



CIATEC

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA MEDIANTE  
ACOPLAMIENTO DE BIOAUMENTACIÓN, BIOESTIMULACIÓN Y  
BIOVENTEO PARA LA REMEDIACIÓN DE UN SUELO COSTERO  
CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS INTEMPERIZADOS.

# Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

Doctora en Ciencia y Tecnología  
en la Especialidad de Ingeniería Ambiental.

PRESENTA:

M.C Verónica Jiménez Hernández

Director de Tesis:

Dr. Ricardo Jaime Guerra Sánchez.

Codirector:

Dra. Jaquelina González Castañeda.



León, Guanajuato, México, enero de 2018

<b>Capítulo</b>	<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>		10
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>		12
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA</b>		14
2.1 El suelo		15
2.1.1 Propiedades del suelo		16
2.2 Petróleo		16
2.3 Suelo de zonas petroleras		20
2.4 Características del suelo contaminado por hidrocarburos intemperizados		21
2.5 Mecanismos de transferencia de los hidrocarburos		25
2.5.1 Advección		28
2.5.2 Difusión		28
2.5.3 Dispersión		29
2.6 Suelos costeros y no costeros		29
2.7 Hidrocarburos intemperizados		30
2.8 Remediación		31
2.8.1 Requerimientos de una tecnología de remediación		33
2.8.2 Bioaumentación		34
2.8.3 Bioventeo		34
2.8.4 Bioestimulación		35
2.9 Mecanismos de biodegradación de los hidrocarburos		36
2.9.1 Biodegradación de los alcanos		38
2.9.2 Biodegradación de los alquenos		38
2.9.3 Biodegradación de los compuestos alicíclicos		39
2.9.4 Biodegradación de compuestos aromáticos		39
2.10 Degradación por hongos y levaduras		40
2.11 Biodegradación por bacterias		42
2.12 Biotransformación de los hidrocarburos intemperizados		42
2.13 Hipótesis		44
2.14 Justificación		44
2.15 Objetivo general		45
2.16 Objetivos específicos		45
<b>3. METODOLOGÍA</b>		46
3.1 Localización del sitio y caracterización fisicoquímica del suelo		48
3.1.1 Muestreo		48
3.1.2 Sitio contaminado		48
3.1.2.1 Identificación de metales mediante ICP-Masas		49
3.2 Bioaumentación		49
3.2.1 Cinética de crecimiento de bacterias		50
3.2.2 Cinética de crecimiento de hongos y levaduras		51
3.2.3 Resiembra del consorcio para el estudio de la morfología colonial		51
3.2.4 Aislamiento e identificación bacteriana		52

3.2.5	Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN)	52
3.2.6	Amplificación del gen 16S ARN e identificación de las especies bacterianas	53
3.2.7	Análisis cromatográfico de la conversión de la fracción pesada del crudo maya en los inóculos de Agua Dulce y Estero de Pantano	53
3.3	Bioestimulación	55
3.3.1	Optimización del medio enriquecido	55
3.3.2	Preparación del suelo contaminado	58
3.3.3	Pruebas de biodegradación y evaluación de tres procesos para la biodegradación	58
3.3.4	Análisis por espectrofotometría infrarrojo (FTIR) evaluar la biodegradación de hidrocarburos	59
3.3.5	Cuantificación de la fracción asfáltica por espectrofotometría UV	59
3.3.6	Cuantificación de la actividad microbiana mediante la producción de CO <sub>2</sub>	60
3.3.6.1	Cuantificación del carbono orgánico	61
3.3.7	Determinación de parámetros fisicoquímicos del suelo tratado	61
3.4	Configuración del acoplamiento de bioaumentación, bioestimulación y bioventeo.	61
3.4.1	Monitoreo de los parámetros de control	62
3.5	Pruebas directa de toxicidad aguada en el suelo	64
3.5.1	Prueba rápida de germinación	65
3.5.2	Prueba directa de toxicidad agua en suelos contaminados con hidrocarburos	65

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1	Caracterización del suelo y propiedades del contaminante	66
4.1.1	Identificación de metales mediante ICP-Masas	68
4.2	Bioaumentación	70
4.2.1	Cinética de crecimiento bacteriano	76
4.2.2	Cinética de crecimiento de hongos y levaduras	78
4.2.3	Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN)	83
4.2.4	Amplificación del gen 16S ARN e identificación de las especies bacterianas	84
4.2.4.1	Identificación y aislamiento de las cepas microbianas del inóculo de Agua Dulce y Estero de Pantano	85
4.2.5	Análisis cromatográfico de la bioconversión de la fracción pesada del crudo maya en los inóculos de Agua Dulce y Estero de Pantano	87
4.3	Bioestimulación	92
4.3.1	Optimización del medio enriquecido	93
4.3.1.1	Respiración microbiana	93
4.3.1.2	pH	94

4.3.1.3	Porcentaje de humedad	96
4.3.1.4	Conductividad eléctrica	98
4.3.1.5	Porcentaje de materia orgánica	100
4.3.1.6	Determinación gravimétrica de los hidrocarburos de fracción pesada	101
4.3.1.7	Análisis del coeficiente de Pearson	102
4.3.2	Preparación del suelo contaminado	104
4.3.2.1	Pruebas de biodegradación	103
4.3.2.2	Análisis por espectrofotometría infrarrojo (FTIR)	104
4.3.2.3	Cuantificación de la fracción asfáltica por espectrofotometría UV	106
4.3.2.4	Cuantificación de la actividad microbiana mediante la producción de CO <sub>2</sub>	108
4.3.2.5	Determinación de parámetros fisicoquímicos del suelo tratado	
4.3.2.6	Cuantificación de hongos y bacterias en el suelo tratado	111
4.4	Acoplamiento de bioaumentación, bioestimulación y Bioventeo	113
4.4.1	Identificación de hidrocarburos mediante análisis FTIR	116
4.5	Pruebas de toxicidad aguada del suelo	120
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	122
<b>6</b>	<b>ANEXOS</b>	124
<b>7</b>	<b>BIOLIOGRAFÍA</b>	129

### Índice de figuras

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Clasificación de los hidrocarburos	13
2	Transporte de nutrientes, agua y microorganismos en un suelo no contaminado	18
3	Transporte de nutrientes, agua y microorganismos en un suelo contaminado	20
4	Distribución de los contaminantes orgánicos en las cuatro fases del suelo	23
5	Degradación de alcanos	35
6	Biodegradación de alquenos	36
7	Biodegradación del ciclohexano	37
8	Degradación del benceno	38
9	Biotransformación de los hidrocarburos	41
10	Metodología para la biodegradación de los hidrocarburos intemperizados	46
11	Variables de entrada y salida en la biodegradación de hidrocarburos intemperizados con medios de cultivo enriquecidos y con el consorcio	56

	microbiano	
12	Variables de entrada y salida del proceso acoplando bioestimulación y bioventeo	61
13	Sitio Agua Dulce y Estero de pantano contaminados con hidrocarburos intemperizados	66
14	Evaluación de emulsificación empleando diferentes formulaciones de nutrientes esenciales	70
15	Producción de emulsión	72
16	Estimación de la producción de biomasa (SSV/L) en el inóculo Agua Dulce (AD) y Estero de Pantano (EP)	73
17	Biodegradación de los HFP en el medio enriquecido de Bushnell Haas, adicionado de hidrocarburos, con inóculo de Agua Dulce o Estero de Pantano, durante catorce días de incubación	75
18	Cinética de crecimiento bacteriano en el estudio de la degradación de fracción pesada	77
19	Colonias bacterianas más abundantes después de la cinética de crecimiento estudiada en los consorcios microbianos Agua Dulce y Estero de Pantano	82
20	Electroforesis del gel agarosa de la extracción de ADN de cada cepa. Pozos A-G: cepas. Pozo H: Control negativo	83

### Índice de figuras (continuación)

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
21	Electroforesis del gel agarosa del 16S, 1542 bp amplificado mediante PCR. Pozo A: marcador de peso molecular 1 KB plus. Pozo B-H: Cepa 1-7. Pozo A: Control negativo	84
22	Árbol filogenético de las especies más abundantes en la degradación del petróleo crudo Maya	85
23	Aumento de la biomasa a las 24 horas en medio líquido AST de las seis especies bacterianas más abundantes	86
24	Cromatograma de los principales componentes identificados a las cero horas del inóculo Agua Dulce	88
25	Cromatograma de los principales componentes identificados a las 24 horas del inóculo Agua Dulce	89
26	Cromatograma de los principales componentes identificados a las cero horas del inóculo Estero de Pantano	90
27	Cromatograma de los principales componentes identificados a las 24	91

	horas del inóculo Estero de Pantano	
28	(a) Estimación de la respiración microbiana a los 7, 14 y 28 días de incubación, expresada en mg CO <sub>2</sub> /kg suelo seco. (b) Diagrama de Pareto donde se muestran los factores que son significativos durante la producción de CO <sub>2</sub>	94
29	(a) Estimación del pH para los 12 tratamientos a los 7, 14 y 28 días de incubación. Se presentan también los valores de pH para el control positivo (P) que es suelo estéril y el control negativo (N) que es ladrillo molido. (b) Diagrama de Pareto donde se muestran los factores que son significativos durante la producción de CO <sub>2</sub>	96
30	(a) Estimación de la humedad para los 12 tratamientos a los 7, 14 y 28 días de incubación. Se presentan también los valores de humedad para el control positivo (P) que es suelo estéril y el control negativo (N) que es ladrillo molido. (b) Diagrama de Pareto donde se muestran los factores que son significativos para la humedad	98
31	Valores registrados de CE para los 12 tratamientos a los 7, 14 d y 28 días de incubación. Las líneas representan la desviación estándar; los números del 1 al 12, corresponden a los experimentos, P control positivo (suelo estéril) y N control negativo (ladrillo molido).	99
32	(a) Estimación del porcentaje de MO. (b) Diagrama de Pareto donde se muestran los factores más significativos.	101

### Índice de figuras (continuación)

Figura		Página
33	a) Estimación de los HFP para los 12 tratamientos durante 28 días de biodegradación de los hidrocarburos intemperizados. b) Diagrama de Pareto donde se muestran los factores significativos para el contenido de HFP.	101
34	Análisis de HTPs por espectroscopia de Infrarrojo para CMA.	104
35	Análisis de HTPs por espectroscopia de Infrarrojo para GCMA	105
36	Curva de calibración de la fracción asfaltenica a $\lambda = 408$ nm por UV visible	106
37	Actividad microbiana de cada tratamiento	108
38	a) Crecimiento bacteriano del tratamiento CMA, b) Crecimiento bacteriano del tratamiento GCMA	110
39	a) Crecimiento de hongos del tratamiento CMA, b) crecimiento de hongos del tratamiento GCMA	111
40	Morfología de hongos CMA y GCMA	111
41	Análisis FTIR para el suelo testigo	115
42	Análisis FTIR para C1B4 con MM	116
43	Análisis FTIR C1B4 con BH	117
44	Respuesta de fitotoxicidad de las semillas de frijol de los tratamientos del suelo.	119

## Índice de Tablas

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Composición elemental del petróleo crudo	15
2	Comparación de propiedades entre petróleos mexicanos: Olmeca, Istmo y Maya	16
3	Propiedades físicas y degradabilidad de los principales compuestos orgánicos encontrados en suelos y sedimentos contaminados con hidrocarburos	17
4	Parámetros que son determinantes en la selección de una tecnología de remediación de suelos	31
5	Parámetros de operación del equipo GC-MS	53
6	Sales minerales comúnmente utilizadas en un medio enriquecido para la adaptación de un consorcio microbiano	55
7	Descripción de los tratamientos para la biodegradación de los hidrocarburos intemperizados	58
8	Factores y niveles para la biodegradación de hidrocarburos aplicando	62
9	Caracterización fisicoquímica de los dos suelos contaminados: Agua Dulce y Estero de Pantano	67
10	Contenido de metales en el suelo con hidrocarburos intemperizados del Agua Dulce	69
11	Caracterización fisicoquímica del petróleo crudo Maya	69
12	Abundancia de las diferentes colonias de microorganismos en los diferentes tiempos de degradación	82
13	Microorganismos y subproductos presentes en los inóculos AD y EP después de las 24 horas de la cinética de crecimiento.	92
14	Correlación de coeficientes de Pearson para las variables involucradas en el proceso de biodegradación de los HFP utilizando bioestimulación. Los valores en negritas son estadísticamente significativos por el <i>p valor</i>	102
15	Porcentajes de remoción de fracción asfáltica de tres tratamientos CMA, GCMA y bioventeo	107
16	Alteración de las propiedades fisicoquímicas del suelo durante los 14 días de tratamiento	109
17	Determinación de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) para todos los tratamientos, evaluado dos medios enriquecidos E y BH	113
18	Prueba directa de toxicidad. Evaluación del crecimiento de las semillas de frijol en los tiempos 7 y 14 días de biodegradación	114

## *Dedicatoria*

*A mis padres Manuel y Carmen por darme la vida y enseñarme principios y valores que me marcaron rumbo y dirección. Mis hermanos Miguel y Leticia, por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho. A mi esposo Nicolás y mi hija Esly Belén porque han estado conmigo y son mi fuente de mi inspiración, los amo con todo mi corazón, y antes que nada a Dios por ser la parte esencial en este caminar por la vida.*

*“Si no conozco una cosa, la investigaré”  
---Louis Pasteur---*



## Agradecimientos

En particular agradezco a mi asesor, el **Dr. Ricardo Guerra Sánchez**, ya que fue un pilar fundamental, no solo en la redacción de esta tesis, sino en mi desarrollo profesional. Dentro de las diversas cualidades que admiro del Dr. Ricardo, la que más destaca, es el compromiso con sus estudiantes y su paciencia.

Gracias al **Mtro. Antonio Quijas Cervantes** y a la **Mtra. Emma Acevedo Moreno**, siempre presentes en el desarrollo de los estudiantes del PICYT, brindando un apoyo puntual y significativo. Gracias Toño por tu paciencia.

Quiero agradecer también a la **Dra. Jaquelina González Castañeda**, por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su supervisión para la redacción de esta tesis. Gracias por su apoyo, por estar conmigo en todos estos años de mi formación profesional.

Gracias a todas las personas que me apoyaron a realizar este valioso trabajo, amigos y compañeros del PICYT, CIATEC.

Finalmente, quiero agradecer a mi país por los recursos que se invirtieron en mi educación mediante instituciones como: el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, **Centro de innovaciones en Tecnologías Competitivas (CIATEC)** y la **Universidad Tecnológica de León (UTL)**. Ofrezco como pago una vida de trabajo dedicada a construir el México que todos queremos tener.

## RESUMEN

Los hidrocarburos intemperizados son estructuras principalmente de fracción pesada con más de 20 carbonos que han quedado acumuladas entre los 0 y 30 cm de profundidad del suelo y son difíciles de remover empleando una sola tecnología, en tanto, el empleo de métodos químicos, físicos o mecánicos resultan costosos y dañinos al ecosistema.

El sitio contaminado seleccionado para efectos de este trabajo se ubica en la localidad de Agua Dulce, Veracruz, México, situado en una región territorial con alta actividad petrolera y donde por años ha sido receptora de desechos petrolíferos. Para lograr la biodegradación de los hidrocarburos intemperizados se llevó a cabo el acoplamiento de tres tecnologías de biorremediación: bioventeo, bioestimulación y bioaumentación. En primer lugar se desarrolló un consorcio microbiano capaz de degradar hidrocarburos de fracción pesada, se controló el nivel de aireación y humedad en el suelo contaminado, así mismo se optimizó un medio enriquecido (MM) con la concentración mínima necesaria. A partir de la identificación bacteriana en el consorcio microbiano se encontró que las especies con mayor abundancia en las primeras horas de biodegradación fueron *Flavobacterium sp.* y *Pseudomonas sp.* Se empleó un diseño Plakett Burman para identificar las mejores condiciones nutrimentales y alcanzar la máxima degradación de los hidrocarburos intemperizados en el proceso del acoplamiento tecnológico. El medio mínimo optimizado presentó la concentración y tipo de nutrientes mínimos necesarios para que los microorganismos llevaran a cabo eficientemente la biodegradación, estos fueron: (g/L) 0.001 NaCl, 0.006 MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0.002 CaCl<sub>2</sub>, 1(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 FeCl<sub>3</sub> • 6H<sub>2</sub>O, 0.001 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25 NH<sub>4</sub>Cl, 1.065 NaHPO<sub>4</sub>, 0.1 FeSO<sub>4</sub>, 0.5 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Una vez realizado el acoplamiento de las tecnologías tratamiento C1B4 presentó 43.2% de remoción de HTP/kg suelo seco con 40% de humedad+210L de aire/h+ medio mínimo (MM), en tanto el suelo testigo presentó 32.2% en un periodo de 14 días. La degradación de los hidrocarburos intemperizados fueron determinados en forma de HTP/kg de suelo seco (Hidrocarburos Totales del Petróleo), en tantos las pruebas de toxicidad indicaron la eficiencia de esta metodología al observar germinación de las semillas de frijol en la mayoría de los tratamientos, por lo tanto, este proyecto se propone como una alternativa de remediación para suelos contaminados con hidrocarburos intemperizados.



## 1. INTRODUCCIÓN

La persistencia de los hidrocarburos intemperizados aumenta después de largos periodos de tiempo de exposición al medio ambiente, se vuelven más recalcitrantes y de manera simultánea, el suelo se intemperiza (Adams y col., 2008; Abuzinada 2008, Asish 2010; Mayes 2011). Los hidrocarburos intemperizados están constituidos por hidrocarburos saturados con grupos alquilo, entre los que se encuentran los  $\beta$ -metilo, etilo y fenoles, así como, hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) con más de tres anillos bencénicos, los cuales, también son llamados hidrocarburos residuales, al igual que aquellos compuestos que ya no son degradados después de un proceso de bioremediación o bien después de largos periodos de años, como es el caso de las resinas y asfaltenos. Estos compuestos reaccionan y se unen a los compuestos húmicos del suelo. Algunos crudos como el maya contienen altos porcentajes de azufre (S) y nitrógeno (N), con altas viscosidades, dando como resultado una mayor persistencia en el suelo.

Entre más tiempo de residencia tenga un contaminante en el suelo, se hace más difícil la degradación de los hidrocarburos químicamente complejos mediante microorganismos. La mayoría de los suelos contaminados en la zona costera del sureste de México tiene concentraciones de hidrocarburos intemperizados por arriba de los 50 000 mg/kg de suelo seco, esto disminuye la fertilidad del suelo, la recarga de los mantos freáticos y debido a la toxicidad de los hidrocarburos, incrementa los daños a la salud. La presencia de hidrocarburos intemperizados en el suelo ocasiona cambios en las propiedades fisicoquímicas, impide la transferencia de masa y humedad en el suelo se reduce, se disminuye la permeabilidad, el pH se modifica y la salinidad puede incrementarse, esto promueve la compactación de los suelos contaminados, la formación de una costra color oscuro en la superficie y que al concentrarse los compuestos, se vuelven tóxicos para los organismos nativos (Zavala y col., 2005, Vega y col., 2009).

Los estados que producen petróleo crudo en la República Mexicana son: Tabasco, Veracruz, Chiapas, Tamaulipas, Puebla, San Luis Potosí e Hidalgo; en el mes de julio de 2016, la Secretaría de Energía (SENER), mediante el Sistema de Información Energética, reporta con datos proporcionados por Petróleos Mexicanos, la producción en julio de 2016, una producción para Tabasco de 2,882,207 y para Veracruz de 109,173, de miles de

barriles diarios, lo que representa el 88.28%, de la producción total (SENER, 2016) aunado a esto la acumulación de hidrocarburos persistentes se ve incrementada por el un gran número de ductos que se encuentran comúnmente localizados en zonas pantanosas, zonas de manglares u otras selvas inundables que después de décadas de uso se han encontrado sumamente corroídos por derrames. Esto ha contribuido al establecimiento de bacterias sulfatoreductoras de sulfatos alterando las propiedades fisicoquímicas del suelo. Ante esta situación, resulta costosa la implementación de procesos fisicoquímicos para la remoción de hidrocarburos químicamente complejos (Adams *et al.*, 1999).

Las tecnologías de remediación comúnmente empleadas como la incineración, excavación entre otras, logran eliminar de manera parcial los contaminantes, en muchos casos, los residuos químicos permanecen, otras veces, se convierten en compuestos más tóxicos que los compuestos originales, así mismo, la mayoría de los estudios de toxicidad que se reportan son para los BTEX (benceno, tolueno, eteno y xileno) e hidrocarburos poliaromáticos (PAHs), de menos de tres anillos aromáticos, ya que se consideran con mayor potencial carcinogénico, de acuerdo a lo establecido por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). Ante esta situación se propone en el presente trabajo una metodología que consiste en la optimización de parámetros de operación (nutrientes, venteo, consorcio microbiano y humedad) para crear las condiciones ambientales más eficientes, que permitan llevar a la obtención de la máxima degradación de hidrocarburos intemperizados. Este proyecto surge ante la necesidad de implementar tecnologías de remediación que consideren la complejidad de los ecosistemas tropicales, la complejidad del contaminante, del suelo y de los microorganismos, estos últimos tienden a ser modificados morfológicamente según sean las condiciones ambientales.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA**

### **2.1 El suelo**

El suelo es la capa superficial de la corteza terrestre en la que viven números organismos y crece la vegetación. Los procesos fisicoquímicos del suelo se llevan a cabo entre las tres fases que constituyen el suelo: sólido, líquido y gas, son determinantes para la degradación de los hidrocarburos, por lo que el entendimiento de los mecanismos físicos, químicos y biológicos del suelo, así como los elementos que lo componen, son relevantes para el éxito de las tecnologías de remediación depende de dichas propiedades.

El suelo está integrado por la materia orgánica, limo, arcilla, arena y organismos, todos estos le dan soporte, estructura y funcionalidad, dependiendo de la relación en la que se encuentren, la fertilidad del suelo se verá afectada. La predominancia de ciertos componentes estructurales del suelo va a depender del clima, fisiografía y geología, de la zona en donde se encuentre ubicado, como es de esperarse, las características fisicoquímicas del suelo cambian de una región a otra.

En la República Mexicana, existe una gran diversidad en cuanto a los tipos de suelo, de acuerdo a la clasificación de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, mundialmente conocida como FAO (por sus siglas en inglés), se reporta que en nuestro territorio se encuentra el 90% de los diferentes tipos de suelo. En el Estado de Veracruz hay una enorme diversidad de suelos, cuyas características fisicoquímicas están asociadas con los horizontes del suelo, las condiciones de formación y/o el material que les dio origen.

Las condiciones de temperatura y precipitación en la región, ocasionan un fuerte intemperismo en las rocas sedimentarias, relativamente suaves e incluso en las ígneas, de tal manera que predominan los suelos profundos sobre los suelos rocosos, a menos de un metro de profundidad. Por otra parte, el relieve predominantemente llano ha dado lugar a procesos de evolución de los suelos de forma lenta, por lo que el 70% de los mismos son jóvenes (en su mayoría arcillosos), pues contienen gran cantidad de sus nutrientes naturales. Los suelos jóvenes se distribuyen por todo el estado de Veracruz, en tanto que los maduros, en los cuales la pérdida de elementos esenciales para la nutrición de las plantas ha sido considerable, se concentran en el sureste del estado y representan el 30% restante.

En el municipio de Agua Dulce, Veracruz, la mayoría de los suelos son los Vertisoles, en este tipo de suelo el tipo de arcilla identificada es la Montmorillonita, por lo que la textura predominante es arcillosa o migajón arcilloso, los cambios de pH oscilan entre ligeramente ácido y ligeramente alcalino, en tanto, el contenido de materia orgánica va de medio a alto, existe una importante capacidad de absorción de cationes como el  $\text{Na}^+$ , aunado a la presencia de sales insolubles. El tipo de uso de suelo en esta región de Veracruz es agrícola (Medina-Chena A., *et. al.* 2010).

### **2.1.1 Propiedades del suelo**

La fase sólida del suelo es una mezcla de materiales inorgánicos y orgánicos que determinan la estructura del suelo. La fracción inorgánica está compuesta por fragmentos de rocas minerales de diferente tamaño y composición. De acuerdo al tamaño las fracciones del suelo se clasifican en arena, limo y arcilla. La arena es de tamaño uniforme (0.02-2.0mm) aunque de formas irregulares, es químicamente inerte y no tiene carga eléctrica, por tanto tiene una baja capacidad de intercambio iónico. El limo tiene un tamaño intermedio (0.002-0.02mm) y presenta características que están entre la arena y la arcilla. La arcilla es la partícula más pequeña (<0.002mm), posee carga negativa y es el constituyente inorgánico más activo en el suelo. Su presencia le confiere al suelo una alta capacidad de intercambio catiónico.

La fracción orgánica es considerada como un polímero tridimensional amorfo, compuesto por hidrocarburos aromáticos y alifáticos, con cadenas hidrófobas laterales y gran variedad de compuestos polares. Su presencia en el suelo mejora la agregación de partículas produciendo estructuras estables e incrementa la capacidad de intercambio catiónico. Cuando un suelo tiene un alto contenido de materia orgánica posee una gran porosidad y área superficial, lo que implica una importante retención de compuestos exógenos contaminantes. Entre los componentes del suelo, las arcillas y la materia orgánica, son los constituyentes que absorben más compuestos exógenos. Cuando se trata de moléculas de elevado peso molecular, como es el caso de los hidrocarburos intemperizados, estos se retienen en la superficie de las arcillas por enlaces de hidrógeno y en el caso de compuestos de bajo peso molecular, por intercambio iónico. Las arcillas tipo 1:1, como la kaolinita, tienen menor capacidad de sorción, por lo que las moléculas solo se adsorben en las

superficies externas. En las arcillas 2:1, como la montmorillonita, la sorción de contaminantes ocurre tanto en la superficie externa como en la interna, incrementándose por tanto, la capacidad de sorción (Weed y Weber 1969). Los minerales arcillosos del tipo montmorillonita contienen iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  o una combinación de estos.

## 2.2 Petróleo

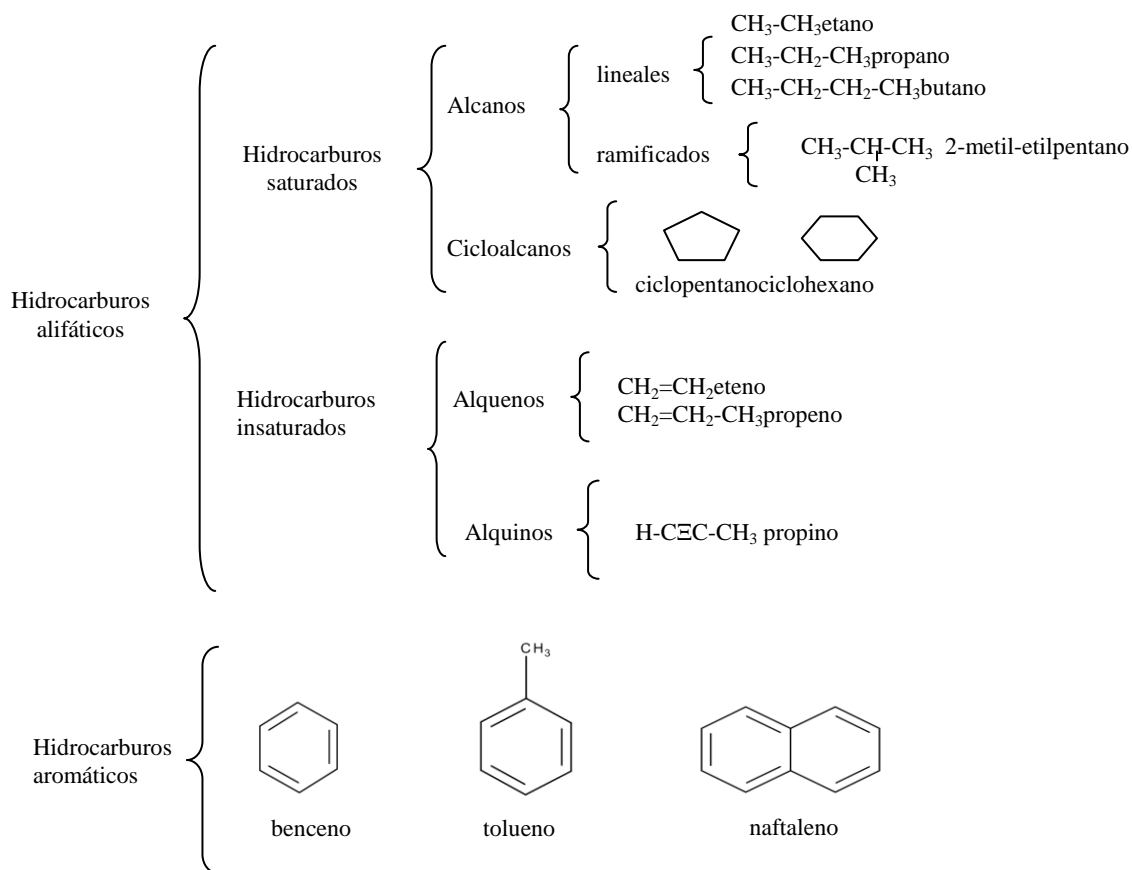


Figura 1. Clasificación de los hidrocarburos (Labardini-Flores *et al.*, 2002)

El petróleo crudo es un líquido negro, viscoso, donde predomina la presencia de hidrocarburos entre un 50 y 98%, es una mezcla de miles de compuestos que se agrupan por sus características en cuatro familias de compuestos o fracciones, clasificándose como hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, resinas y asfaltenos, se pueden



identificar hasta 17000 componentes químicos, mediante espectrometría de masas de alta resolución (Huesemann y Moere, 1993).

De acuerdo a la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, la fracción ligera tiene de 5 a 10 carbonos (C5-C10), la fracción media de (C10 –C18), en tanto, la fracción pesada se encuentra arriba de 18 carbonos (>C18). La clasificación general de los hidrocarburos se muestra en la Figura 1.

La abundancia de los diferentes grupos de hidrocarburos dependerá del origen geológico de cada petróleo crudo. Con base en dicha clasificación, los alifáticos son alcanos de cadena lineal ramificados, en tanto los alicíclicos son los cicloalcanos que contienen anillos y cadenas laterales. El tipo de enlace de los hidrocarburos alifáticos permite una distribución uniforme de la carga electrónica y por lo tanto son moléculas no polares o ligeramente polares. La fuente de sus interacciones electromagnéticas, es función del movimiento aleatorio de la nube de electrones que circundan la molécula, la cual puede provocar fluctuaciones polares que cambian la superficie molecular. Aunque no se forman configuraciones polares, temporalmente si crean dipolos, así mismo, la estructura de anillos en estas moléculas es simétrica y se distribuyen en forma de láminas con nubes de electrones por arriba y debajo del plano de la molécula (Cerniglia 1992). Los patrones de enlace les proporcionan cierta polaridad, ya que las nubes de electrones alrededor de la molécula pueden ser deformadas por moléculas adyacentes, dando como resultado una carga parcial positiva o negativa.

Una importante cantidad de los compuestos polares de bajo peso molecular se forman de la degradación microbiana de compuestos alifáticos y aromáticos (Huesemann and Moere, 1993), se han identificado principalmente algunos compuestos provenientes de la biodegradación como cetonas, ácidos grasos, ésteres, cicloalifáticos y aromáticos (Riser-Roberts *et al.*, 1992).

Las resinas, las cuales están compuestas por heteroátomos que contienen nitrógeno, azufre y oxígeno, conforman al grupo polar de la mezcla de hidrocarburos del petróleo crudo, esta fracción es soluble en n-alcanos (pentano) y solventes aromáticos (tolueno) e insolubles en acetato (Diallo *et al.*, 2000).

Por último, los asfaltenos son la fracción más pesada del petróleo, insoluble en n-alcanos como pentano y heptano (Diallo *et al.*, 2000). Se forman debido a la oxidación de las

resinas naturales. A escala microscópica están compuestos por estructuras alifático/nafténicas, que rodean o conectan láminas de aromáticos polinucleares. Estas láminas se ordenan en grupos pequeños para formar el núcleo de las partículas de asfaltenos, que a su vez es rodeado por otras unidades alifáticos/nafténicas.

Tabla 1. Composición elemental del petróleo crudo

<b>Elemento</b>	<b>% peso</b>	<b>Elemento</b>	<b>mg/L</b>
Carbono	83-87	Vanadio	5-1500
Hidrógeno	10-14	Níquel	3-120
Azufre	0.05-6	Hierro	0.04-120
Nitrógeno	0.1-2.5	Cobre	0.2-120
Oxígeno	0.5-1.5	Cobalto	0.001-12
		Silicio	0.1-5
		Magnesio y Calcio	1-2.5
		Zinc y Aluminio	0.5-1
		Plomo	0.001-0.2
		Mercurio	0.03-1.0

Fuente: García Rivero, 2003

El petróleo crudo contiene en menor proporción compuestos que no son hidrocarburos como los ácidos nafténicos, fenoles, tioles y otros compuestos heterocíclicos de nitrógeno, azufre y metaloporfirinas, contienen compuestos inorgánicos en menor proporción tal como se describe en la Tabla 1, sobre la composición promedio del petróleo crudo (García-Rivero, 2003).

La presencia de metales y compuestos heterocíclicos influye en la calidad del petróleo crudo y por consiguiente también en su biodegradabilidad. En México se producen tres tipos de petróleo crudo, el olmeca, el istmo y el maya, siendo éste último el que predomina y el que más contribuye a la contaminación de ecosistemas costeros debido a la complejidad de su estructura química, su alta viscosidad limita los procesos de remediación.

El petróleo crudo maya contiene el 3.7% de azufre, cabe resaltar que el por ciento de azufre es mayor en el petróleo crudo que se obtiene en México que el de otros países productores como Estados Unidos, Nigeria y Arabia. En la Tabla 2, se presentan algunas de las propiedades que presentan los tres tipos de petróleo crudo producido en México.

La capacidad de biodegradación de los microorganismos, está en función de la complejidad química de los compuestos hidrocarbonados, su capacidad de sorción en las partículas del suelo y en el contenido de materia orgánica en el suelo, así mismo, la eficiencia de biodegradación está influenciada por el coeficiente de partición octanol-agua (Kow), entre más bajo sea este valor, la capacidad de degradación aumentará.

Tabla 2. Comparación de propiedades promedio que presentan los petróleos crudos mexicanos, olmeca, istmo y maya

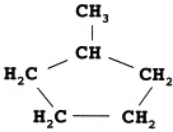
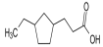
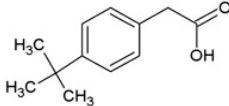
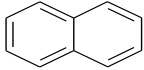
<b>Propiedades</b>	<b>Olmeca</b>	<b>istmo</b>	<b>maya</b>
Peso específico a 20/4 °C	0.8261	0.8535	0.9199
°API	39.16	33.74	21.85
15.6 °C	43.3	65.6	2156.0
21.1	40.3	57.8	1054.0
25.0	39.0	54.5	696.0
Factor de caracterización K	12.00	11.85	11.63
Azufre total, % peso	0.81	1.45	3.70
Carbono, % peso	1.62	3.92	10.57
Cenizas, % peso	0.006	0.007	0.074
Insolubles en nC5, % peso	/1.0	3.0	15.3
Insolubles en nC7, % peso	/1.0	2.09	11.2
Aceites, % peso	89.2	89.2	72.0
Parafinas, % peso	13.4	8.1	3.6
Aceite desparafinado, % peso	75.8	81.1	68.4
Resinas, % peso	10.8	7.8	12.7

\*API: es una medida de densidad para indicar que tan liviano es el petróleo

Fuente: IIE (1998)

En la Tabla 3, se muestran algunas características fisicoquímicas y degradabilidad de los hidrocarburos más estudiados en suelos y sedimentos contaminados. Dependiendo de las características mencionadas en la Tabla 3, puede aumentar o no la recalcitrancia y la biodisponibilidad de los hidrocarburos contaminantes.

Tabla 3. Propiedades físicas y degradabilidad de los principales compuestos orgánicos encontrados en suelos y sedimentos contaminados con hidrocarburos

Clasificación	Fórmula	Solubilidad en agua a 20°C (mg/L)	K <sub>ow</sub> (Log)	Degradabilidad
<b>Hidrocarburos saturados</b>				
Alcanos parafinas Pentano	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub>	Insoluble	1.1	Alta
Isoalcanos cicloparafinas Metil ciclopentano		Insoluble	1.07	Alta
<b>Hidrocarburos Insaturados</b>				
Resinas				
Ácido nafténico		Insoluble	N.R	Muy Baja
Hidrocarburos asfáltenos				
Ter- butil fenil ácido etanoico		Insoluble	N.R	Muy Baja
<b>Hidrocarburos aromáticos</b>				
Poli aromáticos cíclicos Naftaleno		Insoluble	10	Baja

N.R.: No reportado

Fuente: Labardini et al., 2002

### 2.3 Suelo de zonas petroleras

Las zonas de mayor exploración petrolera se localizan en las zonas costeras, estos sitios son ecosistemas extremos donde prevalecen condiciones de acidez, altas temperaturas, alto contenido de materia orgánica, por lo que, en zonas de inundación es común encontrar procesos anaeróbicos dificultando la degradación de los contaminantes.

Para comprender los efectos negativos al suelo, después de un derrame de petróleo crudo, es necesario analizar un suelo donde no hay presencia de hidrocarburos.

En un suelo no contaminado el transporte de agua, aire, microorganismos y nutrientes tienen un movimiento natural en la fase libre. El ambiente de la fase libre, tiene carga neutra por la ocurrencia de interacciones electrostáticas entre las moléculas de agua y los

iones con carga negativa de las arcillas del suelo, lo que promueve una alta capacidad de intercambio catiónico (CIC) tal como se muestra en la Figura 2.

