



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
APLICADA**



**“EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO MIXTO
INMOVILIZADO PARA LA APLICACIÓN EN UN
SISTEMA DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS
CONTAMINADOS CON XENOBIÓTICOS”**

PRESENTA

Rita Karen Pacheco Cabañas

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Diana Verónica Cortés Espinosa

COMITÉ TUTORAL

Dr. Víctor Eric López y López

Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez

Dra. Fabiola Eloísa Jiménez Montejo

Dr. Octavio Loera Corral

Agosto 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

México, D.F. a 4 de mayo del 2018

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA-IPN en su sesión ordinaria No. 5 celebrada el día 11 del mes de MAYO conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

PACHECO

CABAÑAS

RITA KAREN

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Con registro:

A	1	6	0	2	7	9
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA APLICADA

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO MIXTO INMOVILIZADO PARA LA APLICACIÓN EN UN SISTEMA DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON XENOBIOTICOS

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

El uso de microorganismos para la degradación de suelos contaminados con diferentes compuestos tóxicos, el tema tiene como objetivo desarrollar un producto biotecnologico para su aplicación en campo

2.- Se designa como Director de Tesis al Profesor:

Diana Verónica Cortés Espinosa

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en: CIBA-IPN

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Director(a) de Tesis

Dra. Diana Verónica Cortés Espinosa

Aspirante

Rita Karen Pacheco Cabañas

Presidente del Colegio

Dra. María Myrna Solís Oba



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación de Biotecnología Aplicada
Unidad Tlaxcala
Dirección



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla, Tlax. siendo las 8:00 horas del día 1 del mes de junio del 18 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA para examinar la tesis titulada:

EVALUACIÓN DE UN CONSORCIO MIXTO INMOVILIZADO PARA LA APLICACIÓN EN UN SISTEMA DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON XENOBIOTICOS

Presentada por el alumno:

PACHECO
Apellido paterno

CABAÑAS
Apellido materno

RITA KAREN
Nombre(s)

Con registro:

A	1	6	0	2	7	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

DRA. DIANA VERÓNICA CORTES ESPINOSA

DRA. FABIOLA ELOISA JIMENEZ MONTEJO

DRA. MARTHA DOLORES BIBBINS MARTINEZ

DR. VÍCTOR ERIC LÓPEZ Y LÓPEZ

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

DRA. MARIA DEL CARMEN CRUZ LÓPEZ

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



DRA. MARIA MYRNA SOLIS OBA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada
Unidad Tlaxcala
Dirección



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla el día 5 del mes junio del año 2018 la que suscribe Rita Karen Pacheco Cabañas alumna del Programa de Maestría en biotecnología aplicada con número de registro A160279 adscrito a Centro de investigación e biotecnología aplicada (CIBA-IPN) manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Diana Verónica Cortés Espinosa y cede los derechos del trabajo intitulado Evaluación de un consorcio mixto inmovilizado para la aplicación en un sistema de biorremediación de suelos contaminados con xenobióticos, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección rkpacheco@hotmail.com . Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Rita Karen Pacheco Cabañas

Agradecimientos

Gracias a mi mamá por su apoyo en esta etapa, por sus regañones, por sus consejos y por todo su amor con el que siempre nos ha sacado adelante, porque sin ella no sería lo que hoy soy.

Gracias a Alvaro por su paciencia en mis peores días, por su apoyo tanto en la escuela como en la casa, y por su amor siempre.

Gracias a la Doctora Diana por el apoyo, la paciencia y la motivación que me brindó durante la realización de la Tesis.

Un agradecimiento a los profesores de mi comité, el Dr. Ángel, la Dra. Marta, la Dra. Fabiola y el Dr. Erick López, por sus consejos durante la realización de la tesis.

También gracias a mis compañeros y amigos Juanita, Rosita Flores, Lalo, Armando Hernández, Armando Macías, Nuvia, Gerardo y Rosita Arenas, por el apoyo dentro y fuera del laboratorio.

Gracias a todos los profesores del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional; por su enseñanza, ejemplo y esfuerzos para mi formación académica.

Gracias a todos lo que han sido directa e indirectamente parte de este proceso de formación personal y académica.

Finalmente, gracias al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología por el apoyo que me brindaron durante esta etapa con la beca nacional y por el apoyo que brindan a todos los que buscan superación, no solo personal, sino de México a través de la labor académica.

Resumen

En México se encuentran un sin número de sitios con suelos contaminados con diferentes niveles de impacto ambiental como resultado de la actividad industrial y agrícola, es por eso que se ha buscado disminuir el impacto de este tipo de compuestos xenobióticos sobre todo en suelos. La búsqueda de tecnológicas apropiadas como la biorremediación ha dado una opción de solución, ya que es económica, limpia, efectiva y segura, además de ser considerada benéfica sobre métodos físicos y químicos. Durante la realización de este trabajo utilizamos microorganismos fúngicos y bacterianos, los cuales anteriormente han demostrado tener una alta capacidad de degradación de xenobióticos(Zafra *et al.*, 2014, Moreno-Montaño, 2015, Moreno-Montaño, 2016, Zafra *et al.*, 2017), sin embargo, también se ha reportado que se ven afectados si el sitio se encuentra con una alta contaminación o las condiciones ambientales de este son adversas, por eso se evaluaron dos técnicas de inmovilización , el encapsulado en alginato y la adsorción en residuo agroindustrial de maíz, aunado a esto evaluamos la capacidad de degradación de ambos inmovilizados después de un tiempo prolongado de vida de anaquel, sobre todo en sitios altamente contaminados con diferentes xenobióticos como PAHs, petróleo, diésel y plaguicidas. Como resultado obtuvimos que después de 24 meses ambos inmovilizados lograron degradar casi en su totalidad una mezcla de PAHs de medio y alto peso molecular (PHE:PY), y después de 26 meses lograron degradar en un suelo impactado con petróleo crudo un 46% con los inmovilizados en alginato y un 48% los inmovilizados en residuo de maíz demostrando así que ambas inmovilizaciones mantuvieron la capacidad de degradación del consorcio. Con esto sugiere que los ambos tipos de inmovilización son buena opción para alargar el tiempo de vida del consorcio y aumenta la degradación de xenobióticos con respecto a microorganismos no inmovilizados. Es por esto que posteriormente se realizó la estandarización de un medio de bajo

costo como complemento durante la aplicación en campo de los inmovilizados, las pruebas determinaron que un medio que utiliza como fuente de carbono la melaza y como fuente de nitrógeno el sulfato de amonio es capaz de mantener la capacidad de crecimiento y degradación del consorcio. Como último ensayo se realizaron pruebas con diferentes xenobióticos como el diésel y los plaguicidas, para este último xenobiótico se utilizó una mezcla de diferentes plaguicidas (Endosulfan, Paraquat, Paratión metílico y Carbofuran) en relación 1:1:1:1, así también se evaluaron en 3 suelos con características fisicoquímicas diferentes. El comportamiento del consorcio mostró que la materia orgánica del suelo es un factor importante durante los procesos de biorremediación.

Abstract

Mexico show have a large number of sites with contaminated soils and with different levels of environmental impact as a result of industrial and agricultural activity, which is why many investigations sought to reduce the impact of this type of xenobiotic compounds, especially in soils. The search for appropriate technologies such as bioremediation has given a solution option, since it is economical, eco-friendly and cost-effective, besides being considered beneficial on physical and chemical methods. During the execution of this work we use fungal and bacterial microorganisms, which have previously been shown to have a high degradation capacity of xenobiotics (Zafra et al., 2014, Moreno-Montaña, 2015, Moreno-Montaña, 2016, Zafra et al., 2017), however, have also been shown to be affected if the site is highly contaminated or environmental conditions are adverse, so we evaluated the immobilization of the strains in two different techniques, one of them is encapsulation in alginate beads and another is adsorption on agro-industrial corn waste, as well as assessing the degradation capacity of both immobilized after a prolonged storage life, especially in highly contaminated sites with different xenobiotics such as PAHs, petroleum, diesel and pesticides. As a result, we obtained that after 24 months both immobilized managed to degrade almost a whole mixture of PAHs of medium and high molecular weight (PHE: PY), and after 26 months managed to degrade in soil impacted with crude oil, alginate beads showed 46% degradation and consortium immobilized in corn residue showed 48%, demonstrating that both immobilizations maintained the degradation capacity of the consortium. This means that the two types of immobilization are a good option to lengthen the lifetime of the consortium and that they increase the degradation of xenobiotics with respect to non-immobilized microorganisms. That is why we later performance the standardization of a low-cost medium as a complement during the application of the

immobilized field, the result was a medium that uses molasses as a carbon source and as a nitrogen source ammonium sulfate maintains the capacity for growth and degradation of the consortium. As a last test, treatments were carried out with diesel and mixture of pesticides (Endosulfan, Paraquat, Methyl Parathion and Carbofuran), as well as evaluated in 3 soils with different physicochemical characteristics. The behavior of the consortium showed that soil organic matter is an important factor during the bioremediation processes.

INDICE

Acta de registro de tema de tesis y designación de director de tesis.....	I
Acta de revisión de tesis.....	II
Carta de cesión de derechos.....	III
Agradecimientos.....	IV
Resumen.....	V
Abstract.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEORICO.....	2
1. Xenobióticos.....	2
2. El petróleo crudo y sus derivados.....	2
2.1 Fracción saturada.....	4
2.2 Fracción con heteroátomos.....	5
2.3 Fracción aromática.....	6
2.4 Derivados del petróleo.....	7
3. Contaminación.....	8
3.1 Contaminación por hidrocarburos policíclicos aromáticos.....	8
3.2 Características de los contaminantes.....	10
3.3 Contaminación en México.....	10
4. Remediación de suelos.....	12
4.1 Biorremediación.....	15
4.2 Bioaugmentación y bioestimulación.....	16
4.3 Bioaugmentación.....	16
4.4 Bioestimulación.....	17
4.5 Microorganismos.....	18
4.6 Rutas de los microorganismos.....	19
4.7 Inmovilización.....	20
4.7.1 Adsorción.....	22
4.7.2 Encapsulación.....	22
5. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	24
6. JUSTIFICACIÓN.....	26

7.	HIPÓTESIS	26
8.	OBJETIVO GENERAL	26
9.	OBJETIVOS PARTICULARES	27
10.	ETAPAS EXPERIMENTALES.....	28
11.	METODOLOGÍA.....	29
11.1	Medios de cultivo.....	29
11.2	Técnicas analíticas	29
11.3	Etapas experimentales	31
11.3.1	Primera etapa.....	31
11.3.2	Segunda etapa.....	37
11.4	Tercera Etapa	43
12.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
12.1	Primera Etapa: Evaluar la viabilidad del consorcio mixto inmovilizado	46
12.1.1	Determinación de la viabilidad en placa.....	46
12.1.2	Determinación de la viabilidad en cultivo sólido	47
12.1.3	Cinética en cultivo sólido para determinar la viabilidad del consorcio inmovilizado en maíz.....	49
12.1.4	Cinética en cultivo sólido para determinar la viabilidad del consorcio inmovilizado en alginato.	55
12.2	Segunda etapa. Optimización de condiciones para la aplicación del consorcio inmovilizado en campo.	62
12.2.1	Evaluación a nivel biopila la viabilidad de un consorcio mixto inmovilizado en residuo agroindustrial y en una matriz polimérica después de un tiempo de vida de anaquel. 62	
12.2.2	Optimización de condiciones para la aplicación en campo.	72
12.3	Tercera etapa: Evaluación del inmovilizado con diferentes xenobióticos.....	83
13.	CONCLUSIONES.....	89
14.	BIBLIOGRAFIA	91

INTRODUCCIÓN

En México se encuentran un sin número de sitios con suelos contaminados con diferentes niveles de impacto ambiental como resultado de la actividad industrial, debido al avance de la contaminación de estos compuestos xenobióticos en los últimos años, se han buscado soluciones tecnológicas apropiadas. Una de las técnicas utilizadas ha sido la biorremediación por ser una alternativa atractiva, ya que es económica, limpia, efectiva y segura, además de ser considerada benéfica sobre métodos físicos y químicos (Margesin y Schinner, 2001; Wang *et al.*, 2008).

Sin embargo, el éxito de la mayoría de los experimentos de bioaumentación depende de la supervivencia de los microorganismos inoculados (Jézéquel y Lebeau, 2008). Es por esto que la capacidad de introducir microorganismos no-nativos para competir con la microflora nativa del suelo es una de las más grandes limitaciones de la biodegradación (Mallory *et al.*, 1983; Jézéquel and Lebeau, 2008).

En los últimos años se han utilizado microorganismos aislados de sitios contaminados para biorremediar tanto ecosistemas terrestres como acuáticos (Margesin and Schinner, 2001; Norman *et al.*, 2004; Vaccar *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Y se ha demostrado que la inmovilización protege a los microorganismos de la competencia natural y de perturbaciones ambientales tales como el pH y los compuestos tóxicos (Jézéquel y Lebeau, 2008; Zhang *et al.*, 2008).

Debido a la necesidad de un proceso biotecnológico de biorremediación que resuelva estas limitantes, en este trabajo se ha planteado investigar la eficiencia y las ventajas de las técnicas de inmovilización y bioestimulación de para la remoción de compuestos xenobióticos en suelos contaminados.

MARCO TEORICO

1. Xenobióticos

La expresión "xenobiótico" se deriva de la palabra griega para xeno (extranjero) y bióticos (de o relacionados con la vida). Los xenobióticos son los compuestos que no son importantes para un organismo o en otras palabras no son parte de su nutrición habitual. Los ejemplos comunes de xenobióticos son las combinaciones que incluyen fármacos, aditivos alimentarios, productos químicos sintéticos y contaminantes ambientales. Estos agentes químicos generalmente se excluyen del cuerpo después del metabolismo a compuestos que se excretan a través de la bilis, riñón, pulmón o dermis.

Sin embargo, en el ambiente cualquier compuesto que pueda cambiar el funcionamiento normal del ecosistema ya sea producido natural o artificialmente podría ser incluido en esta categoría. Los xenobióticos ambientales sobre todo existen como compuestos artificiales o sintéticos y son potencialmente tóxicos para la biota significativamente para los eucariotas inferiores e incluso para los seres humanos y los podemos encontrar en espacios contaminados con hidrocarburos (Zaffar *et al.*, 2017; Qadir *et al.*, 2017).

2. El petróleo crudo y sus derivados

El petróleo es quizás la sustancia más importante consumida en la sociedad moderna. Provee no sólo las materias primas para los plásticos y otros productos, sino también el combustible para la energía, la industria, calefacción y transporte.

Se sabe que la formación del petróleo está asociada al desarrollo de rocas sedimentarias, depositadas en ambientes marinos o próximos al mar, y que es el resultado de procesos de descomposición de organismos de origen vegetal y animal que en tiempos remotos quedaron incorporados en esos depósitos, esto lo posiciona como la mezcla más compleja de compuestos orgánicos que se produce de forma natural en la Tierra. Estudios recientes con espectrometría de masas de ultra-alta-resolución han permitido identificar más de 17000 componentes químicos distintos (Head *et al.*, 2006; “IMP | Petróleo”, 2016).

Los componentes mayoritarios del petróleo son los hidrocarburos, compuestos de hidrogeno y carbono, así como algunas otras moléculas que pueden mostrar una gran variación en su estructura molecular (Tabla 1). Sin embargo, la composición química de los crudos puede presentar gran variabilidad en función de su origen, observándose cambios en las proporciones entre las distintas familias de hidrocarburos. Además, la composición molecular del petróleo puede describirse en términos de tres clases de fracciones: saturadas, aromáticas y compuestos que llevan heteroátomos (azufre, oxígeno o nitrógeno). Dentro de cada clase hay varias familias de compuestos relacionados, a saber, los constituyentes saturados incluyen alcanos, alcanos ramificados y ciclo alcanos (parafinas, iso-parafinas y naftenos, en términos petroleros); los constituyentes alquenos (olefinas) son raros en la medida en que se consideran una rareza; los constituyentes mono aromáticos van del benceno a análogos de anillos fusionados múltiples (naftaleno, fenantreno, pireno, etc.); los componentes tiol (mercaptano) contienen azufre como lo hacen las tioéteres y tiofenos; y los componentes que contienen nitrógeno y que contienen oxígeno tienen más probabilidades de encontrarse en formas polares (piridinas, pirroles, fenoles, ácidos carboxílicos, amidas, etc.) que en formas no polares (tales como éteres). (Speight, 2014; Sugiura *et al.*, 1997).

Tabla 1. Composición elemental típica de petróleo (Speight, 2014)

Carbono	83.0%-87.0%
Hidrogeno	10.0%-14.0%
Nitrógeno	0.1%-2.0%
Oxigeno	0.05%-1.5%
Sulfuro	0.05%-6.0%
Metales (Ni,V)	<1000ppm

2.1 Fracción saturada

También llamada fracción alifática, se encuentra formada por n-alcanos, alcanos de cadena ramificada (isoprenoides), y cicloparafinas o cicloalcanos, incluidos los hopanos. Los n-alcanos son hidrocarburos de cadena lineal que van desde el metano hasta el C-40. Entre ellos, los compuestos de 1 a 10 átomos de carbono (C1-C10) son volátiles, y por lo tanto susceptibles de pérdidas abióticas por evaporación. Dentro de este grupo, los compuestos de C10 a C20 son los más fácilmente degradables. A los isoprenoides, sus ramificaciones les conceden un alto grado de resistencia a la degradación biológica en comparación a los lineales. Los más abundantes son el pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) y el fitano (2,6,10,14-tetrametilhexadecano), antiguamente utilizados como marcadores internos del grado de biodegradación de un crudo, pero que actualmente no se usan, ya que se ha descrito su degradación en condiciones naturales y las vías catabólicas implicadas (Watkinson y Morgan, 1990).

Los cicloalcanos (naftenos o cicloparafinas), son compuestos de distinto número de anillos (entre 1 y 5), predominando los derivados alquilados (fundamentalmente metilados), que pueden llegar a representar un 31% del crudo.

2.2 Fracción con heteroátomos

Los compuestos de azufre están entre los constituyentes heteroatómicos más importantes del petróleo, y aunque hay muchas variedades de compuestos de azufre, las condiciones prevalecientes durante la formación, maduración e incluso la alteración *in situ* pueden dictar que sólo existen tipos particulares en diferentes petróleos. Sin embargo, los compuestos de azufre de un tipo u otro están presentes en todos los aceites crudos (Thompson *et al.*, 1976).

El nitrógeno en el petróleo puede clasificarse arbitrariamente como básico y no básico. Los compuestos básicos de nitrógeno, que están compuestos principalmente por homólogos de piridina y que se presentan a lo largo de los intervalos de ebullición, tienen una tendencia decidida a existir en las fracciones y residuos de mayor punto de ebullición. Los compuestos nitrogenados no básicos, que usualmente son de los tipos pirrol, indol y carbazol, también se encuentran en las fracciones y residuos de ebullición más alta (Speight, 2014).

En general, el contenido de nitrógeno del petróleo crudo es bajo y generalmente cae dentro del rango de 0.1% -0.9%, aunque los primeros trabajos indican que algunos crudos pueden contener hasta 2% de nitrógeno. Sin embargo, no son infrecuentes los aceites crudos sin nitrógeno detectable o incluso trazas, pero en general, cuanto más asfáltico sea el aceite, mayor será su contenido de nitrógeno.

Los constituyentes metálicos se encuentran también en cada petróleo crudo y las concentraciones se deben reducir para convertir el aceite al combustible del transporte. Los

metales afectan a muchos procesos de mejoramiento y causan problemas particulares porque envenenan los catalizadores usados para la eliminación de azufre y nitrógeno, así como otros procesos tales como craqueo catalítico.

El metal traza Ni y V son generalmente órdenes de magnitud más altos que otros metales en el petróleo, excepto cuando están contaminados con sales de salmuera coproducidas (Na, Mg, Ca y Cl) o productos de corrosión recolectados en el transporte (Fe) (Speight, 2014.)

2.3 Fracción aromática

La fracción aromática del crudo está formada por compuestos que poseen uno o más anillos bencénicos en su estructura (Figura 1). Dentro de esta fracción se pueden distinguir los hidrocarburos mono aromáticos, los cuales se forman mediante la sustitución de los átomos de hidrógeno del benceno por grupos alquilo y arilo, dando lugar a los alquilbencenos, polifenilos, o a una mezcla de ambos. El benceno, tolueno, etilbenceno y los tres isómeros del xileno (BTEX), son de gran importancia ambiental debido a su volatilidad y toxicidad, y por su abundancia en los combustibles fósiles. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) están formados por dos o más anillos bencénicos fusionados, siendo el representante más simple de esta clase el naftaleno. Su disposición es lineal, angular o en racimos. Los átomos de hidrógeno pueden ser sustituido por varios grupos polares y no polares como $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$, $-\text{NO}_3$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, etc. y de la misma manera, O, N o S pueden ser incorporado en la estructura de anillo en lugar de un carbono (denominado hetero-PAH). Los representantes más conocidos de un total de varios compuestos son: naftaleno (2 anillos), fenantreno (3 anillos), criseno, pireno (4 Anillos), benzo (b) fluoranteno, benzo (a) pireno (5 Anillos), benzo (g, h, i) perileno (6 anillos). Compuestos con 4 y más anillos exhiben carcinogenicidad y efectos mutagénicos. El

Benzo(a)pireno se encuentra entre los compuestos particularmente tóxicos y persistentes. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés), enlista 16 PAH como contaminantes prioritarios por su recalcitrancia y su alta carcinogenicidad (Bojes & Pope, 2007; Neilson, 1998; Blumer, 1976).

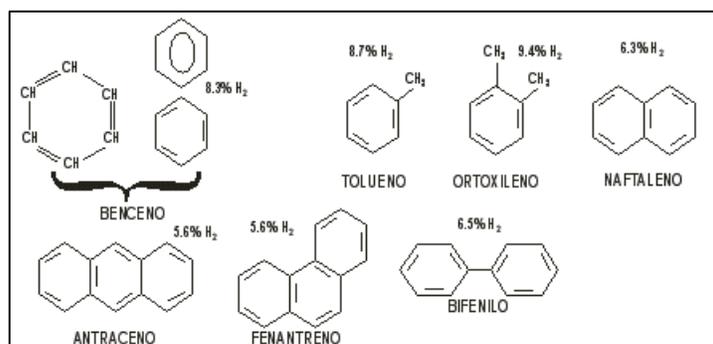


Figura 1. Hidrocarburos Aromáticos policíclicos.

2.4 Derivados del petróleo

El refinado es un proceso de destilación cuya finalidad es obtener distintas fracciones separándolas del residuo, en el que se encuentran, entre otros, los compuestos N, O y S.

En este proceso se destilan, a temperaturas crecientes, cuatro fracciones principales: gasolina, queroseno, destilados medios (gasoil, aceites lubricantes) y un residuo. Posteriormente este residuo se destila al vacío obteniéndose aceites lubricantes pesados, ceras y parafinas, y betunes asfálticos (alquitranes). En el proceso de refinado se eliminan componentes de la fracción asfáltica (altamente recalcitrante) lo que implica que los refinados intermedios (gasoil, fueles, querosenos y también las gasolinas) sean productos relativamente más biodegradables que los coques o alquitranes residuales.

La gasolina es un combustible que se utiliza en motores de combustión interna con encendido por chispa convencional o por compresión, así como en estufas, lámparas, limpieza con solventes y otras aplicaciones. Se almacena en tanques subterráneos y, ocasionalmente, se producen fugas provocando la contaminación de suelos. Forma parte de la fracción ligera del crudo de petróleo, obteniéndose a temperaturas de entre 20 y 180 °C, y su producción es inferior a la de diésel y fueles. Este hecho implica que los suelos contaminados por gasolina presenten, básicamente, hidrocarburos de cadena corta (C6–C11). Sus componentes principales son n-butano, isopentano, n-mentano, mono y dimetilpentanos, n-hexano, BTEX, mono y dimetilhexanos, trimetilbencenos, metiletilbencenos, naftalenos y n-heptano, estos dos últimos en menor grado (Speight, 2014).

3. Contaminación

3.1 Contaminación por hidrocarburos policíclicos aromáticos

La sociedad actual, con un alto desarrollo industrial y tecnológico para la obtención de bienes de consumo, basado en un elevado uso de energía, genera una serie de desechos que impactan de forma negativa sobre los ecosistemas: suelo, agua y aire (Chirinos, Larreal, & Díaz, 2010).

En el caso del suelo, los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmosfera, iniciando una serie de procesos fisicoquímicos simultáneos, como evaporación, que, dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida pueden ser procesos más o menos lentos lo que ocasiona una mayor toxicidad. Además de tener una moderada, alta o extrema salinidad, lo que dificulta su tratamiento, debido a que altos gradientes de salinidad pueden destruir la estructura terciaria de las proteínas,

desnaturalizar enzimas y deshidratar células, lo cual es letal para muchos microorganismos usados para el tratamiento de aguas y suelos contaminados (Mesa *et al.*, 2006).

