos Santos Scotti, S. C., Kinoshita, A., Guedes de Paiva, F. F., & Roberta Tamashiro, J. (2023). Bioindicadores ambientais: a contribuição brasileira no período de 2018 a 2023. In C. S. Pacheco, *ciências e tecnologia das águas: inovações e avanços em pesquisa - volume 1* (pp. 62-74). Científica digital.
- Radhakrishnan, A., Balaganesh, P., Vasudevan, M., Natarajan, N., Chauhan, A., Arora, J., Ranjan, A., Rajput, V., Sushkova, S., Minkina, T., Kumar Basniwal, R.,

- Kapardar, R., & Srivastav, R. (2023). Bioremediation of Hydrocarbon Pollutants: Recent Promising Sustainable Approaches, Scope, and Challenges. *Sustainability*, 15(7). <https://doi.org/10.3390/su15075847>
- Raffa, C. M., Vergnano, A., Chiampo, F., & Godio, A. (2021). Integrated use of chemical and geophysical monitoring to study Integrated use of chemical and geophysical monitoring to study conditions. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 16(2), 1263-1276. <https://doi.org/10.1007/s40201-021-00681-2>
- Riveroll-Larios, J., Escalante-Espinosa, E., Fócil-Monterrubio, R. L., & Díaz-Ramírez, I. J. (2015). Biological Activity Assessment in Mexican Tropical Soils with Different Hydrocarbon Contamination Histories. *Water Air Soil Pollut*, 226, 353. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2621-1>
- Sayed, K., Baloo, L., & Sharma, N. K. (2021). Bioremediation of Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) by Bioaugmentation and Biostimulation in Water with Floating Oil Spill Containment Booms as Bioreactor Basin. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(5), 2226. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052226>
- Shi, H., Wang, X., Xu, M., Zhang, H., & Luo, Y. (2017). Characteristics of soil C:N ratio and $\delta^{13}C$ in wheat-maize cropping system of the North China Plain and influences of the Yellow River. *Scientific Reports*, 7, 16854. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17060-3>
- Singh, A., Parmar, N., Kuhad, R. C., & Ward, O. P. (2011). Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol in Soil Biology. *Soil Biology*, 28, 1-23. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19769-7_1
- Standardization, I. O. (1995). *Soil quality Determination of total nitrogen Modified Kjeldahl method (ISO 11261)*. <https://www.iso.org/standard/19239.html>.
- Suthersan, S. S., Horst, J., Schnibrich, M., Welty, N., & McDonough, J. (2017). *Remediation Engineering: Design Concepts*. CRC Press Taylor & Francis Group.
- Torres, G., Figueroa-Glavis, I., Muñoz-García, A., Polanía, J., & Venegas, J. (2019). Potential bacterial biondicatos of urban pollution in mangroves. *Enviromental*

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113293>

- Uboto, B. E., & Tewari, L. (2015). Soil enzymes as bioindicators of soil ecosystem status. *Applied ecology and environmental research*, 13(1), 147-169. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1301_147169
- Udom, B., & Nuga, B. (2011). Characterization of Soil Health Using Microbial Community and Maize Germination as Bioindicators in Oil-Contaminated soil. *Journal of Advances in Developmental Research*, 2(2), 191-197.
- Velázquez-Vázquez, V. W., Gómez, S. A., Gutiérrez-Rojas, M., Díaz-Ramírez, I., & Volke-Sepúlveda, T. (2022). Estimation of hydrocarbon sequestration in soils: Influence of the chemical characteristics of humic substances. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 8: 3. p.p. 1-16.
- Von Mersi, W., & Schinner, F. (1991). An improved and accurate method for determining the dehydrogenase activity of soils with idonotrotetrazolium chloride. *Biology and Fertility of Soils*.(11), 216-220.
- Wilson, S., & Jones, K. (1993). Bioremediation of soil contaminatef with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Enviromental Pollution*, 81, 229-249. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0269-7491\(93\)90206-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0269-7491(93)90206-4)
- 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, 252-258.
- Yusuf, M., Rinaldo Fernandes, A. A., Kurniawan, S., & Arisoesilaningsih, E. (2021). Spatial variation of soil bacteria communities and its alpha diversity as a potencial bioindicator of land degradation. *Journal of Degradation and Mining Lands Management*, 8(4), 2847-2860. <https://doi.org/https://doi.org/10.15243/jdmlm.2021.084.2847>