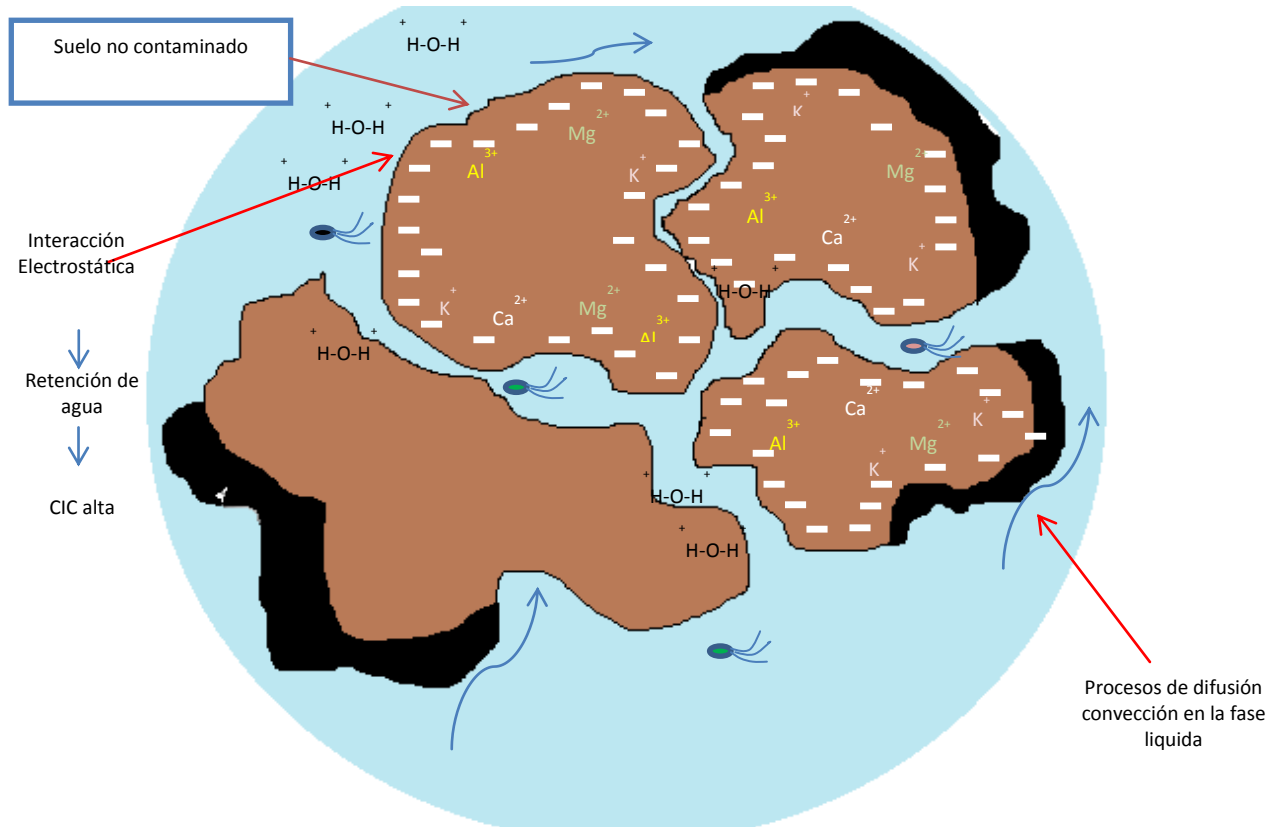


Figura 2. Transporte de nutrientes, agua y microorganismos en un suelo no contaminado (Yu *et al.* 1994, Maier 2000, García-Rivero 2003)

#### 2.4 Características del suelo contaminado por hidrocarburos intemperizados

La intensa actividad petrolera principalmente en los estados del sureste de México contribuye de manera significativa en los derrames de hidrocarburos. Los suelos de regiones petroleras muestran concentraciones de hidrocarburos y metales pesados muy superiores a los límites máximos permisibles, establecidos en la normatividad (García-Rivero 2003).

Después de un derrame de hidrocarburos los n-alcenos de fracción ligera y media, experimentan un fenómeno de intemperización, donde se llevan a cabo procesos como volatilización, foto-oxidación, emulsificación, sedimentación y biodegradación.

Posteriormente, los hidrocarburos que quedan sobre la superficie del suelo son denominados hidrocarburos residuales o hidrocarburos intemperizados, con compuestos con un contenido de carbonos mayor a 25, son de alto peso molecular y muy hidrofóbicos (Abuzinada *et al.*; 2008, Asish *et al.*, 2010; Mayes *et al.*, 2011), entre más arcilloso sea un suelo, estos hidrocarburos son adsorbidos más fácilmente. Estudios reportados muestran que en suelos con un contenido arcilloso entre 48 y 79%, se incrementa significativamente la sorción de los contaminantes (Steliga *et al.*, 2010).

Es precisamente en los suelos costeros donde predominan los suelos arcillosos que tienen un tamaño de poro menor a 0.002 mm. En las partículas del suelo se llevan a cabo atracciones físicas o químicas que permiten a los hidrocarburos hidrofóbicos quedar adsorbidos en los microporos del suelo (Figura 3).

El coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ), ha sido un parámetro fisicoquímico muy empleado en los estudios de remediación de suelos. El  $K_{ow}$  representa la relación entre la fase n-octanol y en la fase acuosa en el equilibrio es una medida de hidrofobicidad hacia los lípidos de una sustancia disuelta en agua (Calamari 1993). Los compuestos insolubles con valores de  $K_{ow} \log > 3.5$  no se encuentran biodisponibles para los microorganismos, tales compuestos sustituyen los espacios porosos que inicialmente eran ocupados por la microbiota natural. El decremento de la biodisponibilidad es influenciada por la incorporación del contaminante a la materia orgánica presente en el suelo, lo que ocasiona reacciones químicas de oxidación y polimerización, difusión lenta hacia los microporos y la formación de películas semirrígidas del hidrocarburo alrededor de los poros, lo que causa resistencia en la transferencia de masa entre los nutrientes, microorganismos, agua, aire y compuestos orgánicos. Por consiguiente, se modifica la estructura del suelo: los microorganismos nativos cambian su morfología, en algunos microorganismos se produce una alteración de la estructura de las micelas, se reduce su tamaño y su actividad enzimática, algunos autores (Yu *et al.* 1994) han nombrado a estos microorganismos “microbiota vieja”.

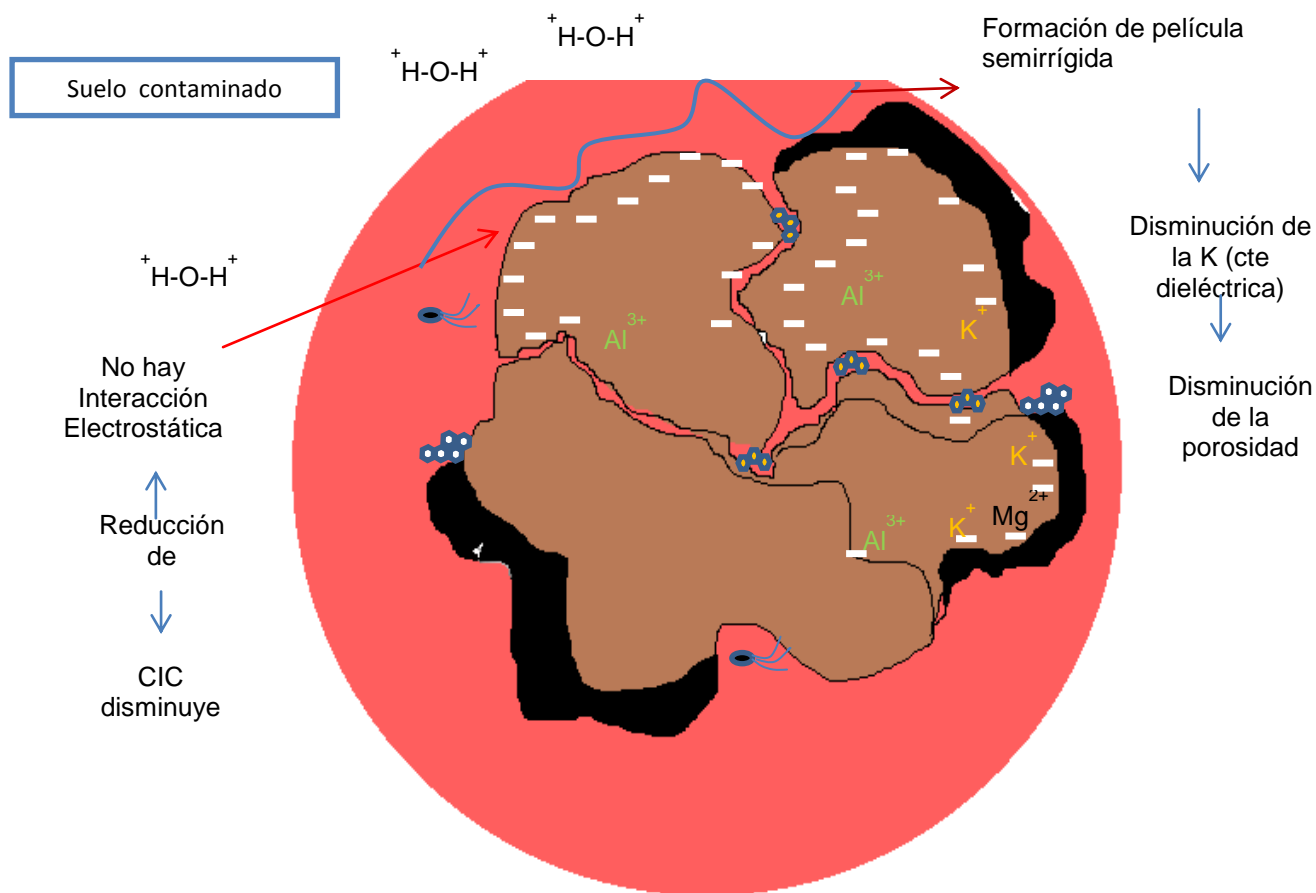


Figura 3. Interacción de nutrientes, agua y microorganismos en un suelo contaminado (Yu *et al.* 1994, Maier 2000, García-Rivero 2003)

El grado de persistencia de los hidrocarburos en el suelo aumenta de manera directa con el número de anillos aromáticos y el punto de ebullición. Los asfaltenos son considerados resistentes a la degradación microbiana, aunque se ha reportado que tales moléculas podrían ser degradadas si se encuentran solubles o dispersas (Riser-Roberts 1992), lo que es difícil en los suelos contaminados con hidrocarburos, expuestos por años al medio ambiente. El suelo se hace más compacto al no existir la interacción electrostática, en este caso los hidrocarburos hidrofóbicos quedan fuertemente adsorbidos a las partículas del suelo y a la materia orgánica presente, por lo que no pueden ser liberados fácilmente a la fase líquida por solventes o por quimiotaxis, que es un fenómeno natural por el cual una bacteria por si misma tiende a dirigirse a la fuente de carbono y se aleja de agentes tóxicos. Cuando no hay interacción electrostática entre el agua y la fracción mineral del suelo, las

sales tienden a lixiviarse, por lo que hay cambios en la salinidad y pH, así mismo, esto promueve el aumento de la toxicidad por la presencia de compuestos inorgánicos como cloruros ( $\text{Cl}^-$ ), peróxidos ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ), cromo ( $\text{Cr}^{3+}$ ) y arsénico ( $\text{As}^{3+}$ ), entre otros.

Existen limitantes en la remediación de suelos costeros contaminados con hidrocarburos intemperizados, ya que tales ecosistemas se caracterizan por ser ambientes extremos y sistemas dinámicos que continuamente cambian sus propiedades fisicoquímicas, así mismo, se modifican por la hidrogeología y actividades industriales aledañas a estos sitios. La hidrogeología de estos sitios ocasiona un proceso de inundación en los suelos, por lo que disminuye el pH, el potencial de óxido reducción oscila de +100 a -400 mV, esto modifica el ambiente de aerobio a anaerobio. En muchos sitios costeros prevalecen las condiciones anaerobias, donde la respiración bacteriana utiliza al nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), hidróxido de hierro II ( $\text{Fe}(\text{OH})_2$ ), sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y carbonatos ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), ya que funcionan como aceptores finales de electrones. Estos aspectos influyen en el transporte de masa, movilidad de los hidrocarburos y la forma de interacción con la biomasa.

Otro de los efectos de la inundación, es la precipitación de los nutrientes, al acidificar el suelo, mediante el intercambio de los iones hidronio ( $\text{H}^+$ ) del agua de lluvia, por iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), potasio ( $\text{K}^+$ ) y sodio ( $\text{Na}^+$ ); otra característica importante es el origen de la roca, se considera de reacción básica si contiene iones como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , o reacción ácida si libera iones  $\text{H}^+$  o aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ). Otro factor que incrementa la acidez del suelo es la degradación de la materia orgánica, al generar residuos de la actividad microbiana, como son los ácidos húmicos y fúlvicos. Cuando se incrementa la concentración de iones  $\text{H}^+$ , aumenta también la toxicidad, ya que disminuye el movimiento descendente de los hidrocarburos hacia las capas más profundas (Tam *et al.*, 2008). Los suelos ácidos pierden cantidades sustanciales de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , elementos esenciales para plantas y microorganismos. En los ecosistemas naturales es común encontrarlos, así mismo, los pantanos se consideran extremadamente deficientes en  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{K}^+$ . Otros investigadores reportan que se incrementa la acidez con la presencia de  $\text{Al}^{3+}$ , intercambiable, que resulta ser tóxico para los microorganismos del suelo. Metales como el vanadio (V), níquel (Ni), cobre (Cu), plomo (Pb), cromo (Cr) y hierro (Fe), prolongan el

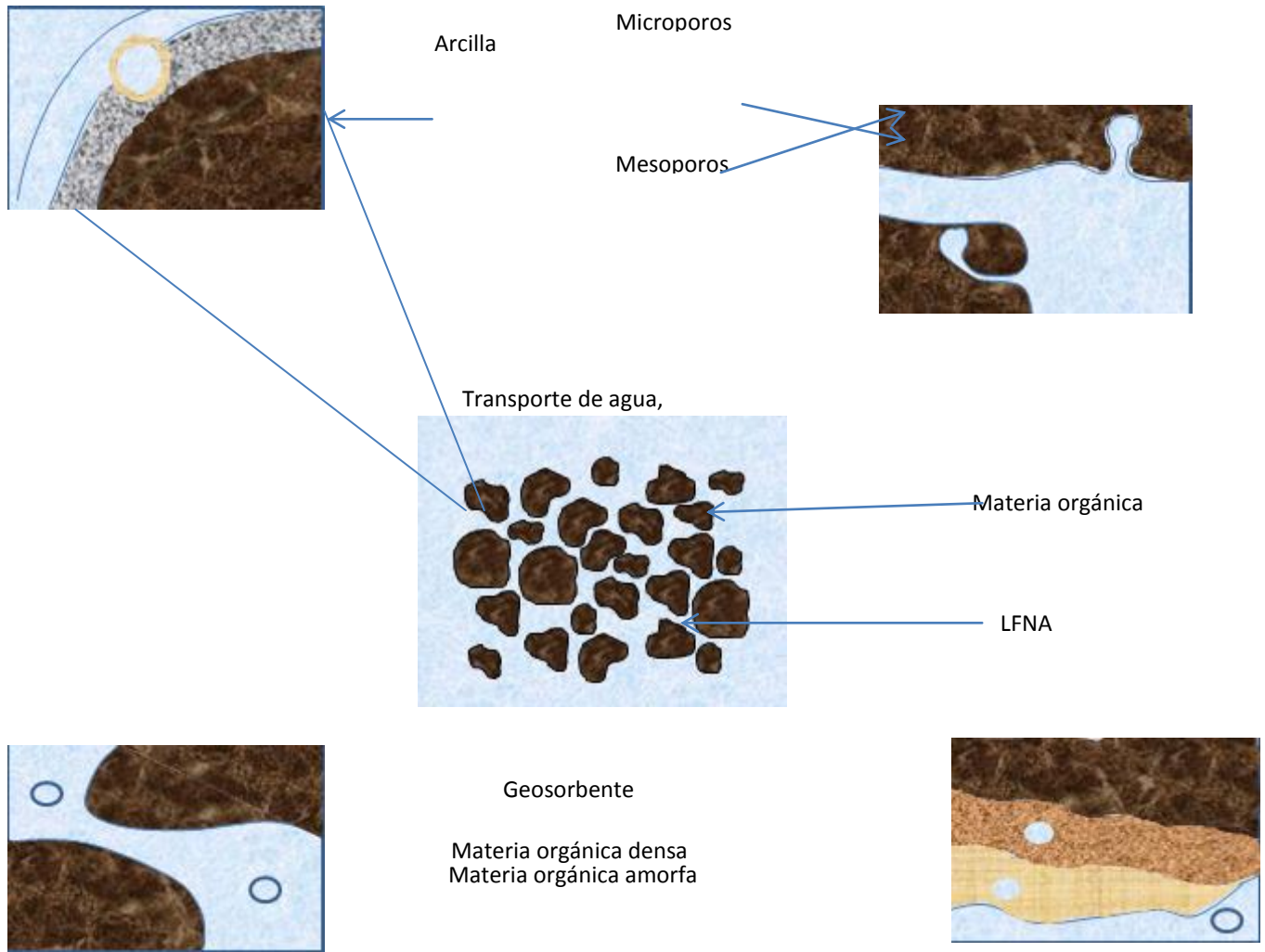


tiempo de residencia de los hidrocarburos en el ambiente (Maier *et al.*, 2000; García-Rivero 2008; Vega *et al.*, 2009).

## **2.5 Mecanismos de transferencia de los hidrocarburos en el suelo**

Como ya se mencionó, la acumulación de los hidrocarburos intemperizados en el suelo está ligada al fenómeno de adsorción y absorción, las cuales describen interacciones fisicoquímicas entre las partículas del suelo y los contaminantes orgánicos. Cuando es un proceso de adsorción las moléculas orgánicas tienden a interactuar en el interior o en el exterior de la partícula mediante interacciones electrostática, fuerzas de Van der Waals o bien mediante puentes de hidrógeno, así mismo, existe un equilibrio dinámico en la fase sorbida y otras fases. La absorción de los compuestos hidrocarbonados se encuentran con la materia orgánica dicha unión está asociada a los procesos de polimerización, la cual, es la unión de cadenas cortas de compuestos orgánicos para formar estructuras con mayor complejidad química (Bouchards *et al.*, 1989, Lee *et al.*, 1989).

Las moléculas de los hidrocarburos se encuentran en equilibrio dinámico en las diferentes fases del suelo, aunque este estado es muy limitado en la naturaleza, ya que el suelo de la zona vadosa no es un sistema cerrado y existen diferencias en varios de los procesos cinéticos, ya que dependen de otras características como las propiedades geológicas de la zona vadosa, las propiedades fisicoquímicas de los hidrocarburos y factores ambientales como la temperatura. Las interacciones entre el suelo y el contaminante se presentan en la Figura 4, se muestran las interacciones entre la fase líquida, la fase sólida y la fase gaseosa. El transporte de aire, agua y nutrientes, así como la distribución de los hidrocarburos, depende de la solubilidad de éstos últimos, que se expresa como el coeficiente de partición octanol-agua ( $K_{ow}$ ), siendo un parámetro comúnmente empleado para determinar la capacidad de degradación. La solubilidad puede indicar la cantidad máxima de hidrocarburos disueltos en la fase líquida y se expresa en mg/L a 20°C. Los compuestos con un alto grado de solubilidad se lixiviarán a las aguas subterráneas, en tanto, los hidrocarburos insolubles tienden a quedar fuertemente sorbidos en los primeros centímetros de la superficie del suelo.



\*Líquidos en la fase no acuosa (LFNA)

Figura 4. Distribución de los contaminantes orgánicos en las cuatro fases del suelo (Luthy *et al.*, 1997)

Otra característica fisicoquímica de los contaminantes es el coeficiente de adsorción suelo/agua ( $K_{oc}$ ) y se define como la razón entre la concentración de un hidrocarburo en estado de adsorción (adherido a las partículas de suelo) y la fase de solución (disuelto en el agua del suelo). En un contaminante orgánico, cuanto menor sea el valor de  $K_{oc}$ , mayor será

la concentración del hidrocarburo en la solución de un suelo muy permeable. Es más probable que se lixivien en las aguas subterráneas los hidrocarburos con valores bajos de  $K_{oc}$  que los que tienen valores altos. Es crucial tener un control de los parámetros de operación en una tecnología de biorremediación ya que de lo contrario la formación de metabolitos tóxicos en un suelo permeable aumenta el riesgo de contaminar el agua subterránea. La adsorción de un hidrocarburo será mayor en suelos con un alto contenido de materia orgánica. Por consiguiente, se considera que la infiltración de los hidrocarburos será más lenta en los suelos con alto contenido de carbono, que en suelos con un contenido inferior de materia orgánica. Debido a la gran variedad de valores de  $K_{oc}$ , se recomienda utilizar el logaritmo de  $K_{oc}$ . El valor de  $K_{oc}$  superior a 10000mL/g carbono orgánico de un compuesto tiende a fijarse en el suelo, sedimento, biota y materia orgánica, en tanto que valores de contaminantes de  $K_{oc}$  superiores a 100,000mL/g carbono orgánico, la vía de exposición generalmente es por la cadena alimenticia (Boyd and Sun 1990). La ley de Henry describe que a temperatura constante la solubilidad de un gas en un líquido es directamente proporcional a la presión del gas sobre el líquido, por lo que, al disolverse un hidrocarburo en agua existe una cantidad mínima de está en estado gaseoso, encontrándose en mayor concentración en la superficie del agua. En una situación de equilibrio, a medida que las moléculas son incorporadas al agua, un número equivalente de moléculas de la sustancia química abandonan el estado líquido para transformarse en vapor.

La capacidad de retención del suelo (SRT), es una de las características importantes para que los hidrocarburos puedan percolar a través de la zona no saturada. En los suelos contaminados de zonas costeras se muestran valores de SRT de 30 a 50 L/m<sup>3</sup>, en estos casos los hidrocarburos son retenidos por tensión superficial (fuerzas capilares) y el movimiento de los hidrocarburos se da hacia arriba, debido a las fuerzas capilares.

El movimiento (arrastre o infiltración) de los hidrocarburos, almacenamiento y transformación (físicoquímica o biológica) de contaminantes, es un fenómeno de transferencia de masa que está regido por la ley de conservación de masa, en donde se considera que el flujo es afectado por transporte convectivo, dispersión aparente (difusión molecular y dispersión mecánica), reacciones geoquímicas (intercambio iónico y adsorción) y los procesos bioquímicos. A continuación, se describen los principales procesos.

### 2.5.1 Advección

La advección describe el transporte un contaminante, donde la velocidad del fluido depende del gradiente hidráulico y de las propiedades físicas e hidráulicas del suelo, tales como la porosidad y el contenido de agua. El transporte advectivo (ecuación 1) o flujo másico advectivo, se refiere al movimiento pasivo de solutos disueltos en la fase líquida. La ecuación unidimensional de este flujo es:

$$F_A = q \cdot C \quad (1)$$

Donde:

$q$  = flujo de Darcy ( $m^3/s$ )

$C$  = concentración del contaminante en disolución.

Se requiere profundizar en el estudio del movimiento de hidrocarburos recalcitrantes en el suelo, de los subproductos de la degradación y sus consecuencias en los suelos tropicales, ya que no hay suficientes estudios que describan dicho fenómeno.

### 2.5.2 Difusión

El transporte por difusión (ecuación 2) es ocasionado por el movimiento de iones disueltos y moléculas debido a la existencia de gradientes de concentración y a la agitación térmica de las moléculas. Este movimiento es descrito por la ley de Fick:

$$F_D = -\theta D_m \frac{dC}{dx} \quad (2)$$

Donde:

$\theta$  = contenido volumétrico de agua ( $m^3$ )

$D_m$  = coeficiente de difusión molecular ( $m^2/s$ ) en el medio poroso

$x$  = distancia (m)

$D_m$  es siempre más pequeño que el correspondiente a la difusión molecular en agua pura, debido a la tortuosidad del medio.

$D_m = D_a/t$

La tortuosidad ( $t$ ) entre dos puntos se define como el recíproco de la relación real entre los puntos y la trayectoria rectilínea. Su valor medio depende de la estructura del medio poroso y del contenido de humedad, este el valor oscila entre 0.01 y 1.

### 2.5.3 Dispersión

Los diferentes tipos, tamaños y orientación de los poros afectan las velocidades del transporte de masa que difieren de un punto a otro. Además hay también variaciones en un mismo poro. Este mecanismo es llamado dispersión mecánica (ecuación 3), que se expresa por la ecuación:

$$F_h = -\theta D_h \frac{dC}{dz} \quad (3)$$

Donde:

$F_h$  = transporte dispersivo

$D_h$  = coeficiente de dispersión mecánica (ecuación 4), que está linealmente relacionado con la velocidad de flujo mediante la siguiente expresión

$$D_h = \alpha \cdot v \quad (4)$$

Donde:

$v$  = velocidad media del agua

$\alpha$  = dispersividad.

## 2.6 Suelos costeros y no costeros

Los suelos costeros se caracterizan por su contenido de materia orgánica, superior al 6% en masa, pH ácidos con valores entre 2.7 y 6.0, de manera general tienen un bajo contenido de sales debido a los efectos de lixiviación de los iones y cationes presentes en la fracción mineral, la cual se ve intensificada por la acidez del medio líquido. El tipo de bacterias que se desarrollan lo hacen bajo condiciones aerobias o anóxicas, lo que retarda el proceso de degradación de los hidrocarburos. Los suelos costeros se caracterizan por ser áreas con yacimientos petroleros muy cercanos, por lo que son suelos muy contaminados por la intensa actividad de extracción. Su remediación es difícil debido a las condiciones extremas de estos ecosistemas, por lo que las tecnologías convencionales de remediación

implementadas en otros países, no logran alcanzar el mismo éxito bajo las condiciones particulares de México.

En un suelo no costero, el porcentaje de materia orgánica oscila entre los 2 y 3%, mientras que el pH puede ser neutro hasta ligeramente alcalino, el tipo de microbiota es muy diverso, son muy eficientes para fines agrícolas, tienen un buen drenaje y esto evita cualquier condición anaerobia, de esta manera, es muy eficiente el transporte de oxígeno, nutrientes, agua y microorganismos.

## **2.7 Hidrocarburos intemperizados**

Los hidrocarburos intemperizados son los hidrocarburos residuales presentes en el suelo o sedimento, una vez que han sufrido los procesos de intemperización como: volatilización, fotooxidación, emulsificación, sedimentación y biodegradación. Están constituidos por cadenas de carbonos con más de 25 carbonos, después de décadas de intemperización se convierten en contaminantes altamente persistentes en el medio ambiente, tienen baja o nula biodisponibilidad debido a su alta hidrofobicidad y contenido de compuestos heterocíclicos, los cuales contienen elementos inorgánicos como el Cl, Va, Ni entre otros. Estos incrementan la toxicidad en el suelo e inhiben la degradación de los compuestos aún más simples, como hidrocarburos aromáticos y cadenas lineales menores a 18 carbonos, sin embargo, existe poca información sobre tales mecanismos de inhibición. Los hidrocarburos intemperizados afectan el crecimiento de plantas, debido a la disminución de la fertilidad del suelo. Esto ocasiona una ruta de riesgo cuando el ganado ingiere partículas de suelo adheridas al pasto, al respecto se reporta que concentraciones mayores a 50000 mgHTP/kg suelo representa un riesgo para plantas, organismos vivos y bacterias, otros estudios reportan que la presencia de hidrocarburos intemperizados en concentraciones de 2300 mg/kg ocasiona la reducción de la altura de plantas de zonas pantanosas (Rivera-Cruz *et. al.*, 2004).

La complejidad fisicoquímica entre un suelo intemperizado y un sin número de reacciones bioquímicas que se presentan entre los diferentes componentes del suelo, dificultan la comprensión de los procesos de biotransformación que se desarrollan en el medio sólido y que conducen a la biodegradación de los hidrocarburos intemperizados. Los asfaltenos son Hidrocarburos Poli aromáticos Heterocíclicos (HPAHs), son muy recalcitrantes y

presentan un alto peso molecular con valores entre 600 a  $3 \times 10^5$  daltons y concentraciones entre 1000 y  $2 \times 10^6$  g/mol. Los hidrocarburos intemperizados presentan poca lixiviación o movimiento descendente hacia capas más profundas, (Tam N.F.Y y col., 2008). En ambientes costeros el destino de los hidrocarburos en suelo y sedimentos, son principalmente afectados por la biodegradación, procesos de sorción y textura del suelo. En este caso, si existe la presencia de un alto contenido de arcillas y materia orgánica, hay una alta capacidad de intercambio iónico en la matriz del suelo, lo que se refleja en una mayor sorción de hidrocarburos en suelo y sedimentos.

## **2.8 Remediación**

Un gran número de procesos de remediación se implementan para eliminar contaminantes y mejorar las propiedades fisicoquímicas del suelo, los procesos más comunes incorporan residuos agroindustriales con técnicas de composteo, lo que permite incrementar la porosidad, textura del suelo y aumentar la biomasa, sin embargo, en la mayoría de los casos se observa una gran competencia de los microorganismos por el tipo de sustrato al tratar de consumir otra fuente de carbono que no son los mismos hidrocarburos. Stelinga *et al.*, (2010) promovieron la desorción de los hidrocarburos hidrofóbicos mediante una dilución de los contaminantes al incorporar suelo no contaminado al suelo contaminado, las muestras de suelo contenían entre 48 y 79% de arcilla, sin embargo, en condiciones extremas como acidez en el suelo, no ha sido muy exitosa la desorción. Otros procesos fisicoquímicos que se utilizan son el venteo del suelo o fracturación del suelo, sin embargo, se requieren estudios geológicos y edáficos para conocer las características de la roca y la mineralogía, ya que en algunos casos hay emanación de gases como ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ), por la presencia de yacimientos de pirita comúnmente encontrados en algunos suelos costeros siendo esto más riesgoso que los mismos contaminantes.

Los hidrocarburos intemperizados deben ser considerados al seleccionar un método de remediación de suelos debido a su recalcitrancia. En algunos estudios se sugiere la implementación inicial de procesos fisicoquímicos para promover el movimiento y transporte de los hidrocarburos de los microporos hacia la fase líquida, mediante una solubilización de los compuestos (Providenti *et al.*, 1993). Algunos estudios reportan el incremento en la solubilización de los hidrocarburos intemperizados, mediante la

solubilización de las micelas de la fracción polar, al aplicar un solvente no polar y alcanzar la fragmentación de la fracción asfáltica.

Se reporta que la adición de los ácidos húmicos puede incrementar la población microbiana e influir en el aumento de la velocidad de biodegradación de la fracción pesada, con una consecuente disminución de la toxicidad de los hidrocarburos en el suelo contaminado (Perminova *et al.*, 2001; Holman *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2007), sin embargo, también se reporta la germinación de semillas y el crecimiento nulo, debido a la salinidad del 3.3% en el suelo.

Durante la biodegradación de los HTP se observan variaciones en el pH, lo que se debe en muchos casos, a la actividad microbiana en el suelo y no tanto a la concentración de hidrocarburos. Bacterias muy específicas son susceptibles de generar ácidos y bases débiles, sin embargo, no se aprecia una correlación positiva de la degradación de HTP con la cuenta microbiana.

Así mismo durante la implementación de una tecnología, el tamaño de partícula y salinidad son dos factores importantes que deben ser correctamente controlados en el sitio contaminado. Su control influye en la biotransformación de los hidrocarburos del petróleo en el suelo y promueve su degradación.

En las últimas décadas ha despertado gran interés en la comunidad científica las tecnologías de bioremediación por el costo- beneficio de su implementación y la poca perturbación en el ecosistema, de las cuales la fitoremediación se ha buscado como una alternativa para la remediación de suelos costeros, sin embargo, no puede funcionar en sitios donde el nivel sobre pasa el metro de profundidad. Los procesos de fitoremediación han sido una alternativa de bioremediación debido al potencial que tienen algunas especies endémicas de las ecosistemas tropicales, otro inconveniente es que no se ha demostrado su efectividad en la degradación de hidrocarburos con un número mayor de 34 carbonos (Holguin *et al.*, 2001; Ke L. *et al.*, 2003; Moreira I.T.A., *et al.*, 2011).



### 2.8.1 Requerimientos de una tecnología de remediación

Tabla 4. Parámetros que son determinantes en la selección de una tecnología de remediación de suelos.

<b>Parámetros fisicoquímicos</b>	
pH	En función del grado de contaminación, es la importancia del control de parámetros fisicoquímicos, lo cual influye en la capacidad de biodegradación de los hidrocarburos por los microorganismos nativos en el suelo y el grado de mineralización de los compuestos orgánicos.
Oxígeno disuelto (mg/L)	
Nutrientes C:N:P	
Materia orgánica (%)	
Temperatura (°C)	
Humedad relativa (%)	
<b>Parámetros Hidrogeológicos</b>	
Permeabilidad del suelo (cm/s)	Estos parámetros afectan la velocidad del transporte de hidrocarburos a través del suelo o bien influyen en la acumulación en la superficie.
Densidad del suelo (g/cm <sup>3</sup> )	
Conductividad hidráulica (cm/s)	
Porosidad	
Textura	
Tamaño de partícula (mm)	
<b>Propiedades físicas del contaminante</b>	
Solubilidad (gL <sup>-1</sup> /gL <sup>-1</sup> )	Las propiedades físicas del contaminante afectan el movimiento y transporte de estos en el medio físico y en consecuencia la capacidad de degradación.
Presión de vapor (mm Hg)	
Constante de Henry (atm . m <sup>3</sup> /mol)	
Viscosidad (cP)	
<b>Principales parámetros de operación</b>	
Velocidad de flujo del aire (m <sup>3</sup> /min)	El control de parámetros de operación de una tecnología son muy importantes ya que de ello depende éxito de una tecnología
Inyección de oxígeno (kilogramo O <sub>2</sub> /kilogramo)	
UFC (Unidades Formadoras de Colonias) /mL	

(Faisal y col., 2004)

Las propiedades fisicoquímicas del suelo y del contaminante influyen en la capacidad de biodegradación de los hidrocarburos intemperizados. Muchos estudios se enfocan en el monitoreo y control de parámetros de operación de las tecnología de biorremediación para asegurar la máxima degradación, tales variables se mencionan en la Tabla 4.

La acidez, temperatura alta y porcentaje de materia orgánica, así como la textura fina de los suelos y concentración de hidrocarburos intemperizados, son los principales factores que inhiben la biodegradación.

### **2.8.2 Bioaumentación**

La bioaumentación es el proceso en el que se inocula al suelo microorganismos nativos o exógenos con la capacidad comprobada de degradar contaminantes presentes en el suelo, una vez que se multiplican "in vitro" (Atlas and Bartha 2002). Esta tecnología ha sido muy estudiada a nivel laboratorio, sin embargo, poco se ha implementado a grandes escalas ya que por sí sola, esta tecnología presenta la desventaja de desarrollar procesos antagónicos con los microorganismos nativos, una vez que comienza el proceso de degradación.

### **2.8.3 Bioventeo**

Bioventeo es una evolución de la tecnología de extracción de vapores por sus siglas en inglés Soil Vapor Extraction (SVE), desarrollada para remover hidrocarburos volátiles. Esta tecnología opera mediante la inyección de oxígeno en la zona vadosa para remover los compuestos no acuosos de la fase líquida Non Aqueous Phase Liquid por sus siglas en inglés (NAPL). En los suelos costeros el bioventeo puede funcionar con alta humedad y tamaño de partícula fina como el que presentan comúnmente las zonas pantanosas.

La tecnología emplea pozos de extracción, aireadores y bombas de vacío para la extracción de gases, así como, un sistema de inyección de nutrientes. Las consideraciones operacionales más importantes de un sistema de bioventeo son el volumen de oxígeno y la velocidad de inyección al suelo. Un flujo de bioventeo no debe ser mayor a 4800L O<sub>2</sub>/0.45 kg de hidrocarburos y con una baja presión (Metcalf & Eddy, 1996), para evitar perturbación en el suelo por el exceso de aire, se recomienda que la distribución de O<sub>2</sub> en el

suelo debe ser aproximadamente de un  $0.1 \text{ cm}^3/\text{s}$ , ya que algunos autores reportan mejores resultados en la actividad microbiana con flujos bajos de oxígeno. Al introducir el aire en el suelo se debe esperar al menos 48 horas para la medición de la actividad microbiana, la cual puede ser expresada como producción de  $\text{CO}_2/\text{kg}$  de suelo seco, en este intervalo de tiempo la microbiota realiza los procesos metabólicos. El monitoreo consiste en optimizar la velocidad de flujo, evaluación de hidrocarburos volátiles como los BTEX (Benceno, Tolueno, Etano y Xileno), temperatura, adición de agua, nutrientes, presencia de subproductos. Las constantes biocinéticas se obtienen de la literatura, debido a que es complicado evaluar *in situ* la actividad bacteriana (Metcalf & Eddy, 1996). Existen estudios donde el bioventeo se aplicó en zonas costeras, en otros casos se implementaron tecnologías emergentes y se modificó el sistema básico de bioventeo, esto se realizó en sitios donde la remediación es factible. Los factores que afectan la aplicabilidad de bioventeo son: La permeabilidad del gas, difusión y distribución del contenido (pluma de contaminación), flujo de oxígeno, nutrientes, concentración de hidrocarburos, pH, temperatura, humedad y aceptores de electrones. Las características geológicas influyen en la implementación de un sistema de bioventeo, sin embargo, el alto contenido de humedad, así como la presencia de partículas muy finas no han dificultado en algunos casos, la aplicación de esta técnica al tener un buen control de los parámetros de operación.

Para que se lleven a cabo los procesos de sorción del contaminante en el suelo, dado que es un sistema complejo, se deben considerar la interacción de diferentes factores como son: Fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, intercambio iónico, entre otras, durante la implementación del bioventeo se debe tener un control del radio de influencia (RI) que es la máxima distancia en donde el vacío (movimiento del gas en el suelo) se lleva a cabo.

#### **2.8.4 Bioestimulación**

El proceso de bioestimulación implica la adición de nutrientes esenciales y agua al suelo contaminado para incrementar la actividad microbiana nativa, la cual disminuyó al modificarse la morfología de los microorganismos, por la presencia de los procesos de intemperización, tal es el caso de la actividad enzimática, reducción del tamaño celular y pérdida del micelio, por lo tanto, se pierde la capacidad de biodegradar los compuestos hidrofóbicos. La falta de nutrientes, la concentración y tipo de sal debe ser estimada con

exactitud ya que un exceso o falta de estos impiden alcanzar el mayor potencial de biodegradación.

## **2.9 Mecanismos de biodegradación de los hidrocarburos**

La restauración de un suelo inicia con la desorción del contaminante de la fase sólida en la que se encuentra fuertemente retenido mediante atracciones electrostáticas o de naturaleza química. Es aquí donde la biodegradación de algunos compuestos es más fácil. Tal proceso natural, no solo permite la eliminación de compuestos nocivos, sino que es indispensable para el reciclaje de los elementos en la biósfera, al permitir la restitución de elementos esenciales, como carbohidratos, lípidos y proteínas, para la formación y crecimiento de los organismos. La descomposición puede ser aerobia o anaerobia. La primera es más completa ya que libera energía, dióxido de carbono y agua, es la de mayor rendimiento energético. Los procesos anaeróbicos son oxidaciones incompletas y liberan menor energía (Branco 1984). La biodegradación de la materia orgánica, ocurre en varias etapas y son catalizadas por los microorganismos. La degradación de hidrocarburos por oxidación microbiana es un proceso ambiental importante en el cual, se eliminan los contaminantes del petróleo del agua y suelo.

### **2.9.1 Biodegradación de los alcanos**

Debido a que hay similitud entre las estructuras de los ácidos grasos y las parafinas las cuales están presentes en la naturaleza, muchos microorganismos pueden utilizar los n-alcanos (cadenas largas de alcanos), como única fuente de carbono y energía. Es más fácil aislar microorganismos capaces de degradar alcanos del medio ambiente que cicloalcanos. Como resultado de esto, los alcanos se consideran como los hidrocarburos más fáciles de degradar. La biodegradación de los alcanos se efectúa cuando hay una alta demanda de oxígeno (DBO), la cual emplea dos rutas metabólicas tal como se muestra en la Figura 5. El proceso metabólico más común es la incorporación directa de un átomo de oxígeno sobre el final de la cadena de carbonos del alcano mediante la enzima monoxigenasa.