Algunos accidentes que han supuesto un elevado impacto ambiental como el vertido de combustible del Exxon Valdez, la liberación de productos radiactivos tras el accidente de la central nuclear de Chernobil, la rotura de la presa de Aznalcóllar o la reciente catástrofe ecológica producida por el vertido del petrolero Prestige (Moreno *et al.*, 2004; Mesa *et al.*, 2006)

En el agua, al llegar a esta, la mancha generada por los hidrocarburos vertidos flota por diferencia de densidades impidiendo la entrada de luz y el intercambio gaseoso, dando comienzo a la solubilización de compuestos hidrosolubles y a la afección de diferentes poblaciones: la primera población afectada por un derrame es el plancton, en segundo lugar son afectados los macro invertebrados, y la última población afectada son los bentos o poblaciones de macro invertebrados que viven en los fondos de los ríos y ciénagas(Chirinos *et al.*, 2010).

La contaminación del suelo y agua ha venido en aumento como resultado de la explotación, refinación, distribución y almacenamiento de petróleo crudo y sus derivados. Hasta el año 2004, el volumen de derrames accidentales de petróleo y sus derivados fue calculado en 1.5 millones de toneladas por año, afectando suelo, agua y atmósfera. (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006)

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos por sus siglas en ingles PAH, son contaminantes ambientales ubicuos producidos durante la combustión de compuestos fósiles y otros procesos antropogénicos. Debido a sus propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas producen un severo impacto sobre la salud humana y ambiental (Kulhanek *et al.*, 2005; Morelli *et al.*, 1999; Pieper S, 2004). Consecuentemente, su remoción del ambiente es actualmente una prioridad. En el ambiente, estos contaminantes se encuentran frecuentemente adsorbidos a las partículas de

suelo, disueltos en una fase líquida no acuosa (NALP) representada como “gotas” o films en la superficie del suelo o, como fase libre en aguas subterráneas de sitios contaminados (Wild *et al.*, 1995; Alexander M., 2000).

3.2 Características de los contaminantes

El contenido de carbono orgánico en el suelo se incrementa debido a la oxidación de los hidrocarburos (Al-Sarawi y Massoud, 1998; Martínez y López, 2001). Las fracciones del petróleo se alojan como gotas en los poros o pueden ser sorbidas por la materia orgánica (MO) y la arcilla (Fine *et al.*, 1997). De acuerdo con Mueller *et al.*, 1996, Li *et al.*, 1997 y Riser-Roberts (1998) el petróleo disminuye el pH del suelo, así como no afecta la capacidad de intercambio catiónico (CIC) en el suelo (Zavala-Cruz *et al.*, 2005).

3.3 Contaminación en México

Como consecuencia de varios siglos de actividad minera en México y posteriormente, debido a la industria de la química básica, petroquímica y de refinación del petróleo, se han producido cantidades muy grandes, pero muy difíciles de cuantificar, de residuos peligrosos. Aunado a lo anterior, la intensa actividad de otras industrias, junto con accidentes durante el almacenamiento, transporte o trasvase de sustancias (fugas, derrames, incendios) y la disposición clandestina e incontrolada de residuos, contribuyen en gran medida a la contaminación de suelos (SEMARNAT, 2002). El número de sitios contaminados, aún en las estimaciones más conservadoras, asciende a varios miles de lugares cuyo riesgo potencial es desconocido. De acuerdo con datos publicados por el INEGI (2000), la superficie de suelo degradado por causas de contaminación en 1999 fue de 25,967 km².

Para tener una idea, la contaminación del suelo por hidrocarburos del petróleo en el estado de Tabasco (México) ha llegado a abarcar 0.07% del área total de este estado (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006)

Todos los eventos en los que se encuentran involucradas sustancias que implican algún riesgo para el ambiente o la población y que puedan generar la contaminación de suelos y cuerpos de agua, son conocidos como emergencias ambientales. De acuerdo con estadísticas de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA), cada año se presentan en México un promedio de 550 emergencias ambientales asociadas con materiales y residuos peligrosos. Dentro de los compuestos peligrosos más comúnmente involucrados en emergencias ambientales, se encuentran el petróleo y sus derivados (gasolinas, combustóleo, diésel), agroquímicos, gas LP y natural, entre otros (Figura 2).

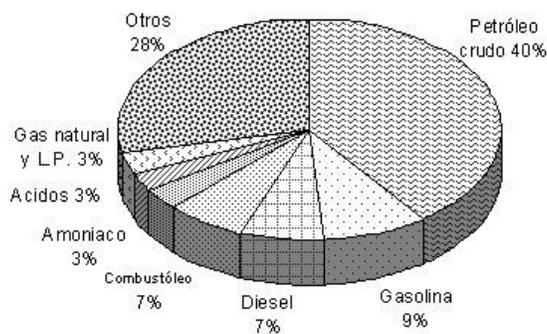


Figura 2. Porcentaje de contaminantes en

México(<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/372/fuentes.html>)

4. Remediación de suelos

Cuando se empezó a actuar sobre los espacios contaminados a comienzo de los años 1980, el método solía consistir en retirar los residuos y/o suelo contaminado a un vertedero o cubrirlos con una capa impermeable (confinamiento). Más tarde, se planteó la necesidad de desarrollar alternativas para solucionar de forma más permanente y menos costosa el problema de los espacios contaminados. En consecuencia, el desarrollo y uso de tecnologías más apropiadas para el tratamiento de suelos contaminados ha avanzado mucho y en la actualidad es un tema de gran interés por sus repercusiones económicas y sociales (Tabla 2).

Cada suelo contaminado a remediar representa un caso particular debido a las condiciones del suelo, las condiciones climáticas, el tipo de contaminante y las causas que originaron la contaminación, no obstante, estos sitios pueden evaluarse y puede determinarse la solución más efectiva para su remediación. En la elección de los procesos de remediación de suelos se toman en consideración los siguientes criterios:

El tipo de contaminante: sus características físicas y químicas determinan la manera en que el contaminante debe tratarse. Además, dichas propiedades determinan en parte la movilidad del contaminante y si éste es o no persistente en el ambiente.

Tipo de suelo: Las características naturales del suelo a menudo determinan las particularidades de los procesos de tratamiento a aplicar y determinan también si un contaminante podrá dispersarse en el medio ambiente. Los componentes del mismo tales como, arcillas, arenas, gravas y rocas entre otras, intervienen, como criterio, en la selección del tipo de tecnología.

Localización y uso de suelo: Estos factores fundamentalmente inciden en los niveles de remediación y los métodos que pueden emplearse para alcanzarlos. Es importante describir en

forma detallada los siguientes aspectos; ubicación geográfica y uso de suelo, origen de la contaminación, magnitud y distribución de la pluma del o los contaminantes, acceso al sitio, ubicación de asentamientos humanos, cuerpos de agua, características topográficas, clima, hidrológicas, hidrogeológicas, geológicas, edafológicas y clima.

Por lo que ahora la recuperación de un espacio contaminado puede abordarse mediante diferentes estrategias (Mc Eldowney *et. al*, 1993) que, en general, se pueden agrupar en tres categorías: confinamiento, limpieza y estrategia de respuesta.

El confinamiento tiene como finalidad el aislamiento de la fuente contaminante, evitando la salida de líquidos (lixiviados), polvo o gases; es decir controlando la dispersión de la contaminación. Es el tratamiento que se aplica habitualmente en el caso de contaminaciones provocadas por los vertederos incontrolados de residuos industriales. Las medidas que incluye generalmente este tipo de actuación son: recubrimiento, revegetación, control de aguas de escorrentía superficial y control de lixiviados y aguas subterráneas.

La limpieza incluye la aplicación de una o varias tecnologías para eliminar los contaminantes del suelo. Se distinguen tres tipos de tratamiento: 1) tratamiento *in situ* del suelo contaminado, 2) excavación del emplazamiento contaminado, retirada del suelo afectado y tratamiento *ex situ* del mismo y 3) excavación, retirada y depósito en vertedero controlado. En el primer caso, la contaminación se trata en el lugar en el que se ha producido y en el segundo caso hay que proceder a una excavación del suelo contaminado o a un bombeo del agua contaminada antes de proceder a su tratamiento. En general, el tratamiento *in situ* es menos costoso y permite que se utilice el espacio durante el mismo, por lo que se aplica cada vez con más frecuencia a pesar de que habitualmente requiere largos períodos de tiempo.

Los métodos existentes para tratar los suelos contaminados pueden ser de naturaleza física, química o biológica y tanto unos como otros pueden aplicarse en el lugar de la contaminación o como tratamiento *ex situ*. A continuación, en la tabla 2, se incluye una clasificación de las diferentes técnicas empleadas, agrupadas según su naturaleza y la forma de aplicación (Moreno, Becerra, & Santos, 2004).

Tabla 2. Técnicas de biorremediación

Tratamientos <i>in situ</i>		Tratamientos <i>ex situ</i>		
Fisicoquímicos	Biológicos	Térmicos	Fisicoquímicos	Biológicos
Extracción con vapor	Biorremediación	Desorción térmica	Extracción con disolventes	Laboreo agrícola
Lavado	Fitorremediación	Incineración	Lavado	Biodegradación en reactor
Solidificación y estabilización			Oxido-reducción	Biopila
Separación electrocinética			Deshalogenación química	
			Solidificación y estabilización	

El tratamiento biológico o biorremediación de espacios contaminados, que es el que se va a abordar en mayor profundidad en este trabajo y este se basa en la capacidad de diversos microorganismos, ya sean levaduras, hongos o bacterias para romper o degradar sustancias peligrosas convirtiéndolas en productos menos tóxicos o inocuos. Algunos microorganismos

pueden metabolizar productos como combustibles o disolventes, que constituyen un riesgo para la salud humana y para los ecosistemas en los que son vertidos. Una vez que los contaminantes son degradados, la población microbiana decrece, al consumirse lo que constituía su fuente de nutrientes (Moreno, Becerra, & Santos, 2004).

La degradación anaeróbica de hidrocarburos por microorganismos también ocurre, no obstante, es muy baja y su significación ecológica puede ser menor (Atlas y Bartha, 2002).

4.1 Biorremediación

La biorremediación puede clasificarse de acuerdo al organismo que efectuó la degradación del compuesto xenobiótico. La Fitorremediación, es el uso de plantas para la remoción de contaminantes de suelo y aguas, es una técnica apropiada para la remoción de metales pesados y radionucleos. Sin embargo, no se conoce sobre la habilidad de esta en el tratamiento de suelos con contaminantes orgánicos persistentes, un ejemplo lo constituye la especie *Thlaspi caurulencens* en suelos contaminados con zinc y cadmio donde se encontró que los eliminaba del suelo agrícola (Atlas, Bartha, Corzo, & others, 2002; Stres, Mahne, Avguštin, & Tiedje, 2004). Así mismo, existen animales que actúan como agentes descontaminantes, ya que pueden desarrollarse en medios con fuerte toxicidad y poseen en su interior microorganismo capaces de retener metales pesados; tal es el caso de la lombriz de tierra (*lumbricus terrestris*) la cual absorbe los contaminantes a través de los tejidos y los acumula en las vías digestivas (1,10). Las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, aunque también se han empleado otros microorganismos como hongos, algas, Cianobacterias y Actinomicetos para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo.

La biodegradación de hidrocarburos por poblaciones nativas de microorganismos representa uno de los mecanismos primarios por el cual los hidrocarburos contaminantes son eliminados

del ambiente. Las tasas de degradación bajo condiciones óptimas de laboratorio se encuentran entre 2500 – 100000 g/m³ /día, bajo condiciones de campo (in situ) están en un orden de magnitud bajo, en el rango de 0,001-60 g/m³ /día (Atlas, 1981).

La biorremediación que implica bioaumentación y / o bioestimulación, es una solución económica con un enfoque ecológico que se ha convertido en una de las técnicas más ventajosa de eliminación de xenobióticos en suelo y en agua para sitios contaminados con metales pesados y / o contaminantes orgánicos como los hidrocarburos.

4.2 Bioaumentación y bioestimulación

La adición de microorganismo previamente adaptados para aumentar la degradación de los compuestos no deseados (bioaumentación) y / o la inyección de nutrientes y otros componentes complementarios para la población microbiana nativa para inducir la propagación en una tasa apresurada (bioestimulación), son los enfoques más comunes para en biorremediación *in situ* de derrames accidentales y sitios contaminados crónicamente en todo el mundo. Sin embargo, muchos factores como la selección de cepas, la ecología microbiana, el tipo de contaminante, las limitaciones ambientales, así como los procedimientos de introducción de las cepas, puede conducir a su fracaso. Estos inconvenientes abren una brecha entre los ensayos de laboratorio y en campo.

4.3 Bioaumentación

Un programa de biorremediación exitoso generalmente requiere la aplicación de estrategias personalizadas para las condiciones ambientales específicas del sitio contaminado (El Fantroussi & Agathos, 2005). Para lograr esto se necesita una población de microorganismos que sea competente y su aclimatación o adaptación puede ser muy larga es por esto que la inoculación de microorganismo previamente adaptados puede ayudar a elevar los niveles de

biorremediación; ya sea con microorganismos aislados naturalmente o microorganismo genéticamente modificados (GEMs) (Christiansen, Mathrani, Ahring, & Colleran, 1997).

La biodegradación es un proceso natural que puede proceder lentamente, dependiendo del tipo de contaminante. Ha sido reportado el aislamiento de microorganismos por varios autores ; entre las cuales se encuentran cepas como *Rhodococcus chlorophenolicus*, *Flavobacterium sp.* y *Arthrobacter sp.* (Middeldorp, Briglia, & Salkinoja-Salonen, 1990; Crawford & Mohn, 1985; Edgehill & Finn, 1983). Otro ejemplo es la degradación de hidrocarburos de petróleo y la producción de un biosurfactante halotolerante que ha sido atribuido a *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514 aislada de un sitio contaminado de petróleo crudo de Gujarat (Varjani *et al.*, 2015; Varjani y Upasani, 2016b; 2016c).

Alisi *et al.* (2009) estudió la degradación de fenantreno y diésel, usando un consorcio microbiano de las cepas nativas seleccionadas y observó una eliminación del 75% hidrocarburos totales y el 60% de isoprenoides en 42 días. Un grupo de bacterias aisladas de un suelo de contaminado con gasolina se encapsuló como consorcios enriquecidos en micro perlas de goma por Moslemy *et al.* (2002), las células encapsuladas exhibieron una mayor tasa de degradación de gasolina con una fase de retraso más corta en comparación con células libres a la misma concentración de unidades formadoras de colonias.

4.4 Bioestimulación

La bioestimulación se refiere a la adición de nutrientes limitantes del crecimiento especializados tales como carbono, nitrógeno y fósforo en los sitios contaminados de manera que los microorganismos que están presentes en estado natural sean un número suficiente que logre degradar los residuos de manera efectiva (Trindade *et al.*, 2005). Como tal, la biodegradación se ve reforzada por la modificación de soluciones a base de agua, tales como receptores de

electrones, nutrientes y otros aditivos (Juwarkar *et al.*, 2010). Acetato, sulfato, nitratos y etanol son los donantes de electrones que se utilizan en la bioestimulación de sitios contaminados. Herbicidas, pesticidas, combustibles, VOCs no halogenados, compuestos orgánicos volátiles, metales pesados se eliminaron con éxito a través de la bioestimulación en el campo a gran escala (Eguchi *et al.* 2001; Brar *et al.*, 2006). Este enfoque requiere la presencia de microorganismos que tengan capacidad de degradar un contaminante.

A pesar de que el costo de las tecnologías de bioestimulación tiende a cambiar dependiendo del sitio, es considerada como una de las alternativas de remediación más barata y aplicable tanto para los suelos y como para aguas subterráneas. Esta tecnología no es adecuada para los sitios contaminados con altas concentraciones de contaminantes, ya que impediría el crecimiento microbiano. También el subsuelo impermeable hace que sea difícil la difusión de micronutrientes a través del suelo sin embargo se podrían generar fracturas que crean vías preferenciales en el subsuelo, a partir de donde la solución de nutrientes podría fluir y ayudar a la actividad (Kuppusamy, Palanisami, Megharaj, Venkateswarlu, & Naidu, 2016).

4.5 Microorganismos

El paso inicial en el proceso de degradación de hidrocarburos por bacterias y hongos envuelve oxidación del sustrato por oxigenasas, para lo cual se requiere oxígeno molecular. La disponibilidad de oxígeno en suelos, sedimentos y acuíferos es frecuentemente limitante y depende del tipo de suelo (Overcash y Pal, 1979 ; Chirinos, Larreal, & Díaz, 2010). El género *Pseudomonas*, ha sido identificado históricamente como degradador de gran cantidad de sustratos como el n-hexadecano, mineralización de compuestos alifáticos en condiciones anaeróbicas y degradador de hidrocarburos aromáticos y poli aromáticos, así como del pireno en estudios *in vitro* (Fan *et al.*, 2000, Braker *et al.*, 1998).

4.6 Rutas de los microorganismos

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que, en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, ya que se producen una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía. La cadena se inicia con un sustrato orgánico (compuestos hidrocarburos) que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia. Los aceptores más comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono.

Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio. En la figura 2 se muestra una ruta de degradación de PAHs propuesta por Cerniglia en 1992.

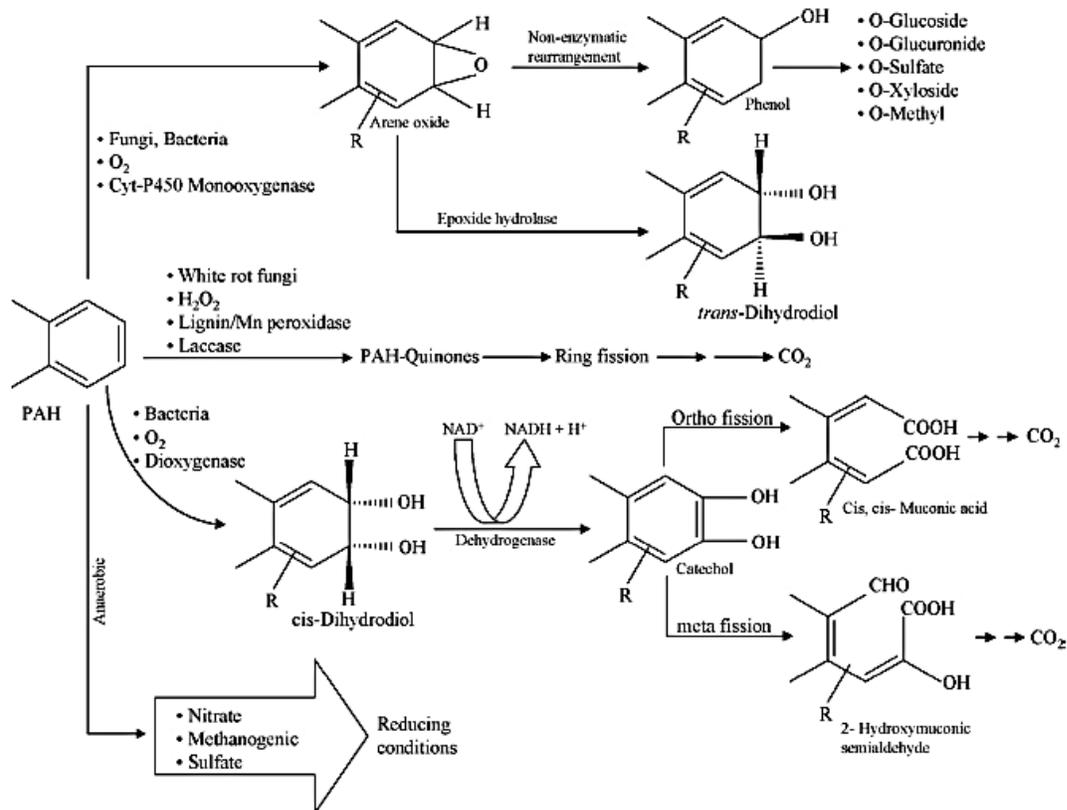


Figura 3. Ruta propuesta para el catabolismo microbiano de hidrocarburos policíclicos aromáticos.

4.7 Inmovilización

Recientemente, el proceso de biorremediación ha empleado métodos de inmovilización, ya que la inmovilización es definida como la limitación de movilidad de las células y enzimas, así como la preservación de su viabilidad y sus funciones catalíticas (Kourkoutas *et al.*, 2004, Guzik *et al.*, 2014, Guzik *et al.*, 2014 b). Asimismo, dependiendo del tipo de inmovilización tanto las células como las enzimas pueden ser inmovilizadas de forma permanente o temporal para ser utilizadas repetida y continuamente en diversos procesos (Fajardo-Ochoa *et al.*, 2014).

La fijación a las superficies mediante adsorción, atrapamiento por geles y oclusión dentro de los poros internos de los portadores preformados son los métodos básicos para la inmovilización celular en materiales de soporte.

La resistencia con la que las células están unidas a las superficies es específica de las cepa afectadas, hasta cierto punto por la propiedad de las superficies, y por tanto las células libres coexisten con las células inmovilizadas, haciendo este método no adecuado para la producción de productos industriales, pero ampliamente aplicados en el tratamiento de aguas residuales y suelos para compensar la desventaja de que el crecimiento de los microorganismos sea lento y por tanto estos podrían ser desplazados por los microorganismos nativos y la contaminación (FW Bai and X-Q Zhao, 2011).

Estos métodos tienen muchos beneficios a la biorremediación, como el incremento de eficiencia en la degradación del contaminante, reducción de costos, reutilización de la matriz en la que se realizó la inmovilización, crean un microambiente estable para células y enzimas, reducen el riesgo de mutaciones genéticas, incrementa la resistencia de la biocatálisis a diferentes condiciones ambientales, incrementan la supervivencia durante el tiempo de vida de anaquel e incrementan la tolerancia a las altas concentraciones de contaminantes (Kourkoutas *et al.* 2004; Wojcieszynska *et al.*, 2012; Rivelli *et al.*, 2014; Bayat *et al.*, 2015).

Existen 5 principales técnicas de inmovilización (Fig.3): adsorción, unión a la superficie (covalente o electrostática), fluctuación (natural o artificial), atrapamiento y encapsulación. En este trabajo nos enfocaremos a la revisión de los métodos por adsorción y encapsulación.

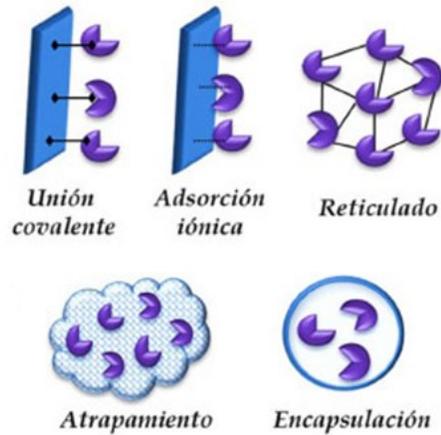


Figura 3. Tipos de inmovilización.

4.7.1 Adsorción

Este método de inmovilización de células está basado en la interacción física entre el microorganismo y la superficie de la matriz. La inmovilización por adsorción es rápida, sencilla, económicamente ventajosa, sin necesidad de aditivos químicos. Además, es fácil realizar el proceso con la posibilidad de recargar el soporte. En la interacción entre el microorganismo y la superficie de la matriz, las fuerzas débiles incluyen enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, enlaces hidrófobos y fuerzas de van der Waals. Las desventajas utilizando la técnica de adsorción es la tasa muy alta de fugas de matriz debido a interacciones débiles, interacciones inestables, no hay posibilidad de controlar la carga, por lo que la reproducibilidad es también podría ser baja (León *et al.*, 1998; Argin-Soysal *et al.*, 2008).

4.7.2 Encapsulación

Es una técnica irreversible similar al atrapamiento. Este método puede conseguirse envolviendo los componentes biológicos dentro de varias formas de membranas semipermeables esféricas con una permeabilidad selectiva controlada. La proporción de tamaño del poro de la membrana respecto al tamaño del material del núcleo es un factor significativo en este fenómeno. Esta limitada disponibilidad al interior de la microcápsula es una de las principales ventajas de la

microencapsulación, debido a la protección del biocatalizador de las condiciones extremas. Como la mayoría de los métodos de inmovilización, previene la fuga de biocatalizador, aumentando la eficiencia del proceso (Bayat *et al.*, 2015).

5. ANTECEDENTES DIRECTOS

Zafra et al., 2014; Aisló y selecciono un consorcio microbiano con potencial para la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos de tres, cuatro y cinco anillos en suelos contaminados con petróleo crudo. Los estudios morfológicos y moleculares indicaron la aislación de hongos del genero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Scedosporium* y *Acremonium*, y bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Streptomyces*, *Stenotrophomonas*, *Kocuria*, y *Delftia*. La prueba de tolerancia del aislado mostro que *Trichoderma asperellum*, *Aspergillus fumigatus*, *Rhizomucor variabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.* y *Stenothrophomonas maltophilia* presentan la mayor tolerancia a PAH y a partir de esta información formo dos consorcios mixtos.

Zafra et al., 2017: Formo dos consorcios para tratamientos de bioaumentación. El primer consorcio estuvo conformado *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nomius*, *Thrichoderma sperellum*, *Bacillus cerus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Kelebsiella sp.*, *Stenothrophomonas maltophilia* y el segundo con dos sepas modificadas genéticamente con los genes que codifican para manganeso y lignina peroxidasa.

