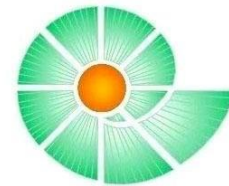




**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA**



TESIS

Para obtener el grado de  
MAESTRO EN BIOPROCESOS

Presentado por:

**Carlos Andrés Rengifo Guerrero**

Ingeniero Agroindustrial

**DINÁMICAS DE CARBONO Y NITRÓGENO EN SUELO Y VERMICOMPOSTA  
CON THINNER E IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES MICROBIANAS  
INVOLUCRADAS EN LA MINERALIZACIÓN DE NITRÓGENO**

Dirigida por:

**Dra. Marina Olivia Franco Hernández**

**Dra. María Soledad Vásquez Murrieta**

Ciudad de México, enero de 2018

# ACTA DE REVISIÓN SIP-14 BIS



## INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 16 del mes de enero del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, para examinar la tesis titulada:

Dinámicas de carbono y nitrógeno en suelo y vermicomposta con thinner e identificación de poblaciones microbianas involucradas en la mineralización del nitrógeno

Presentada por el alumno:

<b>Rengifo</b>	<b>Guerrero</b>	<b>Carlos Andrés</b>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro: 

A	1	6	0	5	3	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

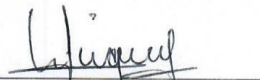
**Maestría en Ciencias en Bioprocesos**

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

### LA COMISIÓN REVISORA

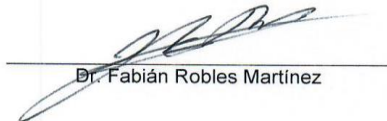
Directores de tesis

  
Dra. Marina Olivia Franco Hernández


  
Dra. María Soledad Vásquez Murrieta

  
Dra. María del Carmen Oliver Salvador

  
Dra. Ana Belém Piña Guzmán

  
Dr. Fabián Robles Martínez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
Dra. María del Carmen Oliver Salvador

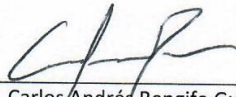
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD PROFESIONAL  
INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



## Declaración de originalidad

### DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“Yo declaro que esta tesis, así como los resultados en ella reportados, son producto de mi trabajo y que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, ni tampoco contiene material que haya sido utilizado para obtener algún grado o diploma en alguna otra institución educativa, excepto donde se reconoce como tal. Declaro igualmente que hago justo reconocimiento en la tesis a las personas que contribuyeron con su trabajo y finalmente, declaro que esta tesis es producto de mi propio trabajo con el apoyo de mis directores de tesis en cuanto a la concepción del proyecto, al estilo de la presentación o a la expresión escrita”.



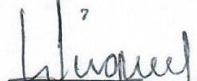
I.A. Carlos Andrés Rengifo Guerrero

Vo. Bo.



Dra. Marina Olivia Franco Hernández

Vo. Bo.



Dra. María Soledad Vásquez Murtieta

## **Autorización / Prohibición de uso de obra**

### **Autorización de uso de obra**

**Instituto Politécnico Nacional**  
**P r e s e n t e**

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe **Carlos Andrés Rengifo Guerrero**, manifiesto ser autor (a) y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada **Dinámicas de carbono y nitrógeno en suelo y vermicomposta con thinner e identificación de poblaciones microbianas involucradas en la mineralización del nitrógeno**, en adelante "La Tesis" y de la cual se adjunta copia, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 fracción II, inciso b) de la Ley Federal del Derecho de Autor, otorgo a el Instituto Politécnico Nacional, en adelante El IPN, autorización no exclusiva para comunicar y exhibir públicamente total o parcialmente en medios digitales como lo es disco compacto (CD) y el ejemplar escrito. "La Tesis" por un periodo de **un año** contado a partir de la fecha de la presente autorización, dicho periodo se renovará automáticamente en caso de no dar aviso expreso a "El IPN" de su terminación.

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La Tesis".

Adicionalmente, y en mi calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de "La Tesis", manifiesto que la misma es original y que la presente autorización no contraviene ninguna otorgada por el suscrito respecto de "La Tesis", por lo que deslindo de toda responsabilidad a El IPN en caso de que el contenido de "La Tesis" o la autorización concedida afecte o viole derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros y asumo las consecuencias legales y económicas de cualquier demanda o reclamación que puedan derivarse del caso.

Ciudad de México, a 15 de enero de 2018

**Atentamente**

  
\_\_\_\_\_  
Carlos Andrés Rengifo Guerrero



## Resumen

La contaminación de suelos con hidrocarburos derivados de petróleo es una de las problemáticas ambientales de mayor interés, ya que estos compuestos están compuestos de sustancias ampliamente reconocidas como peligrosas tanto para la salud humana como para el ambiente, y presentan altos niveles de solubilidad en agua y gran capacidad de adhesión a las partículas del suelo (Rinaldi & Da Silva, 2011).

En este trabajo de investigación se evaluó el efecto del disolvente conocido como thinner sobre la lombriz de tierra roja californiana (*Eisenia foetida*) y se determinó cuál es su concentración letal media (CL<sub>50</sub>). Así mismo, se determinó el efecto sobre las dinámicas de mineralización de C y N en suelo de bosque, suelo salino y vermicomposta, analizando CO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y además se evaluó el efecto de la concentración de materia orgánica adicional. De igual manera, se evaluó el efecto del thinner y la adición de materia orgánica sobre la población responsable del proceso de nitrificación, y finalmente se hizo el aislamiento e identificación de microorganismos con potencial para la degradación de hidrocarburos y con actividad nitrificante.

El thinner se evaluó por cromatografía de gases y la composición fue tolueno (263 mg/ml), 2 – butoxietanol (48 mg/ml), metanol (305 mg/ml), benceno (1.40 mg/ml) y mezcla de hexanos (70 mg/ml) y además provocó adelgazamiento, decoloración y fraccionamiento en los tejidos de las lombrices de tierra (An & Lee, 2008). El valor de CL<sub>50</sub> correspondió a 12.46 ml de thinner por kg de suelo (bs) (3273.44 mg tolueno/kg suelo (bs) y 17.19 mg benceno/kg suelo (bs)). Se observó mayor producción de CO<sub>2</sub> en los tratamientos con adición de thinner y thinner más adición de materia orgánica en comparación con los tratamientos control. Se encontró que el contenido de materia orgánica y la adición de materia orgánica adicional ejercen un efecto de retención sobre los componentes del thinner, observándose mayores concentraciones retenidas en los tratamientos con suelo de bosque y vermicomposta, y en todos los tratamientos con adición de materia orgánica adicional (Prokop *et al.* 2016).

Se encontró que la adición de thinner y residuo de zanahoria más thinner en suelos y vermicomposta provocó el aumento y la acumulación de las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_2^-$  y por el contrario provocó la disminución en la concentración de  $\text{NO}_3^-$ . En la vermicomposta, se encontró que la adición de thinner y materia orgánica adicional provocó el aumento en la concentración de población amonificante, nitritante y nitratante y de mesófilos aerobios, sin embargo, ante la acumulación de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_2^-$ , y la disminución en la concentración de  $\text{NO}_3^-$ , se concluyó que se favorecen los procesos de desnitrificación (Scott *et al.* 2014).

De las dinámicas realizadas, se aislaron 23 microorganismos, de los cuales se identificaron 11 usando la plataforma EzTaxon (Chun *et al.* 2007), en su mayoría resultaron gram (+). De los microorganismos identificados, *Arthrobacter rhombi*, *Microbacterium maritypicum*, *Glutamicibacter soli*, *Brachybacterium paraconglomeratum* y *Microbacterium esteraromaticum* pertenecen al filo actinobacteria. Por su parte *Pseudochrobactrum saccharolyticum*, *Ochrobactrum pituitosum* y *Alcaligenes faecalis* subsp. *Phenolicus* pertenecen al filo de las proteobacterias. *Bacillus wiedmannii*, *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis* pertenecen al filo de los firmicutes. Estos microorganismos poseen actividad previamente reportada sobre el tratamiento de contaminantes orgánicos e inorgánicos, y con participación en la mineralización de nitrógeno tanto en el suelo como en ambientes acuáticos, los cuales podrán ser utilizados en trabajos posteriores para bioremediación.

## Abstract

Soil contamination with oil derived hydrocarbons is one of the environmental problems of greatest interest, since these compounds are formulated with substances widely recognized as dangerous, both for human health and for the environment and have high levels of water solubility and high adhesion capacity to soil particles.

In this research, the effect of the solvent known as thinner was evaluated on the californian red earthworm (*Eisenia foetida*) and its median - lethal concentration (LC<sub>50</sub>) was determined. Likewise, the effect on the dynamics of mineralization of C and N in forest soil, saline - alkaline soil and vermicompost were determined, analyzing CO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and also the effect of the concentration of additional organic matter was evaluated. Similarly, the effect of the thinner and the addition of organic matter on the population responsible for the nitrification process was evaluated, and finally the isolation and identification of microorganisms with potential for the degradation of hydrocarbons and with nitrifying activity was made.

The thinner was evaluated by gas chromatography and the composition was toluene (263 mg / ml), 2-butoxyethanol (48 mg/ml), methanol (305 mg/ml), benzene (1.40 mg/ml) and hexanes mixture (70 mg/ml) and also caused thinning, discoloration and fractionation in the tissues of earthworms. The LC<sub>50</sub> value corresponded to 12.46 ml of thinner per kg of soil (bs) (3273.44 mg toluene/kg soil (bs) and 17.19 mg benzene/kg soil (bs)). Higher CO<sub>2</sub> production was observed in treatments with addition of thinner and thinner plus addition of organic matter compared to control treatments. It was found that the content of organic matter and the addition of additional organic matter exert a retention effect on the components of the thinner, observing higher concentrations retained in treatments with forest soil and vermicompost, and in all treatments with additional of organic matter.

It was found that the addition of thinner and additional organic matter plus thinner in soils and vermicompost caused the increase and accumulation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> concentrations, and conversely caused the decrease in the concentration of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. In the vermicompost, it was found that the addition of thinner and additional organic

matter caused the increase in the concentration of ammonifying, nitriting and nitrating population and of aerobic mesophiles; however, the accumulation of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$ , and the decrease in the concentration of  $\text{NO}_3^-$ , it was concluded that the denitrification processes are favored.

Of the dynamics performed, 23 microorganisms were isolated, of which 11 were identified using the EzTaxon platform, mostly resulting in gram (+). From the microorganisms identified *Arthrobacter rhombi*, *Microbacterium maritopicum*, *Glutamicibacter soli*, *Brachybacterium paraconglomeratum* and *Microbacterium esteraromaticum* belong to the phylum actinobacteria. On the other hand, *Pseudochrobactrum saccharolyticum*, *Ochrobactrum pituitosum* and *Alcaligenes faecalis* subsp. *Phenolicus* belong to the phylum of proteobacteria. *Bacillus wiedmannii*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* belong to the phylum firmicutes. These microorganisms have previously reported activity on the treatment of organic and inorganic contaminants, and with participation in nitrogen mineralization both in the soil and in aquatic environments, which may be used in subsequent bioremediation processes.



## **Agradecimientos**

A toda mi familia y las personas que amo y me esperan en Colombia, gracias por apoyarme desde la distancia, este logro es para ustedes.

A la doctora Marina Olivia Franco Hernández por su infinito apoyo y orientación tanto en el aspecto académico como en el personal.

A mis amigos y compañeros de estudio, gracias por los momentos compartidos y por abrirme las puertas de este México maravilloso.

A los doctores María Soledad Vásquez Murrieta, Ana Belem Piña Guzmán, María del Carmen Oliver Salvador y Fabián Robles Martínez, por su orientación y por compartir algo de su experiencia para la obtención de este logro.

## Tabla de Contenido

1	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	Contaminación en el suelo.....	1
1.2	Características de los compuestos BTEX.....	2
1.3	El thinner y sus características .....	5
1.4	Técnicas de remediación de ambientes contaminados. ....	6
1.4.1	Biorremediación.....	6
2	ANTECEDENTES.....	9
3	JUSTIFICACIÓN.....	15
4	OBJETIVOS.....	16
4.1	Objetivo General.....	16
4.2	Objetivos específicos .....	16
5	MATERIALES Y METODOLOGÍA .....	17
5.1	Obtención del suelo y vermicomposta .....	17
5.2	Caracterización fisicoquímica del suelo y vermicomposta .....	17
5.2.1	Textura.....	17
5.2.2	Determinación de pH y conductividad eléctrica .....	18
5.2.3	Humedad y capacidad de retención de agua.....	18
5.2.4	Capacidad de Intercambio catiónico .....	18
5.2.5	Determinación de Carbono Orgánico Total (COT).....	19
5.2.6	Determinación de fósforo.....	19
5.2.7	Determinación de nitrógeno total .....	19
5.2.8	Determinación de nitrógeno amoniacal (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) y nitratos (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) .....	20
5.3	Obtención y caracterización de los componentes del disolvente (thinner)...	21
5.4	Prueba de toxicidad en lombriz de tierra.....	21
5.4.1	Obtención de lombrices .....	21
5.4.2	Determinación de concentración letal media (CL50) y efecto morfológico del thinner sobre Eisenia foetida.....	21
5.5	Proceso de incubación en microcosmos.....	22
5.5.1	Preincubación .....	23
5.5.2	Incubación .....	23
5.5.3	Determinación de CO <sub>2</sub> (mineralización de C) .....	25
5.5.4	Determinación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> y NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mineralización de N) .....	25
5.5.5	Determinación de concentración de disolvente y porcentaje de extracción ----25	
5.6	Dinámicas de mineralización en vermicomposta y efecto de la adición de materia orgánica .....	26

5.6.1	Conteo microbiológico total.....	27
5.6.2	Determinación de concentración de microorganismos amonificantes (R – NH <sub>2</sub> a NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) .....	27
5.6.3	Determinación de concentración de microorganismos nitritantes (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> a NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) .....	27
5.6.4	Determinación de concentración de microorganismos nitratantes (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> a NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) .....	28
5.6.5	Aislamiento de microorganismos asociados al proceso de nitrificación..	28
5.7	Identificación molecular .....	29
5.7.1	Extracción de DNA bacteriano.....	29
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
6.1	Caracterización fisicoquímica de los suelos y vermicomposta.....	31
6.2	Análisis de la composición del thinner .....	37
6.3	Efecto de la toxicidad del thinner en las lombrices de tierra .....	39
6.4	Cinéticas de mineralización.....	42
6.4.1	pH.....	42
6.4.3	Nitrógeno Amoniacal (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) .....	49
6.4.4	Nitritos (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ).....	51
6.4.5	Nitratos (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ).....	54
6.4.6	Variación de la concentración de los componentes del thinner .....	56
6.4	Dinámicas de mineralización en vermicomposta y efecto de thinner y adición de materia orgánica. ....	64
6.4.1	Variación de mesófilos aerobios. ....	64
6.4.2	Variación de la concentración de CO <sub>2</sub> .....	66
6.4.3	Nitrógeno amoniacal (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) y concentración de microorganismos amonificantes (R-NH <sub>2</sub> → NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ). ....	68
6.4.4	Nitritos (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) y microorganismos nitritantes (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> → NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ). ....	74
6.4.5	Nitratos (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) y microorganismos nitratantes (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> → NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ). ....	79
6.4.6	Concentración de los compuestos del thinner .....	84
6.4.7	Aislamiento e identificación de microorganismos asociados al proceso de nitrificación.....	92
7	Conclusiones .....	103
8	Prospectivas .....	105
9	Bibliografía .....	106
10	Anexos.....	120

## Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades de los compuestos BTEX. ....	3
Tabla 2. Valores de referencia para compuestos BTEX en suelo permitidos por la legislación Holandesa. Brasileña y Mexicana.....	4
Tabla 3. Técnicas de biorremediación utilizadas comúnmente. ....	7
Tabla 4. Especies bacterianas aisladas en suelos contaminados con derivados de petróleo. ....	12
Tabla 5. Características texturales de los suelos y vermicomposta utilizados. ....	17
Tabla 6. Tratamientos para el proceso de incubación en microcosmos. ....	23
Tabla 7. Tratamientos propuestos para evaluar mineralización en vermicomposta. ....	26
Tabla 8. Caracterización fisicoquímica de los suelos y vermicomposta. ....	32
Tabla 9. Comparación de resultados fisicoquímicos con la normatividad mexicana vigente.....	33
Tabla 10. Composición del thinnner utilizado. ....	37
Tabla 11. Características de los otros compuestos encontrados en el thinner.....	38
Tabla 12. Variación de la concentración de los componentes de thinner en suelo de bosque. ....	57
Tabla 13. Variación de la concentración de los componentes de thinner en suelo de salino.....	58
Tabla 14. Variación de la concentración de los componentes de thinner en vermicomposta. ....	59
Tabla 15. Variación de la concentración de los compuestos del thinner en vermicomposta (frasco abierto). ....	85
Tabla 16. Variación de la concentración de los compuestos del thinner en vermicomposta (tratamientos en frasco cerrado). ....	86
Tabla 17. Identificación y características de los microorganismos aislados.....	94

## Índice de figuras

Figura 1. Efectos de la exposición al thinner sobre la morfología de lombriz de tierra <i>Eisenia foetida</i> .....	41
Figura 2. Variación de pH.....	44
Figura 3. Comportamiento de las dinámicas de mineralización de carbono. ....	46
Figura 4. Comportamiento de la concentración de $\text{NH}_4^+$ .....	50
Figura 5. Comportamiento de la concentración de $\text{NO}_2^-$ .....	53
Figura 6. Comportamiento de la concentración de $\text{NO}_3^-$ . ....	55
Figura 7. Ruta metabólica microbiana principal para la degradación aerobia de hidrocarburos .....	61
Figura 8. Esquema de la ruptura de una molécula de tolueno hasta la formación de catecol y posterior incorporación al ciclo de Krebs.....	62
Figura 9. Variación de mesófilos aerobios en vermicomposta. ....	65
Figura 10. Variación de la concentración de $\text{CO}_2$ en vermicomposta.....	67
Figura 11. Variación de la concentración de $\text{NH}_4^+$ y microorganismos amonificantes en vermicomposta con inclusión de residuo de zanahoria. ....	69
Figura 12. Variación de la concentración de $\text{NH}_4^+$ y microorganismos amonificantes en vermicomposta con inclusión de thinner y residuo de zanahoria más thinner..	71
Figura 13. Variación de la concentración de $\text{NO}_2^-$ y microorganismos nitritantes en vermicomposta con inclusión de residuo de zanahoria. ....	74
Figura 14. Variación de la concentración de $\text{NO}_2^-$ y microorganismos nitritantes en vermicomposta con inclusión de thinner y residuo de zanahoria más thinner.....	77
Figura 15. Variación de la concentración de $\text{NO}_3^-$ y microorganismos nitratantes en vermicomposta con inclusión de residuo de zanahoria. ....	81
Figura 16. Variación de la concentración de $\text{NO}_3^-$ y microorganismos nitratantes en vermicomposta con inclusión thinner y residuo de zanahoria más thinner.....	83
Figura 17. Posibles mecanismos verificados experimentalmente para la utilización de hidrocarburos por microorganismos .....	90
Figura 18. Ruta de degradación anaerobia para tolueno y m – xileno en bacterias desnitrificantes. ....	91
Figura 19. Intermediarios y enzimas envueltas en el metabolismo anaerobio de fenol por un microorganismo desnitrificante ( <i>Pseudomonas</i> ). ....	91
Figura 20. Siembra y aislamiento en medios selectivos.....	92

# 1 INTRODUCCIÓN

Como resultado del rápido proceso de urbanización, industrialización e incremento descontrolado de la población, la generación y el manejo de residuos se ha convertido en un problema alrededor del mundo (Singh *et al.* 2011). El ambiente global se encuentra bajo un gran stress debido a la presión demográfica efectuada sobre los limitados recursos naturales. De acuerdo a Juwarkar y colaboradores (2010), la magnitud y la naturaleza de los problemas ambientales siempre está en constante cambio, trayendo consigo nuevos retos y creando una necesidad constante por desarrollar nuevas tecnologías que permitan abordarlos y dar una solución.

Lo anterior ha traído consigo efectos considerables en la salud, lo que ha hecho que todos los gobiernos, las industrias y la ciencia se esfuercen por encontrar un nuevo enfoque hacia la restauración de los ambientes contaminados (Ekperusi & Aigboidion, 2015).

De acuerdo a Rinaldi & Da Silva (2011), muchas áreas se encuentran contaminadas debido a la actividad industrial, en relación a un manejo incorrecto de los residuos, la inadecuada manipulación de sustancias químicas y la generación de subproductos. Juwarkar *et al.* (2010) indican que el origen de los problemas ambientales se puede clasificar en dos partes, la generación de residuos (industriales, efluentes, alimenticios, aguas residuales) y el efecto del uso de compuestos químicos empleados en varias cadenas productivas (insecticidas, pesticidas, fertilizantes y subproductos de la industria química).

## 1.1 Contaminación en el suelo

La fabricación y aplicación de productos industriales y agrícolas junto con la falta de eliminación adecuada de residuos ha causado que los productos químicos terminen donde originalmente no estaban destinados, causando contaminación del suelo, aguas subterráneas, sedimentos y la propia cadena alimentaria (Vicent *et al.* 2013).

Los suelos juegan el papel más importante en la dinámica de los ecosistemas, y tienen estrecha relación con la diversidad biótica, el control en la erosión, la



seguridad alimentaria, la producción de biocombustibles y el cambio climático global (Paul 2016) y pueden llegar a ser contaminados fácilmente por residuos orgánicos como consecuencia de residuos industriales, o el abuso de plaguicidas. Osman (2014) menciona que la contaminación en el suelo se debe a la acumulación e introducción de sustancias con niveles peligrosos para el crecimiento y la salud de los todos los organismos, incluyendo plantas, animales y microorganismos.

Actualmente, el problema ambiental más común en los suelos lo causan productos derivados del petróleo, los cuales, al ser dispuestos inadecuadamente, pueden ser peligrosos para todas las formas de vida presentes en el ecosistema (Sihag *et al.* 2014). Riffaldi *et al.* (2006) indican que la contaminación en el suelo por productos derivados del petróleo es uno de los mayores problemas ambientales, y los hidrocarburos a base de aceites minerales son los contaminantes que se producen con mayor frecuencia, siendo un típico efecto secundario de la actividad industrial.


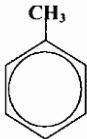
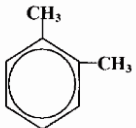
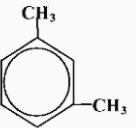

## **1.2 Características de los compuestos BTEX**

La contaminación de suelos asociados a sustancias como benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) puede traer serias consecuencias tanto para el medio ambiente como para la salud humana y, la exposición en ambientes contaminados con estos componentes puede causar graves daños de tipo neurológico e incluso provocar cáncer (Ezquerro *et al.* 2004). De acuerdo a Song (2003), las sustancias conocidas como BTX son los mayores componentes de la gasolina, y se usan ampliamente como solventes y como materias primas para la síntesis química de varias sustancias; sin embargo, cantidades considerables de estos compuestos se disponen continuamente en ambientes naturales de manera accidental o intencional. Por su parte, Mitra & Roy (2011) indican que una de las fuentes más comunes de la contaminación de suelos y aguas subterráneas por compuestos BTX tiene que ver con el derrame de productos derivados de petróleo tales como la gasolina, el diesel, lubricantes y algunos disolventes, causados por la ruptura de ductos y tanques de almacenamiento y que, por su polaridad y sus propiedades,

estos compuestos pueden entrar fácilmente en el suelo y causar serios problemas ambientales.

Por sus propiedades estos compuestos se consideran lo más móviles, ya que por su nivel de volatilidad y su solubilidad en agua pueden contaminar tanto el aire como los cuerpos de agua subterráneas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Propiedades de los compuestos BTEX.

Compuesto	Estructura	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en agua a 25°C (g/l)	Constante de Henry a 25°C (kPa m <sup>3</sup> /mol)
<b>Benceno</b>		80	1.79	0.557
<b>Tolueno</b>		110.6	0.53	0.673
<b>O - Xileno</b>		144.5	0.18	0.525
<b>M - Xileno</b>		139.1	0.16	0.728
<b>P - Xileno</b>		138.3	0.16	0.699

Referencia: Sieg *et al.* 2008, Njobuenwu *et al.* 2005

Tanto la legislación holandesa como la brasileña (De Almeida-Andrade *et al.* 2010) son más estrictas con los valores de referencia permitidos por su legislación respecto a las concentraciones de benceno y tolueno permitidas en suelo en México (SEMARNAT 2012), como se muestra en la tabla 2. Así mismo, tanto la legislación mexicana como la brasileña especifican las concentraciones permitidas de acuerdo al tipo de uso del suelo.

**Tabla 2.** Valores de referencia para compuestos BTEX en suelo permitidos por las legislaciones Holandesa, Brasileña y Mexicana.

	Legislación Holandesa <sup>1</sup>			Legislación Brasileña <sup>1</sup>			Normatividad Mexicana <sup>2</sup>			
	Valor de referencia	Alerta	Intervención	Valor de prevención	Valor de intervención			Agrícola, forestal, pecuario	Residencial, recreativo	Industrial, Comercial
					Agrícola	Residencial	Industrial			
Concentración (mg kg <sup>-1</sup> peso seco)										
Benceno	0.01	0.11	0.20	0.03	0.06	0.08	0.15	6	6	15
Tolueno	0.01	13.0	26.0	0.14	30	30	75	40	40	100
Etilbenceno	0.01	5.0	10.0	6.2	35	40	95	10	10	25
Xilenos	0.01	2.5	5.0	0.13	25	30	70	40*	40*	100*
HPA	0.2	4.1	8.0	12.7	56.6	147.1	384.8	-	-	-
HTP	10	505	1000	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> De Almeida-Andrade *et al.* (2010)

<sup>2</sup> SEMARNAT (2012)

### 1.3 El thinner y sus características

El diluyente de pintura conocido como “thinner”, es una de las sustancias más empleadas en la construcción de nuevas viviendas, fabricación de textiles y pinturas (Baydas *et al.* 2005, Yilmaz *et al.* 2006); y se conoce que es un material inflamable y se ha reportado que una exposición prolongada puede generar efectos adversos en la salud y provocar intoxicación (Singh *et al.* 2015). , el thinner contiene en su composición sustancias como tolueno, benceno, xileno, entre otros compuestos en los que se encuentran algunos alcoholes. El principal componente es el tolueno, conocido ampliamente como una neurotoxina, el cual se encuentra entre el 60 y 70% de la composición del thinner comercial (Baydas *et al.* 2005). La Organización para la Administración de la Salud y Seguridad Ocupacional determinó que la exposición a un ambiente saturado con 2000 ppm de tolueno resulta ser peligroso para la salud humana, se puede absorber fácilmente por la sangre, distribuir a todos los tejidos cognitivos y afectar el cerebro y el sistema nervioso (Argo *et al.* 2010).

La literatura reporta algunos casos de intoxicación con thinner en seres humanos. También se han reportado casos de muerte de personas por inhalación de thinner, una persona de 18 años de edad, encontrando xileno (10 – 50 ng/ml) en sangre (Ahmed 2012) y . la muerte de una persona de 55 años de edad por la ingestión de thinner, encontrando sustancias como tolueno y benceno en la sangre y fluidos gástricos (Yajima *et al.* 2005). Con respecto a incidencias relacionadas con el ambiente no se han reportado casos de contaminación de suelos con thinner; sin embargo, por sus características y componentes, es una sustancia que representa alta peligrosidad y es potencialmente contaminante para todo tipo de ambientes.

La gravedad de la problemática relacionada con la contaminación por hidrocarburos radica en que los suelos se consideran un recurso natural no renovable, y por lo tanto las funciones del suelo que se encuentra contaminado pueden alterarse severamente, e incluso, pueden tardar más de una generación humana en restaurarse por sí misma, empleando mecanismos de atenuación natural (Vicent *et al.* 2013). Por lo anterior, es necesario desarrollar estrategias que permitan la descontaminación de los suelos alterados por contaminantes como los derivados de petróleo.

#### **1.4 Técnicas de remediación de ambientes contaminados.**

Algunos autores han reportado el uso de técnicas fisicoquímicas para el tratamiento de algunos contaminantes y residuos, como la encapsulación y el lavado *in situ* y con métodos químicos como la precipitación, la oxidación (Osman 2014), la oxidación química con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>) (Rinaldi & Da Silva 2011) o lavado con surfactantes Long *et al.* (2013).

A pesar de que el uso de surfactantes puede degradar los contaminantes presentes en el suelo, los subproductos generados en el proceso también representan riesgos para la salud humana y el medio ambiente, por lo cual requieren de procesos posteriores para finalmente ser dispuestos correctamente (Long *et al.* 2013).

Los procesos de remediación basados en tecnologías químicas y físicas demandan un gran consumo de energía, lo cual los hace costosos, especialmente cuando se tienen grandes volúmenes de ambientes contaminados (Asgharnia *et al.* 2014). A pesar de que las técnicas basadas en reacciones químicas y procesos de absorción están muy difundidas, algunos autores argumentan que se deben buscar alternativas amigables ambientalmente, cuya aplicación represente grandes beneficios económicos y energéticos.

##### **1.4.1 Biorremediación**

Las técnicas de biorremediación se han desarrollado y mejorado para el tratamiento de ambientes contaminados con sustancias químicas peligrosas y han traído consigo una alternativa viable en comparación con los tratamientos físicos y químicos (Tabla 3) (Chao & Hsu 2004, Riffaldi *et al.* 2006). Actualmente se ha extendido el uso de la biorremediación como una alternativa biológica y una tecnología interesante, la cual posibilita la degradación de contaminantes usando la actividad microbiológica natural y recuperación de ambientes contaminados tales como el agua, aire y el suelo, asegurando la conservación de las propiedades biofísicas y bioquímicas de los ecosistemas (Ceccanti *et al.* 2006, Juwarkar *et al.* 2010),. ).

**Tabla 3.** Técnicas de biorremediación utilizadas comúnmente.

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>
Bioaugmentación	Adición de cultivos de bacterias en el medio contaminado. Se utiliza frecuentemente en biorreactores y sistemas <i>ex situ</i>
Biofiltración	Uso de columnas para tratamiento de emisión de gases
Bioestimulación	Estimulación de la flora microbiana nativa en suelos, sistemas acuáticos
Biorreactores	Biodegradación en contenedores para degradar líquidos o lodos
Bioventeo	Método para tratar suelos contaminados estimulando el crecimiento microbiano a través del suministro de oxígeno
Compostaje	Tratamiento termofílico aeróbico en el cual el material contaminado es mezclado con un agente voluminoso y poroso. Se puede utilizar en pilas estáticas, pilas aireadas o reactores alimentados continuamente.

(Juwarkar *et al.*, 2010)

Otra técnica de biorremediación es el vermicomposteo, es una tecnología ecológica y económica que emplea lombrices de suelo, las cuales ingieren la materia orgánica y posteriormente excretan compuestos altamente nutricionales que se pueden usar como alimento por la flora microbiana presente, aumentando su actividad biológica (Chen *et al.* 2016).

La vermicomposta es el producto obtenido al final del vermicomposteo y es un mejorador de las propiedades del suelo por excelencia, ya que aumenta la porosidad, aireación, concentración de nutrientes y diversidad microbiana, la cual a su vez es responsable de las propiedades fisicoquímicas y promueve el crecimiento de las plantas (Pathma & Sakhtivel 2012). Debido a la alta actividad microbiana en la vermicomposta, ésta se puede utilizar como un agente de biocontrol y biorremediación para el tratamiento de contaminantes orgánicos (Joshi *et al.* 2015).

Teniendo en consideración las implicaciones que trae consigo la contaminación y exposición a estos componentes para la salud humana y el medio ambiente, es necesario estudiar los efectos que tienen estos contaminantes en el suelo, y cómo afectan el equilibrio ecológico, alterando las dinámicas de mineralización y recirculación de nutrientes. Dependiendo de la ubicación geográfica, y del uso de



suelo (forestal, agrícola, industrial), los suelos presentan características particulares que van a determinar su comportamiento ante la presencia de un contaminante. Entender cómo se alteran las características de los suelos, es el primer paso para formular y proponer alternativas que permitan descontaminar este tipo de ambientes empleando técnicas de biorremediación.

## 2 ANTECEDENTES

En México se estima que en los últimos 20 años la contaminación con derivados del petróleo ha provocado pérdidas por más de 50 mil millones de dólares, con impacto en el aspecto ambiental y agrícola (Cavazos–Arroyo *et al.* 2014). La Comisión Nacional de Hidrocarburos (CNH) en conjunto con la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA), entre el año 2010 y 2014 reportan que se presentaron alrededor de 1750 derrames de hidrocarburos en suelos, afectando principalmente estados como Veracruz, Campeche y Tabasco. Con respecto a la utilización de thinner, Reza *et al.* (1997) presentaron un estudio en donde evaluaron diferentes tipos de thinner comercializados en la Ciudad de México, y reportaron diferencias tanto en el número de componentes como en la composición de los disolventes, lo que indica que probablemente no se aplican normas ni criterios para definir sus características técnicas, ambientales o de toxicidad para aplicaciones comerciales e industriales específicas.

Los hidrocarburos causan alteraciones importantes en los suelos, y afectan principalmente los procesos de recirculación y disponibilidad de nutrientes (Vicent *et al.* 2013). Autores como Hernández *et al.* (2003), hacen referencia a la contaminación de suelos con hidrocarburos como por ejemplo el queroseno, y su efecto negativo sobre los microorganismos responsables de la fijación de nitrógeno atmosférico. El nitrógeno es un elemento crucial para el desarrollo de todas las células, y los procesos de fijación y nitrificación microbiana constituyen la principal fuente de nitrógeno para todos los ecosistemas (Hirsch & Mauchline, 2015). El ciclo del nitrógeno es el segundo ciclo más importante (después del de carbono), y es esencial para el crecimiento de plantas, las cuales conforman la cadena trófica de los seres humanos; sin embargo, la disponibilidad de este elemento en el suelo se ve alterado por el desarrollo de actividades antropogénicas que comprenden la agricultura intensiva, la deforestación y la actividad industrial (Fowler *et al.* 2015).

Otros autores mencionan que la disposición de contaminantes en el suelo podría tener un efecto sobre el proceso de colonización de los microorganismos asociados

a la fijación de  $N_2$  en la rizosfera y afectar su interacción con las plantas (Franché *et al.* 2009). La disminución de la actividad enzimática del suelo y la biomasa microbiana es un resultado del potencial inhibitorio que tienen los hidrocarburos derivados del petróleo en el suelo y que puede tener un efecto sobre procesos tan importantes como la nitrificación (Alrumman *et al.* 2015). La nitrificación es el proceso biológico en el cual se lleva a cabo el intercambio entre el nitrógeno atmosférico inerte ( $N_2$ ) y el nitrógeno reactivo y biodisponible, amonio ( $NH_4^+$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ) y nitrato ( $NO_3^-$ ), que son compuestos que soportan el metabolismo celular y el crecimiento de plantas y microorganismos, y cuyo proceso se controla enteramente por la actividad microbiana (Stein & Klotz, 2016). De acuerdo a lo indicado por Aciego- Pietri & Brooks (2008), la mineralización del nitrógeno y la nitrificación son indicadores de la actividad microbiana y la fertilidad de los suelos.

En algunas investigaciones se ha reportado el efecto que tienen los hidrocarburos sobre el proceso de nitrificación en suelos. Betancur-Galvis *et al.* (2006) reportaron el efecto de antraceno y fenantreno (hidrocarburos policíclicos aromáticos) sobre las dinámicas de nitrificación en suelos salinos del exlago de Texcoco, reportando incrementos en la concentración de  $NH_4^+$  y disminución en la concentración de  $NO_3^-$ , lo que sugiere pérdidas del nitrógeno disponible para microorganismos y plantas. Por su parte, John *et al.* (2016) encontraron que la presencia de hidrocarburos en el suelo aumenta la relación C:N, lo que conlleva a que se inmovilice mayor cantidad de nitrógeno por los microorganismos (formación de biomasa microbiana), reduciendo la disponibilidad de nitrógeno para las plantas. Estas investigaciones demuestran claramente que los hidrocarburos como contaminantes del suelo causan problemas asociados con la recirculación de nutrientes, limitando nutricionalmente a los suelos y provocando problemas de infertilidad.

A diferencia de los procesos de degradación termoquímica, los procesos biológicos de degradación traen consigo beneficios ecológicos inherentes y costos potenciales accesibles (Zhang *et al.* 2013). La literatura permite evidenciar diferentes estudios en los cuales se han aplicado las técnicas de biorremediación para la descontaminación y degradación de agentes contaminantes presentes en el suelo.

Graj *et al.* (2013) evaluaron el potencial de la técnica de bioaumentación en conjunto con la rizoremediación (uso de plantas y microorganismos de la rizosfera) para degradar un contaminante a base de diésel. Dentro de sus resultados se evidenció que la adición de bacterias mejoró el índice de germinación y la elongación de las raíces de las plantas, promoviendo la producción de exudados que facilitan el rompimiento de las moléculas del contaminante. Por su parte, Xu *et al.* (2013) comprobaron el efecto del pasto de centeno “ryegrass” (*Lolium perenne L.*) como agente biofiltrante en combinación con el uso de microorganismos para la degradación de tolueno.

Una de las técnicas de biorremediación que más ha despertado interés sobre la comunidad científica es el vermicomposteo. La biorremediación a través de esta técnica se ha aplicado ampliamente en las últimas dos décadas para el tratamiento de residuos y ambientes contaminados como el agua y el suelo (Yadav & Garg 2011). La vermicomposta (producto final del vermicomposteo) mejora la porosidad, aireación, concentración de nutrientes y diversidad microbiana en el suelo, la cual a su vez es responsable de las propiedades fisicoquímicas y promueve el crecimiento de las plantas (Pathma & Sakhtivel, 2014) y debido a la alta actividad microbiana se puede utilizar como un agente de biocontrol y biorremediación para el tratamiento de contaminantes (Joshi *et al.* 2015).

Al respecto la literatura reporta varias aplicaciones del uso de esta tecnología. Autores como Chen *et al.* (2016) probaron el efecto del vermicomposteo con *Eisenia fetida* junto a una técnica de tratamiento de sedimentos para estabilizar aguas residuales contaminadas. Asgharnia *et al.* (2014) emplearon la metodología de bioaumentación para mejorar la bioacumulación de fenantreno presente en un suelo contaminado empleando el vermicomposteo. Estos autores encontraron una correlación positiva entre el aumento de la población microbiana capaz de degradar fenantreno, y el porcentaje de bioacumulación de este contaminante en los tejidos de la lombriz de tierra.

He *et al.* (2017), reportaron la utilización de vermicomposta como agente adsorbente en suelos contaminados con metales pesados (Pb y Cd) y contaminantes orgánicos como la tetraciclina. Fu *et al.* (2011) emplearon la vermicomposta como material biofiltrante para la remoción de etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), un compuesto orgánico volátil generado de plantas petroquímicas.

Al igual que los suelos, la vermicomposta se caracteriza por tener una actividad y diversidad microbiana alta (Joshi *et al.* 2015) y los microorganismos presentes podrían tener potencial para emplearlos en tratamientos de biorremediación. Según El-Naas *et al.* (2004) los microorganismos (especialmente bacterias) suelen aislarse de lodos y muestras de suelos de zonas cercanas a las refinerías de petróleo y las plantas de tratamiento de aguas residuales. Estos microorganismos que son autóctonos de los sitios contaminados tienen mayor capacidad de soportar ese tipo de condiciones ambientales, en comparación con los microorganismos de otros ambientes, siendo el grupo de *Pseudomonas* uno de los más conocidos por sus habilidades en la degradación de compuestos orgánicos.

En una investigación realizada por Obire & Nwaubeta (2002), identificaron diferentes tipos de microorganismos aislados de suelos contaminados con derivados de petróleo, tales como diesel, gasolina y keroseno (Tabla 4), y cuya variación dependía del tiempo de residencia del contaminante en el suelo.

**Tabla 4.** Especies bacterianas aisladas en suelos contaminados con derivados de petróleo.

Tiempo (Semanas)	Tipo de contaminante			
	Control	Gasolina	Keroseno	Diesel
1	<i>Bacillus sp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Micrococcus roseus</i>
	<i>KleibSELLA sp.</i>	<i>P. aeruginosa</i>		
2	<i>Flavobacterium sp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
		<i>Proteus mirabilis</i>		<i>P. aeruginosa</i>
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	

	<i>Actinomyces sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Kleibsella sp</i>
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
4	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>
5	<i>Flavobacterium sp.</i> <i>Kleibsiella sp.</i>	<i>P. aureginosa</i>	<i>P. aureginosa</i>	<i>P. aureginosa</i>
12	<i>Alealigenes faecalis</i>	<i>Bacillus sp.</i> <i>Kleibsella sp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
16	<i>Arthrobacter sp.</i> <i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i> <i>Kleibsiella sp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Micrococcus luteus</i> <i>P. aureginosa</i>

---

(Referencia: Obire & Nwaubeta, 2002)

En investigaciones previas llevadas a cabo por Arciniega (2011) en UPIBI, se reportó el aislamiento de 13 cepas del tracto digestivo de *Eisenia foetida* con capacidad para crecer en un medio de cultivo con acrilamida y policacrilamida como única fuente de carbono, entre las que se destacan *B. subtilis*, *A. luteolus*, *S. marcescens*, *K. rosea* entre otras, demostrando que estas cepas pueden desarrollarse en presencia de estas sustancias, y que desarrollan complejos enzimáticos que les permiten degradar estos contaminantes.