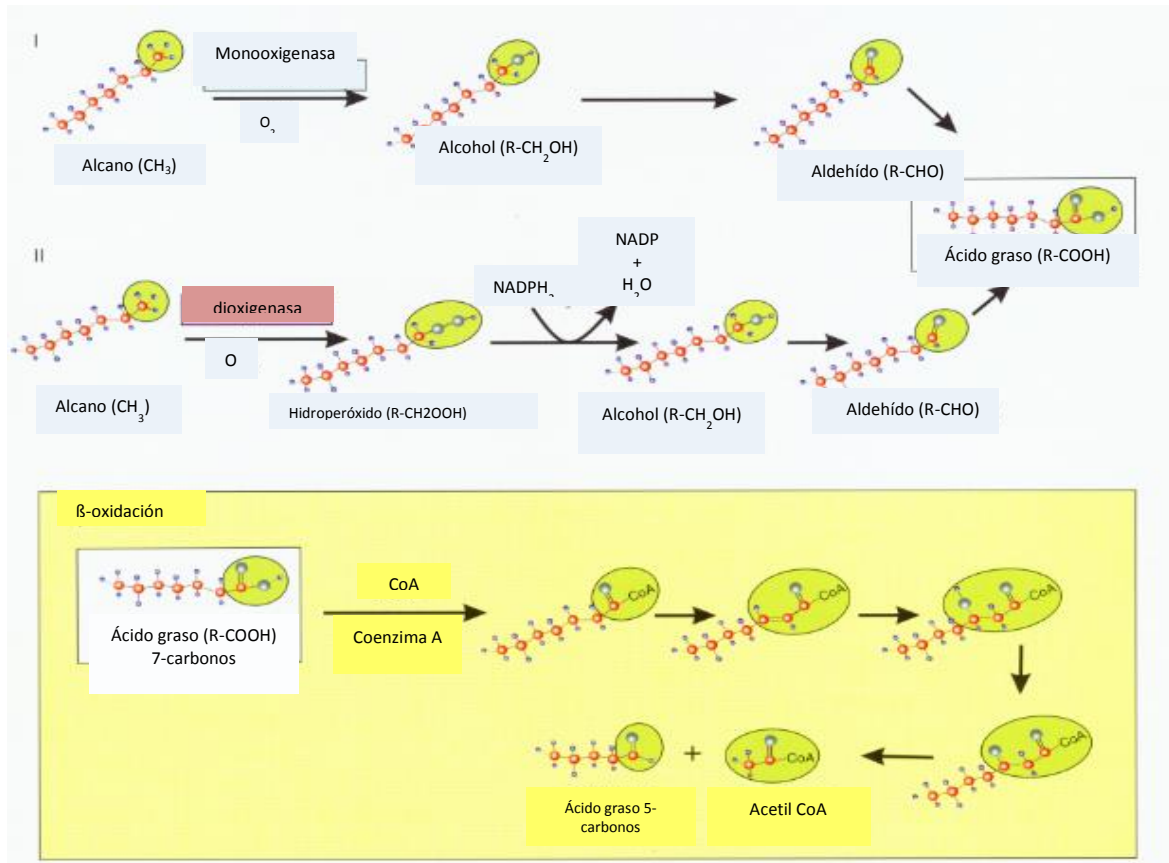


Figura 5. Degradación de alcanos (Maier y col., 2000)

Esto promueve la formación de un alcohol primario (proceso metabólico a). Alternativamente la enzima dioxigenasa puede incorporar ambos átomos de oxígeno en el alcano para formar hidroperóxido (proceso metabólico b). El resultado final de ambos procesos metabólicos es la producción de un ácido graso primario. Los ácidos grasos son metabolitos básicos encontrados en las células. Estos son usados en la síntesis de la membrana de fosfolípidos y como materiales lipídicos de almacenamiento. El proceso metabólico comúnmente empleado en el catabolismo de los ácidos grasos es conocido como  $\beta$ -oxidación, durante este proceso se fragmentan los carbonos en dos partes. Cada fragmento es removido por la coenzima A o acetil-CoA, la cual entra después en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), para llegar a obtener los subproductos de la mineralización que son  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Este proceso resulta obvio si se comienza con un alcano que tiene pares de carbonos, los tres fragmentos de carbonos propionyl-CoA será el último residuo. El propionyl-CoA después se convierte a succinyl-CoA, cuatro moléculas

que se encuentran en forma intermedia en el ciclo de los TCA. Los microorganismos degradan mejor cadenas lineales de compuestos alifáticos con ocho a diez carbonos (C<sub>10</sub>-C<sub>8</sub>). En cuanto a la solubilidad, ésta decrece con el incremento del número de carbonos en compuestos lineales, en contraste las cadenas cortas tienen una mayor solubilidad pero pueden ser tóxicas para los microorganismos.

## 2.9.2 Biodegradación de los alquenos

Los alcanos y alquenos tienen una velocidad de degradación muy similar, en la Figura 6, se muestra la degradación de alquenos. El paso inicial en la degradación de un alqueno, se efectúa 1) en la parte terminal de la estructura o subterminal, 2) en el grupo metil tal como se describió para los alcanos, 3) también puede comenzar el ataque en el doble enlace, 4) en un alcohol secundario, 5) en el epóxido. En cada caso los productos de la degradación inicial se oxidan para obtener un ácido graso el cual es degradado mediante  $\beta$ -oxidación.

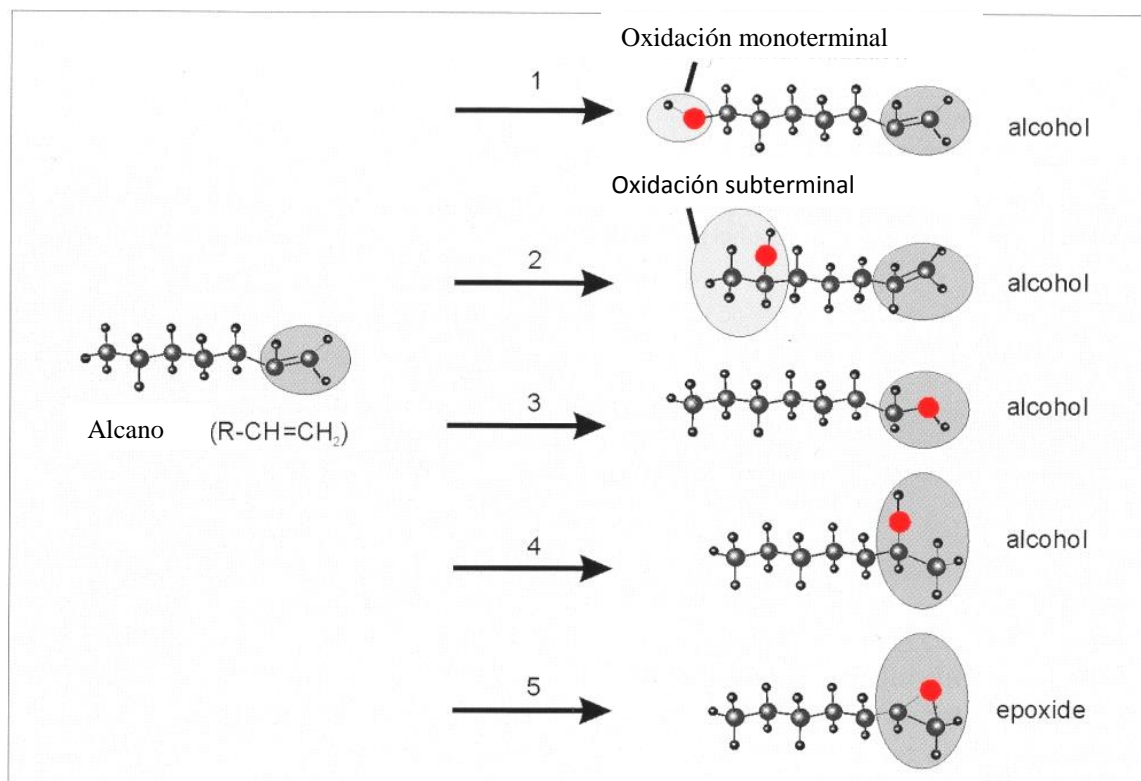


Figura 6. Biodegradación de alquenos (Maier y col., 2000)

### 2.9.3 Biodegradación de los compuestos alicíclicos

Es conocido que no hay alguna correlación para la capacidad de oxidación completa de los cicloalcanos, ya que es difícil aislar cultivos puros que degraden hidrocarburos alicíclicos usando técnicas de enriquecimiento. La degradación de los hidrocarburos alicíclicos como el ciclohexano, se lleva a cabo primero por comensalismo y reacciones cometabólicas tal como se muestra en la Figura 7. En estas series de reacciones existen microorganismos que convierten el ciclohexano a ciclohexanol vía ciclohexanol, pero son incapaces de romper el anillo. Un segundo microorganismo que es incapaz de oxidar el ciclohexano a ciclohexanona, puede romper el anillo y mineralizar el componente alifático restante.

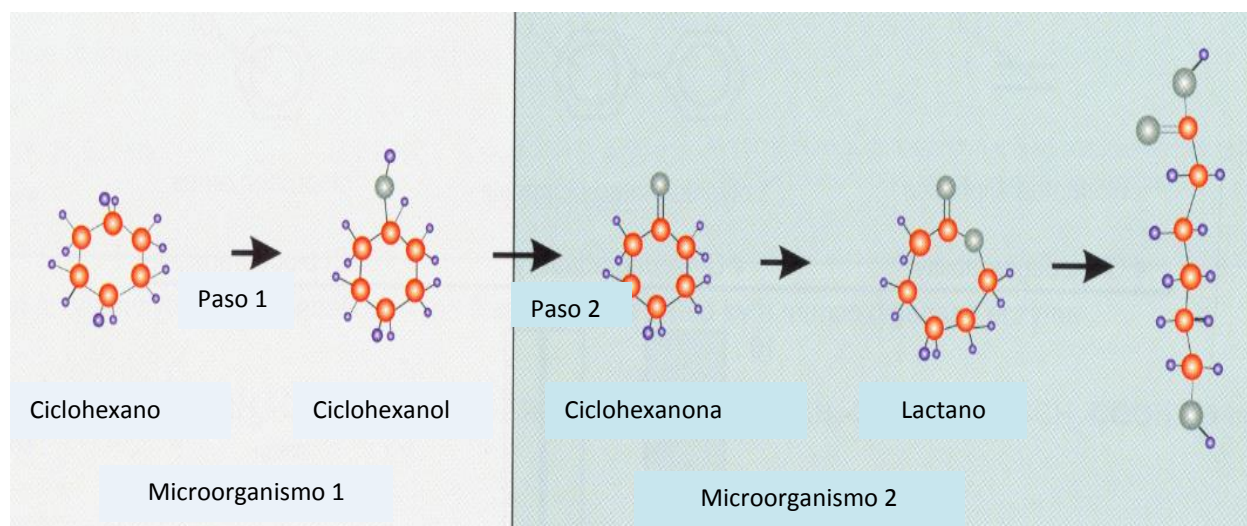


Figura 7. Biodegradación del ciclohexano ( Maier y col., 2000)

### 2.9.4 Biodegradación de compuestos aromáticos

Bajo condiciones aeróbicas, la transformación inicial más común es la hidroxilación que involucra la incorporación del oxígeno molecular. Las enzimas involucradas en dicha transformación son las monoxigenasas y dioxigenasas. En general los microorganismos procarióticos transforman los compuestos aromáticos mediante un ataque inicial de la dioxigenasa a cis-dihidrodiol. El cis-dihidrodiol ( $C_2OH_4O_2$ ) es rearomatizado para formar un hidroxilato intermedio, el catecol. El anillo del catecol es dividido mediante una segunda dioxigenasa entre dos grupos hidroxilo (orto) y un siguiente grupo hidroxilo (meta), más

adelante es degradado como se observa en la Figura 8. En general los compuestos aromáticos (PAH), pueden tener dos o tres anillos, los cuales son transformados y frecuentemente mineralizados por los microorganismos nativos, cuando los compuestos contienen cuatro o más anillos son transformados más lentamente como resultado del ataque cometabólico. Esto es debido a la limitada biodisponibilidad por su alto peso molecular. Los PAH presentan poca solubilidad y fuerte adsorción a las partículas del suelo y sedimentos. Sin embargo, se reporta que la velocidad de transformación de estos compuestos se puede mejorar, si se logra adaptar microorganismos nativos de los sitios contaminados.

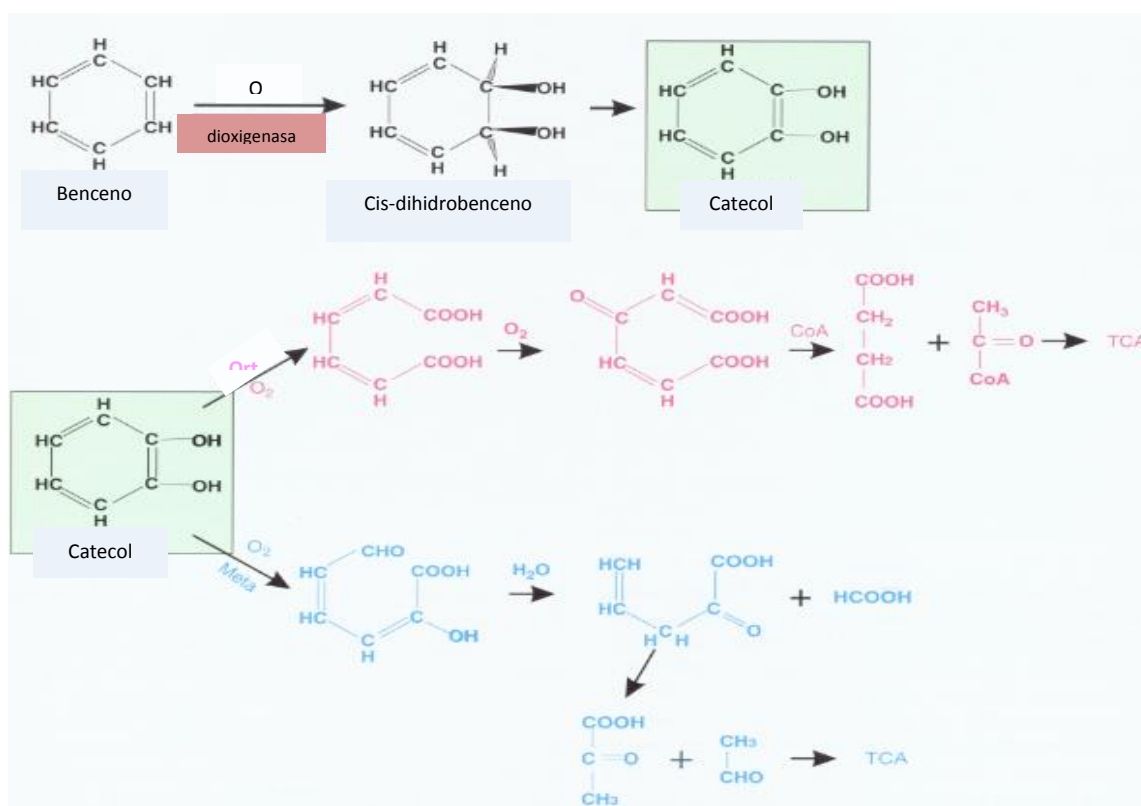


Figura 8. Degradación del benceno, Maier y col., 2000

## 2.10 Degradación de hidrocarburos mediante hongos y levaduras

De manera general los microorganismos desarrollan mecanismos de degradación no específicos mediante la formación de radicales que se forman en el ambiente extracelular,



por lo tanto, son capaces de desdoblar contaminantes que se encuentran poco disponibles. Para los hongos y otros microorganismos son esenciales para su crecimiento los elementos traza, sin embargo, en altas concentraciones son tóxicos e inhiben el crecimiento, además de causar cambios morfológicos y fisiológicos. Cada especie difiere en el nivel de sensibilidad hacia los metales y desarrolla diferentes mecanismos de protección por los micelios que tienen una capacidad de sorción selectiva individual dependiendo del ion (Baldrian *et. al.* 2003). Los micelios de los hongos tienen la capacidad de fraccionar las complejas estructuras de los hidrocarburos persistentes, esto incrementa el área de superficie para la biodegradación y el ataque microbiano, aunado a que tienen la capacidad de reproducirse en ambientes de estrés en contraste con las bacterias que sobreviven limitadamente. Para realizar un proceso de biodegradación es necesaria una eficiente asimilación de los hidrocarburos. Los hongos son microorganismos capaces de asistir un proceso de emulsificación y transporte de hidrocarburos dentro de la célula (Das P *et al.*, 2008).

En el estudio de la degradación de hidrocarburos persistentes se establecen varias relaciones de nutrientes esenciales, en función de los requerimientos nutricionales del suelo contaminado y la presencia de microorganismos nativos. Los micronutrientes cobalto (Co), Cu, Zn y molibdeno (Mo), también llamados elementos traza y macronutrientes como el C, N, P, S, K, Mg, intervienen en dos principales procesos: el desarrollo de la estructura celular y la síntesis de proteínas, cada nutriente tiene una función específica para alcanzar los requerimientos metabólicos. Los hongos tienen la capacidad de incorporarse rápidamente dentro de la matriz del suelo, pueden adaptarse a ambientes extremos con una baja cantidad de nutrientes, bajo contenido de humedad y pH ácido (Mollea y col., 2005). Algunos autores mencionan que la mayor biodegradación de los PAHs de fracción pesada (mayores a cinco anillos) en suelos tropicales, puede realizarse primeramente por hongos tales como *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* (Yateem y col., 1998, Boochan S., y col., 2000, Mollea y col., 2005). En estudios de bioestimulación y bioaumentación emplearon *Rhizopus sp.*, *Penicillium funiculosum* y *Aspergillus* para la degradación de hidrocarburos intemperizados con una concentración de 60,600 mg/Kg HTP, el cual alcanzó una remoción de PAHs de 70% en un tratamiento de bioaumentación con *Rhizopus sp.*, en tanto los hidrocarburos alifáticos alcanzaron 90% de

remoción. Estos microorganismos desarrollan mecanismos de degradación no específicos mediante la formación de radicales en el ambiente extracelular e influyen en la biotransformación de los hidrocarburos recalcitrantes (Mancera-López *et al.*, 2008).

### **2.11 Biodegradación por bacterias**

Inicialmente los hidrocarburos recalcitrantes son transformados por ciertas especies de hongos capaces de crecer en condiciones ácidas posteriormente. Por mucho tiempo se le consideró a las bacterias como los agentes más activos de la biorremediación, sin embargo las enzimas que secretan algunos hongos realizan la oxidación de los hidrocarburos y los subproductos son posteriormente empleados por las bacterias (De Lorenzo 2008, Chávez *et al.*, 2003, Rodríguez -Vázquez *et al.*, 2003). Se ha reportado una importante actividad por parte de algunos hongos al inicio de la biodegradación, los cuales, desarrollan ciertos subproductos intermediarios que son empleados por grupos bacterianos que a su vez estos mismos generan nuevos metabolitos y son asimilados por otras especies de bacterias, de esta manera se lleva a cabo la transformación de compuestos tóxicos a compuestos inocuos, en tanto, se presenta un cambio de las propiedades fisicoquímicas del suelo en tratamiento. La remediación de un suelo contaminado es influenciada por la capacidad de rotación de diversas especies microbianas, sin embargo, sin la implementación de algunos procedimientos de bioremediación en un suelo contaminado difícilmente se establecerán microorganismos específicos con características bioquímicas para desdoblar compuestos recalcitrantes, por lo que es importante promover la condiciones ambientales mediante el control de parámetros que son determinantes para el desarrollo de microorganismos hidrocarbonoclastas.

### **2.12 Biotransformación de los hidrocarburos intemperizados**

A continuación se presenta un modelo del proceso de biotransformación de los hidrocarburos intemperizados (Figura 9).

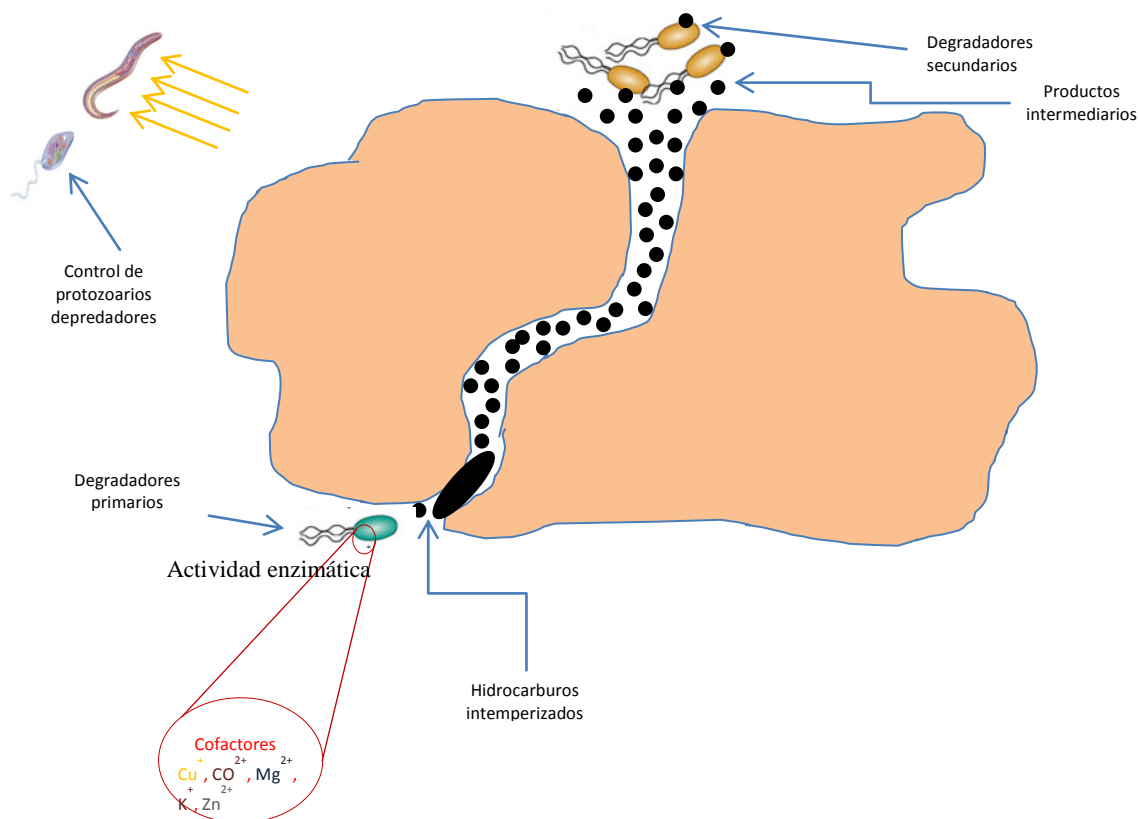


Figura 9. Biotransformación de los hidrocarburos (Yu *et al.* 1994, Maier 2000, García-Rivero 2003)

El primer paso para la biotransformación de los hidrocarburos intemperizados es la presencia de microorganismos con una capacidad enzimática para el desdoblamiento de las estructuras químicamente complejas de los hidrocarburos intemperizados, un factor esencial para promover la degradación de los compuestos hidrocarbonados es la aplicación de nutrientes esenciales que pueden ser cofactores o activadores metálicos como el  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , que influyen en la formación de sitios activos para que especies microbianas puedan llevar a cabo la biotransformación de los compuestos, mediante el debilitamiento de los enlaces químicos de las moléculas de hidrocarburos. Para que esto ocurra deben existir microorganismos específicos, por lo que el control de la producción de biomasa es un factor limitante para obtener la solubilización de los hidrocarburos persistentes. La biodegradación de los hidrocarburos se puede realizar mediante dos mecanismos: 1) cometabolismo, dicho mecanismo de biodegradación consiste en la reducción de lodos y 2) anabolismo, proceso donde hay una gran producción de lodos, en

el primer caso es afectado por la formación de complejos sustrato-enzima que serán producidos por microorganismos hidrocarbonoclastas con sistemas enzimáticos adecuados para la alcanzar la mineralización de los hidrocarburos, por lo que es determinante la producción de enzimas específicas para la biotransformación de los hidrocarburos persistentes.

### **2.13 Hipótesis**

El acoplamiento de los procesos de bioestimulación, bioventeo y bioaumentación, con las mejores condiciones de operación mejoran las características fisicoquímicas de un suelo costero contaminado y se incrementa la eficiencia de degradación de los hidrocarburos intemperizados.

### **2.14 Justificación**

Este proyecto surge como una alternativa tecnológica para la degradación de los hidrocarburos intemperizados que son estructuras químicas persistentes y recalcitrantes a la degradación biológica. En México, especialmente en Veracruz, municipios como Agua Dulce es el centro de la actividad petrolera por los que los suelos se han visto afectados desde hace décadas por la contaminación. Los métodos tradicionales de remediación térmicos o fisicoquímicos pueden producir compuestos aún más tóxicos que el contaminante de origen aunado a los costos que generan su implementación. Debido a la complejidad de las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en un suelo costero es importante resaltar, se requiere controlar parámetros fisicoquímicos y biológicos. Una opción es la optimización de un proceso de remediación empleando un diseño de experimentos, que impliquen menores costos y tiempo para degradar la máxima concentración de hidrocarburos intemperizados, lo cual, es posible alcanzar si se logra identificar las condiciones de operación óptimas en un acoplamiento de tecnologías de biorremediación, tales como bioestimulación, bioventeo y bioaumentación. Al optimizar variables de control es posible alcanzar mayor biodisponibilidad de los hidrocarburos intemperizados y por consiguiente la degradación.

### **2.15 Objetivo general**

Desarrollar una metodología mediante el acoplamiento de las técnicas de bioventeo, bioestimulación y bioaumentación para la remediación de un suelo costero contaminado con hidrocarburos intemperizados reduciendo costos y tiempo.

### **2.16 Objetivos específicos**

- Realizar la caracterización física, química y biológica del suelo, así como, la identificación de las propiedades de los hidrocarburos intemperizados, para establecer condiciones de biodegradación.
- Seleccionar las condiciones nutrimentales de un consorcio microbiano bioaumentado para hacerlo más eficiente en la biodegradación de los hidrocarburos intemperizados.
- Construir un prototipo de la alternativa tecnológica obtenida a nivel laboratorio, empleando un diseño de experimentos Placket-Burman, para optimizar los parámetros de operación.
- Llevar a cabo el acoplamiento de las técnicas de bioestimulación, bioventeo y bioaumentación, para determinar el potencial de biodegradación de los hidrocarburos intemperizados.
- Desarrollar pruebas ecotoxicológicas para conocer la eficiencia del tratamiento de la tecnología acoplada.
- Realizar la propuesta de una alternativa tecnológica para cumplir con las demandas de calidad de suelo establecidas por la normatividad.

### 3. METODOLOGÍA

En el siguiente esquema (Figura 10) se describen las etapas para la obtención de una metodología como alternativa tecnológica en la remediación de un suelo tropical contaminados con hidrocarburos. Inicialmente se realizó la revisión bibliográfica de tecnologías aplicadas a la remediación de hidrocarburos, para conocer sus ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación comúnmente implementadas en suelos contaminados. Se encontró que bioestimulación, bioventeo y bioaumentación, son tecnologías con un mejor costo beneficio y capacidad de degradar los hidrocarburos intemperizados con la mínima perturbación de un suelo, por lo que se establecieron los parámetros fisicoquímicos y biológicos más influyentes en la biodegradación.

Para la obtención del consorcio microbiano con mayor potencial de biodegradación se seleccionaron dos sitios los cuales han sido influenciados por una intensa actividad petrolera, mismos que se encuentran en dos localidades: el suelo de la localidad “Estero de pantano” y el suelo del sitio de “Agua Dulce”, ambos sitios se encuentran contaminados desde hace más de diez años. A partir de las muestras de suelo tomadas de los dos sitios y previamente caracterizadas, se realizó un proceso de bioaumentación, ambos inoculos fueron adaptados por más de tres meses, los cuales eran sembrados empleando crudo maya previamente volatilizado empleando una temperatura de 200°C para eliminar componentes de fracción ligera, de los resultados se seleccionó “Agua Dulce” como el consorcio microbiano con mayor capacidad de biodegradación de hidrocarburos recalcitrantes.

Mediante un proceso de bioestimulación se optimizó un medio nutritivo para que los microorganismos degradaran la máxima cantidad de hidrocarburos intemperizados, empleando un diseño de experimentos para identificar la concentración y tipo de sal que influyen en la disminución de los hidrocarburos de fracción pesada. Posteriormente se realizó el acoplamiento de bioaumentación, bioestimulación y bioventeo donde se estudió el efecto de la humedad, la aplicación de aire y nutrientes en la degradación de los hidrocarburos de fracción pesada, el cual se desarrolló utilizando un diseño de experimentos factorial fraccionado con ocho corridas experimentales. Para evaluar la eficiencia de biodegradación de hizo una prueba de toxicidad.

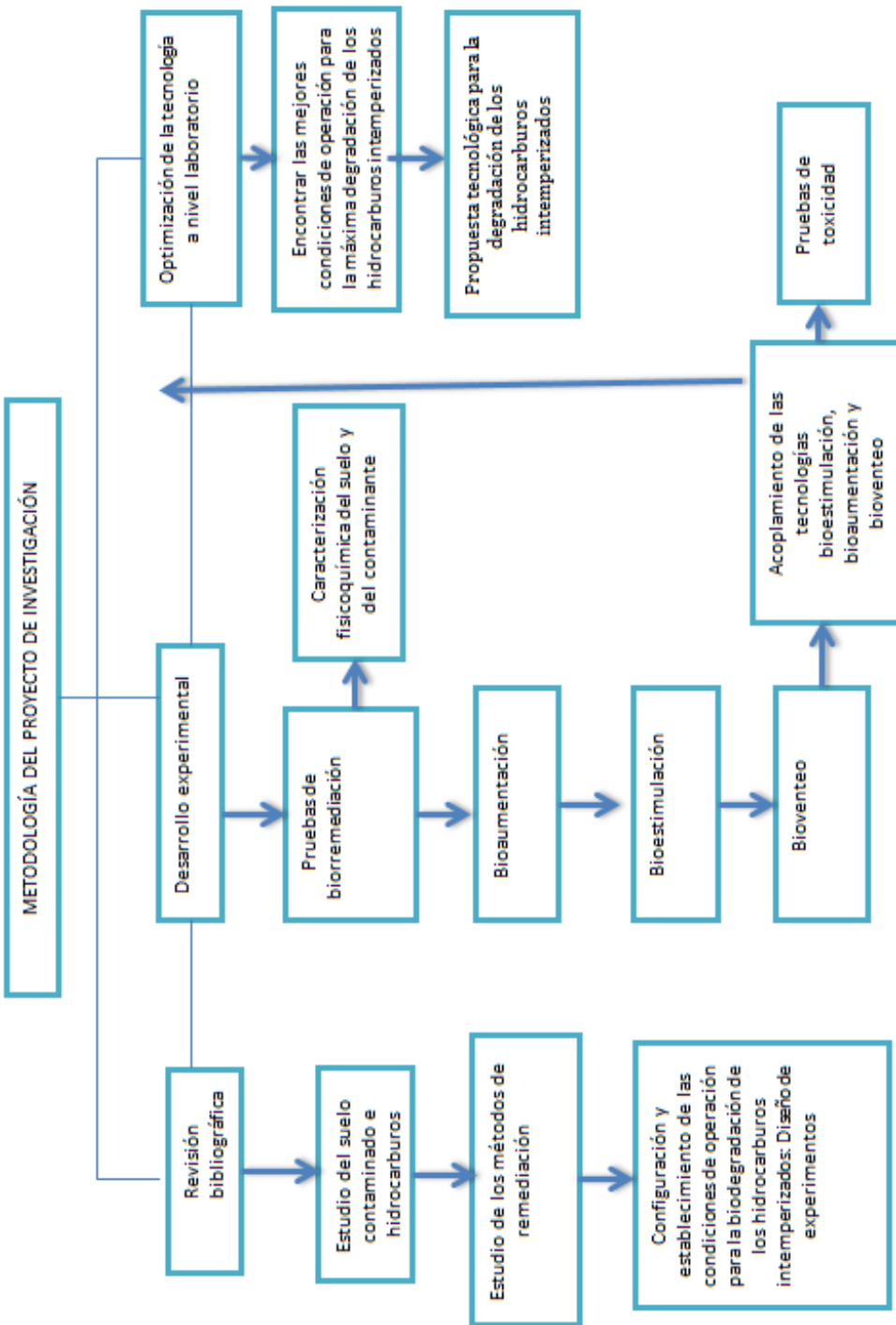


Figura 10. Metodología para la biodegradación de los hidrocarburos intemperizados

### **3.1 Localización del sitio y caracterización fisicoquímica del suelo**

El suelo contaminado con hidrocarburos intemperizados se colectó de una región costera, en el municipio de Agua Dulce, Veracruz que está ubicado en las *coordenadas* 18°09" latitud norte y 94°08" longitud oeste y una altura de 20 msnm. La vegetación cercana al sitio está compuesta por totora (*Typha latifolia*), cañas (*Phragmites australis*) y leguminosa (*Mimosa spp.*). La temperatura promedio es de 25.6°C y la precipitación anual es de 2041mm (Gobierno del Estado de Veracruz, 2010). El sitio se ubica entre dos municipios (Coatzacoalcos y Minatitlán) con intensa actividad petrolera, por lo que, esta región ha sido de las más afectadas por los derrames de petróleo crudo, el sitio ha estado contaminado desde hace décadas y los hidrocarburos han experimentado un proceso de intemperización. El sitio de Estero de Pantano, localizado en el estado de Veracruz en la región de Cosoleacaque (94°28"N), se encuentra a 10 metros sobre el nivel del mar, este sitio es una zona suburbana, donde los habitantes se dedican a la pesca y agricultura, dicho sitio tiene casi dos décadas haber sido contaminado con un derrame de hidrocarburos y los continuos muestreos indican que a pesar de haber transcurrido un periodo de tiempo, aún existen hidrocarburos presentes en el suelo.

#### **3.1.1 Muestreo**

El procedimiento de muestreo se realizó siguiendo las especificaciones de la norma Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.

#### **3.1.2 Sitio contaminado**

En este estudio las muestras de suelo se extrajeron de cero a 15 cm de profundidad. Se tomó una muestra compuesta en cuatro puntos en un área de 1ha, con un peso de 1 kilogramo para su posterior caracterización. En el laboratorio el suelo se secó al aire y en la sombra por 24 horas, ya seco se homogenizó y guardó para su posterior caracterización, los ensayos se realizaron por triplicado, las muestras presentaron una textura franco-arcillosa, materia orgánica de 6.8%, densidad bacteriana  $1.7 \times 10^5$  UFC/g de suelo seco, conductividad del suelo (CE) de  $0.508 \pm 0.1$   $\mu$ S/cm, en tanto, el contenido de hidrocarburos de fracción pesada fue de  $80\ 926.4 \pm 50$  mg HFP/kg suelo seco.



Las características físicas y químicas del suelo que más influyen en la degradación de los hidrocarburos intemperizados son el pH, porcentaje de materia orgánica, textura, porcentaje de humedad y contenido de fracción pesada.

El pH se determinó utilizando 5g de muestra, se adicionaron 12.5 mL de agua destilada, la lectura se realizó a una temperatura de 24°C (Aleman-Caporal, 2009). La determinación de la materia orgánica se realizó mediante el método de combustión húmeda de Walkley & Black (1934). La textura afecta el tamaño del poro, humedad, aireación y consecuentemente la actividad de los microorganismos, la cual se realizó mediante el método de Bouyoucos. El porcentaje de humedad se realizó mediante la diferencia de peso, se pesaron 20 g del suelo contaminado, posteriormente se secó a 125°C en una estufa digital marca RIOSSA (Cheng *et al.* 2001). La determinación de los hidrocarburos de fracción media y pesada se realizó siguiendo las especificaciones de la norma Mexicana NMX-AA-145-SCFI-2008 y NMX-AA-134-SFCI-2006 respectivamente.

#### **3.1.2.1 Identificación de metales mediante ICP-Masas**

A partir de una submuestra de suelo de 200 g del sitio de Agua Dulce. Se determinó la concentración de metales pesados siguiendo las especificaciones de la EPA 6010C/2007/ICP (Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, ICP-AES).

### **3.2 Bioaugmentación**

Se emplearon 9 diferentes medios enriquecidos (Tabla 8), los cuales se inocularon con los suelos de los lugares de muestreo (Agua Dulce y Estero de Pantano), para observar la capacidad de emulsificación del crudo maya, como un potencial para su degradación. Esto consistió en preparar 275 mL de cada medio y se adicionó 1% (w/v) de crudo maya, posteriormente se introdujo en un agitador horizontal a 28°C para promover la aireación y agitación en el medio, cada medio contenía 1% del inóculo de Agua Dulce y de Estero de Pantano. Con base a los reportes en donde se indica que la capacidad de biodegradación está asociada a la emulsión que presenta el petróleo crudo, la aparición de emulsión, se relaciona directamente con la producción de biosurfactante como un producto de la biodegradación del hidrocarburo en el medio de cultivo (Cooper 1987).

El crecimiento microbiano se estimó mediante el aumento de los sólidos suspendidos volátiles (mg SSV/mL). La temperatura, contenido de nutrientes y pH se mantuvieron

constantes. Para la determinación de SSV se siguieron las especificaciones de la norma NMX-AA-034-SCFI-2001 que consistió en tomar 10 mL del inóculo adaptado. Posteriormente, se sometió a evaporación la alícuota del inóculo adaptado a una temperatura entre 103 y 105°C, se empleó una estufa digital marca RIOSSA. Se registró el peso y posteriormente se calcinó a 550°C ± 50°C en un tiempo de 15 a 20 minutos. Los SSV se obtuvieron como la cantidad de materia orgánica capaz de volatilizarse por el efecto de la calcinación, los cuales se estimaron por diferencia de peso de la biomasa obtenida después de la calcinación. Los consorcios que presentaron la mayor degradación de hidrocarburos, fueron seleccionados para realizar el proceso de bioaumentación.

### **3.2.1 Cinética de crecimiento de bacterias**

El crecimiento de bacterias está correlacionado con la biodegradación de los hidrocarburos, al ser la única fuente de carbono (Song and Katayama 2010). La cinética de crecimiento bacteriano se llevó a cabo en las dos muestras de suelo, Estero de Pantano y Agua Dulce. Se empleó como fuente de carbono 3mL de petróleo crudo maya, el cual, fue volatilizado a una temperatura de 250°C, con la finalidad de que proliferaran microorganismos con alto potencial de biodegradación de la fracción pesada. Este procedimiento consistió en pesar 1g del suelo del sitio de Agua Dulce, así como, de Estero de Pantano para cuantificar la densidad bacteriana. Después 5g de suelo de ambos suelos fueron inoculados en un matraz Erlenmeyer, al cual se le adicionaron 287mL de medio enriquecido Bushnell Haas previamente esterilizado a 121°C por 20 minutos, después se incubó a 28°C por siete días. El medio enriquecido se compone de las siguientes sales: 60 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 60 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 60 KNO<sub>3</sub>, 3 g/L FeCl<sub>3</sub>, 1.2 g/L CaCl<sub>2</sub>, 12 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. (Atlas *et al.*, 1994). Esta operación se repitió cada siete días resembrando 5mL del inóculo (para ambos consorcios Agua Dulce y Estero de Pantano) y adicionando la fuente de nutrientes Bushnell Haas y el petróleo crudo Maya como fuente de carbono.