Moreno- Montaña, 2015; Estableció condiciones ideales para la conformación de un consorcio fúngico con la capacidad de tolerar y degradar altas concentraciones de hidrocarburos de petróleo, de un suelo contaminado con diésel. Lo hongos que conformaron el consorcio son *Aspergillus niger* SCB2, *Talaromyces spectabilis* SSC12 isoformo de *Paecilomyces variotii* y *Tricoderma asperellum* H15-50869. Para esto realizó ensayos de tratabilidad para estandarizar condiciones de cultivo para la biodegradación de hidrocarburos. Demostrando que el residuo de avena en un proceso de bioestimulación produce el mayor porcentaje de remoción en condiciones de laboratorio. Por lo que al realizar la investigación en campo determinó que la

técnica de biorremediación por Bioestimulación y bioaumentación permite una remoción de PAHs del 49% en biopilas de 800 kg en 90 días bajo temperaturas que oscilan entre 2 y 37°C.

Moreno-Montaña,2016; Inmovilizo el consorcio microbiano (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus nonius*, *Thrichoderma sperellum*, *Bacillus cerus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Kelebsiela sp.*, *Stenothrophomonas maltophilia*) asilado por Zafra *et al.*,2014 en residuo agroindustrial y en matrices poliméricas, dándole como mejores resultados las inmovilizaciones en residuos de Maíz y en biopolímeros de alginato.

6. JUSTIFICACIÓN

Las búsquedas de tecnologías para la remoción de contaminantes en suelo han demostrado que el uso de bacterias y hongos en los procesos de descontaminación han sido efectivos. Sin embargo, existen factores que disminuyen este porcentaje de éxito en los tratamientos, como son la competencia con los microorganismos nativos y la desfavorable adaptación a los cambios ambientales de los microorganismos inoculados. Es por esto que recientemente se ha buscado probar técnicas que permitan al microorganismo tener más tiempo de adaptación y condiciones que sean favorables para su desarrollo; todo con el fin de lograr un proceso de biorremediación más rentable y eficiente.

Por estas razones este trabajo plantea la evaluación de un consorcio mixto inmovilizado por diferentes métodos así con la adición de nutrientes para su adecuado desarrollo en suelo contaminado por xenobióticos.

7. HIPÓTESIS

La inmovilización del consorcio mixto favorecerá su permanencia en un suelo contaminado y se reflejará en un incremento en el porcentaje de degradación de compuestos tóxicos.

8. OBJETIVO GENERAL

Evaluar un consorcio mixto inmovilizado como tratamiento de biorremediación para la degradación de compuestos xenobióticos en suelo.

9. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la viabilidad de un consorcio mixto inmovilizado en residuo agroindustrial y una matriz polimérica después de un tiempo de vida de anaquel.

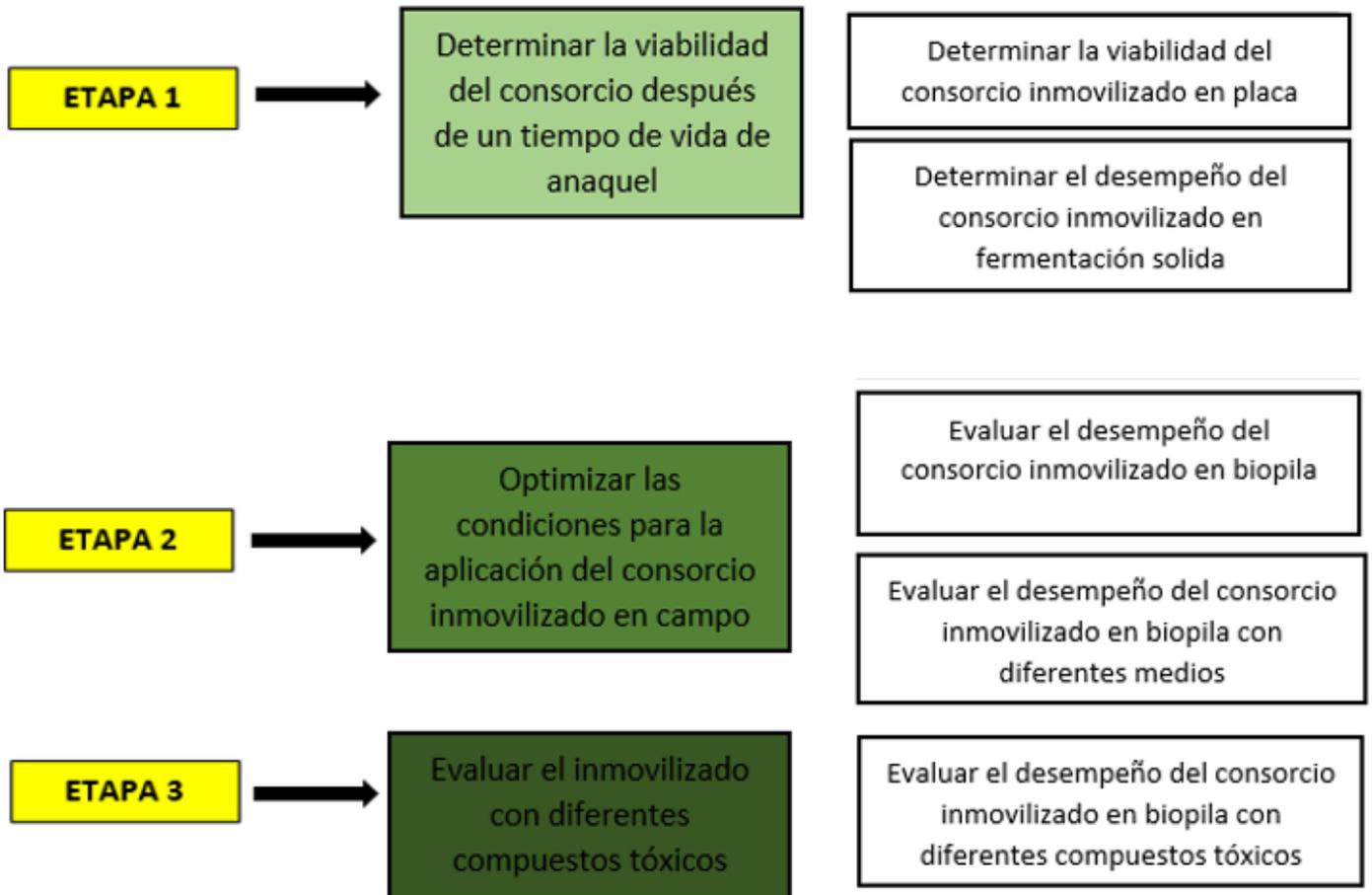
Evaluar a nivel biopila el desempeño en la degradación del consorcio mixto inmovilizado.

Ajustar las condiciones de cultivo sólido para mantener la viabilidad del consorcio mixto inmovilizado durante la aplicación en campo.

Evaluar a nivel de biopila la degradación en suelos contaminados con diferentes tipos de compuestos tóxicos por un consorcio mixto inmovilizado.

10. ETAPAS EXPERIMENTALES

Para cumplir los objetivos se plantearon tres etapas experimentales las cuales se conforman de la siguiente manera:



11. METODOLOGÍA

11.1 Medios de cultivo

Czapeck(g/L): Glucosa (10 g), KCl (0.5g), FeSO₄ (0.001g), MgSO₄·7H₂O (0.5 g), la fuente de nitrógeno y fosforo se ajustaron de acuerdo al ajuste de C: N: P 100:10:1 y para esto se utilizaron los reactivos NaNO₃ y K₂HPO₄; todo se ajustó a pH 6.5.

Agar Nutritivo + Ciclohexamida: Agar nutritivo grado reactivo (23g/L) y ciclohexamida (100µg/ mL).

Agar papa-dextrosa + Ampicilina: Agar papa-dextrosa grado reactivo(39g/L), rosa de bengala (0.050g/L) y ampicilina (80µg/mL).

Solución de fosfatos 0.1M: KH₂PO₄ (12.79 g/L) y K₂HPO₄ (1.02 g/L), ajustado a pH 7.

11.2 Técnicas analíticas

Humedad

La cuantificación de la humedad se realizó mediante la diferencia de peso para esto se utilizó 1 g de muestra y se puso en una termobalanza a 105°C el tiempo era variable de acuerdo a la humedad de la muestra ya que el proceso se detenía hasta que el peso se mantuviera estable durante un minuto.

pH

Para la cuantificación del pH se utilizó 1 g de muestra seca y se resuspendió en 10 mL de agua desionizada, se agito durante 1 min y posteriormente se dejó sedimentar durante 10 min, se hicieron lecturas del sobrenadante con un potenciómetro previamente calibrado.

Actividad heterotrófica por adsorción alcalina (CO₂)

Durante las cinéticas en viales se realizaron mediciones de CO₂. A través de un bomba se adiciono aire y para que este estuviera libre de CO₂ se pasó por una trampa de NaOH 3N, a su vez para no reseca los cultivos sólidos, también se pasó por una trampa de agua para posteriormente ser filtrado mediante una membrana de poro 0.22µm; este aire desplazó el CO₂ presente en los viales y este a su vez fue atrapado y disuelto en una solución que contaba de: indicador Tropaeolina-fenofaleina (50mL), NaOH 1N (10mL), BaCl (0.5g); pasados 10 min de aireación para viales de 50mL y 15 para viales de 500mL, se retiró la solución y fue titulada con HCL al 10% hasta que virara a color blanco.

Extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs)

La extracción se realizó mediante un sistema de extracción de microondas Multiwave 3000 SOLV (Anton Paar, Alemania). Se agregó un gramo de suelo en 30 mL de una mezcla de acetona-hexano en una relación (3:1). La rampa de temperatura se realizó con un incremento de 0 a 140°C en 15 minutos, posteriormente se mantuvo a 140°C por 40 minutos y finalmente un enfriamiento durante 30 minutos.

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Una vez obtenido el extracto este fue concentrado y resuspendido en 2mL de acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker, EUA) y posteriormente pasado por un filtro de Nylon de poro 0.45µm (Milipore, Alemania). Para el análisis se utilizó un equipo HP Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Alemania) equipado con una columna C18 fase reversa, y con un detector de absorbancia UV, las muestras fueron corridas a 254 nm con acetonitrilo como fase móvil a una velocidad de flujo de 1 ml min⁻¹.

Extracción de hidrocarburos totales del petróleo (TPH) y plaguicidas.

La extracción de TPH se realizó mediante extracción mecánica, para lo cual se agregó a un gramo de suelo 30 mL de hexano, posteriormente este se puso en agitación en un vórtex durante 1hr y posteriormente se centrifugo a 9000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue concentrado y resuspendido en 2 mL de hexano pasando por un filtro de Nylon de poro 0.45µm (Milipore, Alemania).

Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)

La degradación de TPH fue monitoreada por el equipo de cromatografía de gases con detector de ionización de flama modelo 7820A (Agilent Technologies, EUA). Las muestras fueron inyectas usando el método reportado por Roy *et al.*, 2018; utilizando una columna HP-5 (30m×0.25mm,0.25 mm) y nitrógeno como gas de arrastre. Los extractos fueron inyectas en modo split 1:20 . La temperatura del del inyector fue de 300°C y la velocidad de flujo fue mantenida a 1 ml/min. La temperatura inicial de la columna fue de 50°C por 5 min y posteriormente se incrementó la temperatura en una rampa de 10°C por min hasta 310°C y se mantuvo durante 20 min.

11.3 Etapas experimentales

11.3.1 Primera etapa

Evaluar la viabilidad del consorcio mixto inmovilizado.

En esta etapa se realizaron evaluaciones por dos técnicas las cuales son determinación de la viabilidad en placa y determinación de la viabilidad en cultivo sólido. Lo anterior para observar la viabilidad de los consorcios inmovilizados en rastrojo de maíz y capsulas de alginato de sodio

después de tener una vida de anaquel de 24 meses en donde las condiciones de temperatura y humedad no fueron reguladas, ya que los inmobilizados fueron resguardados a temperatura ambiente en bolsas de polipapel.

Determinación de la viabilidad en placa

Para realizar la determinación en placa se llevó a cabo la siguiente metodología:

Se tomó un gramo del inmobilizado (residuo agroindustrial o capsulas de alginato de sodio) y se le agregó 9 ml de buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7), se llevó a agitación hasta llegar a una homogenización.

Posteriormente se tomó 1 ml del homogenizado y se resuspendió en 9 ml de buffer de fosfatos llevándose a agitación hasta llegar a una homogenización. Este procedimiento se repitió hasta llegar a una concentración de 10^{-8} .

En placas de PDA+Rosa de bengala con Ampicilina al ($80 \mu\text{g ml}^{-1}$) y Agar Nutritivo con Ciclohexamida ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) y se inocularon 0.1 ml de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} .

El PDA+Rosa de bengala con Ampicilina se incubó durante 5 días a 30°C y el Agar Nutritivo con ciclohexamida se incubó durante 3 días a 30°C .

Solo aquellas cajas (diluciones) que mostraban entre 30 y 300 colonias fueron contadas y se realizaron los cálculos siguientes:

$$\text{UFC/g.} = (\text{NC} * 1/\text{FD} * 1/\text{V}) / \text{P} .$$

Donde:

UFC/ g s. s. = unidades formadoras de colonias / g de inmobilizado.

NC= número de colonias en una caja.

FD = factor de dilución que corresponde a la dilución de donde se tomó la muestra con la que se inocula la caja (10-5 a 10-8).

V= volumen inoculado en la caja = 1 ml.

P = peso de la muestra húmeda = 1 g.

Determinación de la viabilidad en cultivo sólido

Para realizar esta técnica se llevó a cabo primeramente el muestreo de suelos y su evaluación físico química, posteriormente se realizó una cinética en cultivo sólido. La metodología a seguir fue la siguiente:

Muestreo y evaluación de suelo

Las muestras de suelo se obtuvieron teniendo en cuenta las normas NOM-021-SEMARNAT-2000 y NOM-138-SEMARNAT/SS- 2003 que especifica las condiciones de muestreo de suelos. Posteriormente el suelo fue secado a temperatura ambiente en el laboratorio, homogenizado, tamizado a través de malla 30 y almacenado a 4 °C para su análisis.

La caracterización físico-química del suelo se realizó tomando en cuenta la norma NOM-021-SEMARNAT-2000, los parámetros que se analizaron fueron: Temperatura, pH, humedad, contenido de materia orgánica, contenido de carbono orgánico total, fosforo soluble y nitrógeno total.

Cinética de cultivo sólido

Para observar la viabilidad y el desempeño de los consorcios inmovilizados en rastrojo de maíz y capsulas de alginato de sodio después de tener una vida de anaquel de 24 meses, se realizaron cinéticas en cultivo sólido, utilizando un suelo contaminado con 3000 ppm de una mezcla de fenantreno y pireno (1:1).

Cinética para el consorcio inmovilizado en residuo de maíz.

Las unidades experimentales fueron botellas serológicas de 500 ml de capacidad con 30 gramos de materia húmeda y 30% de humedad. Se utilizó rastrojo de maíz como texturizaste en una relación 95:1.5 (suelo: residuo agroindustrial).

El suelo se inoculo con el consorcio inmovilizado a una relación 95:3.5 (suelo: consorcio inmovilizado) de materia húmeda. Ya que Moreno 2016 demostró que el consorcio no activado tiene un mejor comportamiento, es decir mezclando el consorcio inmovilizado desde el inicio con el suelo contaminado.

Para ajustar la relación C: N: P a 100:10:1 y la humedad al 30% se utilizó medio Czapeck. Los tratamientos a evaluar fueron: 1) Bioestimulación + bioaumentación+ PAHs,2) Bioestimulación + bioaumentación-PAHs, 3) Bioestimulación+ PAHs, 4) Bioestimulación – PAHs, como se muestra en la tabla 3.

Todos los tratamientos se incubaron a 30°C por 30 días y las variables a evaluar fueron la producción de CO₂ por medio de una trampa de hidróxido de sodio, conteo en placa del consorcio microbiano cada 4 días, porcentaje de remoción por la técnica de microondas cada 4 días y cuantificación de PAHs extraídos por HPLC.

Tabla 3. Diseño experimental para cinética de PAHs con inmovilizado de maíz

Tratamientos	4	8	12	16	24	30
BIOESTIMULACIÓN + BIOAUMENTACIÓN+PAHs (Suelo+ residuo+ inmovilizado en maíz+ PAHs)	xx	xx	xx	xx	xx	xx
BIOESTIMULACIÓN + BIOAUMENTACIÓN-PAHs (Suelo+ residuo+ inmovilizado en maíz- PAHs)	xx	xx	xx	xx	xx	xx
BIOESTIMULACIÓN +PAHs (Suelo+residuo+ PAHs)	xx	xx	xx	xx	xx	xx
BIOESTIMULACIÓN -PAHs (Suelo+residuo- PAHs)	xx	xx	xx	xx	xx	xx

Cinética para la evaluación del consorcio inmovilizado en alginato.

Las unidades experimentales fueron botellas serológicas de 500 ml de capacidad con 30 gramos de materia húmeda y 30% de humedad. Se utilizó rastrojo de maíz como texturizaste en una relación 95:5 (suelo: residuo agroindustrial)

Como inculo se utilizó 0.25 gramos de cápsulas por cada 30g de materia húmeda de acuerdo a lo reportado por Moreno-Montaña, 2015.

La humedad se ajustó al 30 % y la relación C: N: P se ajustó a 100:10:1 ambos utilizando medio Czapeck. Los tratamientos a evaluar fueron: 1) Bioestimulación + bioaumentación+ PAHs,2) Bioestimulación + bioaumentación-PAHs, 3) Bioestimulación+ PAHs, 4) Bioestimulación – PAHs, como se muestra en la tabla 4.

Todos los tratamientos se incubaron a 30°C por 60 días y las variables a evaluar fueron la producción de CO₂, el conteo en placa del consorcio microbiano cada 5 días, porcentaje de remoción por la técnica de microondas cada 5 días y cuantificación de los PAHs extraídos por HPLC. Los tratamientos a evaluar se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Diseño experimental para cinética de PAHs con inmovilizado de alginato

Tratamientos	Tiempo (días)						
	5	10	15	20	25	30	60
BIOESTIMULACIÓN + BIOAUMENTACIÓN+PAHs (Suelo+ residuo+ inmovilizado en alginato + PAHs)	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
BIOESTIMULACIÓN + BIOAUMENTACIÓN-PAHs (Suelo+ residuo+ inmovilizado en alginato- PAHs)	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
BIOESTIMULACIÓN +PAHs (Suelo+residuo+ PAHs)	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
BIOESTIMULACIÓN -PAHs (Suelo+residuo- PAHs)	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx

11.3.2 Segunda etapa

Optimización de condiciones para la aplicación del consorcio inmovilizado en campo.

Durante esta etapa se evaluaron los consorcios en biopilas primeramente en un suelo real contaminado con petróleo y posteriormente en un suelo contaminado artificialmente con petróleo y ajustes de condiciones esto con el objetivo de buscar medios que pudieran hacer decremento en los costos sin afectar el desempeño del consorcio, para la aplicación en campo. Las variables a evaluar fueron las fuentes de carbono y nitrógeno, así como la presencia y ausencia del contaminante.

En esta etapa el suelo fue contaminado artificialmente con petróleo crudo a una relación de 100g de petróleo crudo por kilogramo de suelo.

Evaluar a nivel biopila la viabilidad de un consorcio mixto inmovilizado en residuo agroindustrial y en una matriz polimérica después de un tiempo de vida de anaquel.

Para observar la viabilidad de los consorcios inmovilizados en rastrojo de maíz y capsulas de alginato de sodio después de tener una vida de anaquel de 26 meses, se realizarán cinéticas en biopila que contenían suelo contaminado con petróleo crudo que había sido muestreado de una zona petrolera en Veracruz. La metodología a seguir fue la siguiente:

Muestreo y evaluación de suelo

Las muestras de suelo se obtuvieron teniendo en cuenta las normas NOM-021-SEMARNAT-2000 y NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 que especifica las condiciones de muestreo de suelos.

Posteriormente el suelo fue secado a temperatura ambiente en el laboratorio, homogenizado, tamizado a través de malla 30 y almacenado a 4 °C para su análisis.

La caracterización físico-química del suelo se realizó tomando en cuenta la norma NOM-021-SEMARNAT-2000, los parámetros que se analizaron fueron: temperatura, pH, humedad, contenido de materia orgánica, contenido de carbono orgánico total, fosforo soluble y nitrógeno total.

Cinética de biopila

Las unidades experimentales fueron cajas de plástico con 1 kg de materia húmeda. Se utilizó rastrojo de maíz como texturizaste en una relación 95:1.5 (suelo: residuo agroindustrial).

El suelo se inoculo con el consorcio inmovilizado en el residuo en una relación 95:3.5 (suelo: consorcio inmovilizado) de materia húmeda. Se ajustó la humedad al 30% y la relación C: N: P a 100:10:1 con medio Czapeck.

. Los tratamientos a evaluar fueron: 1) Bioestimulación + bioaumentación ,2) Bioestimulación, 3) Atenuación natural, como se muestra en la tabla 5.

Todos los tratamientos se incubaron en invernadero por 30 días y las variables a evaluar fueron: conteo en placa del consorcio microbiano cada 5 días, porcentaje de remoción de Hidrocarburos totales del petróleo (TPH) por la técnica mecánica cada 5 días y cuantificación de Hidrocarburos totales del petróleo por cromatografía de gases (GC-FID).

Tabla 5. Diseño experimental para el tratamiento en biopila.

	Tratamientos	Días				
		0	5	10	15	30
Suelo contaminado con petróleo crudo	Bioestimulación+ bioaumentación (MAÍZ)	xx	xx	xx	xx	xx
	Bioestimulación+ bioaumentación (ALGINATO)	xx	xx	xx	xx	xx
	Bioestimulación+ bioaumentación (NO INMOVILIZADO)	xx	xx	xx	xx	xx
	Bioestimulación	xx	xx	xx	xx	xx
	Atenuación Natural	xx	xx	xx	xx	xx

Caracterización de suelo y fuentes de carbono-nitrógeno.

La caracterización fisicoquímica del suelo y de las fuentes carbono-nitrógeno se realizaron tomando en cuenta la NOM-021-SEMARNAT-2000. Los parámetros que se analizaron fueron: pH, humedad, contenido de materia orgánica, contenido de carbono orgánico total, fosforo soluble y nitrógeno total.

Cinética de optimización de condiciones

Las unidades experimentales fueron viales de 50 ml con 20g de materia húmeda al 30% de humedad. Se utilizó rastrojo de maíz como texturizaste en una relación 95:1.5 (suelo: residuo agroindustrial).

El inmovilizado se utilizó en una proporción 95:3.5(suelo: inmovilizado). La relación C: N: P se ajustó a 100:10:1 para todos los tratamientos.

Los tratamientos a evaluar utilizaron como fuente de nitrógeno urea y sulfato de amonio, y como fuente de carbono melaza, azúcar y glucosa. Durante esta cinética también se evaluó la estimulación de la población endógena del suelo con tratamientos en suelo estéril y no estéril, al mismo tiempo se determinó la toxicidad del contaminante hacia el inmovilizado con tratamientos que contenían petróleo crudo. Los diseños experimentales de estas cinéticas se muestran en las tablas 6 y 7.

Las unidades experimentales se incubaron a 30°C durante 30 días y las variables a evaluar fueron: conteo en placa del consorcio microbiano cada 5 días, porcentaje de remoción de Hidrocarburos totales del petróleo (TPH) por la técnica mecánica cada 5 días y cuantificación de Hidrocarburos totales del petróleo por cromatografía de gases (GC-FID).

Tabla 6. Diseño experimental para pruebas de tratabilidad. (Fuente de nitrógeno: urea; Fuente de carbono: melaza, azúcar y glucosa)

Variables					Días						
Fuente de Nitrógeno	Fuente de carbono	Suelo	Contaminante	Inoculo	0	5	10	15	20	25	30
UREA	Melaza	No estéril	Petróleo	Inmovilizado	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
		No estéril		Inmovilizado	xx		xx		xx		xx
		Estéril	Petróleo	Inmovilizado	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
		Estéril		Inmovilizado	xx		xx		xx		xx
		Estéril	Petróleo		xx		xx		xx		xx
		Estéril			xx			xx			xx
	Azúcar	No estéril	Petróleo	Inmovilizado	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
		No estéril		Inmovilizado	xx		xx		xx		xx
		Estéril	Petróleo	Inmovilizado	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
		Estéril		Inmovilizado	xx		xx		xx		xx
		Estéril	Petróleo		xx		xx		xx		xx
		Estéril			xx			xx			xx
	Glucosa	No estéril	Petróleo	Inmovilizado	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
		No estéril		Inmovilizado	xx		xx		xx		xx
		Estéril	Petróleo	Inmovilizado	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
		Estéril		Inmovilizado	xx		xx		xx		xx
		Estéril	Petróleo		xx		xx		xx		xx
		Estéril			xx			xx			xx

Tabla 7. Diseño experimental para pruebas de tratabilidad. (Fuente de nitrógeno: sulfato de amonio, Fuente de carbono: melaza, azúcar, glucosa).