Vicent *et al.* (2013) indican que algunos microorganismos que llevan a cabo funciones esenciales en el suelo pueden mostrar resistencia a la perturbación causada por la presencia de un contaminante. Así mismo, estos autores indican que, si las especies consideradas esenciales recuperan su funcionalidad y la densidad de su población, se les conoce como resilientes, y por el contrario, si las especies esenciales se afectan de manera irreversible, pero aparecen otras especies autóctonas que tienen la capacidad de cumplir funciones similares en las mismas condiciones se les conoce como redundantes.



Como se mencionó anteriormente, una de las funciones esenciales llevada a cabo en los suelos es la fijación de  $N_2$  y la nitrificación, proceso que también se lleva a cabo en la vermicomposta (Broz *et al.* 2016). Hernández *et al.* (2003) reportan que géneros como *Pseudomonas*, *Agrobacterium* y *Bacillus* se caracterizan, además, por tener la capacidad de fijar  $N_2$  atmosférico, y estos géneros se estudian como microorganismos biodegradadores de petróleo o sus derivados. Deni & Penninckx (1999) indican que en experimentos *in vitro*, las bacterias oxidadoras de  $NH_4^+$  son capaces de oxidar hidrocarburos de manera incompleta. Zepeda *et al.* (2006) reportaron en su estudio la utilización de un consorcio bacteriano con actividad nitrificante para la degradación de benceno, tolueno y m – xileno, encontrando que estos microorganismos emplean mecanismos como la actividad de la mono oxigenasa tanto como para oxidar  $NH_4^+$  hasta  $NO_2^-$  y posteriormente a  $NO_3^-$ , como también para degradar este tipo de compuestos en intermediarios como fenol y bencil – alcohol, compuestos que después se transforman en ácidos grasos volátiles por otro tipo de microorganismos.

Por lo anterior, además de estudiar cómo se alteran ciclos biogeoquímicos como el del nitrógeno en suelos y vermicomposta, es importante además aislar e identificar qué tipo de microorganismos son los que llevan a cabo este tipo de procesos en la vermicomposta, y que pueden ser potencialmente útiles para formular un tratamiento de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo (thinner) a partir de la vermicomposta.

### 3 JUSTIFICACIÓN

El thinner es una mezcla de disolventes utilizado ampliamente en la industria textil, fabricación de pinturas y en la limpieza de partes metálicas; sin embargo, su uso inapropiado y exposición prolongada, puede causar graves daños de tipo neurológico e incluso provocar cáncer. Por sus características, la disposición final de este tipo de sustancias en tiraderos a cielo abierto ocasiona la contaminación del suelo y mantos freáticos, generando efectos adversos en el medio ambiente y afectando el equilibrio de los procesos biológicos de diversos organismos.

Se ha reportado que los microorganismos relacionados con el proceso de nitrificación en suelos tienen el potencial para utilizarse como degradadores de hidrocarburos. Así mismo, investigaciones previas en nuestro grupo de trabajo han demostrado que el uso de *Eisenia foetida* y las poblaciones microbianas asociadas presentes en la vermicomposta son capaces de degradar compuestos orgánicos tóxicos como la acrilamida y la poliacrilamida, por lo tanto es posible que algunos grupos microbianos presentes en la vermicomposta tengan la capacidad de degradar compuestos derivados del petróleo.

El aislamiento e identificación de las poblaciones microbianas asociadas al proceso de nitrificación en vermicomposta conforman el primer paso para formular y proponer alternativas que permitan descontaminar este tipo de ambientes empleando técnicas de biorremediación.

Por lo expuesto anteriormente, es necesario estudiar cómo se alteran los ciclos biológicos del suelo y vermicomposta contaminados con thinner y observar cómo se afectan las poblaciones microbianas relacionadas con el proceso de nitrificación.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto de thinner sobre las dinámicas de carbono y nitrógeno en dos suelos y en vermicomposta e identificar las poblaciones microbianas de la fracción cultivable involucradas en el proceso de mineralización del nitrógeno.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Analizar el comportamiento de las dinámicas de C, N y biodegradación de thinner en dos suelos con diferente concentración de materia orgánica y en vermicomposta a nivel de microcosmo.
2. Evaluar la concentración de los principales compuestos del thinner durante la dinámica de mineralización.
3. Cuantificar en medios selectivos las poblaciones amonificantes, nitritantes y nitratantes en el tratamiento con vermicomposta.
4. Aislar e identificar molecularmente los microorganismos cultivados involucrados en el proceso de mineralización del N en vermicomposta, usando técnicas de biología molecular.

## 5 MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 5.1 Obtención del suelo y vermicomposta

Se utilizaron dos tipos de suelo, tipo franco proveniente de bosque con alto contenido de materia orgánica y suelo salino – alcalino proveniente del ex lago de Texcoco (Tabla 5). La vermicomposta se obtuvo de un lote de vermicomposteo alimentado con residuos lignocelulósicos, ubicado en el invernadero de la Unidad Interdisciplinaria de Biotecnología – UPIBI.

**Tabla 5.** Características texturales de los suelos y vermicomposta utilizados.

	Suelo de Bosque	Suelo Salino - Alcalino	Vermicomposta
<b>Arcilla (mg/kg)</b>	42.08 ± 0.041	193.49 ± 3.30	51.14 ± 1.21
<b>Limo (mg/kg)</b>	396.64 ± 1.89	254.24 ± 3.68	183.25 ± 1.27
<b>Arena (mg/kg)</b>	561.28 ± 1.93	552.26 ± 1.09	765.60 ± 2.14
<b>Textura</b>	Franco Arenoso	Franco Arenoso	Arenoso Franco

### 5.2 Caracterización fisicoquímica del suelo y vermicomposta

Para el muestreo de suelos y vermicomposta se utilizó la metodología propuesta por Li *et al.* (2015). Para cada tratamiento, las muestras se tamizaron en un tamaño de malla menor a 2 mm y se dejó secar a temperatura ambiente para análisis de propiedades fisicoquímicas. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

#### 5.2.1 Textura

Se llevó a cabo según lo mostrado por Beretta *et al.* (2014). Se tomaron 50 g de muestra previamente seca y tamizada (<2 mm) y se mezclaron con 10 ml de solución de hexametáfosfato de sodio (37 g y 7.94 g de carbonato de sodio en 1000 ml de agua destilada), homogenizando con una batidora por 2 minutos. Posteriormente, el contenido se llevó a una probeta de 1000 ml completando con agua de grifo, se mezcló y se midió la densidad a través de un densímetro de Bouyoucos. La textura se determinó empleando el diagrama triangular (Anexo 1) de clases texturales básicas de suelo (Flemming 2000; Dexter 2004).

### **5.2.2 Determinación de pH y conductividad eléctrica**

Para la medición de pH se tomó una muestra seca y se diluyó en agua en una relación 1:2.5. Se dejó homogeneizar por 3 minutos y se determinó potenciométricamente (Chevremont *et al.* 2013).

La conductividad eléctrica se midió con un conductímetro (OAKTON DO-110, Singapur). Se tomaron 25 g de muestra y se saturaron con agua en exceso hasta obtener una capa de agua por encima del nivel del suelo de aproximadamente 3 mm. Se dejó reposar en un refrigerador por 24 horas y se llevó a centrifugación por 5 minutos a 3000 rpm (IEC HN – SII, USA). Posteriormente se llevó a cabo la determinación tomando una alícuota del sobrenadante.

### **5.2.3 Humedad y capacidad de retención de agua**

Estos parámetros se determinaron de acuerdo a lo propuesto por Asuming-Brempong y colaboradores (2008). La humedad se determinó por gravimetría tomando 10 g la cual se llevó a un horno de convección a una temperatura de 105°C por un periodo de 24 horas o hasta peso constante. La capacidad de retención de agua se evaluó saturando 10 g de muestra dispuesta sobre un papel filtro totalmente seco, colocado sobre un embudo de decantación. El embudo se cubrió para prevenir pérdidas de agua por evaporación. Adicionalmente, se colocó un papel filtro sobre un embudo y se agregó agua con el fin de obtener la cantidad de agua retenida por el papel. Se dejó decantar por un periodo de 24 horas. Posteriormente se pesó la muestra de suelo y el papel filtro.

### **5.2.4 Capacidad de Intercambio catiónico**

La determinación de CIC se llevó a cabo según lo establecido por Rodríguez-Seijo & Andrade (2015). Se utilizó una solución de cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) y trietanolamina ajustada a un pH 8.1 con una solución de HCl 1 N (solución A), sulfato magnésico 0.1N (solución B), solución de EDTA 0.05N, solución de cloruro amónico 1 N e hidróxido amónico 1 N en una relación 1:5 y solución de eriocromo negro T como indicador. Se tomaron 2 g de muestra tamizada previamente (<2 mm) y se mezclaron con 25 ml de solución A. Posteriormente se centrifugó (3000 rpm, 5

minutos) y se descartó el sobrenadante. Después se agregaron 25 ml de la solución B y se centrifugó a las mismas condiciones descritas anteriormente. La CIC se determinó por titulación del sobrenadante con EDTA y se expresó como miliequivalentes por cada 100g de suelo.

### **5.2.5 Determinación de Carbono Orgánico Total (COT)**

Se tomaron 50 mg de muestra secada previamente a temperatura ambiente y se analizó según lo propuesto por Qi *et al.* (2016). Se utilizó el método de oxidación con una solución de ácido fosfórico-ácido sulfúrico-agua ( $H_3PO_4:H_2SO_4:H_2O$ ) en una relación 2.5:2.5:5.0 y una solución de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) 0.4 N. Se llevó a baño María por 30 minutos a 121°C, y posteriormente se tituló con una solución de sulfato ferroso amoniacal ( $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ ), empleando fenantrolina como indicador.

### **5.2.6 Determinación de fósforo**

Se tomaron 10 g de muestra y se mezclaron con 100 ml de una solución de bicarbonato de sodio  $NaHCO_3$  0.5 M y se llevó a agitación por 20 minutos. Posteriormente, la mezcla se filtró a través de un filtro de papel. De la muestra se tomó 1 ml y se mezcló con una solución preparada con molibdato de amonio ( $(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$ ) (20 g en 500 ml de agua desionizada), en presencia de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 5 N y tartrato de amonio ( $C_8H_4K_2O_{12}Sb_2\cdot 3H_2O$ ), usando ácido ascórbico (1%p/v) como agente reductor. (Olsen *et al.* 1954, citado por Chevremont *et al.* 2013). El contenido de fósforo se determinó espectrofotométricamente (Cintra 10e, USA) a una longitud de onda de 880 nm empleando una curva tipo (Anexo 2).

### **5.2.7 Determinación de nitrógeno total**

El contenido de nitrógeno se determinó por el método de Kjeldahl según lo reportado por Chevremont *et al.* (2013). Se pesó 0.5 g de muestra previamente seca y 0.5g de sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) y se llevó a un matraz de balón de digestión con 5 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado en presencia de una mezcla de dióxido de selenio como catalizador. Después de 2.5 horas de digestión, se dejó enfriar y se agregaron 500 ml de agua destilada y 40 ml de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 50% para llevar a cabo la destilación. El hidróxido de amonio obtenido se

atrapó como borato de amonio en un matraz con una solución de ácido bórico al 4% en presencia de un indicador (0.1 g/100 ml de verde de bromocresol y 0.1 g/100ml de rojo de metilo en 95% de etanol). La cantidad de nitrógeno se determinó por titulación con una solución de HCl 0.01N.

### **5.2.8 Determinación de nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ )**

Según López *et al.* (2010) el nitrógeno se encuentra comúnmente en el suelo en forma de nitrito, nitrato y amonio. La determinación de estos compuestos en el suelo ha tenido gran importancia en el monitoreo y control de la polución de los mismos. De Aquino *et al.* (2005) indican que la mineralización de nitrógeno es definida como la transformación de nitrógeno orgánico en formas inorgánicas tales como amonios y nitratos, a partir de las cuales los organismos heterótrofos las utilizan como fuente de energía.

La medición de nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) se llevó a cabo con modificaciones a la metodología propuesta por Ai *et al.* (2012). Se pesaron 20 g de muestra y se llevaron a un proceso de extracción con una solución de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.5 M, por un periodo de 30 minutos.

Para  $\text{NH}_4^+$  se tomaron 3 ml del volumen extraído previamente con  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.5 M y se mezclaron con 1 ml de solución de EDTA disódico. Después se adicionaron 4 ml de nitroprusiato de sodio como catalizador, y 2 ml de solución buffer de hipoclorito. La mezcla se llevó a incubación en baño maría por 30 minutos a 40°C, se dejó enfriar y se leyó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 667 nm, comparando con una curva tipo (Anexo 2).

Para  $\text{NO}_3^-$  se tomaron 20 ml del extracto previamente obtenido y se llevaron a desecación a 100°C en horno de convección (Blue M, USA). Posteriormente, la materia seca se mezcló con 2 ml de solución de ácido 2-4 fenildisulfónico y se agregaron 10 ml de solución de KOH 12 N para obtener el máximo desarrollo de color. Después se aforó a 50 ml con agua destilada y se dejó en reposo por 24 horas. La medición se llevó a cabo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm comparando con una curva tipo (Anexo 2).

### **5.3 Obtención y caracterización de los componentes del disolvente (thinner)**

Se utilizó disolvente bajo la marca comercial Comex® obtenido en un establecimiento de venta de pinturas de la Ciudad de México.

La caracterización se realizó por cromatografía de gases (PerkinElmer, USA) empleando un detector de ionización de flama (FID). Se utilizó una columna Elite – 5 de 30 metros de longitud, 0.32 mm de diámetro y 0,25 µm de grosor de película. La temperatura del inyector y del detector fueron de 150 y 200°C respectivamente. La temperatura del horno se mantuvo constante a 70°C y el tiempo de la corrida fue de 7 minutos de acuerdo a lo establecido por Kelly & Harder (2003). El volumen de inyección fue de 0.5 µL. Se utilizó nitrógeno como gas de transporte a un flujo de 1 ml min<sup>-1</sup>. El flujo de hidrógeno y aire fueron de 35 y 350 ml min<sup>-1</sup> respectivamente. La identificación y cuantificación de compuestos se realizó empleando la técnica del análisis externo con soluciones patrón con concentraciones definidas para cada compuesto (Anexo 3 y 4) y mediante la comparación de tiempos de retención (Dongqiang *et al.* 2007).

### **5.4 Prueba de toxicidad en lombriz de tierra**

#### **5.4.1 Obtención de lombrices**

Se utilizó la lombriz de tierra roja californiana (*Eisenia foetida*), la cual se obtuvo de un lombricultivo ubicado en el invernadero de la Unidad Interdisciplinaria de Biotecnología – UPIBI. Se utilizaron lombrices en estado adulto, sexualmente maduras y con el clitelio desarrollado según lo establecido por Espinoza-Navarro *et al.* (2013).

#### **5.4.2 Determinación de concentración letal media (CL50) y efecto morfológico del thinner sobre *Eisenia foetida***

Para determinar la concentración de thinner que puede soportar la lombriz de tierra, se llevó a cabo un experimento de acuerdo a lo establecido por Shin & Kim (2001) y An & Lee (2008). Se tomaron 200 g de vermicomposta tamizada previamente proveniente de la pila de compostaje del invernadero y se depositaron en un



recipiente plástico de 1000 ml. Así mismo, se adicionaron 5 g de residuo de zanahoria como fuente de alimento para la lombriz, y 5 g de pasto seco para facilitar el proceso de aireación. Posteriormente se agregó agua para ajustar el porcentaje de humedad al 60%. En cada recipiente, se pesaron y agregaron 5 lombrices adultas ( $300 \pm 50$  mg,  $3 \pm 1$  cm) obtenidas de la misma pila de compostaje. Cada recipiente se cubrió con un trozo de malla mosquitera ( $<2$  mm) y se dejó en reposo por un periodo de 24 horas con el fin de que las lombrices se adaptarían a las nuevas condiciones. Pasado este tiempo, a cada recipiente se agregaron 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 ml de thinner respectivamente, se cubrieron nuevamente y se dejaron en el invernadero. Este proceso se hizo por triplicado. El muestreo se llevó a cabo a las 24 horas, en donde se monitoreo el estado de las lombrices (respuesta al estímulo, color, individuos muertos).

Con la respuesta obtenida en este tratamiento, se llevó a cabo un segundo experimento, en el cuál se seleccionó el rango en el cuál se observaron los mayores efectos y número de individuos muertos por exposición al thinner. El proceso se realizó de la misma manera como se describió previamente, utilizando un total de 11 lombrices por recipiente. A cada recipiente se agregó 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 y 2.0 ml de thinner respectivamente, llevándolo a cabo por triplicado. El muestreo se hizo nuevamente a las 24 h, verificando el estado de las lombrices. Con los datos obtenidos, se elaboró la curva dosis – respuesta de las diferentes concentraciones y se calculó el valor de la concentración letal (CL 50) a las 24 horas, a través del método de unidades probabilísticas Probit, según lo reportado por Fernández *et al.* (2006).

## **5.5 Proceso de incubación en microcosmos**

La incubación en microcosmos es el proceso que permite determinar las tasas de mineralización, que se relacionan de manera importante con la dinámica del carbono y nitrógeno orgánico en el suelo (Wei *et al.* 2016).

### 5.5.1 Preincubación

Previamente, se llevó a cabo un proceso de preincubación de acuerdo a lo establecido por Moreno *et al.* (2009) y Tejada *et al.* (2016). Las muestras de suelo y vermicomposta se ajustaron al 40% de su capacidad de retención de agua y se preincubaron por 7 días a temperatura ambiente con el fin de activar las poblaciones microbianas presentes. Según Lefèvre *et al.* (2014), el proceso de pre incubación se debe realizar en suelos humedecidos, ya que la actividad microbiana de los suelos se reestablece rápidamente una vez se lleva a cabo un proceso de re-humedecimiento, incluso si los suelos se han almacenado por mucho tiempo.

### 5.5.2 Incubación

Posteriormente, el proceso de incubación se llevó a cabo según las metodologías propuestas por Qi *et al.* (2016), Wei *et al.* (2016) y Li *et al.* (2009). Se evaluaron cuatro tratamientos por cada tipo de suelo y vermicomposta, cada uno por triplicado. Los tratamientos se describen en la (Tabla 6).

**Tabla 6.** Tratamientos para el proceso de incubación en microcosmos.

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>
<b>B</b>	Suelo de Bosque (Control)
<b>Be</b>	Suelo de Bosque estéril + adición de thinner (factor abiótico)
<b>BT</b>	Suelo de Bosque + adición de thinner
<b>BTZ</b>	Suelo de Bosque + Adición de thinner + Residuos de zanahoria
<b>S</b>	Suelo Salino (Control)
<b>Se</b>	Suelo Salino estéril + Adición de thinner (factor abiótico)
<b>ST</b>	Suelo salino + adición de thinner
<b>STZ</b>	Suelo Salino + Adición de thinner + Residuos de zanahoria
<b>V</b>	Vermicomposta (Control)

<b>Ve</b>	Vermicomposta estéril + adición de thinner (factor abiótico)
<b>VT</b>	Vermicomposta + adición de thinner
<b>VTZ</b>	Vermicomposta + adición de thinner + Residuos de zanahoria

Para cada tratamiento se utilizaron 20 g de muestra de suelo o vermicomposta y se colocaron en frascos de vidrio de 70 ml. Para los tratamientos con adición de thinner, se adicionaron 160 µL de thinner (correspondiente al valor calculado de CL50). Para los tratamientos con adición de materia orgánica, se utilizaron residuos de zanahoria obtenida de un local comercial de venta de jugos. En cada frasco se agregaron 5 g y se mezcló lo más homogéneo posible. Se seleccionó residuo de zanahoria debido a que en trabajos previos llevados a cabo en el laboratorio, se encontró que este tipo de residuos era preferido por las lombrices y además de estar disponible durante todo el año (Reyes, 2014)

Los frascos de vidrio se dejaron destapados y se colocaron en el interior de recipientes plásticos de 1000 ml de boca ancha, los cuales se cerraron y se llevaron a incubación por 56 días a temperatura ambiente en condiciones de invernadero. El recipiente plástico se abrió en intervalos regulares (semanalmente) con el fin de permitir un intercambio gaseoso y evitar la anaerobiosis, además de poder ajustar gravimétricamente la capacidad de retención de agua de las muestras en el valor establecido previamente. Dentro de los recipientes, se dispuso de un vial con 10 ml de una solución de NaOH 1 M para atrapar el CO<sub>2</sub> generado (Vásquez-Murrieta *et al.* 2006), y sobre la base del recipiente se colocaron 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada para evitar la desecación de las muestras (Fernández-Luqueño *et al.* 2013). De igual manera, se realizó el mismo procedimiento con frascos de vidrio sin muestra (control) y adicionalmente, se dispuso de un recipiente con 10 g de muestra en las condiciones previamente establecidas, para el monitoreo de pH y temperatura.

Se tomaron muestras al azar a los 0, 7, 14, 28 y 56 días de iniciado el proceso, y se llevó a cabo la determinación de humedad y pH (como se describió previamente), concentración de CO<sub>2</sub> producido, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>+</sup> y concentración de thinner.

### **5.5.3 Determinación de CO<sub>2</sub> (mineralización de C)**

El CO<sub>2</sub> se determinó llevando a cabo una titulación de la solución de NaOH 1 M, empleando un titulador automático (Methrom – Titrino Plus 848, Suiza). Se utilizó una solución de HCl 0.1 y 0.3 N.

### **5.5.4 Determinación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mineralización de N)**

La medición de nitrógeno amoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) se llevó a cabo según la metodología propuesta por Ai *et al.* (2012). Para la extracción se tomaron 8 g de muestra y se mezclaron con 40 ml de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M y se llevaron a agitación por un periodo de 30 minutos. Posteriormente se centrifugó y se guardó en congelación hasta su análisis. La determinación se llevó a cabo según lo propuesto por Christou *et al.* (2005), empleando un autoanalizador (Skalar – San Plus, Holanda).

### **5.5.5 Determinación de concentración de disolvente y porcentaje de extracción**

La extracción de thinner presente en las muestras se determinó según lo propuesto por Delgado-Balbuena *et al.* (2013). Se tomaron 5 g de muestra y se agregaron 3 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y 10 ml de acetona y se agitó por un minuto en vórtex a la máxima revolución. Después se llevó a sonicación (BRANSON 2210, USA) por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se llevó a un proceso de filtración (0.22 µm). El filtrado se utilizó para la determinación de concentración de thinner presente a través de cromatografía de gases como se describió anteriormente.

## 5.6 Dinámicas de mineralización en vermicomposta y efecto de la adición de materia orgánica

Después de analizar los datos obtenidos en las dinámicas de mineralización, se decidió evaluar el efecto del thinner y la adición de materia orgánica en vermicomposta. Se utilizó vermicomposta obtenida como se describió anteriormente, con el fin de evaluar el efecto del thinner y la materia orgánica en las dinámicas de mineralización de carbono,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ , así como en la concentración de los componentes del thinner y pH. De igual manera, los experimentos se llevaron a cabo a nivel de microcosmos y las determinaciones se llevaron a cabo como se indicó anteriormente. El tiempo de las dinámicas fue de 28 días, con tiempos de muestreo a los 0, 7, 14 y 28 días. Adicionalmente, se evaluó el comportamiento de la dinámica en frascos cerrados, en donde se utilizaron frascos de vidrio de 100 ml y se cerraron herméticamente con septa de caucho y tapa de aluminio. En estos tratamientos sólo se determinó el comportamiento de los compuestos del thinner. Los tratamientos planteados se presentan en la tabla 7. De los tratamientos en condiciones aerobias, se determinó además la concentración de mesófilos aerobios a través de recuento microbiológico en placa, y la concentración, aislamiento e identificación de microorganismos asociados al proceso de nitrificación, tales como amonificantes ( $\text{R} - \text{NH}_2$  a  $\text{NH}_4^+$ ), nitritantes ( $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_2^-$ ) y nitratantes ( $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$ ).

**Tabla 7.** Tratamientos propuestos para evaluar mineralización en vermicomposta.

<b>Tratamiento</b>	<b>Identificación (Condiciones aerobias)</b>	<b>Identificación (Condiciones anaerobias)</b>
V (Control)	1	A
V + T	2	B
Ve + RZe	3	C
V + RZe	4	D
Ve + RZ	5	E

V + RZ	6	F
Ve + RZe + T	7	G
V + RZe + T	8	H
Ve + RZ + T	9	I
V + RZ + T	10	J

V: vermicomposta; Ve: vermicomposta estéril; RZ: residuo de zanahoria; RZe: residuo de zanahoria estéril; T: thinner.

### 5.6.1 Conteo microbiológico total

El conteo de los microorganismos en vermicomposta se realizó según lo propuesto por Crecchio *et al.* (2004). Se tomaron 5 g de vermicomposta y se diluyeron en 45 ml de solución salina (NaCl) estéril al 0.85%. Posteriormente se hicieron diluciones seriadas en tubos con 9 ml de NaCl estéril. Después se tomó 1 ml de cada dilución y se depositó en placas estériles, a las cuales se les agregó agar nutritivo a una temperatura de 45°C. Las placas se llevaron a incubación a 28°C por 48 horas y posteriormente se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC), teniendo en cuenta las placas que se encontraban en un rango de 25 a 250 UFC (SSA,1994).

### 5.6.2 Determinación de concentración de microorganismos amonificantes (R – NH<sub>2</sub> a NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)

La concentración de microorganismos amonificantes se determinó empleando la técnica del número más probable (NMP). Se utilizó un medio selectivo (Anexo 5) y se esterilizó usando membrana (0.45 µm). Se distribuyó en tubos estériles adicionando 4.5 ml de medio estéril a cada uno. Posteriormente, se inoculó con 0.5 ml de la dilución correspondiente (por triplicado) y se llevó a incubación a 28°C por 7 días. Los tubos positivos para amonificantes (Anexo 7) correspondieron a aquellos que cambiaron el color del medio de amarillo a rosa intenso (Hirooka *et al.* 2009), y el conteo se determinó empleando la tabla de Mc Graddy (Anexo 6).

### 5.6.3 Determinación de concentración de microorganismos nitritantes (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)

La concentración de microorganismos nitritantes se determinó empleando la técnica del número más probable (NMP). Se utilizó un medio selectivo (Anexo 5) y se

distribuyó en tubos estériles adicionando 4.5 ml de medio estéril a cada uno. Posteriormente se inoculó con 0.5 ml de la dilución correspondiente y se llevó a incubación a 28°C por 15 días. Después a cada tubo se le agregó 5 gotas de reactivo de Griess I (ácido sulfanílico) y 5 gotas de reactivo de Griess II (alfa- naftilamina). Los tubos positivos para nitritantes correspondieron a aquellos que desarrollaron un color rosa o rojo intenso (Anexo 7) y el conteo se determinó empleando la tabla de Mc Graddy (Anexo 6).

#### **5.6.4 Determinación de concentración de microorganismos nitratantes ( $\text{NO}_2^-$ a $\text{NO}_3^-$ )**

La concentración de microorganismos nitratantes se determinó empleando la técnica del número más probable (NMP). Se utilizó un medio selectivo (Anexo 5) y se distribuyó en tubos estériles adicionando 4.5 ml de medio estéril a cada uno. Posteriormente se inoculó con 0.5 ml de la dilución correspondiente y se llevó a incubación a 28°C por 15 días. Después a cada tubo se agregó 5 gotas de reactivo de Griess I y 5 gotas de reactivo de Griess II (Anexo 5). Los tubos positivos para nitritantes correspondieron a aquellos que no presentaron cambios en la coloración (Anexo 7) y el conteo se determinó empleando la tabla de Mc Graddy (Anexo 6).

#### **5.6.5 Aislamiento de microorganismos asociados al proceso de nitrificación**

Para llevar a cabo el aislamiento, se prepararon placas de agar de cada medio selectivo descrito anteriormente, adicionando 15 g/l de agar bacteriológico. La inoculación se llevó a cabo empleando la técnica de agotamiento por estría cruzada y después se llevó a incubación. Posteriormente, se verificó el crecimiento en las placas y se tomó una asada de las colonias que se observaron aisladas completamente y con crecimiento definido y se inoculó en agar TSA. De igual manera, se tomó una asada para llevar a cabo una prueba de tinción y determinar morfología y pureza del aislado. De cada colonia se registró además apariencia, coloración y características particulares necesarias para su identificación.

## **5.7 Identificación molecular**

### **5.7.1 Extracción de DNA bacteriano**

La extracción de DNA se realizó de acuerdo con la técnica establecida por Hoffman & Winston, (1987) y modificaciones propuestas por Crecchio *et al.* (2004), a partir de un cultivo bacteriano previamente cultivado en medio TSB. Se tomó 1 ml de caldo de cultivo y se centrifugó (10000 rpm, 5 min) hasta obtener la mayor cantidad de pellet bacteriano. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 500 µL de agua destilada estéril y 500 µL de una solución Winston (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) y se almacenó durante 24 h a 4°C para facilitar la lisis celular. Posteriormente, se adicionaron 200 µL de una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) junto con perlas de vidrio, y se llevó a agitación en un vórtex durante 4 min. Después se llevó a incubación en baño metabólico a 65°C durante 30 min. Posteriormente, se pasó por baño de hielo para detener la reacción, se adicionaron 200 µL de solución TE (Tris 10mM-EDTA 1mM) y se centrifugó (13000 rpm, 15 min). El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo (libre de impurezas) y se adicionó 200 µL de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por inversión. La muestra se centrifugó (13000 rpm, 15 min), el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se le adicionaron 1000 µL de isopropanol frío para favorecer la precipitación del DNA. Se centrifugó nuevamente (13000 rpm, 10 min), se descartó el sobrenadante por decantación y se adicionaron 1000 µL de etanol al 70% frío. Se centrifugó (13000 rpm, 10 min) y se decantó el etanol. Posteriormente, la muestra se dejó evaporar para retirar el total de etanol y se resuspendió en 50 µL de agua inyectable.

Para visualizar la calidad del DNA se realizó una electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1% y se reveló con SyberGreen para comprobar la presencia de DNA. La visualización del gel se realizó con un fotodocumentador.

#### **5.7.1.1 Amplificación del fragmento 16S del gen rrs**

Se amplificó un fragmento de aproximadamente 1500 pb del fragmento 16S del gen rrs de bacterias empleando iniciadores universales 27F (AGAGTTTG ATCMTGGCTCAG) y 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) (Das *et al.* 2016). La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 25 µL, utilizando 2.5 µL de



buffer con  $MgCl_2$  20 mM (Thermo Scientific), 1  $\mu L$  de un mix de dNTP's, 2  $\mu L$  del iniciador 27 F y 2  $\mu L$  del iniciador 1492 R, 0.25  $\mu L$  de Taq polimerasa (Thermo Scientific), adicionando 1  $\mu L$  de DNA molde con una concentración mínima de 50  $ng \mu L^{-1}$ . Las condiciones de amplificación para la región se establecieron de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 min; 58°C por 1 min, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 5 min. Para corroborar la presencia del amplicón esperado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó como se describió anteriormente.

Los productos de la PCR se purificaron empleando el kit GeneJet PCR (Thermo Scientific). Todos los productos de la PCR purificados se secuenciaron, utilizando un secuenciador de DNA 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems®) en Macrogen, Seoul, República de Korea.

#### **5.7.1.2 Análisis de las secuencias del gen 16S rRNA**

Las secuencias del fragmento 16S del gen *rrs* se compararon en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y se recuperaron las secuencias de referencias en la plataforma EzTaxon (Chun *et al.* 2007).

## 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Caracterización fisicoquímica de los suelos y vermicomposta

De acuerdo a Joimel *et al.* (2016), el nivel de fertilidad y de contaminación se consideran generalmente como aspectos importantes de la calidad del suelo, de tal manera que la medición de algunos elementos como el carbono, nitrógeno y fósforo, además de la medición del pH, son parámetros que permiten evaluar su viabilidad para suplir elementos minerales que permitan el crecimiento y el desarrollo de organismos como las plantas.

La vermicomposta presentó las mayores concentraciones de carbono orgánico total (COT), nitrógeno total (N), nitratos y fósforo soluble, además de tener los niveles más altos en conductividad y capacidad de intercambio catiónico (Tabla 8). Por su parte, el suelo salino presentó los niveles más bajos en carbono orgánico y nitrógeno total, y en las formas nitrogenadas inorgánicas (amonio y nitratos). El suelo de bosque presentó la mayor concentración en materia orgánica y el nivel más alto en la relación carbono nitrógeno, además de los mejores niveles en concentración de amonio y capacidad de retención de agua.

**Tabla 8.** Caracterización fisicoquímica de los suelos y vermicomposta.

	<b>Suelo de Bosque</b>	<b>Suelo Salino-Alcalino</b>	<b>Vermicomposta</b>
<b>Humedad (%)</b>	25.1 ± 1.13	17.3 ± 0.72	41.4 ± 1.02
<b>pH</b>	5.16 ± 0.175 Moderadamente ácido <sup>1</sup>	9.70 ± 0.042 Fuertemente alcalino (> 8.5)	7.56 ± 0.087 En el rango establecido (5.5 – 8.5)
<b>Conductividad (dS/m)</b>	0.15 ± 0.00 Efectos despreciables (< 1.0)	4.05 ± 0.064 Suelo Salino (4.1 – 8.0)	7.56 ± 0.047 Fuera del rango (≤4)
<b>CIC (meq/100g)</b>	73.76 ± 2.42	46.06 ± 6.01	99.31 ± 3.38
<b>CRA (g/kg)</b>	1402.70 ± 6.75	900.64 ± 1,75	1288.0 ± 5.29
<b>COT (g/kg)</b>	106..71 ± 0.45	24.42 ± 0.18	133.51 ± 0.41
<b>Materia orgánica (g/kg)</b>	183..98 ± 0.78 Muy alta (>16.1)	42.11 ± 0.31 Baja (4.1 – 6-0)	144.99 ± 0.70 20 – 50%
<b>Nitrógeno Total (g/kg)</b>	6.10 ± 0.21 Medio (0.3 – 0.8)	1.91 ± 0.09 Bajo (< 0.3)	16.46 ± 0.27 En el rango establecido (1 – 4)
<b>Relación C:N</b>	17.47 ± 0.37	12.78 ± 1.16	8.10 ± 0.12
<b>Amonio (mg/kg)</b>	21.71 ± 0.46	14.59 ± 1.02	16.11 ± 0.31
<b>Nitratos (mg/kg)</b>	23.45 ± 1.24	8.04 ± 0.31	1417.83 ± 43.71
<b>Fósforo soluble (mg/kg)</b>	50.47 ± 2.30 Alto (>11)	60.76 ± 3.00 Alto (>11)	342.63 ± 8.92 ≤20

<sup>1</sup> NOM – 021 – SEMARNAT – 2000

<sup>2</sup> NMX – FF – 109 – SCFI – 2008

Estos resultados se compararon con los parámetros establecidos por la Norma Oficial Mexicana 021 del 2000 (SEMARNAT, 2002) y la Norma 109 de la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial del 2007 (SCFI, 2007) (Tabla 9).

**Tabla 9.** Comparación de resultados fisicoquímicos con la normatividad mexicana vigente.

	<b>NOM – 021 – SEMARNAT - 2000</b>		<b>NMX – FF – 109 – SCFI – 2008</b>
	<b>Suelo de Bosque</b>	<b>Suelo Salino - Alcalino</b>	<b>Vermicomposta</b>
<b>pH</b>		Fuertemente alcalino (> 8.5)	En el rango establecido (5.5 – 8.5)
<b>Conductividad electrolítica (dS/m)</b>	Efectos despreciables (< 1.0)	Suelo Salino (4.1 – 8.0)	Fuera del rango (≤4)
<b>Materia orgánica (g/kg)</b>	Muy alta (>16.1)	Baja (4.1 – 6.0)	20 – 50%
<b>Nitrógeno Total (%)</b>	Medio (0.3 – 0.8)	Bajo (< 0.3)	En el rango establecido (1 – 4)
<b>Formas mineralizadas de N (mg/kg)</b>	Alto (40 – 60)	Medio (20 – 40)	–
<b>Fósforo soluble (mg/kg)</b>	Alto (>11)	Alto (>11)	–
<b>Relación C/N</b>	-	-	≤20

Los resultados obtenidos en el análisis fisicoquímico de suelo de bosque fueron similares a los encontrados por Stevenson *et al.* (2016), quienes reportaron valores de 5.60 para pH, 117 g/kg de COT, 8.2 g/kg de N y una relación C:N de 15. Por otra parte, Beltrán-Hernández *et al.* (1999) reportaron valores similares obtenidos a partir de un suelo obtenido del exlago de Texcoco, con pH de 9.7, COT 26.8 g/kg y N 1.8 g/kg. Así mismo, Castro-Silva *et al.* (2013) mostraron valores similares de pH para suelo salino–alcalino (9.0), pero por el contrario encontraron concentraciones diferentes de COT (12.9 g/kg). Como se observó en los resultados, el contenido de COT fue más bajo para el suelo salino – alcalino en comparación con el suelo de bosque y la vermicomposta. De acuerdo a Muhammad *et al.* (2008), los niveles de COT disminuyen cuando el pH se incrementa, posiblemente por la labilización de la materia orgánica, además de que el aporte de carbono por la presencia de vegetación se ve altamente reducido por la alcalinidad de este tipo de suelos. Lo anterior guarda relación con lo reportado por Beltrán-Hernández *et al.* (2007) y Dendooven *et al.* (2010), quienes indicaron que el suelo salino – alcalino del ex lago de Texcoco está cubierto por una limitada vegetación halofílica, por lo cual el contenido de COT y de materia orgánica se encuentra altamente reducido.

Con respecto a la vermicomposta, Jadia & Fulekar (2008) reportaron valores de 135.0 g/kg y 13.3 g/kg para COT y N respectivamente, dando como resultado una relación C:N de 10:15. En los resultados obtenidos en este estudio se encontró que la vermicomposta presenta el valor más bajo en la relación C:N en comparación con el suelo de bosque y el suelo salino-alcalino. De acuerdo a lo mencionado por Pathma & Sakthivel (2012), durante el proceso de vermicomposteo se lleva a cabo la biooxidación de la materia orgánica, en donde se obtienen formas mineralizadas de CO<sub>2</sub> y nitrógeno, los cuales producen una relación C:N más baja. Según Yadav & Garg (2011), la relación C:N es uno de los factores más importantes en el proceso de vermicomposteo, ya que un valor muy alto o muy bajo puede provocar bajas tasas de degradación de los residuos orgánicos. Así mismo, estos autores indican que las plantas asimilan mejor el nitrógeno mineral en un rango de C:N de 25:1 a 20:1; sin embargo, esta relación se ve reducida fuertemente en suelos arenosos por

la intervención de las lombrices de tierra. Lo anterior permite ilustrar por qué se obtuvieron los valores más bajos de C:N en la vermicomposta.

El suelo de bosque presentó una concentración de COT más baja que la encontrada en la vermicomposta; sin embargo, la concentración de materia orgánica fue mayor en el suelo de bosque. Lo anterior obedece a que los suelos de bosque se caracterizan por tener altos contenidos de materia orgánica, proveniente de fuentes nativas tales como partes de vegetación (hojas, flores, frutos, ramas) los cuales se encuentran en diferentes estados de descomposición, así como los cuerpos sin vida de animales e insectos que forman parte de su ecosistema (Osman, 2014). De acuerdo a Azlan *et al.* (2012), los niveles de actividad biológica dependen de una cantidad significativa de materia orgánica en el suelo. Lo anterior estaría relacionado con la concentración más baja de COT encontrada en el suelo de bosque, ya que la cantidad de materia orgánica presente en el suelo de bosque supone la existencia de un mayor número y variedad de microorganismos en el suelo, los cuales utilizan altas cantidades de carbono como fuente de energía. Azlan *et al.* (2012) también reportaron que las concentraciones de COT y materia orgánica dependen de las características texturales del suelo, encontrando en su estudio concentraciones más bajas en suelos arenosos que en suelos franco-arenosos. Lo anterior se debe a que la presencia de grandes cantidades de arcilla protege a la materia orgánica, creando una barrera física que la protege de la descomposición por parte de los microorganismos. Estos resultados se encuentran relacionados con los encontrados en este estudio con respecto a la materia orgánica de los suelos analizados y sus características texturales presentadas.

Dendooven *et al.* (2010), mencionan que en el suelo salino – alcalino del exlago de Texcoco se han reportado valores de conductividad entre 1.2 hasta 200 dS/m. Castro-Silva *et al.* (2013) reportaron valores diferentes de conductividad eléctrica (56 dS/m) y capacidad de retención de agua (50.4 g/100g) en comparación con los mostrados en este estudio. El suelo salino – alcalino utilizado en este estudio, es una mezcla de varias muestras obtenidas de diferentes puntos de muestreo ubicados en esta zona, por lo cual es posible que se hayan mezclado muestras de suelo con conductividades eléctricas diferentes y haya dado como resultado un

suelo con una conductividad comparativamente baja con lo reportado por otros autores. Según Muhammad *et al.* (2008), una de las razones para la variabilidad en la salinidad de este tipo de suelos se debe a la micro – topografía, ya que la presencia de pequeños desniveles puede causar grandes diferencias en la acumulación de sales. Así mismo, Dendooven *et al.* (2010) también indican que las características de este tipo de suelos se deben a que se encuentran en una gran área de origen lacustre expuesta a la desertificación, la cual se encuentra cubierta de una vegetación halófila y cuya superficie posee grandes capas de costras de sal, por lo que gran parte del lecho del lago ha estado expuesto a la erosión eólica.