El crecimiento bacteriano se describe matemáticamente mediante la ecuación reportada por Maier (2000):

$$dX/dt = \mu X,$$

Donde:

$X$  = número de células (masa/volumen),

$t$  = tiempo

$\mu$  = constante de la velocidad de crecimiento específico (1/tiempo)

La velocidad de crecimiento bacteriano ( $\mu$ ) para ambos inóculos fue estimada durante la fase exponencial correspondiente  $\ln X = \mu t + \ln X_0$ . El valor de  $\mu$  para Agua Dulce fue determinado entre las 16 y 20 horas, en tanto que para el Estero Pantano fue entre las 12 y 20 horas.

El crecimiento bacteriano se realizó mediante la inoculación en dos matraces Erlenmeyer de 500mL y se adicionó 1% (v/v) de ambos consorcios, Estero de Pantano y Agua Dulce, también se agregó 1% (w/v) de petróleo crudo volatilizado, posteriormente se adicionaron 287mL medio enriquecido. Ambos consorcios fueron incubados en un agitador rotatorio (C25HC modelo científico), a 200 rpm a una temperatura de 28°C por un periodo de 24 horas. Cada 4 horas se realizaron diluciones seriales desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$ , para llevar a cabo el conteo bacteriano por siembra de las diluciones, en caja Petri usando 1.5% de Agar Soya Tripcaseina (AST). Las cajas fueron incubadas a 35°C por 24 horas. Los ensayos fueron realizados por triplicado. Se realizó un análisis de regresión no lineal empleando el software (Origin 8.0).

### **3.2.2 Cinética de crecimiento de hongos y levaduras**

La cinética de crecimiento de hongos y levaduras se llevó a cabo simultáneamente con el conteo bacteriano según el apartado anterior. Se empleó 1.5% Agar Dextrosa Saboraud (ADS) para realizar el conteo en caja Petri, se inhibió el crecimiento de bacterias empleando 125 mg de Amoxicilina en 267 mL del medio de cultivo. Se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ L cada 4 horas, se realizaron diluciones seriales desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$ . Las cajas fueron incubadas a 35°C por 24 horas. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

### **3.2.3 Resiembra del consorcio para el estudio de la morfología colonial**

El crecimiento bacteriano fue estudiado en sistema batch o por lote, utilizando un matraz Erlenmayer de 500mL, se adicionó el 1% (v/v) de petróleo crudo Maya, más 287 mL de medio mineral Bushnell Haas, como se indicó en el apartado anterior. El crecimiento bacteriano fue estudiado durante un tiempo de 24 horas, posteriormente, se tomó una

alícuota de 200 $\mu$ L y se resembró en otro matraz Erlenmayer. Este proceso se realizó durante siete días, se realizaron diluciones seriales desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$ , cada 4 horas. El número total de Unidades Formadoras de Colonia (UFC), de bacterias degradadoras, se estimó en placa con un medio sólido de Agar soya tripticaseína (AST) marca BD Bioxon a 35°C, selectivo para bacterias. Esta operación se realizó por triplicado para ambos inóculos. La cinética de crecimiento bacteriano se estudió mediante un ajuste por análisis de regresión no lineal empleando en software Origin versión 8.0.

### **3.2.4 Aislamiento e identificación bacteriana**

De las UFC, más abundantes de la cinética de crecimiento del inóculo de Agua Dulce y de Estero de Pantano, se realizó el aislamiento. Se empleó la técnica de aislamiento por estría cruzada, se usó una asa redonda, la cual se esterilizó directamente a la flama. El aislamiento se realizó varias veces hasta obtener colonias puras y bien diferenciadas en base a su morfología.

### **3.2.5 Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN)**

La extracción del ADN se realizó a partir de la selección de seis UFC's, que fueron las más abundantes en ambos inóculos, fueron resembradas en medio líquido AST en tubos de vidrio de manera individual. Los tubos que contenían cada UFC fueron incubados a 72h a 28°C, baja condiciones aerobias. Después de la incubación se realizó la extracción del ADN, para lo cual se empleó un kit ZR Fungal/Bacterial ADN (marca Zymo Research), para la extracción se siguieron las instrucciones de protocolo que comprendió tres pasos. a) Lisis, que consistió en romper la pared celular o membrana plasmática, así como, la membrana nuclear para liberar el ADN. b) Purificación del ADN mediante la precipitación con etanol para eliminar otros compuestos celulares como proteínas, lípidos y compuestos reactantes generados durante la lisis. Adicionalmente se llevó a cabo la purificación del ADN utilizando el kit UltraClean PCR Clean-Up (marca MoBio Laboratories) para impedir inhibición en el PCR.

El procedimiento para verificar la extracción del ADN se realizó mediante electroforesis con 1% de agarosa gel y bromuro de etidio (EtBr) (IBI mark Scientific) usando Ultrapure TAE 1X Buffer (Acetato de Trix y EDTA). Se empleó una cámara de electroforesis para

confirmar la extracción del ADN. La corrida de la electroforesis se llevó a cabo por 20 minutos a 120°C empleando un marcador de peso molecular con un tamaño de 1542 bp. La concentración del ADN fue determinada mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 260nm empleando un espectrofotómetro Quawell modelo Q5000.

### **3.2.6 Amplificación del gen 16S ARN e identificación de especies bacterianas**

La amplificación del gen 16S ARN de las bacterias mediante PCR se realizó tomando una mezcla de 50µL de una mezcla para PCR, la cual está compuesta de 1µL de primer Fd1, 1µL de primer Rd1, 1.5µL de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), 1µL desoxinucleótido trifosfato (dNTP). Al ADN extraído se le adicionaron 48µL de la mezcla. Posteriormente el PCR fue conducido por una secuencia bacteriana de primers: 16SF1 (5'-CCG AAT TCG ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') -16SR1' y (5' - GGG CCC ATC GGA TAA CAA GGT GCT GCC CCA GAT -3 ') (Viñas and et. al. 2005). Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: (i) 5 min a 96°C, (ii) 40 ciclos of 30s a 94°C, 30s a 58°C y 30 s a 72°C y (iii) 15s a 72°C. La obtención del PCR se realizó en un equipo Mastercycler gradient S (Eppendorf) y la amplificación de los productos fue analizada empleando 1% de agarosa con un TAE buffer. El gen 16S para cada cepa fue identificado en el laboratorio LANGEBIO (Laboratory of Genomics for Biodiversity), CINVESTAV. Las secuencias del gen obtenido para cada cepa fueron comparadas empleando la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### **3.2.7 Análisis cromatográfico de la conversión de la fracción pesada del crudo maya en los inóculos de Agua Dulce y de Estero de Pantano**

El contenido de hidrocarburos en el suelo contaminado se evaluó, mediante diferentes análisis fisicoquímicos como: Análisis cromatográfico GC-MS, el cual permitió identificar cualitativamente los compuestos hidrocarbonados al tiempo cero y a las 24 horas de incubación, durante la cinética de crecimiento bacteriano. El análisis FTIR permitió observar la disminución de la fracción pesada conforme transcurrió la biodegradación. UV-visible fue otro método empleado para observar compuestos recalcitrantes como la fracción asphalténica. En tanto, el método gravimétrico se empleó para la cuantificación de hidrocarburos de fracción pesada (HFP/kg suelo seco), el análisis de los resultados,

permitió conocer la degradación de los hidrocarburos durante la bioestimulación, bioaumentación y bioventeo.

La evaluación de degradación del petróleo crudo maya con los inóculos de Agua Dulce y Estero de Pantano, se realizó como se indica a continuación. De las diferentes formulaciones de los medios de cultivo, se obtuvo una alícuota de 1.5 mL para realizar la extracción de los hidrocarburos con dos solventes acetona-diclorometano, en una relación 1:1, se realizaron tres extracciones y se agitó vigorosamente empleando un vortex por 5 minutos, el solvente fue evaporado hasta obtener 1 mL de extracto el cual se guardó en viales de vidrio color ámbar y se conservó a 4°C, hasta su análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), para obtener el porcentaje de abundancias relativas de los componentes más significativos.

Tabla 5. Parámetros de operación del equipo GC-MS

<b>Parámetros de operación</b>		
<b>Parámetros del Inyector</b>		
Split/Splitless injector	Modo split con pulso	20:1, a 10 psi hasta 0.75 min
Volumen de Inyección	1 µL	
Flujo de purga de septum	On	3.0 ml/min
Temperatura de inyección	280°C	
<b>Columna cromatográfica</b>		
Columna	Rxi-5Sil MS	30m X 0.25mmID X 0.25 µm de grosor de película.
<b>Parámetros del horno</b>		
Temperatura inicial	35°C	Tiempo sostenido de 6 minutos
Rampa de temperatura	5°C/min hasta 300°C	
Temperatura final	300°C	Tiempo sostenido 30 minutos
<b>Parámetros MS</b>		
Interfase MS	290°C	
Modo Scan (rango de masa)	50-550 m/z	

El análisis cromatográfico de gases (GC), se realizó en un GC-MS modelo 7890<sup>a</sup>, acoplado a un detector selectivo de masa MSD modelo 5975C, ambos marca Agilent Technologies,

integrado con el software ambiental chemstation. Los parámetros de operación se mencionan en el Tabla 5.

### **3.3 Bioestimulación**

En el proceso de bioestimulación se optimizó un medio enriquecido para la degradación de los hidrocarburos intemperizados, así mismo, se adicionó el consorcio adaptado de Agua Dulce, al considerar que tenía mayor potencial de biodegradación.

#### **3.3.1 Optimización del medio enriquecido**

Se estudiaron diferentes formulaciones de nutrientes esenciales para identificar el tipo de sal y su respectiva concentración, para determinar cuales tenían mayor influencia en la degradación de los hidrocarburos de las siguientes fracciones: fracción pesada (HFP)/kg de suelo en base seca, fracción asfáltica (FA)/kg de suelo en base seca, producción de CO<sub>2</sub>/kg de suelo en base seca, efecto de la humedad (%), pH, y conductividad eléctrica (CE μS/cm), para esto se realizó un diseño de experimentos factorial fraccionado Plackett-Burman, el cual es un diseño de barrido donde obtienen los efectos principales de las variables de estudio sobre la variable de respuesta, se compone de 11 factores y 2 niveles, un nivel alto y un nivel bajo del contenido de nutrientes, el nivel bajo es casi cero puesto que se consideró la existencia de los nutrientes ya presentes en el suelo, ya sea de manera natural, o por la adición de fertilizantes, los cuales pueden ser asimilados por los microorganismos para realizar sus procesos metabólicos, dado que se reporta que la mayor bioasimilación se lleva a cabo, en las concentraciones mínimas de sales minerales que promueven la máxima degradación de los hidrocarburos intemperizados, así como, el mejoramiento de las propiedades fisicoquímicas del suelo contaminado. En la Tabla 6, se muestran las sales minerales que fueron utilizadas por diferentes autores para la degradación de hidrocarburos altamente persistentes. Como se puede observar, los tratamientos consideran un nivel alto y otro nivel bajo para las sales empleadas.

Tabla 6. Sales minerales comúnmente utilizadas en un medio enriquecido, para la degradación de hidrocarburos con consorcios microbianos\*, F: Factor

\*Los tratamientos consideran un nivel alto y un nivel bajo de sales

F	Referencia	Nutriente (g/L)	Tratamiento*											
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Chaves 2003; Das P. et al 2008	NaCl	0.001	0.001	0.001	0.1	0.1	0.1	0.1	0.001	0.001	0.1	0.001	0.1
B	Chaves 2003; Das P. et al 2008	MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0.5	0.006	0.5	0.006	0.5	0.006	0.006	0.006	0.006	0.5	0.5	0.5
C	Yu y col., 2005; Wynham and Costerton, 1981	CaCl <sub>2</sub>	1	1	1	1	0.002	0.002	1	0.002	0.002	1	0.002	0.002
D	Armendáriz y col., 2004; Wynham and Costerton, 1981	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2	1	1	0.2	1	0.2	1	0.2	1	0.2	0.2	1
E	Wynham and Costerton, 1981; Arvin y col., 1989	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	1	0.0094	0.0094	0.0094	1	0.0094	0.0094	1	1	1	0.0094
F	Armendáriz, 2004; Arvin y col., 1989	FeCl <sub>3</sub> • 6H <sub>2</sub> O	0.0004	0.0004	1	0.0004	0.0004	1	1	0.0004	1	1	1	0.0004
G	Armendáriz, 2004; Arvin y col., 1989	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.001	2	2	2	0.001	2	0.001	0.001	0.001	0.001	2	2
H	Rivera- Hernández, 2011; Wynham and Costerton, 1981	NH <sub>4</sub> Cl	0.1	0.25	0.1	0.25	0.25	0.1	0.1	0.1	0.25	0.25	0.25	0.1
I	Rivera- Hernández, 2011; Arvin y col., 1989	NaHPO <sub>4</sub>	1.065	0.0058	1.065	1.065	1.065	1.065	0.0058	0.0058	1.065	0.0058	0.0058	0.0058
J	Rivera- Hernández, 2011; Arvin y col., 1989	FeSO <sub>4</sub>	1	1	0.1	0.1	1	1	1	0.1	0.1	0.1	1	0.1
K	Wynham and Costerton, 1981; Arvin y col., 1989	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.5	0.0122	0.0122	0.5	0.0122	0.0122	0.5	0.0122	0.5	0.0122	0.5	0.5

El procedimiento consistió en preparar 500mL de cada medio enriquecido con cada formulación, una vez preparados, se tomaron 7.5mL, los cuales, fueron mezclados con 30 g



de suelo seco, tamizado previamente con una malla de 2mm, al suelo se le ajustó una humedad del 30% (Nocentini *et al.*, 2000), posteriormente se adicionó 1% del inóculo previamente adaptado a altas concentraciones de fracción pesada, todo esto fue completamente homogeneizado en un frasco de 5cm de diámetro por 7 cm de altura. Se preparó adicionalmente un vial con 30 mL de NaOH 1M, el cual fue introducido con el frasco que contenía el suelo en otro frasco de 1L, en el fondo se adicionaron 50mL de agua para mantener un ambiente húmedo, posteriormente fueron cerrados herméticamente, los frascos. Las muestras fueron incubadas en la oscuridad para evitar efectos de fotooxidación a temperatura ambiente, a los 14 días de iniciada la incubación, se destaparon todos los frascos para evitar condiciones de anaerobiosis. Se sacaron los viales y los frascos con las muestras a los 0, 7, 14 y 28 días de iniciada la incubación, para realizar los análisis correspondientes. Cada toma de muestra se hizo por triplicado.

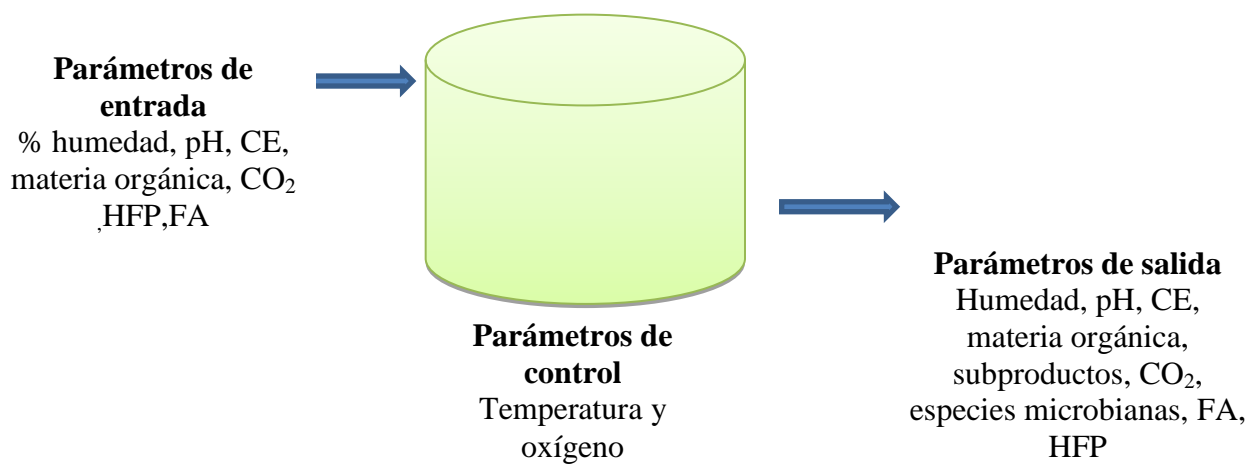


Figura 11. Variables de entrada y salida en la biodegradación de hidrocarburos intemperizados con medios de cultivo enriquecidos y con el consorcio microbiano

A continuación se muestra el diagrama (Figura 11), de las variables de entrada y salida de los experimentos de biodegradación de hidrocarburos intemperizados, mediante la adición de diferentes concentraciones de nutrientes. Se estudió el mejoramiento de las propiedades fisicoquímicas del suelo contaminado, se monitoreo la aparición de nuevos compuestos o

subproductos de la biotransformación, los cuales servirán como un indicador del aumento de la biomasa y la correspondiente degradación de hidrocarburos altamente recalcitrantes.

### **3.3.2 Preparación del suelo contaminado**

A los cero, siete y catorce días de incubación, se homogenizó el suelo, se secó al aire y a la sombra durante 24 horas, después se colocó en bolsas de polietileno se guardaron a 4°C hasta que se realizaron los análisis fisicoquímicos, HTPs y actividad microbiana.

### **3.3.3 Pruebas de biodegradación y evaluación de tres procesos para la biodegradación.**

Se evaluó la capacidad de biodegradación de los hidrocarburos intemperizados en tres tratamientos:

Se emplearon 300 g de suelo seco contaminado tamizado con una malla de 2 mm, se le ajustó la humedad al 30% para cada tratamiento. El suelo fue introducido en un frasco de 1L en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente, se estudió el efecto de tres tratamientos bajo las siguientes condiciones: a) CMA: Suelo más la adición de 1% v/v de un consorcio microbiano previamente adaptado más medio de Bushnell Haas, b) bioventeo, al suelo se le incorporó aire con un flujo 80 L/h, c) GCMA: Se realizó un tercer tratamiento incorporando medio de Bushnell Haas más glicerol (1% w/v), como co-sustrato, más 1% v/v del consorcio de microorganismos previamente adaptados, adicionalmente se consideró como un control (-), la sustitución del suelo por ladrillo molido calcinado a 600°C, con forme a las especificaciones de la norma mexicana. Los tratamientos fueron evaluados por triplicado a los 0, 7 y 14 días después de iniciada la incubación, se realizaron los análisis fisicoquímicos de pH, CE, densidad aparente, fracción asfáltica y HTPs, así como, la producción de CO<sub>2</sub>, la cual es una medida indirecta de la actividad microbiana, se realizó la cuantificación de UFC/g suelo seco de hongos y bacterias, así mismo, se realizaron observaciones al microscopio óptico, para registrar la morfología de las hifas de los hongos. La forma en que se desarrollaron los experimentos a nivel laboratorio es como se describe en la Tabla 7.

Tabla 7. Descripción de los tratamientos para la biodegradación de los hidrocarburos intemperizados

Biodegradación (Días)	Tratamiento				
	0	Testigo 0	CMA 0	GGMA 0	Control (-)
7	Testigo 7	CMA 7	GCMA 7	Control (-)	Control (+)
14	Testigo 14	CMA 14	GCMA 14	Control (-)	Control (+)
28	Testigo 28	CMA 28	GCMA 28	Control (-)	Control (+)

### 3.3.4 Análisis por espectrofotometría infrarrojo (FTIR) para evaluar la biodegradación de hidrocarburos

La espectroscopia de infrarrojo (IR) con transformada de Fourier (FT, por sus siglas en inglés) es una técnica cualitativa que permite identificar de manera rápida compuestos desconocidos, con menor ruido analítico y mayor sensibilidad óptica en relación con instrumentos IR que no tienen integrado el algoritmo FT (Robledo-Zacarías, 2017). El análisis de los hidrocarburos se realizó de manera cualitativa y se llevó a cabo empleando FTIR, el espectro fue tomado en la región media (fundamental), entre 400 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ , ajustando la transmitancia T a 100%. La técnica para la obtención del espectro fue mediante ATR (attenuation total reflectance), la muestra se colocó de manera directa en una placa con cristal de selenuro de cinc (ZnSe). La muestra se puede analizar de manera sólida o líquida. El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo de Rajasekar y col., 2005. Las bandas características para los hidrocarburos se localiza entre 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  y entre 1500-1100  $\text{cm}^{-1}$ , los hidrocarburos aromáticos y compuestos halógenos de encuentran debajo de los 700  $\text{cm}^{-1}$ . Los espectros fueron obtenidos a 10 scan, los análisis se realizaron en un FT-IR Marca Perkin Elmer, Modelo 1000. Los datos fueron comparados con la biblioteca del FT-IR Perkin Elmer Spectrum incluida en el espectrómetro.

### 3.3.5 Cuantificación de la fracción asfáltica por espectrofotometría UV

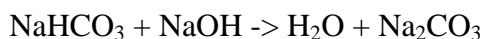
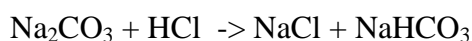
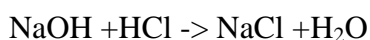
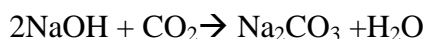
La extracción de los hidrocarburos intemperizados se realizó adicionando 10 mL de cloroformo grado reactivo a 5 g de suelo, para ayudar a extraer la fracción pesada que está

fuertemente sorbida a la matriz del suelo, posteriormente se volatilizó el solvente empleando un evaporador rotatorio de vacío (Buchi RII) equipado con baño de calentamiento bajo las condiciones de temperatura a 38°C a una presión de 474mbar. Se siguieron las especificaciones de la NMX-AA-134-SCFI-2000, para la determinación de la fracción pesada. Una vez analizada la fracción, el extracto se cerró herméticamente y se guardó a 4°C en tubos de vidrio, para realizar la cuantificación de hidrocarburos de la fracción asfáltica (Miller y col., 1999), mediante un espectrofotómetro UV visible a una longitud de onda de 408 nm, Marca Thermo Scientific, modelo Evolution 300.

### **3.3.6 Cuantificación de la actividad microbiana mediante la producción de CO<sub>2</sub>**

Para la cuantificación del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) producido durante la biodegradación, se utilizó NaOH para atrapar el CO<sub>2</sub> generado durante la respiración de los microorganismos. Se introdujeron 30mL de NaOH en viales, en el sistema cerrado antes mencionado, a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad para evitar efectos de fotoxidación, posteriormente fueron extraídos para su cuantificación a los tiempos de 0, 7, 14 y 28 días, después de iniciada la incubación. Se tomaron alícuotas de 5mL de los viales y fueron titulados con una solución de HCl a una concentración 1 N y 0.1 N, usando como indicadores fenolftaleína y naranja de metilo, respectivamente, este procedimiento se realizó por duplicado.

Este método es de los más usados para la determinación de CO<sub>2</sub>, el cual consiste en la reacción de los álcalis con el CO<sub>2</sub>, el cual forma un ácido débil. A continuación se muestran las reacciones que ocurren entre el NaOH con el CO<sub>2</sub>, lo que da lugar a la formación de carbonatos (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>).



Si se considera que la solución contiene un exceso de hidróxido de sodio (NaOH), el equilibrio se desvía a la derecha de la ecuación y el Carbono es retenido como CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (Zibilsque, 1994).

### **3.3.6.1 Cuantificación de carbono orgánico**

La cantidad de carbono orgánico se determinó mediante el método de Walkley & Black (1934), descrito en el apartado AS-07-2000 de la norma NOM-021-RECANAT-2000, basado en la oxidación del carbono orgánico presente en el suelo al usar una disolución de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ), así mismo se usa ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) para completar la oxidación de la materia orgánica. La cuantificación se realiza mediante una titulación con una solución valorada de sulfato ferroso ( $FeSO_4$ ).

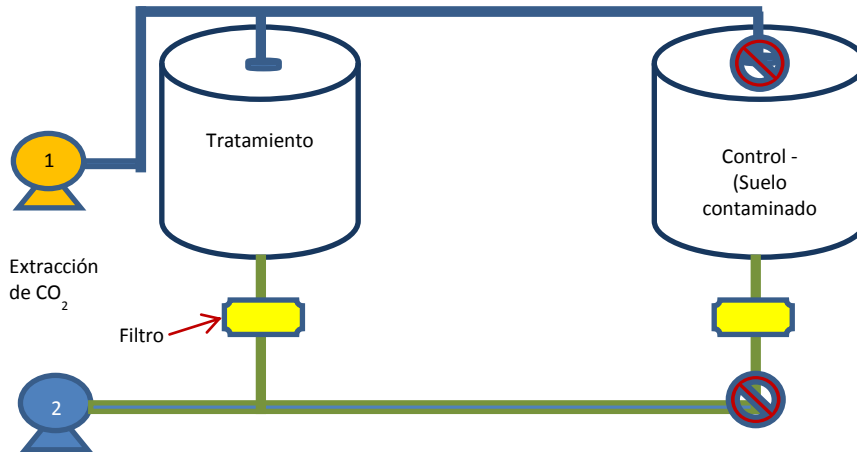
### **3.3.7 Determinación de parámetros fisicoquímicos del suelo tratado**

El pH se determinó mediante la norma NOM-021-RECANAT-2004. Se utilizó un potenciómetro modelo OAKTON pH/Conductivity/TDS/°C/°F Meter, con una relación suelo-agua de 1:2. La determinación de la humedad se realizó conforme a la NOM-021-SEMARNAT-2000, la cual establece la metodología en su apartado AS-06, se empleó un equipo de secado marca Sartorius MA 35, a partir de una muestra de 0.5 g y el cálculo se realizó por diferencia de peso con respecto a la humedad inicial. La conductividad eléctrica del suelo contaminado se determinó mediante la NOM-021-RECANAT-2000, por el método AS-18-2000, se añadió agua desionizada a una muestra de suelo, se agitó y se dejó reposar, posteriormente se midió la conductividad eléctrica del sobrenadante con un conductímetro HACH TDS METER. La determinación de los hidrocarburos de fracción pesada (HFP), se realizó de acuerdo a las especificaciones de la norma NMX-AA-145-SFCI-2000. La densidad aparente se realizó mediante el método de la parafina, siendo esta una medida directa de correlación con la porosidad del suelo.

### **3.4 Configuración de los experimentos de bioaumentación, bioestimulación y bioventeo**

Se estudiaron los parámetros de operación: humedad (%), flujo de aire (L/h) y contenido de nutrientes (g/L). En todos los tratamientos se adicionó un consorcio microbiano previamente adaptado a altas concentraciones de fracción pesada del petróleo crudo maya.

**Variables de entrada: HFP, UFC, pH, CE**



**Variables de salida: HFP, UFC, pH, CE**

**Parámetros de control:**

Humedad, flujo de aire, nutrientes

Figura 12. Variables de entrada y salida del proceso acoplando bioestimulación y bioventeo

Adicionalmente se preparó un blanco que fue el suelo contaminado con los hidrocarburos intemperizados, sin la aplicación del consorcio microbiano adaptado, agua, aire y nutrientes. Del porcentaje de degradación de hidrocarburos observado durante la optimización del consorcio microbiano de Agua Dulce, así como, en el proceso de obtención de un medio enriquecido, se observó que la mayor actividad microbiana se presenta en los primeros días iniciada la degradación de los hidrocarburos, por lo tanto se establecieron 14 días para estudiar la degradación de los hidrocarburos intemperizados. Se llevaron a cabo dos experimentos bajo las mismas condiciones del % de humedad y flujo de aire, en el caso de los nutrientes se estudió la capacidad de ser asimilados por los microorganismos nativos y los adaptados al petróleo crudo Maya.

### 3.4.1 Monitoreo de los parámetros de control

Para incrementar la eficiencia de la biodegradación de los hidrocarburos intemperizados, se llevó a cabo el acoplamiento de bioaumentación, bioestimulación y bioventeo, a nivel laboratorio, donde se identificaron las condiciones de operación para alcanzar la máxima degradación, para esto se realizó un diseño de experimentos factorial fraccionado en cuatro bloques (Plackett-Burman) y considerando dos niveles (alto y bajo), este es un diseño de barrido que establece relaciones entre los factores de estudio como humedad, inyección de

aire y contenido de nutrientes, en tanto que la variable de respuesta es la biodegradación de los hidrocarburos, expresada por la reducción en la concentración de los HTPs, presencia de biomasa, cambio de las propiedades fisicoquímicas y la disminución de la toxicidad. Este diseño permite reducir el número de experimentos considerablemente, al tratarse de un modelo ortogonal (Montgomery Douglas 2006). Mediante este experimento se busca identificar las condiciones operacionales para llevar a cabo la mayor biotransformación de los hidrocarburos intemperizados (Tabla 8).

Tabla 8. Factores y niveles para la biodegradación de hidrocarburos acoplando las tecnologías de bioestimulación, bioventeo y bioaumentación

<b>Corrida</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>% Humedad</b>	<b>L aire/hora</b>	<b>Nivel de Nutrientes (g/L)*</b>
1	C1B1	30	210	MM/BH
2	C2B1	40	80	0
3	C1B2	30	80	MM/BH
4	C2B2	40	210	0
5	C1B3	30	210	0
6	C2B3	40	80	MM/BH
7	C1B4	40	210	MM /BH
8	C2B4	30	80	0

\* MM: Medio enriquecido optimizado, BH: Medio enriquecido Bushnell Haas

Las pruebas de degradación se realizaron en frascos de vidrio de 1L pintados en su exterior de color negro para impedir la entrada de luz en los tratamientos de los suelos, para evitar efectos de fotooxidación. Se pesaron 300 g de suelo contaminado previamente tamizado a una malla de 2mm, adicionalmente se introdujo un vial con 30mL de NaOH para atrapar el CO<sub>2</sub> producido por la respiración microbiana. Se emplearon dos bombas de aire marca Trixie de 2.5 Watts para la introducción de aire en dos niveles: 80L/h y 210L/h, en ambas

bombas se monitoreo un flujo constante y libre de impurezas, como polvo u otros microorganismos, para esto se utilizó un filtro de fibra de vidrio Whatman marca Sigma-Aldrich de 0.45µm, el cual se colocó entre la manguera conectada a la bomba y el frasco. Los frascos fueron cerrados herméticamente y se abrieron cada 48 horas, para evitar que la actividad microbiana provocara condiciones de anaerobiosis, posteriormente, las muestras del suelo se sacaron cada 0, 7 y 14 días, después de iniciada la incubación, para evaluar las variables de estudio.

### **3.5 Prueba directa de toxicidad aguda en el suelo**

El estudio de toxicidad funciona como un indicador de la efectividad del tratamiento, como una prueba de la biodegradación de los hidrocarburos intemperizados. Se empleó la técnica de prueba directa en una muestra problema, se siguió la metodología reportada por Cuevas-Díaz *et al.* (2013). En primer lugar se llevó acabo la desinfección de las semillas, sumergiéndolas en una solución de Hipoclorito de Sodio (NaClO) al 5%, posteriormente se lavan las semillas con agua estéril, para eliminar residuos de cloro.

Se evaluó la viabilidad de las semillas, mediante un método químico (Moore *et al.*, 1985). Se seleccionaron 50 semillas al azar, considerando un lote más una réplica. Esta prueba se basa en la actividad de las deshidrogenasas de ácido málico, que reduce la sal de 2,3,5 cloruro de trifetil tetrazolio en los tejidos vivos de las semillas. En esta reacción los iones  $H^+$ , son transferidos a la sal, cuando la semilla se sumerge en la solución de trifeniltetrazolio, ocurre la reacción de reducción en las células vivas y se forma un compuesto de color rojo (trifenilformazán) que indica la presencia de actividad respiratoria en las mitocondrias y consecuentemente, que el tejido es viable. Los tejidos muertos (no viables) no reaccionan con la solución y conservan su color natural.

Para llevar a cabo la prueba de viabilidad se siguieron los siguientes pasos:

- a) Se remojaron 50 semillas de la especie seleccionada en agua destilada durante 18 horas a temperatura ambiente
- b) Se colocaron las semillas en un vaso de precipitados de 250 mL, con la adición de 150mL de la solución de cloruro de trifeniltetrazolio, se dejaron reposar por 24 horas, dado que las semillas eran grandes.



c) Se evaluó la viabilidad calculando el por ciento de las semillas que se tiñeron de rosa, con respecto al total de semillas a las que se les hizo la prueba.

### **3.5.1 Prueba rápida de germinación**

Las pruebas de germinación nos permiten tener información con respecto a la capacidad de las semillas para producir plántulas normales. La capacidad de germinación se determina por el porcentaje de semillas capaces de producir una plúmula y una radícula normales, bajo condiciones diseñadas para asegurar una máxima germinación y en consecuencia, la producción de biomasa.

Una vez que se verificó la viabilidad de las semillas, se seleccionaron y se colocaron en una bandeja en condiciones adecuadas de humedad, temperatura, luz y en un soporte, a fin de obtener las plántulas. Para evaluar el crecimiento de las plántulas, una vez desarrolladas, se colocaron en cajas de Petri y se pesaron en una balanza analítica. Posteriormente, se colocaron en una estufa a 75 °C durante 20 a 24 h, para eliminar la humedad y obtener un peso constante. La producción de biomasa se calculó por diferencia de peso.

### **3.5.2 Prueba directa de toxicidad aguda en suelos contaminados con hidrocarburos**

Este bioensayo es una prueba aguda, con exposición directa de las semillas al suelo problema, durante 14 días (prueba de tratamiento único), posteriormente se mide la inhibición de la germinación, modificación en el tiempo de crecimiento de las plántulas y producción de biomasa. La prueba de tratamiento único se compara con el control negativo, es decir, en donde se utiliza un soporte no contaminado para el desarrollo de las plántulas y se evalúa la inhibición del crecimiento.

El suelo se secó a temperatura ambiente, posteriormente se homogenizó y se cribó para eliminar las piedras. Se depositaron 8 g de suelo en recipientes de plástico, para facilitar el crecimiento de las plantas. Se ajustó el contenido de humedad del suelo con agua destilada a un valor entre el 28 y el 30 % de la capacidad de campo (Cuevas-Díaz *et al.*, 2013). Posteriormente se evaluó la toxicidad por diferencia de peso en la producción de biomasa.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización fisicoquímica del suelo y localización

En la Figura 13, se muestran los dos sitios de muestreo de los suelos contaminados con hidrocarburos, Agua Dulce y Estero de Pantano.



Figura 13. a) Sitio Agua Dulce y b) Estero de pantano contaminados con hidrocarburos intemperizados

Inicialmente el suelo de Agua Dulce presentó mayor contenido de hidrocarburos de petróleo tipo maya fracción pesada y de fracción media, con una concentración de  $80926.4 \pm 50$  y de  $400 \pm \text{mg/kg}$  suelo seco, respectivamente, por el contrario el suelo de Estero de Pantano tuvo una concentración de fracción pesada de  $267 \pm 51 \text{ mg/kg}$  suelo seco, así mismo, la concentración de hidrocarburos de fracción pesada y media se encontraron dentro de los límites máximos permisibles de la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, como se puede observar en la Tabla 9. La capacidad de degradación de los hidrocarburos se asocia al proceso de selección natural, los microorganismos nativos del suelo de Estero de Pantano muestran mayor capacidad para emplear a los hidrocarburos persistentes como principal fuente de carbono. En un estudio realizado en el mismo sitio de Estero de Pantano, en el año 2009, reportan concentraciones de hidrocarburos de fracción pesada de  $24,800 \text{ mg/kg}$  de suelo (Alemán-Caporal 2009), lo que indica que los microorganismos nativos han sido resistentes a los hidrocarburos, a las condiciones extremas ambientales del sitio, la hidrogeología y edafología del suelo, reflejándose en una mejor adaptación, al lograr la degradación de los hidrocarburos. Por el contrario, el sitio de Agua Dulce, es una zona industrial donde el suelo es expuesto constantemente a la contaminación de desechos industriales petroquímicos, lo que explica la mayor concentración de hidrocarburos con

respecto al suelo de Estero de Pantano. Estudios anteriores, muestran la capacidad de degradación que tienen algunas especies bacterianas para adaptarse a altas concentraciones de compuestos recalcitrantes.

Tabla 9. Caracterización fisicoquímica de los suelos contaminados: Agua Dulce y Estero de Pantano

<b>Características fisicoquímicas del suelo</b>	<b>Agua Dulce</b>	<b>Estero de Pantano</b>
Textura	Limo arenoso	Arenoso
Hidrocarburos de fracción pesada (mg/kg suelo seco)	80926.4±50	267.01±51
Hidrocarburos de fracción media (mg/kg suelo seco)	400	N.D
Asfaltenos y resinas (mg/kg suelo seco)	0.0237	N.D
Materia orgánica o carbono orgánico? (%)	18.8±0.3	1.5±0.3
Densidad bacterias (UFC/g suelo seco)	1.7 X 10 <sup>5</sup>	3.4 X 10 <sup>6</sup>
pH	5.5±0.2	6.5±0.2
Humedad (%)	33.97±1	23.38±1
Salinidad (µS/cm)	0.508±0.1	1.059±0.1

La disminución de la concentración de hidrocarburos de fracción pesada en Estero de Pantano se atribuye a la naturaleza de la microbiota, que mostró resistencia a la toxicidad de los hidrocarburos presentes en ese suelo. Como consecuencia existe un favorecimiento de las propiedades fisicoquímicas del suelo como lo fue el aumento de la porosidad del suelo, incremento en el pH y de la salinidad, ya que un suelo contaminado tiende a ser ácido y estar limitado en nutrientes. Estero de Pantano presentó 1.5±0.3% de materia orgánica, en tanto, Agua Dulce mostró 18.8±0.3%, esto afecta la remoción de los hidrocarburos, cuando un suelo tiene alto contenido de materia orgánica se incrementa la persistencia de los hidrocarburos en el suelo ya que tienden a adsorberse a la materia orgánica (Tabla 9).

El suelo de Agua Dulce tiene menor densidad bacteriana, lo cual es influenciado por el alto contenido de hidrocarburos y por las características fisicoquímicas del suelo del sitio: la baja porosidad, la acidez, la baja capacidad de intercambio catiónico debida a la textura del

suelo que muestra signos de compactación, así mismo, la hidrofobicidad de los hidrocarburos promueve la sorción de estos en la matriz del suelo.

La formación de películas semirrígidas de hidrocarburos se posicionan alrededor de los componentes del suelo, causando resistencia en la transferencia de masa como es el agua, aire, nutrientes y microorganismos, por consiguiente los hidrocarburos tienden a adsorberse con mayor facilidad a la materia orgánica, especialmente si esta es mayor de 2%, bajo estas circunstancias se llevan a cabo reacciones químicas de oxidación y polimerización, lo que aumenta la complejidad química de los compuestos orgánicos, esto trae como resultado el decremento de la biodisponibilidad de los contaminantes (Weissenfeld *et al.*, 1992; Erickson *et al.*, 1993; Van Hamme *et al.*, 2003).