		Variables			Días						
Fuente de Nitrógeno	Fuente de carbono	Suelo	Contaminante	Inoculo	0	5	10	15	20	25	30
Sulfato de amonio	Melaza	No estéril	Petróleo	Inmovilizado	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
		No estéril		Inmovilizado	xx		xx		xx		xx
		Estéril	Petróleo	Inmovilizado	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
		Estéril		Inmovilizado	xx		xx		xx		xx
		Estéril	Petróleo		xx		xx		xx		xx
		Estéril			xx			xx			xx
	Azúcar	No estéril	Petróleo	Inmovilizado	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
		No estéril		Inmovilizado	xx		xx		xx		xx
		Estéril	Petróleo	Inmovilizado	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
		Estéril		Inmovilizado	xx		xx		xx		xx
		Estéril	Petróleo		xx		xx		xx		xx
		Estéril			xx			xx			xx
	Glucosa	No estéril	Petróleo	Inmovilizado	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
		No estéril		Inmovilizado	xx		xx		xx		xx
		Estéril	Petróleo	Inmovilizado	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
		Estéril		Inmovilizado	xx		xx		xx		xx
		Estéril	Petróleo		xx		xx		xx		xx
		Estéril			xx			xx			xx

11.4 Tercera Etapa

Evaluación del inmovilizado con diferentes xenobióticos

Como última etapa del proyecto se evaluó el desempeño del consorcio mediante una cinética en un sistema de biopila con suelo contaminado con diferentes xenobióticos.

Cinética en biopila con diferentes xenobióticos.

Los xenobióticos a utilizar fueron diésel, mezcla de plaguicidas (paratión metílico, endosulfan, paraquat, carbofuran) en una proporción de 100 g por kilogramo de suelo.

Se utilizaron 3 suelos con características físico químicas diferentes.

Muestreo y evaluación del suelo.

Las muestras de suelo se obtuvieron teniendo en cuenta las normas NOM-021-SEMARNAT-2000 y NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 que especifica las condiciones de muestreo de suelos.

Posteriormente el suelo fue secado a temperatura ambiente en el laboratorio, homogenizado, tamizado a través de malla 30 y almacenado a 4 °C para su análisis.

La caracterización físico-química del suelo se realizó tomando en cuenta la norma NOM-021-SEMARNAT-2000, los parámetros a analizar fueron: temperatura, pH, humedad, contenido de materia orgánica, contenido de carbono orgánico total, fósforo soluble y nitrógeno total.

Cinética para la evaluación del consorcio con diferentes xenobióticos.

Las unidades experimentales fueron cajas de plástico con 1 kg de materia húmeda. Se utilizó rastrojo de maíz como texturizante en una relación 95:1.5 (suelo: residuo agroindustrial) para todos los tratamientos excepto la atenuación natural.

El inoculo con el consorcio inmovilizado en el residuo de maíz se utilizó en una relación 95:3.5 (suelo: consorcio inmovilizado), mientras para el inoculo con el consorcio inmovilizado en capsulas de alginato se utilizaron 8 gramos por kilogramo de suelo.

El inoculo que contenía microorganismos libres (no inmovilizados) se utilizó para comparar el desempeño de los inmovilizados; se utilizaron 1.8×10^8 UFC/kg de suelo húmedo.

Los tratamientos en los tres suelos a evaluar fueron: 1) Bioestimulación + bioaumentación (utilizando el inmovilizado en alginato) 2) Bioestimulación + bioaumentación (utilizando el inmovilizado en rastrojo de maíz), 3) Bioestimulación+ bioaumentación (utilizando microorganismos no inmovilizados), 4) Bioestimulación 5) Atenuación natural, como se muestra en la tabla 8.

En todos los tratamientos se ajustó la relación C: N: P a 100:10:1 tomando en cuenta las relaciones del contaminante, el suelo, el residuo y el medio seleccionado en la etapa anterior (nitrato de amonio-urea).

Tabla 8. Diseño experimental para la cinética en biopila con diferentes xenobióticos.

Tratamientos		Contaminante	0	5	10	15	20	25	30
Suelo 1/2/3	Bioestimulación +bioaumentación (inmovilizado alginato)	Diésel	xx						
		Plaguicida	xx						
		Sin contaminante	xx						
	Bioestimulación +bioaumentación (inmovilizado maíz)	Diésel	xx						
		Plaguicida	xx						
		Sin contaminante	xx						
		Diésel	xx						

	Bioestimulación +bioaumentación (libres)	Plaguicida	xx						
		Sin contaminante	xx						
	Bioestimulación	Diésel	xx						
		Plaguicida	xx						
		Sin contaminante	xx						
	Atenuación Natural	Diésel	xx						
		Plaguicida	xx						
		Sin contaminante	xx						

12. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

12.1 Primera Etapa: Evaluar la viabilidad del consorcio mixto inmovilizado

12.1.1 Determinación de la viabilidad en placa

Los consorcios inmovilizados en alginato y residuos de maíz (Figura 4) fueron evaluados mediante el recuento en placa. El recuento para el consorcio inmovilizado en alginato dio como resultado un conteo para bacterias de 3.175×10^8 UFC/g y para hongos 2.975×10^8 UFC/g, esto es un 11 % de recuperación de acuerdo a los resultados obtenidos por Moreno-Montaño en 2016 donde obtuvo un recuento de 2.755×10^9 UFC/g de inmovilizado (66% de recuperación) después de una semana del tratamiento de inmovilización.

Las unidades formadoras de colonia por gramo de inmovilizado de maíz fueron 2.07×10^9 de: bacterias y de hongos 1.65×10^8 , Moreno- Montaño en 2016 encontró que la viabilidad para este inmovilizado fue de 6.4×10^8 UFC/ g de inmovilizado (38% de recuperación).

La agencia de protección ambiental de estados unidos (EPA) reporta que las poblaciones microbianas en suelos típicos oscilan entre 10^4 y 10^7 UFC / gramo de suelo y para que un tratamiento de biorremediación como biopilas sea eficiente, el recuento mínimo de debe ser 1×10^3 UFC / gramo de suelo. Esto nos indica que a pesar de que los inmovilizados han perdido viabilidad estos aún son aptos para un tratamiento de biorremediación en suelos.



Figura 4. Consorcio inmovilizado en Maíz (izquierda) y consorcio inmovilizado de alginato de sodio (derecha).

12.1.2 Determinación de la viabilidad en cultivo sólido

Muestreo de suelos.

Para esta etapa, se determinó como área de muestreo, Tepetitla de Lardizábal, ubicado a 25 km de la Capital del estado de Tlaxcala y a 2200 m del nivel del mar. En esta región la mayoría del suelo lo comprenden tierras de cultivo agrícola y pastos. El relieve del municipio presenta tres formas características: zonas planas que comprenden el 75% de la superficie total del municipio, zonas semiplanas las cuales ocupan el 20% de la superficie y se ubican en la parte norte del municipio, zonas accidentadas que abarcan el 5% restante y se localizan al suroeste del municipio.

Los recursos hidrográficos del municipio son el río Atoyac que atraviesa el municipio desde la parte noroeste hasta el sureste, recorriendo aproximadamente 8.7 Km., además cuenta con un arroyo de caudal sólo durante la época de lluvias que se encuentra a 100 m de la zona de muestreo. En la mayor parte del municipio prevalece el clima templado subhúmedo con lluvias en verano. La temperatura media anual máxima registrada es de 23.7 grados centígrados y durante el año se observan variaciones en la temperatura que van desde los 0.5 grados

centígrados como mínima, hasta los 26.2 grados centígrados como máxima. La precipitación promedio mínima es de 4.4 milímetros y la máxima de 132.1 milímetros anuales.

Las muestras de suelo se tomaron en las coordenadas Latitud: 19°16'49.53"N Longitud: 98°21'56.31"O (Fig.5). Esta área se encuentra a un costado del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada.

Las muestras se tomaron de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000, y posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente y se tamizaron a través de malla 30.

El pH y la humedad fueron determinadas inmediatamente después de ser recolectado el suelo. En la tabla 9, se muestran los resultados de las pruebas físico-químicas clasificándolos de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000.



Figura 5. Zona de muestreo con coordenadas Latitud: 19°16'49.53"N Longitud: 98°21'56.31"O.

De acuerdo con Wu *et al.*, 2017, la diversidad bacteriana está fuertemente ligada al pH del suelo ya que se han reportado mayor diversidad en muestras neutras que en muestras ácidas. Es por

esto que un pH neutro como indica que no impactara de manera negativa en el crecimiento de nuestro consorcio inmovilizado.

La relación de C: N: P de 100:8.9:0.049 mostró que es un suelo medianamente rico y lo que fue conveniente para el ajuste C: N: P a 100:10:1 ya que este ajuste es uno de los factores importantes para la supervivencia de los microorganismos (Kuppusamy *et al* 2016).

Tabla 9. Resultados fisicoquímicos del suelo CIBA-IPN, Tlaxcala.

Parámetro	Valor	Clasificación
pH	7.01	Neutro
Humedad	13.8%	
Contenido de materia orgánica	2.554968	Medio
Carbono (%)	1.482	Medio
Nitrógeno (%)	0.132	Medianamente rico
Fosforo (%)	0.000728	Bajo
C/N/P	100/8.9/0.049	
Arcilla		
Limo		
Arena		

12.1.3 Cinética en cultivo sólido para determinar la viabilidad del consorcio inmovilizado en maíz.

Las cinéticas se montaron de acuerdo a las relaciones que se muestran en la tabla 10, utilizando residuo de maíz como texturizante, esto para favorecer la disponibilidad de oxígeno en el cultivo sólido.

Tabla 10. Relación para cultivo solido del consorcio inmovilizado en maíz.

	Relación			
	30%	95	3.5	1.5
Inmovilizado de maíz	Humedad	Suelo	Residuo	Inoculo
30 g de materia húmeda	9ml	19.95g	0.735g	0.315g

Como se ha dicho anteriormente, las variables a evaluar fueron: la producción de CO₂ por medio de una trampa de hidróxido de sodio cada 48 horas, el pH, la humedad, el conteo en placa del consorcio microbiano y porcentaje de remoción por la técnica de microondas, cada 4 días.

La humedad se mantuvo constante durante todo el tiempo del tratamiento. En el grafico 1 se muestra el pH durante los 30 días de cinética, durante este tiempo no se mostró una diferencia significativa entre los tratamientos, ya que oscilo entre 6.4 y 7. La EPA reporta que para soportar el crecimiento microbiano el suelo debe mantener un pH de 6-8 siendo 7 un pH óptimo para el crecimiento de las poblaciones microbianas.

El CO₂ fue medido cada 48 horas durante los 30 días de la cinética, como un indicador indirecto del crecimiento del consorcio. En el grafico 2 se muestra al día 20 del cultivo solido el tratamiento Bioaumentado+bioestimulado+PAHs presenta una producción de 1.86 mg de CO₂ / g de materia seca, mientras el tratamiento Bioalumentado+bioestimulado-PAHs tiene una actividad heterotrófica de 1.22 mg de CO₂ /g de materia seca sin embargo esto no muestra diferencia significativa en la actividad heterotrófica instantánea.

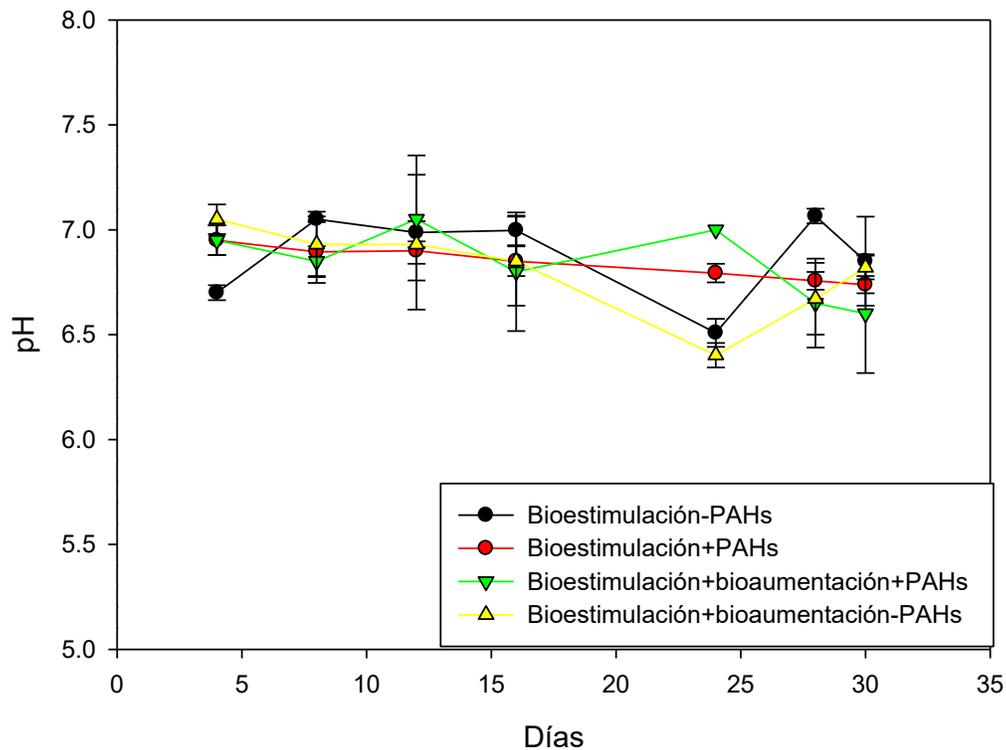


Grafico 1. Comportamiento de pH durante 30 días de cultivo sólido.

Por otra parte el tratamiento Bioaumentado+bioestimulado+PAHs, mostró una producción de CO₂ acumulado de 12.01 mg de CO₂ /gramo de materia seca, mientras que el tratamiento Bioaumentado+bioestimulado-PAHs, presentó una producción de 10.13 mg de CO₂/ gramo de materia seca, ambos después de 30 días de tratamiento, obteniendo una diferencia significativa de CO₂ acumulado al día 30 .Estos resultados se correlacionan con las UFC por g de materia húmeda que se encontraron al día 30 , en el tratamiento Bioaumentado+bioestimulado+PAH 2.9 x 10⁹ UFC mientras que el tratamiento Bioaumentado+bioestimulado-PAHs tuvo 2.6 X 10⁸ UFC , lo que estadísticamente muestra una diferencia significativa entre estos tratamientos. Los tratamientos controles Bioaumentado+PAHs y Bioaumentado-PAHs no mostraron actividad ya que era un suelo estéril.

Moreno-Montaña en 2016, utilizó el mismo tratamiento con los inmovilizados en maíz (Bioaumentado+bioestimulado+PAH) s y obtuvo 8 m de CO₂/g de materia seca a los 30 días del tratamiento y una degradación del 53% al fin de la cinética. En el grafico 4 se presentan los porcentajes de degradación durante el tiempo de cinética. Al día 30 se obtiene 92.72% de degradación total de PHE:PY, sin embargo, los contaminantes no se degradaron en la misma proporción, por lo que el fenantreno tuvo una degradación de 100%, mientras que el pireno se degradó un 71.68%. Zafra *et al.*, 2014 reportó una degradación parecida con un 87.76% de fenantreno y un 48% de pireno después de 14 días de tratamiento de suelo contaminado con 3000 ppm con PHE:PY: BaP (1:1:1), y bioestimulado con un consorcio mixto, sin embargo, este no se encontraba inmovilizado en ninguna matriz.

Anteriormente autores como Sawulski *et al.*, 2014 han reportado que en una mezcla de PAHs (fenantreno:200ppm, fluorantheno:50pp y benzo(a)pireno:50ppm), estos se han degradado en diferentes porcentajes, fenantreno un 95% en 2 días, fluorantheno 90% y benzo(a)pireno menos 20% ambos en 20 días; a su vez Tauler *et al.* , 2015 utilizó un consorcio bacteriano conformado por los generos *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, y *Mycobacterium*, para un tratamiento de bioaumentación en un suelo contaminado con creosota y mezcla de PAHs, posterior a 30 días de tratamiento no encontraron fenantreno y de pireno encontraron una remoción del 90% de pireno. Xu *et al.*, 2006 explica que la degradación de PAHs baja mientras el peso molecular y el número de anillos de benceno aumenten; lo anterior es significativo en nuestro análisis ya que después de 30 días encontramos una diferencia significativa entre la degradación de fenantreno y pireno

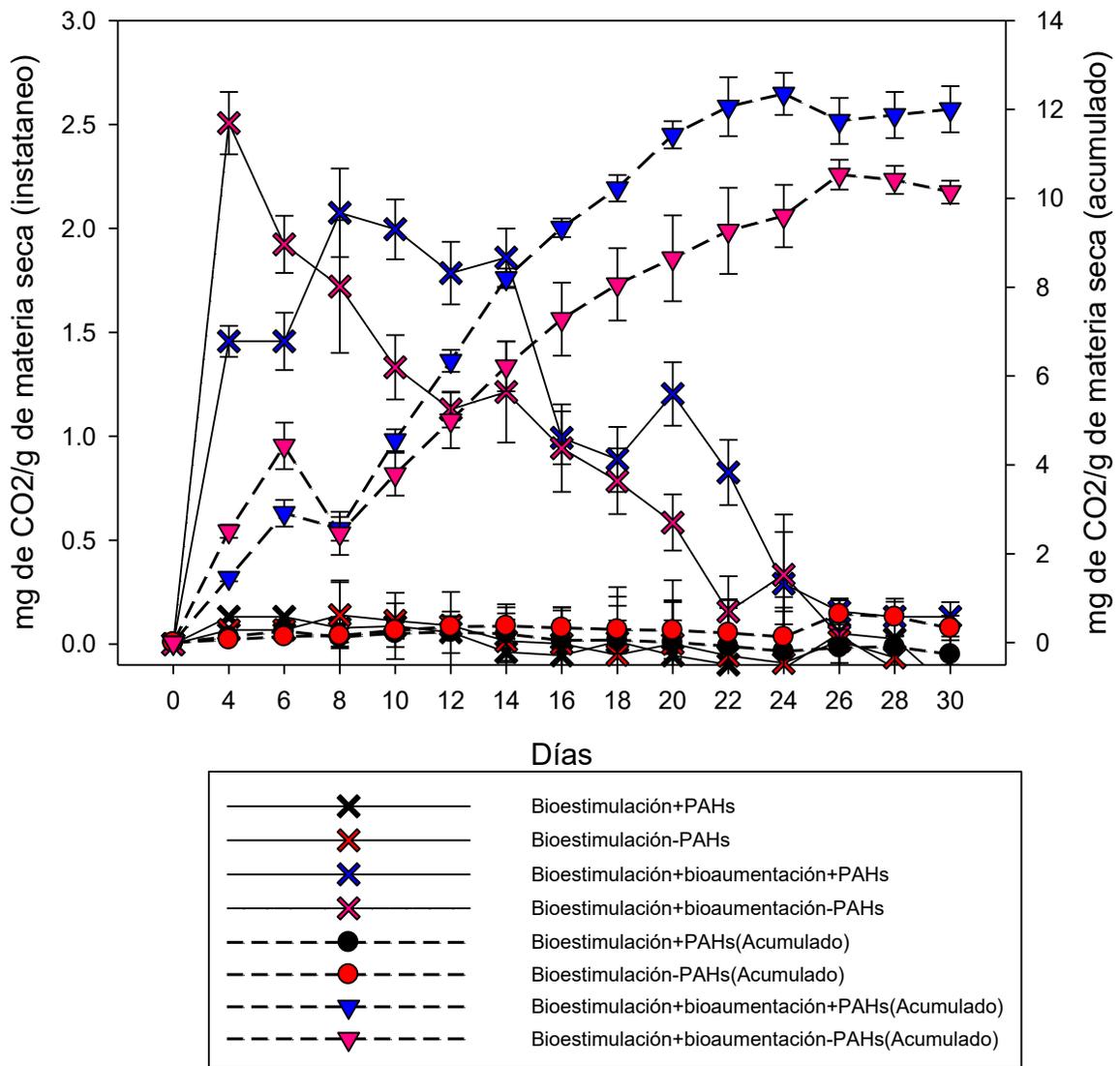


Grafico 2. Actividad heterotrófica durante la cinética con consorcio inmobilizado en residuo de maíz.

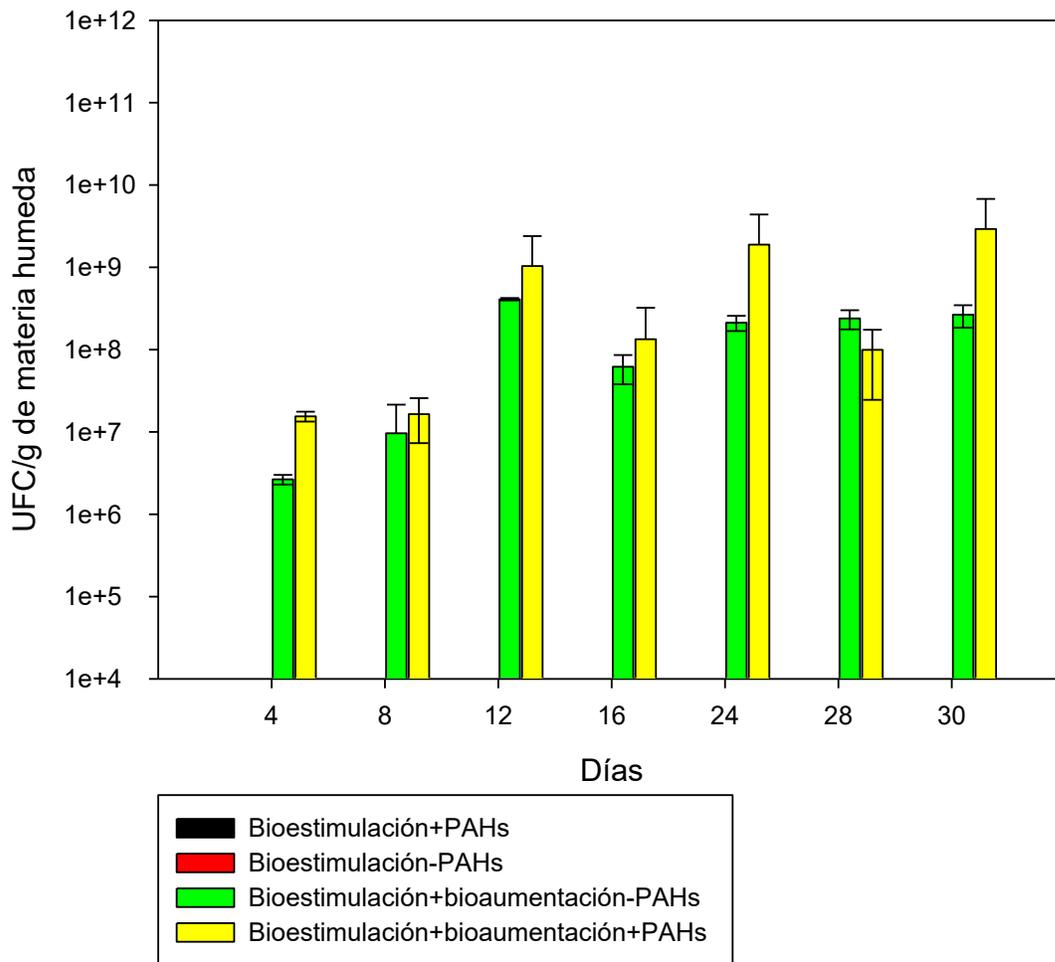


Grafico 3. Unidades formadoras de colonia (UFC) por g de materia húmeda durante los 30 días del cultivo sólido.

Lo anterior indica que la viabilidad del consorcio inmovilizado en una matriz de alginato y su capacidad para degradar siguen siendo buenas después de 24 meses de inmovilización. Mõrsen *et al.*, 1996 reporta haber adsorbido en carbón activado células de un consorcio bacteriano y guardarlas a 4°C durante 12 meses, después de este tiempo las células conservaron su capacidad de degradación de fenol. Mohammadi *et al.*, 2013 reportó que la inmovilización de

Phanerochaete chrysosporium en bagazo de caña de azúcar aumentó la producción de la enzima manganeso peroxidasa durante la biodegradación del antraceno.

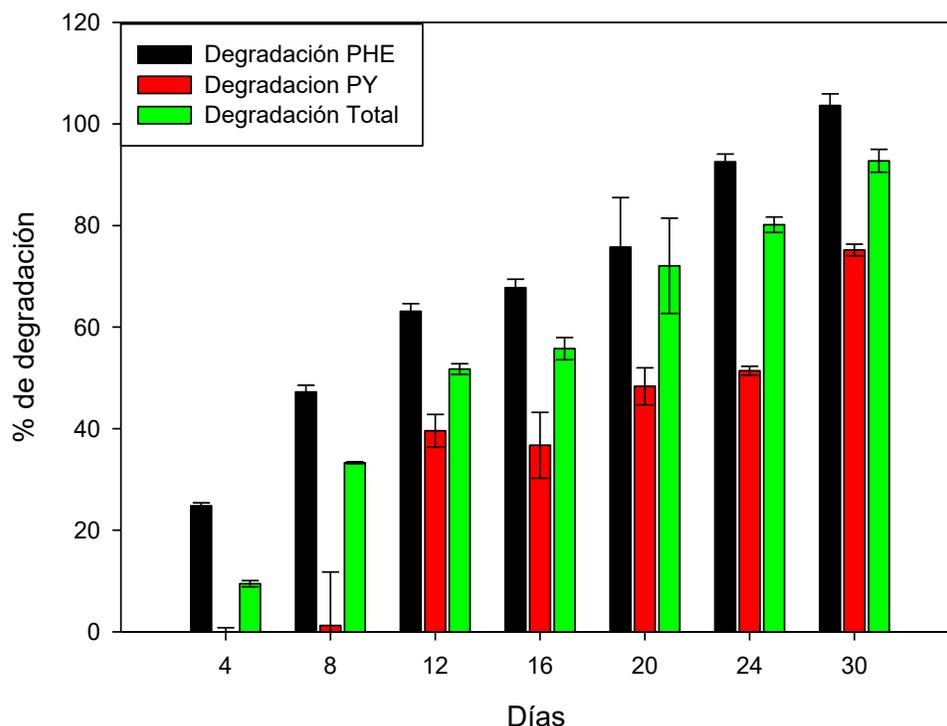


Grafico 4. Porcentaje de degradación de fenantreno (PHE), pireno(PY) y total durante los 30 días de cultivo sólido con inmovilizado en maíz.