La vermicomposta presentó valores de pH cercanos a la neutralidad (7.56) comparado con el suelo de bosque (5.16) y suelo salino (9.70). En las vermicompostas el valor de pH tiende hacia la neutralidad debido a la mineralización del nitrógeno y el fósforo en nitratos, amonio y ortofosfatos (Yadav & Garg, 2011). Según Kumar *et al.* (2013), la descomposición de la materia orgánica resulta en la formación de ácidos húmicos y formas mineralizadas de nitrógeno ( $\text{NH}_4^+$ ), los cuales tienen un efecto opuesto en el valor de pH, ya que los ácidos húmicos reducen el pH, mientras que los iones de amonio lo incrementan, resultando en un valor de pH cercano a la neutralidad.

Por otra parte, se encontró que en la vermicomposta se presentaron los niveles más altos de nitrógeno mineralizado en forma de nitratos. De acuerdo con Atiyeh *et al.* (2000), las lombrices aceleran el proceso de mineralización e incrementan las tasas de conversión de nitrógeno en amonio y sobretodo en nitratos, la cuál es la forma de nitrógeno más estable y biodisponible para las plantas. En comparación con el suelo salino – alcalino, Beltrán-Hernández *et al.* (2007) mencionan que las altas concentraciones de sales inhiben el proceso de nitrificación, lo cual estaría relacionado con los bajos niveles encontrados de nitratos, con respecto al suelo de bosque y la vermicomposta.

## 6.2 Análisis de la composición del thinner

Los resultados obtenidos en los cromatogramas mostraron que el thinner tiene en su composición sustancias tales como tolueno, benceno, metanol, mezcla de hexanos, y 2-butoxietanol, siendo el tolueno el componente que se encuentra en mayor concentración (Tabla 10). Lo anterior concuerda con lo indicado por Baydas *et al.* (2005), quienes afirman que el thinner comercial contiene en su composición sustancias como tolueno, benceno y xileno entre otros, siendo el tolueno el principal componente con un 60–70% de su composición. Por su parte, Shina & Zadi (2008) encontraron además sustancias tales como naftaleno, isómeros de etilbenceno y xilenos, siendo estos últimos los componentes que se encontraban en mayor concentración. En el thinner analizado en este estudio no se encontraron sustancias tales como etilbenceno y xilenos. En la tabla 11 se presentan los demás componentes encontrados en el thinner y sus características.

**Tabla 10.** Composición del thinnner utilizado.

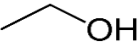
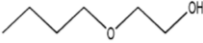

Compuesto	Concentración (mg/ml)	Tiempo de retención (min)
Metanol	305 ± 3,93	2.19
Tolueno	263 ± 6.21	3.47
2 – Butoxietanol	48 ± 1.88	5,83
Hexanos	70 ± 6.01	2.40, 2.44, 2.48, 2.59
Benceno	1.40 ± 0.07	2.75

El 2–butoxietanol es un compuesto orgánico volátil de la familia del glicol – éter, utilizado comúnmente en la industria como solvente basado en su alta solubilidad en agua, su estabilidad química y su bajo costo (Pérez *et al.* 2016). Según Dartsch *et al.* (1999), se han reportado casos de intoxicación humana por el 2-Butoxietanol, causando toxicidades severas que incluyen estado de coma, acidosis metabólica, hipokalemia y hemoglobinemia, causados principalmente por los productos generados de su oxidación, tales como el butoxiacetaldehido y el ácido butoxiacético. Con respecto a la peligrosidad de este tipo de compuestos en el ambiente no se dispone de referencias; sin embargo, de acuerdo con estudios



mostrados por el CICAD (Concise International Chemical Assessment Document), si el 2-Butoxietanol se emite en el aire, cerca del 66% se quedaría en el aire, 20% migraría hacia el agua y 14% se encontraría en el suelo. Por su parte, si el 2-butoxietanol se dispusiera en el suelo (sin incluir el aire), cerca del 75% permanecería en el suelo y el 25% permanecería en el agua de los microporos (WHO, 2005).

**Tabla 11.** Características de los otros compuestos encontrados en el thinner.

<b>Compuesto</b>	<b>Estructura</b>	<b>Punto de ebullición (°C)</b>	<b>Solubilidad</b>	<b>Constante de Henry (H) (atm.m<sup>3</sup>/mol)</b>	<b>Log K<sub>ow</sub></b>
Metanol		64	Soluble	$4.60 \times 10^{-6}$	- 0.77
2-Butoxietanol		171	Soluble	$2.08 \times 10^{-8}$	0.83
Hexanos		56 - 60	Insoluble	1.69	3.90

Por otra parte, el metanol es uno de los productos que se producen en mayor volumen, y se puede encontrar en muchos productos químicos, así como en combustibles (Laquaniello *et al.* 2017). De acuerdo a Bertau *et al.* (2014), el metanol es una sustancia de alta toxicidad para los seres humanos, y se puede absorber rápidamente a través del sistema gastrointestinal, por inhalación, o a través de la piel. Así mismo, estos autores indican que esta sustancia es miscible completamente en agua y que exhibe una alta movilidad en el ambiente, por lo cual se puede biodegradar fácilmente y no presenta casos de bioacumulación. Galbally & Kirstine (2002) presentaron un modelo matemático para la estimación del movimiento de metanol en el ambiente, y encontraron que el 75% del metanol emitido en el ambiente se remueve por la oxidación (reacciones hidroxílicas) en la atmosfera, y que el porcentaje restante se remueve por la deposición y subsecuente oxidación microbiana llevada a cabo en la biosfera terrestre.

El hexano es un solvente de amplia utilización en la industria de alimentos, fabricación de textiles, pinturas, pegantes y desengrasantes y dependiendo de su

utilización puede estar altamente purificado (análisis cromatográficos), o encontrarse como una mezcla de varios isómeros como el metilpentano y metilciclopentano (EPA, 2005). Yang *et al.* (2010) indican que, así como otros compuestos orgánicos volátiles, el hexano presenta toxicidad para los seres humanos y puede causar náuseas y enfermedades respiratorias, lo cual hace importante la remoción en ambientes que lo contengan.

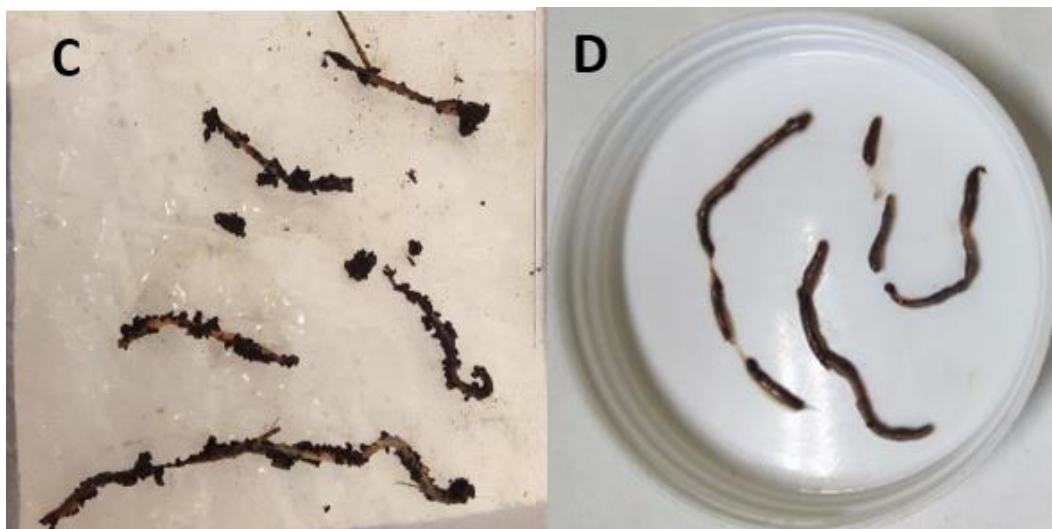
### **6.3 Efecto de la toxicidad del thinner en las lombrices de tierra**

Se encontró que la exposición de la lombriz de tierra *Eisenia foetida* al thinner provocó efectos tóxicos y nocivos y resultó letal para estos organismos. Los resultados para el cálculo de CL50 a las 24 horas evidenciaron que un volumen de 12.5 ml de thinner por kilogramo de vermicomposta (b.s.) provocó la mortalidad del 50% de la población de individuos estudiados. Según la composición del thinner utilizado, se encontraron sustancias tales como tolueno, benceno, metanol, hexanos y 2-butoxietanol, siendo el tolueno el componente mayoritario, por lo cual es muy probable que los resultados encontrados se deban al efecto tóxico de esta sustancia. Teniendo en cuenta lo anterior, el volumen de thinner asociado al valor de CL50 corresponde a una concentración de 3273 y 17 mg de tolueno y benceno por kg de vermicomposta, respectivamente. Estos resultados fueron diferentes a los reportados por Liu *et al.* (2010) quienes reportaron valores de LC50 de 583.6, 346.8 y 192.4 mg/kg de suelo a las 24 horas y 454.3, 167.1 y 127.2 mg/kg de suelo a las 48 horas, en un estudio de efectos ecotoxicológicos de tolueno, etilbenceno y xileno respectivamente, sobre la lombriz de tierra *Eisenia fetida*. Esegbe *et al.* (2013) reportaron un valor de CL50 de 1335 y 1896 mg de tolueno y benceno kg/suelo respectivamente a las 96 horas de exposición, empleando la lombriz de tierra *Eudrilus eugeniae*. Las diferencias pueden obedecer a que el tolueno y el benceno presentes en el thinner utilizado se encuentra en dilución con otros componentes, por lo cual se necesita de una mayor concentración para provocar un efecto letal.

Por otra parte, se observaron cambios y anomalías morfológicas en las lombrices (Figura 1). Entre los individuos muertos, se encontraron efectos

morfológicos tales como adelgazamiento, fraccionamiento, desintegración y generación de una película mucosa sobre la superficie de las lombrices. Así mismo, se encontró que los niveles de daño no dependen de la concentración de thinner utilizado, ya que los cambios morfológicos se observaron por igual en todos los volúmenes utilizados. Liu *et al.* (2010) mencionaron que el tolueno puede causar narcosis en ciertos niveles del tejido lipídico de las membranas de las lombrices, lo cual puede causar la fragmentación de los tejidos. Por su parte, Esegibe *et al.* (2013) reportaron que la exposición de la lombriz de tierra *Eudrilus eugeniae* a diferentes concentraciones de tolueno, xileno y el etilbenceno provocó alteraciones histopatológicas en el clitelio, en el cual las células internas presentaron diferentes niveles de ruptura, inflamación, degeneración celular, necrosis, y degeneración del endotelio. Wu *et al.* (2015) reportaron incluso que el benceno puro resultó ser mucho más tóxico que el biodiesel, inhibiendo el crecimiento en organismos estudiados tales como lombriz de tierra (*Eisenia foelidae*) y el pez cebra (*Danio rerio*). Con respecto al efecto tóxico de 2-butoxi-etanol en lombrices de tierra no se encontraron investigaciones al respecto; sin embargo, de acuerdo a lo reportado por Starek *et al.* (2008) y Lockley *et al.* (2004), la exposición de ratas de laboratorio a diferentes concentraciones de este tipo de sustancia (0.5, 0.75, and 1.25 mM kg<sup>-1</sup>) provocó efectos hematológicos, entre ellos la anemia hemolítica, la cual se encuentra relacionada con la reducción de glóbulos rojos y la concentración de hemoglobina.





(A: Normal; B: Decoloración; C: Adelgazamiento; D: Fraccionamiento).

**Figura 1.** Efectos de la exposición al thinner sobre la morfología de lombriz de tierra *Eisenia foetida*.

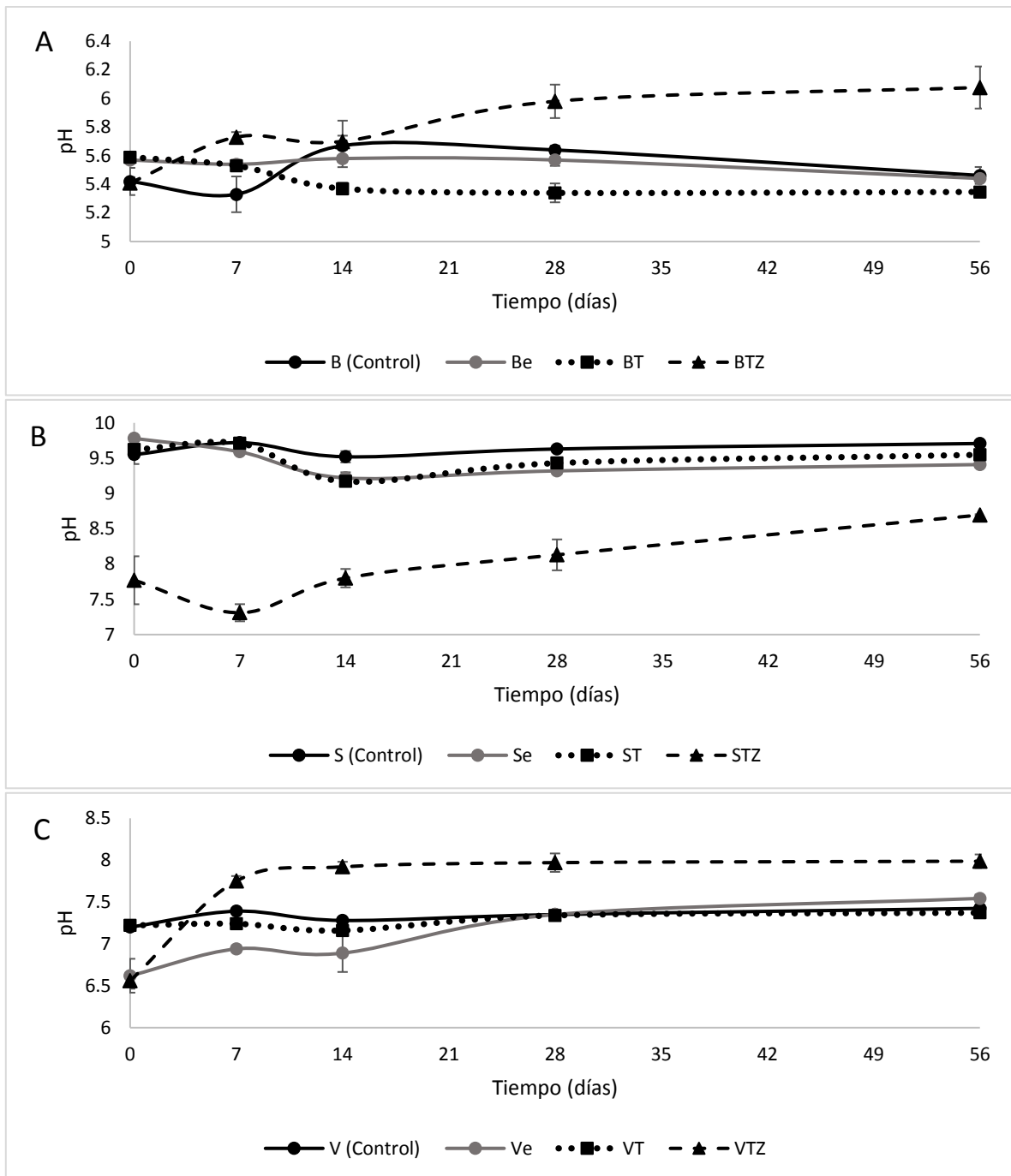
Lo anterior es acorde con lo reportado por An & Lee (2008), quienes investigaron el efecto y la toxicidad del tolueno y del metil ter-butil éter (MTBE) sobre la lombriz de tierra *Perionyx excavatus*. Encontraron que el tolueno es dos veces más tóxico que el MTBE, con valores de LC50 de 1305 y 1602 mg/kg de suelo en 24 y 48 horas respectivamente. De igual manera, estos autores reportaron la aparición de daños morfológicos tales como secreciones mucosas, adelgazamiento y fragmentación. Del estudio realizado por Liu *et al.* (2010), las sustancias tales como el tolueno, etilbenceno y xileno provocaron un efecto genotóxico sobre la lombriz de tierra *Eisenia foetida*, siendo el tolueno la sustancia que más provocó daño en el ADN de estos organismos. De igual manera, estos autores explican que la exposición a estos contaminantes provoca un efecto relacionado con el estrés oxidativo, en el cuál se generan especies reactivas de oxígeno tales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radicales de oxígeno ( $O_2^-$ ) los cuales producen alteraciones moleculares que llevan a la muerte celular. De acuerdo con Esegbe *et al.* (2013), la generación de radicales de peróxidos se considera como el componente central de la transducción de la señal que activa los genes responsables de las enzimas

antioxidantes, las cuales actúan sobre las formas oxidativas oxigenadas, pero se inhiben conforme aumenta la concentración de los contaminantes (Liu *et al.* 2010).

## **6.4. Cinéticas de mineralización**

### **6.4.1 pH**

Se encontró que el valor del pH para todos los tratamientos control y tratamientos estériles no presentó variaciones y permaneció relativamente constante (Figura 2). No se presentaron diferencias significativas ( $p = 0.098$ ) entre los tratamientos B (Control), Be y BT. Por el contrario, el tratamiento BTZ fue diferente estadísticamente a los demás tratamientos. Un comportamiento similar se encontró en los tratamientos con suelo salino y vermicomposta, en donde los tratamientos STZ y VTZ fueron diferentes estadísticamente a los demás tratamientos, entre los cuales no se presentó diferencia significativa ( $p=0.083$ ) en suelo salino, a excepción del tratamiento Ve que fue significativamente diferente con respecto a los tratamientos V (Control) y VT, entre los cuales no se presentó diferencia significativa ( $p=0.075$ ). Se encontró que los tratamientos con adición de residuo de zanahoria presentaron un comportamiento diferente en comparación con el control, con un valor de pH que tuvo tendencia hacia la neutralidad en el suelo de bosque, y un valor ligeramente básico (8.0) en los tratamientos con suelo salino y vermicomposta.



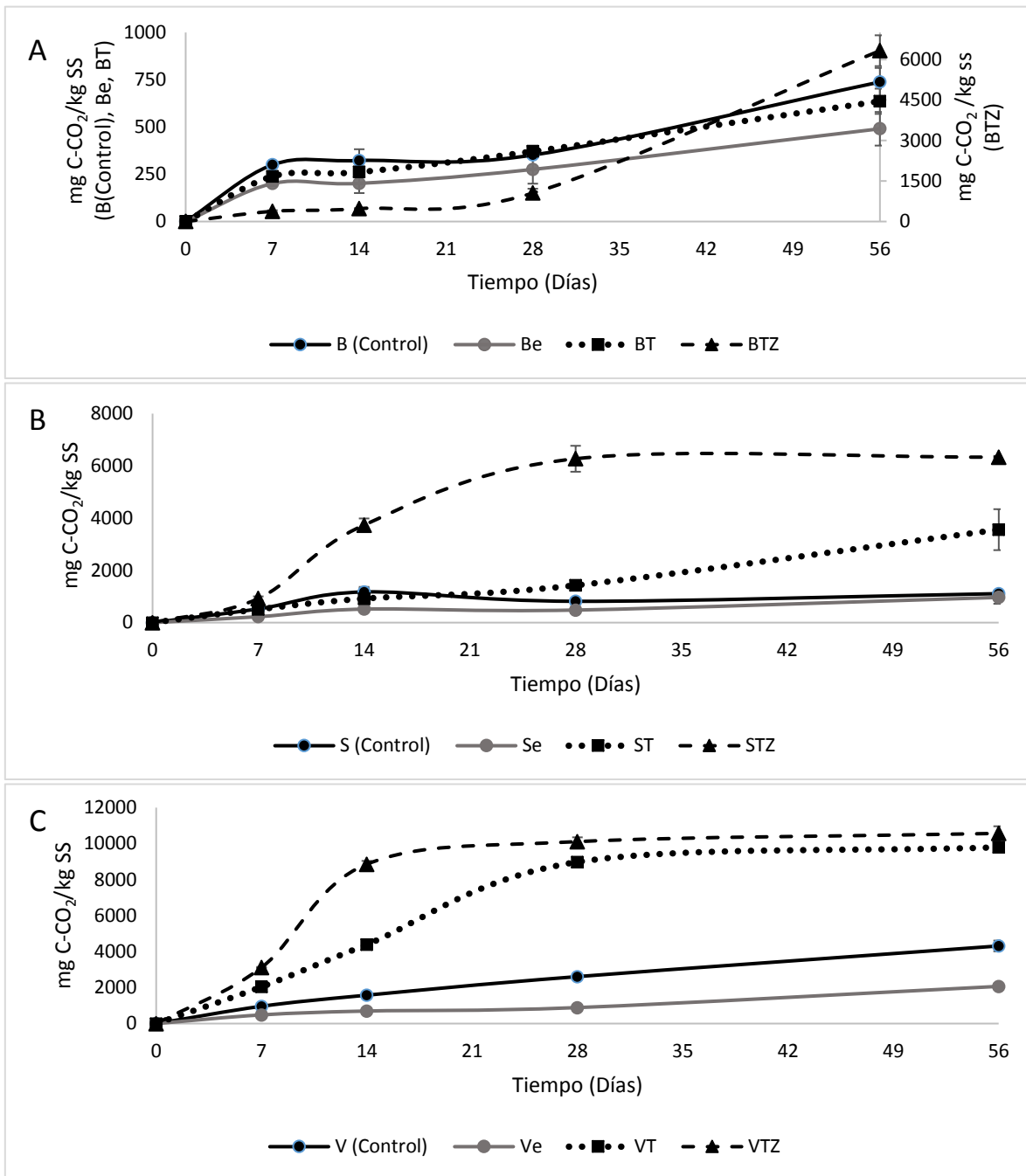
A: Suelo de Bosque; B: Suelo Salino; C: Vermicomposta. (B: Bosque, Be: Bosque estéril, BT: Bosque + thinner, BTZ: Bosque + thinner y residuo de zanahoria; S: Salino, Se: Salino estéril, ST: Salino + thinner, STZ: Salino + thinner + residuo de zanahoria; V: Vermicomposta, Ve: Vermicomposta estéril + thinner, VT: Vermicomposta + thinner, VTZ: Vermicomposta + thinner + residuo de zanahoria)

## **Figura 2.** Variación de pH.

Ashraf & Bilal (2015) reportaron que el pH de los residuos de zanahoria (pieles) se encuentra alrededor de 5.75, producto de la presencia de algunos ácidos orgánicos y azúcares. Lo anterior podría explicar por qué para el suelo salino (STZ) y la vermicomposta (VTZ) adicionados con thinner y residuo de zanahoria, el valor de pH disminuyó con respecto al valor de pH en el tratamiento control. Por su parte, para el tratamiento BTZ en donde el pH aumentó, se puede asociar al valor de pH de los productos de descomposición de los residuos de zanahoria, los cuales durante su descomposición generan un pH ligeramente alcalino, debido a que en su composición de oligoelementos contiene calcio, magnesio y sodio (Reyes, 2014). Wang *et al.* (2013) indican que el aumento en el valor de pH puede estar asociado con la acumulación de bases intercambiables tales como  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Na}^{+2}$ . Estas bases se podrían liberar también en el proceso de descomposición de la materia orgánica proveniente de los residuos de zanahoria, provocando un ligero aumento en el valor de pH.

### **6.4.2. Mineralización de Carbono (producción de $\text{CO}_2$ )**

De acuerdo a Qi y colaboradores (2016) el incremento en la tasa de respiración del suelo y la cantidad total de carbono mineralizada se relaciona con la eficiencia y la actividad de los microorganismos del suelo para utilizar las fuentes de carbono. En la cinética de mineralización de carbono se encontró que la concentración de producción de  $\text{CO}_2$  fue mayor para todos los tratamientos con vermicomposta, seguido por los tratamientos con suelo salino y los tratamientos con suelo de bosque (Figura 3). No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos B (Control), Be y BT ( $p = 0.171$ ); sin embargo, el tratamiento BTZ si fue diferente estadísticamente. En los tratamientos con suelo salino se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre todos los tratamientos evaluados. Por su parte en los tratamientos con vermicomposta, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos VT y VTZ con respecto al tratamiento V (Control) y el tratamiento Ve (Figura 3).



A: Suelo de Bosque; B: Suelo Salino; C: Vermicomposta. (B: Bosque, Be: Bosque estéril, BT: Bosque + thinner, BTZ: Bosque + thinner y residuo de zanahoria; S: Salino, Se: Salino estéril, ST: Salino + thinner, STZ: Salino + thinner + residuo de zanahoria; V: Vermicomposta, Ve: Vermicomposta estéril + thinner, VT: Vermicomposta + thinner, VTZ: Vermicomposta + thinner + residuo de zanahoria)



**Figura 3.** Comportamiento de las dinámicas de mineralización de carbono.

En todos los tratamientos control, se encontró que la concentración de CO<sub>2</sub> producido se mantuvo relativamente constante durante los 56 días de duración de la cinética. Por otra parte, se encontró que en los experimentos que recibieron tratamiento térmico, la concentración de CO<sub>2</sub> presentó un ligero incremento, siendo más evidente en los tratamientos con suelo de bosque y vermicomposta para todos los días de muestreo.

Según lo reportado por Choromanska & DeLuca (2002) se pueden encontrar altas tasas de sobrevivencia de microorganismos en suelos sometidos a tratamientos térmicos (120 - 160°C), los cuales se encontraban previamente secos, lo cual es el resultado de la formación de esporas como mecanismo de defensa y adaptación a las condiciones de sequedad en el suelo. Lo anterior puede relacionarse con las concentraciones de CO<sub>2</sub> obtenidas en los tratamientos Be, Se y Ve, si se tiene en cuenta que los suelos y la vermicomposta utilizados se sometieron a secado a temperatura ambiente antes de darles el tratamiento térmico, por lo cual los microorganismos tenían activado su sistema de defensa. De esta manera, es posible que los microorganismos con este tipo de mecanismo de defensa sobrevivieran al tratamiento térmico y posteriormente reactivaran su metabolismo cuando se ajustó la humedad de los suelos y la vermicomposta al 40% de su capacidad de retención de agua. Choromanska & DeLuca (2002). también indican que los tratamientos térmicos conllevan al desdoblamiento de macromoléculas que contienen en su estructura sustancias como azúcares solubles, los cuales son fácilmente asimilables por los microorganismos que pudieran quedar presentes. Por otra parte, Keraval *et al.* (2016), sugieren que la persistencia de la generación de CO<sub>2</sub> en suelos sometidos a tratamientos de altas temperaturas y presión (esterilización) se debe a un conjunto de reacciones químicas denominadas como EXOMET, en donde los electrones se transfieren de la materia orgánica a mediadores de reacciones redox como NAD<sup>+</sup>, NADH, Mn<sup>+3</sup>, Mn<sup>+2</sup>, y cuyas reacciones se pueden catalizar con enzimas asociadas a la respiración (glicolisis,

descarboxilación, transferencia de electrones), las cuales provienen del rompimiento celular de los microorganismos, y que posteriormente se estabilizan por las partículas del suelo. Acorde con esta investigación, es posible que además de que el tratamiento térmico no haya sido efectivo para eliminar por completo la flora microbiana presente en los suelos y la vermicomposta, se estén llevando a cabo reacciones extracelulares que emplean el oxígeno como aceptor de electrones y generan emisiones de CO<sub>2</sub>.

En los tratamientos con adición de residuo de zanahoria y thinner se presentó la mayor concentración de CO<sub>2</sub> producido. Según Aimaretti *et al.* (2012), la zanahoria es uno de los productos que pueden acumular azúcares reductores en sus vacuolas, de los cuales el 99% corresponden a fructosa y glucosa. Este tipo de compuestos son de fácil asimilación por los microorganismos presentes, los cuales pueden mineralizarlos fácilmente y usarlos como fuente de carbono, oxidándolos hasta CO<sub>2</sub>. Por otra parte, se encontró que para los tratamientos de suelo salino y vermicomposta con adición de thinner, se presentaron concentraciones más altas de CO<sub>2</sub> producido en comparación al tratamiento control, siendo los tratamientos con vermicomposta los que mayor cantidad de CO<sub>2</sub> produjeron. Por el contrario, se observó que la concentración de CO<sub>2</sub> producido fue similar entre los tratamientos B y BT. Pathma y Sakthivel (2012) mencionan que en las vermicompostas, las lombrices de tierra aumentan la biodisponibilidad de los nutrientes, lo cual beneficia y aumenta la actividad y la diversidad de los microorganismos presentes. Por esta razón, es posible explicar el por qué de la diferencia de concentraciones de CO<sub>2</sub> producidas entre los tratamientos con suelo y vermicomposta, al suponer que en la vermicomposta hay un mayor número de microorganismos cuya actividad biológica es mayor. Así mismo, se encontró que en los tratamientos de vermicomposta con thinner (VT), la cantidad de CO<sub>2</sub> producida siempre fue mayor en todos los tiempos de muestreo en comparación con el tratamiento control (V), y también en comparación con los tratamientos ST y BT. De acuerdo con Tejada y Masciandaro (2011), en el campo de la biorremediación, el usar lombrices de tierra para la promover el número de microorganismos así como su diversidad y su actividad, permite obtener beneficios relacionados con el aumento en los niveles de su

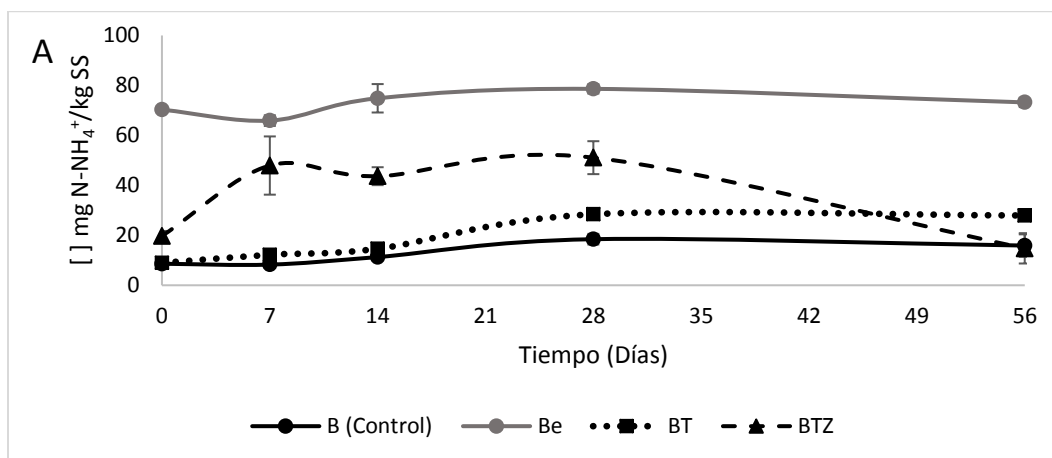
actividad catabólica, lo cual ayuda en la biodegradación de los contaminantes presentes. Lo anterior nos da un indicio de que probablemente en la vermicomposta hay un mayor número de microorganismos, con una actividad metabólica alta, que tienen la capacidad de biodegradar los componentes del thinner, y utilizarlos como fuente de carbono y oxidarlos hasta CO<sub>2</sub>.

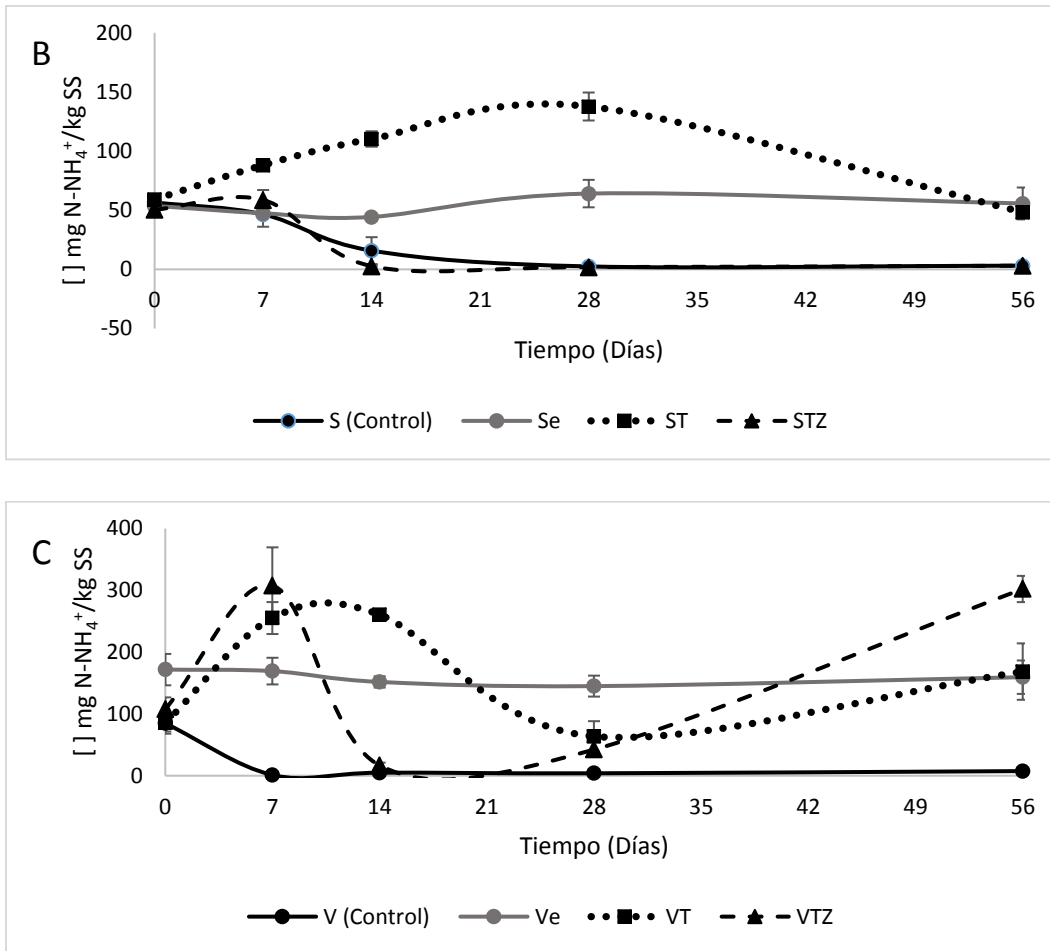
Por otra parte, en el tratamiento ST se encontró también que las concentraciones de CO<sub>2</sub> aumentaron con respecto al tratamiento control (S) a partir del día 28 de proceso. Betancur – Galvis *et al.* (2006) trabajaron con suelos salinos del exlago de Texcoco contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) tales como antraceno, fenantreno y benzo(a)pireno y observaron que se llevaba a cabo una degradación de este tipo de compuestos, aunque en una menor proporción en comparación con un suelo de tipo agrícola. Así mismo, estos autores reportaron que la inclusión de un biosólido mejoró las tasas de remoción de estos contaminantes, debido al aporte de ciertas moléculas que pueden estimular el crecimiento microbiano y a su vez incidir sobre la actividad catabólica de los microorganismos. Estos resultados podrían explicar por qué se obtuvo mayor concentración de CO<sub>2</sub> en el tratamiento ST en comparación con el tratamiento control S, ya que es posible que los microorganismos del suelo salino tengan la capacidad de biodegradar también sustancias como el benceno y el tolueno presentes en el thinner, cuya conformación estructural y características son similares a los HAP. De igual manera, la adición de residuos de zanahoria aportaría otro tipo de nutrientes como por ejemplo azúcares reductores, los cuales aprovecharían los microorganismos, además de otro tipo de compuestos aprovechables y que son producto de la biodegradación de los residuos de zanahoria. Adicionalmente, de acuerdo a lo mencionado por Eweis (1999) y Betancur – Galvis *et al.* (2006), la susceptibilidad y disponibilidad de un contaminante a la degradación microbiana es proporcional al grado de solubilidad en agua, por lo cual se puede llegar a inferir que si los microorganismos del suelo salino tuvieron acceso y actividad catalítica sobre compuestos como antraceno y fenantreno, con solubilidades de 0.045 y 1 mg/L respectivamente, es probable que entonces también presenten actividad catalítica

sobre compuestos tales como el benceno y tolueno, cuyas solubilidades son mucho más altas, con valores de 1.79 y 0.53 g/L respectivamente (Sieg *et al.* 2008).

### 6.4.3. Nitrógeno Amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ )

Como se había observado en la caracterización físico - química, los tratamientos con vermicomposta presentaron las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  más altas en comparación con los tratamientos en el suelo de bosque y suelo salino. Para el suelo de bosque se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de la concentración de nitrógeno amoniacal entre todos los tratamientos (Figura 4). Por su parte, en suelo salino se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos S (control), Se y ST, pero no se observó diferencia significativa ( $p = 0.868$ ) entre los tratamientos S y STZ. En la vermicomposta, se encontró diferencia significativa entre el tratamiento V (control) con respecto a Ve, VT y VTZ; sin embargo, entre estos tratamientos no hubo diferencias significativas ( $p = 0.944$ ). Se observó que en los tratamientos control, la concentración de  $\text{NH}_4^+$  permaneció constante prácticamente durante todo el desarrollo de la cinética, lo cual obedece a un comportamiento normal, en donde en condiciones aerobias el  $\text{NH}_4^+$  se produce a partir de la descomposición de la materia orgánica llevada a cabo por microorganismos amonificantes, se genera a partir del proceso de desnitrificación, o se obtiene producto del proceso de fijación de nitrógeno (Shen *et al.* 2003). Posteriormente, el ion  $\text{NH}_4^+$  se oxida hasta  $\text{NO}_2^-$  dando inicio al proceso de nitrificación (Alrumman *et al.* 2015).





(A: Suelo de Bosque; B: Suelo Salino; C: Vermicomposta). (B: Bosque, Be: Bosque estéril, BT: Bosque + thinner, BTZ: Bosque + thinner y residuo de zanahoria; S: Salino, Se: Salino estéril, ST: Salino + thinner, STZ: Salino + thinner + residuo de zanahoria; V: Vermicomposta, Ve: Vermicomposta estéril + thinner, VT: Vermicomposta + thinner, VTZ: Vermicomposta + thinner + residuo de zanahoria)

**Figura 4.** Comportamiento de la concentración de  $\text{NH}_4^+$ .

Por otra parte, en los tratamientos estériles se observó que la concentración de  $\text{NH}_4^+$  fue mayor con respecto al tratamiento control, y además permaneció constante. Estos resultados fueron similares a lo reportado por Ai *et al.* (2012) en suelos estériles. Lo anterior obedece a que, en el proceso de esterilización, componentes nitrogenados presentes en el suelo y en la vermicomposta se desdoblaron, liberando formas nitrogenadas más simples como el ion  $\text{NH}_4^+$  (Koebel & Elsener 1995).

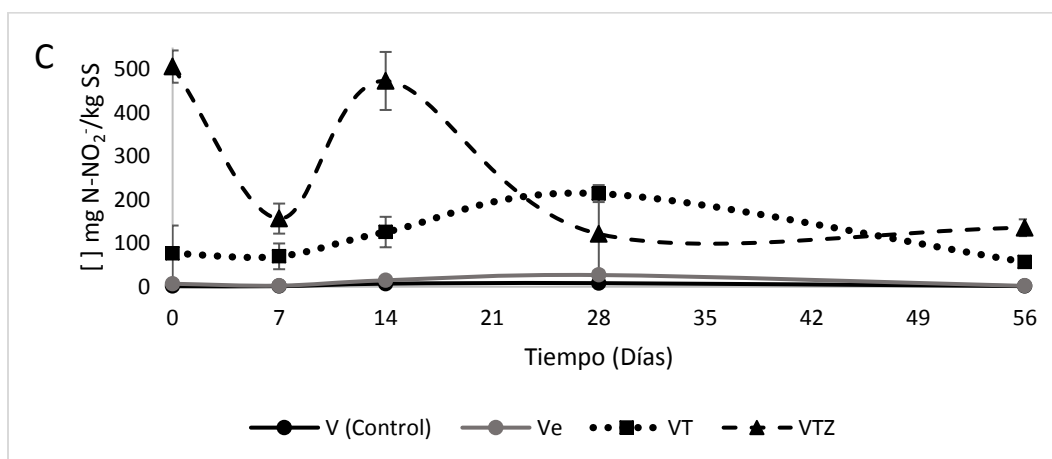
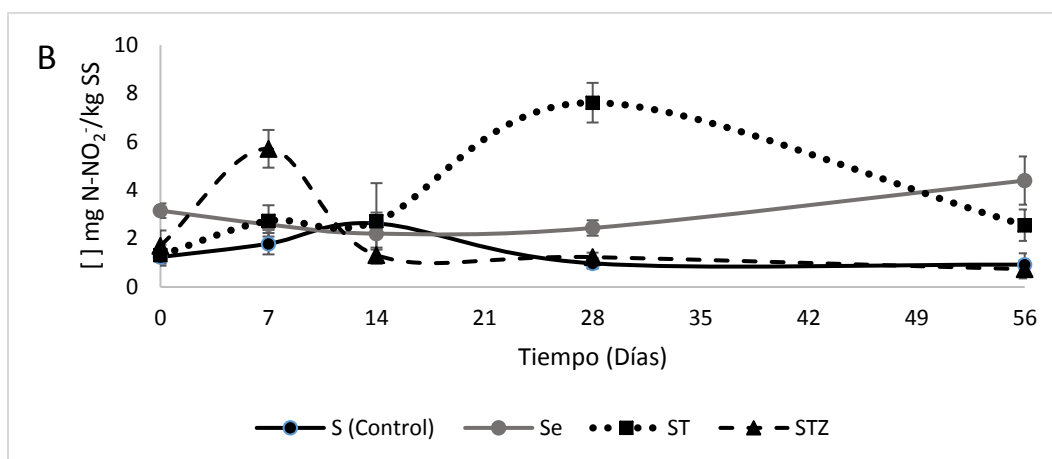
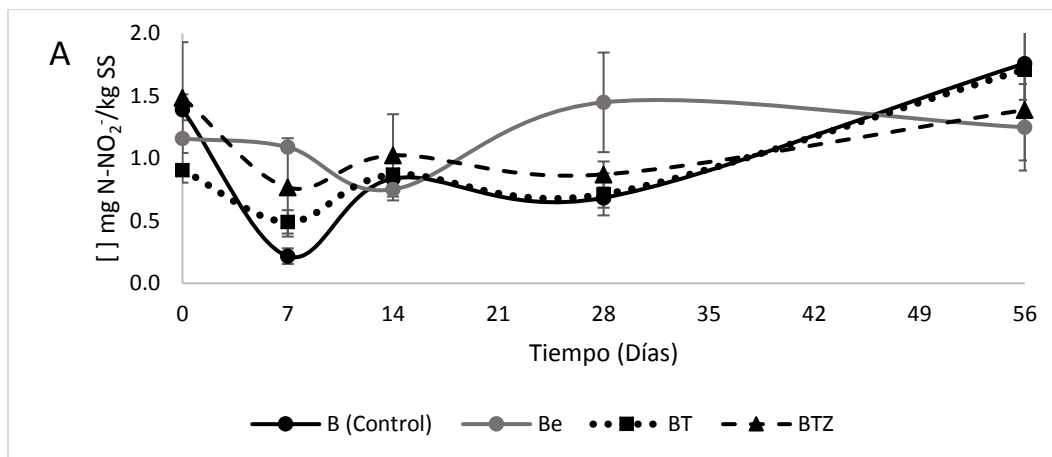
En este estudio se encontró que la adición de thinner y residuo de zanahoria causó alteraciones en el desarrollo normal de los procesos de nitrificación. Los resultados obtenidos indicaron un incremento en la concentración de  $\text{NH}_4^+$ . Estos resultados estuvieron acordes a lo reportado por Obire & Nwaubeta (2002), quienes encontraron que la concentración de amonio fue más alta en los tratamientos con inclusión de contaminantes tales como la gasolina. Según John *et al.* (2016), la presencia de altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  es un indicativo de que se ha estimulado la actividad de las bacterias amonificantes, lo cual a su vez se traduce en un bajo nivel de nitrificación. Osuji & Nwoye (2007) mencionan que la inclusión de un contaminante en el suelo estimula el metabolismo microbiano, lo cual tiene relación con la mineralización de carbono (producción de  $\text{CO}_2$ ), en donde se encontró mayor producción de  $\text{CO}_2$  en los tratamientos con adición de thinner y residuo de zanahoria. De acuerdo a lo propuesto por Eweis (1999), el ion  $\text{NH}_4^+$  se libera a partir de la degradación de la materia orgánica del suelo por parte de las bacterias amonificantes, y en este proceso se da la liberación además de una molécula de  $\text{CO}_2$  por cada mol de  $\text{NH}_4^+$  producido.