#### **4.1.1 Identificación de metales mediante ICP-Masas**

El contenido de metales es una medición crítica y que puede afectar la capacidad de biodegradación. Cuando hay una concentración de metales mayor a los 2500 mg/kg de suelo, los suelos deben ser tratados, aunque algunos metales pueden ser tolerantes si el pH se encuentra arriba de 6.5. El suelo Agua Dulce no mostró mercurio, ni arsénico, los cuales podrían inhibir el crecimiento microbiano, sin embargo, encontraron cantidades significativas de Aluminio (Tabla 10).

Un exceso de aluminio en el suelo está asociado a diversos orígenes: Actividades industriales, el tipo de roca ígnea entre otros factores, en este caso el tipo de arcilla presente en el suelo de Agua Dulce es la Montmorillonita que contiene un alto contenido de  $Al^{+3}$ .

Las propiedades fisicoquímicas del crudo maya fueron obtenidas de las características de calidad de acuerdo a las especificaciones de los diferentes tipos de petróleo crudo que maneja PEMEX, Tabla 11.

Tabla 10. Contenido de metales en el suelo con hidrocarburos intemperizados del sitio de Agua Dulce

<b>Metal</b>	<b>mg metal/kg suelo contaminado)</b>	<b>Uso agrícola, residencial/comercial (mg/kg)</b>	<b>Uso industrial (mg/kg)</b>
Arsénico	1.145	22	260
Cromo hexavalente	21.76	280	510
Níquel	12.025	1600	20000
plomo	10.067	400	800
Bario	120.8	5400	67000
Mercurio	ND*	1600	20000
Plata	ND	390	5100
Vanadio	18.46		
Molibdeno	ND		
Fierro	7706		
Magnesio	1959		
Potasio	324.5		
Sodio	1759.5		
Aluminio	3925.5		
Azufre	319.6		

ND: No detectado

Tabla 11. Caracterización fisicoquímica del petróleo crudo maya

<b>Característica fisicoquímica</b>	<b>Unidad</b>
Gravedad específica (°API)	21
Azufre (%)	3.6
Presión de vapor (psi)	6.5
Níquel (mg/kg)	54
Vanadio (mg/kg)	278

## 4.2 Bioaumentación y selección de nutrientes esenciales

Se estudiaron 9 medios enriquecidos con nutrientes empleados en diferentes investigaciones, observándose de manera cualitativa, la degradación del hidrocarburo mediante la presencia de la emulsión (Figura 14).



Figura 14. Evaluación de la presencia de emulsión en las diferentes formulaciones de nutrientes esenciales en los medios de cultivo

El medio nutritivo con mayor formación de emulsión (observado visualmente en la figura 14) fue Bushnell Haas, el cual está compuesto por las siguientes sales:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$  y  $\text{FeCl}_3$ , este medio enriquecido tiene un alto contenido de K, Ca, P y N con respecto a los otros medios enriquecidos (Tabla 8). La presencia de emulsión del crudo maya durante la biodegradación, actúa como indicador de la biotransformación de los hidrocarburos en los diferentes inóculos. Del análisis de diferentes medios enriquecidos se observó que la capacidad de biodegradación varía dependiendo del tipo de petróleo crudo empleado, ya que en la mayoría de dichos estudios el petróleo crudo era ligero, por consiguiente no contenían altos porcentajes de S, esto disminuye la viscosidad del petróleo crudo y su recalcitrancia. El petróleo crudo maya tiene un alto contenido de S ( $>3.6\%$ ), V y Ni, en comparación con otras mezclas de petróleo producidas en otros países, lo que le confiere alta viscosidad y por consiguiente disminuye su capacidad de biodegradación.

Se ha reportado que los consorcios microbianos pueden eficientizar sus procesos metabólicos y lograr solubilizar los hidrocarburos de fracción pesada como los asfaltenos, cuando se optimizan condiciones nutrimentales, humedad y oxígeno. Con respecto a la

solubilización de compuestos petrolíferos químicamente complejos, algunos autores reportan que la presencia de diversas especies de bacterias y hongos pueden facilitar la emulsificación de los hidrocarburos (Das *et al.*, 2013). Se reporta que el N y K tienen un efecto positivo durante la degradación del petróleo crudo, es decir, cuando hay un alto contenido de K existe una eficiente asimilación del N, lo que mejora el metabolismo de los microorganismos, por el contrario, cuando se reduce la concentración de P, se reduce la absorción del K y viceversa. Un alto suministro de Mg y Ca afecta la absorción del K, por consiguiente, la absorción del Mg, Zn y Cu se favorece con la aplicación del K. Esto se reporta en estudios con una interacción positiva entre K-Zn y K-Mg (Castellanos 2005).

La relación de sales minerales en un medio enriquecido afecta los mecanismos de interacción entre el suelo, el contaminante y los microorganismos, así como, la activación de las reacciones cometabólicas y los procesos de comensalismo, llevados a cabo por las especies microbianas, encargadas de realizar la biotransformación de los compuestos de los hidrocarburos de fracción pesada. El control de nutrientes requiere amplia atención en los ecosistemas costeros, principalmente en los suelos pantanosos debido a la pérdida por procesos de lixiviación.

#### **4.2.1 Crecimiento microbiano, estimado como mg SSV/mL**

En la Figura 15, se presenta la emulsificación alcanzada por ambos inóculos Agua Dulce y Estero de Pantano empleando medio enriquecido Bushnell Haas adicionado con hidrocarburos a los cero, siete y catorce días de incubación. Durante la degradación del petróleo los microorganismos desarrollan subproductos como ácidos grasos, aminoácidos, ácidos carboxílicos, entre otros, que contribuyen a la solubilización y emulsificación de los hidrocarburos de fracción pesada. La rápida producción de bioemulsificantes en las muestras de Estero de Pantano, se atribuye a la adaptación de los microorganismos nativos a los contaminantes presentes en el sitio, durante los cinco años previos al año 2013, periodo en que se realizó ésta investigación.

El inóculo con los microorganismos de Agua Dulce, mostró una adaptación más lenta y como era de esperarse, una menor presencia de emulsión en el medio de cultivo. Las especies microbianas y su capacidad enzimática específica para degradar los hidrocarburos

químicamente complejos, se asocia con la adaptación o sobrevivencia que tienen los microorganismos nativos, a los sitios contaminados. En ambos casos, se tomaron muestras de suelo de los puntos detectados con el mayor contenido de hidrocarburos, por lo que se considera que los microorganismos se encontraban en condiciones de estrés. Para el caso de Agua Dulce, dado que la presencia de emulsión en el medio de cultivo es menor, se considera que el estrés al que están sometidos los microorganismos es mayor, en comparación con los microorganismos presentes en el Estero de Pantano.

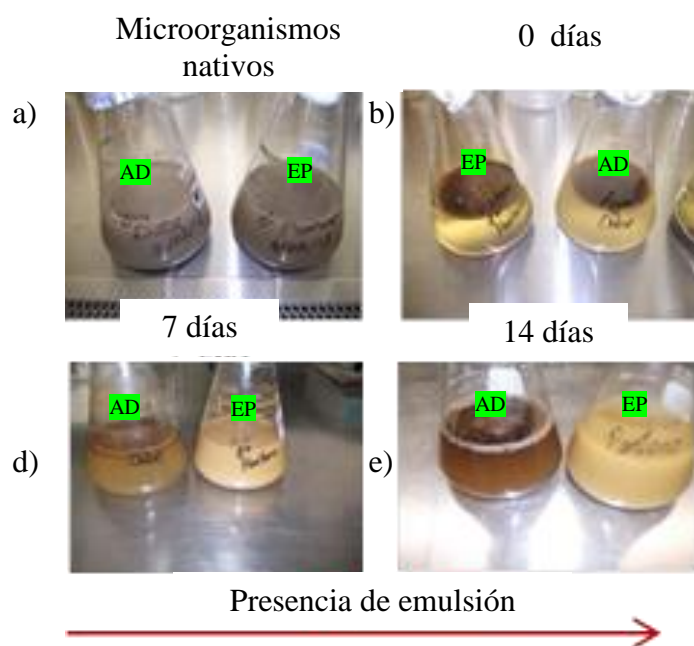


Figura 15. a) suelo más microorganismos, b) medio enriquecido Bushnell Haas + crudo maya + microorganismos a los cero días, c) medio enriquecido Bushnell Haas + crudo maya + microorganismos a los siete días, d) medio enriquecido Bushnell Haas + crudo maya + microorganismos a los 14 días.

La desaparición total de la capa del petróleo crudo maya en la superficie del medio de cultivo a los catorce días de incubación, cuando se inoculó con Estero de Pantano, muestra la presencia de microorganismos hidrocabonoclastas, los cuales tienen la capacidad de mineralizar compuestos recalcitrantes contenidos en el petróleo crudo maya.

En la Figura 16 se presenta el crecimiento microbiano expresado como mg SSV/mL, durante catorce días de incubación. Como era de esperarse, estos resultados muestran la misma tendencia con el crecimiento microbiano, estimado como mg SSV/mL. El inóculo



de Estero de Pantano a los siete días de incubación mostró una concentración de 8480 mg SSV/L y disminuyó de manera importante en el día 14 a 6390 mg SSV/L, es decir, mostró una disminución de 1.3 veces entre el día siete y catorce de incubación, lo que puede explicarse debido al decremento de la fuente de carbono, por el contrario, el inóculo de Agua Dulce aumenta de manera continua de 5400 mg SSV/L hasta 6700 mg SSV/L, es decir se incrementa 1.2 veces en el mismo periodo, lo que indica un lento crecimiento microbiano asociado a la baja densidad bacteriana inicial, cabe aclarar, que la capacidad para la degradación de hidrocarburos por los microorganismos, se relaciona directamente con las rutas metabólicas implicadas en el proceso de biodegradación de la fracción pesada del petróleo crudo maya y por consiguiente el tipo de subproductos generados.

La fracción pesada del crudo maya tiene un alto contenido de asfaltenos, resinas y metales como el Ni y V, lo que hace compleja la degradación por un solo microorganismo. Sin embargo, pueden ser biotransformados mediante procesos cometabólicos y de comensalismo, reportándose como los mecanismos más viables para lograr la biodegradación de compuestos recalcitrantes, gracias a la intervención de diferentes especies microbianas como bacterias, levaduras y hongos, mediante un proceso de sinergia las diferentes especies microbianas degradan compuestos específicos y generan subproductos que son empleados por otras especies de microorganismos, hasta obtener compuestos químicos más simples y menos tóxicos.

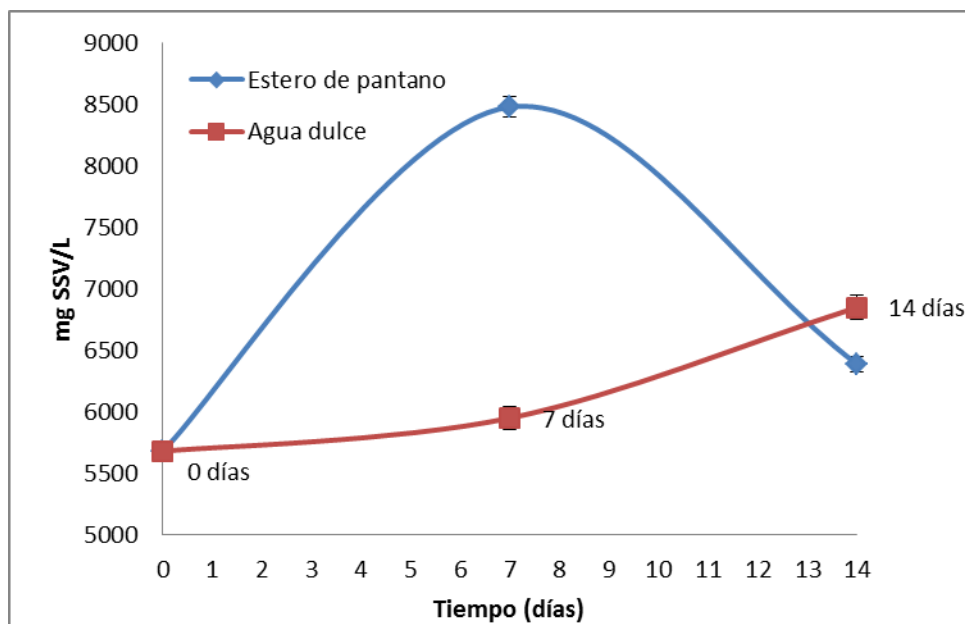


Figura 16. Crecimiento microbiano, estimado como mg SSV/mL en el medio enriquecido de Bushnell Haas, adicionado de hidrocarburos, con inóculo de Agua Dulce o Estero de Pantano, durante catorce días de incubación

Los resultados mostraron la disminución de la fracción pesada del petróleo crudo maya, donde la concentración inicial de asfaltenos y resinas del inóculo de Agua Dulce, correspondiente al día 0 fue de 0.0237 mg/kg suelo base seca, en tanto, para el día 7 y 14 no se detectaron, mientras que en el inóculo de Estero de Pantano no fue detectada esta fracción.

El porcentaje de biodegradación de los hidrocarburos de fracción pesada para el inóculo de Agua Dulce y Estero de Pantano fue de 84 y 98.9%, respectivamente. En la Figura 17, se observa que la concentración de hidrocarburos de Agua Dulce tuvo un decremento 7399.82 mg HFP/L a 1177.95 mg HFP/L, lo que representa 6.3 veces menos, en tanto, el inóculo de Estero de Pantano tuvo la mayor degradación con respecto al inóculo de Agua Dulce, al presentar una disminución de la concentración de 7349.82 mg HFP/L hasta 75 mg HFP/L, es decir, 98 veces menos que la concentración inicial, esto significa que los microorganismos provenientes del suelo del sitio de Estero de Pantano lograron degradar estructuras complejas como asfaltenos, resinas, cadenas mayores de 18 carbonos en compuestos más simples (Figura 17), el factor al que se le atribuye una mayor

biotransformación en los primeros 14 días es la adaptación de los microorganismos nativos en el sitio contaminado por la presencia de hidrocarburos en el suelo. En contraste con el inóculo de Agua Dulce que mostró baja capacidad de degradación de los hidrocarburos de fracción pesada, así como un lento aumento en la biomasa lo que pudo ser ocasionado por la presencia de compuestos tóxicos presentes en el sitio, por consiguiente, la tasa de mineralización es más lenta y requiere un periodo de tiempo de adaptación mayor para llevar a cabo la mineralización de los compuestos recalcitrantes.

Lo anterior confirma la importancia de introducir consorcios microbianos para facilitar la biodegradación de compuestos químicamente complejos como la fracción pesada del crudo maya, a pesar de que existen un gran número de trabajos donde han introducido cepas individuales para biodegradar este tipo de mezclas de hidrocarburos, no obstante en la realidad los suelos contaminados contienen cantidades importantes de plaguicidas, pesticidas entre otros contaminantes.

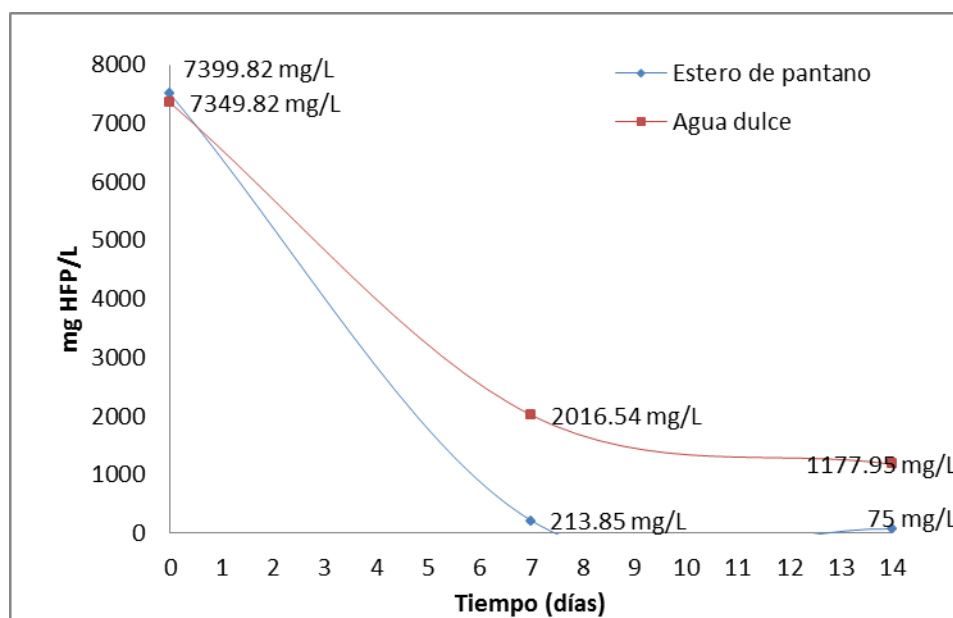


Figura 17. Biodegradación de los HFP en el medio enriquecido de Bushnell Haas, adicionado de hidrocarburos, con inóculo de Agua Dulce o Estero de Pantano, durante catorce días de incubación

El crecimiento microbiano y la degradación de HFP fue mayor para el inóculo de Estero de Pantano que para el inóculo de Agua Dulce. De cero a siete días de incubación se observa

la mayor degradación de HFP para ambos inóculos, alcanzando valores de 2016.54 mg/L para Agua Dulce y para Estero de Pantano 213.85 mg/L, lo que representa una disminución en la concentración de 3.7 y 3.4 veces, respectivamente. Posteriormente, se observa una menor disminución en la concentración de HFP alcanzando valores a los catorce días de incubación de 1177.99 mg/L para el inóculo de Agua Dulce, en tanto que para el Estero de Pantano de 75 mg/L. Los resultados muestran que el inóculo de Estero de Pantano, tiene mayor capacidad metabólica y mayor potencial de biodegradación de HFP.

#### **4.2.1 Cinética de crecimiento bacteriano**

Después de tres meses de adaptación de los inóculos, de llevó a cabo la cinética de crecimiento bacteriano, para conocer la abundancia y la velocidad de crecimiento en el medio enriquecido Bushnell Haas para los inóculos de Agua Dulce y Estero de Pantano. Se realizó en un sistema batch y se mantuvo en 24 horas de incubación. Los resultados muestran para el inóculo de Agua Dulce  $1.2 \times 10^8$  UFC/mL y  $\mu=0.35$  y para el Estero de Pantano  $7 \times 10^7$  UFC/mL,  $\mu=0.48$  respectivamente (Figura 18), en ambos inóculos se observó la misma tendencia en las fases de adaptación, exponencial y estacionaria. Cabe hacer notar que la fase de adaptación fue mayor para el inóculo de Estero de Pantano (15 días). Por el contrario, la fase exponencial mostró valores mayores para el inóculo de Agua Dulce. El incremento de las UFC/mL del inóculo de Agua Dulce se puede atribuir a la capacidad metabólica de las bacterias presentes y una mejor adaptación.

Se encontró una correlación de  $R^2$  de 0.95 y 0.99 respectivamente. Para el ajuste se empleó un análisis de regresión no lineal (Origin versión 8.0). En este sentido se reporta que los microorganismos bajo un estado de estrés, pueden generar metabolitos específicos que pueden ser empleados como sustrato para algunas especies de bacterias hidrocarbonoclastas, lo que incrementa positivamente la población bacteriana con respecto a una microbiota vieja, es aquí donde en el inóculo de Agua Dulce muestra la presencia de las especies microbianas tolerantes a los hidrocarburos persistentes mediante un proceso de selección natural, tales especies emplearon los nuevos subproductos originados de la degradación de los hidrocarburos intemperizados para desarrollar sus procesos metabólicos.

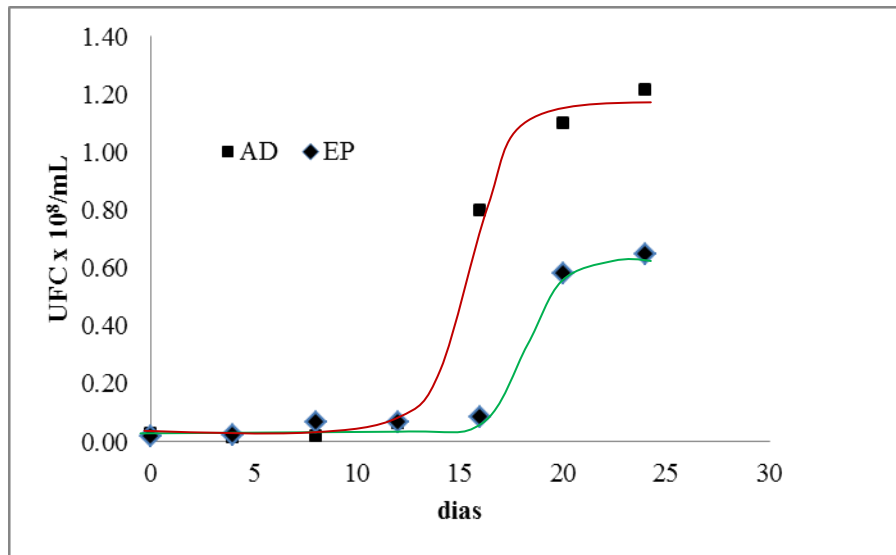


Figura 18. Cinética de crecimiento bacteriano en el medio enriquecido Bushnell Haas, a las 24 horas de la degradación de fracción pesada de petróleo crudo maya para los inóculos de Agua Dulce (AD) y Estero de Pantano (EP).

Los resultados del crecimiento bacteriano demostró la existencia de la densidad bacteriana mínima necesaria para obtener una biodegradación eficiente, la cual debe ser de  $1 \times 10^8$  UFC/mL de acuerdo a lo señalado por Cookson (1995), no obstante la cantidad de microorganismos, así como de las especies que conformen al consorcio varían de una tecnología de bioremediación a otra aunado a las características del contaminante. Tal fue el caso de Reda *et al.*, (2009) quienes llevaron a cabo la biodegradación del 68% de un petróleo crudo ligero con una concentración de 2000mg/L, en un medio líquido, los cuales emplearon un cultivo bacteriano de  $6 \times 10^5$  UFC/mL, dicho resultado indica que entre menos complejidad química tenga la mezcla favorece el desarrollo de microorganismos. sin embargo, la velocidad de degradación del crudo depende de diversos factores fisicoquímicos y biológicos del ambiente, como la composición química del petróleo crudo y la densidad microbiana.

El éxito de biorremediación de una tecnología depende en gran medida de las especies establecidas y que se han desarrollado por selección natural, por influencia de control de factores ambientales, tales como, el contenido de humedad, disponibilidad de nutrientes, oxígeno, etc.

#### **4.2.2 Cinética de crecimiento de hongos y levaduras**

Después de un periodo de tres meses de adaptación de ambos inóculos, se observó que el inóculo de Agua Dulce fue más resistente a los compuestos tóxicos presentes en el suelo y a subproductos formados durante el proceso de biodegradación, el cual duró 24 horas. Los resultados mostraron menor desarrollo bacteriano en el caso del inóculo de Estero de Pantano, esto se asocia a que había una mayor población de hongos y levaduras en el inóculo de Agua Dulce en comparación al inóculo de Estero de Pantano después de 24 horas de biodegradación. El consorcio microbiano de Agua Dulce presentó  $1 \times 10^3$  UFC/mL de hongos, en tanto que en Estero de Pantano fue de  $1 \times 10^2$  UFC/mL, así mismo, el número de levaduras para Agua Dulce fue de  $1 \times 10^2$  UFC/mL, mientras que Estero de Pantano no fue cuantificable.

El resultado obtenido se asemeja a lo reportado por Quin X. y col., (2012) quienes aislaron hongos de un suelo contaminado con petróleo y observaron la capacidad para degradar eficientemente los hidrocarburos, las especies de hongos mostraron una alta actividad deshidrogenasa que está asociada a la actividad enzimática para biotransformar hidrocarburos químicamente complejos, ellos encontraron que los subproductos desarrollados de las especies de hongos promueven el crecimiento de nuevas especies microbianas cuyo metabolismo muestra resistencia a las condiciones hostiles del medio ambiente, así como a la toxicidad de los hidrocarburos, logrando de esta manera la remediación del suelo.

Más adelante se presentan los resultados microbiológicos se asumió que el consorcio de Agua Dulce al mostrar una mayor diversidad de especies microbianas, refleja mayores posibilidades de adaptarse a las condiciones extremas debido a la formación de enzimas extracelulares que les permite modificar aspectos de su metabolismo y por consiguiente, sobrevivir en ambientes ácidos, con bajo contenido de nutrientes, agua y oxígeno, aunado a esto los hongos pueden ser empleados en la degradación de compuestos recalcitrantes como los hidrocarburos alifáticos de cadenas largas o los asfaltenos. En años recientes se ha encontrado que en un proceso de bioremediación los hongos y levaduras son microorganismos con mayor potencial para realizar el desdoblamiento de las estructuras complejas, donde los subproductos son posteriormente empleados por las bacterias. Así mismo, los micelios de los hongos pueden penetrar capas de hidrocarburos expuestos a

procesos de intemperización, de esta manera es posible incrementar el área de superficie donde las bacterias pueden desdoblar los hidrocarburos con mayor facilidad (Rivera-Hernández, 2011). En condiciones de estrés como la acidez, toxicidad de los compuestos no ha sido una limitante para que los microorganismos desarrollen subproductos menos tóxicos, como consecuencia de la oxidación de los hidrocarburos mediante enzimas específicas como las monooxigenasas y dioxigenasas (Ojeda-Morales *et al.*, 2012; Leitão 2009). La presencia de hongos y levaduras en el inóculo Agua Dulce favorecen la degradación de los hidrocarburos, debido a que sus hifas actúan como un vector de movimiento para la bacterias, lo que facilita el desplazamiento de estas a través de los espacios porosos del suelo, actuando como un medio de soporte los hongos y levaduras, lo que promueve rápidamente la colonización de especies bacterianas y la biodisponibilidad de los hidrocarburos altamente recalcitrantes (Biancotto *et al.*, 1996, Perotto *et al.*, 1997, Li *et al.*, 2008). En el caso del inóculo de Estero de Pantano, se observó una menor capacidad de biodegradación, al respecto algunos autores han asociado esta causa al hecho de que las especies de microorganismos que se encuentran establecidas por años no tienen el potencial de degradación de otros compuestos, por lo tanto, se les ha denominado como “biomasa vieja”, la cual ya está adaptada y no contienen las enzimas específicas que rompan las estructuras de nuevos compuestos recalcitrantes (Jorgensen y col., 2000). El resultado de la cinética de crecimiento de bacterias y hongos mostró que la microbiota que vive en condiciones de estrés puede lograr una mayor capacidad para degradar compuestos recalcitrantes como la fracción pesada del petróleo crudo maya, ya que se convierten en especies más activas, que una microbiota que ha estado expuesta al ambiente por años, ya que dichos microorganismos son capaces de reproducirse en un ambiente en condiciones adversas y por consiguiente han adquirido cierto potencial para desdoblar las complejas estructuras del petróleo, sobre esto se reporta que la edad de las especies, así como, los cambios en su morfología externa e interna de las células, les impide incrementar su potencial de degradación. Un consorcio adaptado a altas concentraciones de hidrocarburos de fracción pesada con una diversidad de especies microbianas incrementa la eficiencia de biodegradación de hidrocarburos altamente persistentes en un suelo. La diversidad microbiana presente en Agua Dulce pudo haber estimulado la producción de compuestos intermediarios y subproductos que son asimilados por otras especies de manera más

eficiente, así mismo, disminuye la producción de metabolitos de carácter tóxico, como ha sucedido en algunos casos donde se han desarrollado compuestos aún más tóxicos que el contaminante de origen.

Otros estudios también han hecho aportaciones, en cuanto al control de condiciones de operación de un proceso de remediación e influir en el potencial que tienen algunos otros microorganismos como las levaduras pueden degradar de manera más eficiente los hidrocarburos que las bacterias (Gargouri et al., 2015), por consiguiente, los consorcios microbianos tiene una mayor capacidad de degradación de moléculas de hidrocarburos químicamente complejas.

Tabla 12. Abundancia de las diferentes UFC durante 24 horas de degradación para los inóculos bioaumentados de Estero de Pantano y Agua Dulce.

Tiempo (h)	Unidades Formadoras de Colonia (UFC)					
	1	2	3	4	5	6
	<b>UFC predominantes en el inóculo de Agua Dulce</b>					
0		X	X	X		
4		X	X			
8		X	X	X		
12		X			X	X
16		X	X		X	X
20		X	X	X	X	X
24		X		X		
	<b>UFC predominantes en el inóculo de Estero de Pantano</b>					
0	X	X		X		
4	X	X				
8		X		X		
12		X			X	X
16		X	X		X	X
20		X	X			
24		X	X			



En este trabajo se hizo un estudio en microscopio con el objetivo de 40x donde se observó la morfología de las levaduras en el inóculo de Agua Dulce y del inóculo de Estero de Pantano, lo cual concuerda con algunos trabajos donde observaron una eficiente emulsificación de hidrocarburos mediante un inóculo donde había una importante presencia de la especie de levadura *Candida maltosa* (Chrzanowski *et al.*, 2006). Por consiguiente en este estudio se atribuye la solubilización de los hidrocarburos por la presencia de diferentes grupos microbianos como bacterias, hongos y levaduras es influenciada por la concentración y tipo de nutrientes adicionados.

En la Tabla 12 se presentan los resultados de la observación del crecimiento colonial de bacterias en un periodo de tiempo de 24 horas de degradación de los hidrocarburos con el inóculo seleccionado (Agua Dulce). Se realizó la identificación genética de las seis UFC más abundantes en los inóculos de Agua Dulce y Estero de Pantano. En este análisis se encontró que en el tiempo de cero a cuatro horas predomina una especie de bacteria quien es la que comienza el rompimiento de los enlaces químicos que conforman a la fracción pesada, posteriormente otras especies se desarrollan de manera significativa y quienes emplean los metabolitos generados por el primer grupo como fuente de carbono.

Se observaron diferencias en la morfología entre una UFC y otra, tales como la pigmentación, consistencia, tamaño, así mismo, conforme transcurrió el tiempo de degradación, la abundancia de especies varió entre los inóculos de Agua Dulce y en Estero de Pantano. En la Tabla se observa la ausencia de la UFC 1 en Agua Dulce, mientras que en Estero de Pantano dicha colonia está presente, en tanto la UFC 3 está presente en el inóculo de Agua Dulce durante las primeras horas del proceso de degradación de los hidrocarburos. Los subproductos generados durante la biodegradación son asimilados por algunas especies, mientras que otros podrían ser tóxicos lo que inhibe el crecimiento de otras especies (Tang *et al.*, 2012).

#### **4.2.3 Resiembra del consorcio para el estudio de la morfología colonial**

Una vez aisladas las colonias más abundantes se realizaron resiembras de cada cepa. Se observó diferentes pigmentaciones en cada colonia aislada, así como diferencias en tamaño y borde. Se observó una variación del diámetro de cada colonia de 1mm a 2 mm, se observó pigmentación amarilla, blanca y rosada.

#### 4.2.4 Aislamiento e identificación de microorganismos

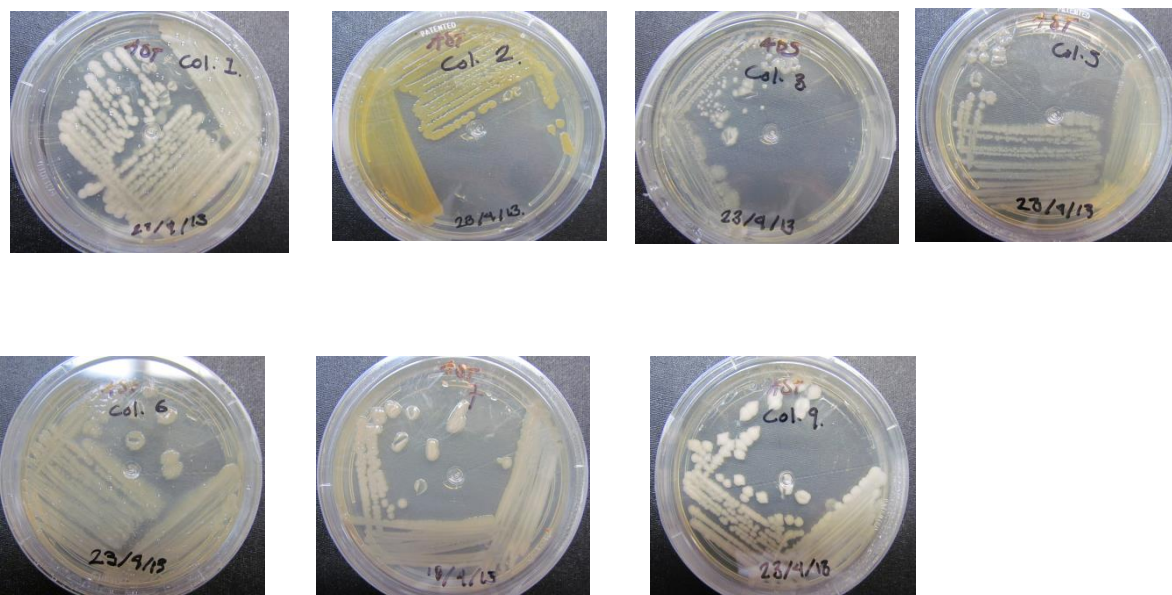


Figura 19. Colonias bacterianas más abundantes después de la cinética de crecimiento estudiada en los consorcios microbianos Agua Dulce y Estero de Pantano

Una vez obtenidos los aislados de las colonias más abundantes en la cinética de crecimiento bacteriano de ambos consorcios, Estero de Pantano y Agua Dulce, se estudió la morfología de las colonias. Se visualizó cada colonia al microscopio con el objetivo 40X y 100X respectivamente (Figura 19). Se observó diferente pigmentación: La colonia 1 que fue la más abundante en las primeras horas de degradación presentó un color blanco, en tanto la colonia 2 se observó un color ligeramente rosado, la colonia 3 presenta un color amarillo, este tipo de pigmentación podría deberse al tipo de subproductos que se están asimilando durante ese tiempo de degradación. En cuanto al tamaño de las colonias, se observó que aquellas con diámetro menor fueron las que realizaron la degradación de los hidrocarburos en las primeras horas, esto se asocia a lo antes mencionado en el capítulo 1, que las bacterias presentes en un suelo intemperizado o bien en condiciones extremas son de tamaño reducido.

### 4.2.3 Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN)

El periodo de crecimiento fue de 24 horas a una temperatura de 35°C. Las cepas aisladas fueron identificadas mediante un análisis comparativo del gen 16S rARN y examinado para determinar la posición taxonómica precisa de la cepa. Se obtuvieron siete aislados que fueron identificados empleando un marcador de peso molecular de 1560 bp (pares de bases) y amplificando con 16SF1 y 16SR1´.

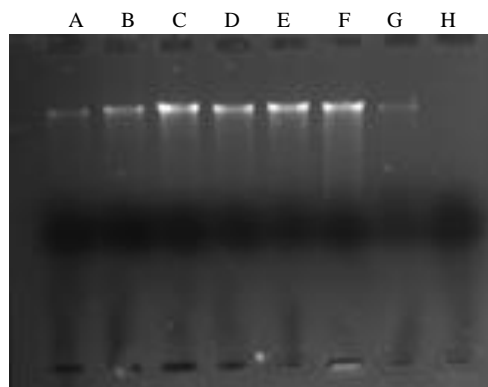
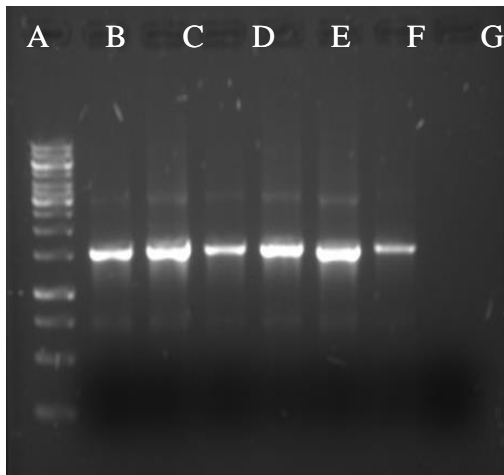


Figura 20. Electroforesis del gel agarosa de la extracción de ADN de cada cepa. Pozos A-G: cepas. Pozo H: Control negativo

Una vez realizada la extracción del ADN de las cepas obtenidas de ambos consorcios Agua Dulce y Estero de Pantano, se realizó la amplificación del gen 16S de cada colonia (Figura 20). La amplificación del gen 16S para cada cepa se observa en la Figura 25, cada cepa presentó el gen de interés con un tamaño de 1542 bp.

La Figura 21 muestra la presencia del ADN extraído de cada una de las cepas obtenidas. Estas son las concentraciones (ng/uL) y una pureza respectivamente: A 53.8, 1.65; B 73.2, 1.8; C 35.7, 1.75; D 75.8, 1.66; E 76.61.74; F 33.9, 1.47; H 53.9, 1.66. Estos valores cumplen con la concentración mínima para llevar a cabo la identificación de las bacterias presentes en ambos inóculos.



A Marcador de peso molecular  
 B Control negativo  
 C *Flaviobacterium saliserosum* strain AS 1.3801  
 D *Pseudomonas citronellolis* DSM 50332  
 E *Pseudomona citronellolis* DSM 50332  
 F *Pseudomona citronellolis* DSM 50332  
 G *Pseudomona citronellolis* DSM 50332  
 H *Ochrobacteriumintermedium* Strain  
 CCUG24694

Figura 21. Electroforesis del gel agarosa del 16S, 1542 bp amplificado mediante PCR. Pozo A: marcador de peso molecular 1 KB plus. Pozo B-H: Cepa 1-7. Pozo A: Control negativo

#### 4.2.4 Amplificación del gen 16S ARN e identificación de las especies bacterianas

El ADN extraído fue secuenciado en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad LANGEBIO CINVESTAV, IPN. Las bacterias identificadas fueron *Flaviobacterium saliserosum* strain AS 1.3801 (NR 043481.1), *Pseudomonas citronellolis* DSM 5033 (026533.1 NR) and *Ochrobactrum intermedium* Strain CCUG24694 (NR 042447.1). Cuatro de los siete aislados fueron identificados como *Pseudomonas citronellolis* con un porcentaje de identidad del 98%, sin embargo, las características morfológicas fueron diferentes. El gen *Pseudomona sp.* fue el más abundante de acuerdo a las bandas mostradas. La filogenia basada en estas cepas puede ser usada para relacionarse, de acuerdo como lo indica la Figura 6. En este estudio se observó que la especie más abundante fue *Ochrobactrum intermedium* Strain CCUG24694.

El inóculo de Agua Dulce y Estero de Pantano presentaron cepas similares durante la cinética de crecimiento, sin embargo, al comienzo de la cinética el inóculo de Agua Dulce desarrolló mayor número de colonias correspondientes a la especie *Flavobacterium saliperosum* AS 1.3803, en tanto al final de la cinética. El inóculo de Agua Dulce mostró mayor diversidad microbiana, siendo las especies más abundantes: *Pseudomonas citronellois* DSM 50332 (98%), *Pseudomonas delhiensis* RLD-1 (98%) and *Ochrobactrum intermedium* CCUG 24694 (98%).