12.1.4 Cinética en cultivo sólido para determinar la viabilidad del consorcio inmovilizado en alginato.

Las cinéticas para los inmovilizados de alginato se montaron de acuerdo a las relaciones que se muestran en la tabla 11, utilizando residuo de maíz como texturizante y ajustando la humedad al 30% con medio Czapeck

Tabla 11. Relación para cultivo solido del consorcio inmovilizado en maíz.

	Relación			
	30%	95	5	-
Inmovilizado de alginato	Humedad	Suelo	Residuo	Inoculo
30g de materia húmeda	9ml	19.7125g	1.0375g	0.25g

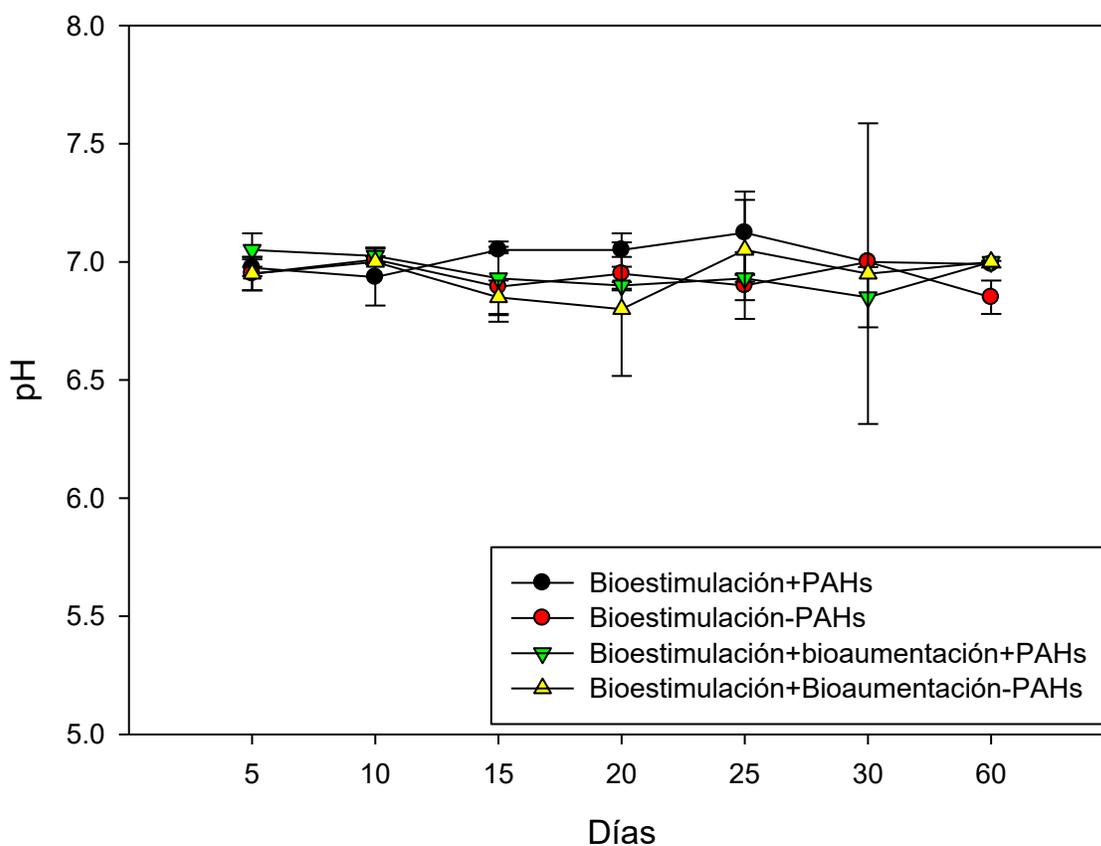


Grafico 5. pH durante la cinética de cultivo solido con inmovilizados de alginato.

En el grafico 4 se muestra el pH de los tratamientos durante los 60 días de cinética, no hubo una diferencia significativa durante todo el tratamiento. Diferentes valores de pH influyen en la utilización de nutrientes por parte de los microorganismos, la producción y secreción de enzimas extracelulares, etc. (Shen *et al.*, 2017). En el grafico 5 se muestra la actividad heterotrófica

acumulada durante los 60 días de cinética, la cual refiere que los tratamientos Bioestimulado+ bioaumentado+ PAHs, alcanzan 21.05 mg de CO₂ / g de materia seca al día 36 mientras que los tratamientos Bioestimulación+bioaumentación+PAHs alcanzan 10.5 mg de CO₂/ g de materia seca al mismo día. El análisis estadístico de esta cinética muestra una diferencia significativa en la actividad heterotrófica entre los tratamientos Bioestimulado+ bioaumentado+ PAHs y Bioestimulación+bioaumentación+PAHs.

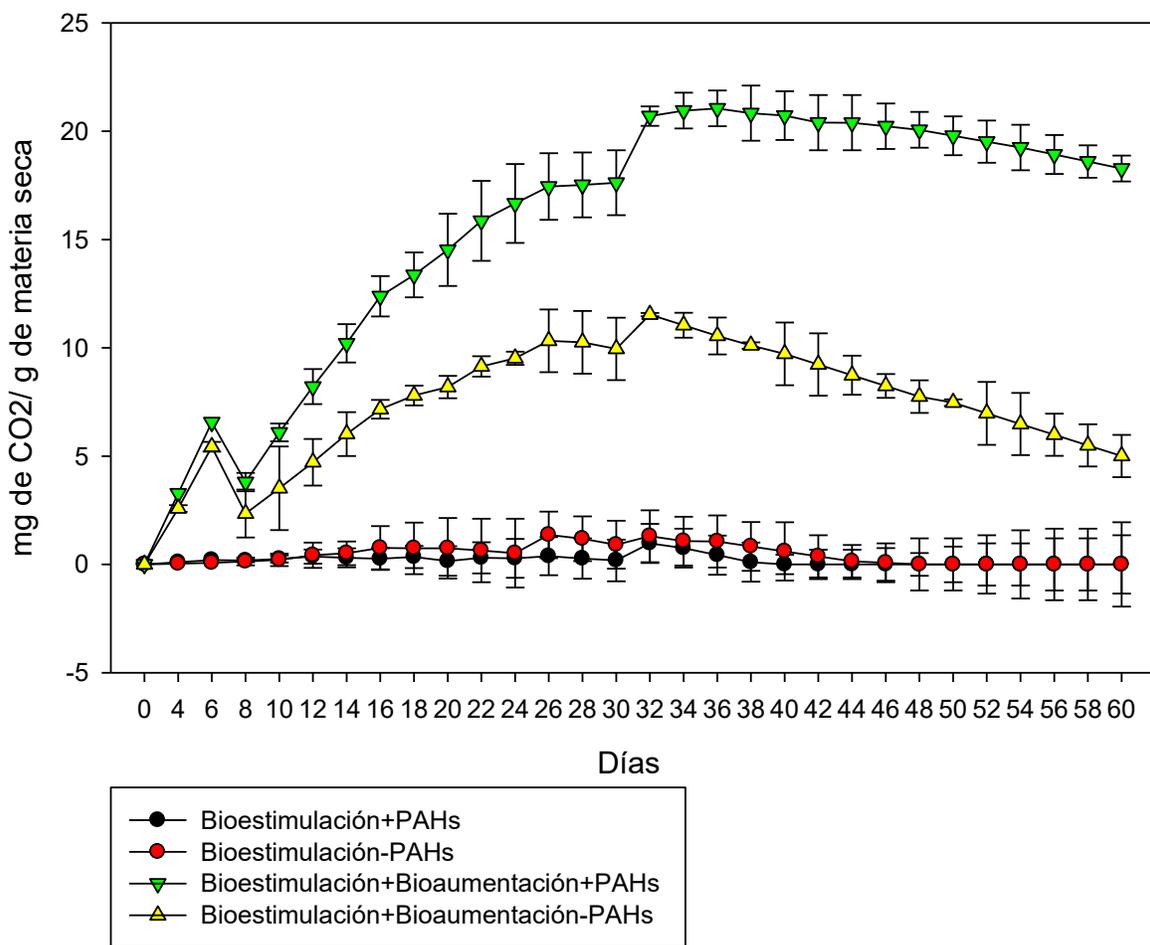


Grafico 6: Actividad heterotrófica acumulada con consorcio inmovilizado en alginato.

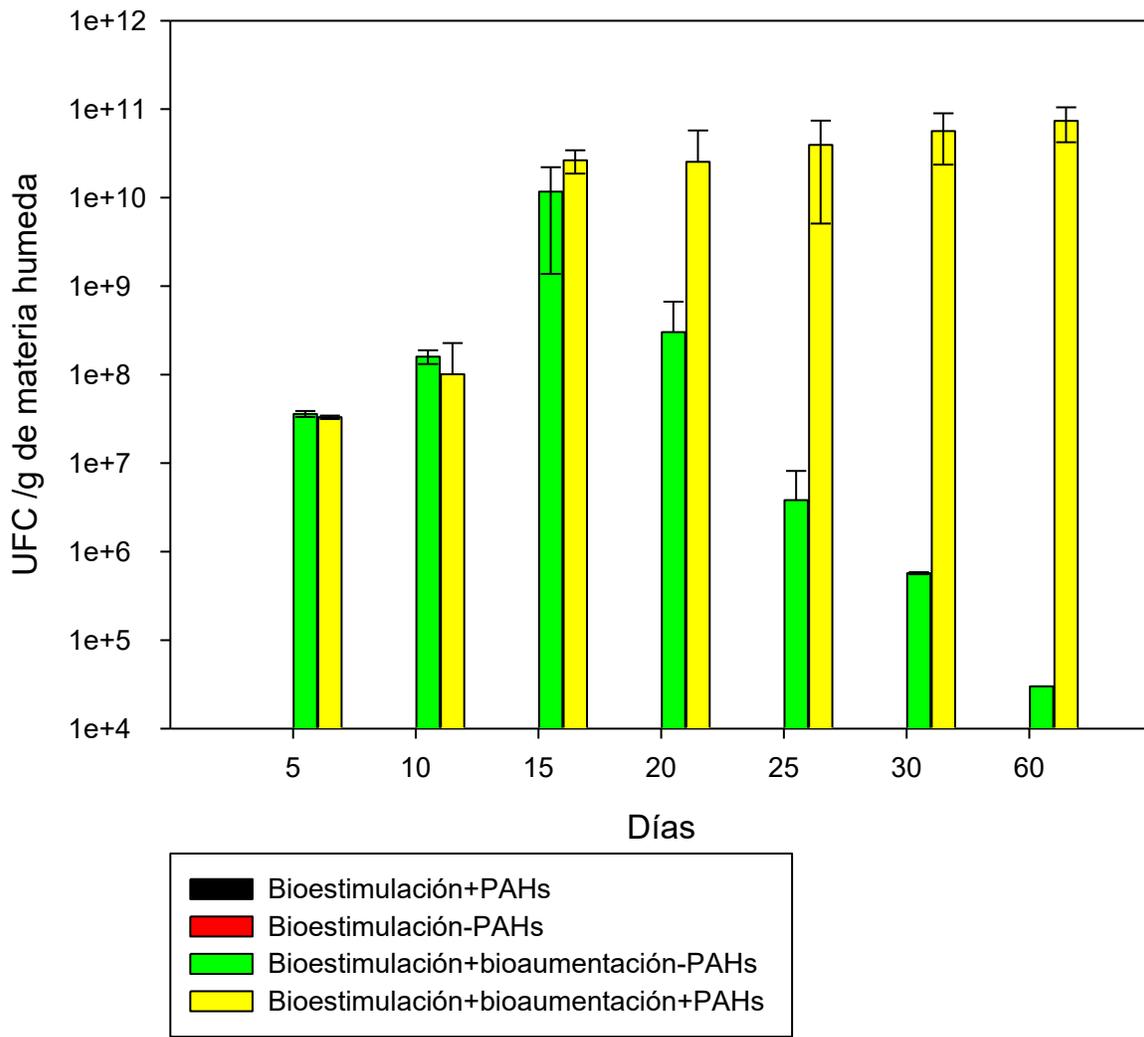


Grafico 7. Unidades formadoras de colonia (UFC) por g de materia húmeda durante la cinética con el consorcio mixto inmovilizado en alginato.

Los tratamientos controles Bioaumentación+PAHs y Bioaumentación-PAHs no mostraron actividad heterotrófica, ni actividad durante el recuento en placa, los tratamientos Bioaumentación+bioestimulación+PAHs tuvieron un recuento de 7.3×10^{10} UFC/g de materia húmeda, mientras que los tratamientos Bioaumentación+bioestimulación-PAHs mostraron un recuento de 3×10^4 UFC/g de suelo húmedo ambos al día 60, estadísticamente muestra una

diferencia significativa entre estos tratamientos, lo que nos da un indicio de que el consorcio está utilizando los contaminantes como fuente de carbono alternativa al terminarse la fuente de carbono de fácil asimilación.

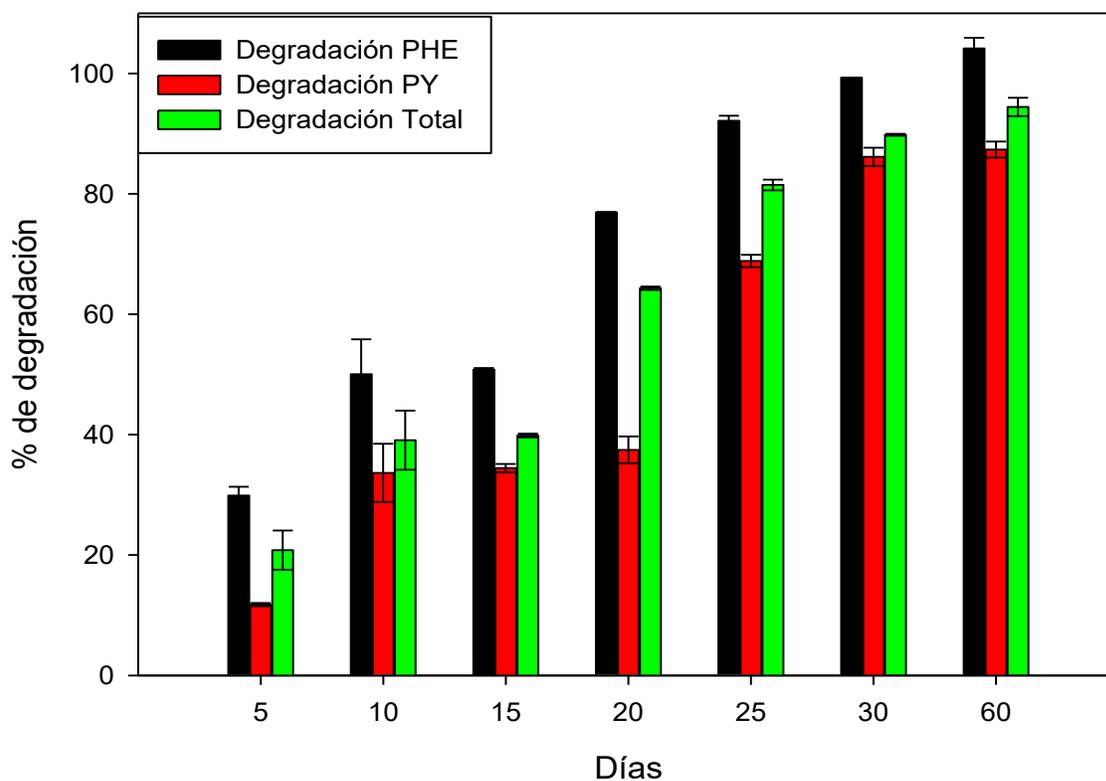


Grafico 8. Porcentaje de degradación de fenantreno (PHE), pireno(PY) y total durante los 60 días de cultivo sólido con inmovilizado en alginato.

La degradación total durante esta cinética fue de 94.41% (Grafico 8), sin embargo, la degradación de fenantreno fue mayor a la de pireno ya que el fenantreno se degradó un 100% mientras que el pireno un 87.35%.

Moreno-montaña,2016 reportó una degradación total de 47.21% lo que fue más bajo de lo encontrado en nuestro estudio esto puede deberse a diferentes factores, uno de estos es la relación fisicoquímica del suelo ya que el suelo que Moreno-Montaña utilizo es un suelo que tenía un porcentaje de, 0.063% de nitrógeno y 0.0023% de fosforo, mientras que el suelo que fue recolectado de CIBA tenía un 0.132% de nitrógeno y 0.000728 de fosforo. Otro factor es la viabilidad en la matriz ya que Zommere, y Nikolajeva en 2017 reportan que la viabilidad de un consorcio conformado por las cepas., *Bacillus* sp., *Ochrobactrum* sp. y *Pseudomonas* sp. e inmovilizado en capsulas de alginato incrementan su viabilidad después de 250 días, lo que nos hace pensar que la viabilidad del consorcio es mejor después de 24 meses y por tanto su desempeño durante la degradación incrementa significativamente. Comparando los resultados de los diferentes tipos de inmovilizados podemos ver en el grafico 9 que no se encuentran diferencias significativas durante la degradación durante los días 20 y 30, ya que ambos han podido degradar el 100% de pireno para el día 30.

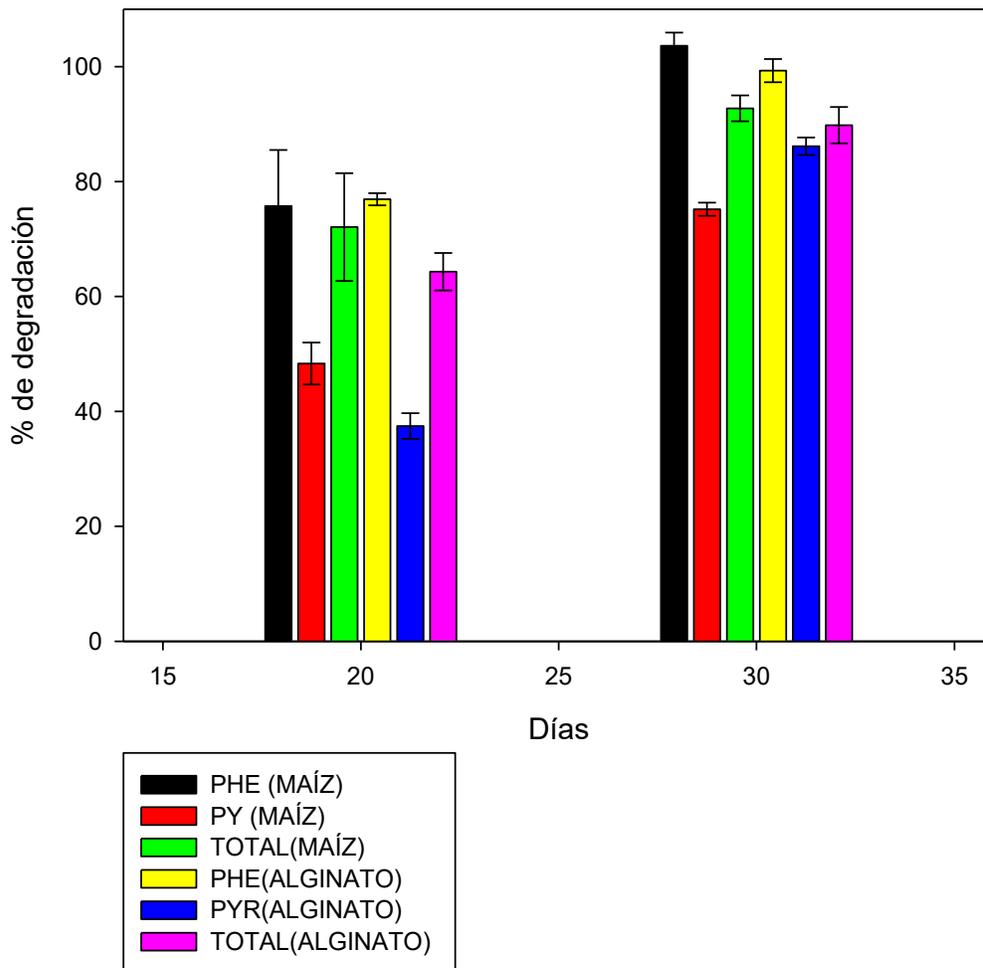


Grafico 6. Comparación de la degradación y el CO2 acumulado.

El promedio del conteo de UFC se muestra en el grafico 7 teniendo el tratamiento con inmovilizado de maíz su mayor conteo el día 10 llegando a un orden de magnitud de 10^8 mientras que el tratamiento con inmovilizados de alginato llegan a su conteo máximo el día 15, sin embargo, se mantienen en el orden de magnitud de 10^8 desde el día 5 y hasta el final de la cinética el día 30.

Moreno-Montaña 2016, reporta en una pila de 1kg de suelo contaminado con diésel en los tratamientos con alginato al día 30 $6.30 \cdot 10^4$ UFC/g y en los tratamientos con inmovilizado en

maíz reporta $4.45 \cdot 10^2$ UFC/g, sin embargo, el suelo que utiliza es contaminado artificialmente por tanto no tenía viable micro biota nativa. Mientras que en nuestros tratamientos era un suelo intemperado que poseía una cantidad importante de microorganismos del orden de 10^6 por lo que la bioestimulación con residuo de maíz y medio Czapeck incremento el conteo de microorganismos.

12.2 Segunda etapa. Optimización de condiciones para la aplicación del consorcio inmovilizado en campo.

Durante esta cinética se evaluaron los inmovilizados en biopila de 1kg, con el fin de optimizar las condiciones para la aplicación en campo.

12.2.1 Evaluación a nivel biopila la viabilidad de un consorcio mixto inmovilizado en residuo agroindustrial y en una matriz polimérica después de un tiempo de vida de anaquel.

Muestreo y caracterización de suelo

El muestreo de suelo se llevó a cabo en Ejido El Salitral, Municipio Ignacio de la llave- Región de la mixtequilla. El municipio se encuentra ubicado en la zona central del estado, dentro de la zona conocida anteriormente como llanuras del sotavento, en la región económico-administrativa llamada, Papaloapan. Limita al norte con los municipios de Tlalixcoyan y Alvarado, al sur con los municipios de Ixmatalhuacan y Tierra Blanca, al oeste con los municipios de Tierra Blanca y Tlalixcoyan, y al este con los municipios de Alvarado e Ixmatalhuacan. Su suelo es de tipo gleysol. Se caracteriza por que se localiza en terrenos en donde se acumula y estanca el agua, con tonalidades azulosas, verdosas o grisáceas que al secarse presentan manchas rojas y son poco susceptibles a la erosión. Parte del territorio es

irrigado por el río blanco, y algunas aguas perennes, pertenecientes a la cuenca hidrográfica del Papaloapan. En la mayor parte del territorio cálido subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad y en minoritariamente cálido subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media, con un rango de precipitación de 1 400 – 1 600 mm y una temperatura promedio de 24 – 28 °C. El 35.53% del territorio municipal es dedicado a la agricultura, un 61.83% son terrenos sujetos a inundaciones se utilizan exclusivamente para la explotación de la ganadería, un 2.04% es destinado para viviendas y un 0.60% son utilizados en caminos vecinales de terracería y asfalto, al igual Petróleos Mexicanos (PEMEX) ha abierto pozos de exploración y explotación contaminando así parte de los suelos de esta región (<http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM30veracruz/municipios/30075a.html>)



Figura 6. Zona de muestreo con coordenadas Latitud: 18°39'31.38"N y Longitud: 95°59'27.14"O.

Las muestras de suelo se tomaron en las coordenadas Latitud: 18°39'31"N Longitud: 95°59'27.14"O (Fig.6). En la tabla 12, se muestran los resultados de las pruebas fisico-químicas clasificándolos de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000.

De acuerdo a Xu *et al.*,2017, los suelos contaminados tienden a tener un pH alcalino por lo que reporta que un suelo contaminado con petróleo crudo tiene un pH de 8.99., lo que se relaciona con nuestros resultados fisicoquímicos

Haller *et al.*, 2016 refiere que el tipo de suelo es importante para los microorganismos ya que un suelo franco arenoso es capaz de retener más cantidad de agua y nutrientes que uno totalmente arenoso.

Tabla 12. Resultados fisicoquímicos del suelo El salitral, Veracruz.