El incremento en las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  representa uno de los mayores índices de contaminación en los suelos y en el ambiente. Las formas amoniacaes en el suelo se encuentran en un balance entre amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), y se ha reportado que estos compuestos tienen efectos sobre la salud humana y son precursores de la formación de smog en zonas urbanas (Spencer & Van Heyst 2013).

#### **6.4.4. Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ )**

Se encontró que la concentración de  $\text{NO}_2^-$  fue mayor en los tratamientos con vermicomposta, y fue relativamente constante en los tratamientos control y tratamientos estériles (Figura 5). No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos con suelo de bosque ( $p = 0.545$ ). Por su parte, en el suelo salino salino se presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el tratamiento ST con respecto a los tratamientos S (Control), Se y STZ. Entre los tratamientos S (Control) y STZ no se presentaron diferencias significativas ( $p = 0.653$ ). En los tratamientos

con vermicomposta se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre todos los tratamientos, a excepción de los tratamientos V y Ve ( $p = 0.061$ ).



A: Suelo de Bosque; B: Suelo Salino; C: Vermicomposta. (B: Bosque, Be: Bosque estéril, BT: Bosque + thinner, BTZ: Bosque + thinner y residuo de zanahoria; S: Salino, Se: Salino estéril, ST: Salino + thinner, STZ: Salino + thinner + residuo de zanahoria; V: Vermicomposta, Ve: Vermicomposta estéril + thinner, VT: Vermicomposta + thinner, VTZ: Vermicomposta + thinner + residuo de zanahoria)

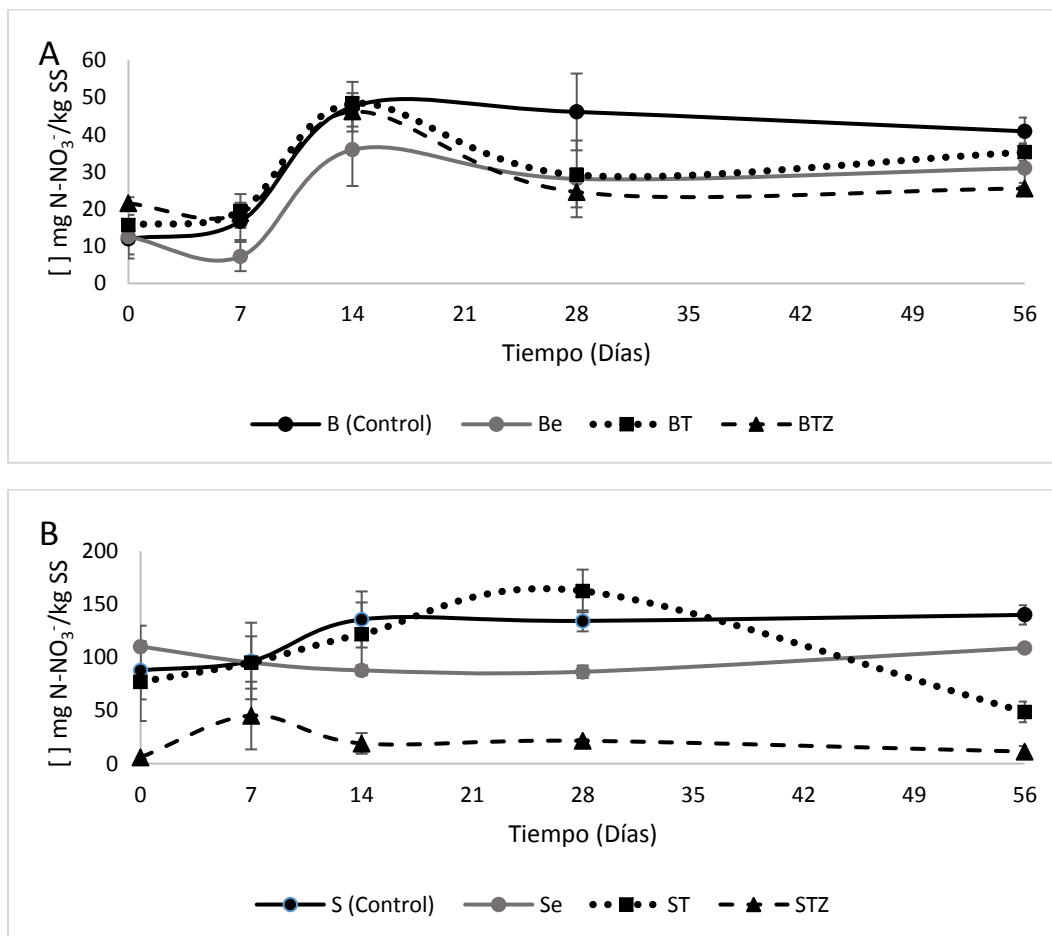
**Figura 5.** Comportamiento de la concentración de  $\text{NO}_2^-$ .

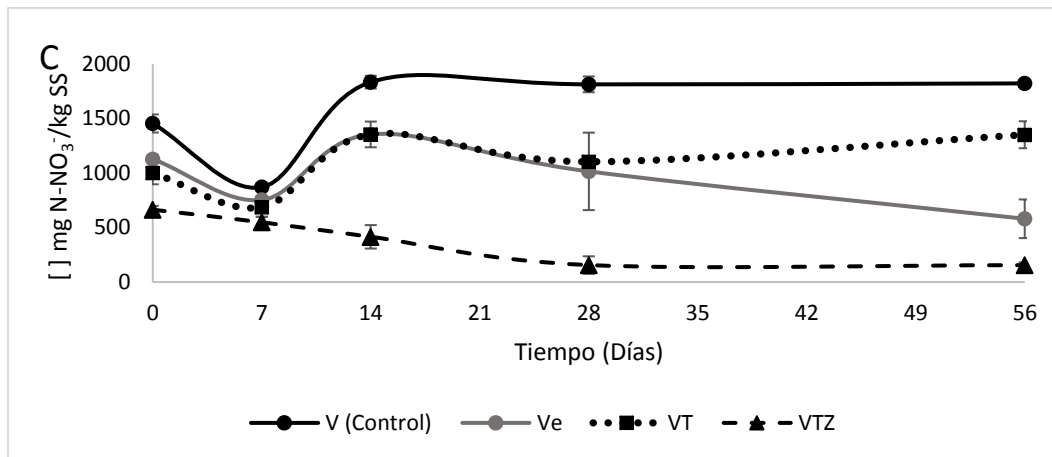
El aumento de concentración de nitritos en suelo salino y vermicomposta es acorde a lo reportado por Shen *et al.* (2003), quienes confirmaron que en ambientes alcalinos y con altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ , hay acumulación de  $\text{NO}_2^-$  alterando el proceso de nitrificación. Si bien el pH en los tratamientos con vermicomposta no presentó cambios significativos, se observó un aumento en la concentración de  $\text{NH}_4^+$  en los tratamientos con presencia de thinner. Ying *et al.* (2017) encontraron un efecto positivo entre la concentración de  $\text{NH}_4^+$  y la concentración de bacterias oxidadoras de  $\text{NH}_4^+$ . De igual manera, Nicol *et al.* (2008) reportaron que las bacterias oxidadoras de  $\text{NH}_4^+$  tienden a ser más abundantes en condiciones de pH alcalino. Según Smith *et al.* (1997), para que el  $\text{NO}_2^-$  se acumule, la tasa de oxidación de  $\text{NH}_4^+$  debe ser mucho más alta que la tasa de oxidación de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$ . Por otra parte, Inglett *et al.* (2005), indican que además del proceso de nitrificación, están presentes otros procesos conocidos como reducción desasimilatoria, en la cual en un ambiente altamente reductor (anaerobiosis), un grupo de bacterias heterotróficas facultativas reducen  $\text{NO}_3^-$  hasta  $\text{NO}_2^-$  y posteriormente éste se puede reducir a  $\text{NH}_4^+$  o dar paso a la formación de compuestos como óxido nítrico (NO), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) y nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ). Wang *et al.* (2013) mencionan que los hidrocarburos causan ambientes anóxicos en el suelo obstruyendo los espacios entre las partículas del suelo y bloquea la difusión de oxígeno, lo cual afecta a las poblaciones microbianas presentes. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_2^-$ , favoreciendo los procesos de desnitrificación causados por la presencia del thinner.



### 6.4.5. Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ )

El comportamiento se muestra en la. No se presentaron diferencias significativas en la concentración de  $\text{NO}_3^-$  de los tratamientos con suelo de bosque ( $p = 0.545$ ) (Figura 6). En el suelo salino se encontró diferencia significativa entre el tratamiento STZ con respecto a los demás tratamientos (S y ST), entre los cuales no se presentaron diferencias significativas ( $p = 0.070$ ). Por su parte, en los tratamientos con vermicomposta se presentaron diferencias significativas entre todos los tratamientos, excepto entre los tratamientos Ve y VT ( $p = 0.231$ ).





A: Suelo de Bosque; B: Suelo Salino; C: Vermicomposta. (B: Bosque, Be: Bosque estéril, BT: Bosque + thinner, BTZ: Bosque + thinner y residuo de zanahoria; S: Salino, Se: Salino estéril, ST: Salino + thinner, STZ: Salino + thinner + residuo de zanahoria; V: Vermicomposta, Ve: Vermicomposta estéril + thinner, VT: Vermicomposta + thinner, VTZ: Vermicomposta + thinner + residuo de zanahoria)

**Figura 6.** Comportamiento de la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

En los tratamientos control se encontró un comportamiento de nitrificación normal, la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> aumentó en el día 7 presentando algunas fluctuaciones hasta el día 56. Este comportamiento lo reportaron Akpan *et al.* (2013), la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> presentaba ligeros cambios de aumento y disminución, lo que se debe al comportamiento propio de la nitrificación, y a su vez a la inmovilización de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por parte de los microorganismos. En contraste, la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> presentó una tendencia a la disminución y fue menor en presencia del thinner, comportamiento que fue significativo en el suelo salino y en la vermicomposta hacia el día 56. Lo anterior fue similar a lo reportado por Aciego - Pietri & Brooks (2008), quienes encontraron que la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> disminuyó en el tratamiento con inclusión de contaminantes, y a su vez presentó una relación negativa con los valores de pH. Así mismo, se encontró que la inclusión de residuos de zanahoria mostró un efecto significativo en la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, encontrándose concentraciones más bajas con respecto al tratamiento control. Margesin *et al.* (2000) reportaron que la presencia de grandes cantidades de

carbono orgánico da como resultado la rápida disminución de los nutrientes inorgánicos disponibles como el nitrógeno y el fósforo. De acuerdo con las concentraciones de CO<sub>2</sub> obtenidas en el tratamiento V + T, la población microbiana presente se estimuló y aumentó su actividad, consumiendo rápidamente fuentes inorgánicas disponibles como el NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Osuji & Nwoye (2007), mencionan que, como resultado de la presencia de un contaminante, y de la estimulación microbiana, el oxígeno presente se convierte en un reactivo limitante, lo cual produce un ambiente anaerobio (altamente reductor), lo cual obliga a los microorganismos a buscar aceptores de electrones alternativos. Según Inglett *et al.* (2005), el oxígeno es termodinámicamente el aceptor de electrones preferido por los microorganismos; sin embargo, ante la ausencia de esta molécula, el siguiente aceptor en la lista es el NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. John *et al.* (2016) mostraron en su estudio que la alteración en la relación C:N altera la actividad de los microorganismos presentes, los cuales tienden a consumir de manera más rápida el nitrógeno disponible. Lo anterior está acorde a los resultados encontrados en este estudio, en donde el aumento en la concentración de materia orgánica producto de la inclusión de residuo de zanahoria provocó un aumento en la relación C:N, por lo cual, la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> fue menor en comparación con el tratamiento control. De igual manera, Beristain – Cardoso *et al.* (2009), la inclusión de materia orgánica inhibe los procesos de nitrificación tanto en suelos y lodos, y esto obedece a la competencia que se genera entre microorganismos heterótrofos y autótrofos por utilizar NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y O<sub>2</sub>, ya que la materia orgánica estimula la actividad de los microorganismos heterótrofos, los cuales secuestran el ion NH<sub>4</sub><sup>+</sup> para incorporarlo a su biomasa, limitando el proceso de nitrificación, ya que disminuye la disponibilidad de este ion para ser oxidado hasta NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

#### **6.4.6. Variación de la concentración de los componentes del thinner**

Los resultados de la variación de concentración de los componentes de thinner se presentan en las tablas 12, 13 y 14. El tratamiento de extracción no permitió cuantificar el benceno. En todos los tratamientos estériles, se observó que en el día 7 la concentración de tolueno disminuyó entre el 85 y 90% con respecto a la concentración inicial, siendo este componente el que presentó una tasa de

volatilización mayor. Por su parte el metanol, 2 – butoxietanol y mezcla de hexanos presentaron menores tasas de volatilización, encontrándose en el día 7 de muestreo disminución en las concentraciones entre 67 - 76%, 10 – 33% y 56 – 80% respectivamente, con respecto a la concentración inicial. Para el día 56, las concentraciones de tolueno en los tratamientos estériles disminuyeron hasta más del 95%, metanol en 85 a 90% y 2 – butoxietanol en 77 a 82%. Por su parte no se encontró mezcla de hexanos desde el día 14 en suelo salino, y desde el día 28 en suelo de bosque y vermicomposta. Riffaldi *et al.* (2006) reportaron pérdidas por volatilización de más del 58% en tratamientos de suelos estériles contaminados con HTP (hidrocarburos totales del petróleo) hacia el final de la dinámica (100 días).

Valores en las constantes de Henry menores a  $10^{-7}$  indican que la sustancia se puede considerar no volátil. Valores entre  $10^{-7}$  y  $10^{-5}$  indican que la sustancia puede llegar a volatilizarse lentamente y particionarse hacia la fase acuosa. Valores entre  $10^{-5}$  y  $10^{-3}$  indican una tasa de volatilización significativa, y valores superiores a  $10^{-3}$  suponen que la mayoría de la masa de la sustancia se particionará hacia la fase gaseosa (Alberta Environment, 2010). De acuerdo con los componentes encontrados en el thinner, el metanol y el butoxietanol tienen constantes de Henry menores a  $10^{-5}$  ( $4.6 \times 10^{-6}$  y  $2.08 \times 10^{-8}$  respectivamente), lo que indica que estas sustancias tienden a volatilizarse lentamente, lo cual está acorde con los resultados obtenidos. Por su parte, sustancias como benceno, tolueno y hexanos tienen valores de constante de Henry iguales o mayores a  $10^{-3}$  ( $5.49 \times 10^{-3}$ ,  $6.64 \times 10^{-3}$  y  $1.69$  respectivamente), y fueron estas sustancias en donde se encontró mayores tasas de volatilización en los tratamientos estériles.

**Tabla 12.** Variación de la concentración de los componentes de thinner en suelo de bosque.

Tolueno (mg/kg ss)					
	0	7	14	28	56
<b>Be</b>	$4686.78 \pm 81.56^a$	$410.09 \pm 35.41^a$	$121.99 \pm 10.35^a$	$94.29 \pm 3.21^a$	$90.96 \pm 0.81^a$
<b>BT</b>	$4534.42 \pm 99.78^a$	$122.12 \pm 16.12^b$	$112.62 \pm 3.38^a$	$91.59 \pm 1.86^a$	$88.22 \pm 1.18^b$
<b>BTZ</b>	$5049.98 \pm 196.72^b$	$164.55 \pm 18.39^b$	$126.38 \pm 2.96^a$	$111.00 \pm 0.55^b$	$107.34 \pm 0.32^c$

Metanol (mg/kg ss)					
--------------------	--	--	--	--	--

	0	7	14	28	56
<b>Be</b>	5890.55 ± 215.76 <sup>a</sup>	1375.66 ± 94.22 <sup>a</sup>	879.12 ± 56.65 <sup>a</sup>	936.74 ± 64.78 <sup>a</sup>	770.26 ± 62.74 <sup>a</sup>
<b>BT</b>	5881.92 ± 154.78 <sup>a</sup>	992.56 ± 70.43 <sup>b</sup>	825.89 ± 34.89 <sup>b</sup>	762.88 ± 69.29 <sup>a</sup>	785.69 ± 28.43 <sup>a</sup>
<b>BTZ</b>	6811.01 ± 191.09 <sup>a</sup>	1291.29 ± 56.34 <sup>a</sup>	1238.90 ± 43.32 <sup>c</sup>	1236.39 ± 63.53 <sup>b</sup>	1101.97 ± 41.50 <sup>b</sup>

2 – Butoxietanol (mg/kg ss)					
	0	7	14	28	56
<b>Be</b>	776.21 ± 36.02 <sup>a</sup>	519.05 ± 41.86 <sup>a</sup>	373.25 ± 24.10 <sup>a</sup>	195.24 ± 37.63 <sup>a</sup>	180.79 ± 15.28 <sup>a</sup>
<b>BT</b>	764.12 ± 26.54 <sup>a</sup>	378.15 ± 26.54 <sup>b</sup>	360.80 ± 57.21 <sup>a</sup>	208.78 ± 29.44 <sup>a</sup>	197.05 ± 33.50 <sup>a</sup>
<b>BTZ</b>	937.73 ± 18.38 <sup>b</sup>	566.86 ± 18.38 <sup>a</sup>	419.52 ± 34.91 <sup>a</sup>	396.35 ± 35.73 <sup>b</sup>	381.48 ± 48.29 <sup>b</sup>

Hexanos (mg/kg ss)					
	0	7	14	28	56
<b>Be</b>	1110.23 ± 54.16	212.67 ± 14.26	165.81 ± 1.09	ND	ND
<b>BT</b>	942.11 ± 41.26	172.75 ± 0.86	158.52 ± 1.58	ND	ND
<b>BTZ</b>	1261.53 ± 184.97	190.52 ± 1.84	188.81 ± 1.23	183.18 ± 3.60	ND

\*Diferentes letras en cada columna indicaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las concentraciones de Tolueno, Metanol y 2 – Butoxietanol respectivamente, según la prueba de Tukey,  $n = 3$ .

**Tabla 13.** Variación de la concentración de los componentes de thinner en suelo de salino.

Tolueno (mg/kg ss)					
	0	7	14	28	56
<b>Se</b>	3060.42 ± 162.59 <sup>a</sup>	233.66 ± 43.06 <sup>a</sup>	167.74 ± 4.53 <sup>ab</sup>	57.99 ± 1.19 <sup>ab</sup>	56.72 ± 3.19 <sup>a</sup>
<b>ST</b>	2966.49 ± 186.60 <sup>a</sup>	104.34 ± 13.50 <sup>b</sup>	78.82 ± 2.59 <sup>a</sup>	65.60 ± 2.72 <sup>a</sup>	61.20 ± 9.27 <sup>a</sup>
<b>STZ</b>	3397.41 ± 213.71 <sup>a</sup>	98.92 ± 2.56 <sup>b</sup>	97.15 ± 9.52 <sup>b</sup>	73.77 ± 8.12 <sup>b</sup>	73.77 ± 8.12 <sup>a</sup>

Metanol (mg/kg ss)					
	0	7	14	28	56
<b>Se</b>	4105.60 ± 155.68 <sup>a</sup>	882.70 ± 33.03 <sup>a</sup>	635.76 ± 52.98 <sup>a</sup>	429.72 ± 145.90 <sup>a</sup>	397.52 ± 74.60 <sup>a</sup>
<b>ST</b>	4014.32 ± 366.44 <sup>a</sup>	694.20 ± 86.73 <sup>b</sup>	465.31 ± 28.78 <sup>b</sup>	392.98 ± 86.14 <sup>a</sup>	363.84 ± 79.17 <sup>a</sup>
<b>STZ</b>	4597.45 ± 419.68 <sup>a</sup>	952.49 ± 49.18 <sup>a</sup>	791.26 ± 78.40 <sup>c</sup>	645.56 ± 46.36 <sup>a</sup>	596.53 ± 53.37 <sup>b</sup>

2 – Butoxietanol (mg/kg ss)					
	0	7	14	28	56
<b>Se</b>	541.74 ± 41.35 <sup>a</sup>	450.38 ± 35.24 <sup>a</sup>	226.31 ± 18.98 <sup>a</sup>	114.61 ± 1.97 <sup>a</sup>	112.61 ± 14.46 <sup>a</sup>
<b>ST</b>	514.89 ± 82.63 <sup>a</sup>	512.10 ± 8.94 <sup>a</sup>	194.74 ± 18.09 <sup>a</sup>	110.39 ± 2.72 <sup>a</sup>	107.16 ± 16.25 <sup>a</sup>
<b>STZ</b>	594.81 ± 89.35 <sup>a</sup>	497.66 ± 51.72 <sup>a</sup>	259.07 ± 75.99 <sup>a</sup>	142.44 ± 8.12 <sup>b</sup>	147.50 ± 33.80 <sup>b</sup>

Hexanos (mg/kg ss)					
	0	7	14	28	56
<b>Se</b>	840.61 ± 39.84	233.11 ± 21.13	125.39 ± 2.42	ND	ND

<b>ST</b>	684.13 ± 43.58	129.46 ± 1.71	ND	ND	ND
<b>STZ</b>	783.50 ± 49.92	146.48 ± 1.68	145.86 ± 1.03	ND	ND

\*Diferentes letras en cada columna indicaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para las concentraciones de Tolueno, Metanol y 2 – Butoxietanol respectivamente, según la prueba de Tukey,  $n = 3$ .

**Tabla 14.** Variación de la concentración de los componentes de thinner en vermicomposta.

<b>Tolueno (mg/kg ss)</b>					
	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>28</b>	<b>56</b>
<b>Ve</b>	2981.67 ± 66.96 <sup>a</sup>	452.33 ± 52.49 <sup>a</sup>	262.37 ± 11.76 <sup>ab</sup>	72.50 ± 5.17 <sup>a</sup>	71.76 ± 5.17 <sup>a</sup>
<b>VT</b>	3101.89 ± 150.79 <sup>a</sup>	175.83 ± 7.96 <sup>b</sup>	109.49 ± 14.74 <sup>a</sup>	69.18 ± 1.53 <sup>a</sup>	67.70 ± 1.53 <sup>b</sup>
<b>VTZ</b>	3651.76 ± 170.77 <sup>b</sup>	408.04 ± 46.31 <sup>a</sup>	172.16 ± 31.81 <sup>b</sup>	93.85 ± 6.39 <sup>b</sup>	79.31 ± 1.72 <sup>a</sup>
<b>Metanol (mg/kg ss)</b>					
	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>28</b>	<b>56</b>
<b>Ve</b>	4361.11 ± 151.24 <sup>a</sup>	1404.23 ± 301.91 <sup>a</sup>	994.40 ± 43.99 <sup>a</sup>	551.57 ± 72.50 <sup>a</sup>	530.86 ± 23.93 <sup>a</sup>
<b>VT</b>	4511.64 ± 233.75 <sup>a</sup>	922.90 ± 43.78 <sup>b</sup>	884.40 ± 67.60 <sup>a</sup>	356.47 ± 96.10 <sup>b</sup>	265.48 ± 13.12 <sup>b</sup>
<b>VTZ</b>	5377.52 ± 342.53 <sup>b</sup>	1571.35 ± 75.72 <sup>c</sup>	1483.11 ± 54.79 <sup>b</sup>	955.16 ± 29.31 <sup>c</sup>	934.85 ± 20.86 <sup>c</sup>
<b>2 - Butoxietanol (mg/kg ss)</b>					
	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>28</b>	<b>56</b>
<b>Ve</b>	542.29 ± 45.16 <sup>a</sup>	483.65 ± 44.48 <sup>a</sup>	237.27 ± 14.56 <sup>a</sup>	98.77 ± 4.17 <sup>a</sup>	97.49 ± 6.39 <sup>a</sup>
<b>VT</b>	541.36 ± 39.86 <sup>a</sup>	469.85 ± 52.15 <sup>a</sup>	175.39 ± 19.97 <sup>a</sup>	89.50 ± 4.24 <sup>a</sup>	85.11 ± 11.20 <sup>b</sup>
<b>VTZ</b>	651.63 ± 35.42 <sup>a</sup>	589.90 ± 37.48 <sup>b</sup>	464.39 ± 23.56 <sup>b</sup>	148.79 ± 18.82 <sup>b</sup>	119.81 ± 9.47 <sup>c</sup>
<b>Hexanos (mg/kg ss)</b>					
	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>28</b>	<b>56</b>
<b>Ve</b>	831.40 ± 24.46	365.48 ± 36.91	361.03 ± 69.16	165.83 ± 26.02	ND
<b>VT</b>	905.09 ± 60.20	153.72 ± 8.16	137.40 ± 1.52	ND	ND
<b>VTZ</b>	1016.21 ± 32.70	402.59 ± 49.22	225.31 ± 52.92	173.53 ± 25.06	ND

\*Diferentes letras en cada columna indicaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para las concentraciones de tolueno, metanol y 2 – butoxietanol respectivamente, según la prueba de Tukey,  $n = 3$ .

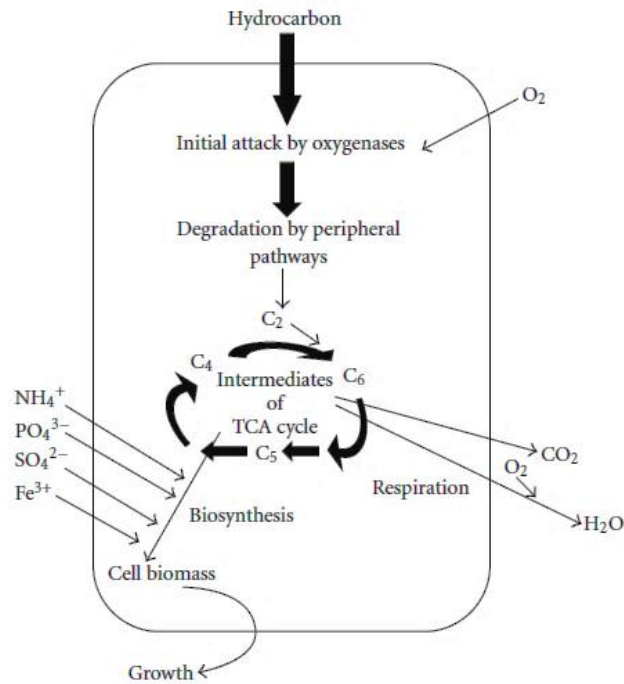
De manera general, la concentración encontrada de todos los componentes fue mayor en los tratamientos con suelo de bosque y en vermicomposta. Así mismo, en la mayoría de los casos se encontró diferencia significativa en la concentración de los componentes entre los tratamientos con y sin adición de residuo de zanahoria. Lo anterior sugiere que, además de la tasa de volatilización propia de los

componentes, y la mineralización de los componentes del thinner, existe otro factor que incide sobre la retención de los componentes de thinner en el suelo y la vermicomposta. Según Prokop *et al.* (2016) la materia orgánica tiene gran afinidad por los compuestos orgánicos presentes, de tal manera que los retiene, pero a su vez reduce la movilidad y disponibilidad de los mismos. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos, ya que se encontró que la concentración retenida de los compuestos fue mayor en los tratamientos con mayor contenido de materia orgánica (bosque: 106.71; salino: 24.42; vermicomposta: 133.51 g/kg ss), y cuyo efecto se observó más claramente con adición de residuo de zanahoria como materia orgánica adicional, en donde se encontró mayor retención de los componentes en todo el desarrollo de la dinámica.

Además de la volatilización de los componentes del thinner, la disminución en la concentración puede obedecer también a la mineralización de estas sustancias al utilizarlas como fuente de carbono por algunos microorganismos. Lo anterior se relaciona con la variación en las concentraciones de CO<sub>2</sub> que se mostraron previamente, en donde se encontró que en los tratamientos ST y VT se presentaba una concentración de CO<sub>2</sub> más alta en relación con el tratamiento control. Así mismo la concentración de CO<sub>2</sub> en los tratamientos con thinner y adición de residuo de zanahoria también fue más alta.

Según Ceccanti *et al.* (2006), la actividad microbiana representa uno de los mecanismos biológicos primarios en la remoción de contaminantes en el suelo tales como derivados de petróleo, alifáticos y solventes. Por su parte, Osuji & Nwoye (2007), indican que los procesos de descomposición de materia orgánica e hidrocarburos son propios de microorganismos heterótrofos; sin embargo, es muy probable que estos microorganismos se estimulen fuertemente por la presencia de un contaminante, por lo que su proliferación no está en función de descomponer el exceso de carbono proveniente de los hidrocarburos. Lo anterior podría indicar que las concentraciones de CO<sub>2</sub> obtenidas en los tratamientos con adición de thinner no provienen precisamente de la mineralización de sus compuestos, no obstante, algunos estudios reportan la biodegradación de este tipo de compuestos por microorganismos presentes en el suelo. Según Das & Chandran (2011) los

contaminantes derivados de hidrocarburos los pueden biodegradar tanto bacterias, levaduras y hongos, en un proceso que principalmente es aerobio y en el que actúan principalmente enzimas tales como las oxigenasas. En la figura 7 se presenta un esquema del principio de degradación aerobia por parte de microorganismos.

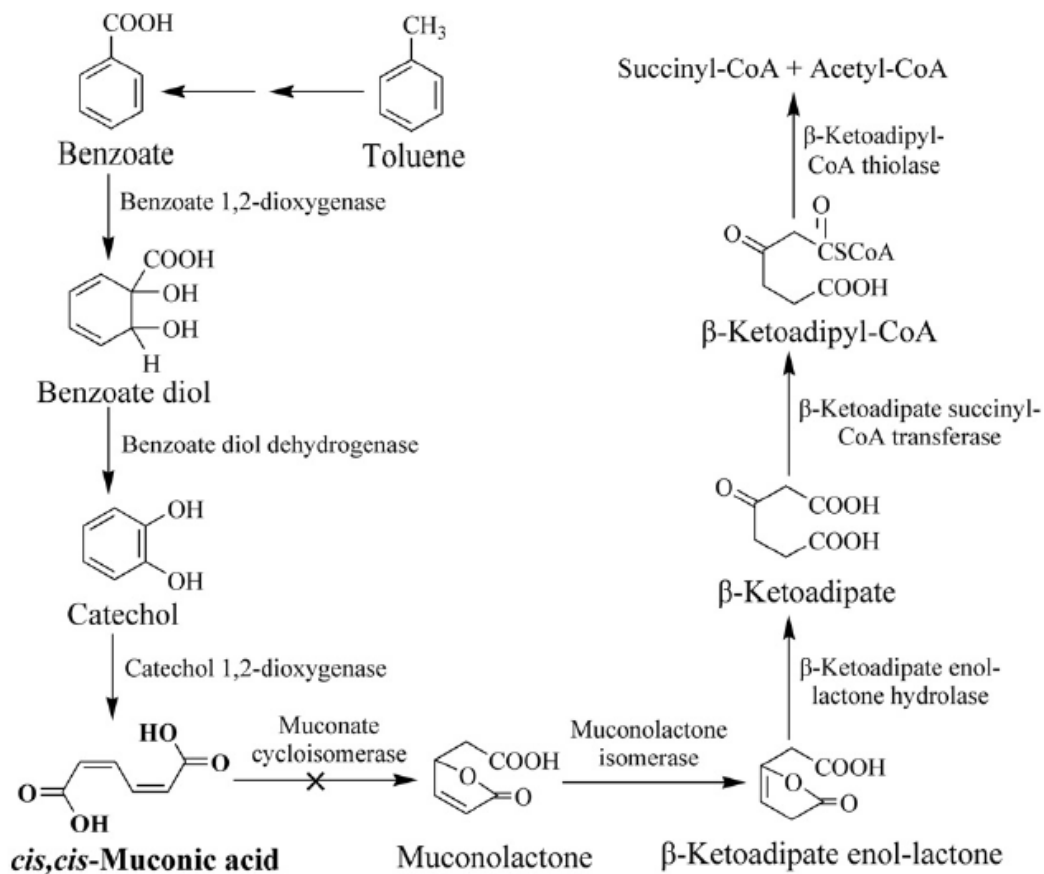


(Das & Chandran, 2011).

**Figura 7.** Ruta metabólica microbiana principal para la degradación aerobia de hidrocarburos

Por otra parte, Eweis (1999) indica que la biodegradación de moléculas aromáticas como el tolueno, involucran la activación de las mismas a través de la inclusión de oxígeno produciendo una molécula conocida como dihidrodiol, el cual se oxida nuevamente para producir moléculas como el catecol, el cual es precursor de ácido mucónico y 2 – hidroximucónico semialdehído, los cuales se pueden degradar fácilmente para formar ácidos empleados por los microorganismos para síntesis celular y como fuente de energía (Figura 8).





(Xie et al. 2014).

**Figura 8.** Esquema de la ruptura de una molécula de tolueno hasta la formación de catecol y posterior incorporación al ciclo de Krebs

Diferentes estudios han mostrado el potencial que tienen algunos microorganismos del suelo para la degradación de contaminantes orgánicos. Nicholson & Fathepure (2005) demostraron la capacidad de mineralización de cepas nativas de suelos hiper salinos del estado de Oklahoma (USA), encontrando altas tasas de mineralización de benceno y tolueno en microcosmos con duración de 1 a 4 semanas. Por su parte, Betancur – Galvis *et al.* (2006) encontraron que en suelos salinos del exlago de Texcoco se llevaba a cabo una degradación de contaminantes tales como antraceno, fenantreno y benzo(a)pireno, aunque en una menor proporción en

comparación con un suelo de tipo agrícola. Kim *et al.* (2008), reportaron el aislamiento de una cepa de *Pseudoxanthomonas spadix* perteneciente al género *Pseudoxanthomonas*, con capacidad para la degradación aerobia de BTEX. Así mismo, Chao *et al.* (2004) reportaron que, en suelos contaminados con tolueno, las mayores poblaciones microbianas correspondieron a *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.* y *Alcaligenes sp.*, con actividad catabólica reconocida sobre compuestos xenobióticos y recalcitrantes. Por otra parte, Lee *et al.* (2010), reportaron la degradación de hexano en condiciones aerobias por una bacteria (*Rhodococcus sp.* EH831) aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos, encontrando que este microorganismo podía mineralizar aproximadamente el 49% del hexano presente y llevarlo hasta CO<sub>2</sub>, y podía aprovechar el 46% en su propia biomasa microbiana. De igual manera este microorganismo demostró poder degradar compuestos como metanol, acetona y BTEX. Con respecto al metanol; sin embargo, no se encontraron estudios relacionados con degradación aerobia en suelo.

Se ha reportado que la concentración de materia orgánica influye sobre la retención y biodisponibilidad de los contaminantes orgánicos en suelo; sin embargo, autores como Kim *et al.* (2008) encontraron que algunos componentes insolubles presentes en la materia orgánica favorecen las tasas de degradación de BTEX, debido a que la materia orgánica provee lo que denominaron factores de crecimiento, lo cual promueve la actividad y el desarrollo de los microorganismos. Teniendo en cuenta lo anterior, en vermicomposta y suelos de bosque, cuyo contenido de materia orgánica es más alto, es posible que los microorganismos presentes que tengan la capacidad de degradar compuestos del thinner, se vean aún más favorecidos por elementos presentes en la materia orgánica y puedan acelerar las tasas de degradación de los mismos. En la literatura no se han reportado casos de vermicomposta contaminada con derivados de petróleo; sin embargo, hay reportes de técnicas como el vermicomposteo para el tratamiento de este tipo de contaminantes. Ekperusi & Aigbodion (2015), determinaron el potencial de la técnica de vermicomposteo empleando la lombriz de tierra *Hyperiodrilus africanus* para su uso en la degradación de compuestos derivados del petróleo en el suelo, y

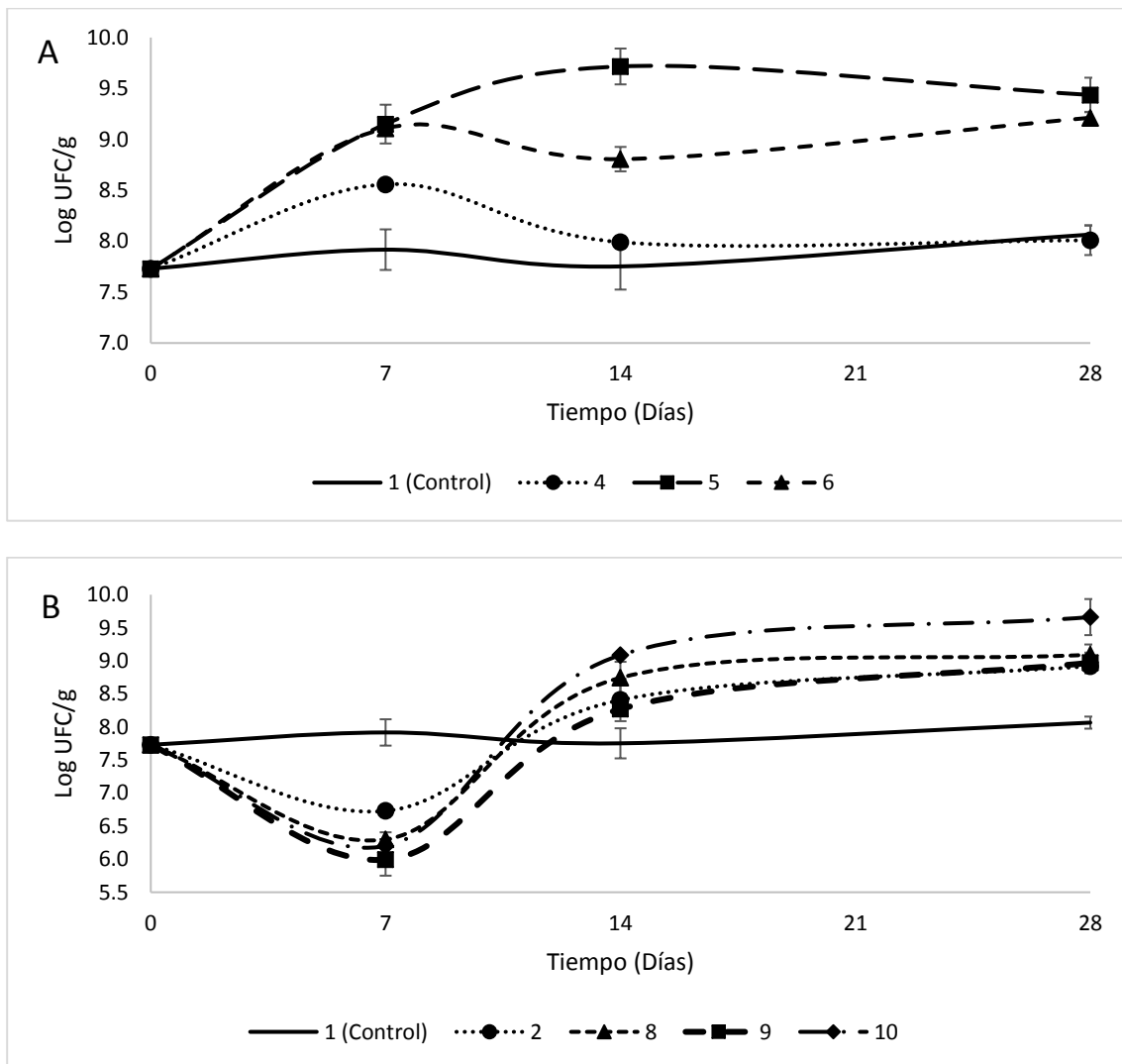
determinaron los porcentajes de biodegradación y bioacumulación del contaminante en sus tejidos. Según Ceccanti *et al.* (2006) el uso de vermicompostas tiene un doble efecto, ya que además de proveer nutrientes y materia orgánica para los microorganismos autóctonos del suelo, también se introducen nuevos microorganismos con suficiente actividad microbiana, lo cual estimula los procesos metabólicos del suelo y asegura mejores resultados en la biodegradación de contaminantes orgánicos. Lo anterior permite suponer que la vermicomposta presenta el potencial para utilizarse como tratamiento de biorremediación en suelos contaminados con sustancias similares a las de este estudio. Al respecto, se han encontrado algunos estudios como por ejemplo He *et al.* (2017), quienes reportaron la utilización de vermicomposta como agente adsorbente en suelos contaminados con metales pesados (Pb y Cd) y contaminantes orgánicos como la tetraciclina. Fu *et al.* (2011) emplearon la vermicomposta como material biofiltrante para la remoción de etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), un compuesto orgánico volátil generado de plantas petroquímicas.