#### 4.2.4.1 Identificación y aislamiento de las cepas microbianas del inóculo de Agua Dulce y de Estero de Pantano

En ambos inóculos Agua Dulce y Estero de Pantano se encontraron las mismas cepas, sin embargo, al inicio de la cinética de crecimiento de Agua Dulce se encontró mayor abundancia de *Flavobacterium saliperosum* AS 1.3803 (NR 043481.1), mientras que al final de la cinética la cepa predominante fue *Ochrobactrum intermedium* CCUG (NR 042447.1). El inóculo de Agua Dulce mostró mayor diversidad microbiana. Las especies más abundantes fueron *Pseudomonas citronellois* DSM 50332, (NR 026533.1).

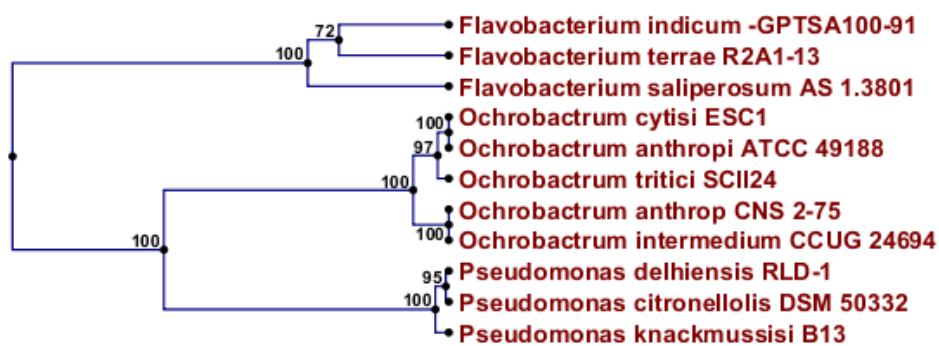


Figura 22. Árbol filogenético de las especies más abundantes en la degradación del petróleo crudo maya

El árbol filogenético (Figura 22) se realizó empleando las cepas con mayor porcentaje de identidad, que representan la similitud con otras especies identificadas mediante el método UPGMA por sus siglas en inglés (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) que es empleado para la construcción de diagramas que reflejan las similitudes fenotípicas entre diversas especies, empleando el programa CLC viewer 6.8.1

Las cepas identificadas están directamente asociadas a la degradación de compuestos recalcitrantes. Fall *et al.* (1979) encontraron que la *Pseudomona citronellois* es capaz de oxidar n-alcanos ramificados a citronellol, donde la biodegradación se realiza primeramente vía oxidación terminal para producir un ácido alcanico, el cual es posteriormente degradado por una secuencia de ácidos. Las cadenas ramificadas son menos susceptibles a la biodegradación, la presencia de grupos alquil los convierte en grupos altamente recalcitrantes, sin embargo, estas bacterias aumentan potencialmente la producción de

citronellol, lo que promueve la degradación de compuestos altamente recalcitrantes. El metabolismo del citronellol ocurre en ciertas especies de *Pseudomonas sp.* y promueve la transformación de n-alcenos a 3-metil alceno y 2-metil alceno, los subproductos más conocidos de esta transformación han sido los compuestos intermedios 2,6-dimetil-2-octano, 3,6-dimetil-octadecano y 2,6-dimetil-decano (Schaeffer *et al.*, 1979).

La identificación de estas especies determinaron la existencia de la degradación de compuestos altamente persistentes como los que contiene la fracción pesada del crudo maya, así mismo, el consorcio Agua Dulce mostró mayor potencial de biodegradación.

Así mismo, se observó que en las primeras horas del crecimiento bacteriano hubo una predominancia para ambos inóculos de la especie bacteriana *Flavobacterium spp.* Esto confirma lo reportado por algunos autores que dicha especie es capaz de desarrollarse de manera significativa en la primera etapa del crecimiento bacteriano biotransformando los compuestos químicamente complejos y recalcitrantes (Atlas and Bartha, 1972), en tanto, Christopher and Christopher (2004) reportaron en un estudio del tratamiento de un suelo contaminado con petróleo mediante un proceso de composteo que *Flavobacterium spp* y *Pseudomonas spp* fueron las bacterias más predominantes en las primeras horas.

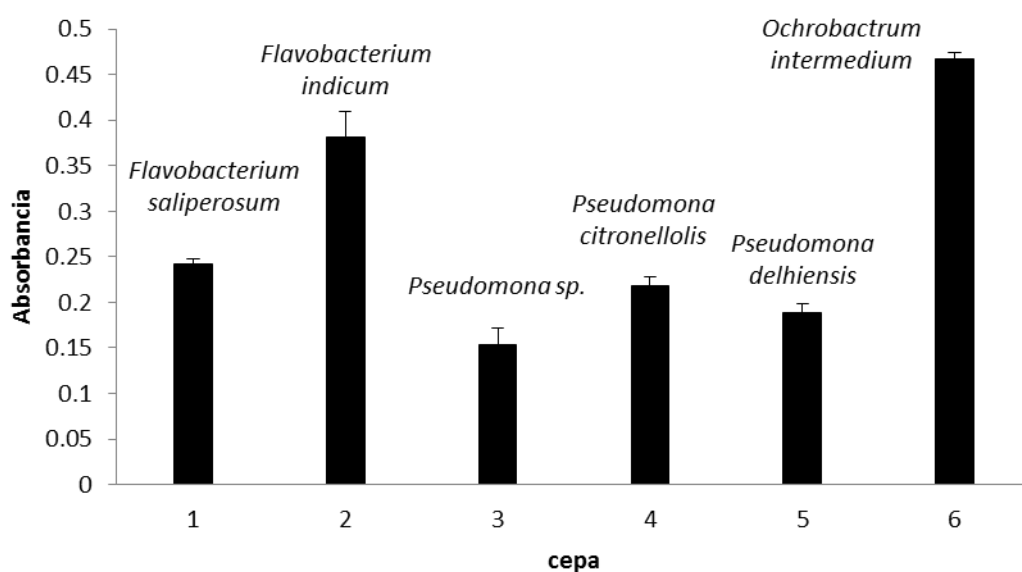


Figura 23. Aumento de la biomasa a las 24 horas en medio liquido AST de las seis especies bacterianas más abundantes

Se estudió la capacidad de crecimiento de manera individual de cada cepa en medio líquido empleando como única fuente de carbono del petróleo crudo maya. La turbiedad de cada cepa es un indicador del crecimiento microbiano. En la Figura 23 se observa que las especies con mayor absorbancia, la cual está directamente relacionada con el desarrollo de biomasa fueron la *Ochrobactrum intermedium*, *Flavobacterium indicum* y *Flavobacterium saliperosum* consecutivamente.

Muchos estudios se han enfocado en el potencial de biodegradación de una especie microbiana individualmente en el estudio de ciertos componentes del petróleo, sin embargo, frente a un problema de contaminación del suelo, de derrames de hidrocarburos, son las mezclas de hidrocarburos, son los consorcios microbianos los que tienen la mayor capacidad de biodegradación de los hidrocarburos recalcitrantes.

#### 4.2.5 Análisis cromatográfico de la bioconversión de la fracción pesada del crudo maya en los inóculos de Agua Dulce y Estero de Pantano

El consorcio Agua Dulce realizó la biotransformación de hidrocarburos cuyas cadenas de carbonos fue mayor a C18. Se observó la producción de diferentes subproductos tales como los ácidos carboxílicos y alcoholes.

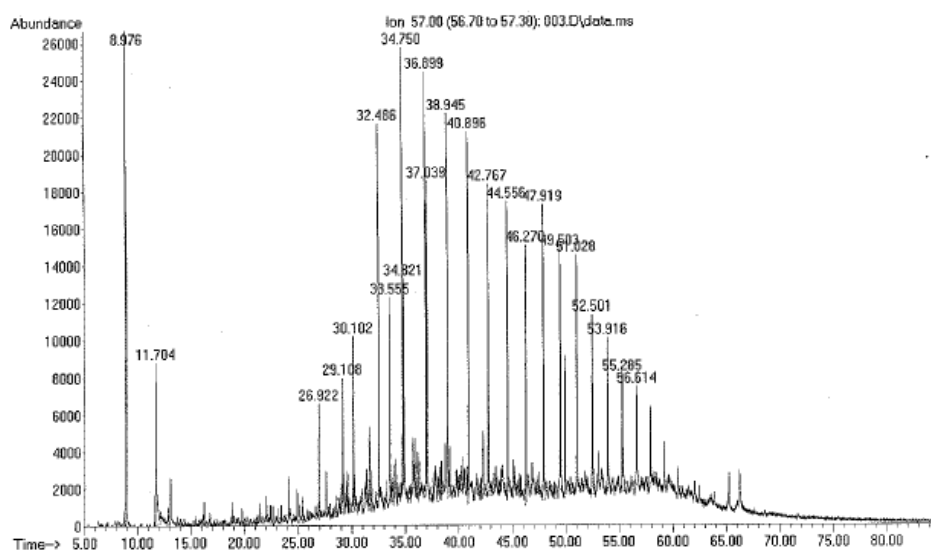


Figura 24. Cromatograma de los principales componentes identificados a las cero horas del inoculo de Agua Dulce

. El 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona fue el más abundante a las 24 horas de degradación con un 33% con respecto a las cero horas (Figura 24). En otros trabajos en la remediación de un suelo contaminado con hidrocarburos se encontró que la presencia del 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona se obtiene en la biodegradación de asfalténos, resinas e hidrocarburos aromáticos en un suelo al ser un subproducto del *Bacillus sp*, así mismo encontraron cambios significativos en las propiedades fisicoquímicas del suelo al biodegradarse el crudo presente (Ruixia et. al., 2006).

Los resultados de este trabajo mostraron que una vez transcurridas las 24 horas varios compuestos ya no estaban presentes, tal fue el caso del octadecano (C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>), 2,6 metilundecano (C<sub>13</sub>H<sub>28</sub>) y el 3-metilnonano (C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>), estos dos últimos con un 4.36% y 5.42% respectivamente (Figura 25). En otros trabajos se ha reportado que tales compuestos están comúnmente presentes durante el proceso de la hidrólisis e influyen en la emulsificación de compuestos hidrocarbonados no solubles interviniendo bacterias *Bacillus sp* y *Pseudomonas sp* (Ruixia et al., 2007; Luo et al., 2003), dichas especies en un sin número de trabajos en la última década son reconocidas por su capacidad reductora de estructuras químicamente complejas asfalténos y resinas.

Dependiendo de la naturaleza de los microorganismos que componen al consorcio será posible la asimilación de metabolitos específicos que contribuyen a la biodegradación exitosa de compuestos persistentes como la fracción pesada y por consiguiente se modifica las propiedades fisicoquímicas del suelo en tratamiento. En el caso de un suelo contaminado la presencia de subproductos específicos mejoran la porosidad del suelo mediante la producción de CO<sub>2</sub> por efecto de la presión de gases derivados de la mineralización, altera la textura, lo que incrementa el transporte de nutrientes y agua a través del suelo, estableciendo condiciones aerobias e incrementando la biodisponibilidad.



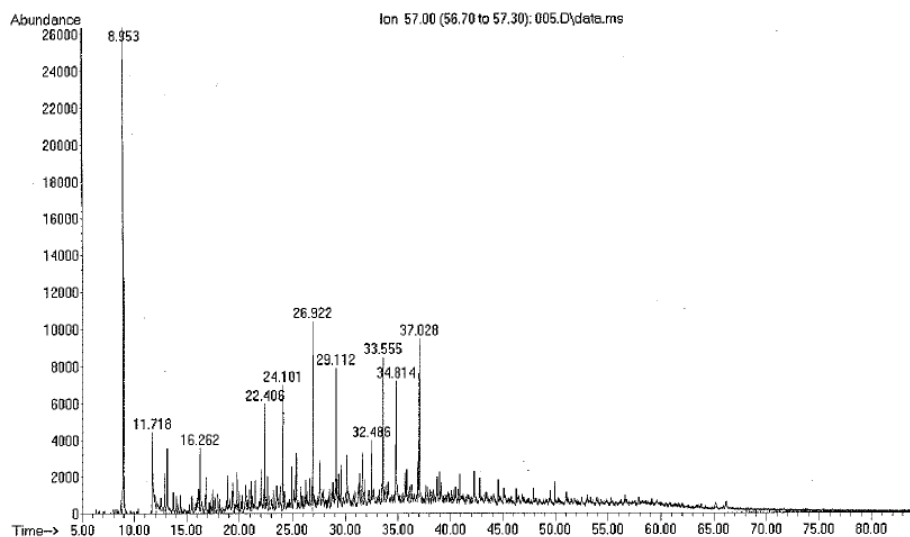


Figura 25. Cromatograma de los principales componentes identificados a las 24 horas del inoculo de Agua Dulce

Mediante el análisis GC-MS para Estero de Pantano se identificaron subproductos que resultan tóxicos e inhiben la asimilación de los metabolitos generados por las especies presentes, los cuales se presentan en el anexo 2 a las 24 horas de la biodegradación, algunos de los subproductos contienen grupos metil, etil y sustituyentes fenólicos por ejemplo el metabolito 2 - (1,1-dimetil) -4 - (1-metil-1-fenil etil)- fenol presentó 9.1% de abundancia después de las 24 horas de degradación con respecto al tiempo cero en un tiempo de retención de 39.320 minutos (Figura 26) . Otros dos subproductos 1,6-dimetil naftaleno y el 2,6 dimetil naftaleno desaparecieron al final de la cinética de crecimiento, la velocidad de biodegradación de los compuestos depende de la posición del grupo metil en la cadena hidrocarbonada según como lo menciona Volkman JK (1984). Entre más adyacente sea la posición de los grupos alquilo será más baja la velocidad de biodegradación.

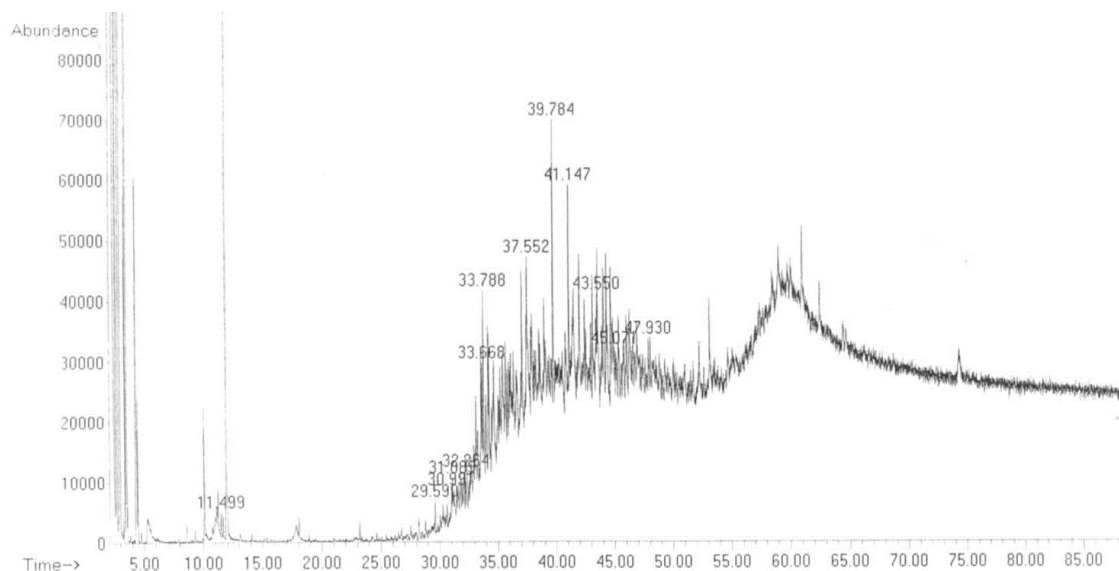


Figura 26. Análisis cromatográfico en el tiempo cero de la biotransformación de la fracción pesada llevada a cabo por el inóculo de Estero de Pantano

La velocidad de biodegradación de compuestos como el dimetilnaftaleno varía dependiendo de la estructura isomérica, en tanto, compuestos con sustituyentes beta-metil son fáciles de biodegradar en contraste con los etil naftalenos. La biodegradación del consorcio Estero de Pantano (Figura 27) mostró la presencia de subproductos con grupos etilo, como el 6-etil-2-metiloctano con una abundancia del 3.9%. Estudios atribuyen la inhibición de la biodegradación ante la presencia de tal metabolito (Kenna M. et al., 1976), estos compuestos afectan el desarrollo de nuevas especies con la capacidad de asimilar estas estructuras como fuente de energía, por lo que dependiendo del tipo de hábitat es la preferencia de los microorganismos por llevar a cabo un proceso metabólico.

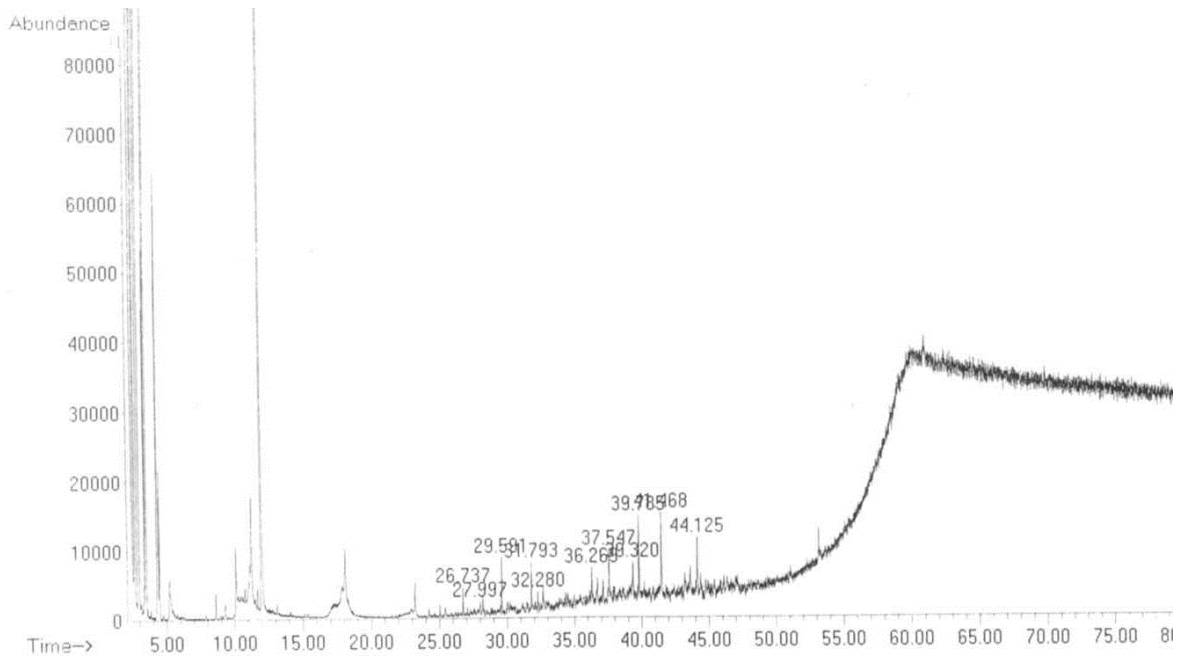


Figura 27. Cromatograma de la degradación de la fracción pesada del inóculo de Estero de Pantano después de las 24 horas de biodegradación.

La identificación bacteriana, así como, el análisis de hidrocarburos permitió profundizar en la capacidad para degradar los hidrocarburos intemperizados. El resultado del análisis de identificación de iones principales por GC-MS a las 24 horas de degradación de la fracción pesada de crudo maya de ambos inóculos Agua Dulce y Estero de Pantano mostró una remoción de hidrocarburos intemperizados al identificar los iones principales contenidos en los hidrocarburos extraídos, donde el barrido cromatográfico de los iones demostró del 65% y 61% respectivamente. Generalmente se ha reportado que la diversidad de especies promueve los procesos cometabólicos, al haber generación de subproductos que favorecen el establecimiento de nuevas especies al ser asimilados por estos como su fuente de carbono, mediante esta forma de metabolismo se ha comprobado la degradación de compuestos altamente resistentes (Boonchan *et al.*, 2000). En la Tabla 13 se muestra algunas características microbiológicas y químicas de los dos consorcios adaptados Agua Dulce y Estero de Pantano.

Tabla 13. Microorganismos y subproductos presentes en los inóculos Agua Dulce y Estero de Pantano después de las 24 horas de la cinética de crecimiento

<b>Consorcio Agua Dulce (AD)</b>		<b>Consorcio Estero de Pantano (EP)</b>	
Bacterias (UFC/mL)	1.2X10 <sup>8</sup>	Bacterias (UFC/mL)	7X10 <sup>7</sup>
subproductos AD a las 24 horas de degradación		subproductos EP a las 24 horas de degradación	
2,6-dimetil-undecano (C13H28)	4.36%	2,3,7-trimetil octano	4.16%
3-metil-nonane (C10H22)	5.42%	3-etil-2-metil heptano	2.799%
		2-metil decano	7.826%
		6-etil-metil-octane	3.905%
		2,6-dimetil undecano	6.048%
		2-(1,1-dimetil etil-4-fenil etil)-fenol	9.190%
		5-(hexadecil-oxipentano decil cis-1,3-dioxano)	15.148%
Hongos	Presentes	Hongos	No presentes
Levaduras	Presentes	Levaduras	No presentes
Velocidad de crecimiento específico (μ)	0.35	Velocidad de crecimiento específico (μ)	0.48
*Compuestos no identificados	65%	*Compuestos no identificados	61%

\*Este parámetro se estimó en base al porcentaje de iones no detectados a las 24 horas de la cinética de degradación en base a la sumatoria de áreas de los espectros de las cromatografías.

### 4.3 Bioestimulación

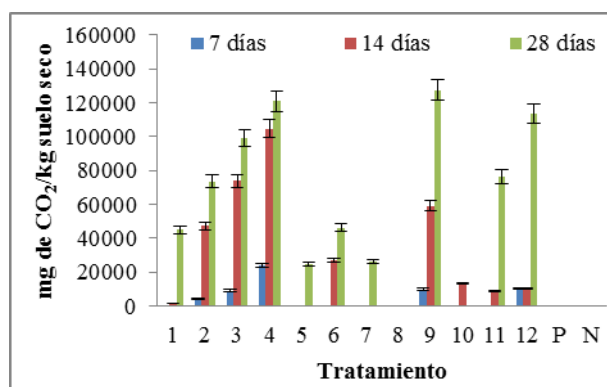
Se encontró mediante el diseño de experimentos Plackett-Burman la concentración mínima necesaria de nutrientes para que los microorganismos nativos y los bioaumentados desarrollaran eficientemente los procesos metabólicos para biodegradar los hidrocarburos en el suelo contaminado de Agua Dulce. La evaluación de los algunos parámetros fisicoquímicos como el cambio de pH, porcentaje de humedad, porcentaje de materia

orgánica, conductividad eléctrica, concentración de hidrocarburos y producción de CO<sub>2</sub> permitieron conocer la capacidad de biodegradación de los hidrocarburos en los 12 experimentos. Por consiguiente se establecieron concentraciones y tipo de sales minerales óptimas para obtener la máxima degradación.

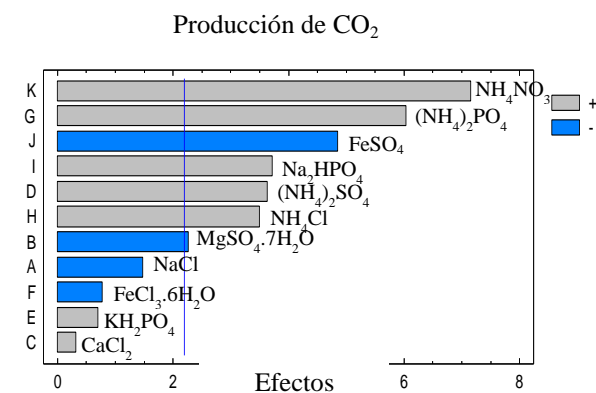
### **4.3.1 Optimización de un medio enriquecido**

#### **4.3.1.1 Respiración microbiana**

Se estimó la actividad microbiana (expresado como mg CO<sub>2</sub>/kg suelo seco) que fue llevada a cabo por los microorganismos para los 12 tratamientos. Esta medición es un parámetro indirecto para medir la capacidad de degradación de los microorganismos hidrocarbonoclastas (Anderson 1982, D'Annibale *et al.* 2004). La figura 28a muestra la producción de CO<sub>2</sub> para los 12 tratamientos a los 7, 14 y 28 días de biodegradación. Las barras de error muestran la desviación estándar de la generación de CO<sub>2</sub> de los 12 experimentos a partir de dos réplicas. Se observó un aumento progresivo de la actividad microbiana en los tratamientos 4, 9 y 12 con un valor de 132 180, 94 246 y 92 107 mg CO<sub>2</sub>/kg suelo a los 28 días, respectivamente, siendo el tratamiento 9 el de mayor producción de CO<sub>2</sub>. El diagrama de Pareto (figura 28b) muestra las sales inorgánicas (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) consideradas estadísticamente significativas durante la respiración microbiana, tales compuestos intervinieron de manera importante con un nivel alto en la producción de CO<sub>2</sub> y por consiguiente en la actividad metabólica de los microorganismos presentes en el suelo. El diagrama de Pareto donde se muestran únicamente los factores (A-K) correspondientes a las sales minerales que resultaron tener mayor significancia en la producción de CO<sub>2</sub>. El análisis de varianza mostró los valores de  $R^2 = 93.5 \%$ ,  $R_{ajustada} = 87.6 \%$  y un error estándar = 16963 de todos los experimentos. La producción de CO<sub>2</sub> en el suelo tratado se comparó con dos suelos: un testigo positivo (P) y un testigo negativo (N). El nitrógeno y potasio influyen en la formación de nuevas células e intervienen en los procesos cometabólicos y la formación de productos intermediarios específicos como los ácidos grasos, ácidos carboxílicos, los cuales, serán asimilados por otras especies microbianas. La producción de CO<sub>2</sub> fue nula para los controles P y N, al igual que en el tratamiento 8. Esto sugiere que la aplicación de nutrientes y su concentración son determinantes para incrementar la actividad microbiana.



(a)



(b)

Figura 28. (a) Estimación de la producción de CO<sub>2</sub>. b) Diagrama de Pareto donde se muestran únicamente los factores más significativos.

#### 4.3.1.2 pH

El pH en los suelos costeros afecta la solubilización de los nutrientes y de los hidrocarburos persistentes. Los suelos contaminados con hidrocarburos tienden a ser suelos ácidos, sin embargo, para que la biodegradación sea llevada a cabo se requiere un pH neutro entre 7.4 y 7.8. Los tratamientos que se encontraron dentro de este rango de pH a los 28 días de biodegradación fueron: 3, 4, 6, 9 y 10 (figura 29a), esto demuestra que el tipo de nutriente y su concentración influyen en los procesos metabólicos de los microorganismos, lo que influye directamente en el cambio de las propiedades fisicoquímicas del suelo en tratamiento. A continuación se muestra la estimación del pH para los 12 tratamientos durante la degradación de los hidrocarburos intemperizados durante 28 días, las líneas de error representan la desviación estándar de cada uno de los tratamientos a partir de dos réplicas. Los valores 1 a 12 corresponden a los experimentos, en tanto, P y N corresponden a los controles positivo y negativo. A partir de los resultados se establece que el cambio de pH ligeramente ácido a neutro favorece los procesos metabólicos de las especies microbianas involucradas en la degradación de hidrocarburos (Arrieta 2011). La formación de subproductos ocasiona cambios de pH durante el proceso de biodegradación de los hidrocarburos, las especies iónicas formadas en ocasiones tienden a inhibir la actividad microbiana por la formación de metabolitos que ocasionan un ambiente tóxico en la fase

líquida del suelo, lo que disminuye el crecimiento de bacterias hidrocarbonoclastas o bien ciertos subproductos de la biodegradación pueden ser empleados con fuente de energía por otras especies que no participan en la degradación del contaminante. Los resultados analizados de acuerdo al diagrama de Pareto mostraron que las sales con mayor significancia en el cambio del pH son:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4$  (figura 29b). El análisis de varianza mostró los valores de  $R^2 = 83.6 \%$ ,  $R_{\text{ajustada}} = 68.6 \%$  y el error estándar = 0.22.

Se observó que en las sales contienen de manera importante el elemento fósforo en forma de fosfato ( $\text{PO}_4$ ), este compuesto participa en la síntesis enzimática, sin duda se observó que el pH afecta la solubilidad de los nutrientes y el transporte de metales traza o metales pesados presentes en el suelo lo cual es corroborado por autores como Riser-Roberts (1998) y Townsend *et al.* (2000), quienes evaluaron diferentes aceptores que al aplicarlos al suelo contaminado en un ambiente facultativo, lograron la solubilización de compuestos persistentes y el aumento en la biodegradación de hidrocarburos con solo aplicar  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  como aceptor de electrones.

Cuando se mantiene la concentración mínima necesaria de nutrientes esenciales en el suelo se puede influir en la generación subproductos específicos, como: ácidos carboxílicos, alcoholes, ésteres, los cuales, determinan un ambiente ácido o alcalino en la fase líquida del suelo, influyen en el desarrollo de especies microbianas capaces de degradar los hidrocarburos fuertemente adsorbidos en los poros del suelo, es aquí donde la polaridad hidrocarburos presentes la fase líquida tiende a aumentar. Los nuevos metabolitos promueven la desorción los compuestos orgánicos e inorgánicos secuestrados en la fase sólida del suelo. Algunos autores han reportado relaciones de nutrientes C:N:P (100:10:1) esenciales para un eficiente crecimiento microbiano, sin embargo, si el suelo pertenece a un ambiente extremo reduce el éxito esperado, comúnmente esto se asocia a características de la microbiota natural, la fracción mineral y el contaminante (Días *et al.* 2012). Para obtener la mayor biodegradación de los hidrocarburos intemperizados se recomienda estudiar todas fuentes de nutrientes que afectan los procesos metabólicos, no obstante, una extensa evaluación de los requerimientos nutrimentales ocasiona altos costos y tiempo. El aporte necesario de nutrientes, agua y oxígeno en el proceso de biodegradación incrementa la desorción de los hidrocarburos presentes en el suelo intemperizado, por consiguiente, la

degradación los hidrocarburos persistentes es posible en condiciones en donde las moléculas se encuentran dispersas o solubles (Riser-Roberts 1998).

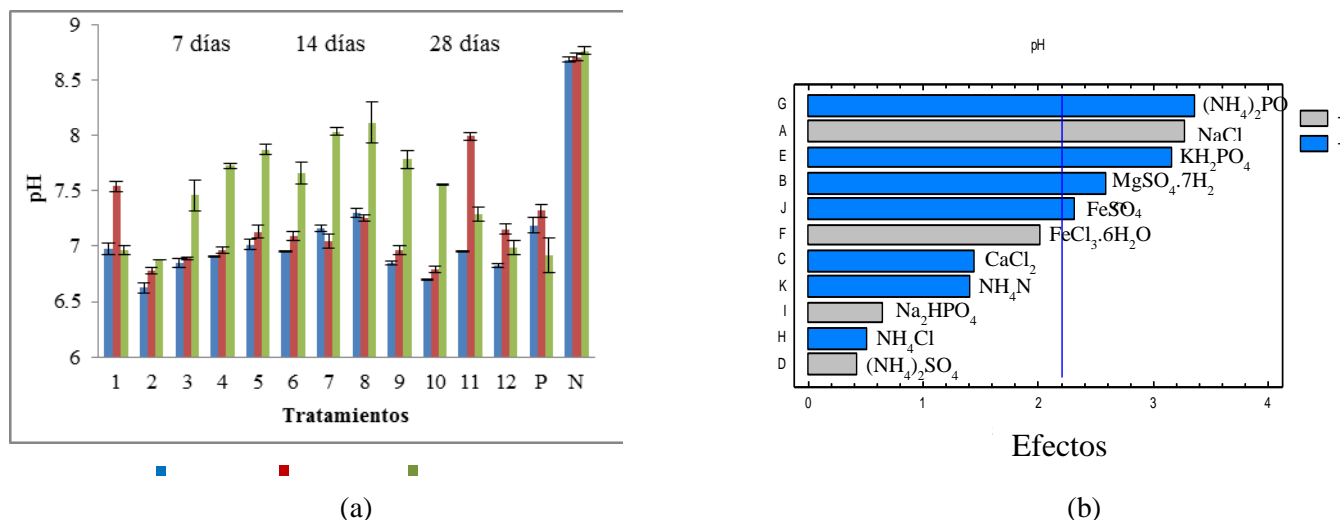


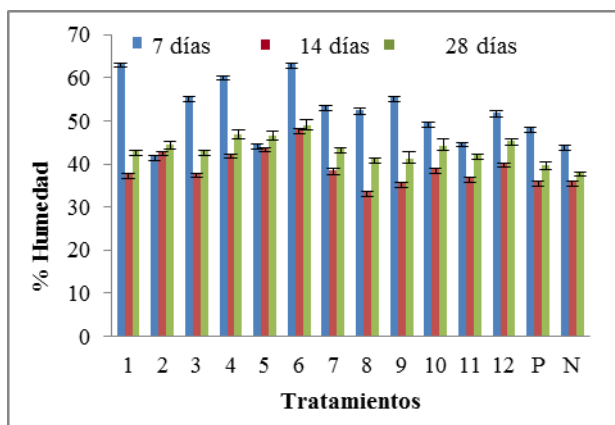
Figura 29. a) Estimación del pH. (b) Diagrama de Pareto donde se muestran los factores (A-K) que son significativos.

#### 4.3.1.3 Porcentaje de humedad

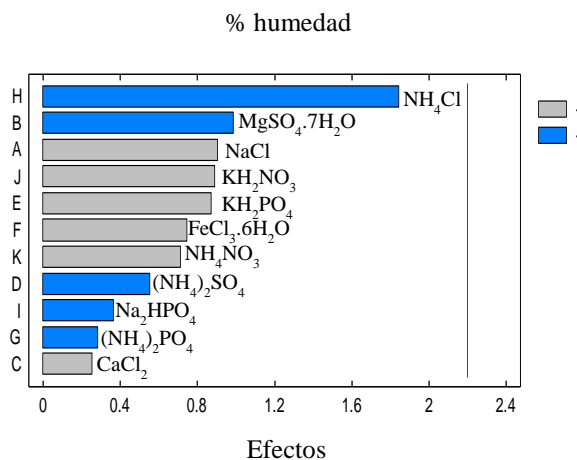
La humedad del suelo es un factor limitante para el éxito de biorremediación, por lo que previamente a este estudio se evaluaron diferentes porcentajes de humedad en la biodegradación de los hidrocarburos obteniéndose que una humedad del 30 % tiene mayor influencia en la biodegradación de hidrocarburos intemperizados, por consiguiente, en el tiempo cero todos los experimentos comenzaron con una humedad fija del 30 %. Posteriormente durante el periodo de biodegradación de los hidrocarburos, la humedad presentó aumentos o decrementos lo que se asocia a la biodegradación de los hidrocarburos y no por efectos abióticos puesto que los experimentos se desarrollaron en la oscuridad, bajo condiciones herméticas y controladas para evitar pérdidas de subproductos por volatilización o fotooxidación. Los porcentajes de humedad para cada tratamiento se observan en la figura 30a, la estimación del porcentaje de humedad de los 12 experimentos durante los 28 días de la biodegradación de los hidrocarburos intemperizados, En este trabajo se realizó la estimación de CE de los 12 experimentos durante 28 días de biodegradación de los hidrocarburos intemperizados, así mismo, las líneas de error representan la desviación estándar de cada experimento en dos réplicas. Los valores 1 a 12



corresponden a los experimentos, en tanto, P y N son los controles positivo y negativo, así mismo, las líneas de error representa la desviación estándar de cada experimento en dos éplicas. Los valores 1 a 12 corresponden a los experimentos en todos los tratamientos se observó un aumento de la humedad en el día 7 en un intervalo del 10 al 20 % para los tratamientos, esto se atribuye a la mineralización de compuestos hidrocarbonados, debido a la formación de  $\text{CO}_2$  y agua, así mismo, la producción de nuevos subproductos incrementa la solubilidad de los compuestos orgánicos por lo que la tasa de biodegradación es directamente proporcional a la humedad en un sistema cerrado (Place *et al.* 2001). Después del día 14 se observó el mayor aumento de la humedad en los tratamientos 1, 3, 4, 6 y 9, con respecto a los demás tratamientos, en tanto, los testigos P y N presentaron menor contenido de humedad con respecto a los demás tratamientos. El incremento de humedad esta correlacionada con la biodegradación de los hidrocarburos siendo el agua parte de los subproductos obtenidos de la mineralización, así mismo, el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{H}_2\text{O}$  alteran las propiedades fisicoquímicas del suelo, debido al incremento de la presión interna en la matriz del suelo lo que ocasiona un incremento de la porosidad (Place *et al.* 2001), esto permite un mayor transporte de agua, nutrientes, oxígeno y microorganismos entre los poros del suelo.



(a)



(b)

Figura 30. (a) Estimación del porcentaje de humedad. (b) Diagrama de Pareto donde se presentan los factores más significativos.

Los tratamientos y los testigos P y N presentaron nula actividad microbiana debido a la falta de nutrientes. Cuando no existen las condiciones de humedad y nutrientes en el suelo el tamaño de los microorganismos disminuye, por lo que los poros del suelo son reemplazados por los hidrocarburos hidrofóbicos quedando secuestrados entre los espacios porosos del suelo. El análisis del diagrama de Pareto no muestra un efecto significativo de los nutrientes sobre la humedad (figura 30b) donde únicamente los factores (A-K) resultaron ser significativos para el cambio de la humedad del suelo en el proceso de biodegradación. El análisis de varianza mostró los valores de  $R^2 = 90.0 \%$ ,  $R_{ajustada} = 81.3 \%$  y el error estándar = 2.5. Sin embargo, la humedad controla el transporte de nutrientes entre el suelo y la pared celular de los microorganismos al existir un mayor contacto y su correspondiente asimilación.

#### **4.3.1.4 Conductividad eléctrica**

La capacidad de degradación de los hidrocarburos fue asociada con el cambio de la CE al ser una característica fisicoquímica que es afectada por la concentración de iones solubles tales como  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  y  $Na^+$ , los cuales, interfieren en el crecimiento de microorganismos. En la figura 31a se presenta la estimación de CE de los 12 experimentos durante 28 días de biodegradación de los hidrocarburos intemperizados, así mismo, las líneas de error representan la desviación estándar de cada experimento en dos réplicas. Los valores 1 a 12 corresponden a los experimentos, en tanto, P y N son los controles positivo y negativo, de este análisis se observó que para el día 14 se duplicó el valor de la CE respecto al día 7 para la mayoría de los tratamientos. En el día 28 el valor de CE más alto fue para el tratamiento 9, con  $0.94 \mu S/cm$ , en tanto para la mayoría de los tratamientos esta disminuyó a los 14 y 28 días. A nivel del campo la CE del suelo incrementa al paso del tiempo, debido a la acumulación de compuestos ácidos y alcalinos. Un pH bajo tiende a solubilizar las especies iónicas durante un proceso de biodegradación influenciado por la generación de subproductos lo que ocasiona un aumento en los valores de CE (Acar *et al.* 1996). Algunos autores han encontrado en los suelos restaurados que los niveles de nitrógeno y potasio disminuye hasta tres veces, por lo que se incrementa dos veces la CE y cuatro veces el sodio, esto altera el pH de ácido a neutro o ligeramente alcalino (Trujillo *et al.* 2012).