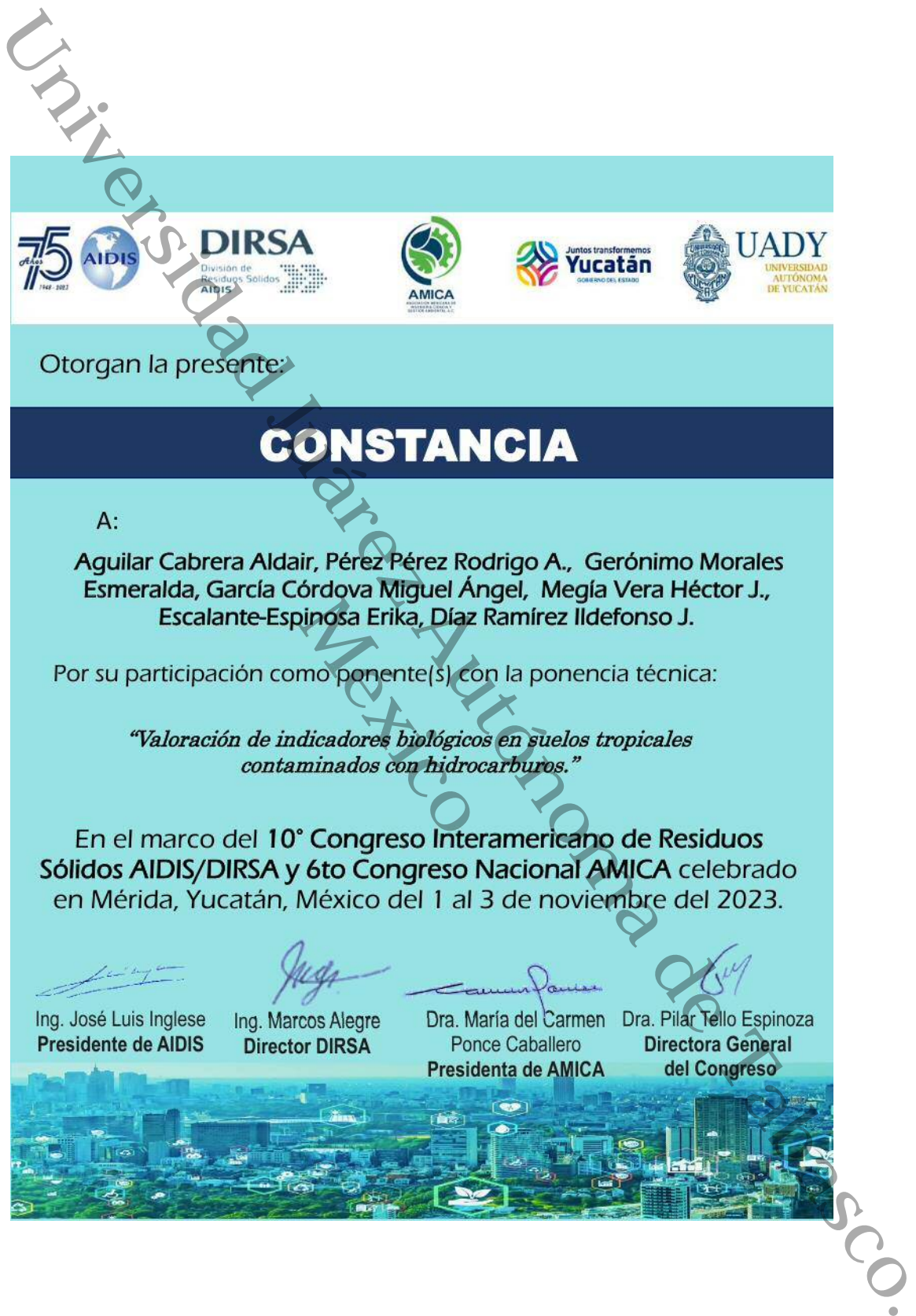
11. Anexos

11.1. Productos derivados del proyecto

11.1.1. *Presentación de resultados en eventos científicos.*

Evento científico internacional





Otorgan la presente:

CONSTANCIA


A:


Aguilar Cabrera Aldair, Pérez Pérez Rodrigo A., Gerónimo Morales Esmeralda, García Córdova Miguel Ángel, Megía Vera Héctor J., Escalante-Espinosa Erika, Díaz Ramírez Ildefonso J.

Por su participación como ponente(s) con la ponencia técnica:

“Valoración de indicadores biológicos en suelos tropicales contaminados con hidrocarburos.”

En el marco del 10° Congreso Interamericano de Residuos Sólidos AIDIS/DIRSA y 6to Congreso Nacional AMICA celebrado en Mérida, Yucatán, México del 1 al 3 de noviembre del 2023.


Ing. José Luis Inglese
Presidente de AIDIS


Ing. Marcos Alegre
Director DIRSA


Dra. María del Carmen
Ponce Caballero
Presidenta de AMICA


Dra. Pilar Tello Espinoza
Directora General
del Congreso



Evento científico nacional



11^o Encuentro de Jóvenes Investigadores en evaluación y tecnología ambiental

6^o Simposium de orientación y vinculación del ingeniero ambiental con su campo profesional



El Cuerpo Académico de Evaluación y Tecnología Ambiental


Otorgan la presente


CONSTANCIA

Rodrigo A. Pérez Pérez, Ildefonso J. Díaz Ramírez
Erika Escalante Espinosa