#### **6.4 Dinámicas de mineralización en vermicomposta y efecto de thinner y adición de materia orgánica.**

##### **6.4.1 Variación de mesófilos aerobios.**

Se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de la concentración de mesófilos aerobios entre el tratamiento 1 (control) y los tratamientos 5 y 6; sin embargo, no se presentó diferencia significativa ( $p = 0.073$ ) entre los tratamientos 1 y 4, y los tratamientos 5 y 6 ( $p = 0.328$ ) (Figura 9). Se observó que en el tratamiento control la población microbiana se mantuvo relativamente constante durante todo el desarrollo de la cinética. La adición de residuo de zanahoria estéril (tratamiento 5) estimuló la población microbiana de la vermicomposta, incrementándose hasta 2 unidades logarítmicas por encima del tratamiento control. De igual manera se aprecia como en el tratamiento con vermicomposta y adición de residuo de zanahoria (tratamiento 6), la población microbiana fue mayor en comparación al tratamiento control. En el tratamiento 4 con vermicomposta estéril y residuo de zanahoria (tratamiento 4) se presentó un incremento de una unidad logarítmica

hacia el día 7 de la cinética; sin embargo, fue similar al tratamiento control hacia el día 14 y 28.



A) inclusión de residuo de zanahoria, B): inclusión de thinner y residuo de zanahoria + thinner.

**Figura 9.** Variación de mesófilos aerobios en vermicomposta.

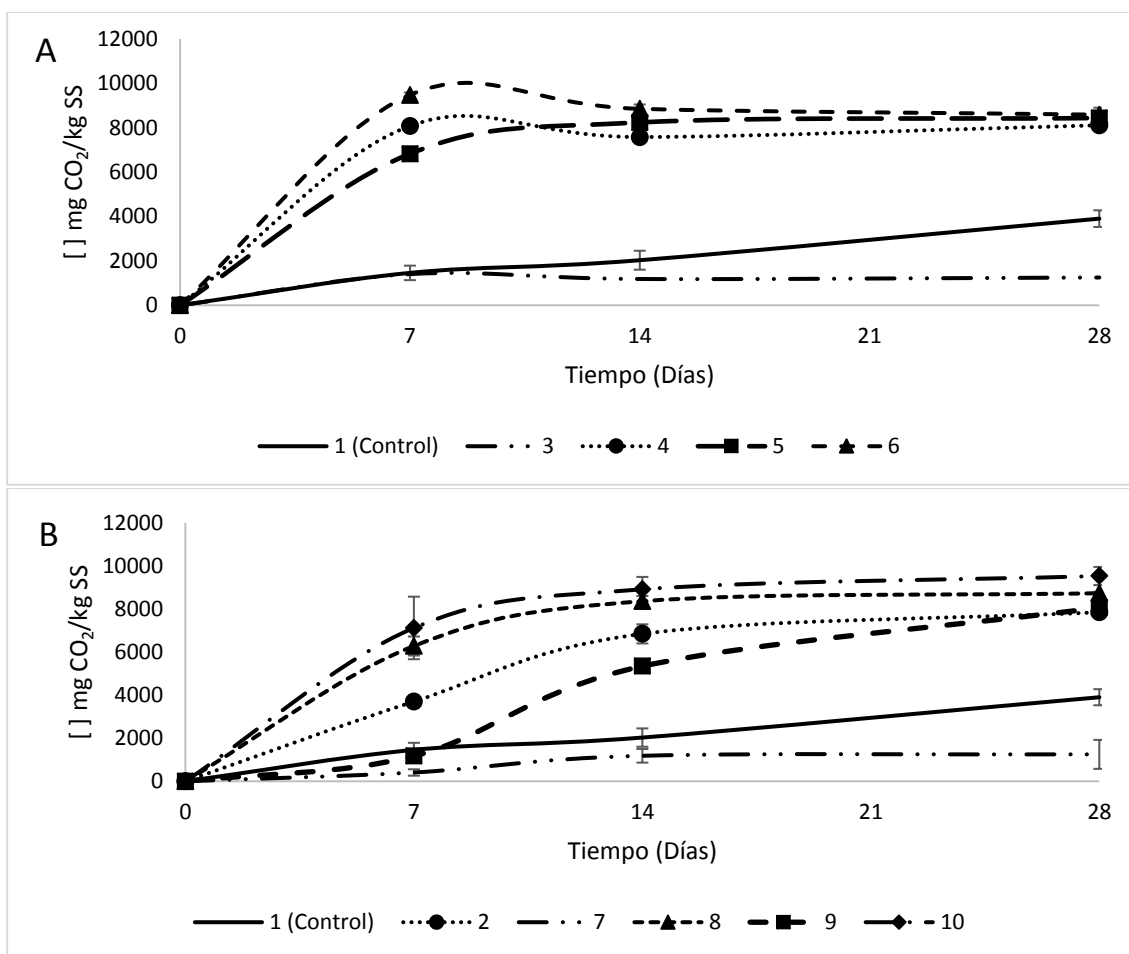
Por otra parte, se presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el tratamiento control y los tratamientos con adición de thinner y residuo de zanahoria; sin embargo, entre los tratamientos 2, 8, 9 y 10 no se presentó diferencia significativa ( $p = 0.147$ ). Se observó que en todos los tratamientos con adición de thinner y

thinner con residuo de zanahoria se presentó una disminución en la concentración de la población microbiana entre 1 y 2 unidades logarítmicas; sin embargo, se encontró que después la concentración de microorganismos aumenta hacia el día 14 y se mantiene hasta 1.5 unidades logarítmicas por encima del tratamiento control hasta el fin de la cinética. Lo anterior posiblemente se debe al efecto tóxico y a su vez estimulante que tiene el thinner sobre la población microbiana, ya que en comparación con los tratamientos 4, 5 y 6 (con sólo adición de residuo de zanahoria) no se observó este efecto. Posteriormente, se observó cómo después del día 7 hay un efecto de estimulación en los microorganismos, los cuales aumentaron su actividad metabólica y su concentración, efecto que ha sido reportado por autores como Osuji & Nwoye (2007), quienes mencionan que la inclusión de un contaminante en el suelo estimula el metabolismo microbiano. En el tratamiento 10 se encontró una concentración de microorganismos hasta casi 2 unidades logarítmicas por encima del tratamiento control, lo que se relaciona con la concentración y actividad microbiana tanto de la vermicomposta como de los residuos de zanahoria, y se aprecia como en los tratamientos que tienen sólo vermicomposta más thinner (tratamiento 2), o tratamiento de esterilización de residuo de zanahoria o vermicomposta (tratamientos 8 y 9, respectivamente), la concentración de microorganismos es menor (aproximadamente 1 unidad logarítmica) con respecto al tratamiento 10, en donde el aporte a la concentración de microorganismos proviene de una sola fuente.

#### **6.4.2 Variación de la concentración de CO<sub>2</sub>**

Se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de la variación de la concentración de CO<sub>2</sub> entre el tratamiento 1, y los tratamientos 4, 5 y 6 (con adición de residuo de zanahoria), entre los cuales no se encontró diferencia significativa ( $p = 0.828$ ) (Figura 10). La concentración de CO<sub>2</sub> fue mayor en los tratamientos 4, 5 y 6 en comparación al tratamiento control y el tratamiento 3 (control abiótico), cuya concentración permaneció relativamente constante. Estos resultados estuvieron en concordancia con la concentración de población microbiana (Figura 10 A), en donde en los tratamientos 5 y 6 se encontró un incremento con respecto al tratamiento control; sin embargo, en el tratamiento 4, el aumento de la población microbiana no

fue significativo. Estos resultados también indicaron que no existe un efecto significativo con respecto a la forma de adición de vermicomposta y residuo de zanahoria (estéril o no), ya que la contribución de CO<sub>2</sub> entre estos tratamientos fue similar.



A) inclusión de residuo de zanahoria, B): inclusión de thinner y residuo de zanahoria + thinner

**Figura 10.** Variación de la concentración de CO<sub>2</sub> en vermicomposta.

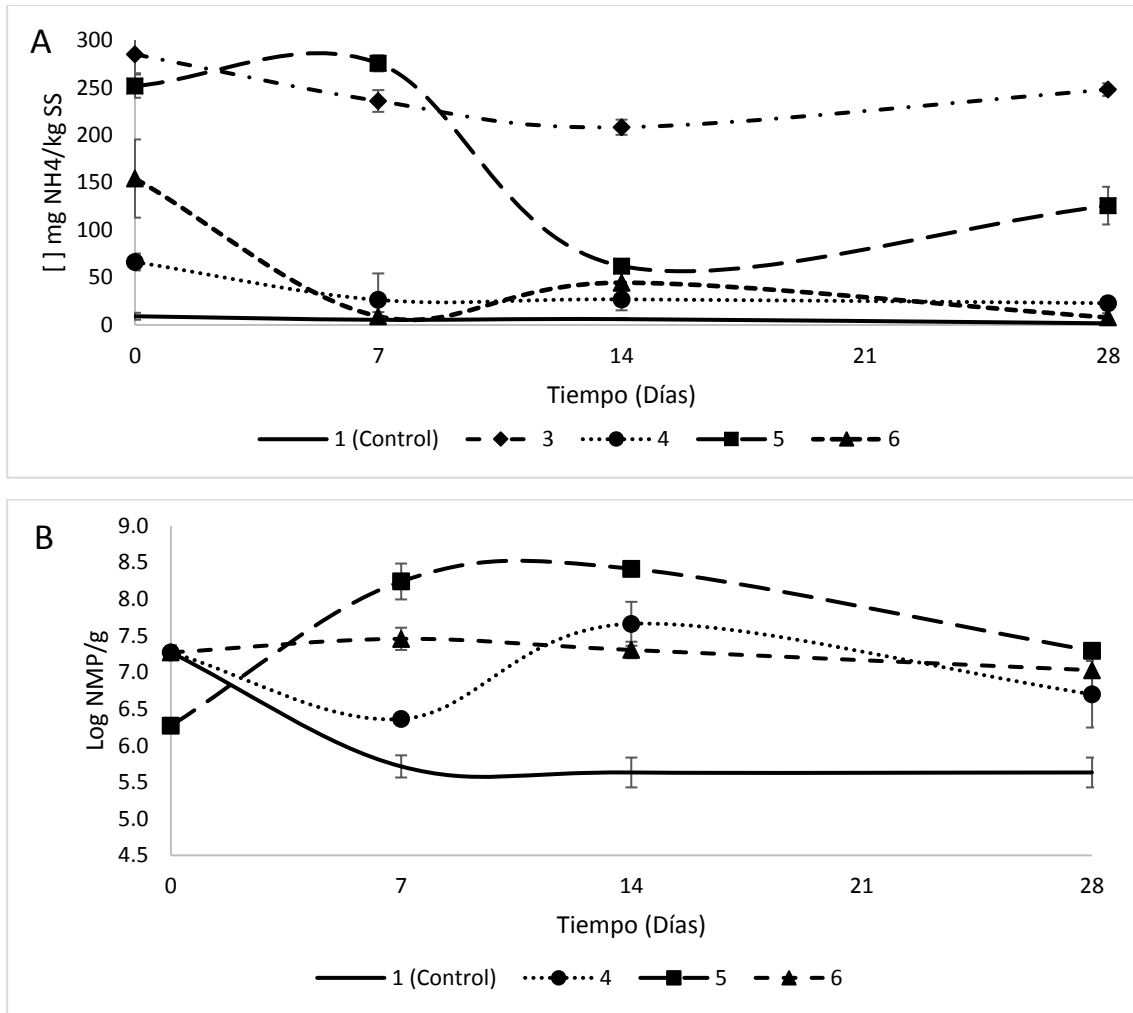
En los tratamientos con adición de thinner y residuo de zanahoria se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el tratamiento 1 y los tratamientos 2, 8, 9 y 10. Así mismo, se encontró que los tratamientos 8 y 10 fueron significativamente diferentes a los tratamientos 2 y 9. En todos los tratamientos con adición de thinner

y residuo de zanahoria se encontró que la concentración de CO<sub>2</sub> obtenida fue mayor en comparación al tratamiento control, a excepción del tratamiento 7 (control abiótico), en donde la concentración de CO<sub>2</sub> fue menor a la obtenida en el tratamiento 1 y permaneció relativamente constante. Estos resultados estuvieron relacionados con los obtenidos en la concentración de población microbiana (Figura 9 B), en donde se observó una estimulación de la actividad microbiana por efecto de la adición de thinner y residuo de zanahoria con thinner, lo que provocó un aumento en la concentración de microorganismos. En el tratamiento 9 (vermicomposta estéril + residuo de zanahoria + thinner) se observó que la concentración de CO<sub>2</sub> aumentó desde el día 14, pero presentó concentraciones más bajas en comparación con el tratamiento 10 (vermicomposta + residuo de zanahoria + thinner), lo que se debe al efecto de esterilización en la vermicomposta en el tratamiento 9, por lo cual solo se presentó actividad por los microorganismos presentes en los residuos de zanahoria, además de la contribución de las reacciones abióticas sugeridas por Keraval *et al.* (2016), quienes mencionaron que la persistencia de la generación de CO<sub>2</sub> en suelos estériles se debe a un conjunto de reacciones químicas llevadas a cabo por enzimas liberadas al ambiente en el momento de la ruptura celular. De igual manera, la concentración de CO<sub>2</sub> obtenida puede atribuirse a la mineralización de los compuestos del thinner por parte de los microorganismos presentes en la vermicomposta como se observa en el tratamiento 2.

#### **6.4.3 Nitrógeno amoniacal (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y concentración de microorganismos amonificantes (R-NH<sub>2</sub> → NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).**

Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la variación de concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y concentración de microorganismos amonificantes entre el tratamiento control y los tratamientos 3, 4, 5 y 6, entre los cuales se presentó diferencia significativa excepto entre los tratamientos 4 y 6 ( $p = 0.343$ ) (Figuras 11 y 12). Se observó que la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el tratamiento control permaneció constante durante todo el desarrollo de la cinética, tal como se había observado previamente en la figura 4 C. De igual manera, la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en los tratamientos estériles (tratamientos 3 y 7) fue más alta en comparación con el

tratamiento control y permaneció relativamente constante en una concentración entre 300 y 400 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/kg ss, cuyo comportamiento estuvo acorde a lo reportado previamente por Koebel & Elsener (1995), en donde el proceso de esterilización desdobra la materia orgánica y libera el ion NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.



(A) NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y (B) microorganismos amonificantes (R - NH<sub>2</sub> → NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)

**Figura 11.** Variación de la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y microorganismos amonificantes en vermicomposta con inclusión de residuo de zanahoria.

En el tratamiento con vermicomposta y residuo de zanahoria estéril (tratamiento 4) se observó que la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> fue más alta respecto al tratamiento control y permaneció relativamente constante. Un comportamiento similar se observó en el tratamiento con vermicomposta y adición de residuo de zanahoria (tratamiento 6),

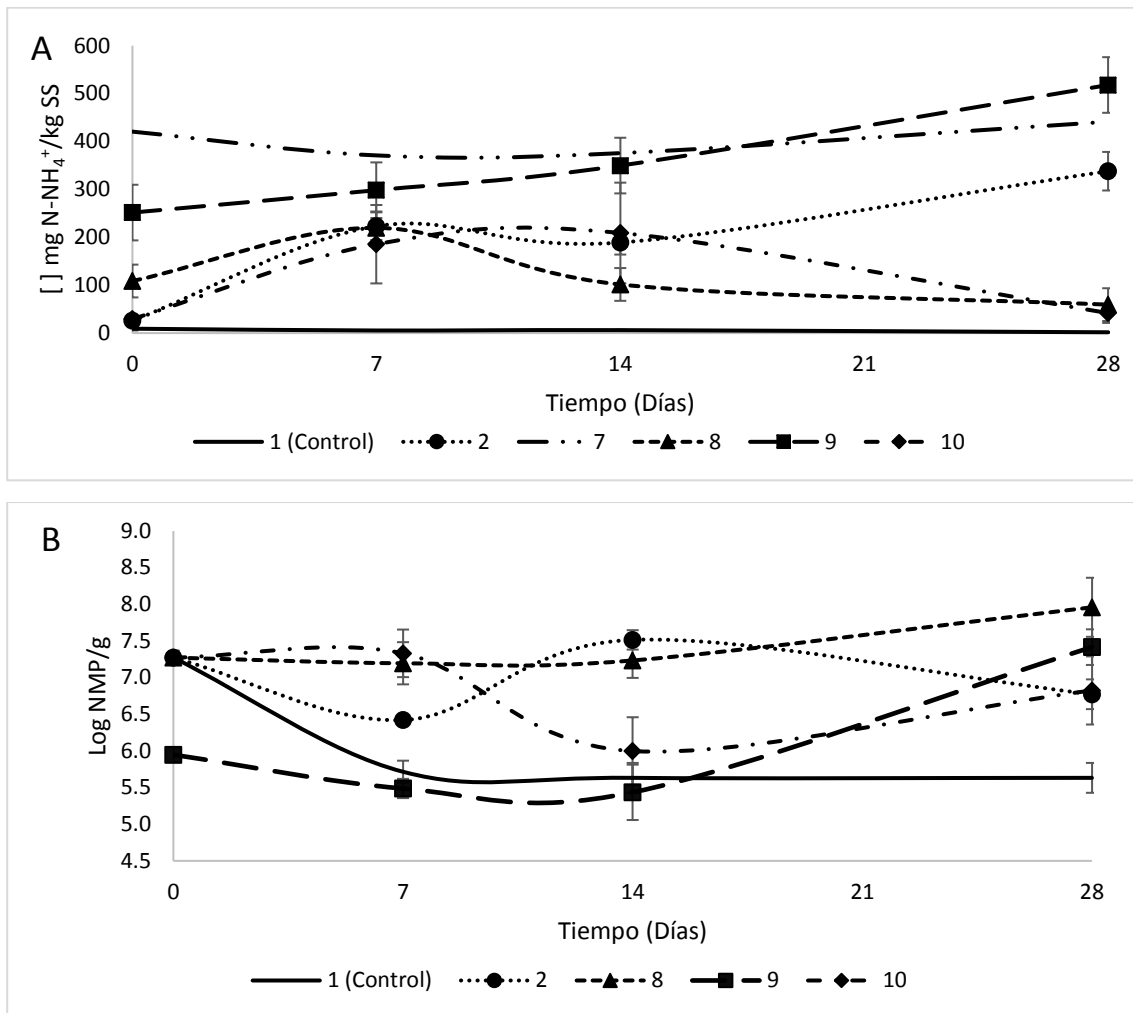


el cual presentó concentración mayor con respecto al control; sin embargo, presentó mayores fluctuaciones en la concentración de  $\text{NH}_4^+$ . Por su parte, en el tratamiento con vermicomposta estéril y adición de residuo de zanahoria (tratamiento 5) se encontró una concentración alta de  $\text{NH}_4^+$  en el día cero y siete, producto del proceso de esterilización en la vermicomposta, pero posteriormente se aprecia una disminución. Lo anterior indica que posiblemente los microorganismos heterótrofos presentes en el residuo de zanahoria emplean el ion  $\text{NH}_4^+$  disponible para su actividad microbiana, tal como lo menciona Beristain–Cardoso *et al.* (2009)

De manera general, se encontró que la adición de materia orgánica incrementó la concentración de  $\text{NH}_4^+$ , comportamiento que estuvo acorde con la concentración de microorganismos amonificantes encontrada, la cual fue mayor al tratamiento control (Figura 11 B). Se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el comportamiento del tratamiento 1 con respecto a los tratamientos 4, 5 y 6 entre los cuales no se presentó diferencia significativa ( $p = 0.112$ ). Se observó que en el tratamiento control la concentración de microorganismos amonificantes disminuyó alrededor de dos unidades logarítmicas con respecto al día cero y permaneció constante hasta el fin de la cinética. De igual manera, se observó que la concentración en el tratamiento control siempre fue menor en comparación con los tratamientos con adición de materia orgánica.

En el tratamiento con vermicomposta y residuo de zanahoria estéril (tratamiento 4) se observó una fluctuación de la concentración de microorganismos amonificantes, siendo mayor por una unidad logarítmica con respecto al tratamiento control en el día 28. Por su parte, se aprecia que en el tratamiento con vermicomposta estéril y residuo de zanahoria (tratamiento 5), la concentración de amonificantes fue menor con respecto al tratamiento control; sin embargo, hacia el día 7 y 14 aumentó hasta tres unidades logarítmicas por encima, y permaneció dos unidades por encima en el día 28, lo que indica que en los residuos de zanahoria se encuentran microorganismos degradadores de materia orgánica y que pueden liberar  $\text{NH}_4^+$  como parte de su actividad metabólica. Por su parte, en el tratamiento con vermicomposta y residuo de materia orgánica (tratamiento 6) la concentración de

amonificantes fue mayor al tratamiento control, y permaneció dos unidades logarítmicas por encima en un comportamiento constante hasta el día 28.



(A) NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y (B) microorganismos amonificantes (R - NH<sub>2</sub> → NH<sub>4</sub><sup>+</sup>).

**Figura 12.** Variación de la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y microorganismos amonificantes en vermicomposta con inclusión de thinner y residuo de zanahoria más thinner.

Por otra parte, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el tratamiento control y los tratamientos 2, 7, 8, 9 y 10, entre los cuales se presentó diferencia significativa entre sí, con excepción entre los tratamientos 7 y 9 ( $p =$

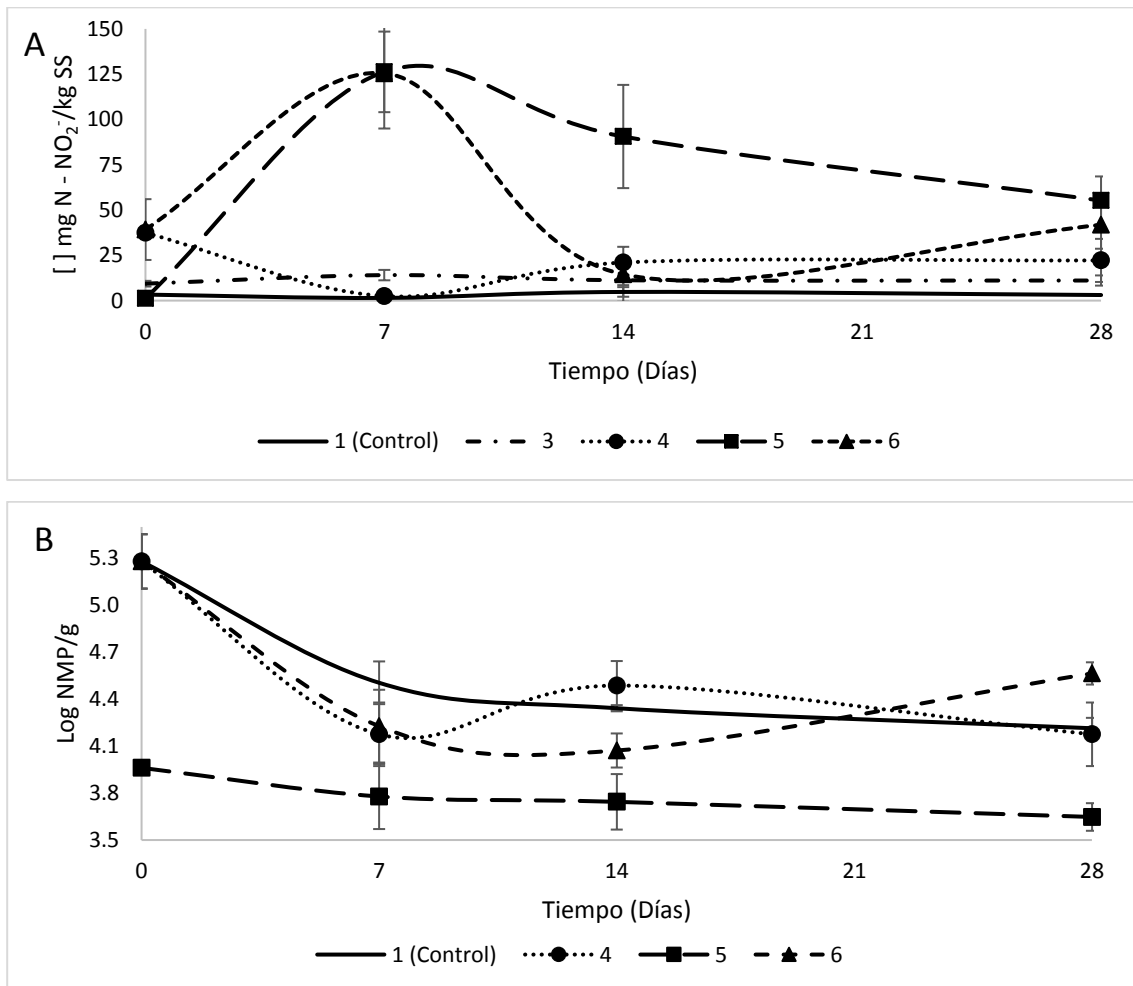
0.088) y 8 y 10 ( $p = 0.876$ ). Todos los tratamientos con adición de thinner y adición de residuo de zanahoria más thinner presentaron una concentración de  $\text{NH}_4^+$  mucho más alta (hasta 500 mg  $\text{NH}_4^+$  en los tratamientos estériles y 300 mg/kg ss en tratamientos sin esterilización), en comparación con el tratamiento control, cuya concentración no fue mayor a 10 mg  $\text{NH}_4^+$ /kg ss durante todo el desarrollo de la cinética. Así mismo, en los tratamientos con sólo adición de residuo de zanahoria la concentración de  $\text{NH}_4^+$  alcanzó un máximo de 300 mg/kg ss (en los tratamientos con vermicomposta estéril) y sólo hasta 50 mg/kg ss en los tratamientos sin esterilización. Lo anterior demuestra que si bien la materia orgánica tiene un efecto sobre el incremento en la concentración de  $\text{NH}_4^+$ , este efecto se ve potencializado con la inclusión de un contaminante como el thinner. El tratamiento con adición de thinner (tratamiento 2) presentó un incremento en la concentración de  $\text{NH}_4^+$  de 200 mg/kg ss en el día 7 y aumentó hasta 300 mg/kg ss en el día 28. Estos resultados fueron similares con lo reportado por Obire & Nwaubeta (2002), quienes encontraron que la concentración de amonio fue más alta en los tratamientos con inclusión de contaminantes similares tales como la gasolina. Según John *et al.* (2016), la presencia de altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  es un indicativo de que se ha estimulado la actividad de las bacterias amonificantes, comportamiento que se puede corroborar en la figura 12 B. En los tratamientos con vermicomposta y residuo de zanahoria más thinner (tratamiento 10) y vermicomposta y residuo de zanahoria estéril más thinner (tratamiento 8) se observó un comportamiento similar, en el cual la concentración de  $\text{NH}_4^+$  aumentó en el día 7 hasta concentraciones alrededor de 200 mg/kg ss, y posteriormente disminuyó hasta aproximadamente 50 mg/kg ss en el día 28, indicando que la manera como se incluye la materia orgánica (estéril o no) no influyó de manera significativa en la concentración de  $\text{NH}_4^+$ . Por otra parte, en el tratamiento con vermicomposta estéril con inclusión de residuo de zanahoria más thinner (tratamiento 9) inicialmente se encontró una concentración inicial de  $\text{NH}_4^+$  de aproximadamente 250 mg/kg ss (por efecto de la esterilización de la vermicomposta) y posteriormente aumentó hasta duplicarse en el día 28 de la dinámica, lo que indica que, además del  $\text{NH}_4^+$  liberado por la esterilización, los microorganismos amonificantes presentes en los residuos de zanahoria se vieron

estimulados por la inclusión del thinner, aumentando su actividad microbiana y liberando  $\text{NH}_4^+$  a partir de la materia orgánica presente. Este comportamiento se puede corroborar con lo mostrado en la figura 11 B, en donde se aprecia que, si bien la concentración de microorganismos amonificantes en este tratamiento fue similar al tratamiento control hasta el día 14, a partir de este momento se observa un incremento en la concentración de estos microorganismos hasta llegar incluso a dos unidades logarítmicas por encima en el día 28.

En los tratamientos con adición de thinner y adición de residuo de zanahoria más thinner, se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la concentración de microorganismos amonificantes entre el tratamiento 1 y el tratamiento 2, 8 y 10, sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 9 ( $p = 0.980$ ). En el tratamiento con adición de thinner (tratamiento 2) se observó que la concentración de amonificantes presentó variación entre una y dos unidades logarítmicas por encima del tratamiento control, indicando una estimulación de estos microorganismos por efecto de la adición de thinner (John *et al.* 2016). Un comportamiento similar se encontró en el tratamiento con vermicomposta y adición de residuo de zanahoria (tratamiento 10), en donde la concentración de amonificantes estuvo hasta dos unidades logarítmicas por encima del tratamiento control y permaneció relativamente constante durante todo el desarrollo de la cinética. Los resultados anteriores indican que la inclusión de un contaminante y la adición de materia orgánica incrementa la concentración de microorganismos amonificantes. En el tratamiento con vermicomposta estéril y residuo de zanahoria más thinner (tratamiento 9, Figura 12 B), se observa que la concentración de microorganismos amonificantes fue similar a la del tratamiento control hasta el día 14, y posteriormente se aprecia un incremento en la concentración de hasta dos unidades logarítmicas hacia el día 28, a diferencia del tratamiento con vermicomposta estéril y residuo de zanahoria (tratamiento 5, Figura 11 B) en donde se observó un incremento de la población amonificante desde el día 7, lo que indica que el thinner tuvo un efecto negativo sobre las poblaciones amonificantes de los residuos de zanahoria retrasando su crecimiento.

#### 6.4.4 Nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) y microorganismos nitritantes ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ ).

En los tratamientos con adición de residuo de zanahoria se encontraron diferencias significativas en la concentración de  $\text{NO}_2^-$  y los microorganismos nitritantes entre el tratamiento control y los tratamientos 3, 4, 5 y 6; sin embargo, no se presentó diferencia significativa entre los tratamientos 5 y 6 ( $p = 0.471$ ) (Figura 13 - a). Se observó que en el tratamiento control la concentración de  $\text{NO}_2^-$  se mantuvo relativamente constante y no se presentó acumulación, presentando concentraciones por debajo de 10 mg/kg ss (Zepeda *et al.* 2006)



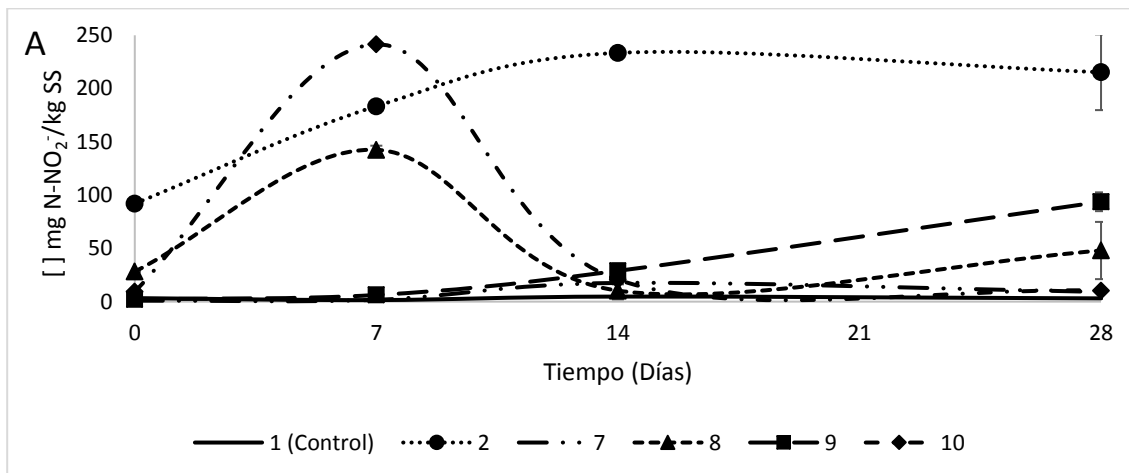
(A)  $\text{NO}_2^-$ , (B) microorganismos nitritantes ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ )

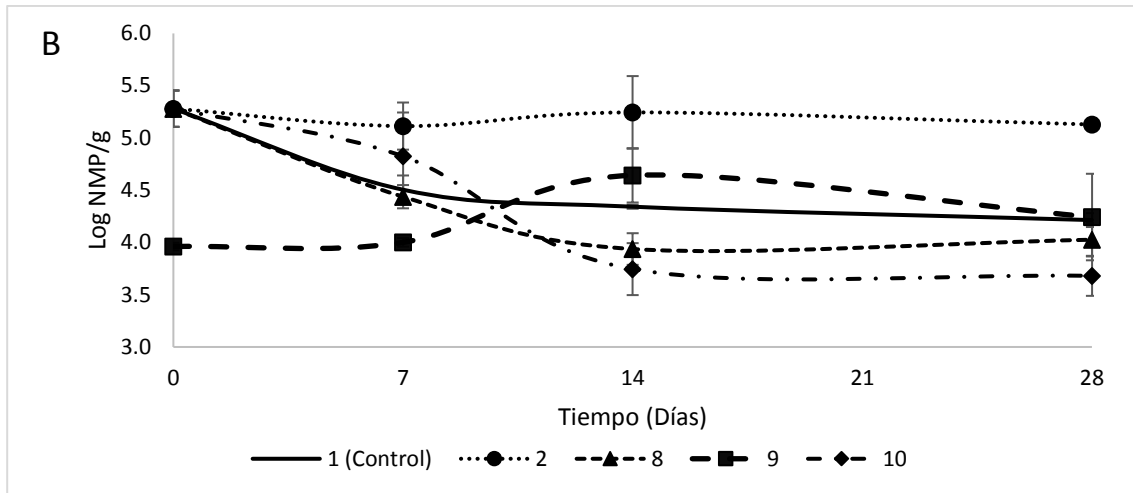
**Figura 13.** Variación de la concentración de  $\text{NO}_2^-$  y microorganismos nitritantes en vermicomposta con inclusión de residuo de zanahoria.

En el tratamiento con vermicomposta estéril y residuo de zanahoria estéril (tratamiento 3, Figura 13 A) se observó que la concentración de  $\text{NO}_2^-$  permaneció constante como era lo esperado, demostrando que no se presentaron efectos abióticos en la concentración de  $\text{NO}_2^-$ . En el tratamiento con vermicomposta y residuo de zanahoria estéril (tratamiento 4), se presentaron fluctuaciones en la concentración de  $\text{NO}_2^-$ , cuya variación estuvo en un rango entre 0 y 40 mg/kg ss aproximadamente. De otro lado, el tratamiento con vermicomposta estéril y residuo de zanahoria (tratamiento 5) presentó un aumento en la concentración de  $\text{NO}_2^-$  hasta 100 veces por encima con respecto al tratamiento control en el día 7, y posteriormente disminuyó hasta una concentración final de aproximadamente 60 mg/kg ss. Un comportamiento similar se observó en el tratamiento con vermicomposta y residuo de zanahoria (tratamiento 6), en donde se presentó un incremento hacia el día 7 de la dinámica y posteriormente disminuyó hasta 40 mg/kg ss aproximadamente. Este comportamiento está relacionado con la acumulación de  $\text{NH}_4^+$  obtenida (figura 11 A), de acuerdo con Shen *et al.* (2003), con altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  hay acumulación de  $\text{NO}_2^-$ , alterando el proceso de nitrificación. De igual manera, se encontró que la materia orgánica provoca una disminución en la concentración de  $\text{NO}_3^-$  y se ha reportado que la materia orgánica modifica la dinámica de las poblaciones microbianas presentes favoreciendo la actividad de los microorganismos desnitrificantes (Jie & Daping 2008), proceso en el cual el  $\text{NO}_3^-$  se reduce a  $\text{NO}_2^-$  favoreciendo su acumulación.

Con respecto al efecto de la materia orgánica sobre la concentración de microorganismos nitritantes, no se presentaron diferencias significativas ( $p = 0.953$ ) entre el tratamiento control y los tratamientos 4 y 6; sin embargo, si se presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento 5. Se observó que la concentración de microorganismos nitritantes en el tratamiento control disminuyó con respecto al día cero y permaneció relativamente constante hasta el final de la dinámica. Un comportamiento similar se presentó en los tratamientos con vermicomposta y residuo de zanahoria estéril (tratamiento 4) y vermicomposta con residuo de zanahoria (tratamiento 6), indicando que la adición de materia orgánica no influye en la concentración de microorganismos nitritantes, lo que confirma que

la acumulación de  $\text{NO}_2^-$  se debe al proceso de desnitrificación. Por otro lado, se observó en el tratamiento con vermicomposta estéril y residuo de zanahoria (tratamiento 5) una concentración de microorganismos nitrificantes por debajo de la encontrada en el tratamiento control, lo que indica que los residuos de zanahoria aportan microorganismos con capacidad de oxidar  $\text{NH}_4^+$ , pero en concentraciones más bajas con respecto a la vermicomposta. Lo anterior no presentó una relación directa con la concentración de  $\text{NO}_2^-$  obtenida (figura 13 A), ya que en este tratamiento se encontró una concentración alta de  $\text{NO}_2^-$ . En este mismo tratamiento, la concentración de  $\text{NH}_4^+$  también resultó ser mayor con respecto al tratamiento control, lo que podría explicar la concentración de  $\text{NO}_2^-$  encontrada en este tratamiento, según lo que sugiere Shen *et al.* (2003). Así mismo, los residuos de zanahoria aportan microorganismos heterótrofos, los cuales compiten por el oxígeno disponible, favoreciendo los procesos de desnitrificación (Beristain – Cardoso *et al.* 2009), ya que como se observa en la figura 15 A, la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en este tratamiento fue significativamente más baja con respecto al tratamiento control.





(A)  $\text{NO}_2^-$ , (B) microorganismos nitritantes ( $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$ ).

**Figura 14.** Variación de la concentración de  $\text{NO}_2^-$  y microorganismos nitritantes en vermicomposta con inclusión de thinner y residuo de zanahoria más thinner.

Por otra parte, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre la concentración de  $\text{NO}_2^-$  entre el tratamiento control y el tratamiento 2, 8, 9 y 10; sin embargo, no fue significativamente diferente con respecto al tratamiento 7 ( $p = 0.146$ ) (Figura 14 A). En el tratamiento con adición de thinner (tratamiento 2) se observó un efecto similar al encontrado previamente (Figura 5), en donde la concentración de  $\text{NO}_2^-$  fue significativamente más alta con respecto al tratamiento control, alcanzando concentraciones cercanas a los 230 mg/kg ss. Resultados similares fueron reportados previamente por Wang *et al.* (2013), quienes indican que los hidrocarburos causan una disminución en la disponibilidad de oxígeno, y sus vapores bloquean los espacios favoreciendo un ambiente altamente reductor. Según Zepeda *et al.* (2006), en suelos con concentraciones de benceno y tolueno entre 20 y 50 mg/kg ss, se manifiesta no sólo la inhibición de los microorganismos oxidadores de  $\text{NH}_4^+$ , sino también la inhibición de la actividad de las bacterias oxidadoras de  $\text{NO}_2^-$ , disminuyendo el rendimiento de  $\text{NO}_3^-$ . Estos resultados no estuvieron acordes a los obtenidos en este estudio, ya que se observó (Figura 14 B) que la concentración de microorganismos nitritantes fue significativamente superior ( $p < 0.05$ ) a la concentración obtenida en el tratamiento control, lo que



indica que estos microorganismos se estimulan por la alta concentración de  $\text{NH}_4^+$  tal como lo reportan Ying *et al.* (2017), quienes encontraron un efecto positivo entre la concentración de  $\text{NH}_4^+$  y la concentración de bacterias oxidadoras de  $\text{NH}_4^+$ . Deni & Penninckx (1999) reportaron que en experimentos *in vitro* las bacterias oxidadoras de  $\text{NH}_4^+$  tienen la capacidad de oxidar hidrocarburos de manera incompleta, y este proceso se da por una inhibición competitiva de la amonio oxigenasa, la cual es la primer enzima relacionada con la nitrificación, pero también es la enzima encargada de la oxidación de hidrocarburos. De igual manera, y de acuerdo con Osuji & Nwoye (2007) e Inglett *et al.* (2005), la disminución en la disponibilidad de oxígeno favorece las condiciones de un ambiente reductor, favoreciendo los procesos de desnitrificación, lo que conlleva a la formación y acumulación de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NH}_4^+$ , como se observó en las figuras 14 A y 12 A respectivamente.