Por consiguiente, en un proceso de bioestimulación es determinante considerar con precisión el rol de cada nutriente para alcanzar la máxima biodegradación (García 2012). Normalmente los suelos costeros contaminados con hidrocarburos intemperizados tienen bajas cantidades de nutrientes por efecto de la lixiviación, un incremento de iones en el suelo inhibe la degradación de los nutrientes o al haber un exceso de estos puede ocasionar eutrofización por la aparición de algas y otros microorganismos que promueven los procesos de anaerobiosis (Schroeder *et al.* 1999).

En la figura 31b el diagrama de Pareto muestra que nutrientes como el sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ) tiene mayor influencia en el aumento de CE, se muestran únicamente los factores (A-K) que resultaron ser más significativos para el cambio de la CE del suelo en el proceso de biodegradación. El análisis de varianza mostró los valores de  $R^2 = 93.5\%$ ,  $R_{ajustada} = 87.6\%$  y el error estándar = 0.05.

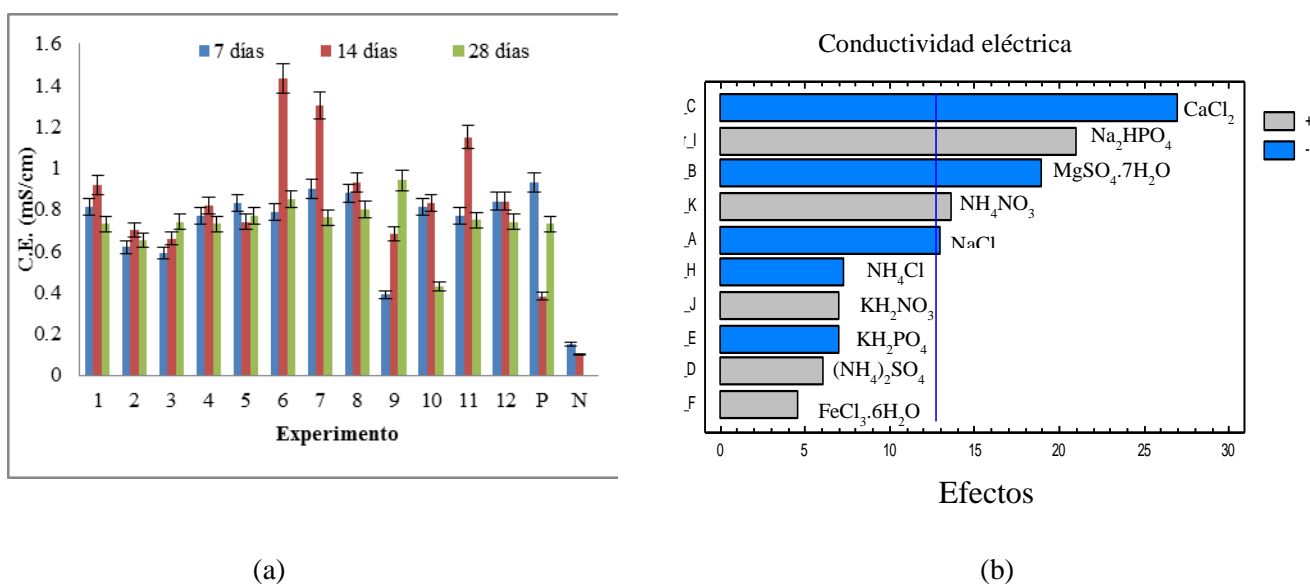


Figura 31. (a) Estimación de CE. (b) Diagrama de Pareto donde se muestran únicamente los factores más significativos.

Se encontró que esta sal tiene influencia importante en otros parámetros analizados como el pH y el porcentaje de humedad aún en pequeñas cantidades es estadísticamente significativo. El magnesio está presente regularmente en suelos arcillosos, por lo que la alteración de propiedades fisicoquímicas del suelo como CE, humedad y pH están directamente relacionadas con la presencia de este elemento (Hernández 2003).

#### 4.3.1.5 Porcentaje de Materia orgánica

La figura 32a donde se presenta la estimación del porcentaje de MO de los 12 experimentos durante 28 días de la biodegradación de los hidrocarburos intemperizados, así mismo, las líneas de error que representan la desviación estándar de cada experimento en dos réplicas. Los valores 1 a 12 corresponden a los experimentos, en tanto, P y N corresponden a los testigos positivo y negativo. Se observó que los tratamientos 5, 9 y 10 tienen menor contenido de materia orgánica una vez transcurridos los 28 días de biodegradación con porcentajes en peso de 3.78 %, 2.17 % y 2.54 % respectivamente, algunos autores han asociado la disminución del contenido de materia orgánica en el suelo con la degradación de la fuente de la materia hidrocarbonada del suelo (Ramírez 2009).

Mediante el método de Walkley and Black, las cadenas cortas de hidrocarburos ( $C_5$  a  $C_9$ ) se volatilizan por la reacción exotérmica con el  $H_2SO_4$ , mientras que el resto se oxida. Cadenas más largas ( $C_{10}$  a  $C_{23}$ ) tienen menor cantidad de compuestos volátiles, al oxidarse se estiman valores altos de materia orgánica; sin embargo, los hidrocarburos con cadenas más largas ( $C_{25}$  a  $C_{35}$ ), son difíciles de volatilizar por el método de Walkley y Black (1934) ya que solo una pequeña parte de ellos son oxidables. En el diagrama de Pareto (figura 32b) donde se muestran únicamente los factores (A-K) que resultaron ser más significativos para la estimación del porcentaje de la materia orgánica, el análisis de varianza mostró los valores de  $R^2 = 75.9 \%$ ,  $R_{ajustada} = 53.9\%$  y el error estándar = 0.78, así mismo se observa que la mayoría los nutrientes no influyeron significativamente en el aumento del porcentaje de materia orgánica. Sin embargo, sí influyeron en el proceso metabólico de los microorganismos, todo depende que tan asimilables sean para ellos lo cual va a estar determinado por las condiciones ambientales, las características de la microbiota y el tipo de contaminantes.

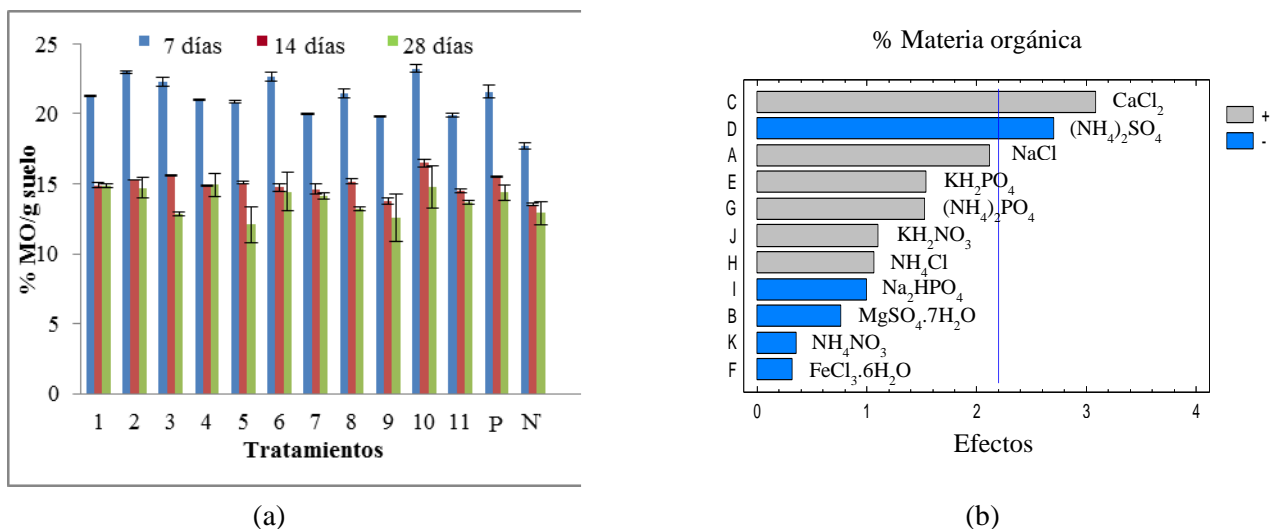
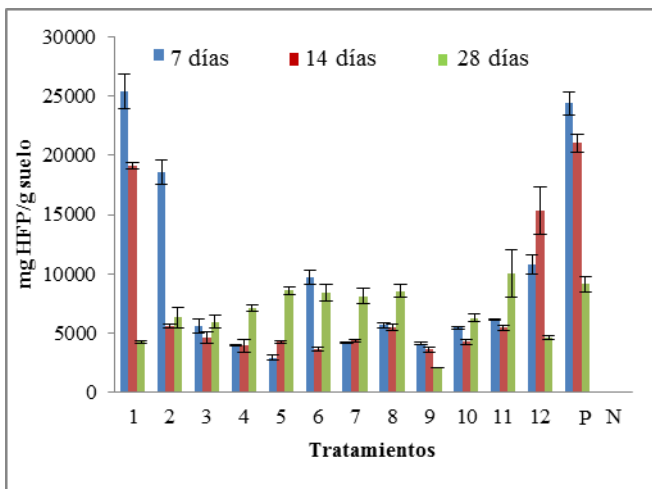


Figura 32. (a) Estimación del porcentaje de MO. (b) Diagrama de Pareto donde se muestran los factores más significativos.

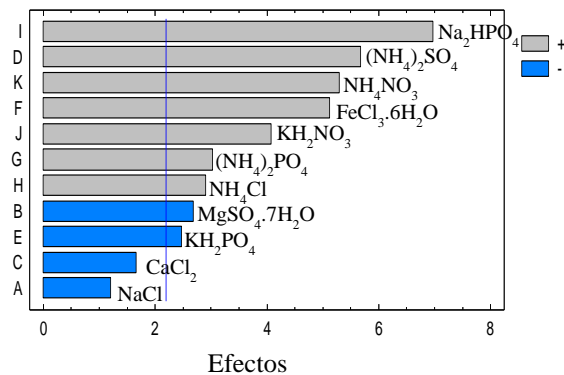
#### 4.3.1.6 Determinación gravimétrica de los hidrocarburos de fracción pesada

La figura 33a se muestra las concentraciones de HFP de los 12 tratamientos durante 28 días de la biodegradación de los hidrocarburos intemperizados, así mismo, las líneas de error representan la desviación estándar de cada experimento en dos réplicas. Los valores 1 a 12 corresponden a los experimentos, en tanto, P y N corresponden a los testigos positivo y negativo. Los testigos P y N, así como, los tratamientos 1 y 2 son los que presentaron mayor contenido de hidrocarburos de fracción pesada a los 7 días de biodegradación. La disminución de la concentración de HFP se atribuyó a los nutrientes aplicados y al consorcio microbiano adaptado. Se observó relación entre la producción de  $\text{CO}_2$  y la degradación de la fracción pesada, ya que el experimento 1 registró menor producción de  $\text{CO}_2$  y también mayor contenido de HFP a los 7 y 14 días de biodegradación, en tanto, el tratamiento 9 presentó la menor concentración de hidrocarburos con una concentración de 3775 mg HFP/kg suelo seco, así mismo, fue el de mayor producción de  $\text{CO}_2$ . La figura 33b muestra el diagrama de Pareto donde se muestran únicamente los factores (A-K) que son más significativos para la medición del contenido de HFP.



(a)

Hidrocarburos de fracción pesada HFP/kg suelo seco



(b)

Figura 33. (a) Estimación del contenido de HFP. (b) Diagrama de Pareto con los factores más significativos.

El análisis de varianza mostró los valores de  $R^2 = 94.5 \%$ ,  $R_{ajustada} = 89.46 \%$  y un error estándar = 1108, se observó que la mayoría de los nutrientes influyeron significativamente en la degradación de HFP. Una vez evaluadas las características fisicoquímicas del suelo se concluyó que el tipo y concentración de cada sal influyeron en la biodegradación de los hidrocarburos siendo el tratamiento 9 el que presentó una mejor respuesta a la degradación de los compuestos hidrocarbonados.

#### 4.3.1.7 Análisis del Coeficiente de Pearson

La Tabla 14 muestra el análisis estadístico del coeficiente de Pearson para identificar las correlaciones más fuertemente positivas de las variables de estudio, las cuales se encuentran entre la materia orgánica y la humedad, con 0.57477, lo que se podría interpretar como una correlación moderada entre estas dos variables; El *p* valor mostró que más de una correlación es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), como es entre la materia orgánica, la producción de CO<sub>2</sub> y con los HFP.

El valor en una correlación proporciona una idea de que tanto algunos parámetros se relacionan entre si al haber alteración por efecto de la biodegradación de los hidrocarburos,

sin embargo, depende mucho de la naturaleza de los experimentos que se realizaron, en algunos casos este valor de 0.57 puede ser bajo si es que se desarrolló bajo condiciones muy controladas para un solo compuesto y un solo microorganismo, en tanto para otros puede demostrar la validez de los experimentos ya debido al tipo de contaminante y las características fisicoquímicas del suelo es difícil predecir las rutas metabólicas que se llevarán a cabo el proceso de biodegradación. Se atribuyen estos valores a la cantidad de experimentos y a la variabilidad de los datos presentados, ya que los rangos de los valores en las diferentes variables oscilaban desde decimales hasta miles.

Tabla 14. Correlación de coeficientes de Pearson para las variables involucradas en el proceso de biodegradación de los HFP utilizando bioestimulación. Los valores en negritas son estadísticamente significativos por el *p valor*.

	Medios	CO <sub>2</sub>	Ph	Humedad	M.O.	C.E.	HTP
<b>Medios</b>	1.0000	-0.06357	<b>0.41539</b>	-0.16604	-0.08987	-0.18303	0.01160
<i>p valor</i>		0.5803	<b>0.0002</b>	0.1463	0.4339	0.1087	0.9197
<b>CO<sub>2</sub></b>	-0.06357	1.0000	-0.10467	-0.22224	<b>-0.34027</b>	-0.03435	-0.19677
<i>p valor</i>	0.5803		0.3617	0.0505	<b>0.0023</b>	0.7653	0.0842
<b>pH</b>	0.41539	-0.10467	1.0000	-0.21169	<b>-0.49777</b>	-0.30899	0.27374
<i>p valor</i>	0.0002	0.3617		0.0628	<b>&lt; .0001</b>	0.0059	0.0153
<b>Humedad</b>	0.16604	-0.22224	-0.21169	1.0000	<b>0.57477</b>	-0.08389	0.11205
<i>p valor</i>	0.1463	0.0505	0.0628		<b>&lt; .0001</b>	0.4652	0.3287
<b>M.O.</b>	-0.08987	-0.34027	-0.49777	0.57477	1.0000	-0.05901	0.27531
<i>p valor</i>	0.4339	0.0023	< .0001	< .0001		0.6078	0.0147
<b>C.E.</b>	-0.18303	-0.03435	<b>-0.30899</b>	-0.08389	-0.05901	1.0000	-0.39061
<i>p valor</i>	0.1087	0.7653	<b>0.0059</b>	0.4652	0.6078		0.0004
<b>HTP</b>	0.01160	-0.19677	0.27374	0.11205	0.27531	<b>-0.39061</b>	1.0000
<i>p valor</i>	0.9197	0.0842	0.0153	0.3287	0.0147	<b>0.0004</b>	

Estadísticamente se puede inferir una formulación óptima para el mejoramiento de las condiciones de la biodisponibilidad del suelo de Agua Dulce, en función a los valores de producción de CO<sub>2</sub> y disminución de HFP. El tratamiento 9 es el medio enriquecido que

optimiza los variables medidas durante el proceso de bioestimulación, además de remover la mayor cantidad de HFP.

### 4.3.2 Preparación del suelo contaminado

#### 4.3.2.1 Pruebas de biodegradación

Una vez identificado el consorcio microbiano con mayor potencial de biodegradación, que fue el obtenido de los microorganismos extraídos del suelo contaminado de la localidad de Agua Dulce, se establecieron las condiciones de operación a la cual se degradarían los hidrocarburos intemperizados en el suelo con mayor contenido de hidrocarburos, siendo el sitio de Agua Dulce el más contaminado.

#### 4.3.2.2 Análisis por espectrofotometría infrarrojo (FTIR)

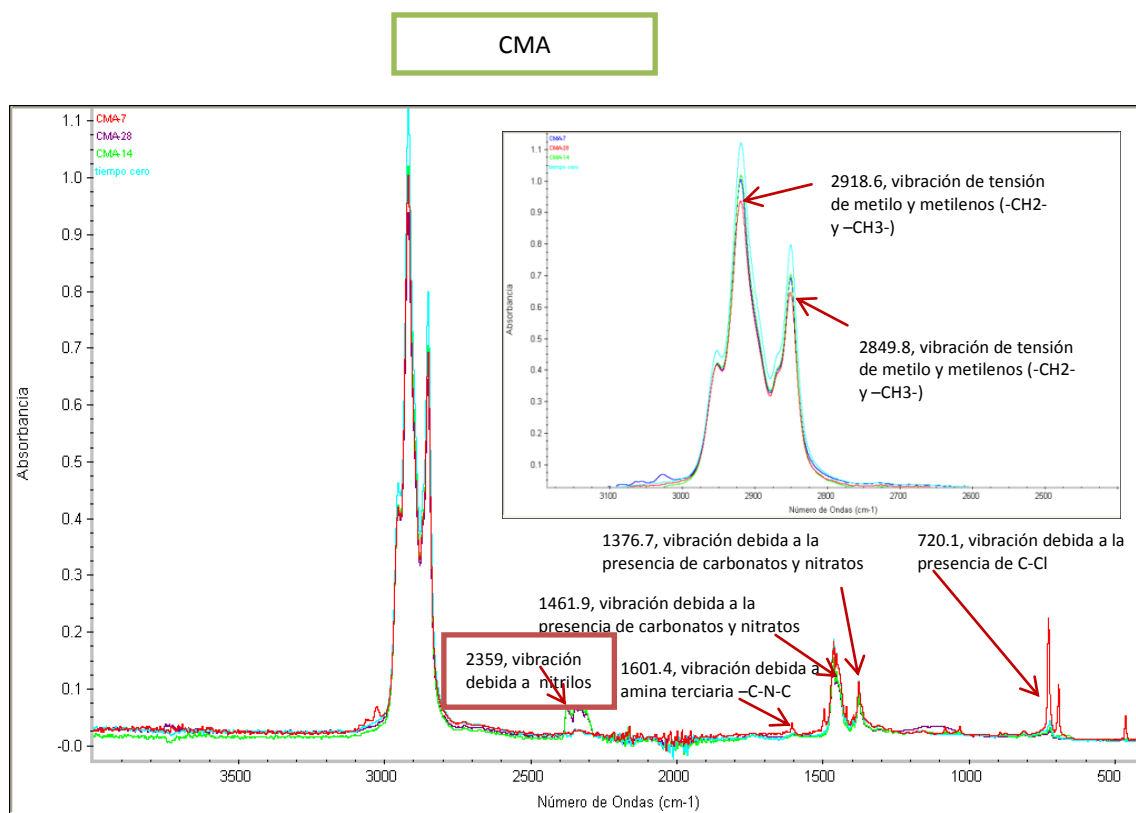


Figura 34. Análisis de HTPs por espectroscopia de Infrarrojo para CMA



Para el tratamiento CMA se observó diferentes bandas de tensión a los 0, 7, 14 y 28 días, al tiempo cero la principal banda de tensión con mayor absorbancia es de la fracción pesada, la cual es de enlaces C-H y ubicada en  $2918.6\text{cm}^{-1}$ , dicha banda disminuyó a los 7, 14 y 28 días, en tanto nuevas vibraciones de tensión debida a la presencia de carbonatos y nitratos han predominado con respecto al tiempo cero, así como las vibraciones de tensión debidas a la presencia de C-Cl y -C-N-C (Figura 34), las cuales son aún más predominantes con respecto a los demás tiempos, esto sugiere que al día 7 se desarrollaron diferentes productos intermedarios.

Mediante análisis FTIR se obtuvo un porcentaje de remoción de HTPs a los 28 días en los tratamientos CMA, GCMA y bioventeo de 62.8%, 65.8% y 47.15% respectivamente. El tratamiento GCMA mostró la mayor remoción de HTPs con respecto a los otros dos tratamientos. Los resultados indican una importante biodegradación de HTPs sin haber inhibición del crecimiento de bacterias y hongos hidrocarbonoclastas, no se observó un efecto negativo del glicerol.

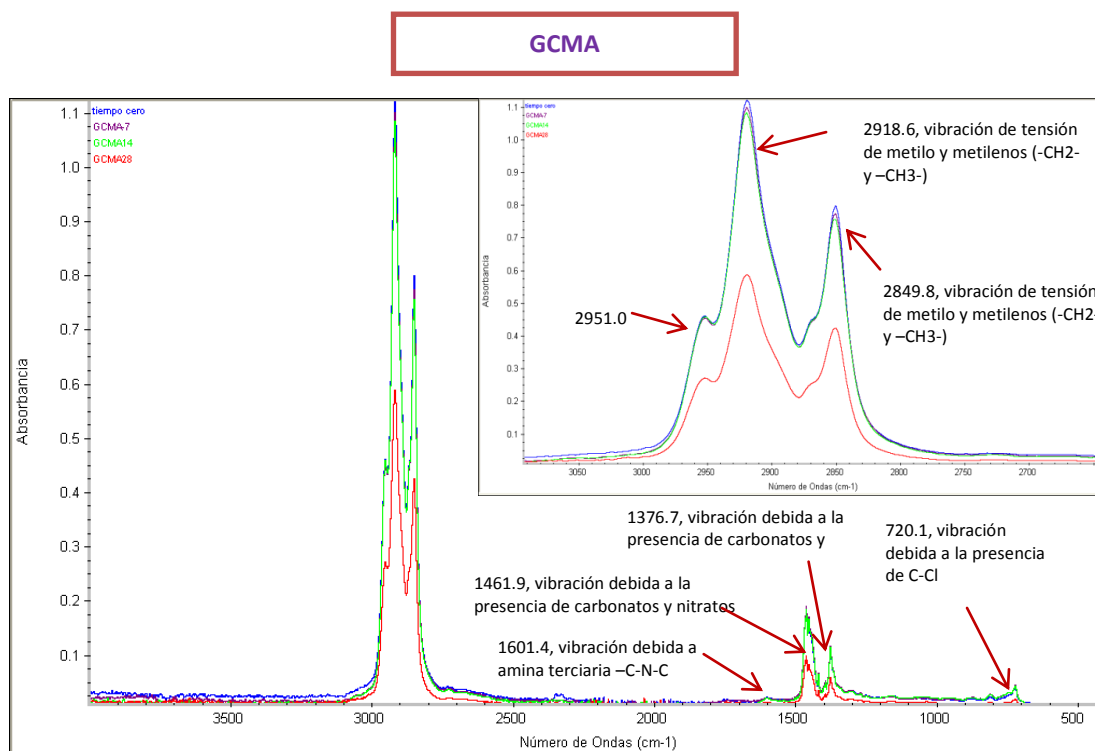


Figura 35. Análisis de HTPs por espectroscopia de Infrarrojo para GCMA

El tratamiento GCMA tiene mayor potencial de degradación empleando glicerol al 1% como co sustrato, así mismo la producción de diferentes compuestos intermediarios varia en un tratamiento a otro. En la Figura 35 se muestra el tratamiento (GCMA), dicho tratamiento GCMA al tiempo cero mostró una banda de tensión en  $2918\text{cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones de enlaces C-H que identifican a los compuestos alifáticos, en tanto a los 7, 14 y 28 días se observó dos principales bandas de tensión  $1480\text{cm}^{-1}$  y  $721.4\text{cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones de enlace de C-O y C-Cl respectivamente. La presencia de alcoholes primarios indica la biodegradación de hidrocarburos de mayor peso molecular. La banda de tensión C-Cl no estuvo presentes al tiempo cero, algunos autores les parece interesante la aparición de compuestos clorados durante el proceso de biodegradación al ser un subproducto, sin embargo, no lo han logrado interpretar a profundidad su presencia. Esto se puede relacionar a la existencia de un sin número de compuestos orgánicos o inorgánicos que se encuentran fuertemente adsorbidos a la matriz del suelo, entre los que se encuentran algunos metales traza provenientes de la roca madre, los cuales posteriormente pueden ser liberados a la fase libre y de esta manera logran ser identificados.

#### **4.3.2.3 Cuantificación de la fracción asfaltenica por espectrofotometría UV**

El tratamiento para la biodegradación de los hidrocarburos intemperizados presentes en el suelo del sitio de Agua Dulce se estudió a los 7, 14 y 28 días. Las condiciones del suelo para evaluar el potencial de biodegradación fue a 30% de humedad, temperatura ambiente, condiciones de oscuridad por análisis de espectrofotometría UV-visible e Infrarrojo:

- Para la realización de la curva de calibración para la posterior medición de la fracción asfaltenica se realizó a una  $\lambda = 408\text{ nm}$  empleando cinco concentraciones de crudo maya (previamente volatilizado a  $250^\circ\text{C}$ ): 0.4, 0.12, 0.08, 0.072 y 0.04 mg/mL y absorbancia 0.435, 0.135, 0.078, 0.072, 0.037, respectivamente, para lo cual se empleó hexano como solvente. La curva de calibración es la siguiente (Figura 36).

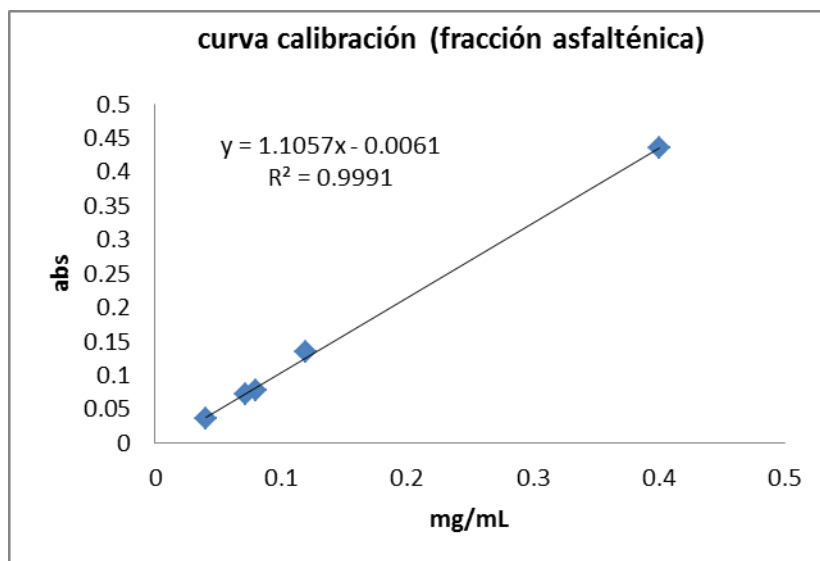


Figura 36. Curva de calibración de la fracción asfáltica a  $\lambda = 408$  nm por UV visible

A continuación se muestran los porcentajes de remoción de la fracción asfáltica para los tres tratamientos a los 0, 7 y 14 días de biodegradación, donde el mayor porcentaje de remoción se presentó dentro de los primeros 14 días de tratamiento (Tabla 15). Después de los 14 días ya no se observó mayor disminución de la concentración de fracción asfáltica.

Tabla 15. Porcentajes de remoción de fracción asfáltica de tres tratamientos CMA, GCMA y bioventeo

Tiempo (días)	CMA (Consortio microbiano)	GCMA (Consortio microbiano más glicerol)	Bioventeo
<b>% remoción</b>			
0	0	0	0
7	94.3	95.05	31.6
14	98.3	98.8	63.4
<b>% Remoción</b>	<b>98.3</b>	<b>98.8</b>	<b>63.4</b>

Los porcentajes de remoción de la fracción asfáltica a los 14 días de biodegradación para GCMA, CMA y bioventeo fueron de 98.8%, 98.3% y 63.4% respectivamente. La fracción

asfalténica está constituida por una gran densidad de compuestos poliaromáticos, por lo que las especies microbianas nativas presentes en el suelo contaminado y las adaptadas a la fracción pesada del crudo maya han logrado establecer un proceso de sinergia que permitió el rompimiento de estructuras complejas. Algunos autores han reportado una biodegradación eficiente de HAPs dentro de los 8 y 15 días por algunas especies de hongos que producen enzimas específicas (Armendáriz *et al.*, 2004).

Durante el tratamiento se encontró que la actividad microbiana en el suelo contaminado de Agua Dulce fue mejorada con la adición de un co sustrato (1% glicerol) favoreciendo reacciones cometabólicas que originaron la remoción de fracción asfalténica en un 98.8% (GCMA). Estudios realizados por Nascimento T. *et al.*, (2012) mostrarán que la adición adecuada de diferentes cosustratos entre los que se encontraba el glicerol era capaz de incrementar la degradación de algunos compuestos altamente persistentes como el criseno y el benzo(a)pireno hasta en un 50% por la presencia de un proceso cometabólico. La adición del glicerol, no presentó ningún efecto de inhibición, por el contrario promovió la transferencia de masa de la fase sólida a la fase líquida, haciendo biodisponibles los hidrocarburos intemperizados. El tratamiento CMA mostró una biodegradación de 98.3% de fracción asfalténica, en tanto para bioventeo fue de 63.4%, aunque esta última fue menor, algunos autores reportan que el venteo con un flujo bajo promueve la actividad microbiana e incluso donde la presencia de microorganismos es nula, desarrollando un ambiente aerobio en el suelo. Los tratamientos CMA y GCMA mostrarán una remoción eficiente de la fracción asfalténica con respecto a bioventeo, lo que significa que es factible que un consorcio microbiano contenga el suficiente potencial de biodegradación.

#### **4.3.2.4 Cuantificación de la actividad microbiana mediante la producción de CO<sub>2</sub>**

La producción de CO<sub>2</sub> para GCMA, CMA y bioventeo al día 28 fue de 291733, 20266 y 115200 mg CO<sub>2</sub>/kg suelo seco respectivamente, en tanto el control positivo presentó un valor 36 266 mgCO<sub>2</sub>/kg suelo seco, el control negativo no presentó ningún valor de CO<sub>2</sub>.

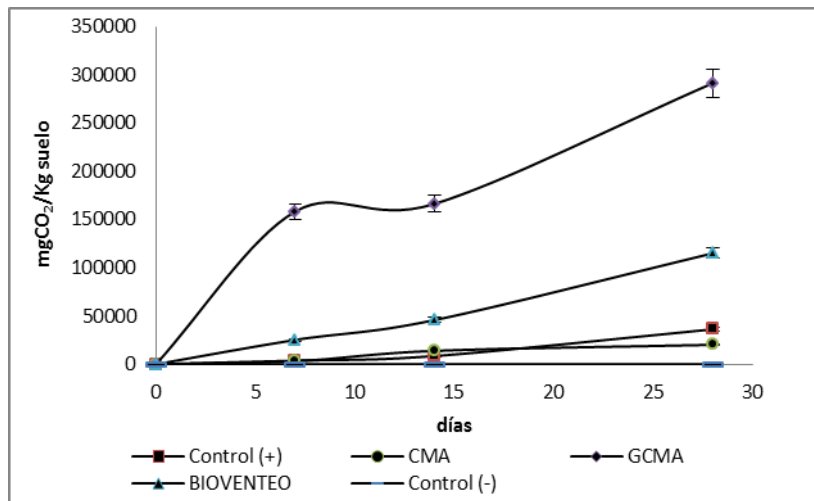


Figura 37. Actividad microbiana de cada tratamiento

El control positivo que corresponde al suelo contaminado sin ningún tratamiento, presenta mayor actividad microbiana con respecto al tratamiento CMA, lo que supone algún efecto de inhibición en el crecimiento y el consumo de la fuente de carbono (Figura 37).

El tratamiento GCMA mostró mayor actividad microbiana, la adición de una segunda fuente de carbono favoreció la cinética de degradación de los componentes orgánicos en el suelo, promoviendo el incremento de la densidad microbiana, lo que incrementó la velocidad de degradación y la mineralización de compuestos intermediarios (Ortiz *et al.*, 2006), algunos autores no sugieren la adición de otra fuente de carbono debido a efectos antagónicos, además que los microorganismos optarán por biodegradar el cosustrato en vez del hidrocarburo. Sin embargo en este estudio se asume que los subproductos de la degradación del glicerol pueden ser asimiladas por especies degradadoras de hidrocarburos y promover la biotransformación de los hidrocarburos persistentes.

#### 4.3.2.5 Determinación de parámetros fisicoquímicos del suelo tratado

Tabla 16. Alteración de las propiedades fisicoquímicas del suelo durante los 14 días de tratamiento. Se muestra las unidades que aumentó al final de la biodegradación

<b>Conductividad eléctrica (mS/cm)</b>			
	<b>día cero</b>	<b>día 14</b>	<b>Aumento</b>
Control (+)	0.11	0.35	0.24±0.1
GCMA	0.13	0.84	0.71±0.09
CMA	0.12	0.61	0.49±0.1
Bioventeo	0.1	0.4	0.3±0.09
<b>Ph</b>			
	<b>día cero</b>	<b>día 14</b>	<b>Aumento</b>
Control (+)	6.9	7	0.1±0.09
GCMA	7	8.1	1.1±0.09
CMA	6.8	7.1	0.3±0.08
Bioventeo	6.9	7.9	1±0.1
<b>Densidad aparente (g/cm<sup>3</sup>)</b>			
	<b>día cero</b>	<b>día 14</b>	<b>Aumento</b>
Control (+)	0.95	0.98	0.03±0.02
GCMA	0.96	1.21	0.25±0.1
CMA	0.94	0.99	0.05±0.02
Bioventeo	0.95	1.24	0.29±0.1

Un indicador de la eficiencia de remediación de un suelo es la modificación de las propiedades fisicoquímicas del suelo, por consiguiente se observó una alteración en el pH, CE y densidad aparente, esta última se relaciona directamente proporcional a la porosidad del suelo, en todos los casos las condiciones cambiaron significativamente con respecto al control.

El mayor aumento en la densidad aparente se observó en el tratamiento de bioventeo y el tratamiento GCMA, aunque bioventeo no mostró una significativa actividad microbiana y remoción de hidrocarburos, si influye de manera importante en el cambio de las propiedades fisicoquímicas del suelo, lo que favorecerá el establecimiento de microorganismos. Es importante profundizar en la adición de cosustratos ya que la complejidad del suelo puede interferir negativa o positivamente en la biodegradación de hidrocarburos.

#### 4.3.2.6 Cuantificación de hongos y bacterias en el suelo tratado

La velocidad de crecimiento bacteriano para CMA y GCMA fue de 0.18 y 0.42 respectivamente con una densidad bacteriana de  $5 \times 10^5$  UFC/g suelo seco y  $1.2 \times 10^{13}$  UFC/g suelo seco al día 28 (Figura 38).

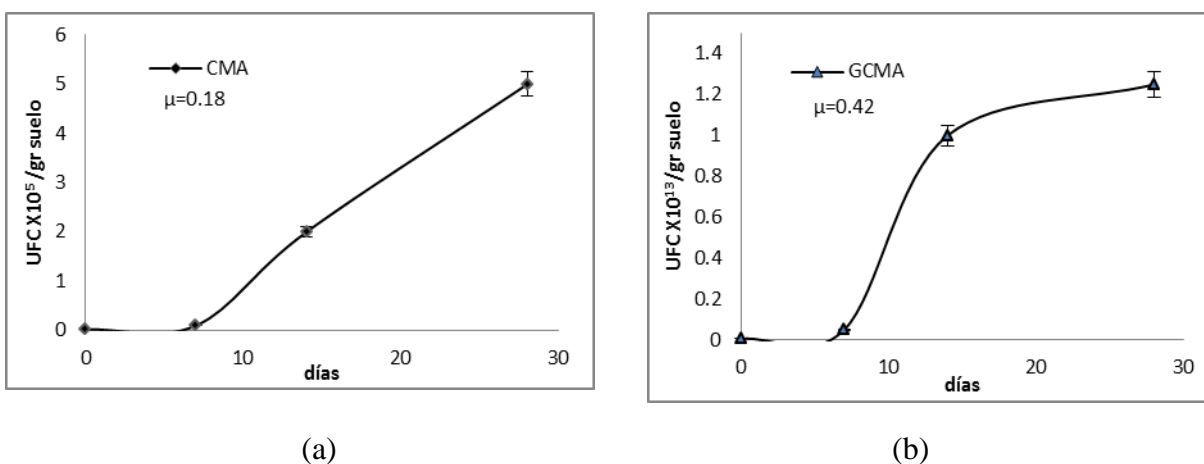
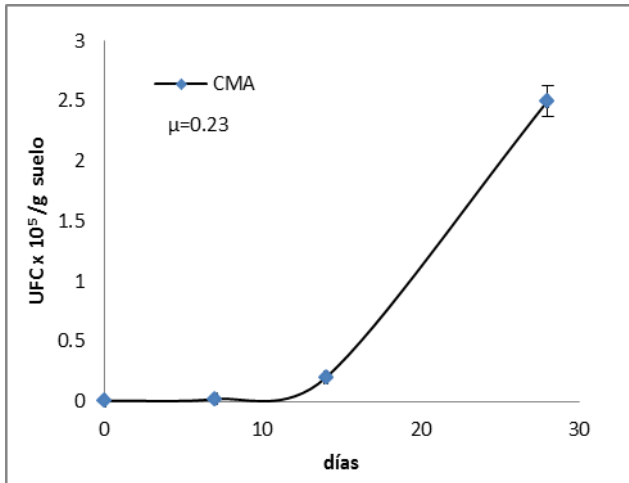
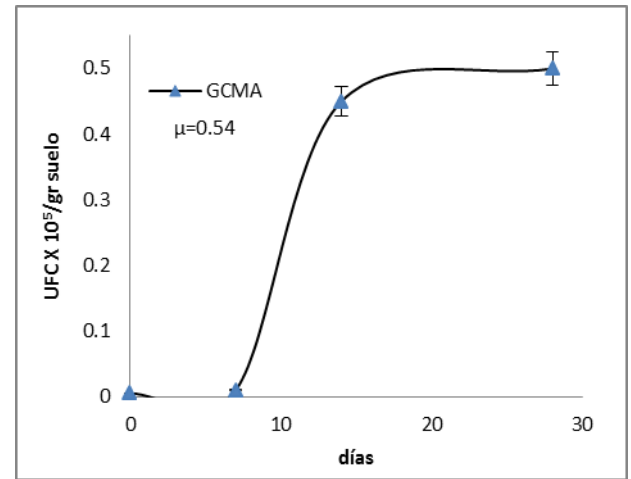


Figura 38. a) Crecimiento bacteriano del tratamiento CMA, b) crecimiento bacteriano del tratamiento GCMA

El tratamiento GCMA obtuvo el doble de la producción de bacterias con respecto al CMA, lo cual se correlaciona con la producción de  $\text{CO}_2$ , aunque algunos autores atribuyen el exceso de producción bacteriana al co sustrato por ser químicamente menos complejo que el contaminante en estudio, sin embargo, no todas las bacterias contienen el sistema enzimático apropiado para degradar los hidrocarburos químicamente complejos. En los resultados también se observó que la producción de hongos fue mayor para el tratamiento GCMA (Figura 39). En este estudio se encontró una directa correlación entre la biodegradación de los hidrocarburos intemperizados y el crecimiento microbiano, se asume que el incremento de la microbiota tiene una asociación directa con la disminución de los hidrocarburos persistentes.