Parámetro	Valor	Clasificación *
pH	8.9	Fuertemente alcalino
Humedad	22.3%	
Contenido de materia orgánica	16.43%	Muy alto
Carbono (%)	9.53%	Muy alto
Nitrógeno (%)	0.993%	Medianamente rico
Fosforo (%)	>1ppm	Bajo
Azufre (%)	1.19%	
Proteína	0.621%	

C/N/P	100/10.41/0.00001	
Arcilla	10%	Suelo franco arenoso
Limo	34%	
Arena	56%	

Cinética en biopila

La cinética en biopila se realizó con el suelo recolectado de Veracruz el cual se encontraba contaminado con petróleo crudo. La relación que se utilizó para las biopilas de esta cinética se muestra en la tabla 13.

Tabla 13. Relación para biopila con inmovilizado de maíz

Biopilas	Relación			
	30%	95	3.5	1.5
Inmovilizado de maíz	Humedad	Suelo	Residuo	Inoculo
1000	300	665	24.5	10.5

El pH inicial de los tratamientos se encontró entre 7.0 y 7.5 esto debido al medio que tenía un pH de 6.5 y ayudo a su disminución, sin embargo, al día 20 los tratamientos que contenían el consorcio ya habían llegado a un pH mayor a 9 lo que de acuerdo a Besalatpour *et al.*, 2011 también ocurre en tratamientos de landfarming con suelo contaminados con petróleo crudo, en su investigación reporta un incremento de 7.3 to 8.3 y al mismo tiempo una remoción de 60% de TPH.

El recuento máximo de UFC en el tratamiento Bioestimulado+bioaumentado (Alginato) fue al día 15 con 3.84×10^8 UFC/g de materia húmeda sin embargo a partir del día 8 muestra ordenes de magnitud de 10^8 y se mantiene durante toda la cinética (Grafico 7), mientras que Moreno-Montaña 2016, reporta un recuento de 1.28×10^8 UFC/g de materia húmeda, a partir del día 8 en una biopila contaminada con diésel e inoculada con inmovilizados de maíz, sin embargo al día 30 ya solo encuentra 4.45×10^2 UFC/g de materia húmeda.

El tratamiento Bioestimulado+bioaumentado(Maíz) muestra un recuento de 3.07×10^8 al día 10 y mantiene este orden de magnitud durante toda la cinética, Moreno-Montaña mostro un comportamiento similar ya que al día 8 obtuvo un recuento de 2×10^8 UFC/g de materia húmeda, sin embargo, al día 30 de la cinética encontramos 1.54×10^8 mientras que Moreno-Montaña solo muestra un recuento de 6.30×10^4 UFC/g de suelo húmedo. Estos resultados muestran que los microorganismos de los inmovilizados de maíz se reactivan antes que los de alginato, esto se debe a la forma de inmovilización.

La capacidad de degradación del hidrocarburo del consorcio bacteriano inmovilizado en residuo de coco, cáscara de arroz y cápsulas de alginato de sodio fue comprada por Nunal *et al.* 1993. Informaron que la inmovilización de los microorganismos degradadores de hidrocarburo en la superficie de residuo de coco tuvo mayor reducción de hidrocarburo, en comparación con la encapsulación en alginato de sodio; esto se debe presumiblemente a que la población microbiana altamente unida a la superficie del soporte, proporcionando un nicho de protección, la naturaleza porosa del residuo de coco podría permitir la difusión eficiente del sustrato, la liberación lenta de nutrientes y la aceleración de la transferencia de oxígeno, proporcionando así un nicho favorable para la utilización de hidrocarburos. Además, en las células bacterianas

encapsuladas, es posible que no se permita la replicación dentro de la matriz de alginato y su posterior liberación en el medio.

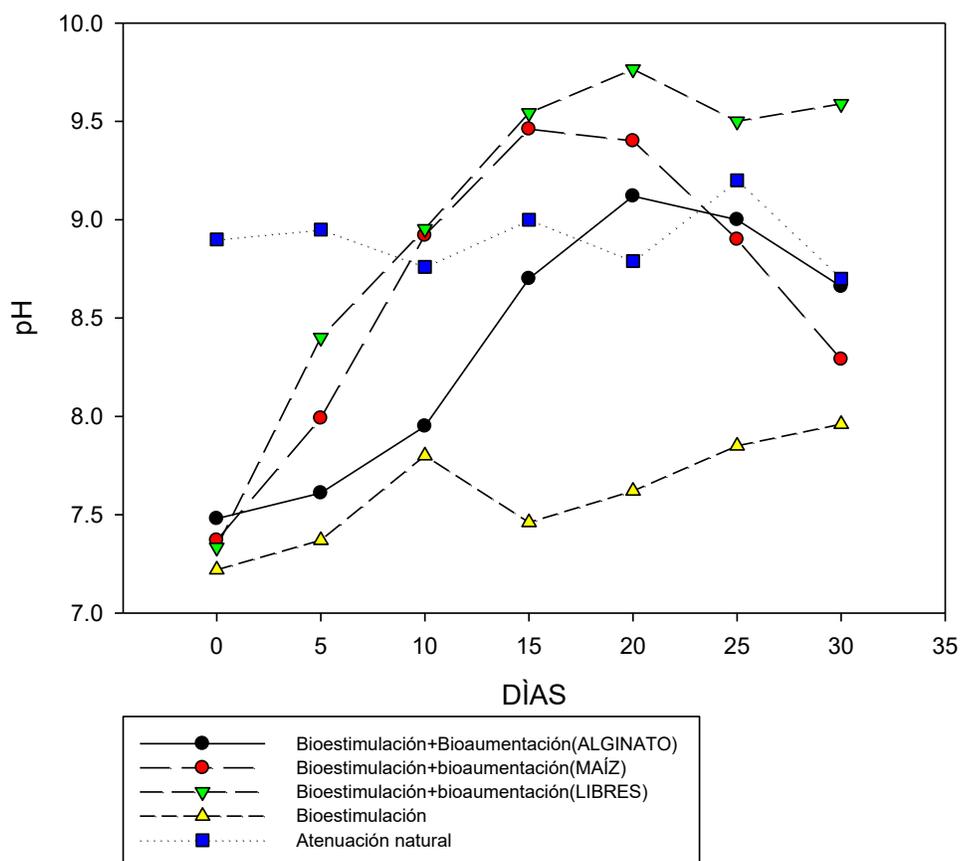


Grafico7. pH durante la cinética de degradación en biopilas.

Al comparar la supervivencia del consorcio no inmovilizado con los inmovilizados, el consorcio no inmovilizado muestra una menor supervivencia a lo largo de la cinética. Díaz *et al.*,2002 informaron que la inmovilización de células bacterianas mejoró la tasa de biodegradación del petróleo crudo en comparación con las células vivas libres en un amplio rango. Cunningham *et al.*,2004 construyeron biopilas para comparar la bioaumentación inmovilizada con la bioaumentación biológica y la bioestimulación del cultivo líquido, y encontraron que los

sistemas inmovilizados fueron más exitosos en términos de porcentaje de eliminación de diésel después de 32 días y las bacterias inmovilizadas en perlas de alginato pudieron degradar hidrocarburos, no hubo disminución en la actividad de biodegradación en el consorcio microbiano cuando este estudio fue repetido por Rahman *et al.* (2006). Con esto se puede concluir que la inmovilización de células es una aplicación prometedora en la biorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos.

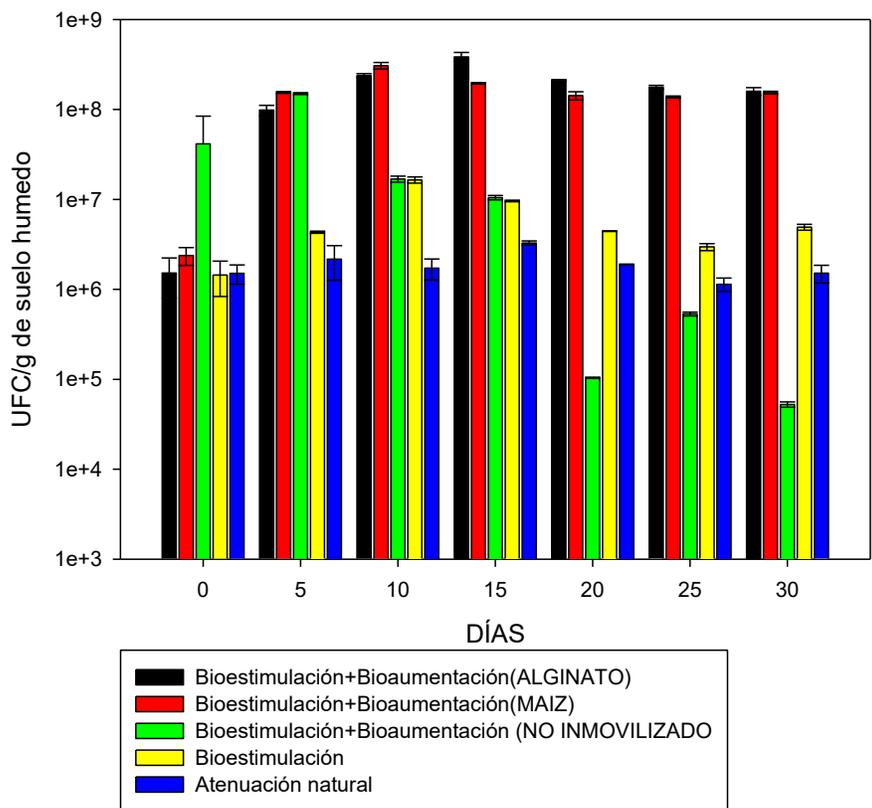


Grafico 7. Promedio de unidades formadoras de colonias en hongos y bacterias.

Los hongos también fueron medidos mediante UFC por gramo de suelo húmedo (Grafico 9) durante los treinta días del tratamiento sin embargo de acuerdo a los conteos los hongos se encuentran por debajo de órdenes de magnitud de 10^7 . El inmovilizado de maíz y alginato muestran un comportamiento diferente al de bacterias (Grafico 8) ya que llega a órdenes de

magnitud de 10^7 al día 5 sin embargo al día 30 hay una disminución de un orden de magnitud, obteniendo una cuenta de 10^6 .

Cobas *et al.*, 2013, reportan que una cepa fúngica de *Trichoderma longibrachiatum* inmovilizado en esponja de nylon, fue eficaz en la eliminación de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

La degradación fúngica de hidrocarburos no es tan rápida o efectiva como las bacterias, pero los hongos son muy poco específicos y tienen la capacidad de hidroxilar una gran variedad de xenobióticos, por medio de enzimas como lacasa, Balaji *et al.*, 2014 reporta la producción de esta enzima por *Aspergillus fumigatus* (73 U/mL) durante el proceso de biorremediación de PAHs. Además, muchos hongos viven naturalmente en el suelo y podrían crecer en el suelo y propagarse a través de la matriz sólida para eliminar los hidrocarburos (Kadri *et al.*, 2017), lo que demuestra que a pesar de su bajo recuento en nuestra cinética estos están teniendo actividad degradadora durante los 30 días (Grafico 10).

En las figuras 7 y 8 podemos ver el crecimiento del consorcio a lo largo de la cinética, en los tratamientos de con inmovilizados podemos observar micelio de los hongos pertenecientes al consorcio.

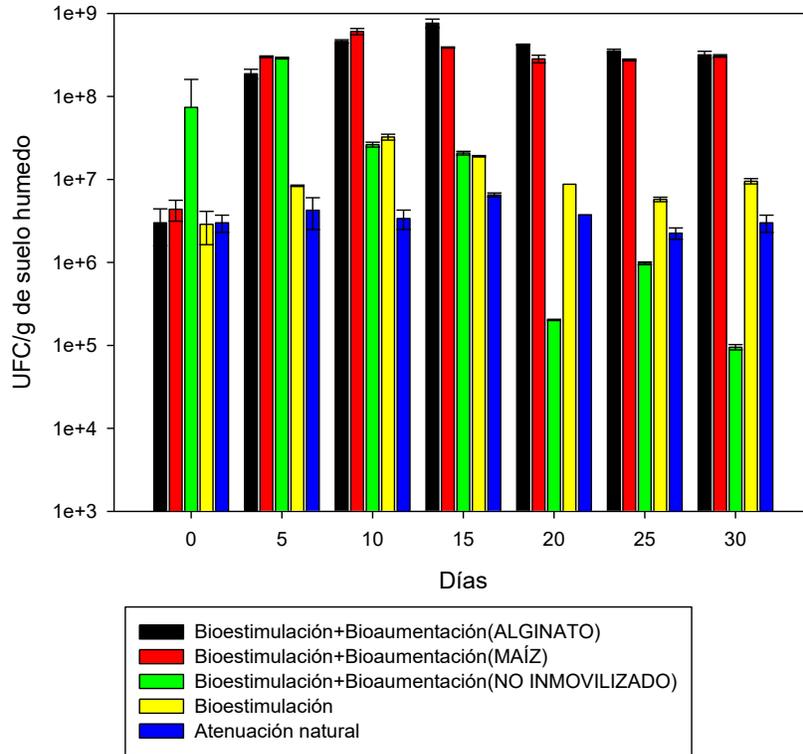


Grafico 8. UFC de bacterias durante el tratamiento de 30 días.

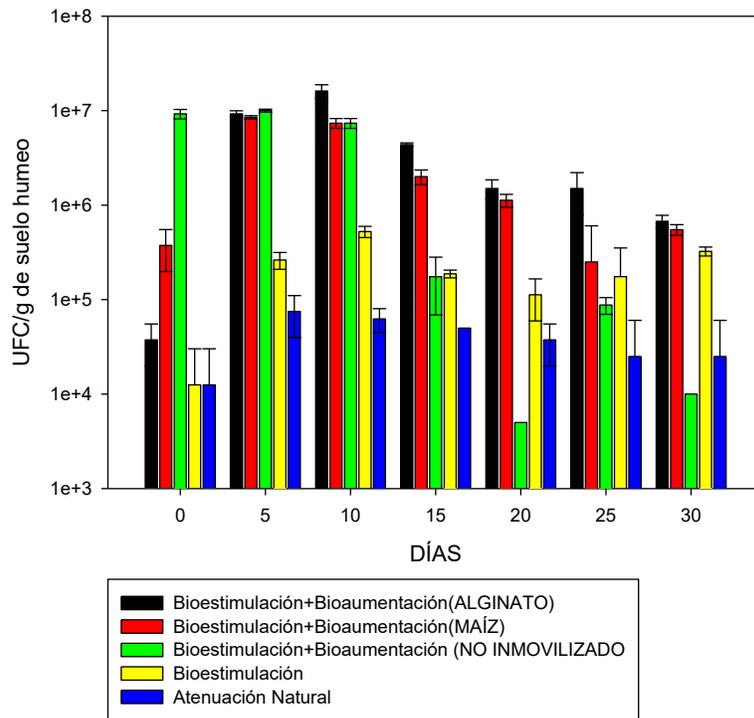
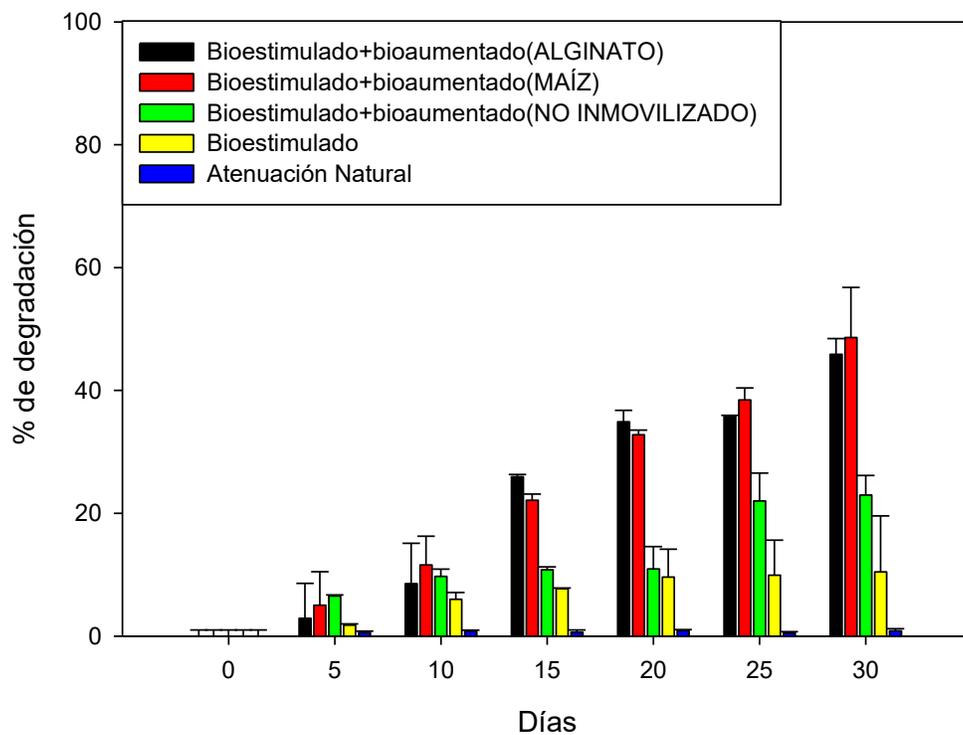


Grafico 9. UFC de hongos durante el tratamiento de 30 días.



Grafica 10. Porcentaje de degradación en suelo real contaminado.

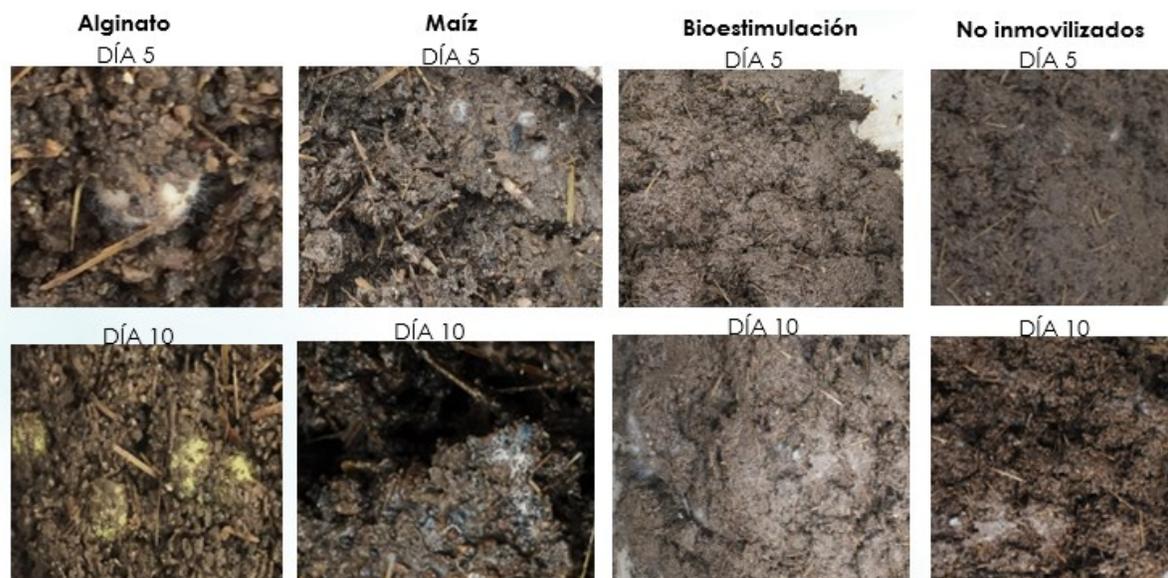


Figura 7. Crecimiento del consorcio mixto en pilas a los días 5 y 10.

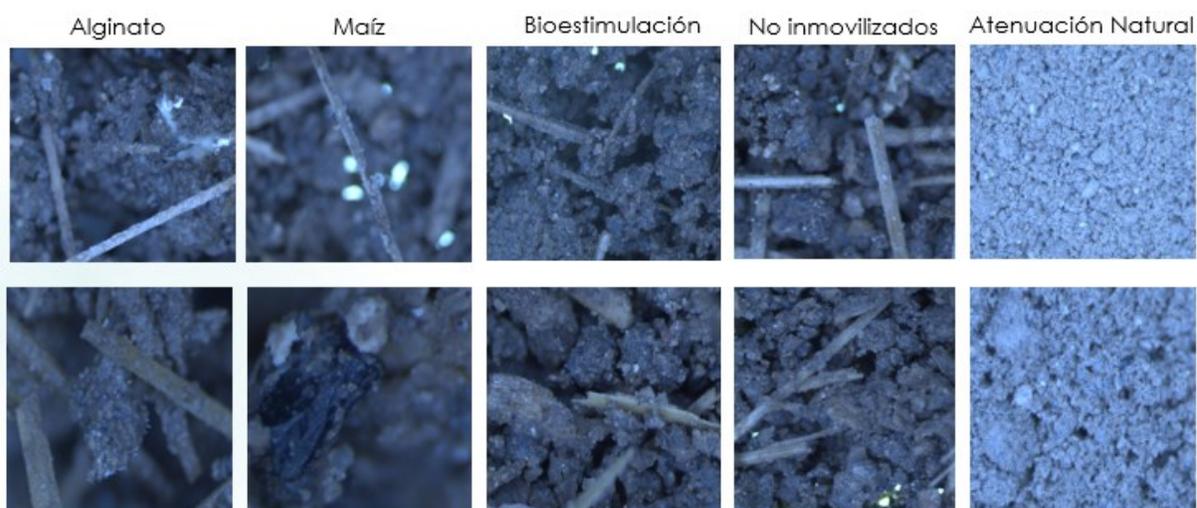


Figura 8. Crecimiento del consorcio mixto en pilas al día 30.

12.2.2 Optimización de condiciones para la aplicación en campo.

Se utilizaron como fuentes alternativas de carbono melaza y urea; y como fuentes alternativas de nitrógeno: urea y sulfato de amonio.

Para esta cinética se utilizaron tratamientos en viales de 50 mL con 20 g de materia húmeda y solo se utilizó inmovilizado de maíz, como se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Relación para tratamientos de 20 g con inmovilizado de maíz

Tratamientos	Relación			
	30%	95	3.5	1.5
Inmovilizado de maíz	Humedad	Suelo	Residuo	Inoculo
20 g	6 mL	13.3g	0.49g	0.2345g

Durante esta cinética se hicieron mediciones de CO₂ a todos los tratamientos los cuales se muestran en los gráficos ,11,12,13 y 14.

Las mediciones de CO₂ muestran que los tratamientos que tenían como fuente de carbono melaza mostraron mayor CO₂ acumulado sin embargo entre ellos no hay diferencia significativa según el análisis de ANOVA.

Esto podemos relacionarlo con los resultados que muestran Lavania *et al.*, 2012, quienes estudiaron especialmente la degradación de asfalteno de petróleo crudo en presencia de las cepa *Garciaella petrolearia* y bioestimulada con melaza, y observó que debido a la degradación del asfalteno, la viscosidad del petróleo crudo reducido hasta un 42%.Soleimani *et al.*, 2013 también muestra que, en el suelo de Isfahán, la eliminación de TPH fue > 50% en cuatro de los seis tratamientos, incluido el enriquecimiento bacteriano y la adición de nutrientes, surfactante y melaza.

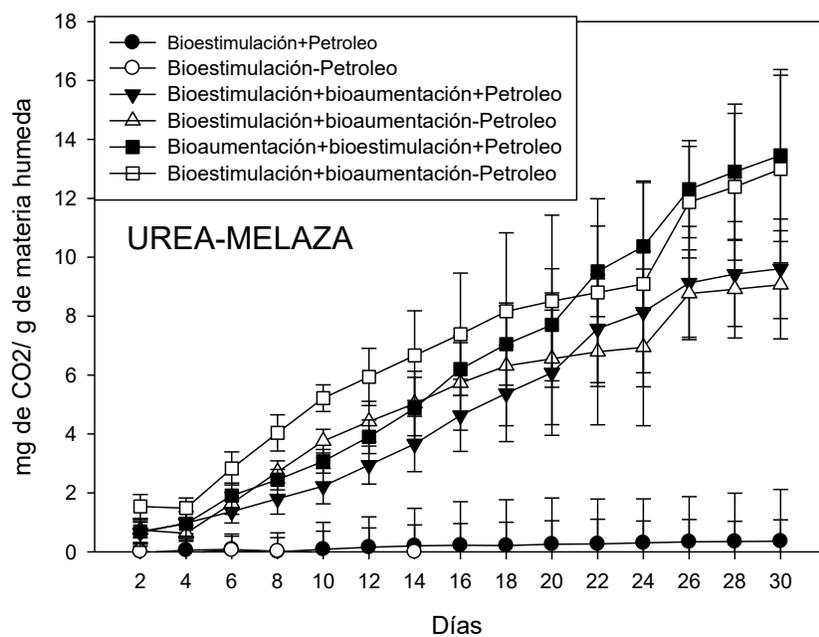


Grafico 11. Actividad heterotrófica durante la cinética en viales con urea. melaza.