Con respecto al tratamiento con vermicomposta y residuo de zanahoria estéril (tratamiento 8) y vermicomposta con residuo de zanahoria (tratamiento 10), se encontraron comportamientos similares entre estos dos tratamientos, presentando un aumento en la concentración de  $\text{NO}_2^-$  hasta 100 y 250 mg/kg ss respectivamente, hacia el día 7 de la dinámica, y posteriormente se observó una disminución hasta por debajo de 50 mg/kg ss (Figura 14 A). Estos resultados indican que la adición de residuo de zanahoria estéril no presentó un efecto significativo en la acumulación de  $\text{NO}_2^-$ , ya que al comparar los comportamientos de los tratamientos 4 y 8, se aprecia que en el tratamiento 4 (sin adición de thinner), la concentración de  $\text{NO}_2^-$  no fue superior a los 30 mg/kg ss; sin embargo, la concentración de  $\text{NO}_2^-$  en el tratamiento 8 (con adición de thinner) fue hasta 5 veces mayor en el día 7 y dos veces mayor hacia el día 28, lo cual indica que los componentes del thinner son los que favorecen la acumulación de  $\text{NO}_2^-$  en estos tratamientos. Por su parte, el comportamiento entre el tratamiento 6 (vermicomposta con residuo de zanahoria) (Figura 13 A) y el tratamiento 10 (vermicomposta con residuo de zanahoria más thinner) (Figura 14 A) fue similar; sin embargo, la adición de thinner provocó una acumulación de  $\text{NO}_2^-$  de hasta 100 mg/kg ss por encima de la obtenida en el tratamiento 6 en el día 7, por lo cual la presencia de los componentes de thinner favorecieron aún más el efecto de acumulación de  $\text{NO}_2^-$ . De igual manera, se

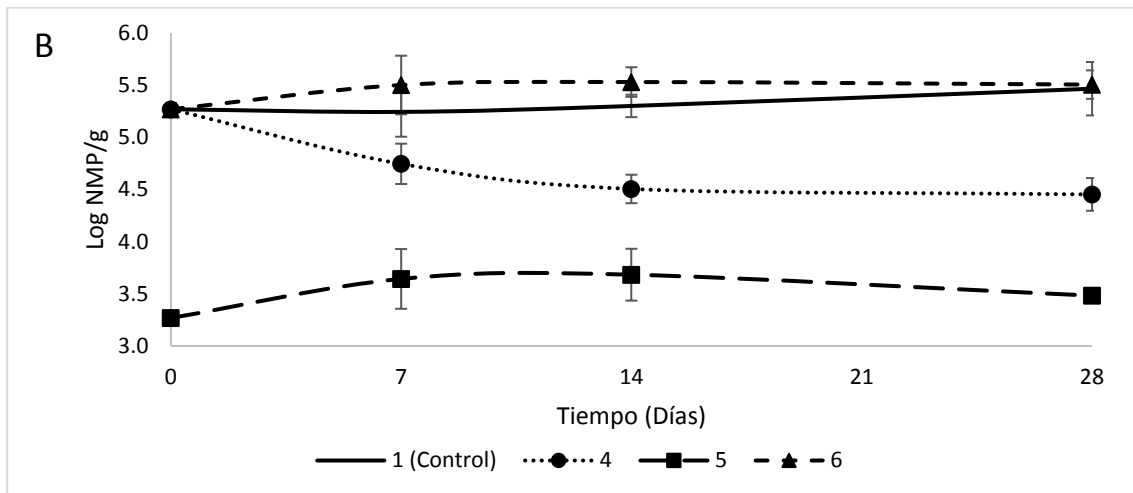
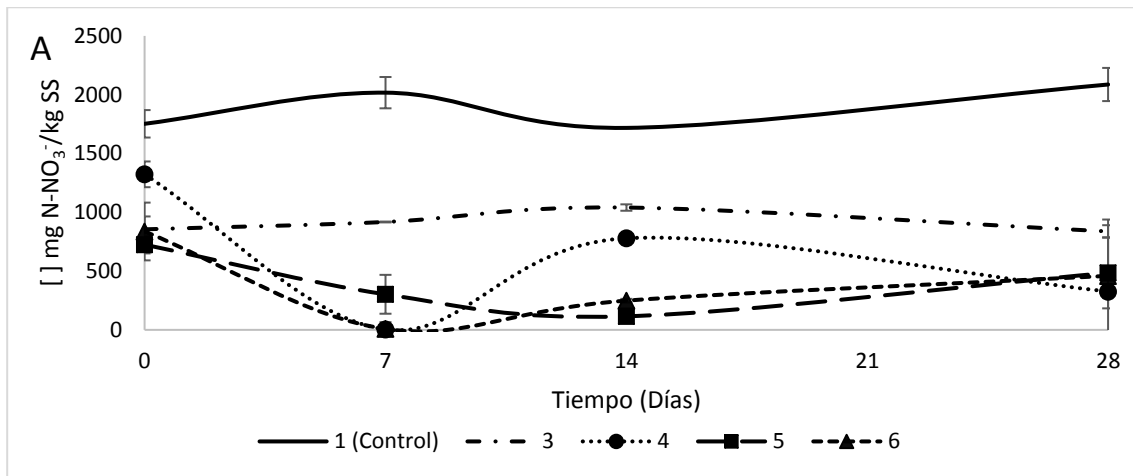
observa que al final de la dinámica la concentración de  $\text{NO}_2^-$  disminuye en los tratamientos con adición de residuo de zanahoria; sin embargo, la concentración de  $\text{NH}_4^+$  sigue siendo más alta (Figura 11 A y 12 A), lo que indica que también se inhiben los procesos de oxidación de  $\text{NH}_4^+$  resultando en su acumulación, a la cual también contribuye la desnitrificación de  $\text{NO}_3^-$ , al observarse la disminución en su concentración (Figura 15 A y 16 A).

Con respecto a la concentración de microorganismos nitrificantes, no se presentó diferencia significativa ( $p = 0.436$ ) entre el tratamiento control y los tratamientos 8, 9 y 10 (Figura 14 B). En el tratamiento con vermicomposta estéril y residuo de zanahoria más thinner (tratamiento 9) se observó una concentración inicial de estos microorganismos más baja en comparación con el tratamiento control (por efecto de la esterilización de la vermicomposta), y posteriormente se observó un aumento en su concentración hacia el día 14 de la cinética, posiblemente por la estimulación de algunos microorganismos heterótrofos presentes en los residuos de zanahoria y con capacidad de oxidar  $\text{NH}_4^+$ .

#### **6.4.5 Nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y microorganismos nitrificantes ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ ).**

La variación en la concentración de  $\text{NO}_3^-$  y microorganismos nitrificantes se presenta en las figuras 15 y 16. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el tratamiento control y los tratamientos 3, 4, 5 y 6, sin embargo no se presentó diferencia significativa entre los tratamientos 4, 5 y 6 ( $p = 0.282$ ) (Figura 15 A). De manera general, se encontró que la inclusión de materia orgánica afecta de forma significativa la concentración de  $\text{NO}_3^-$ , cuyas concentraciones siempre estuvieron muy por debajo con respecto al tratamiento control, en el cual las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  se mantuvieron en un intervalo entre 1500 a 2000 mg/kg ss. En el tratamiento con vermicomposta estéril y adición de residuo de zanahoria estéril (tratamiento 3) se encontró que la concentración de  $\text{NO}_3^-$  se mantuvo relativamente constante, como era de esperarse por ser un tratamiento abiótico. En los tratamientos de vermicomposta con adición de residuo de zanahoria estéril (tratamiento 4), vermicomposta estéril con residuo de zanahoria (tratamiento 5) y vermicomposta con residuo de zanahoria (tratamiento 6) se observó un

comportamiento similar, en donde la concentración de  $\text{NO}_3^-$  disminuyó a partir del día 0 y se mantuvo por debajo de 1000 mg/kg ss hasta el día 28, donde se encontraron concentraciones por debajo de 500 mg/kg ss. Lo anterior indica que la manera de incluir la materia orgánica (estéril o no) no tiene influencia sobre el comportamiento en la concentración de  $\text{NO}_3^-$ , así mismo, que los microorganismos presentes en el residuo de zanahoria no tienen una gran contribución en el proceso de nitrificación; sin embargo, pueden consumir el  $\text{NH}_4^+$  ó el  $\text{NO}_3^-$  disponible para su metabolismo celular. Según Beristain-Cardoso *et al.* (2009), la inclusión de materia orgánica inhibe significativamente los procesos de nitrificación, ya que los microorganismos heterótrofos consumen fuentes nitrogenadas como el  $\text{NH}_4^+$  y lo incorporan a su biomasa, limitando la disponibilidad de esta molécula para ser oxidada hasta  $\text{NO}_3^-$ .



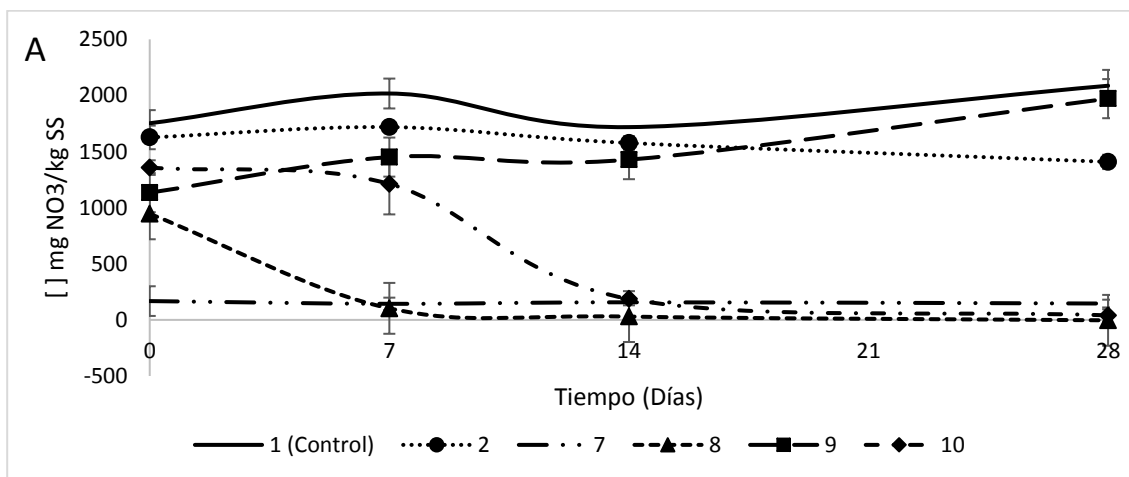
(A)  $\text{NO}_3^-$ , (B) microorganismos nitratantes ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ )

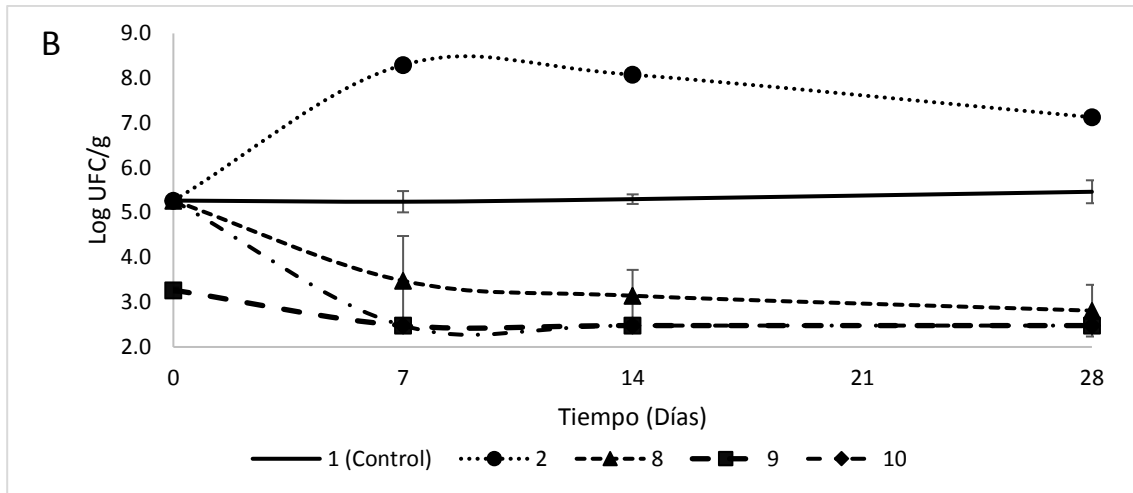
**Figura 15.** Variación de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  y microorganismos nitratantes en vermicomposta con inclusión de residuo de zanahoria.

En la figura 15 B, se observa la variación en la concentración de microorganismos nitratantes ( $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$ ) por efecto de la adición de materia orgánica. Los resultados estuvieron acorde a lo encontrado en la concentración de  $\text{NO}_3^-$ . En el tratamiento control, se encontró una concentración de microorganismos nitritantes relativamente constante durante todo el desarrollo de la dinámica. Por otra parte, en el tratamiento con vermicomposta e inclusión de residuo de zanahoria estéril (tratamiento 4), la concentración de microorganismos nitritantes disminuyó con respecto al día cero y al tratamiento control, lo que indica que la inclusión de materia orgánica afecta el desarrollo de estos microorganismos, y esto a su vez se traduce en una disminución de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  obtenida, como se muestra en la figura 15 – A. Por otro lado, en el tratamiento con adición de residuo de zanahoria (tratamiento 6), se observó una concentración de  $\text{NO}_3^-$  significativamente menor con respecto al tratamiento control; sin embargo, la concentración de microorganismos nitratantes fue similar entre ambos tratamientos. Lo anterior indica que los residuos de zanahoria pueden aportar microorganismos con capacidad para llevar a cabo la oxidación de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$ , tal como se muestra en la figura 15 B, en el comportamiento del tratamiento con vermicomposta estéril y residuo de zanahoria (tratamiento 5), en donde se encontró concentración de microorganismos nitritantes, aunque en una concentración significativamente menor con respecto al tratamiento control. Así mismo, es posible inferir que producto de la esterilización de los residuos de zanahoria en el tratamiento 4, se liberen algunos compuestos que puedan resultar tóxicos para el desarrollo de los microorganismos nitratantes presentes.

Por otra parte, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el tratamiento control y los tratamientos 7, 8, 9 y 10 (figura 16 A). Así mismo, no se presentó diferencia significativa entre los tratamientos 7, 8 y 10 ( $p = 0.0503$ ), así como entre los tratamientos control y 2 ( $p = 0.101$ ). En el tratamiento con vermicomposta estéril y residuo de zanahoria estéril más thinner (tratamiento 7) se

presentó una concentración de  $\text{NO}_3^-$  constante durante el desarrollo de toda la cinética. Se observó que la inclusión de thinner con residuo de zanahoria estéril (tratamiento 8) y thinner con residuo de zanahoria (tratamiento 10) presentaron un efecto similar en la concentración de  $\text{NO}_3^-$ , la cual disminuyó hacia los días 7 y 14 respectivamente, y se mantuvo constante hasta el día 28 en una concentración menor a los 250 mg/kg ss. Un efecto diferente se presentó en el tratamiento con vermicomposta estéril y adición de residuo de zanahoria más thinner (tratamiento 9), en donde la concentración de  $\text{NO}_3^-$  fue en aumento. Lo anterior indica que los microorganismos presentes en los residuos de zanahoria. Por otro lado, se observó que la concentración de  $\text{NO}_3^-$  entre el tratamiento control y el tratamiento con adición de vermicomposta con adición de thinner (tratamiento 2) tuvo un comportamiento similar; sin embargo, la concentración de  $\text{NO}_3^-$  fue siempre menor en el tratamiento 2, y tuvo tendencia a disminuir hacia el día 28. Este comportamiento coincide con lo reportado por Aciego-Pietri & Brookes (2008), en donde la concentración de  $\text{NO}_3^-$  se vio afectada por la presencia de un contaminante orgánico.





(A)  $\text{NO}_3^-$ , (B) microorganismos nitratantes ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ )

**Figura 16.** Variación de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  y microorganismos nitratantes en vermicomposta con inclusión thinner y residuo de zanahoria más thinner.

Como se observa en la figura 16 B, la concentración de microorganismos nitratantes estuvo acorde a lo encontrado con la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en los tratamientos control, vermicomposta con adición de residuo de zanahoria estéril más thinner (tratamiento 8), y vermicomposta con adición de residuo de zanahoria más thinner (tratamiento 10). En el tratamiento control la concentración de microorganismos nitratantes se mantuvo relativamente constante durante todo el desarrollo de la dinámica, sin embargo, en los tratamientos 8 y 10 la concentración de microorganismos nitratantes fue significativamente menor, con una disminución de dos unidades logarítmicas en el final de la dinámica con respecto al día cero y a lo encontrado en el tratamiento control, comportamiento que corrobora los resultados encontrados en la concentración de  $\text{NO}_3^-$ , lo que indica que además de que el  $\text{NO}_3^-$  se asimile en la biomasa de los microorganismos, y que sea utilizado como aceptor final de electrones (Inglett *et al.* 2005), la materia orgánica afecta el desarrollo de estos microorganismos, lo que inhibe el proceso de nitratación ( $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$ ). Jie & Daping (2008) reportaron con base en un análisis de PCR–DGGE del gen 16s que, con el incremento en la concentración de materia orgánica, las poblaciones

dominantes en el suelo se modificaban pasando de microorganismos autótrofos a heterótrofos y a microorganismos desnitrificantes.

Con respecto al tratamiento con adición de thinner (tratamiento 2), se observó un comportamiento diferente en la concentración de microorganismos nitratantes con respecto a los tratamientos con adición de residuos de zanahoria, ya que se observó un aumento en la concentración con respecto al tratamiento control; sin embargo, la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en este tratamiento estuvo por debajo del tratamiento control, y tuvo tendencia a disminuir hacia el día 28 de la dinámica. De acuerdo con lo reportado por Deni & Penninckx (2004), en experimentos con suelos contaminados con hidrocarburos como el diesel, no se encontró inhibición del crecimiento de las bacterias nitratantes, y por el contrario, géneros como el de *Nitrobacter* pueden utilizar los productos orgánicos excretados por bacterias heterotróficas como producto del metabolismo de hidrocarburos. De acuerdo a Scott *et al.* (2014), en un experimento de análisis metagenómico en sedimentos contaminados con hidrocarburos en el golfo de México, se encontró que las rutas metabólicas del ciclo del nitrógeno evidencian un incremento en los procesos de desnitrificación, oxidación anaerobia del amonio (anammox), y que tanto el  $\text{NO}_2^-$  y otras sustancias como el óxido nitroso tienden a acumularse, y por el contrario el  $\text{NO}_3^-$  se consume en el metabolismo microbiano.

#### **6.4.6 Concentración de los compuestos del thinner**

La variación de los compuestos del thinner se presenta en la tabla 15 (dinámicas en frasco abierto) y 16 (dinámicas en frasco cerrado). En la tabla 15 se puede observar que el compuesto más volátil fue el tolueno, en donde se encontró volatilización de cerca del 90% en el tratamiento 7 (vermicomposta estéril con adición de residuo de zanahoria estéril). Con respecto a los demás compuestos, se observó que en el día 14 de la dinámica no se detectó hexanos en los tratamientos 2, 8 y 9. De igual manera, se encontró que el 95.94% del tolueno se había volatilizado hacia el día 28, seguido por el metanol con 69.26% y el 2 – butoxietanol con 49.26%, resultados similares a los reportados por Riffaldi *et al.* (2006) con pérdidas de más del 58% de hidrocarburos por volatilización en tratamientos estériles.

**Tabla 15.** Variación de la concentración de los compuestos del thinner en vermicomposta (frasco abierto).

<b>Tolueno (mg/kg ss)</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	2127.33 ± 197.99 <sup>b</sup>	164.09 ± 15.39 <sup>a</sup>	107.08 ± 2.78 <sup>a</sup>	ND
<b>7</b>	2384.22 ± 292.72 <sup>b</sup>	436.07 ± 22.44 <sup>d</sup>	214.35 ± 0.81 <sup>c</sup>	116.62 ± 1.42 <sup>a</sup>
<b>8</b>	2574.78 ± 104.63 <sup>a</sup>	225.52 ± 1.14 <sup>b</sup>	132.76 ± 3.32 <sup>b</sup>	ND
<b>9</b>	2212.67 ± 199.07 <sup>b</sup>	336.43 ± 11.14 <sup>c</sup>	258.95 ± 9.15 <sup>d</sup>	99.77 ± 0.43 <sup>b</sup>
<b>10</b>	2049.70 ± 68.90 <sup>b</sup>	337.54 ± 31.63 <sup>c</sup>	189.01 ± 3.68 <sup>c</sup>	91.96 ± 2.55 <sup>c</sup>

<b>Metanol (mg/kg ss)</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	3190.45 ± 296.38 <sup>b</sup>	1269.16 ± 75.10 <sup>a</sup>	1040.12 ± 94.35 <sup>a</sup>	597.64 ± 43.96 <sup>a</sup>
<b>7</b>	3139.34 ± 51.55 <sup>b</sup>	1525.52 ± 140.52 <sup>b</sup>	1233.38 ± 90.85 <sup>b</sup>	964.73 ± 66.09 <sup>b</sup>
<b>8</b>	3738.32 ± 255.91 <sup>a</sup>	1618.47 ± 104.81 <sup>b</sup>	1106.38 ± 73.15 <sup>a</sup>	663.30 ± 62.34 <sup>a</sup>
<b>9</b>	3248.59 ± 203.06 <sup>b</sup>	1827.51 ± 91.33 <sup>b</sup>	1472.83 ± 41.39 <sup>b</sup>	1099.67 ± 29.06 <sup>c</sup>
<b>10</b>	2819.23 ± 143.04 <sup>b</sup>	2057.52 ± 147.64 <sup>c</sup>	1061.34 ± 30.78 <sup>a</sup>	908.68 ± 61.11 <sup>b</sup>

<b>2 - Butoxietanol (mg/kg ss)</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	454.28 ± 28.93 <sup>b</sup>	158.66 ± 22.28 <sup>a</sup>	87.70 ± 1.17 <sup>a</sup>	ND
<b>7</b>	509.38 ± 35.15 <sup>c</sup>	378.66 ± 11.97 <sup>b</sup>	311.21 ± 8.16 <sup>c</sup>	258.49 ± 18.18 <sup>a</sup>
<b>8</b>	562.27 ± 39.78 <sup>a</sup>	435.86 ± 9.10 <sup>d</sup>	112.83 ± 21.09 <sup>b</sup>	ND
<b>9</b>	434.61 ± 15.19 <sup>b</sup>	346.18 ± 7.62 <sup>c</sup>	337.52 ± 5.19 <sup>b</sup>	279.50 ± 6.43 <sup>a</sup>
<b>10</b>	483.98 ± 16.03 <sup>c</sup>	451.93 ± 13.86 <sup>d</sup>	276.85 ± 18.95 <sup>c</sup>	261.34 ± 14.77 <sup>a</sup>

<b>Hexanos (mg/kg ss)</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	557.41 ± 29.47 <sup>b</sup>	98.23 ± 2.45 <sup>a</sup>	ND	ND
<b>7</b>	638.15 ± 10.95 <sup>a</sup>	114.83 ± 9.96 <sup>b</sup>	110.40 ± 1.14 <sup>a</sup>	ND
<b>8</b>	631.41 ± 63.28 <sup>a</sup>	103.68 ± 3.50 <sup>b</sup>	ND	ND
<b>9</b>	549.26 ± 38.17 <sup>b</sup>	115.61 ± 4.11 <sup>b</sup>	ND	ND
<b>10</b>	589.88 ± 29.63 <sup>b</sup>	146.14 ± 6.34 <sup>c</sup>	107.81 ± 3.05 <sup>a</sup>	ND

\*Diferentes letras en cada columna indicaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para las concentraciones de tolueno, metanol, 2-butoxietanol y Hexanos respectivamente, según la prueba de Tukey,  $n = 3$ .



Como se había encontrado anteriormente, la adición de residuo de zanahoria provocó un efecto de retención en los compuestos del thinner (Prokop *et al.* 2016), ya que de manera general se encontró que para todos los compuestos la concentración en el tratamiento con vermicomposta más residuo de zanahoria y thinner siempre fue más alta que la encontrada en el tratamiento con thinner sin adición de residuo de zanahoria (tratamiento 2). Anteriormente (Tabla 14) se había observado que de acuerdo al comportamiento observado en los tratamientos con vermicomposta + thinner (VT) y vermicomposta estéril más thinner (Ve), parte de la concentración de CO<sub>2</sub> encontrada en el tratamiento VT provenía de la degradación de algunos de los compuestos del thinner por acción de microorganismos heterótrofos (Osuji & Nwoye 2007) a través de la acción de enzimas como las oxigenasas (Das & Chandran 2011).

**Tabla 16.** Variación de la concentración de los compuestos del thinner en vermicomposta (tratamientos en frasco cerrado).

Tolueno (mg/kg ss)				
Tratamiento	0	7	14	28
B	2658.91 ± 48.50 <sup>a</sup>	943.08 ± 40.04 <sup>a</sup>	844.07 ± 14.19 <sup>a</sup>	736.43 ± 17.91 <sup>a</sup>
G	3325.71 ± 168.19 <sup>b</sup>	1338.16 ± 191.92 <sup>b</sup>	1245.64 ± 146.92 <sup>b</sup>	1032.79 ± 69.22 <sup>c</sup>
H	3889.43 ± 224.86 <sup>c</sup>	1359.49 ± 124.78 <sup>b</sup>	1386.52 ± 166.26 <sup>c</sup>	962.68 ± 21.21 <sup>b</sup>
I	3531.91 ± 73.67 <sup>c</sup>	1212.63 ± 103.29 <sup>b</sup>	1083.00 ± 15.47 <sup>b</sup>	1081.99 ± 30.92 <sup>c</sup>
J	4344.45 ± 90.62 <sup>d</sup>	1496.81 ± 90.32 <sup>b</sup>	1148.41 ± 87.70 <sup>b</sup>	874.37 ± 53.54 <sup>b</sup>

Metanol (mg/kg ss)				
Tratamiento	0	7	14	28
B	4495.27 ± 43.87 <sup>a</sup>	5107.50 ± 211.93 <sup>a</sup>	4748.67 ± 90.72 <sup>a</sup>	4987.90 ± 239.58 <sup>a</sup>
G	4785.49 ± 44.95 <sup>b</sup>	4793.40 ± 151.94 <sup>a</sup>	4962.49 ± 119.81 <sup>a</sup>	4924.66 ± 95.76 <sup>a</sup>
H	5361.57 ± 270.64 <sup>c</sup>	5638.10 ± 199.06 <sup>c</sup>	5798.19 ± 164.46 <sup>c</sup>	5528.01 ± 27.73 <sup>b</sup>
I	4765.78 ± 106.75 <sup>b</sup>	5202.52 ± 166.26 <sup>a</sup>	5288.24 ± 64.96 <sup>b</sup>	4908.48 ± 44.32 <sup>a</sup>
J	5682.17 ± 131.30 <sup>d</sup>	5661.10 ± 254.97 <sup>c</sup>	5947.16 ± 281.30 <sup>c</sup>	5682.39 ± 79.12 <sup>b</sup>

2 - Butoxietanol (mg/kg ss)				
Tratamiento	0	7	14	28
B	546.89 ± 28.68 <sup>a</sup>	628.79 ± 57.86 <sup>a</sup>	588.16 ± 9.33 <sup>a</sup>	452.28 ± 14.66 <sup>a</sup>
G	610.54 ± 2.17 <sup>b</sup>	602.55 ± 51.78 <sup>b</sup>	637.43 ± 27.10 <sup>b</sup>	589.08 ± 3.05 <sup>b</sup>
H	719.16 ± 16.28 <sup>c</sup>	740.83 ± 25.98 <sup>c</sup>	723.25 ± 57.59 <sup>b</sup>	637.33 ± 16.92 <sup>c</sup>

I	625.87 ± 11.94 <sup>b</sup>	655.58 ± 57.29 <sup>a</sup>	657.22 ± 31.41 <sup>b</sup>	577.79 ± 24.04 <sup>b</sup>
J	769.86 ± 14.68 <sup>d</sup>	661.07 ± 19.06 <sup>a</sup>	669.56 ± 42.32 <sup>b</sup>	636.15 ± 31.48 <sup>c</sup>

Hexanos (mg/kg ss)				
Tratamiento	0	7	14	28
B	571.23 ± 64.71 <sup>a</sup>	393.85 ± 6.33 <sup>a</sup>	325.14 ± 12.71 <sup>a</sup>	317.69 ± 8.48 <sup>a</sup>
G	676.81 ± 132.42 <sup>a</sup>	420.60 ± 30.56 <sup>b</sup>	390.92 ± 26.35 <sup>b</sup>	346.46 ± 40.98 <sup>a</sup>
H	713.90 ± 54.55 <sup>b</sup>	357.02 ± 25.37 <sup>a</sup>	381.61 ± 34.14 <sup>b</sup>	336.57 ± 15.84 <sup>a</sup>
I	816.92 ± 47.40 <sup>b</sup>	391.17 ± 17.57 <sup>a</sup>	360.58 ± 12.23 <sup>b</sup>	336.69 ± 26.64 <sup>a</sup>
J	1005.86 ± 58.31 <sup>c</sup>	440.09 ± 14.32 <sup>b</sup>	371.50 ± 29.36 <sup>b</sup>	318.61 ± 21.43 <sup>a</sup>

\* Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para las concentraciones de tolueno, metanol, 2 butoxietanol y hexano respectivamente, según la prueba de Tukey,  $n = 3$ .

Por su parte, con los tratamientos en frasco cerrado se comprobó que la principal vía de transporte de estos componentes como contaminantes del suelo es la volatilización, ya que comparativamente con el experimento en frascos abiertos, en los frascos cerrados se pudo encontrar una mayor concentración de cada uno de los componentes. Se observó que en la medición del headspace de los tratamientos con frasco cerrado solo se encontró tolueno y mezcla de hexanos durante todo el desarrollo de la dinámica. Según Berkowitz *et al.* (2014), el potencial de volatilización de un compuesto se relaciona con su presión de vapor, la cual a su vez influye en otra propiedad como la constante de Henry (H), cuyos valores son mayores en tolueno y hexano ( $6.64 \times 10^{-3}$  y  $1.69$  respectivamente) en comparación con (metanol y 2-butoxietanol  $4.6 \times 10^{-6}$  y  $2.08 \times 10^{-8}$  respectivamente), en donde a mayor valor de H, más volátil es una sustancia (Alberta Environment 2010). Teniendo en cuenta lo anterior, es posible suponer que, por las características de estos componentes, los vapores del tolueno y la mezcla de hexanos saturaron el espacio vacío de los frascos cerrados, limitando la volatilización (aunque mucho más lenta) de los otros componentes, por lo cual la mayor parte de metanol y 2-butoxietanol permaneció en la vermicomposta como se aprecia en la tabla 16. Con respecto al tolueno se observó que la inclusión de residuo de zanahoria favorece la retención de una mayor concentración de este compuesto, en comparación con el tratamiento B (sin residuo de zanahoria). De igual manera, se observó diferencia significativa ( $p$

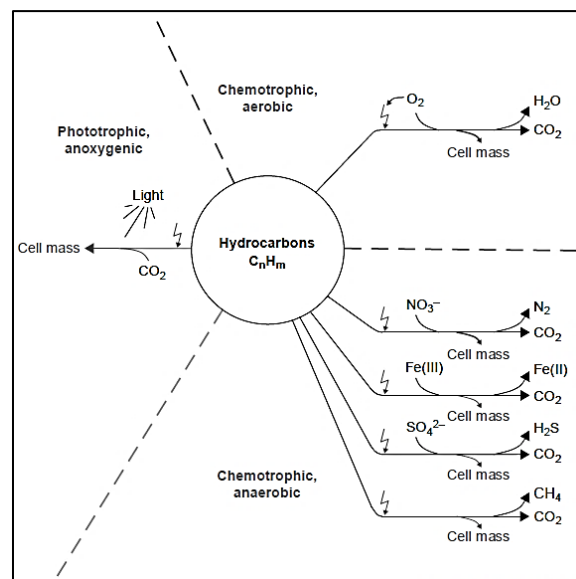
< 0.05) en el día 28 entre el tratamiento con vermicomposta estéril y residuo de zanahoria estéril + thinner (tratamiento G) con respecto a los tratamientos H y J (vermicomposta con residuo de zanahoria estéril + thinner y vermicomposta con residuo de zanahoria + thinner, respectivamente), encontrándose menores concentraciones de tolueno en estos dos tratamientos. Lo anterior permite suponer que además de la volatilización, la disminución en la concentración de tolueno obedece también a la mineralización del mismo. Con respecto al tratamiento con vermicomposta estéril y residuo de zanahoria + thinner (tratamiento I), no se encontraron diferencias significativas con respecto al tratamiento G, lo que supone que no hubo utilización de este compuesto por parte de los microorganismos presentes en la vermicomposta.

Un comportamiento distinto se observó con respecto a la mezcla de hexanos, en donde no se observó diferencias significativas en el día 28 entre los tratamientos con adición de residuo de zanahoria y el tratamiento B. Así mismo no se observaron diferencias significativas entre la concentración obtenida de hexano entre los tratamientos con adición de residuo de zanahoria, lo que supone que no hubo una utilización de este compuesto por parte de los microorganismos presentes, y que la disminución en la concentración de este compuesto obedece sólo a la volatilización.

Con respecto al metanol, la concentración de este compuesto durante el desarrollo de la dinámica permaneció relativamente constante en todos los tratamientos, indicando en primer instancia que no se presentaron pérdidas por volatilización. En el día 28 se encontró diferencia significativa entre el tratamiento G y los tratamientos H y J, lo que en principio podría indicar utilización de esta sustancia por parte de los microorganismos presentes; sin embargo, como se mencionó previamente, la concentración de este compuesto permaneció relativamente constante durante toda la dinámica, lo cual supone un efecto más relacionado con la retención. Por el contrario, no se presentó diferencia significativa entre los tratamientos G e I, lo que indica que, de manera similar con la mezcla de hexanos, los microorganismos presentes en los residuos de zanahoria, en las condiciones descritas, no consumen el metanol como fuente de carbono.

Por su parte, la concentración de 2 – butoxietanol presentó una ligera disminución con respecto a la concentración inicial en el tratamiento B, y al no encontrarse entre los compuestos volatilizados en el headspace, se puede suponer que la disminución obedece al consumo por parte de los microorganismos de la vermicomposta. Con respecto a los tratamientos con inclusión de residuo de zanahoria, se encontraron mayores concentraciones (por efecto de la retención) y que fueron estadísticamente diferentes con respecto al tratamiento B. Entre los tratamientos con inclusión de residuo de zanahoria, se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos H y J con respecto a los tratamientos G e I en el día 28.

Comparativamente entre los resultados presentados en las tablas 17 y 18, y con lo mostrado en la tabla 16 con respecto a la variación de los componentes del thinner en los tratamientos Ve (vermicomposta estéril + thinner) y VT (vermicomposta + thinner), se puede indicar que además de presentarse una utilización de los compuestos del thinner de manera aerobia, en los tratamientos con frasco cerrado se limita la disponibilidad de oxígeno, y por lo tanto se puede presentar también una utilización de estos compuestos de manera anaerobia, como podría ser el caso del tolueno y el 2–butoxietanol. En la figura 17 se presentan los diferentes mecanismos de degradación aerobia y anaerobia para hidrocarburos.

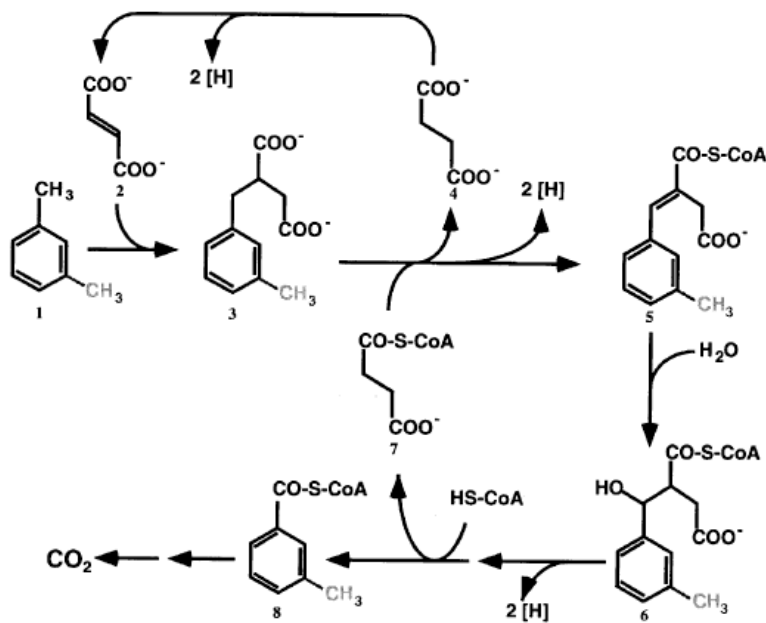


(Widdel & Rabus 2001).

**Figura 17.** Posibles mecanismos verificados experimentalmente para la utilización de hidrocarburos por microorganismos

Según Widdel & Rabus (2001) hay tres tipos de reacciones por las cuales se puede llevar a cabo la utilización de hidrocarburos por microorganismos. En todas las reacciones quimiotróficas, una parte de los hidrocarburos se oxida para la conservación de energía (catabolismo) y otra parte se asimila como parte de la biomasa microbiana. Por otra parte, en la degradación anaerobia de hidrocarburos, el oxígeno no es el único aceptor terminal de electrones, pero es estrictamente necesario para las reacciones de oxigenasas. Finalmente, las reacciones anaerobias comprenden varios mecanismos de activación de hidrocarburos diferentes a los de la activación aerobia, mediante la utilización de aceptores alternos de electrones.

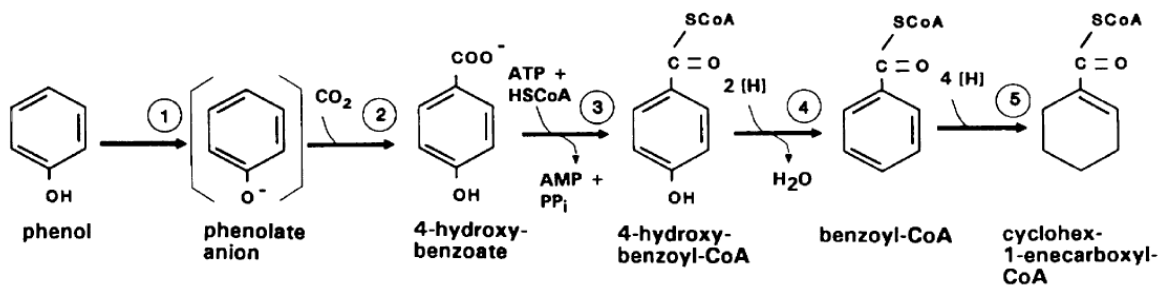
Al respecto, Spormann y Widdel (2000), reportaron el aislamiento de microorganismos desnitrificantes con capacidad para la degradación de tolueno en condiciones anaerobias, los cuales utilizan  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  y sulfatos como fuente de electrones.



1: tolueno; 2: fumarato; 3: bencil succinato; 4: succinato; 5, fenilitaconato; 6: 2 – carboximetil – 3 – hidroxifenilpropionil – CoA; 7: succinil CoA; 8: benzoil – CoA.  
(Spormann y Widdel 2000).

**Figura 18.** Ruta de degradación anaerobia para tolueno y *m* – xileno en bacterias desnitrificantes.

En la figura 18 se aprecia la ruta bioquímica de degradación anaerobia de tolueno y *m*-xileno en condiciones anaerobias llevada a cabo por bacterias desnitrificantes. Según Spormann y Widel (2000), en ambientes anaerobios se requiere de la presencia de grupos funcionales como los hidroxilos, carbonilos y carboxilos presentes en los compuestos orgánicos, como prerequisite para llevar a cabo reacciones siguientes que permiten llevar los sustratos hasta la ruta central oxidativa (ciclo de Krebs). De manera similar, Beristain–Cardoso *et al.* (2009) reportan que, en condiciones anaerobias, el anillo de compuestos aromáticos como el fenol es desestabilizado por ataques reductivos, en donde la ruta bioquímica más estudiada en la oxidación anaerobia es la del benzoil–CoA, con la cual se obtienen los productos necesarios para ingresar al ciclo de Krebs (Figura 19).