Por su participación como **Ponente** en el 11^o Encuentro de Jóvenes Investigadores en Evaluación y Tecnología Ambiental, con la conferencia "Respuesta de la actividad enzimática lipasa y deshidrogenasa en dos suelos contaminados con hidrocarburos bajo condiciones de bioestimulación", celebrado los días 23 y 24 de noviembre de 2023 en la División Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco, México.

Villahermosa, Tabasco, México, 24 de noviembre de 2023


Dr. Arturo Garrido Mora
Director de la DACBIOL-UJAT


Dr. Ildefonso J. Díaz Ramírez
Responsable del CAETA



Evento académico (verano científico)



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"

SECRETARÍA
DE INVESTIGACIÓN,
POSGRADO Y
VINCULACIÓN



Otorga la presente

CONSTANCIA

A: **Rodrigo Alexander Pérez Pérez**

Por haber participado en el Tercer Congreso de Resultados y Productos del XIX Verano de la Investigación Científica UJAT en el área de conocimiento: Ciencias de Agricultura, Agropecuarias, Forestales y de Ecosistemas asesorado por el Dr. Ildefonso Jesús Díaz Ramírez, realizado a través del Aula Virtual UJAT plataforma Microsoft Teams, los días 27, 28 y 29 de septiembre de 2023.



ID VIC:3erCONGRESO-2023-0006

Dra. Karina Pérez Hernández

Directora de Investigación
SIPyV UJAT

Villahermosa, Tabasco a 29 de septiembre de 2023.



"Secretaría de Investigación, Posgrado y Vinculación, Sistema de Gestión de Calidad, certificado por American Trust Register, S.C., Alcanzo de Certificación (Visión en el Mejor de Calidad), Número de certificado ATR 0742 en base a (norma de referencia NMX-CC-9001-IMNC-2015), Vigencia de Certificación (11 de julio de 2026).