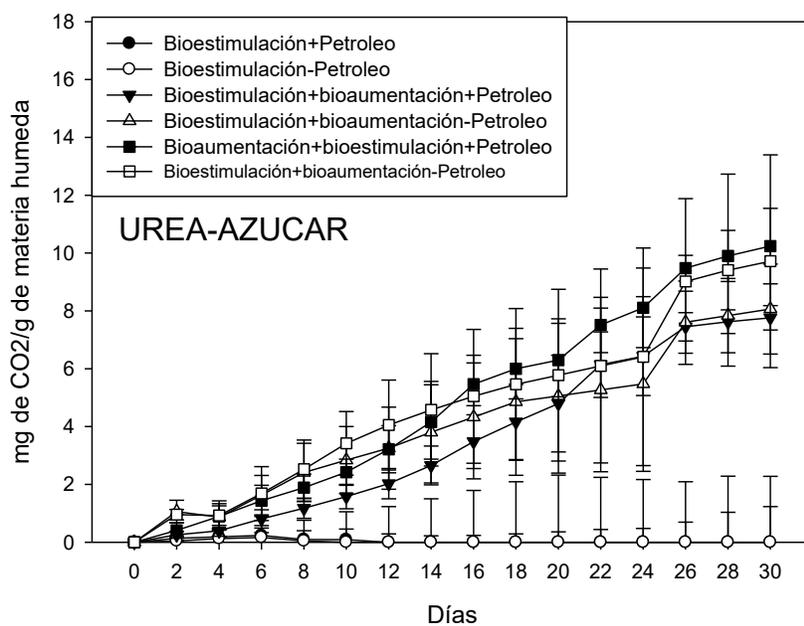


Grafico 12. Actividad heterotrófica durante la cinética en viales con urea-azúcar.

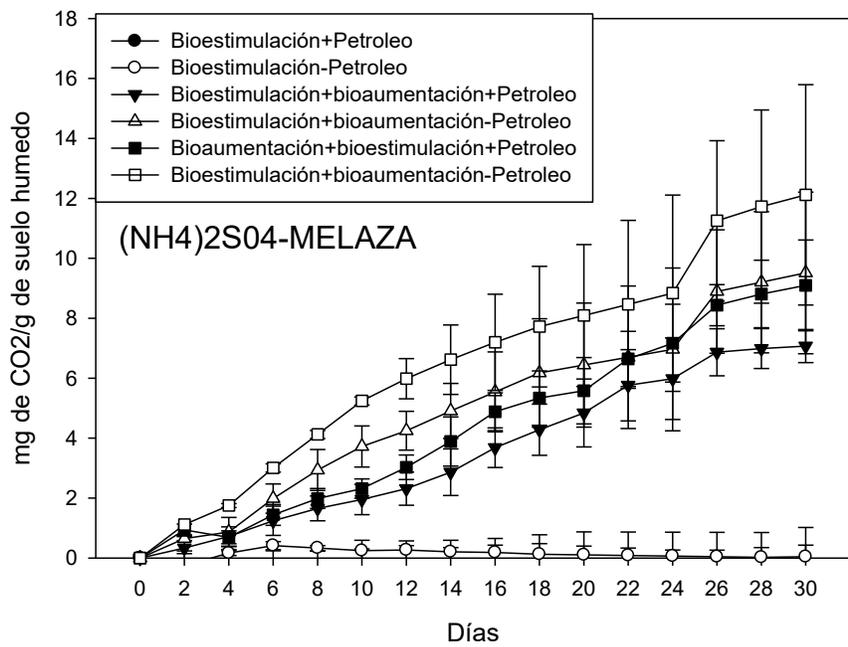


Grafico 13 Actividad heterotrófica durante la cinética con (NH₄)₂SO₄-melaza.

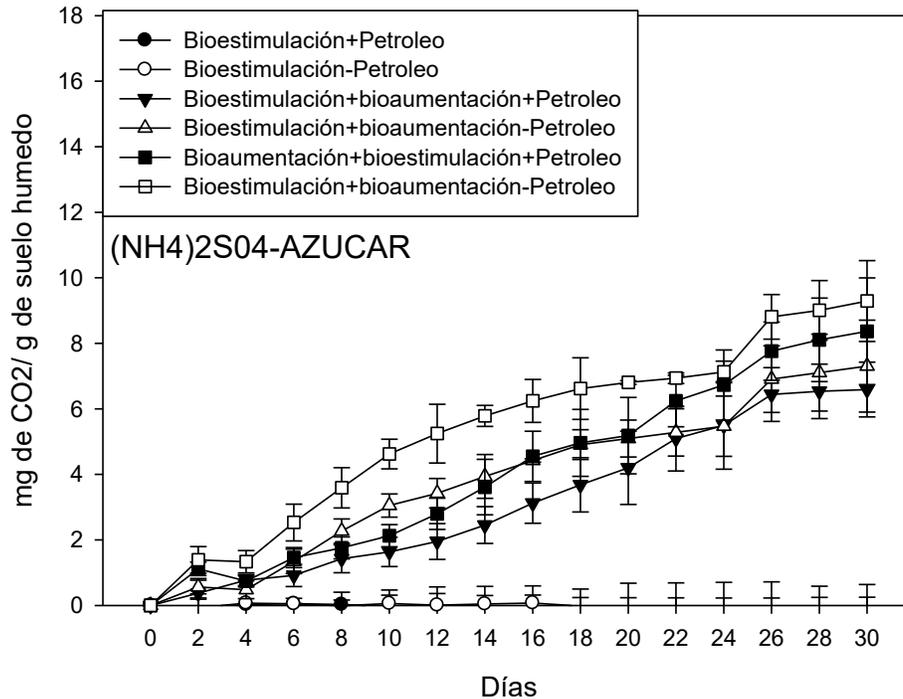


Grafico 14 Actividad heterotrófica durante la cinética con (NH₄)₂S₀₄-azucar.

El análisis de unidades formadoras de colonia muestra que todos los tratamientos se encuentran en ordenes de magnitud de 10^7 (Grafico 15,16,17 y 18) y no muestran diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, durante la degradación se muestra una diferencia significativa entre los tratamientos (NH₄)₂S₀₄-melaza estéril y no estéril y el resto de los tratamientos.

Kumari *et al.*, 2016 muestra que las cepas bacterianas y fúngicas entre las que se encuentran *Pseudomonas stutzeri* BP10 y *Aspergillus niger* PS9 mostraron ser degradadoras de TPH ,además, cuando esta combinación se aplicó en condiciones naturales en suelo con 2% (p / p) de petróleo crudo junto con fertilizantes NPK (1.2 g (NH₄)₂SO₄ y 3.67 g K₂HPO₄) y diferentes agentes de carga como cáscara de arroz, caña de azúcar, vermicompost o fibra de coco, el porcentaje de degradación máximo de TPH fue 82.3% debido a la presencia de fertilizantes

inorgánicos y cáscara de arroz como agente de carga. Además, los resultados mostraron que la presencia de NPK y agentes de carga inducían la actividad de enzimas degradantes, tales como catalasa ($0.718 \text{ m mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$), lacasa ($0.77 \text{ l mol g}^{-1}$), deshidrogenasa ($37.5 \text{ lg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), catecol 1, 2 dioxigenasa ($276,11 \text{ mol g}^{-1}$) y catecol 2, 3 dioxigenasa ($15,15 \text{ l mol g}^{-1}$) en comparación con el control (sin bioaumentación). Se dedujo que los microorganismos seleccionados junto con los bioestimulantes podrían acentuar la degradación del petróleo crudo como es evidente a partir de la actividad potenciada de las enzimas degradativas.

La mejora de la biodegradación enzimática de TPH mediante el uso de diversos consorcios microbianos capaces de producir *in situ* enzima peroxidasa y biosurfactantes es una técnica muy eficiente y prometedora para la biodegradación acelerada y la eliminación de hidrocarburos de petróleo (Moussavi *et al.*, 2017). Sin embargo la fuente de nitrógeno es un componente elemental el crecimiento celular, la síntesis de proteínas y enzimas, y la producción de biosurfactantes, algunos microorganismos como *P. aeruginosa* BS-2 y *U. maydis* producen un incremento de biosurfactantes bajo condiciones limitadas de nitrógeno (Saharan *et al.* 2011). Sin embargo, existe una gran variedad de fuentes de nitrógeno como son urea, peptona, extracto de levadura, sulfato de amonio, nitrato de sodio y malta que incrementan la producción de biosurfactantes en bacterias (Fakruddin, 2012; Saharan *et al.* 2011, Cortés-Sánchez *et al.*, 2015). Esto demuestra que para nuestro consorcio las mejores fuentes de carbono y nitrógeno fueron Melaza y Sulfato de amonio ya que incremento la degradación hasta un 64.8% en los tratamientos no estériles y un 58.6% en los tratamientos estériles (Grafico 19), estas fuentes podrían estar estimulando la producción de enzimas degradadoras de hidrocarburos.

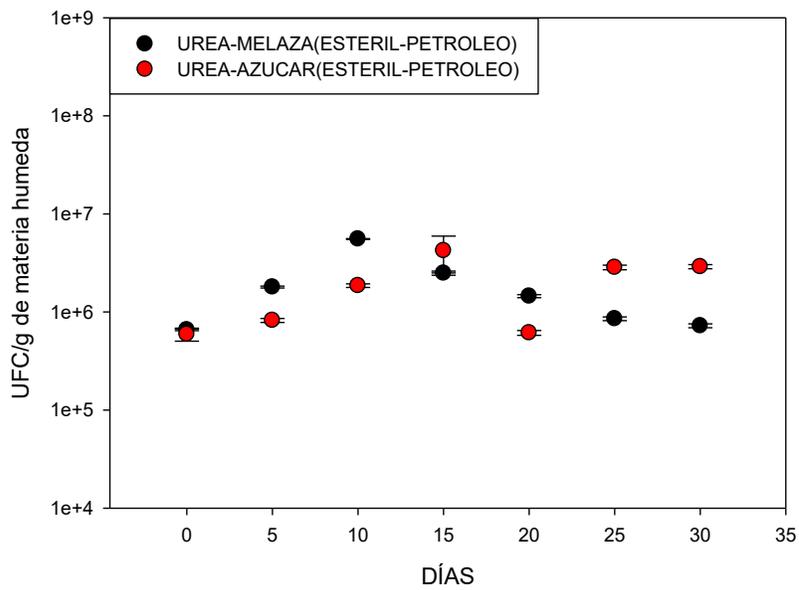
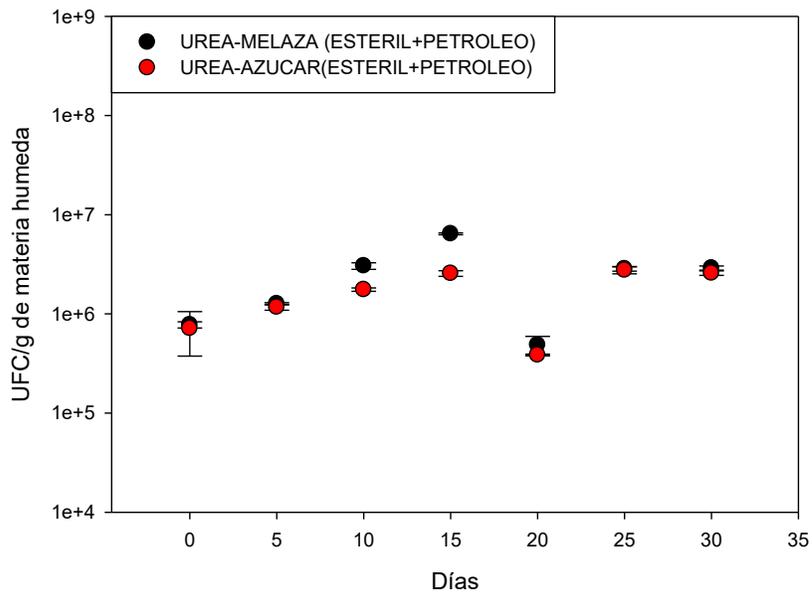


Grafico 15. Comparación del promedio de unidades formadoras de colonias en hongos y bacterias en el tratamiento urea-melaza y urea-azúcar ambos estériles.

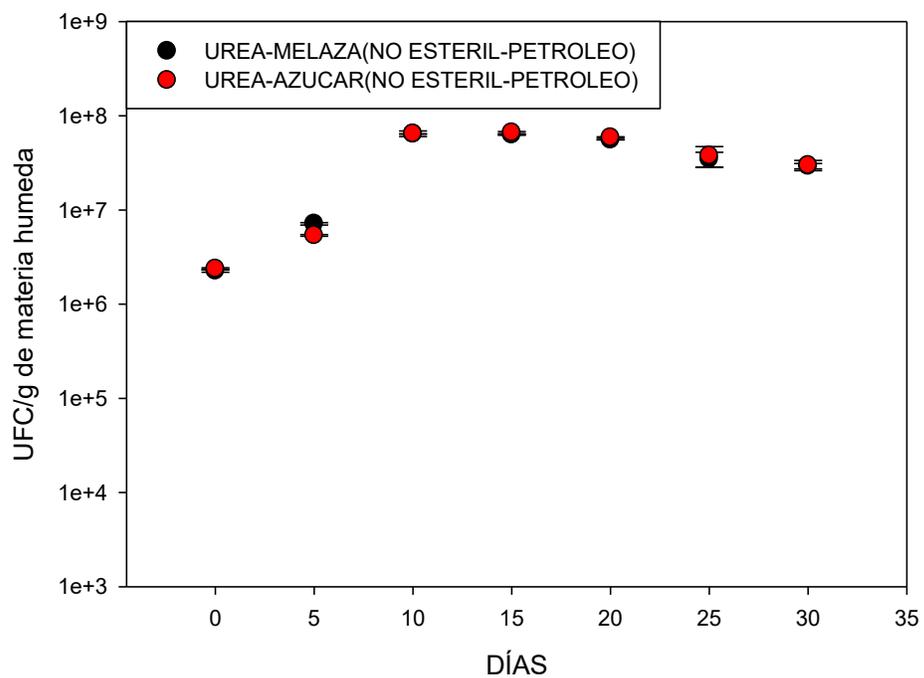
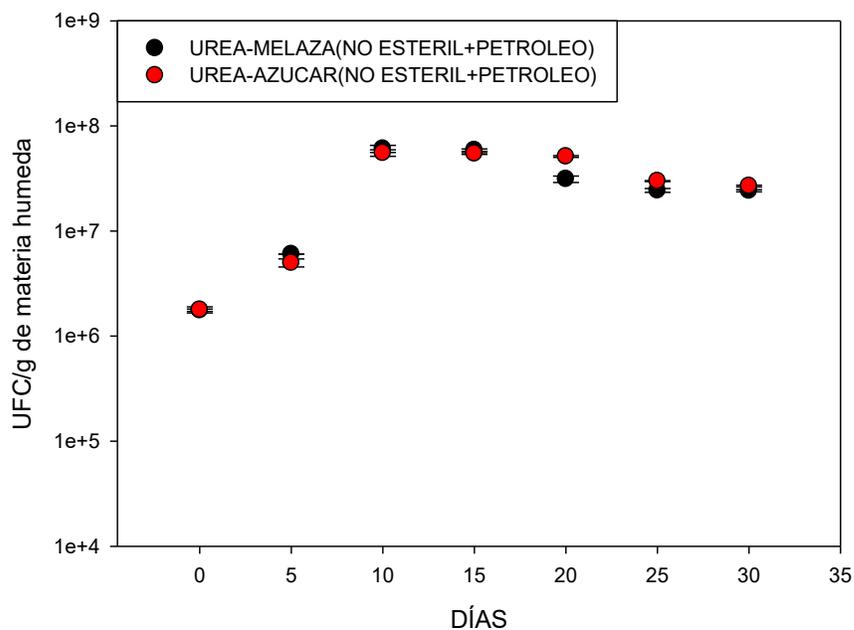


Gráfico 16. Comparación del promedio de unidades formadoras de colonias en hongos y bacterias en el tratamiento urea-melaza y urea-azúcar ambos no estériles.

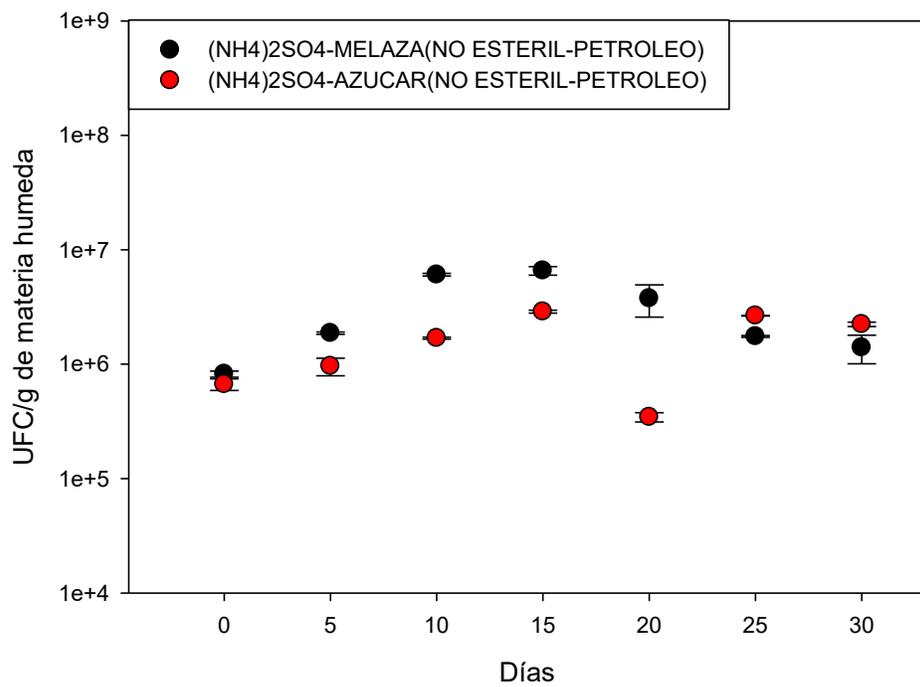
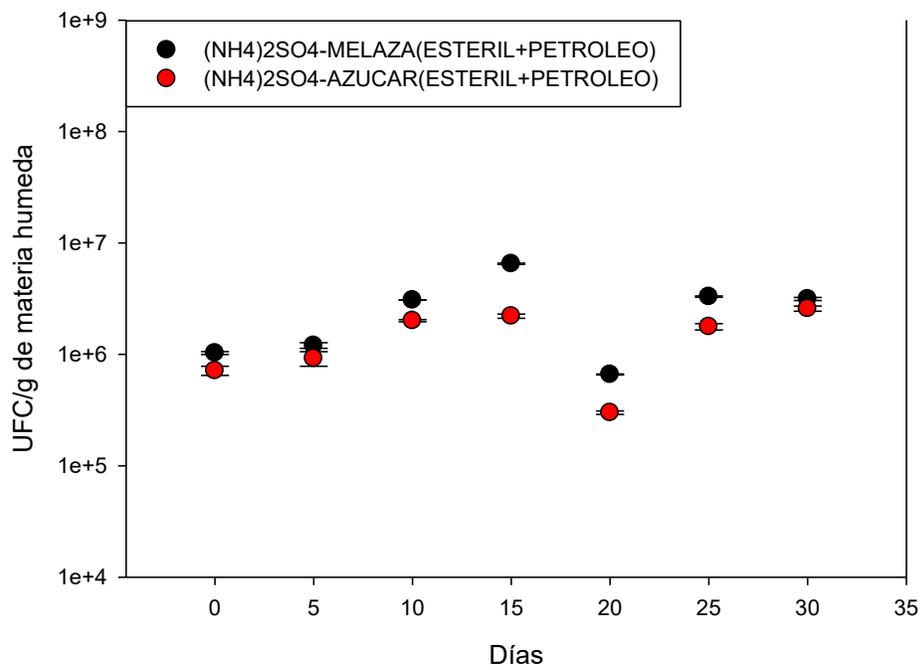


Grafico 17 Comparación del promedio de unidades formadoras de colonias en hongos y bacterias en el tratamiento (NH₄)₂S0₄-melaza y (NH₄)₂S0₄-azucar ambos estériles

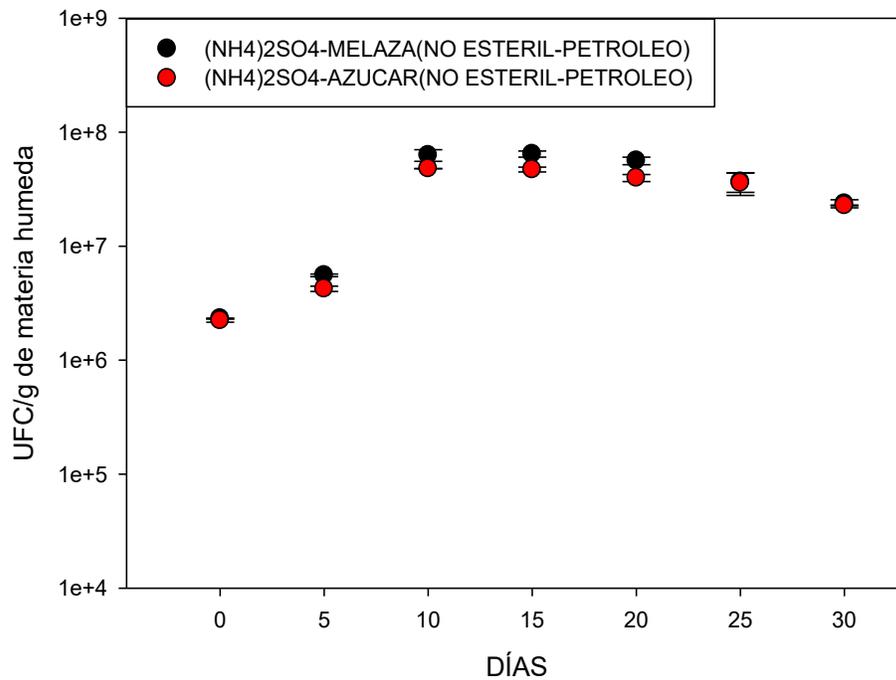
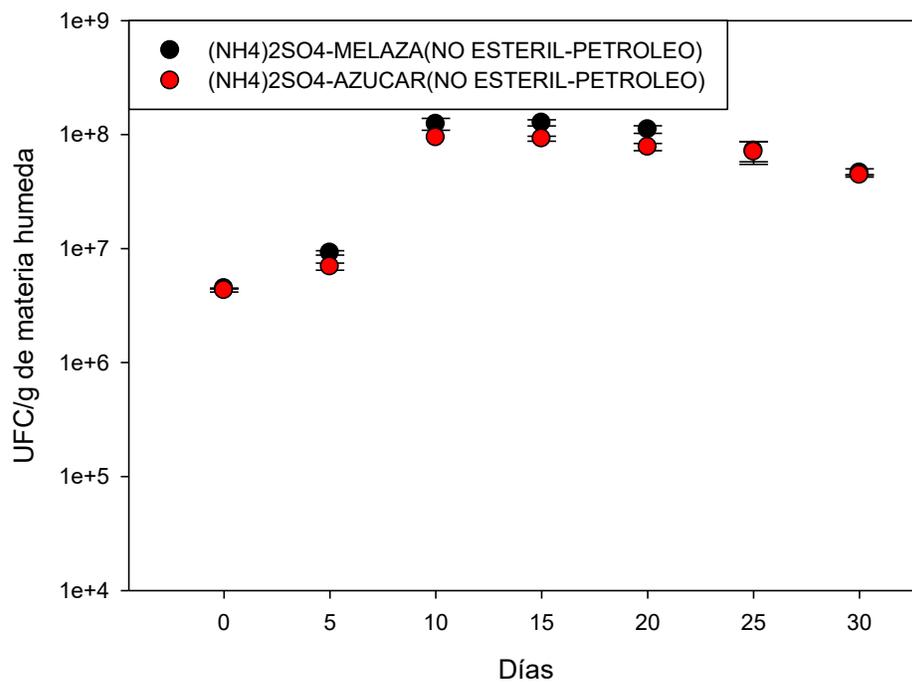


Grafico 18 Comparación del promedio de unidades formadoras de colonias en hongos y bacterias en el tratamiento (NH₄)₂S0₄-melaza y (NH₄)₂S0₄-azucar ambos NO estériles

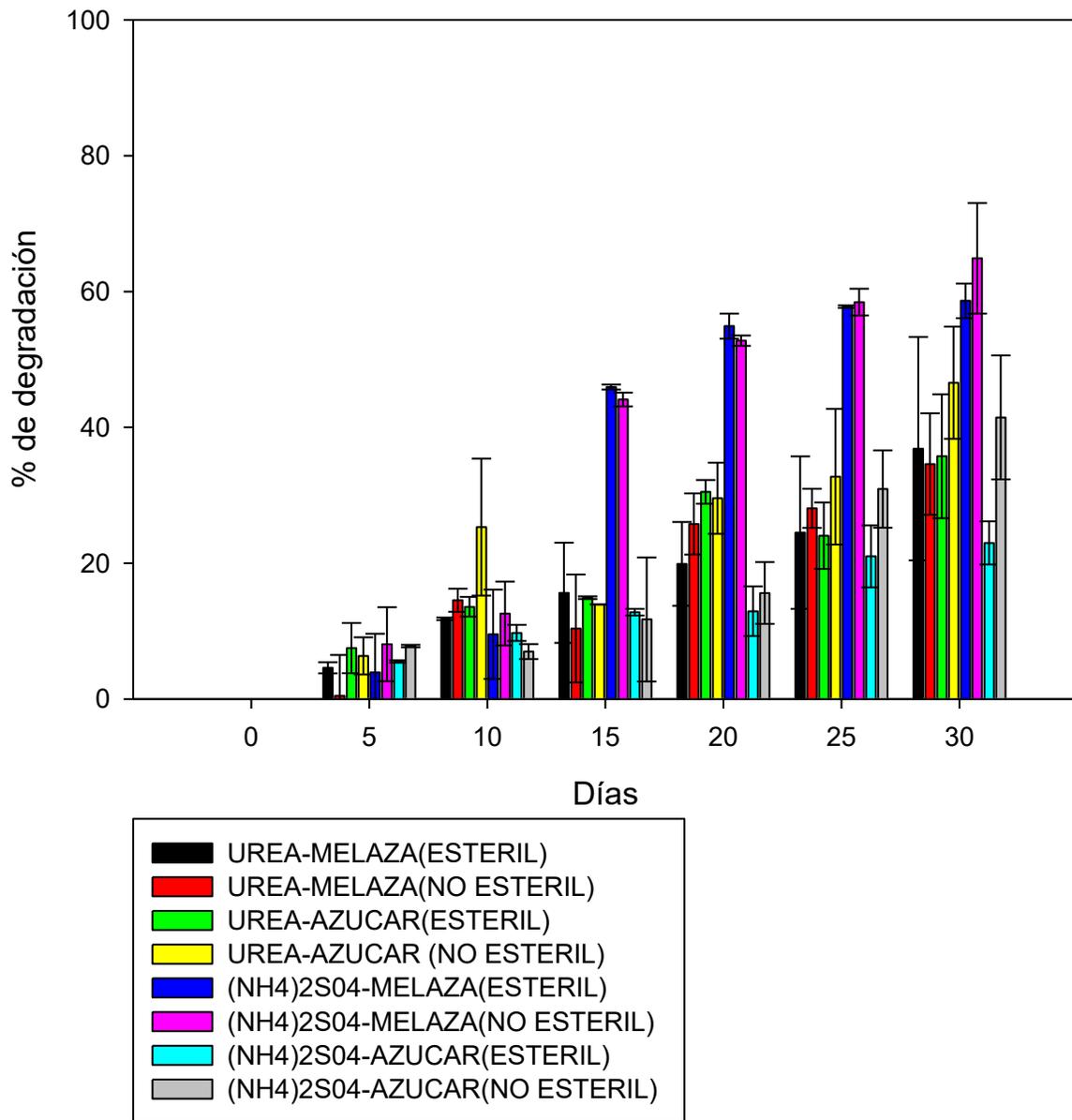


Grafico 19. Porcentaje de degradación con diferentes medios.