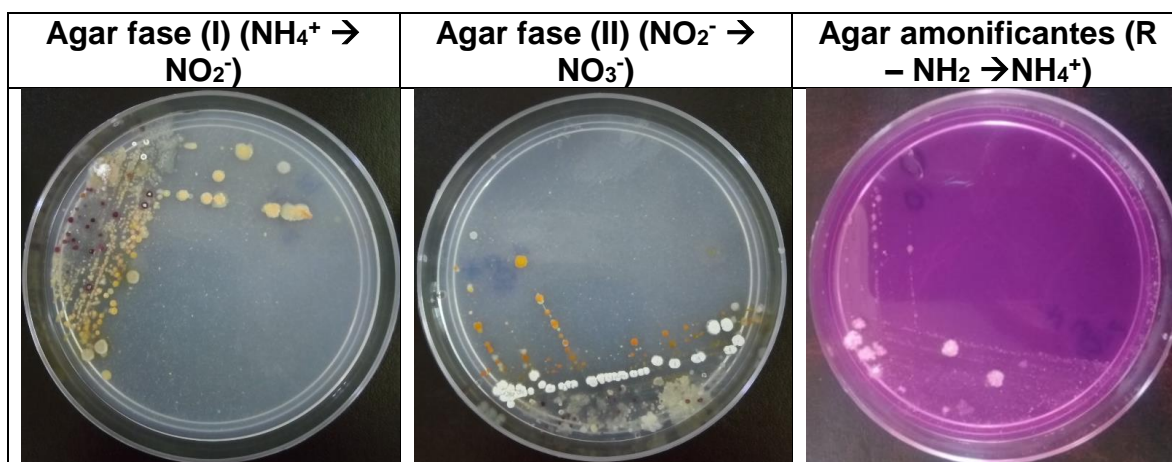
1, 2: fenol carboxilasa; 3: 4–hidroxibenzoato–CoA ligasa; 4: 4–hidroxibenzoil–CoA reductasa (dehidroxilasa); 5: benzoil–CoA reductasa (reducción del anillo aromático). Berinstain – Cardoso *et al.* (2009).

**Figura 19.** Intermediarios y enzimas envueltas en el metabolismo anaerobio de fenol por un microorganismo desnitrificante (*Pseudomonas*).

De acuerdo con los resultados obtenidos en las dinámicas de mineralización de nitrógeno, la variación en la concentración de los componentes del thinner obedece tanto a procesos aerobios como anaerobios, en donde en condiciones de buena disponibilidad de oxígeno, la degradación se llevó a cabo por mecanismos que involucran mono y di – oxigenasas (Das & Chandran 2011). Posteriormente, una vez agotado el oxígeno tanto por la estimulación microbiana, así como por la saturación de la atmosfera por la volatilización de los compuestos del thinner, se dieron las condiciones para un ambiente desnitrificante, en el cual se activaron los mecanismos de degradación anaerobios, con la utilización de aceptores de electrones como el  $\text{NO}_3^-$ . Esta información se puede corroborar con los resultados obtenidos en las dinámicas de mineralización, en donde las concentraciones de  $\text{NO}_3^-$  en presencia de los compuestos del thinner siempre fueron menores al tratamiento control, y por el contrario se presentó la acumulación de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NH}_4^+$ .

#### 6.4.7 Aislamiento e identificación de microorganismos asociados al proceso de nitrificación

A través de siembras en medios de crecimiento selectivos, se lograron aislar 23 microorganismos, con morfología y coloración específica como se muestra en la figura 20. En el anexo 8 se presenta la caracterización de la morfología colonial.



**Figura 20.** Siembra y aislamiento en medios selectivos.

Por medio de la amplificación del fragmento 16S del gen rrs utilizando la técnica de PCR y posterior secuenciación, se identificaron 11 de 23 microorganismos aislados y se obtuvo el género y especie de cada uno. Del total de los microorganismos, 83% fueron gram+, y el 85% fueron bacilos. En la tabla 17 se presentan las características de los microorganismos aislados.



**Tabla 17.** Identificación y características de los microorganismos aislados.

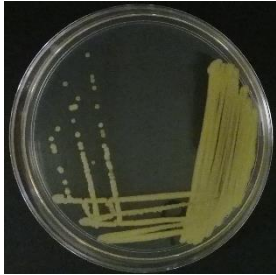

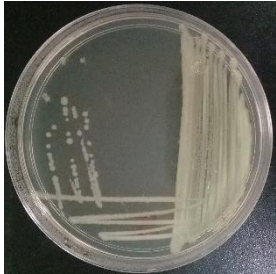
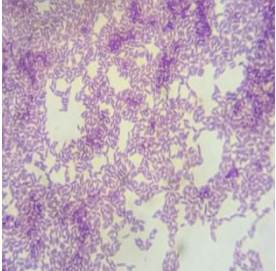


Clave	Identificación	Morfología colonial	Morfología microscópica	% de similitud	% Complementariedad
9N	<i>Arthrobacter rhombi</i>		 Bacilos cortos gram +	98.51	99.7
5R	<i>Microbacterium maritopicum</i>		 Bacilos cortos gram +	98.36	99.6
4R	<i>Glutamicibacter soli</i>		 Bacilos gram +	98.57	99.7

Tabla 17. Continuación.


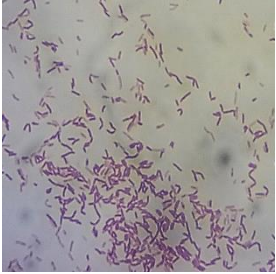

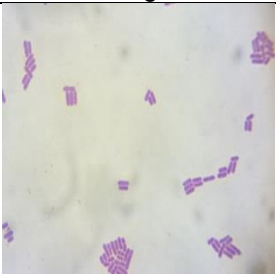

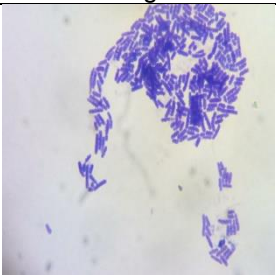
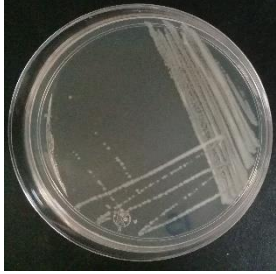
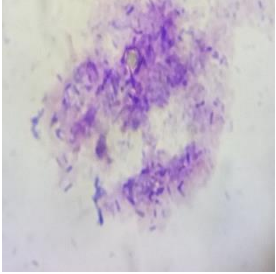
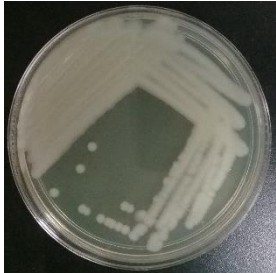
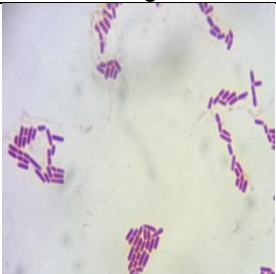

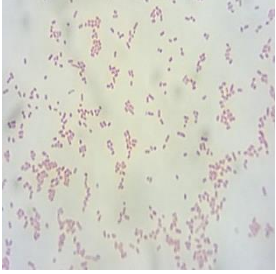

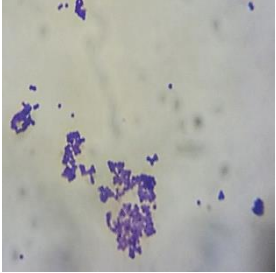
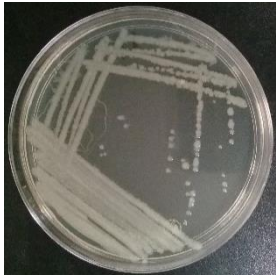

Clave	Identificación	Morfología colonial	Morfología microscópica	% de similitud	% Complementariedad
2A	<i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i>		 Bacilos gram +	98.71	99.5
8N	<i>Bacillus cereus</i>		 Bacilos gram +	98.97	99.3
1N	<i>Bacillus thuringiensis</i>		 Bacilos gram +	98.97	99.0

Tabla 17. Continuación.

Clave	Identificación	Morfología colonial	Morfología microscópica	% de similitud	% Complementariedad
15A	<i>Ochrobactrum pituitosum</i>		 Bacilos gram +	98.85	99.6
13N	<i>Bacillus wiedmannii</i>		 Bacilos gram +	98.84	99.5
7A	<i>Alcaligenes faecalis</i> <i>subsp. phenolicus</i>		 Bacilos cortos gram -	99.50	99.2

**Tabla 17.** Continuación.

Clave	Identificación	Morfología colonial	Morfología microscópica	% de similitud	% Complementariedad
16N	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>		 Cocos gram +	98.18	99.6
11N	<i>Microbacterium esteraromaticum</i>		 Bacilos cortos gram +	97.70	99.4

De los microorganismos identificados, *Arthrobacter rhombi*, *Microbacterium maritypicum*, *Glutamicibacter soli*, *Brachybacterium paraconglomeratum* y *Microbacterium esteraromaticum* pertenecen al filo actinobacteria. Por su parte *Pseudochrobactrum saccharolyticum*, *Ochrobactrum pituitosum* y *Alcaligenes faecalis* subsp. *Phenolicus* pertenecen al filo de las proteobacterias. *Bacillus wiedmannii*, *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis* pertenecen al filo de los firmicutes.

Álvarez *et al.* (2017) indicaron que las actinobacterias son un grupo de microorganismos distribuidos en muchos ambientes y tienen un papel muy importante en el reciclaje de diferentes sustancias, degradación de polímeros y producción de moléculas bioactivas, y se ha demostrado que tienen la capacidad de remover contaminantes orgánicos e inorgánicos, por lo cual representan un gran potencial biotecnológico y son fuertes candidatos para ser usadas en tratamientos de biorremediación.

Bacterias del género *Arthrobacter* son típicas representantes de la microflora del suelo, y son conocidas por su capacidad para degradar hidrocarburos y otro tipo de contaminantes como PHA, pesticidas, monoaromáticos, fenoles, entre otros (Plotnikova *et al.* 2011). Con respecto a *A. rhombi*, este microorganismo fue inicialmente reportado por Osorio *et al.* (1999) aislado a partir de músculo de *Reinherdtius hippoglossoides*, un pez que habita en aguas subterráneas del atlántico norte, y las características reportadas coinciden con lo encontrado en este estudio (Gram +, bacilos cortos, diámetro +/- 1 mm y coloración amarillo tenue). Taha *et al.* (2017) reportaron el aislamiento de *Arthrobacter rhombi*, y encontraron que este microorganismo tiene propiedades halotolerantes, y además puede degradar PHA y utilizarlo como su fuente de carbono.

Por otra parte, basado en la agrupación filogenética, en la similitud de la secuenciación del gen rRNA 16s y homogeneidad en los tipos de peptidoglicano, sistemas de quinonas y perfil lipídico, la especie *Arthrobacter soli* fue reclasificada en el género *Glutamicibacter* gen nov (Busse 2016). La especie *A. soli* fue reportada inicialmente por Roh *et al.* (2008), quienes aislaron este microorganismo a partir de

los sedimentos de aguas residuales en Corea, y encontraron que este microorganismo tiene la capacidad para llevar a cabo la reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ ; así mismo, las características reportadas coinciden con las encontradas en este estudio (Gram +, colonias de pigmentación amarilla, 2 a 4 mm de diámetro). De manera similar, Bassin *et al.* (2012) reportaron el aislamiento e identificación de *Arthrobacter soli* a partir de los lodos de una planta de tratamiento de aguas residuales en Rio de Janeiro – Brasil, y encontraron que este microorganismo también se encuentra envuelto en la nitrificación heterotrófica, al demostrar su capacidad de oxidar  $\text{NH}_4^+$  a hidroxilamina y  $\text{NO}_2^-$ . Lo expuesto anteriormente demuestra que este microorganismo juega un papel importante en la movilización del nitrógeno inorgánico en los diferentes ambientes donde se encuentra. Verstraete & Alexander (1972) indicaron que la desnitrificación heterotrófica llevada a cabo por bacterias del género *Arthrobacter* es un proceso más estable y presenta menos inhibición frente a compuestos orgánicos e inorgánicos que pueden resultar contaminantes, en comparación con los microorganismos que llevan a cabo el proceso de desnitrificación autotrófica.

De otro lado, Al – Mailem *et al.* (2015) reportaron el aislamiento e identificación de *Microbacterium maritpicum* a partir de un sedimento marino, y fue clasificada como una bacteria hidrocarbonoclasta por su capacidad para degradar compuestos derivados de hidrocarburos entre los que se encuentran tolueno, naftaleno y alcanos con cadenas de 16 a 20 átomos de carbono en su estructura. Lin *et al.* (2012) mencionan que el género *Microbacterium* está siendo estudiado como un agente potencial en biotecnología ambiental y proyectos de bioingeniería, y en su trabajo reportaron el aislamiento de *Microbacterium 16SH* a partir de caña de azúcar, encontrando que este microorganismo tiene la capacidad de fijar  $\text{N}_2$  atmosférico, y además promueve el crecimiento del cultivo de caña de azúcar, lo cual lo hace potencialmente útil en agricultura.

Wongbunmakv *et al.* (2017) reportaron la bacteria *Microbacterium esteraromaticum* SBS1-7 aislada de un sedimento estuarino en Tailandia, y con capacidad para la degradación de BTEX de manera individual o en mezcla, y también mostró

tolerancia en un gran rango de hidrocarburos con capacidad de utilizar alcanos y naftaleno como fuente de carbono. Por su parte, Liu *et al.* (2016) mostraron en su estudio la producción de un biofloculante empleando una bacteria álcali – tolerante identificada como *Microbacterium esteraromaticum* C26. Los biofloculantes son sustancias poliméricas extracelulares y que se pueden emplear en el tratamiento de aguas residuales y contaminadas con compuestos orgánicos.

La bacteria *Brachybacterium paraconglomeratum* fue descrita por primera vez por Takeuchi *et al.* (1995) y fue aislada a partir de licor de maíz. Este microorganismo tiene la capacidad de reducir nitrato y produce ureasas, por lo cual puede desdoblar materia orgánica nitrogenada para la producción de  $\text{NH}_4^+$ . Djuric *et al.* (2017) aislaron una cepa de *Brachybacterium paraconglomeratum* a partir de un consorcio de microorganismos degradadores de hidrocarburos aislados de los sedimentos de un canal de aguas residuales en Pancebo – Serbia, y encontraron que este microorganismo puede producir sustancias poliméricas extracelulares (SPE), con potencial utilización como biosorbentes, floculantes y remoción de metales pesados en el tratamiento de aguas residuales.

.Las bacterias pertenecientes al filo proteobacteria han sido reportadas en la ruta de degradación de hidrocarburos, sin embargo, no se encontraron referencias del papel que juegan estos microorganismos en los procesos de mineralización de nitrógeno. Yu *et al.* (2011) encontraron que las bacterias pertenecientes a este filo representaban el grupo dominante en la degradación de los constituyentes recalcitrantes restantes de la degradación primaria de hidrocarburos, sin embargo, bacterias pertenecientes a las Gamma – proteobacterias eran las responsables de la degradación inicial de estos compuestos. Por el contrario, autores como Gao *et al.* (2014) indicaron que las bacterias pertenecientes a la clase Beta y Gamma – proteobacteria fueron los principales degradadores de HTP (Hidrocarburos totales de petróleo), y que por el contrario las bacterias pertenecientes al filo Alpha – proteobacteria no tuvieron incidencia en la degradación de TPH.

Con respecto a la bacteria *Pseudochrobactrum saccharolyticum*, perteneciente a la clase Alpha – proteobacteria, ha sido reportada en estudios anteriores para la

biorremediación de ambientes contaminados con metales tóxicos. Long *et al.* (2013) reportaron la reducción de Cr(VI) a Cr(III) empleando *P. saccharolyticum* aislada de un suelo contaminado con Cr(IV), e inmovilizada en biopelículas insaturadas, y así mismo reportaron que este microorganismo puede producir SPE, conformadas principalmente por polisacáridos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, indicando que la reducción de Cr(IV) está relacionada con la producción de SPE, y que además puede haber un efecto sorción, ya que el Cr(III) puede unirse a través de grupos fosfatos con las sustancias que conforman los SPE. *Ochrobactrum pituitosum* también es una bacteria perteneciente a la clase Alpha – proteobacteria, y su fue reclasificada inicialmente por Huber *et al.* (2010). Este microorganismo que ha sido reportada en la degradación de compuestos orgánicos como el triclorocarbo (TCC), un antimicrobiano sintético utilizado en productos para el aseo personal y de belleza, y se ha reportado como contaminante en sedimentos y que puede afectar el crecimiento de algunas plantas (Sipahutar *et al.* 2017). Así mismo, este microorganismo se ha catalogado como promotor del crecimiento de plantas, lo que lo convierte en un microorganismo versátil para la biorremediación. Por otra parte, *Alcaligenes faecalis subsp. Phenolicus* pertenece a la clase de las Beta – proteobacterias y fue propuesto por primera vez por Refhuss & Urban (2005), quienes la aislaron de un bioprocesador de aguas grises, y encontraron que este microorganismo tiene la capacidad de degradar fenol de manera aerobia, además posee una nitrito reductasa, por lo cual es capaz de llevar a cabo la reducción de nitrito hasta N<sub>2</sub>O. Bharali *et al.* (2011) reportaron una cepa de *Alcaligenes faecalis* aislada de un suelo contaminado con petróleo crudo en la India, con capacidad para la producción de biosurfactantes en un medio de cultivo con 2% v/v de diesel como única fuente de carbono, siendo los biosurfactantes una alternativa de biorremediación importante para aumentar la solubilidad de contaminantes hidrofóbicos como algunos derivados del petróleo.

De manera general, *Bacillus* sp. ha sido identificado como uno de los géneros con potencial para la degradación de hidrocarburos, con actividad reconocida sobre sustancias como el naftaleno y pireno, entre otros. (Darsa *et al.* 2014). Borah & Yadav (2014) reportaron el aislamiento de *Bacillus cereus* DRDU1 a partir de



residuos de hidrocarburos presentes en los motores de automóviles, y que tenía la capacidad de crecer en un medio con 2% v/v de aceite para motor usado como única fuente de carbono, además de mostrar biodegradación de sustancias como el diesel, keroseno y petróleo crudo. Por su parte, Markande & Nerurkar (2016) reportaron el aislamiento de *Bacillus thuringensis* con capacidad de producir bioemulsificantes para contribuir en la degradación de BTEX.

Por la información reportada en trabajos previos con respecto a estos microorganismos, y por lo encontrado en este estudio, la vermicomposta representa un gran potencial como producto biotecnológico para ser empleada en el tratamiento de suelos afectados por la presencia de hidrocarburos y otro tipo de contaminantes como los metales tóxicos.

A través estrategias como la bioaumentación y la bioestimulación, se puede llevar a cabo el diseño e implementación de aplicaciones in situ empleando la vermicomposta como alternativa de biorremediación, en donde además de llevar flora microbiana con capacidad para el tratamiento de estos contaminantes, se aporten nutrientes esenciales presentes en la vermicomposta para favorecer los procesos microbianos y recuperar nutricionalmente los suelos contaminados.

## 7 Conclusiones

- 1) De los componentes evaluados del thinner, se observó que los más volátiles fueron el tolueno y el hexano y los menos volátiles fueron el metanol y el 2-butoxietanol.
- 2) El valor de la concentración letal media de thinner fue de 12.45 ml por kilogramo de suelo seco. Los principales efectos observados en la lombriz de tierra *Eisenia foetida* fueron decoloración, adelgazamiento y fraccionamiento.
- 3) Se encontró que la vermicomposta presentó mayor concentración de nutrientes como carbono, nitrógeno total, nitratos y fósforo. El suelo salino fue el más limitado nutricionalmente.
- 4) La mayor producción de CO<sub>2</sub> se presentó en los tratamientos con adición de thinner y thinner más residuo de zanahoria en comparación con el tratamiento control, entre los cuales la mayor producción de CO<sub>2</sub> fue en los tratamientos con vermicomposta.
- 5) Se encontró que la adición de thinner y residuo de zanahoria más thinner provocó el aumento y la acumulación de las concentraciones de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y por el contrario provocó la disminución en la concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.
- 6) Se detectó que el contenido de materia orgánica y la adición de materia orgánica adicional ejercen un efecto de retención sobre los componentes del thinner, observándose mayores concentraciones retenidas en los tratamientos con suelo de bosque y vermicomposta.
- 7) A través de la comparación de los tratamientos sin adición de thinner, tratamientos estériles con adición de thinner y los tratamientos con adición de thinner sin esterilización, se observó que parte del CO<sub>2</sub> producido proviene de la mineralización de algunos de los componentes del thinner.
- 8) Se encontró que en el tratamiento control de las dinámicas de mineralización con vermicomposta, las concentraciones de mesófilos, microorganismos amonificantes, nitritantes y nitratantes permanecieron constantes durante todo el desarrollo del experimento.

- 9) La adición de residuo de zanahoria más thinner en la vermicomposta provocó un aumento en la concentración de mesófilos aerobios, así como en la concentración de  $\text{CO}_2$  producido, lo que obedece a un efecto de estimulación.
- 10) Se encontró que tanto la inclusión de residuo de zanahoria y residuo de zanahoria + thinner provocaron el incremento y la acumulación de  $\text{NH}_4^+$ , y a su vez estimularon la actividad de las poblaciones microbianas amonificantes.
- 11) Se observó que la inclusión de residuo de zanahoria y residuo de zanahoria más thinner provocó la acumulación e incremento en la concentración de  $\text{NO}_2^-$ , sin embargo, no se observó efecto sobre la población microbiana nitritante.
- 12) Se encontró que la adición solamente de thinner provocó el aumento en la concentración tanto de  $\text{NO}_2^-$  y de población nitritante y nitratante, sin embargo, provocó la disminución en la concentración de  $\text{NO}_3^-$ .
- 13) Se detectó que la concentración de  $\text{NO}_3^-$  y de población microbiana nitratante disminuyó tanto en los tratamientos con residuo de zanahoria y residuo de zanahoria más thinner disminuyó con respecto al tratamiento control, indicando que estas condiciones favorecen el desarrollo de los procesos de desnitrificación.
- 14) Se confirmó a través del desarrollo de las dinámicas en frasco cerrado que la principal ruta de movilización de los compuestos presentes en el thinner es la volatilización, sin embargo, se observó que hay utilización de estos compuestos tanto de manera aerobia como anaerobia.
- 15) Se aislaron 23 microorganismos de los cuales se identificaron 11, en su mayoría gram +, pertenecientes al filo actinobacteria, y a los géneros *arthrobacter* y *microbacterium*, con actividad previamente reportada sobre el tratamiento de contaminantes orgánicos e inorgánicos, y con participación en la mineralización de nitrógeno tanto en el suelo como en ambientes acuáticos.

## **8 Prospectivas**

- 1) Emplear la técnica de cromatografía de gases y espectrometría de masas para confirmar la composición del thinner comercial empleado, y a su vez identificar posibles productos de degradación de estos compuestos, como por el ejemplo el catecol y ácido muconico, y confirmar la degradación de los compuestos del thinner.
- 2) Emplear técnicas para la determinación de compuestos volátiles como el NO, N<sub>2</sub>O con el fin de confirmar que se están favoreciendo los procesos de desnitrificación por efecto de la inclusión de materia orgánica y thinner.
- 3) Someter a los microorganismos aislados a diferentes a las pruebas que sean pertinentes con el fin de evaluar su potencial como degradadores de hidrocarburos, y a su vez evaluar el potencial que tienen como microorganismos nitrificantes.

## 9 Bibliografía

- Aciego – Pietri J.C., Brookes P.C. (2008). Nitrogen mineralisation along a pH gradient of a silty loam UK soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 797–802.
- Ahmed M.G. (2012). Exocrine Pancreatic Carcinogenesis and Autotaxin Expression. *Toxicology Letters*, 211: 5 – 6.
- Aimaretti N.R., Ybalo C.V., Rojas M.L., Plou F.J., Yori J.C. (2012). Production of bioethanol from carrot discards. *Bioresource Technology*, 123: 727 – 732.
- Ai N., Zhou J.B., Yang X.Y., Liang B. (2008). Effects of long - term fertilization and fallowing on soil nitrogen mineralization and exogenous NO<sub>3</sub>-N transformation. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 19(9): 1937 - 1943.
- Ai C., Liang G., Sun J., Zhou W. (2012). Responses of extracellular enzyme activities and microbial community in both the rhizosphere and bulk soil to long-term fertilization practices in a fluvo-aquic soil. *Geoderma*, 173-174: 330 – 338.
- Akpan E.E., Kingsley O., Nwadinigwe C.A. (2013). Bioremediation of Hydrocarbon Polluted Soil in the Lowland Forest Ecosystem in the Niger Delta through Enhanced Natural Attenuation Process (ENAP). *International Journal of Applied Science and Technology*, 3(8): 128 – 137.
- Al - Mailem D., Kansour M., Radwan S. (2015). Bacterial communities associated with biofouling materials used in bench-scale hydrocarbon bioremediation. *Environ Sci Pollut Res*, 22: 3570 – 3585.
- Alberta Environment (2010). Soil and Groundwater Remediation Guidelines for Methanol. Government of Alberta, Canada.
- Alrumman S.A., Standing D.B., Paton G.I. (2015). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University – Science*, 27: 31 – 41.
- Álvarez A., Saez J.M., Davila - Costa J.S., Colin V.L., Fuentes M.S., Cuozzo S.A., Benimeli C.S., Polti M.A., Amoroso M.J. (2017). Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere*, 166: 41 - 62.
- An Y.J., Lee W.M. (2008). Comparative and combined toxicities of toluene and methyl tert-butyl ether to an Asian earthworm *Perionyx excavatus*. *Chemosphere*, 71(3): 407 – 411.
- Arciniega - Carreón I.Y. (2011). Producción de imidasas por las bacterias del tracto digestivo de *Eisenia foetida*. Tesis para obtención de grado de maestría en Bioprocesos. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) - Instituto Politécnico Nacional.

- Argo A., Bongiorno D., Bonifacio A., Pernice V., Liotta R., Indelicato S., Zerbo S., Fleres P., Ceraulo L., Procaccianti P. (2010). A fatal case of a paint thinner ingestion. *Am J Forensic Med Pathol*, 31(2): 186 – 191.
- Asgharnia H., Jafari A.J., Kalantary R.R., Nassen S., Mahvi A., Yaghmaenian K., Esrafil A., Shahamat Y.D. (2014). Influence of bioaugmentation on biodegradation of phenanthrene-contaminated soil by earthworm in lab scale. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12: 150 – 158.
- Ashraf H., Bilal Z.H. (2015). Biosynthesis, partial purification and characterization of invertase through carrot (*Daucus carota L.*) peels. *J Biochem Tech*, 6(1): 867 - 874.
- Asuming – Brempong S., Gantner S., Adiku S.G.K., Archer G., Edusei V., Tiedje J.M. (2008). Changes in the biodiversity of microbial populations in tropical soils under different fallow treatments. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11): 2811 – 2818.
- Atiyeh, R.M., Dominguez J., Sobler S., Edwards C.A. (2000). Changes in biochemical properties of cow manure during processing by earthworms (*Eisenia andrei*, Bouché) and the effects on seeding growth. *Pedobiología*, 44: 709–724.
- Azlan A., Aweng E.R., Ibrahim C.O., Noorhaidah A. (2012). Correlation between Soil Organic Matter, Total Organic Matter and Water Content Correlation between Soil Organic. *Journal Applied Science Environment Management*, 16(4): 353 – 358.
- Bassin J.P., Kleerebezem R., Muyzer G., Soares A., van Loosdrecht M.C.M., Dezotti M. (2012). Effect of different salt adaptation strategies on the microbial diversity, activity, and settling of nitrifying sludge in sequencing batch reactors. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93: 1281 – 1294.
- Baydas G., Ozveren F., Tuzcu M., Yasar A. (2005). Effects of thinner exposure on the expression pattern of neural cell adhesion molecules, level of lipid peroxidation in the brain and cognitive function in rats. *European Journal of Pharmacology*, 512(2-3): 181 – 187.
- Beltrán-Hernández R.I., Coss - Muñoz E., Luna - Guido M.L., Mercado - Garcia F., Siebe C., Dendooven L. (1999). Carbon and nitrogen dynamics in alkaline saline soil of the former Lake Texcoco (Mexico) as affected by application of sewage sludge. *European Journal of Soil Science*, 50(4): 601 – 608.
- Beltrán-Hernández R.I., Luna-Guido M.L., Dendooven L. (2007). Emission of carbon dioxide and dynamics of inorganic N in a gradient of alkaline saline soils of the former lake Texcoco. *Applied Soil Ecology*, 35(2): 390 – 403.
- Beretta A.N., Silbermann A.V., Paladino L., Torres D., Bassahun D., Musselli R., García - Lamohte A. (2014). Soil texture analyses using a hydrometer: modification of the Bouyoucos method. *Ciencia e investigación agraria*, 41(2): 263 – 271.

- Beristain - Cardoso R., Texier A.C., Razo - Flores E., Méndez - Pampín R., Gómez J. (2009). Biotransformation of aromatic compounds from wastewaters containing N and/or S, by nitrification/denitrification: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 8:325–342.
- Berkowitz B., Dror I., Yaron B. (2014). Contaminant Geochemistry: Interactions and Transport in the Subsurface Environment. Second edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014.
- Bertau M., Offermans H., Plass L., Schmidt F., Wernicke H.J. (2014). Methanol: The Basic Chemical and Energy Feedstock of the Future. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Betancur - Galvis L.A., Alvarez - Bernal D., Ramos - Valdivia A.C., Dendooven L. (2006). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated saline–alkaline soils of the former Lake Texcoco. *Chemosphere*, 62: 1749–1760.
- Bharali P., Das S., Konwar B.K., Thakur A.J. (2011). Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65: 682 - 690.
- Borah D., Yadav R.N.S. (2014). Biodegradation of Diesel, Crude Oil, Kerosene and Used Engine Oil by a Newly Isolated *Bacillus cereus* Strain DRDU1 from an Automobile Engine in Liquid Culture. *Arab J Sci Eng*, 39:5337–5345.
- Broz A.P., Verma P.O., Appel C. (2016). Nitrogen Dynamics of Vermicompost Use in Sustainable Agriculture. *Journal of Soil Science and Environmental Management*, 7(11): 173 - 183.
- Busse H.J. (2016). Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66: 9–37
- Castro-Silva C., Ruiz - Valvidiezo V.M., Valenzuela - Encinas C., Alcántara - Hernández R.J., Navarro - Noya Y.E., Vasquez - Nuñez E., Lun - Guido M., Marsch R., Dendooven L. (2013). The bacterial community structure in an alkaline saline soil spiked with anthracene. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(5): 1–20.
- Cavazos - Arroyo J., Pérez - Armendáriz B., Mauricio - Gutierrez A. (2014). Impacts and consequences from hydrocarbon spills on agricultural soils in Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 11: 539 - 550.
- Ceccanti B., Masciandaro G., García Carlos., Macci C., Doni S. (2006). Soil bioremediation: Combination of earthworms and compost for the ecological remediation of a hydrocarbon polluted soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 177(1-4): 383 – 397.

- Chao W.L., Hsu S.F. (2004). Response of the soil bacterial community to the addition of toluene and toluene-degrading bacteria. *Soil Biology & Biochemistry*, 36: 479 – 487.
- Chen Z., Hu S., Hu C., Huang L. Liu H., Vymazal J. (2016). Preliminary investigation on the effect of earthworm and vegetation for sludge treatment in sludge treatment reed beds system. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(12): 11957 - 11963.
- Chevremont A.C., Boudenne J.L., Coulumb B., Farnet A.M. (2013). Impact of watering with UV-LED-treated wastewater on microbial and physico-chemical parameters of soil. *Water Research*, 47(6): 1971–1982
- Choromanska U., DeLuca T.H. (2002). Microbial activity and nitrogen mineralization in forest mineral soils following heating: evaluation of post fire effects. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 263 - 271.
- Chun J., Lee J.H., Jung Y., Kim M., Kim S., Kim B.K., Lim Y.W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57(Pt 10): 2259 – 2261.
- Crecchio C., Gelsomino A., Ambrosoli R., Minati J.L., Ruggiero P. (2004). Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(11): 1873 – 1883.
- Darsa K.V., Thatheyus A.J., Ramya D. (2014). Biodegradation of Petroleum Compound Using the Bacterium *Bacillus subtilis*. *Science International*, 2(1): 20-25.
- Dartsch P.C., Hildenbrand S., Gfrorer W., Kimmel R., Schmahl F.W. (1999). Cytotoxicity of 2-butoxyethanol and its oxidation products in vitro. *Int Arch Occup Environ Health*, 72 (Suppl 3): M57 - M61.
- Das N., Chandran P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 1 - 13.
- Das S., Dash R.H., Chakraborty J. (2016). Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 100: 2967 - 2984.
- De Almeida - Andrade, J., Augusto, F., Fontes - Jardim, I.C.S., (2010). Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Quimica*, 35(3): 17–43.
- De Aquino A.M., Lopes D., Marinho J.G., De - Polli H. (2005). Biomassa microbiana, colóides orgânicos e nitrogênio inorgânico durante a vermicompostagem de diferentes substratos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 40(11): 1087 – 1093.
- Djuric A., Gojic-Cvijovic G., Jakovljevic D., Kekez B., Kojic J.S., Mattinen L.S., Harju I.E., Vrvic M., Beskoski V.P. (2017). *Brachybacterium* sp. CH-KOV3 isolated from an oil-polluted environment–



- a new producer of levan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104: 311–321.
- Delgado-Balbuena L., Aguilar - Chávez A.R., Luna - Guido M., Dendooven L. (2013). Mixing of an anthracene-contaminated soil: A simple but efficient remediation technique? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 96: 238 –241.
- Dendooven L., Alcántara - Hernández R.J., Valenzuela - Encinas E., Luna - Guido M., Perez - Guevara F., Marsch R. (2010). Dynamics of carbon and nitrogen in an extreme alkaline saline soil: A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(6), pp.865–877.
- Deni J., Penninckx M.J. (1999). Nitrification and Autotrophic Nitrifying Bacteria in a Hydrocarbon-Polluted Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9): 4008–4013.
- Deni J., Penninckx M.J. (2004). Influence of long-term diesel fuel pollution on nitrite-oxidising activity and population size of *nitrobacter* spp. in soil. *Microbiological Research*, 159: 323 - 329.
- Dexter A. (2004). Soil physical quality Part I. Theory, effects of soil texture, density, and organic matter, and effects on root growth. *Geoderma*, 120: 201 – 214.
- Dongqiang H., Ma W., Chen D. (2007). Determination of Biodegradation Process of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylenes in Seabed Sediment by Purge and Trap Gas Chromatography. *Chromatographia*, 66(11-12): 889 - 904.
- Ekperusi O.A., Aigboidion F.I. (2015). Biorremediation of petroleum hydrocarbons from crude oil contaminated soil with the earthworm: *Hyperiodrilus*. *Biotech*, 5: 957 – 965.
- Ekperusi O.A., Aigboidion F.I. (2015). Bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons in diesel contaminated soil with earthworm: *Eudrilus eugeniae*. *SpringerPlus*, 4(1): 540 – 553.
- El - Naas M.H., Acio J.A., El Telib A.E. (2004). Aerobic biodegradation of BTEX: Progresses and Prospects. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2: 1104 – 1122.
- Environmental Protection Agency (2005). Toxicological review of n-hexane. Washington, USA:
- Eseigbe F.J., Doherty V.F., Sogbanmu T.O., Otitoloju A.A. (2013). Histopathology alterations and lipid peroxidation as biomarkers of hydrocarbon-induced stress in earthworm, *Eudrilus eugeniae*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(3): 2189 – 2196.
- Espinoza - Navarro O., Ferreira C., Bustos-Obregón E. (2013). Effect of Methamidophos on the Morphology and Male Reproductive Parameters of the Earthworm *Eisenia foetida*, 31(3): 1097–1103.
- Eweis J.B. Ergas S.J. Chang D.P.Y., Schroeder E.D. (1999). Principios de biorrecuperación (Bioremediation). McGraw – Hill, España. 332 p.
- Ezquerro O., Ortiz G., Pons B., Tena M.T. (2004). Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils by multiple headspace solid-phase microextraction. *Journal of*

*Chromatography A*, 1035: 17 – 22.

- Fernández L.C., Rojas N.G., Roldán T.G., Ramirez M.E., Zegarra H.G., Hernández R.U., Reyes R.J., Flores D., Arce J.M. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. I. M. del Pétroleo, ed., Ciudad de México.
- Fernández-Luqueño, F., Vasquez – Nuñez E., Martinez – Suarez C., Salomon – Hernández G., Valenzuela – Encinas C., Franco – Hernández O., Ceballos – Ramirez J.M., Dendooven L. (2013). Bacterial community composition of a saline-alkaline soil amended or not with wastewater sludge and contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *African Journal of Microbiology Research*, 7(28): 3605–3614.
- Flemming B.W. (2000). A revised textural classification of gravel-free muddy sediments on the basis of ternary diagrams. *Continental Shelf Research*, 20(10-11): 1125–1137.
- Fowler D., Steadman C.E., Stevenson D., Coyle M., Rees R.M., Skiba U.M., Sutton M.A., Cape J.N. (2015). Effects of global change during the 21<sup>st</sup> century on the nitrogen cycle. *Atmos. Chem. Phys. Discuss*, 15: 1747 – 1868.
- Franche C., Lindström K., Elmerich C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant and Soil*, 321(1-2): 35–59.
- Fu Y., Shao L., Liu H., Tong L., Liu H. (2011). Ethylene removal evaluation and bacterial community analysis of vermicompost as biofilter material. *Journal of Hazardous Materials*, 192(2): 658 – 666.
- Galbally I.E., Kirstine W. (2002). The Production of Methanol by Flowering Plants and the Global Cycle of Methanol. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 43: 195 –229.
- Gao Y.C., Guo S.H., Wang J.N., Li D., Wang H., Zeng D.H. (2014). Effects of different remediation treatments on crude oil contaminated saline soil. *Chemosphere*, 117: 486 – 493.
- Graj W., Lisiecki P., Szule A., Chrzanowski L., Wojtera - Kwiezor J. (2013). Bioaugmentation with petroleum-degrading consortia has a selective growth-promoting impact on crop plants germinated in diesel oil-contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 224(9): 1676 - 1682.
- He X., Zhang Y., Shen M., Tian Y., Zheng K., Zeng G. (2017). Vermicompost as a natural adsorbent: evaluation of simultaneous metals (Pb, Cd) and tetracycline adsorption by sewage sludge-derived vermicompost. *Environ Sci Pollut Res*, 24: 8375–8384.
- Hernández A., Ferrera-Cerrato R., Rodríguez V. (2003). Nitrogen-Fixing Free-Living Bacteria in Bean Rhizosphere Polluted with Kerosene. *Terra Latinoamericana*, 2(2395-8030): 81–89.
- Hirooka K., Asano R., Nakai Y. (2009). Change in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge during selective incubation for MPN determination. *Journal of*

*Industrial and Microbial Biotechnology*, 36: 679 – 685.

- Hirsch P.R., Mauchline T.H. (2015). The Importance of the Microbial N Cycle in Soil for Crop Plant Nutrition. *Adv Appl Microbiol*, 93: 45 - 71.
- Hoffman C.S., Winston F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2-3): 267 – 272.
- Huber B., Scholz H.C., Kampfer P., Falsen E., Langer S., Busse H.J. (2010). *Ochrobactrum pituitosum* sp. nov., isolated from an industrial environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60: 321–326
- Inglett P.W., Reddy K.R., Corstanje R. (2005). Anaerobic soils. *Applications of soils data*: 72 - 78
- Jadia C., Fulekar M. (2008). Vermicomposting of vegetable waste: A biophysicochemical process based on hydro-operating bioreactor. *African Journal of Biotechnology*, 7(20): 3723 – 3730.
- Jie H., Daping L. (2008). Nitrite Removal Performance and Community Structure of Nitrite-Oxidizing and Heterotrophic Bacteria Suffered with Organic Matter. *Curr Microbiol*, 57: 287 – 293.
- John R.C., Entino E.S., Itah A.Y. (2016). Impact of Crude Oil on Soil Nitrogen Dynamics and Uptake by Legumes Grown in Wetland Ultisol of the Niger Delta, Nigeria. *Journal of Environmental Protection*, 7: 507-515.
- Joimel S., Cortet J., Jolivet C.C., Saby N.P.A., Chenot E.D., Branchu P., Consáles J.N., Lefort C., Morel J.L., Schwartz C. (2016). Physico-chemical characteristics of topsoil for contrasted forest, agricultural, urban and industrial land uses in France. *Science of the Total Environment*, 545-546: 40–47.
- Joshi R., Singh J., Vig A.P. (2015). Vermicompost as an effective organic fertilizer and biocontrol agent: effect on growth, yield and quality of plants. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 14: 137 – 159.
- Juwarkar, A.A., Singh, S.K. & Mudhoo, A., (2010). A comprehensive overview of elements in bioremediation. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 9, pp.215 – 288.
- Kelly K., Harder B. (2003). BTEX: Complete Resolution in Under 6.5 Minutes. The application book. Phenomenex Inc., Torrance, California, USA.
- Keraval B., Lehours A.C., Colombet J., Amblard C., Alvarez G., Fontaine S. (2016). Soil carbon dioxide emissions controlled by an extracellular oxidative metabolism identifiable by its isotope signature. *Biogeosciences*, 13, 6353–6362.
- Kim J.M., Le N.T., Chung B.S., Park J.H., Bae J.W., Madsen E.L., Jeon C.O. (2008). Influence of Soil Components on the Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and *o*-, *m*-, and *p*-Xylenes by the Newly Isolated Bacterium *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23): 7313 – 7320.