12.3 Tercera etapa: Evaluación del inmovilizado con diferentes xenobióticos.

Una vez elegido el medio para la aplicación en campo, se buscaron suelos con características diferentes para determinar la capacidad de degradación del consorcio en diferentes condiciones. A la par evaluamos diferentes compuestos xenobióticos, entre los cuales están el diésel y los plaguicidas.

La contaminación con diésel fue de 100g/ kg de suelo, mientras que para los suelos contaminados con plaguicidas se utilizó una mezcla de Paraquat, Carbofuran, Endosulfan y Paratión Metílico en una relación 1:1:1:1.

Muestreo de suelo

El muestreo se realizó en tres zonas diferentes, la primera zona fue un zona boscosa, en las faldas de la malinche el punto de muestreo Latitud 19.266 N, Longitud 98.0701 O (Figura 9).



Figura 9. Sitio de muestreo Zona Malinche.

La zona del Parque Nacional Malinche o Matlalcuéyatl se ubica en la zona central oriente de México formando parte de la cordillera neovolcánica y se considera la montaña aislada más significativa del país. Constituye la quinta montaña más alta de México. Los principales tipos de clima según la clasificación de Enriqueta García (1989) son: clima templado subhúmedo con lluvias en verano; temperatura media anual entre 11 y 17° C; temperatura del mes más frío entre 3 y 18° C, por ciento de precipitación invernal con respecto a la anual menor de 5.

El Parque Nacional Malinche o Matlalcuéyatl forma parte de la cuenca del Río Atoyac (región hidrológica del Río Balsas) y cuenca cerrada Guadalupe (región hidrológica río Papaloapan). Las condiciones del suelo y subsuelo y las fuertes pendientes, dan lugar a un drenaje muy rápido, no existen corrientes de agua permanente, únicamente se registran corrientes principalmente intermitentes de fuertes pendientes y corto recorrido. La mayoría de estos cauces han perdido la capacidad de conducción debido al arrastre de sedimentos que se originan en la parte alta del volcán y que se depositan a lo largo del cauce. Debido al fuerte escurrimiento son muy escasos los manantiales en esta región. El único recurso lacustre en esta zona lo constituye la laguna de Acuitlapilco, alimentada por escurrimientos provenientes de la montaña. Esta laguna se ubica en la ladera occidental a unos 7 km aproximadamente al sur de la ciudad de Tlaxcala, sobre la carretera TlaxcalaPuebla. Asimismo, esta montaña aporta volúmenes considerables de agua subterránea a la presa Manuel Ávila Camacho (Valsequillo, Puebla), es importante señalar, que en la zona poniente de la montaña se localiza un manantial que abastece a la población de Ixtenco, Tlaxcala. El nivel freático de las aguas subterráneas es relativamente poco profundo, sobre todo a altitudes menores de 3,000 m, pues el material consolidado de los suelos tiene un alto grado de permeabilidad; por el contrario, a altitudes

mayores, el material consolidado tiene un bajo grado de permeabilidad. Además, por el régimen de lluvias que posee, es una zona muy húmeda. Así, el gradiente de humedad mayor es desde la cumbre de la montaña, tanto por la mayor precipitación como por las menores temperaturas reinantes, por lo cual se tiene un déficit mínimo de agua, o inexistente, permaneciendo húmedo el suelo al menos 8 o 10 meses al año; y disminuye hacia las faldas de la montaña, en donde se presenta déficit de unos 100 a 200 m³ anuales.

Los suelos existentes en el volcán se originaron a partir de las erupciones efectuadas por los cráteres satélites durante el Pleistoceno y Holoceno, que aportaron el material para la actual formación de la capa edáfica superior. Dentro de los estudios edafológicos realizados para la región tenemos el de Patiño (1942) donde hace un reconocimiento de la erosión en los suelos de la porción central y sureste del estado de Tlaxcala, abarcando el Parque Nacional Malinche o Matlalcuéyatl, por otra parte Allende (1968) realizó un estudio sobre los suelos derivados de cenizas volcánicas, asimismo, Haine y Haide (1973) presentaron un comunicado sobre la estratigrafía del Pleistoceno reciente y del Holoceno en el volcán y región vecina. La erosión eólica afecta una superficie de 6,028 hectáreas con erosión alta y se ubica sobre la cima del volcán; además 4,855 hectáreas presentan erosión moderada en las zonas dedicadas a la agricultura; 2,022 hectáreas presentan erosión ligera y 19,304 hectáreas no presentan erosión. La erosión hídrica afecta una superficie de 1,461 hectáreas con erosión muy alta y se ubica sobre la cima del volcán y en algunas áreas agrícolas; además 1,846 hectáreas presentan erosión alta en las zonas dedicadas a la agricultura; 4,752 hectáreas presentan erosión ligera y 24,150 hectáreas presentan erosión moderada. Los suelos predominantes de acuerdo a la clasificación de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

que se distribuyen en el Parque Nacional Malinche o Matlalcuéyatl son el Regosol, seguido del Fluvisol, el Cambisol y ocupando una menor extensión se encuentran el Litosol, el Feozem y el Luvisol.

El análisis fisicoquímico del suelo muestra que este suelo tiene un alto contenido de materia orgánica con 5.08%, lo que incrementa la actividad de microorganismos en el suelo (Tabla. 15)

Tabla 15. Resultados fisicoquímicos del suelo La malinche, Tlaxcala-Puebla.

Parámetro	Valor	Clasificación *
pH	6.3	Neutro
Humedad	26.8%	
Contenido de materia orgánica	5.08%	Alto
Carbono (%)	2.95%	Alto
Nitrógeno (%)	0.153%	Rico
Fosforo (%)	0.0109	Medio
Azufre (%)	1.19%	
Proteína	0.621%	
C/N/P	100/5.18/0.36	

La segunda zona fue un zona arida, ubicada cerca de la reserva de la biosfera Tehuacan, el punto de muestreo fue Latitud $18^{\circ} 21' 23.2''$ N Longitud $97^{\circ} 26' 4.6''$ O (Figura 10).



Esta zona pertenece y se encuentra en la Sierra Madre del Sur. Se caracteriza por su relieve accidentado, donde sierras que no rebasan los tres mil metros sobre el nivel del mar rodean los extensos valles de Tehuacán y Zapotitlán, así como la Cañada de Cuicatlán. Forma parte de la cuenca alta del río Papaloapan, uno de los más caudalosos de México, aun cuando en esta zona la humedad del ambiente no alcanza a formar grandes corrientes de agua. El Papaloapan recibe las aguas de numerosos riachuelos que nacen en las montañas de la Sierra de Tehuacán y la Sierra Mixteca, entre ellos habría que citar el río Tehuacán, el Calapa y el Zapotitlán.

El clima de la región es cálido semiseco y cálido semi-tropical en la región de la Cañada cuicateca, con lluvias moderadas a escasas en el verano. En las partes altas de la sierra es frecuente ver que las montañas están coronadas de una espesa neblina que en escasas ocasiones llega a condensarse para formar una modesta llovizna.

Tehuacán-Cuicatlán es el área más sureña además de la más pequeña de las zonas áridas del país, sin embargo cuenta con una gran variedad de cactáceas que van desde las grandes columnares como el candelabro (*Pachycereus weberi*) que llega a medir hasta 16 m de altura, los bosques de cactáceas columnares más densos del país de tetechos o viejitos (*Neobuxbaumia tetetzo*, *Cephalocereus columna-trajani*), hasta la más pequeña cactácea *Mammillaria hernandezii* con casi cinco centímetros de diámetro, esta última endémica de la zona, y la extensión de bosque tropical seco en protección más extensa del centro sur de México.

Este suelo se caracteriza por su bajo porcentaje de nitrógeno y fosforo, sin embargo, en los análisis fisicoquímicos muestra un alto porcentaje de carbono.

Tabla 16. Resultados fisicoquímicos del suelo Tehuacan, Puebla.

Parámetro	Valor	Clasificación *
pH	5.4	Neutro
Humedad	9.02%	
Contenido de materia orgánica	13.2%	Muy alto
Carbono (%)	7.82 %	Alto
Nitrógeno (%)	0%	Bajo
Fosforo (%)	0.0009	Bajo
Azufre (%)	0%	

C/N/P	100/0/0.011	
-------	-------------	--

El tercer suelo ha utilizar es el suelo Muestreado en la ubicación Latitud: 19°16'49.53"N

Longitud: 98°21'56.31"O, perteneciente al CIBA, este suelo se describió con anterioridad en el apartado 12.1.2 , y en la tabla se muestra que es un suelo con un porcentaje medio de carbono y nitrógeno.

13. CONCLUSIONES

El consorcio mixto inmovilizado en capsulas de alginato mostró un mayor porcentaje de recuperación después de 22 meses de inmovilización.

En los tratamientos de suelo contaminados con PAHs(PHE:PY) el inmovilizado en alginato mostro mayor producción de CO₂ que el de inmovilizado en residuos de maíz con PAHs, sin embargo, la remoción es más eficaz en los inmovilizados en maíz ya que logra degradar hasta un 92 % en 30 días.

Ambos inmovilizados logran remover en 30 días casi en su totalidad el fenantreno mientras que el inmovilizado en maíz degrada 75% de pireno y el inmovilizado en alginato degrada el 87% de pireno.

En la cinética en biopilas con suelo real contaminado a partir del día 5 ambos inmovilizados muestran un recuento de UFC con un orden de magnitud 10⁸ UFC/g de suelo húmedo, el recuento de hongos se muestra menor que el de bacterias en todos los tratamientos. La degradación de los inmovilizados (48% Maíz y49% Alginato.) tuvo una diferencia significativa con los tratamientos no inmovilizados (22.9%).

En la cinética de ajuste de condiciones el tratamiento UREA-MELAZA tuvo mayor actividad heterotrófica, y en el recuento de UFC los tratamientos que contenían melaza mostraron un incremento con respecto a los que tenían azúcar como fuente de carbono. Sin embargo, el Melaza-Sulfato de amonio tuvo una degradación hasta un 64.8% en los tratamientos no estériles y un 58.6% en los tratamientos estériles

14. BIBLIOGRAFIA

- Al-Hadhrami, M. N., Lappin-Scott, H. M., & Fisher, P. J. (1997). Studies on the biodegradation of three groups of pure n-alkanes in the presence of molasses and mineral fertilizer by *Pseudomonas aeruginosa*. *Marine Pollution Bulletin*, 34(11), 969–974.
- Almeida, C., Azevedo, N. F., Santos, S., Keevil, C. W., & Vieira, M. J. (2013). Correction: Discriminating Multi-Species Populations in Biofilms with Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization (PNA FISH). *PloS one*, 8(6), 10–1371.
- Atlas, R. M., Bartha, R., Corzo, A., & others. (2002). *Microbial ecology: fundamentals and applications. Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Recuperado a partir de <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=LIBROSNL.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=003151>
- Blume, H.-P., Brümmer, G. W., Fleige, H., Horn, R., Kandeler, E., Kögel-Knabner, I., ... Wilke, B.-M. (2016). *Scheffer/Schachtschabel Soil Science*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Recuperado a partir de <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-30942-7>
- Bojes, H. K., & Pope, P. G. (2007). Characterization of EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47(3), 288–295.
- Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M., & Neviani, E. (2006). Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3), 485–494.
- Cerniglia, C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 3(2–3), 351–368.
- Chávez-Gómez, B., Quintero, R., Esparza-García, F., Mesta-Howard, A. M., de la Serna, F. Z. D., Hernández-Rodríguez, C. H., ... Rodríguez-Vázquez, R. (2003). Removal of phenanthrene from soil by co-cultures of bacteria and fungi pregrown on sugarcane bagasse pith. *Bioresource Technology*, 89(2), 177–183.
- Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., & Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and

- heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnology advances*, 33(6), 745–755.
- Chirinos, I., Larreal, M., & Díaz, J. (2010). Biorremediación de lodos petroquímicos mediante el uso de la biota microbiana autóctona en un oxisol del municipio Lagunillas del estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola*, 10(1), 133–140.
- Christiansen, N., Mathrani, Indra M., Ahring, B. K., & Colleran, E. (1997). Uses of Bacteria in Bioremediation. *Bioremediation Protocols*, 3–22.
- Cortés-Espinosa, V. (s/f). German Zafra, Angélica Moreno-Montaña, Ángel E. Absalón & Diana. Recuperado a partir de https://www.researchgate.net/profile/Diana_Cortes-Espinosa/publication/264629387_Degradation_of_polycyclic_aromatic_hydrocarbons_in_soil_by_a_tolerant_strain_of_Trichoderma_asperellum/links/55b2719b08ae9289a085814e.pdf
- Crawford, R. L., & Mohn, W. W. (1985). Microbiological removal of pentachlorophenol from soil using a *Flavobacterium*. *Enzyme and Microbial Technology*, 7(12), 617–620.
- Edgehill, R. U., & Finn, R. K. (1983). Microbial treatment of soil to remove pentachlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(3), 1122–1125.
- Ersfeld, K. (2004). Fiber-FISH: fluorescence in situ hybridization on stretched DNA. *Parasite Genomics Protocols*, 395–402.
- Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Rev Latinoam Microbiol*, 48(2), 179–187.
- Gan, S., Lau, E. V., & Ng, H. K. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*, 172(2), 532–549.
- GARCÍA-TORRES, R., RIOS-LEAL, E., MARTÍNEZ-TOLEDO, Á., RAMOS-MORALES, F. R., CRUZ-SANCHEZ, J. S., & CUEVAS-DÍAZ, M. del C. (2011). Uso de cachaza y bagazo de caña de azúcar en la remoción de hidrocarburos en suelo contaminado. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 27(1), 31–39.
- Gönen, F., & Aksu, Z. (2008). Use of response surface methodology (RSM) in the evaluation of growth and copper (II) bioaccumulation properties of *Candida utilis* in molasses medium. *Journal of hazardous materials*, 154(1), 731–738.

- Head, I. M., Jones, D. M., & Röling, W. F. (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 173–182.
- IMP | Petróleo. (s/f). Recuperado el 16 de noviembre de 2016, a partir de <http://www.imp.mx/petroleo/?imp=origen>
- Instituto Nacional de Ecología. (s/f-a). Recuperado el 12 de abril de 2016, a partir de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/372/fuentes.html>
- Instituto Nacional de Ecología. (s/f-b). Recuperado el 18 de abril de 2016, a partir de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/372/fuentes.html>
- Jeon, C. O., & Madsen, E. L. (2013). In situ microbial metabolism of aromatic-hydrocarbon environmental pollutants. *Current opinion in biotechnology*, 24(3), 474–481.
- Jézéquel, K., & Lebeau, T. (2008). Soil bioaugmentation by free and immobilized bacteria to reduce potentially phytoavailable cadmium. *Bioresource Technology*, 99, 690–698.
- Kodres, C. A. (1998). Coupled water and air flows through a bioremediation soil pile. *Environmental modelling & software*, 14(1), 37–47.
- Kuppusamy, S., Palanisami, T., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2016). In-situ remediation approaches for the management of contaminated sites: a comprehensive overview. En *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 236* (pp. 1–115). Springer. Recuperado a partir de http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-20013-2_1
- Liu, J., Chen, S., Ding, J., Xiao, Y., Han, H., & Zhong, G. (2015). Sugarcane bagasse as support for immobilization of *Bacillus pumilus* HZ-2 and its use in bioremediation of mesotrione-contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(24), 10839–10851. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6935-0>
- Mallory, L. M., Yuk, C. S., Liang, L. N., & Alexander, M. (1983). Alternative prey: a mechanism for elimination of bacterial species by protozoa. *Applied and environmental microbiology*, 46(5), 1073–1079.
- MARGESIN, R., & SCHINNER, F. (2001). Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. Recuperado a partir de <http://132.198.101.197/~gdrusche/Classes/GEOL%20295%20-%20Geomicrobiology/Margesin%20and%20Schinner,%202001%20AEM%20-%20Biostimulation%20vs%20NA.pdf>

- Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3127–3133.
- Martínez, R. R. (2012). Empleo de la técnica hibridación in situ fluorescente para visualizar microorganismos. *Revista Salud UIS*, 43(3). Recuperado a partir de <http://revistas.uis.edu.co/index.php/revistasaluduis/article/view/2572>
- Mesa, J. B. L. de, Quintero, G., Vizcaíno, A. L. G., Cáceres, D. C. J., Riaño, S. M. G., & García, J. M. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA*, 4(5). Recuperado a partir de <http://www.unicolmayor.edu.co/publicaciones/index.php/nova/article/view/60>
- Mexicana, N. O., LAS, S. Y., & REMEDIACIÓN, E. P. S. C. Y. (2003). NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. *Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación*. Recuperado a partir de <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/ecol/semarnat138ss-05.pdf>
- Middeldorp, P. J., Briglia, M., & Salkinoja-Salonen, M. S. (1990). Biodegradation of pentachlorophenol in natural soil by inoculated *Rhodococcus chlorophenolicus*. *Microbial ecology*, 20(1), 123–139.
- Moreno, C. M., Becerra, A. G., & Santos, M. J. B. (2004a). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev Iberoam Micol*, 21(1), 103–120.
- Moreno, C. M., Becerra, A. G., & Santos, M. J. B. (2004b). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev Iberoam Micol*, 21(1), 103–120.
- Moslemy, P., Neufeld, R. J., & Guiot, S. R. (2002). Biodegradation of gasoline by gellan gum-encapsulated bacterial cells. *Biotechnology and bioengineering*, 80(2), 175–184.
- Neilson, A. H. (Ed.). (1998). *PAHs and Related Compounds* (Vol. 3 / 3I). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Recuperado a partir de <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-49697-7>
- Norman, R. S., Moeller, P., McDonald, T. J., & Morris, P. J. (2004). Effect of Pyocyanin on a Crude-Oil-Degrading Microbial Community. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 4004–4011.

- Peng, S., Zhou, Q., Cai, Z., & Zhang, Z. (2009). Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. *Journal of hazardous materials*, 168(2), 1490–1496.
- Pérez-Armendáriz, B., Loera-Corral, O., Fernández-Linares, L., Esparza-García, F., & Rodríguez-Vázquez, R. (2004). Biostimulation of micro-organisms from sugarcane bagasse pith for the removal of weathered hydrocarbon from soil. *Letters in applied microbiology*, 38(5), 373–377.
- Samanta, S. K., Singh, O. V., & Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology*, 20(6), 243–248.
- SEMARNAT, R. N. (2002). *NOM-021-RECNAT-2000*, *Diario Oficial de la Federación*, Diciembre 31, 2002. México.
- Speight, J. G. (2014). *The chemistry and technology of petroleum*. CRC press. Recuperado a partir de https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=Pp_AAqAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=The+chemistry+and+technology+of+petroleum&ots=SpXJ6mOZdz&sig=pb7rH2_LVu8rfgKUm271gpz-o4s
- Stres, B., Mahne, I., Avguštin, G., & Tiedje, J. M. (2004). Nitrous Oxide Reductase (*nosZ*) Gene Fragments Differ between Native and Cultivated Michigan Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 301–309. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.301-309.2004>
- Suja, F., Rahim, F., Taha, M. R., Hambali, N., Razali, M. R., Khalid, A., & Hamzah, A. (2014). Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90, 115–122.
- Trejo-Hernandez, M. R., Ortiz, A., Okoh, A. I., Morales, D., & Quintero, R. (2007). Biodegradation of heavy crude oil Maya using spent compost and sugar cane bagasse wastes. *Chemosphere*, 68(5), 848–855.
- Tyagi, M., Fonseca, M. M. R. da, & Carvalho, C. C. C. R. de. (2010). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231–241. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>
- Wang, Z., Xu, Y., Zhao, J., Li, F., Gao, D., & Xing, B. (2011). Remediation of petroleum contaminated soils through composting and rhizosphere degradation. *Journal of hazardous materials*, 190(1), 677–685.

- Zafra, G., Absalón, A. E., & Cortés-Espinosa, D. V. (2015). Morphological changes and growth of filamentous fungi in the presence of high concentrations of PAHs. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 937–941.
- Zafra, G., Absalón, Á. E., Cuevas, M. D. C., & Cortés-Espinosa, D. V. (2014). Isolation and selection of a highly tolerant microbial consortium with potential for PAH biodegradation from heavy crude oil-contaminated soils. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(2), 1–18.
- Zafra, G., Moreno-Montaño, A., Absalón, Á. E., & Cortés-Espinosa, D. V. (2015). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(2), 1034–1042.
- Zavala-Cruz, J., Gavi-Reyes, F., Adams-Schroeder, R. H., Ferrara-Cerrato, R., Palma-López, D. J., Vaquera-Huerta, H., & Domínguez-Esquivel, J. M. (2005). Derrames de petróleo en suelos y adaptación de pastos tropicales en el activo Cinco Presidentes, Tabasco, México. *Terra Latinoamerica*, 23(3), 293–302.
- Zhang, K., Xu, Y., Hua, X., Han, H., Wang, J., Wang, J., ... Liu, Z. (2008a). An intensified degradation of phenanthrene with macroporous alginate–lignin beads immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical engineering journal*, 41(3), 251–257.
- Zhang, K., Xu, Y., Hua, X., Han, H., Wang, J., Wang, J., ... Liu, Z. (2008b). An intensified degradation of phenanthrene with macroporous alginate–lignin beads immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical engineering journal*, 41(3), 251–257.
- Zhen—Yu, W., Dong-Mei, G. A. O., Feng—Min, L. I., Jian, Z., Yuan-Zheng, X. I. N., SIMKINS, S., & Bao—ShanI, X. (2008a). Petroleum Hydrocarbon Degradation Potential of Soil Bacteria Native to the Yellow River Delta. *Pedosphere*, 18(6), 707–716.
- Zhen—Yu, W., Dong-Mei, G. A. O., Feng—Min, L. I., Jian, Z., Yuan-Zheng, X. I. N., SIMKINS, S., & Bao—ShanI, X. (2008b). Petroleum Hydrocarbon Degradation Potential of Soil Bacteria Native to the Yellow River Delta. *Pedosphere*, 18(6), 707–716.
- Zhen-Yu, W., Ying, X. U., Hao-Yun, W., Jian, Z., Dong-Mei, G. A. O., Feng-Min, L. I., & Xing, B. (2012a). Biodegradation of crude oil in contaminated soils by free and immobilized microorganisms. *Pedosphere*, 22(5), 717–725.
- Zhen-Yu, W., Ying, X. U., Hao-Yun, W., Jian, Z., Dong-Mei, G. A. O., Feng-Min, L. I., & Xing, B. (2012b). Biodegradation of crude oil in contaminated soils by free and immobilized microorganisms. *Pedosphere*, 22(5), 717–725.