- Koebel M., Elsener M. (1995). Determination of urea and its thermal decomposition products by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 689: 164-169.
- Kumar D.S., Kumar P.S., Rajendran N.M., Anbuganapathi G. (2013). Compost maturity assessment using physicochemical, solid-state spectroscopy, and plant bioassay analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(47): 11326 – 11331.
- Laquaniello G., Centi G., Salladini A., Palo E., Perathoner S., Spadaccini L. (2017). Waste-to-methanol: Process and economics assessment. *Bioresource Technology*, 243: 611 – 619.
- Lee E.H., Kim J., Cho K.S., Ahn Y.G., Hwang G.S. (2010). Degradation of hexane and other recalcitrant hydrocarbons by a novel isolate, *Rhodococcus* sp. EH831. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(1): 64 - 77.
- Lefèvre R., Barre P., Moyano F., Christensen B., Bardoux G., Eglin T., Girardin C., Houot S., Katterer T., Van Oort F., Chenu C. (2014). Higher temperature sensitivity for stable than for labile soil organic carbon - Evidence from incubations of long-term bare fallow soils. *Global Change Biology*, 20(2): 633 – 640.
- Li J., Li Y.T., Yang X.D., Zhang J.J., Lin Z.A., Zhao B.Q. (2015). Microbial community structure and functional metabolic diversity are associated with organic carbon availability in an agricultural soil. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(12): 2500 – 2511.
- Li Y.T., Rouland C., Benedetti M., Li F., Pando A., Lavelle P., Dai J. (2009). Microbial biomass, enzyme and mineralization activity in relation to soil organic C, N and P turnover influenced by acid metal stress. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(5): 969–977.
- Lin L., Guo W., Xing Y., Zhang X., Li Z., Hu C., Li S., Li Y., An Q. (2012). The actinobacterium *Microbacterium* sp. 16SH accepts pBBR1-based pPROBE vectors, forms biofilms, invades roots, and fixes N<sub>2</sub> associated with micropropagated sugarcane plants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93:1185 – 1195.
- Liu W., He R., Liu C. (2016). An alkali-tolerant strain *Microbacterium esteraromaticum* C26 produces a high yield of cation-independent bioflocculant. *AIMS Environmental Science*, 3(3): 408-419.
- Liu J., Lu Z., Yang J., Xing M., Yu F., Guo M. (2012). Effect of earthworms on the performance and microbial communities of excess sludge treatment process in vermifilter. *Bioresource Technology*, 117: 214 – 221.
- Liu Y., Zhou Q., Xie X., Lin D., Dong L. (2010). Oxidative stress and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* induced by toluene, ethylbenzene and xylene. *Ecotoxicology*, 19(8): 1551 – 1559.
- Liu Y., Zhou Q.X., Xie X.J., Lin D.S., Rong W.Y. (2010). Toxic effects of toluene, ethylbenzene and xylene in soils on earthworm *Eisenia fetida* and wheat *Triticum aestivum*. *China Environmental Science*, 30(11): 1501 – 1507.

- Lockley D.J., Howes D., Williams F.M. (2004). Percutaneous penetration and metabolism of 2-butoxyethanol. *Archives of Toxicology*, 78(11): 617 – 628.
- Long A., Zhang H., Y Lei (2013). Surfactant flushing remediation of toluene contaminated soil: Optimization with response surface methodology and surfactant recovery by selective oxidation with sulfate radicals. *Separation and Purification Technology*, 118: 612 – 619.
- Long D., Tang X., Cai K., Chen G., Chen L., Duan D., Zhu J., Chen Y. (2013). Cr(VI) reduction by a potent novel alkaliphilic halotolerant strain *Pseudochrobactrum saccharolyticum* LY10. *Journal of Hazardous Materials*, 256– 257: 24– 32.
- López C.E., Gallego - Pico A., Fernández P., Velasco M., Durand J.S. (2010). Two rapid and sensitive automated methods for the determination of nitrite and nitrate in soil samples. *Microchemical Journal*, 94(1): 79 – 82.
- Margesin R., Zimmerbauer A., Schinner F. (2000). Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, 40: 339 – 346.
- Markande A.R., Nerurkar A.S. (2016). Microcosm-based interaction studies between members of two ecophysiological groups of bioemulsifier producer and a hydrocarbon degrader from the Indian intertidal zone. *Environ Sci Pollut Res*, 23:14462–14471.
- Mitra S., Roy P. (2011). BTEX: A serious Ground – water Contaminant. *Journal of Environmental Sciences*, 5(5): 394 – 398.
- Moreno J.L., Bastida F., Ros M., Hernández T., García C. (2009). Soil organic carbon buffers heavy metal contamination on semiarid soils: Effects of different metal threshold levels on soil microbial activity. *European Journal of Soil Biology*, 45(3): 220–228.
- Muhammad S., Müller T., Joergensen R.G. (2008). Relationships between soil biological and other soil properties in saline and alkaline arable soils from the Pakistani Punjab. *Journal of Arid Environments*, 72(4): 448–457.
- Nicholson C.A., Fathepure B.Z. (2005). Aerobic biodegradation of benzene and toluene under hypersaline conditions at the Great Salt Plains, Oklahoma. *FEMS Microbiology Letters*, 245: 257 – 262.
- Nicol G.W., Leininger S., Schleper C., Prosser J.I. (2008). The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. *Environmental Microbiology* 10(11): 2966–2978.
- Njobuenwu D.O., Amadi S.A., Ukpaka P.C. (2005). Dissolution Rate of BTEX Contaminants in Water. *The Canadian Journal Of Chemical Engineering*, 83: 985 . 989.
- Obire O., Nwaubeta O. (2002). Effects of refined petroleum hydrocarbon on soil physicochemical

- and bacteriological characteristics. *J. Appl. Sci. Environ*, 6(1): 39 – 44.
- Osman, K.T., 2014. Soil degradation, conservation and remediation. In *Soil Degradation, Conservation and Remediation*. Springer Science: 149 – 226.
- Osorio C.R., Barja J.L., Hutson R.A., Collins M.D. (1999). *Arthrobacter rhombi* sp. nov., isolated from Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 1217 - 1220.
- Osuji L.C., Nwoye I. (2007). An appraisal of the impact of petroleum hydrocarbons on soil fertility: the Owaza experience. *African Journal of Agricultural Research*, 2(7): 318 - 324.
- Pathma J., Sakthivel N. (2012). Microbial diversity of vermicompost bacteria that exhibit useful agricultural traits and waste management potential. *SpringerPlus*, 1(1): 26 - 31.
- Paul E. (2016). The nature and dynamics of soil organic matter: Plant inputs, microbial transformations, and organic matter stabilization. *Soil Biology & Biochemistry*, 98: 109 - 126.
- Pérez M.C., Álvarez - Hornos F.J., Engesser K.H., Dobslaw D., Gabaldon C. (2016). Removal of 2-butoxyethanol gaseous emissions by biotrickling filtration packed with polyurethane foam. *New Biotechnology*, 33(2): 263 - 272.
- Plotnikova E.G., Yastrebova O.V., Ananina L.N., Dorofeeva L.V., Lysanskaya V.Y., Demakov A. (2011). Halotolerant Bacteria of the Genus *Arthrobacter* Degrading Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Russian Journal of Ecology*, 42(6): 502–509.
- PROFEPA (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente). Comisión Nacional de Hidrocarburos: Reporte de Derrames de Petróleo Crudo al Primer Semestre de 2014
- Prokop Z., Necasoya A., Klanova J., Cupr P. (2016). Bioavailability and mobility of organic contaminants in soil: new three-step ecotoxicological evaluation. *Environ Sci Pollut Res*, 23: 4312 – 4319.
- Qi R., Li J., Lin Z., Li Z., Li Y., Yang X., Zhang J., Zhao B. (2016). Temperature effects on soil organic carbon, soil labile organic carbon fractions, and soil enzyme activities under long-term fertilization regimes. *Applied Soil Ecology*, 102: 36–45.
- Rehuss M., Urban J. (2005). *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* subsp. nov. a phenol-degrading, denitrifying bacterium isolated from a graywater bioprocessor. *Systematic and Applied Microbiology*, 28: 421–429.
- Reyes-Hernández, F.A. (2014). Pretratamiento para la elaboración de vermicomposta con desechos orgánicos de verdura. Tesis de Licenciatura UPIBI-IPN.
- Reza J., Salazar G., Trejo A. (1997). Evaluation of composition and evaporation behavior of

- commercial thinner samples expended in México city. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 13(2): 87 - 95.
- Riffaldi R., Levi – Minzi R., Cardelli R., Palumbo S., Saviozzi A. (2006). Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 170(1-4), 3 – 15.
- Rinaldi A., Da Silva M.R. (2011). Degradation of BTX in Contaminated Soil by Using Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and Potassium Permanganate (KMnO<sub>4</sub>). *Water Air Soil Pollut*, 217: 245 – 254.
- Rodríguez-Seijo A., Andrade M.L. (2015). Characterization of soil physico-chemical parameters and limitations for revegetation in serpentine quarry soils (NW Spain). *Journal of Soils and Sediments*.
- Roh S.W., Sung Y., Nam Y.D., Chan H.W., Kim K.H., Yoon J.H., Jeon C.O., Oh H.M., Bae J.W. (2008). *Arthrobacter soli* sp. nov., a novel bacterium isolated from wastewater reservoir sediment. *The Journal of Microbiology*, 46(1): 40 - 44.
- SCFI (2007). Norma Oficial Mexicana NMX-FF-109-SCFI-2007: Humus de lombriz (lombricomposta) - especificaciones y métodos de prueba. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial.
- Scott N.M., Hess M., Bouskill N.J., Mason O.U., Jansson J.K., Gilbert J.A. (2014). The microbial nitrogen cycling potential is impacted by polyaromatic hydrocarbon pollution of marine sediments. *Frontiers in Microbiology*, 5(108): 1 - 8.
- SEMARNAT (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000: Establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y analisis. Secretaria de medio ambiente y recursos naturales.
- SEMARNAT (2012). Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2012: Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Secretaria de medio ambiente y recursos naturales.
- Shen Q.R., Ran W., Cao Z.H. (2003). Mechanisms of nitrite accumulation occurring in soil nitrification. *Chemosphere*, 50, 747–753.
- Shin K.H., Kim K.W. (2001). Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil using earthworm (*Eisenia Foetida*). *Environmental Monitoring and Assessment*, 70(1-2), pp.93–103.
- Shina S.S., Zadi S.S. (2008). Gas chromatography - mass spectral analysis of paint thinner. *Asian Journal of Chemistry*, 20(8): 6365 - 6368.
- Sihag S., Pathak H., Jaroli D.P. (2014). Factors Affecting the Rate of Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons. *Int. J. Pure App. Biosci*, 2(3): 185 - 202.

- Sieg K., Fries E., Puttmann W. (2008). Analysis of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes and n-aldehydes in melted snow water via solid-phase dynamic extraction combined with gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1178: 178 – 186.
- Singh R.P., Singh P., Ibrahim M.H., Hashim R. (2011). Land Application of Sewage Sludge: Physicochemical and Microbial Response. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 214. Springer Science+Business Media, LLC.
- Singh S.P., Kaur S., Singh D. (2015). Death by explosion of paint thinner: a case report. *J Punjab Acad Forensic Med Toxicol*, 15(1): 34–36.
- Sipahutar M.K., Vangnai A.S. (2017). Role of plant growth-promoting *Ochrobactrum* sp. MC22 on trichloroan degradation and toxicity mitigation to legume plants. *Journal of Hazardous Materials*, 329: 38–48.
- Smith R.V., Doyle R.M., Burns L.C. Stevens R.J. (1997). A model for nitrite accumulation in soils. *Soil Biol. Biochem*, 29(8): 1241 – 1247.
- Song H.G. (2003). Degradation of humus-bound metabolites generated from toluene and o-xylene in soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51:129 – 132.
- Spencer J.L., Van Heyst B.J. (2013). Effect of different intermediate amendments on pH and ammonia emissions of composted poultry mortalities. *J. Appl. Poult. Res*, 22: 700 – 714.
- Spormann A.M., Widdel F. (2000). Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation*, 11: 85–105.
- SSA (1994). Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. Secretaria de Salud.
- Starek A., Szymczak W., Zapor L. (2008). Hematological effects of four ethylene glycol monoalkyl ethers in short-term repeated exposure in rats. *Archives of Toxicology*, 82(2): 125 – 136.
- Stein L.Y., Klotz M.G. (2016). The nitrogen cycle. *Current Biology*, 26(3): 94 - 98.
- Stevenson B.A., Sarmah A.K., Smernik R., Hunter D.W.F., Fraser S. (2016). Soil carbon characterization and nutrient ratios across land uses on two contrasting soils: Their relationships to microbial biomass and function. *Soil Biology and Biochemistry*, 97: 50–62.
- Taha M., Shahsavari E., Aburto - Medina A., Foda M.F., Clarke B., Roddick F., Ball A.S. (2017). Bioremediation of biosolids with *Phanerochaete chrysosporium* culture filtrates enhances the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Applied Soil Ecology*, In press.
- Takeuchi M., Fang C - X., Yokota A. (1995). Taxonomic Study of the Genus *Brachybacterium*: Proposal of *Brachybacterium conglomeratum* sp. nov., nom. rev., *Brachybacterium paraconglomeratum* sp. nov., and *Brachybacterium rhamnosum* sp. nov. *International Journal*



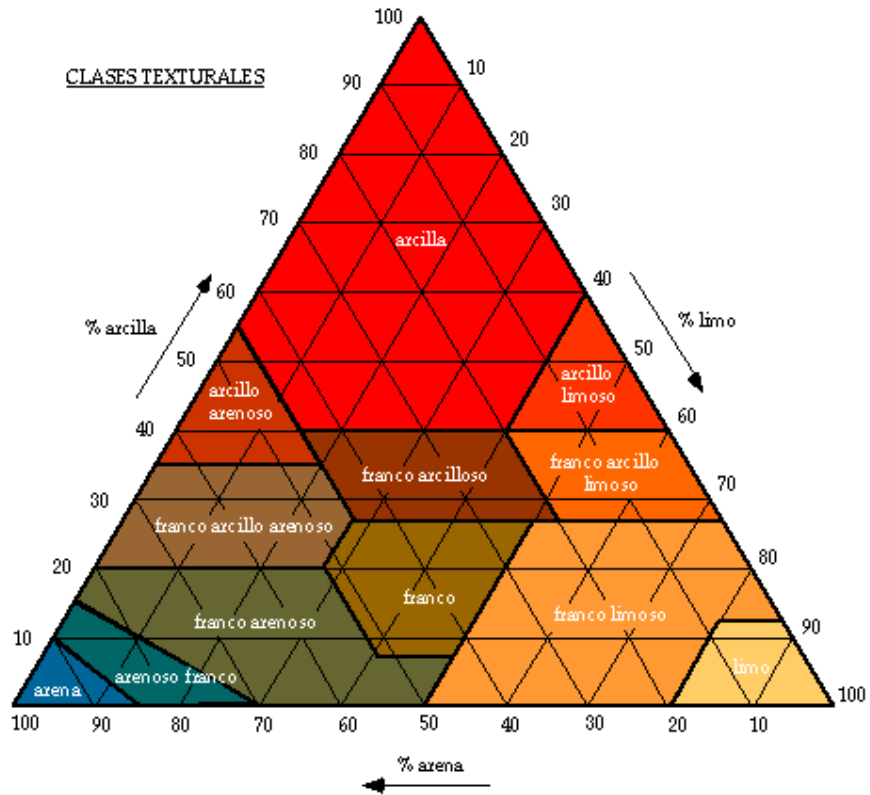
*of systematic bacteriology*, 45(1): 160-168

- Tejada M., Masciandaro G. (2011). Application of organic wastes on a benzo(a)pyrene polluted soil. Response of soil biochemical properties and role of *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 668 – 674.
- Tejada M., Gómez I., Franco - Andreu L., Benitez C. (2016). Role of different earthworms in a soil polluted with oxyfluorfen herbicide . Short-time response on soil biochemical properties. *Ecological Engineering*, 86: 39 – 44.
- Vicent T., Caminal G., Eljarrat E., Barcelo D. (2013). Emerging Organic Contaminants in Sludges: Analysis, Fate and Biological Treatment. The Handbook of Environmental Chemistry. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Vásquez-Murrieta M., Migueles – Garduño I., Franco – Hernández O., Govaerts E., Dendooven L. (2006). C and N mineralization and microbial biomass in heavy-metal contaminated soil. *European Journal of Soil Biology*, 42(2): 89–98.
- Verstraete W., Alexander M. (1972). Heterotrophic Nitrification by *Arthrobacter* sp. *Journal of Bacteriology*, 110(3): 955-961.
- Wang Y., Feng J., Lin Q., Lyu X., Wang X., Wang G. (2013). Effects of crude oil contamination on soil physical and chemical properties in Momoge Wetland of China. *Chinese Geographical Science*, 23(6), 708–715.
- Wei X., Ma T., Wang Y., Wei Y., Hao M., Shao M., Zhang X. (2016). Long-term fertilization increases the temperature sensitivity of OC mineralization in soil aggregates of a highland agroecosystem. *Geoderma*, 272: 1 – 9.
- Widdel F., Rabus R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 259 – 276.
- Wongbunmak A., Khiawjan S., Suphantharika M., Pongtharangkul T. (2017). BTEX- and naphthalene-degrading bacterium *Microbacterium esteraromaticum* strain SBS1-7 isolated from estuarine sediment. *Journal of Hazardous Materials*, 339: 82–90.
- Wu R.H., Zhi Q.Q., Su W.C., Lu C.T., Sun R.H., Zhu K., Yan P. (2015). Measurement of the activities of biodiesel and benzene to several environmental organisms. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 44(10): 109 – 112.
- Xie N.Z., Liang H., Huang R.B., Xu P. (2014). Biotechnological production of muconic acid: current status and future prospects. *Biotechnology Advances*, 32: 615 – 622
- Xu Z., Wu M., He Y. (2013). Toluene Biofiltration Enhanced by Ryegrass. *Bull Environ Contam Toxicol*, 90: 646 – 649.

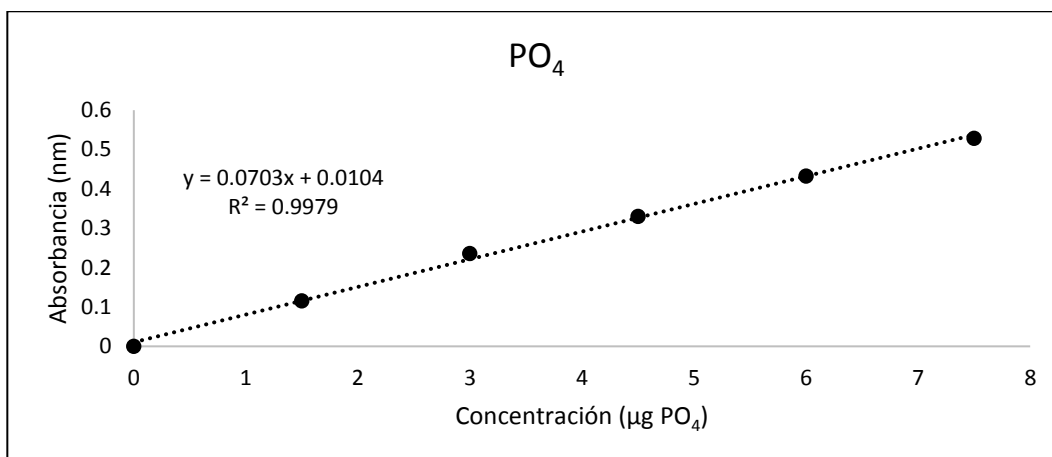
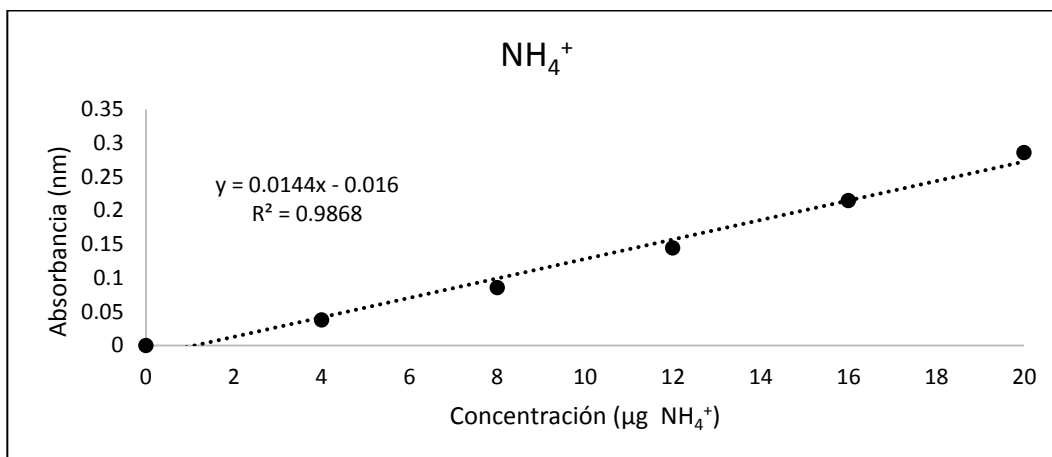
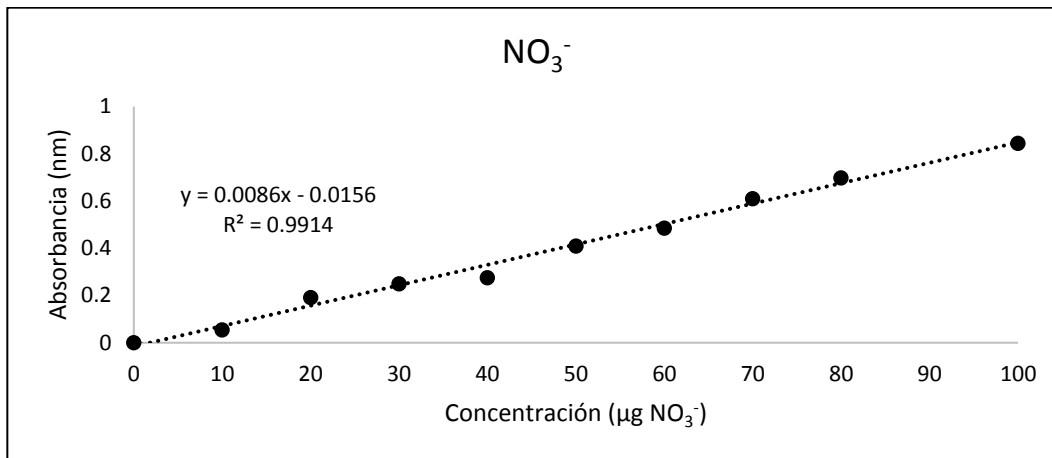
- Yadav A., Garg V.K. (2011). Industrial wastes and sludges management by vermicomposting. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 10(3): 243 – 276.
- Yajima Y., Funayama M., Niitsu H., Nata M., Kanawaku Y., Sakai J., Aoki Y. (2005). Concentrations of toluene in the body killed by an injury to the head shortly after ingesting thinner. *Forensic Science International*, 147: 9 – 12.
- Yang C., Chen F., Luo S., Xie G., Zeng G., Fan C. (2010). Effects of surfactants and salt on Henry's constant of n-hexane. *Journal of Hazardous Materials*, 175: 187 – 192.
- Yilmaz B., Canpolat S., Sandal S., Akpolat N., Kutlu S., Ilhan N., Kelestimur H. (2006). Paint thinner exposure inhibits testosterone synthesis and secretion in a reversible manner in the rat. *Reproductive Toxicology*, 22(4): 791 – 796.
- Ying J., Li X., Wang N., Lan Z., He J., Bai Y. (2017). Contrasting effects of nitrogen forms and soil pH on ammonia oxidizing microorganisms and their responses to long-term nitrogen fertilization in a typical steppe ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry*, 107: 10 - 18
- Yu S., Li S., Tang Y., Wu X. (2011). Succession of bacterial community along with the removal of heavy crude oil pollutants by multiple biostimulation treatments in the Yellow River Delta, China. *Journal of Environmental Sciences*, 23(9): 1533 – 1543.
- World Health Organization (2005). Concise International Chemical Assessment Document 10: 2-Butoxyethanol.
- Zepeda A., Texier A.C., Razo - Flores E., Gomez J. (2006). Kinetic and metabolic study of benzene, toluene and m-xylene in nitrifying batch cultures. *Water research*, 40: 1643 – 1649.
- Zhang L., Zhang C., Cheng Z., Yao Y., Chen J. (2013). Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by the bacterium *Mycobacterium cosmeticum* byf-4. *Chemosphere*, 90(4): 1340 – 1347.

## 10 Anexos

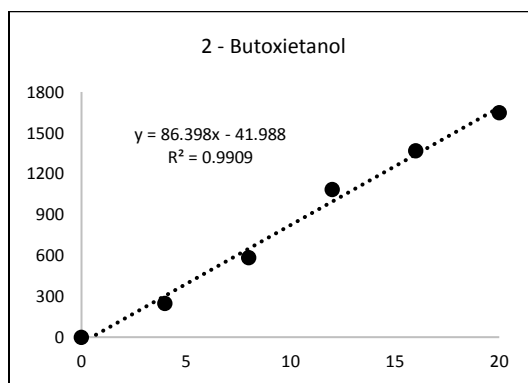
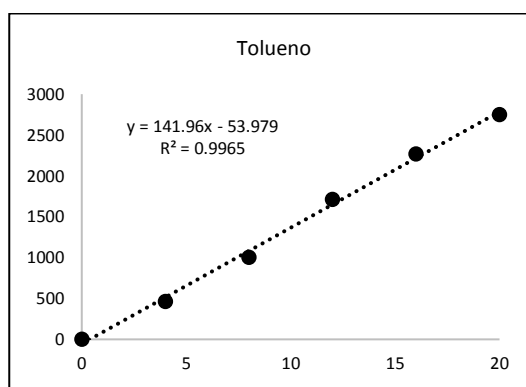
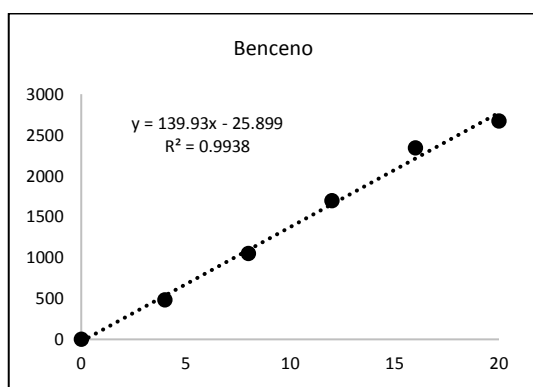
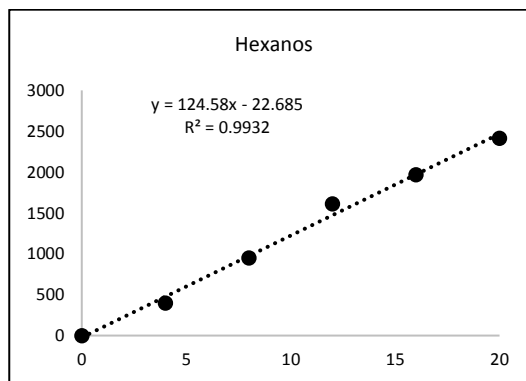
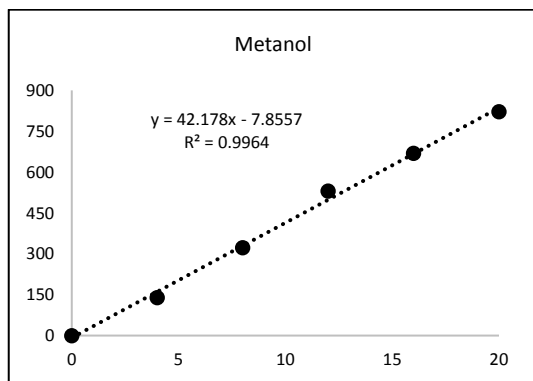
Anexo 1. Diagrama de clases texturales para la determinación de textura empleando el método de Bouyoucos.



**Anexo 2. Curva tipo para la determinación de la concentración de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y fosforo soluble ( $\text{PO}_4$ )**

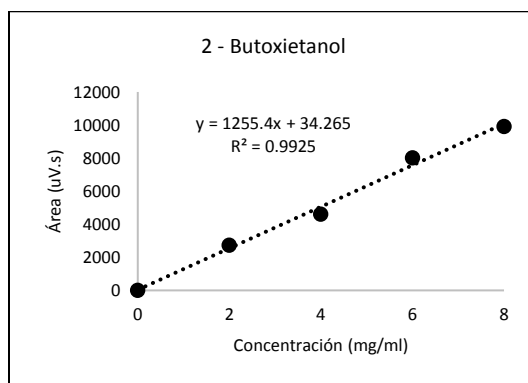
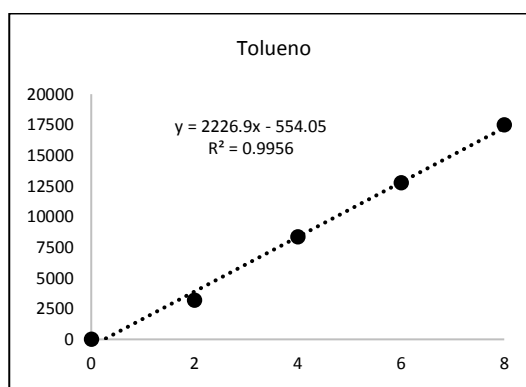
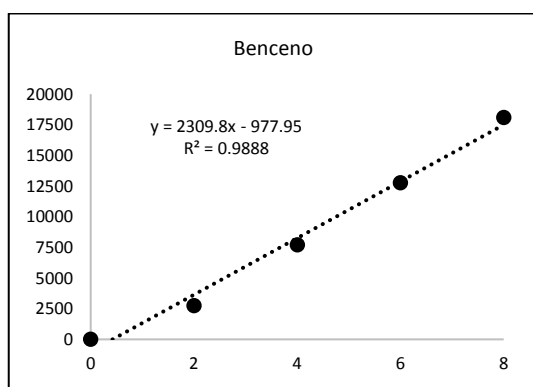
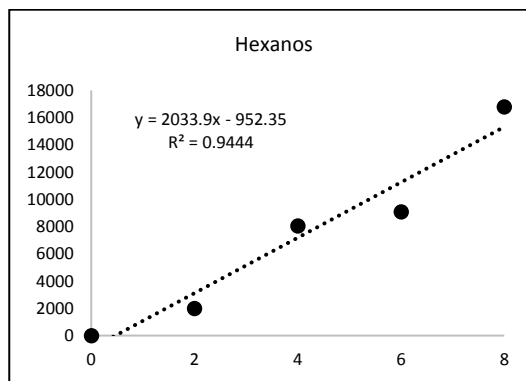
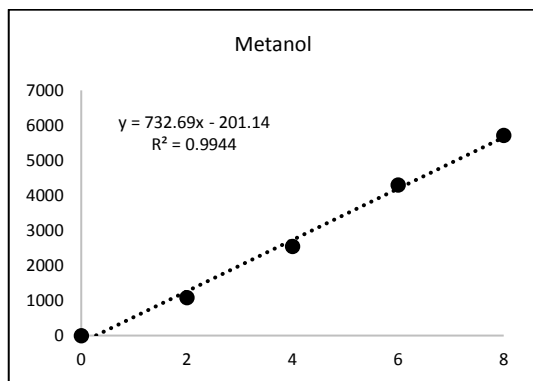


### Anexo 3. Curva tipo para la determinación de concentración de los componentes del thinner en configuración de equipo con rango 20.



Eje X: Área (uV.s); Eje Y: Concentración (mg/ml)

#### Anexo 4. Curva tipo para la determinación de concentración de los componentes del thinner en configuración de equipo con rango 1.



Eje X: Área (uV.s); Eje Y: Concentración (mg/ml)

**Anexo 5. Composición de medios selectivos para la determinación de microorganismos amonificantes ( $R - NH_2 \rightarrow NH_4^+$ ), nitritantes ( $NH_4^+ \rightarrow NO_2^-$ ) y nitratantes ( $NO_2^- \rightarrow NO_3^-$ ) y reactivo de Griess I y II.**

<b>Amonificantes</b>	
<b>Componente</b>	<b>Cantidad (g)**</b>
Urea	20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
Extracto de levadura	0.1
Rojo de fenol	0.01
Agar bacteriológico*	15

<b>Nitritantes</b>	
<b>Componente</b>	<b>Cantidad (g)**</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	0.5
NaCl	0.3
CaCO <sub>3</sub>	0.75
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.3
FeSO <sub>4</sub>	0.03
Agar bacteriológico*	15

<b>Nitratantes</b>	
<b>Componente</b>	<b>Cantidad (g)**</b>
KNO <sub>2</sub>	0.3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
NaCl	0.3
CaCO <sub>3</sub>	0.75
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.3
FeSO <sub>4</sub>	0.03
CaCl <sub>2</sub>	0.3
Agar bacteriológico*	15

<b>Reactivo de Griess I</b>	
<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Ácido sulfanílico (g)	0.6
Ácido acético 30% (ml)	100

<b>Reactivo de Griess II</b>	
<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Alfa – naftilamina (g)	0.6
Ácido acético 30% (ml)	100

**\*Preparación en medio sólido**

**\*\*Cantidad para 1 litro de medio**

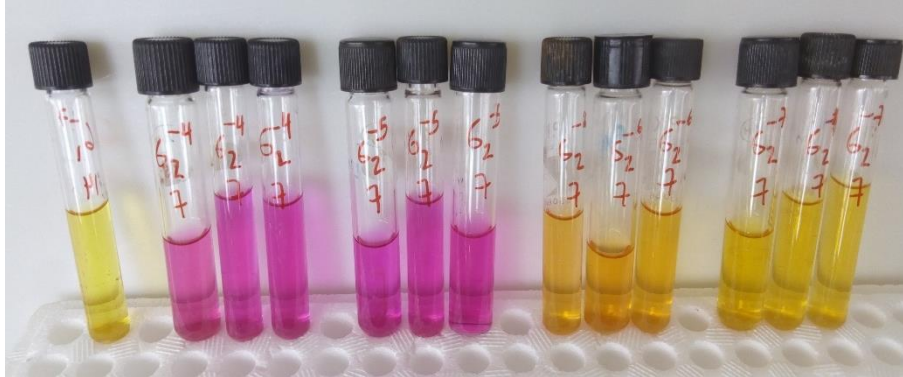
**Anexo 6. Tabla de Mc Graddy para una serie de tres tubos.**

<b>N° Característico</b>	<b>NMP</b>	<b>N° Característico</b>	<b>NMP</b>	<b>N° Característico</b>	<b>NMP</b>
000	<0.3	111	1.1	222	3.5
001	0.3	112	1.5	223	4.2
002	0.6	113	1.9	230	2.9
003	0.9	120	1.1	231	3.6
010	0.3	121	1.5	232	4.4
011	0.61	122	2.0	233	5.3
012	0.92	123	2.4	300	2.3
013	1.2	130	1.6	302	3.9
020	0.62	131	2.0	302	6.4
021	0.93	132	2.4	303	9.5
022	1.2	133	2.9	310	4.3
023	1.6	200	0.91	311	7.5
030	0.94	201	1.4	312	12
031	1.3	202	2.0	313	16
032	1.6	203	2.6	320	9.3
033	1.9	210	1.5	321	15
100	0.36	211	2.0	322	21
101	0.72	212	2.7	323	29
102	1.1	213	3.4	330	24
103	1.5	220	2.1	331	46
110	0.73	221	2.8	332	110

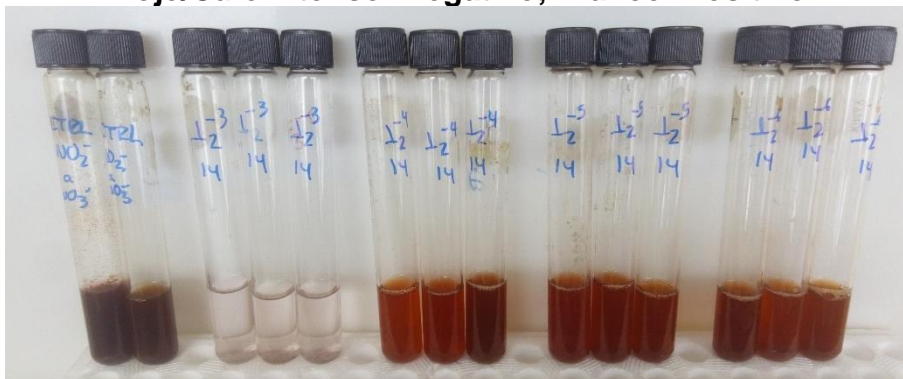


## Anexo 7. Coloración de medios selectivos para microorganismos nitrificantes.

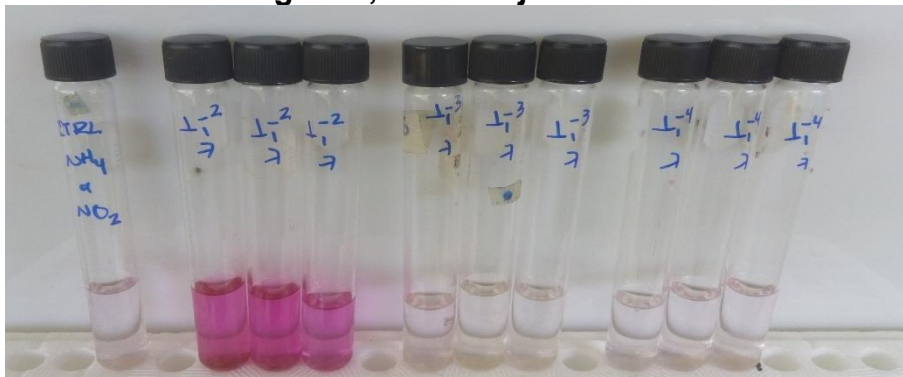
**Medio selectivo para el crecimiento de amonificantes ( $R-NH_2 \rightarrow NH_4^+$ )**  
**Amarillo: Negativo; Rosa: Positivo**



**Medio selectivo para el crecimiento de nitritantes ( $NH_4^+ \rightarrow NO_2^-$ )**  
**Después de agregar reactivos de Griess I y II:**  
**Rojo/Café intenso: Negativo; Blanco: Positivo**



**Medio selectivo para el crecimiento de nitratantes ( $NO_2^- \rightarrow NO_3^-$ )**  
**Después de agregar reactivos de Griess I y II:**  
**Blanco: Negativo; Rosa/Rojo intenso: Positivo**



**Anexo 8. Caracterización colonial de los aislados.**

<b>Característica</b>	<b>Clave</b>							
	<b>2A</b>	<b>5A</b>	<b>4A</b>	<b>7A</b>	<b>9A</b>	<b>11A</b>	<b>12A</b>	<b>15 A</b>
<b>Tamaño (mm)</b>	2	2 - 3	2	12	1	2.5	3	1.5
<b>Aspecto</b>	Humedo	Seco	Humedo	Humedo	Humedo	Seco	Seco	Humedo
<b>Borde</b>	Entero	Entero	Entero	Irregular	Entero	Entero	Irregular	Entero
<b>Luz transmitida</b>	Traslúcida	Opaca	Opaca	Traslucida	Opaca	Opaca	Opaca	Traslucida
<b>Luz reflejada</b>	Brillante	Mate	Brillante	Brillante	Brillante	Mate	Mate	Brillante
<b>Color</b>	Beige	Naranja	Amarilla crema	Beige	Beige	Blanco	Blanco	Beige
<b>Elevación</b>	Convexa	Convexa	Concava	Convexa	Concava	Concava	Concava	Concava
<b>Superficie</b>	Lisa	Lisa	Umbilical	Rugosa	Lisa	Rugosa	Lisa	Lisa
<b>Forma</b>	Redonda	Redonda	Redonda	Irregular	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda
<b>Pigmento</b>	No	No	No	No	No	No	Si	No

**Anexo 8. Caracterización colonial de los aislados. (Continuación)**

<b>Característica</b>	<b>Clave</b>							
	<b>11N</b>	<b>8N</b>	<b>1N</b>	<b>13N</b>	<b>7N</b>	<b>9N</b>	<b>16N</b>	<b>6N</b>
<b>Tamaño (mm)</b>	2	4	5	3	2	3	1	1
<b>Aspecto</b>	Humedo	Seco	Seco	Seco	Seco	Seca	Humedo	Seco
<b>Borde</b>	Entero	Irregular	Irregular	Entero	Irregular	Entero	Entero	Entero
<b>Luz transmitida</b>	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca	Traslucida	Traslucida
<b>Luz reflejada</b>	Brillante	Mate	Mate	Mate	Brillante	Brillante	Brillante	Mate
<b>Color</b>	Amarillo claro	Beige	Beige	Beige	Naranja	Amarillo	Amarillo claro	Beige
<b>Elevación</b>	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
<b>Superficie</b>	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
<b>Forma</b>	Redonda	Redonda	Irregular	Redonda	Irregular	Redonda	Redonda	Redonda
<b>Pigmento</b>	No	No	No	No	No	No	No	No

**Anexo 8. Caracterización colonial de los aislados. (Continuación)**

<b>Característica</b>	<b>5R</b>	<b>9R</b>	<b>11R</b>	<b>10R</b>	<b>4R</b>	<b>3R</b>	<b>13R</b>
<b>Tamaño (mm)</b>	2	3	0.5	2	8	2	0.5
<b>Aspecto</b>	Humedo	Seco	Humedo	Humedo	Humedo	Humedo	Seco
<b>Borde</b>	Entero	Entero	Entero	Entero	Entero	Entero	Entero
<b>Luz transmitida</b>	Traslucida	Opaca	Traslucida	Opaca	Opaca	Opaca	Opaca
<b>Luz reflejada</b>	Brillante	Mate	Brillante	Brillante	Brillante	Brillante	Mate
<b>Color</b>	Amarillo	Salmon	Beige	Amarillo	Amarillo claro	Amarillo crema	Amarillo claro
<b>Elevación</b>	Concava	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa	Convexa
<b>Superficie</b>	Plana	Plana	Lisa	Lisa	Plana	Lisa	Lisa
<b>Forma</b>	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda	Ovalada	Redonda	Redonda
<b>Pigmento</b>	No	No	No	No	No	No	No