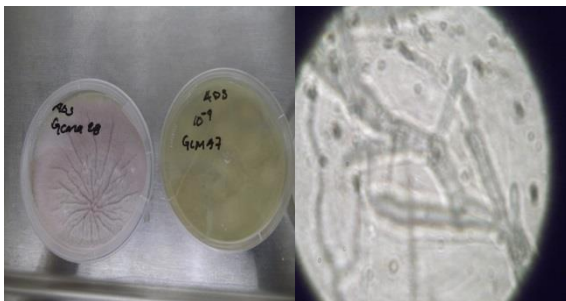
(a)



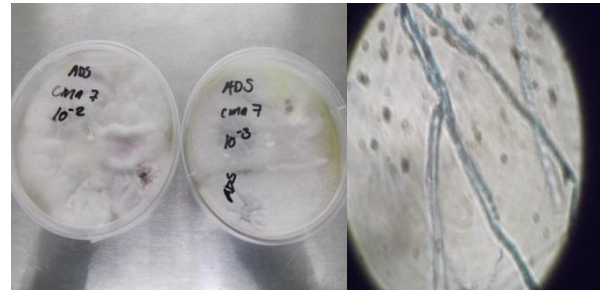
(b)

Figura 39. a) Crecimiento de hongos del tratamiento CMA, b) crecimiento de hongos del tratamiento GCMA

Después se estudiar la morfología de hongos de los tratamientos CMA y GCMA (Figura 40) se sugiere la presencia de diferentes especies hongos en cada tratamiento debido a la diferencia en pigmentación, tamaño, forma, en tanto a nivel microscópico también se observó diferencia en la forma de las hifas, esto pudo haber sido consecuencia del tipo de sustrato.



Morfología microscópica y macroscópica de los microorganismos GCMA



Morfología microscópica y macroscópica de los microorganismos CMA

Figura 40. Morfología de hongos CMA y GCMA

El estudio microscópico mostró que en tratamiento GCMA los hongos tienen un tipo de hifa septada mononucleada con micelio tabicado en tanto CMA los hongos tienen un tipo de hifa cenocítica o septada múltiple.



El establecimiento de especies tanto de hongos como de bacterias está asociado a las condiciones de operación del tratamiento de bioremediación, por lo tanto, para este experimento se atribuye que la capacidad para degradar los hidrocarburos está en función del tipo de especie microbiana, en otros trabajos se ha reportado que los hongos son los primeros microorganismos en llevar a cabo el desbladoblamiento de las cadenas de hidrocarburos, disminuyen la toxicidad de los compuestos, producen biosurfactantes que promueven la solubilización de los compuestos recalcitrantes y desarrollan subproductos que posteriormente las bacterias emplearan como co sustrato.

#### **4.4 Acoplamiento de bioestimulación, bioventeo y bioaumentación**

La Tabla 17, muestra los resultados obtenidos del análisis fisicoquímico realizado al suelo contaminado del sitio de Agua Dulce sobre el contenido de fracción pesada llevado a cabo en ambos experimentos, empleando los medios BH y MM. La mayoría de los experimentos que emplearon MM mostraron mayor remoción de los hidrocarburos en comparación con aquellos cuya fuente de minerales fue el medio BH, así mismo, el tratamiento MM alcanzó 43.2% de remoción.

También se observó que en los tratamientos con MM los valores de pH estuvieron cercanos a la neutralidad, también fue notorio el decremento del porcentaje de materia orgánica, el cual, está asociado a la disminución del contenido de hidrocarburos. La Tabla 17, muestra que todos los tratamientos que emplearon BH como medio enriquecido presentaron más del 13% de materia orgánica mientras que los tratamientos que usaron MM mostraron valores por abajo del 13%, por lo que dicha determinación puede ser considerada como un indicador indirecto de la remoción de compuestos hidrocarbonados, sin embargo, los resultados obtenidos de esta estimación deben ser comprobados con análisis adicionales para validar tal conclusión.

Tabla 17. Análisis fisicoquímico del contenido de fracción pesada en el suelo contaminado a los 14 días de biodegradación para los tratamientos a los que se encuentran con y sin adición de nutrientes.

Tratamiento con nutrientes	BH						MM					
	mg HFP/kg de suelo seco	% Remoción	% Materia orgánica	UFC x 10 <sup>5</sup> /g suelo seco	CE (μS/cm)	pH	mg HFP/kg suelo seco	% Remoción	% Materia orgánica	UFCx10 <sup>5</sup> /g suelo seco	CE (μS/cm)	pH
C1B1	38400	27.9	15.58	5	0.32	8	36131	32.1	11.475	6.87	0.84	7.32
C1B2	40295	24.3	14.18	4.23	1.05	8.5	41071	22.8	12.26	11.75	1.01	7.42
C2B3	33165	37.7	13.25	4.17	0.89	7.9	41958	21.2	12.95	8.12	0.5	7.32
C1B4	32700	38.6	14.79	3.75	1.02	8.2	30214	43.2	12.48	10.62	0.41	7.8

\*C1B1 (30% humedad + 210 L aire/hora + nutrientes), C1B2 (30% humedad + 80 L aire/hora + nutrientes), C2B3 (40% humedad + 80L aire/hora + nutrientes) y C1B4 (40% humedad + 210L aire/hora + nutrientes).

Por otro lado, la cuantificación de UFC representa el crecimiento bacteriano, siendo los hidrocarburos el sustrato limitante (Song and Katayama, 2010). Por consiguiente en este estudio la medición de UFC fue llevada a cabo para observar el crecimiento bacteriano y su correspondiente biodegradación de los hidrocarburos al inicio y después de 14 días de incubación. De acuerdo a esta estimación todos los tratamientos con BH mostraron un bajo contenido de UFC/g de suelo seco (entre  $3.7 \times 10^5$  UFC/g de suelo seco y  $5 \times 10^5$  UFC/g suelo seco) en comparación a los tratamientos con MM que presentaron valores entre  $6.9 \times 10^5$  UFC/g suelo seco y  $11.8 \times 10^5$  UFC/g suelo seco. Sin embargo es importante considerar que no todas las especies bacterianas cuentan con potencial de degradación, por lo que se sugiere realizar estudios posteriores que permitan conocer con precisión la funcionalidad de las bacterias, específicamente aquellas que tienen capacidad de biodegradar hidrocarburos. Los resultados mostraron la mayor densidad bacteriana para los

tratamientos C1B2 y C1B4 con MM con una contenido de  $11.8 \times 10^5$  UFC/g de suelo seco y  $10.6 \times 10^5$  UFC/g de suelo seco respectivamente.

Tabla 18. Análisis fisicoquímico del contenido de fracción pesada en los suelos contaminados a los 14 días de biodegradación para los tratamientos sin adición de nutrientes.

Tratamientos sin nutrientes	mg HFP/kg suelo seco	% Remoción	% Materia orgánica	UFC $\times 10^5$ /g dry soil	CE ( $\mu$ S/cm)	pH
C2B1	37211	30.0	14.875	9.37	0.455	7.855
C2B2	37337	29.8	13.17	1.1	0.525	7.655
C1B3	38639	27.4	12.795	6.96	0.55	7.755
C2B4	35662	33.0	13.14	2.66	0.49	7.65
Testigo	36060	32.2	18.12	0.006	0.9	8.2

La Tabla 18, presenta los resultados de los tratamientos sin adición de nutrientes, donde estos muestran un alto contenido de hidrocarburos, mayor porcentaje de materia orgánica, conductividad eléctrica y pH, que aquellos tratamientos a los que se les adicionó nutrientes. El contenido de UFC en el suelo testigo fue menor que en todos los tratamientos, lo que sugiere la importancia de introducir durante el tratamiento de un suelo, un consorcio microbiano adaptado a hidrocarburos altamente recalcitrantes, así como, la adición de una concentración de nutrientes adecuadas para promover la biodisponibilidad de los hidrocarburos intemperizados.

La biodegradación de los hidrocarburos de fracción pesada en el suelo testigo después de 14 días de incubación fue de 36 446 HFP/kg de suelo seco. Esta evidencia sugiere que existen microorganismos nativos con capacidad para degradar hidrocarburos intemperizados, siendo que al principio del tratamiento la concentración fue de  $55325 \pm 50$  mg HFP/kg de suelo seco, lo que representa un 65.87% de remoción de los hidrocarburos intemperizados. Se observó que la aplicación de un flujo óptimo de aire, así como el

contenido de humedad y nutrientes, pueden mejorar los procesos metabólicos de los microorganismos presentes en el suelo y permitir la degradación de los contaminantes.

#### 4.4.1 Identificación de hidrocarburos mediante análisis FTIR

Se realizó la comparación de la banda característica de los hidrocarburos de fracción pesada de los tratamientos al tiempo cero y a los 14 días de biodegradación. En las Figuras 41 y 42 se observa la absorbancia en la banda característica de la fracción pesada ( $2918.6\text{ cm}^{-1}$ ), del suelo testigo de 2.38, en tanto, el tratamiento C1B4 con MM (40% humedad + 80L de aire/h + nutrientes) se observó un decremento de 2.38 a 1.47, así mismo, otras bandas disminuyeron en intensidad como lo fueron los iones cloro ( $720.1\text{ cm}^{-1}$ ), carbonatos y nitratos ( $1376.7\text{ cm}^{-1}$ ).

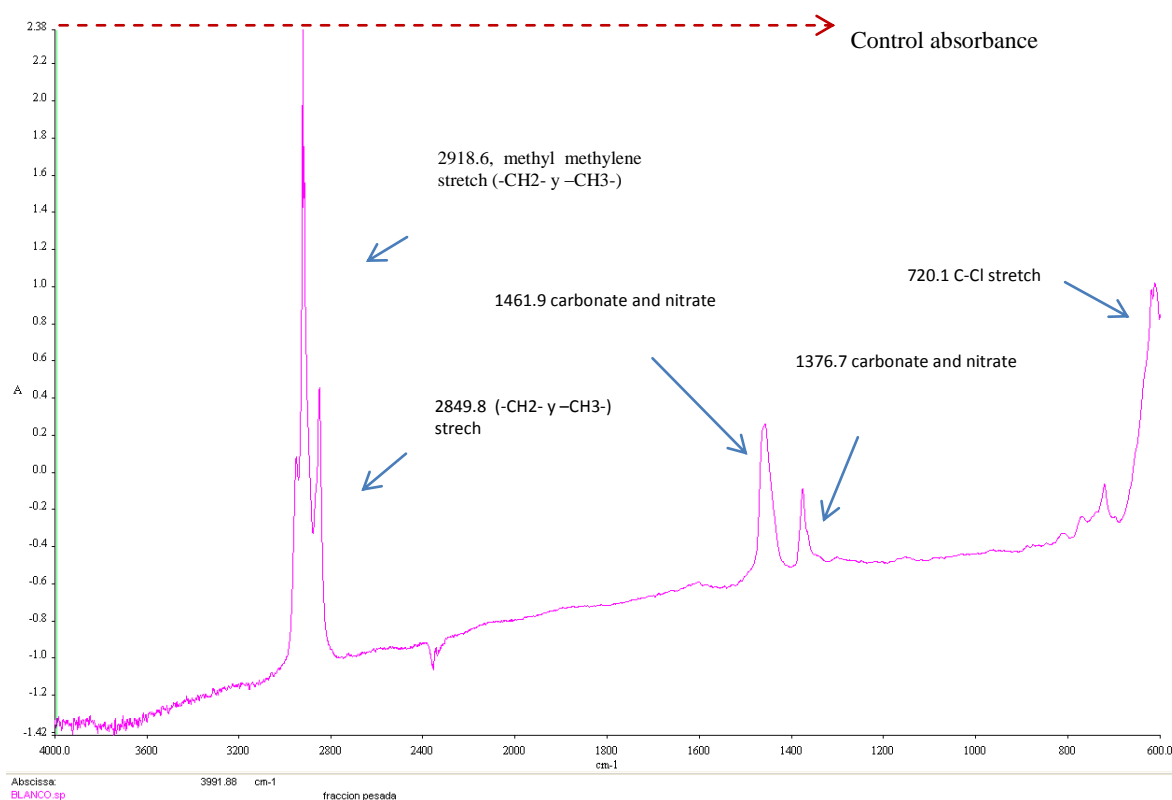


Figura 41. Análisis FTIR para el suelo testigo

La reducción de estos compuestos al final del periodo de tratamiento de las muestras contaminadas, está asociada al desarrollo de diferentes especies microbianas con el potencial de fraccionar los hidrocarburos intemperizados en productos más simples.

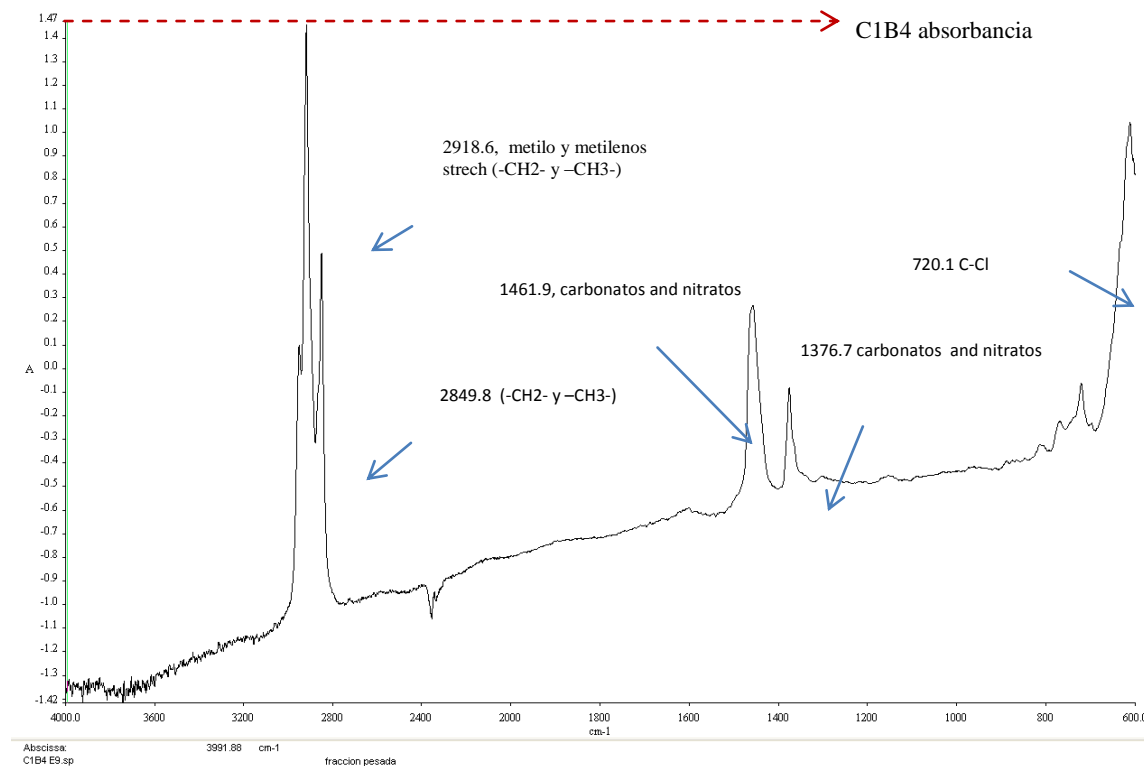


Figura 42. Análisis FTIR para C1B4 con MM

Durante el proceso de biodegradación la materia orgánica entre la que se encuentra la biomasa y compuestos hidrocarbonados tiende a ser degradada, por lo que en el resultado de la biodegradación se obtienen una cantidad de compuestos orgánicos simples entre los que figuran los ácidos grasos, ácidos carboxílicos, entre otros, en tanto, se genera mediante procesos de polimerización una cantidad de compuestos orgánicos que son químicamente complejos comúnmente llamada humus, así mismo, se produce otra cantidad de compuestos inorgánicos muchos de los cuales son aprovechados por los microorganismos. A partir de la biodegradación de compuestos orgánicos se han identificado compuestos inorgánicos se ha encontrado concentraciones importantes de compuestos clorados.

Miles Se ha reportado la existencia de miles de compuestos clorados, sin embargo, se requiere más estudios para identificar si dichos compuestos tienen características tóxicas o

bien si tiene algún beneficio en el metabolismo de los microorganismos degradadores de hidrocarburos.

La Figura 43 muestra el análisis FTIR del tratamiento C1B4 con BH como medio enriquecido, en donde se observa la alta concentración de hidrocarburos después de 14 días de biodegradación en contraste con el suelo testigo presentando una absorbancia de 2.50 a 2.38 respectivamente.

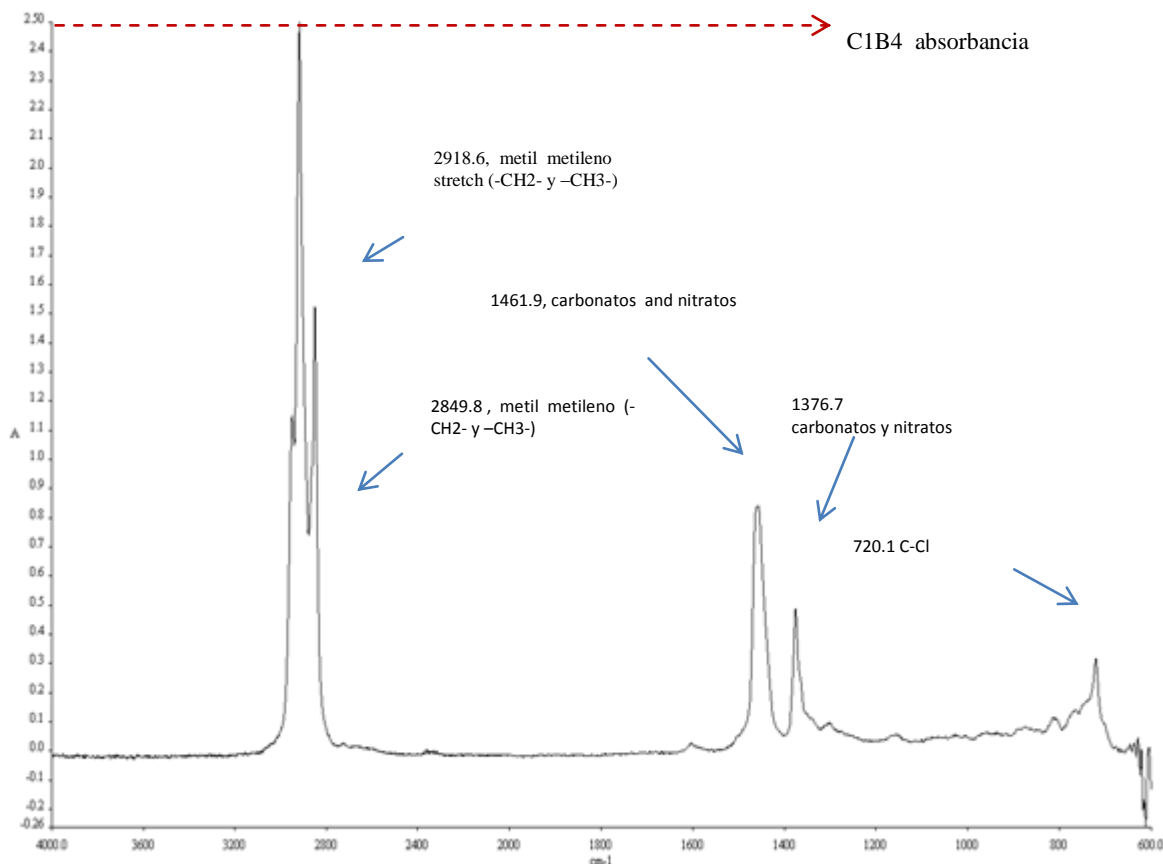


Figura 43. Análisis FTIR C1B4 con BH

A veces al final de la biodegradación las condiciones del suelo ocasionan la aparición de compuestos hidrocarbonados aún más recalcitrantes que el contaminante de origen, pero esto es común cuando las condiciones de operación no son controladas.

La producción de enzimas específicas mediante microorganismos hidrocarbonoclastas promueve la generación de ácidos grasos y alcoholes, entre otros compuestos no tóxicos que contribuyen a la biotransformación de compuestos recalcitrantes. Estos subproductos

influyen en la desorción y solubilización de hidrocarburos, así como, la transferencia de masa a través de matriz del suelo incluyendo aquellos minerales que se encuentran atrapados en la fracción mineral del suelo, los cuales pueden ser posteriormente asimilados por los microorganismos como fuente de energía. Por consiguiente, el control de los niveles de nutrientes, tal como el nitrógeno, tiene su influencia en el desarrollo de biosurfactantes mismos que promueven la degradación de hidrocarburos recalcitrantes (Tomei y Daugulis, 2013). La biodegradación de los hidrocarburos recalcitrantes se favorece, si durante el control de las condiciones de operación el crecimiento de protozoarios es inhibido ya que afectan el desarrollo de bacterias hidrocarbonoclastas. En este trabajo se observó que la adición de microorganismos adaptados a la fracción pesada del suelo no ocasiona efectos antagónicos a los microorganismos nativos del suelo, dado que estos fueron sometidos a condiciones de estrés al estar en contacto con altas concentraciones de crudo Maya, en este sentido los microorganismos logran desarrollar resistencia a compuestos metálicos contenidos en el crudo, así como otros compuestos tóxicos, siendo únicamente su fuente de carbono los hidrocarburos.

El control de humedad en el suelo también es determinante para alcanzar la mayor degradación, durante el proceso de biodegradación tiende a aumentar el porcentaje de ésta, debido a la producción de subproductos. En este estudio se observó que los tratamientos con 40% de humedad presentaron una mayor degradación de hidrocarburos, independientemente del medio enriquecido BH o MM adicionado aplicado al suelo, por consiguiente, el contenido de humedad en el suelo es un factor crítico para alcanzar la biodegradación de los contaminantes, lo que corresponde a lo reportado por otros autores (Camenzuli et al., 2015b).

Los resultados indican que el tratamiento C1B4 con las condiciones de operación de: 40% de humedad, 80Lde aire/h y la adición de nutrientes, influyen significativamente en la biodegradación de los hidrocarburos intemperizados, así mismo, la aplicación del medio enriquecido optimizado permiten maximizar la degradación de los hidrocarburos, ya que la mayor actividad microbiana se presenta cuando la microbiota cuenta con la cantidad mínima necesaria de nutrientes. Se reporta que los microorganismos pueden obtener nutrientes a partir de la fracción mineral del suelo o bien del material orgánico del suelo. Popoviciu *et al.*, (2014) encontraron que la adición de nitrógeno y fósforo en vez de

promover la actividad metabólica en el suelo contaminado, inhibió la biodegradación de los hidrocarburos poli aromáticos, otros autores (Syafuruddin, *et al.*, 2010) encontraron que la aplicación de macronutrientes al suelo contaminado inhibió el proceso de biodegradación, por lo tanto es crucial realizar la optimización de todos los parámetros de operación involucrados durante un trabajo de bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, sin embargo, el éxito de biodegradación está en función de la naturaleza de la microbiota, así como, de los hidrocarburos del suelo.

#### 4.5 Pruebas de toxicidad aguda del suelo

Los resultados de toxicidad empleando semillas de frijol mostraron un 75% de la germinación de las plantas en el tratamiento C1B3 empleando el medio nutritivo Bushnell Haas, en tanto no todos los tratamientos lograron elongación del tallo lo que supone que los hidrocarburos presentes en el suelo posterior al tratamiento son aún lo suficientemente hidrofóbicos para formar una película alrededor de la raíz que impide la entrada de agua provocado un estrés hídrico que afecta algunas etapas de su crecimiento. A diferencia del blanco (suelo no contaminado) la germinación de la semilla tardó 5 días más, lo que las hizo ser vulnerables a las sustancias tóxicas (Figura 44).



Figura 44. Respuesta de fitotoxicidad de las semillas de frijol de los tratamientos del suelo

La inhibición de la germinación son indicadores de la toxicidad de los hidrocarburos. El crecimiento de las plantas puede ser inhibido por la exposición a concentraciones mayores o iguales a 40000mg HTP/kg suelo, mientras que concentraciones inferiores a 5000mg/kg



suelo normalmente no causan efectos dañinos en el crecimiento vegetal (Kulakow, 2000). En este estudio se observó un comportamiento diferente en la exposición de semillas en el suelo tratado a los 7, 14 y 28 días, en tiempo 7 se observó un un crecimiento del tallo, sin embargo, para la mayoría de los casos este disminuyo lo que se atribuyó a la producción de metabolitos que resultaron ser tóxicos para la planta. La activación de la semilla es inhibida ante la presencia de sustancias tóxicas, que afectan su germinación, por otro lado al emplear la formulación de nutrientes, el tratamiento 9, son se observó inhibición del crecimiento de la plántula. En la tabla 18 se muestra los tratamientos que respondieron positivamente a la exposición del suelo con hidrocarburos intemperizados.

Tabla 18. Prueba directa de toxicidad. Evaluación del crecimiento de las semillas de frijol en los tiempos 7 y 14 días de biodegradación.

<b>Tratamiento</b>	<b>Germinación</b>	<b>Elongación del tallo (cm)</b>	<b>Índice de fitotoxicidad (%)</b>
Blanco	+	32	
C1B1T7	+	24	-33.3
C1B1T14	+	Nd	-
C1B1T28	+	8	-300
C1B2T7	+	8	-300
C1B2T14	+	2	93.75
C1B2T28	+	6	-433
C2B2T14	+	Nd	-
C1B3T7	+	3	90.67
C1B3T28	+	4	87.5
C1B4T14 +BH	+	Nd	-
C1B4T14+E9	+	4	87.5

## 5. CONCLUSIONES

Se concluye que para lograr la degradación de los hidrocarburos se requiere la aplicación de dos o más tecnologías, ya que por la complejidad química de los hidrocarburos intemperizados no es posible implementar una sola tecnología. La cinética de crecimiento de los microorganismos inoculados del suelo de Agua Dulce presentaron mayor densidad bacteriana de  $1.2 \times 10^8$  UFC/mL con respecto al inóculo de Estero de Pantano que alcanzó  $7 \times 10^7$  UFC/mL. Las cepas bacterianas más predominantes al comienzo de la degradación para Agua Dulce y en menor proporción para Estero de Pantano fueron: *Pseudomonas salispermis* AS 1.3801 (94%), *Pseudomonas citronellois* DSM 50332 (98%). Las colonias formadas para ambos inóculos variaron en abundancia y en morfología, se asume el incremento de la densidad microbiana en Agua Dulce se debe a la presencia de levaduras y hongos que actúan como un vector de movimiento de bacterias mejorando el área de superficie en el medio y promoviendo un mayor crecimiento de bacterias.

El acoplamiento de las tecnologías de bioaugmentación, bioestimulación y bioventeo mostraron ser una alternativa para la remediación del suelo de Agua Dulce contaminado con hidrocarburos intemperizados debido a su factibilidad y poca perturbación al suelo.

Se identificaron las sales minerales que son limitante en el desarrollo de los procesos metabólicos de microorganismos hidrocarbonoclastas mediante el diseño de Plackett-Burman se optimizó un medio mínimo nutritivo con el tipo y concentración de nutrientes para que los microorganismos lleven a cabo la máxima biodegradación de hidrocarburos.

Durante el estudio de la degradación de los hidrocarburos se observó un cambio de las propiedades del suelo y se encontró una estrecha correlación entre algunas variables: materia orgánica, actividad microbiana, el cambio en el pH y conductividad eléctrica. El acoplamiento de bioestimulación y bioventeo en conjunto con la aplicación de un consorcio microbiano incrementó la capacidad de biodegradación de los hidrocarburos intemperizados presentes en el suelo de Agua Dulce. La materia orgánica es un método indirecto para estimar la degradación de los hidrocarburos, los resultados mostraron una reducción del porcentaje de materia orgánica del  $18\% \pm 0.5$  hasta un  $11\% \pm 0.5$ , el pH cambió en un orden de dos unidades en los diferentes en los tratamientos del acoplamiento lo que beneficia los procesos metabólicos, sin embargo, se debe estudiar a fondo la relación del

pH con los subproductos generados ya que existe la desventaja de crear condiciones tóxicas e inhibir la degradación de los hidrocarburos.

El ensayo para medir la toxicidad aguda en el suelo es un método directo para determinar la eficiencia de los tratamientos. La germinación fue positiva e incluso en tratamientos que presentaron concentraciones altas de hidrocarburos, sin embargo, en estos tratamientos se redujeron crecimiento, longitud de la raíz, biomasa y número de nódulos en las plántulas.

Como perspectiva se recomienda realizar un escalamiento de la tecnología no mayor del 20% para mantener la eficiencia de operación y estudiar los aspectos antes mencionados, como lo es el tipo de microorganismo establecido en el acoplamiento lo que permitirá distinguir el mecanismo metabólico.

## 6. ANEXOS

### Anexo 1. Tecnologías de remediación implementadas en la eliminación de hidrocarburos en zonas costeras

Autor	Proceso	Condiciones experimentales	Concentración mg/g	Nutrientes	PH	Textura	Ecosistema	Crudo	% Remoción
Quianxin 2009	Fitoremediación	Laboratorio	640	Alto	7		Suelos pantanosos	HP	97
Merkel, 2004	Fitoremediación	Laboratorio	5000	Medio	5.9	franco arenoso	zonas costeras	crudo pesado	85
Fariás, 2008	Atenuación natural	Piloto	2.4	Medio	6.93	Arenoso	zonas costeras	PAH	70
García Blanco, 2006	Bioestimulación	Piloto	35000	Alto	7		Suelos pantanosos	crudo ligero	93
Mark A., 2003	Atenuación natural	Laboratorio	0.26	Alto	7		zona de manglares	crudo ligero	95
Tam, 2008	Bioaumentación	Microcosmos	0.00017	Medio	6.67	Arenoso	zona de manglares	PAH	74
Moreira, 2012	Fitoremediación	Piloto	33	Medio	7	franco arenoso	zona de manglares	HP	87
Vega, 2009	Atenuación natural	Laboratorio	298500	Medio	7.3	arcillo arenoso	Suelos pantanosos	PAH	85
Yu y col., 2005	Atenuación natural	Laboratorio	0.00332	Alto	7.24	arcillo limoso	zona de manglares	PAH	95
Armendáriz, 2004	Bioaumentación	Microcosmos	65000	Alto	7.3	franco arenoso	Suelos pantanosos	crudo ligero	78
Mancera, 2008	Bioaumentación	Laboratorio	60600	Alto	7	Franco limoso	Suelos pantanosos	PAH	70
Rivera- Hernández, 2011	Bioaumentación	Microcosmos	345000	Alto	8		zonas costeras	crudo ligero	80
Rivera-Cruz, 2002	Bioestimulación	Laboratorio	322841	Alto	6.2	arcillo arenoso	zonas costeras	crudo pesado	90
Ojeda- Morales,	Bioestimulación	Laboratorio	70000	Alto	6.95	arcillo limoso	zonas costeras	crudo ligero	75

2012									
Ke y col., 2003	Fitoremediación	Microcosmos	0.0003	Bajo	7.48	Arenoso	zona de manglares	PAH	92
Quianxin Lin 1998	Fitoremediación	Laboratorio	250	Alto	6.01		Suelos pantanosos	crudo pesado	58
Österreicher	Bioventeo	Laboratorio	80000	Bajo	7	Arenoso	zonas costeras	BTEX	

Anexo 2. Especies de microorganismos capaces de degradar hidrocarburos intemperizados en suelos costeros

Genero	Compuesto orgánico	Ambiente	Producción de Biosurfactante	Referencia
Achromobacter spp	Pireno	Sedimentos de mar	Lipopeptidos proline	Wang et. Al (2008),
Alcaligenes eutrophus	Antraceno	Suelo tropical	Rhamnolipidos	Hori and Amund (2000)
Alcanivoras spp	Pireno	Sedimentos de mar	Glucolipidos	Wang e. al (2008)
Bacillus sp	Naftaleno, fluoreno, fenantreno, pireno, criseno, 1,2 benzopireno	Suelo tropical	Lipopeptidos : surfactin, fengycin, lichensyn, iturin, pumilacidin, bacillomycin	Hori and Amund (2000); Vater y col., 2002
Burkholderia sp	Antraceno	Suelo acido	Rhamnolipidos	Somtrakoon et. Al (2008)
Corynebacterium lepus	PAH	Suelo tropical	Acidos grasos	Amezcu-Vega y col., 2007
Cycloclasticus sp	Naftaleno, dibenzopireno, fenantreno	Sedimentos de manglares	Rhamnolipidos	Kasai et. Al (2008)
Gordonia	Fluoranteno	Sedimentos de manglares	Lipopeptidos	Brito et. Al. 2006

Marinobacter sp.	Pireno	Sedimentos de manglares	Rhamnolípidos	Brito et. Al. (2006)
Micrococcus luteus	Antraceno	Suelo tropical	Rhamnolípidos	Hori and Amund (2000)
Nocardia amarae	PAH	Suelo tropical	Ácidos grasos	Amezcu-Vega y col., 2007
Pseudomona aeruginosa	Antraceno	Suelo tropical	Rhamnolípidos	Hori and Amund (2000)
Torulopsis bombicola	PAH	Suelo tropical	Ácidos grasos	Amezcu-Vega y col., 2007
Absidia cylindrospora	PAH	Sedimentos de manglares	Polisacáridos	Giraud et. Al., (2001),
Phanerochaete spp	PAH	Suelo tropical	Polisacáridos	Boonchan S. y col., 2000

Anexo 3. Subproductos obtenidos de la degradación de fracción pesada del inóculo proveniente del suelo de Agua Dulce

Tiempo de	Compuesto	Agua dulce tiempo	Agua dulce tiempo
8.97	4-hidroxi-4 metil-2-	14.42	33.45
11.70	2-bitoxi-etanol	4.76	9.90
22.406	2,6-dimetil-undecane	ND	4.36
24.10	3-metil-nonane (C10H22)	ND	5.42
26.92	Tridecano (C13H28)	1.51	7.61
29.11	Tetradecano (C14H30)	1.72	6.02
30.102	Pentadecano (C15H32)	2.12	ND
32.484	Hexadecano (C16H34)	4.83	2.64
33.556	2-metil-pentadecano	4.18	10.54
34.750	Heptadecano (C17H36)	5.56	ND
34.815	2,6,10-trimetil-tetradecano	3.80	9,37
36.899	Octadecano (C17H38)	5.6	ND

37.025	2,6,10,14-tetrametil-	6.32	10.69
38.948	Nonadecano (C19H40)	4.95	ND
40.899	Eicosano	5.04	ND
42.767	Heneicosano (C21H40)	4.24	ND
44.556	Docosane (C22H46)	4.19	ND
46.272	Tricosano (C23H48)	3.63	ND
47.922	Tetracosano (C24H50)	4.04	ND
49.503	Pentacosano (C25H52)	4.25	ND
51.028	Hexacosano (C26H54)	3.48	ND
52.499	Heptacosano (C27H56)	3.78	ND
53.914	Octacosano (C28H58)	2.76	ND
55.283	3-etil-5(2 etilbutil)-	2.24	ND
56.614	Pentatriaconteno	2.56	ND

Anexo 4.

Tiempo de retención (min)	Compuesto	EP cero horas (%)	EP 24 horas (%)
11.499	2,3-Dimetil-1-butanol	2.406	ND
26.737	2,3,7-Trimetil octano	ND	4.162
27.997	3-Etil-2-metil heptano	ND	2.799
29.590	2,6,10-Trimetil dodecano	2.195	9.159
30.991	1,6-Dimetil naftaleno	1.667	ND
31.089	2,6-Dimetil naftaleno	2.666	ND
31.793	2-Metil decano	ND	7.826
32.264	3-Metil decano	1.137	ND
32.280	6-Etil-metil octano	ND	3.905
33.668	1,6,7-Trimetil naftaleno	5.924	ND
33.788	2,3,6-Trimetil naftaleno	14.033	ND
36.269	2,6-Dimetil undecano	ND	6.048
37.552	2,6,10,14-Trimetil pentadecano	7.458	10.908
39.320	2-(1,1-Dimetiletil)-4-(1-metil-Fenil etil)-	ND	9.190

	fenol		
39.784	Nonadecano	29.704	18.253
41.147	3-Metil dibenzotiofeno	17.374	ND
41.468	5-(hexadecil-oxipentanodecil, cis-1,3-dioxano)	ND	15.148
43.550	2,3-Dimetildecano	4.313	ND
44.125	4-(hidroxi-3-metilfenil) fenilpentanona	ND	15.148
45.071	9-Hexil heptadecano	3.849	ND
47.930	5,8 Dietil dodecano	7.274	ND



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abuzinada A.H., Barth H., Krupp F., Böer B., Abdessalaam T.Z. (2008). Protecting the Gulf's Marine Ecosystems from Pollution. Birkhäuser Verlag AG, Basel-Boston-Berlin. ISBN 978-3-7643-7946-9.
- Acar Y.B. y Alshawabkeh A.N. (1996). Electrokinetic remediation. I: Pilot-scale tests with lead-spiked kaolinite. *J. Geotech. Geoenviron.* 122, 173-185.
- Adams R.H.S., Domínguez I.T.R., García L.H. (1999). Potencial de la bioremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra.* 17, 2.
- Adams R.H., Zavala-Cruz Joel, Morales-García Fernando. (2008). Concentración residual de hidrocarburos en el suelo del trópico. II. Afectación a la fertilidad y su recuperación. *Interciencia.* Vol. 33 No. 7.
- Aleman C.A. (2009). Determinación de hidrocarburos totales del petróleo en suelos y sedimentos de la cuenca del río Coatzacoalcos. Tesis. Universidad Veracruzana. Facultad de ciencias químicas. Pp72.
- Anderson JPE. 1982. Soil respiration. In: Page AL, Miller RH, Keeney DR, editors. *Methods of soil analysis. Part II. Chemical and microbiological properties*, 2nd ed. Agronomy 9/2. Madison, WI: American Society of Agronomy 871pp.
- Armendáriz P., Loera-Corral O., Fernández-Linares L., Esparza-García F. y Rodríguez Vázquez R. (2004). Biostimulation of micro-organisms from sugarcane bagasse pith for the removal of weathered hydrocarbon from soil. *Letters in applied microbiology.* 38, 372-377.
- Armendariz P. B., Martínez-Carrera D., Calixto-Mosqueda M., Alba J., Rodríguez-Vázquez R. (2010). Filamentous fungi remove weathered hydrocarbons from polluted soil of tropical México. *Rev. int. Contam. Ambie.* 26(3) 193-199.
- Arrieta R.O. (2011). Evaluación de la influencia del bioestimulo sobre un suelo contaminado con diesel y su integración a la gestión ambiental. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Medellín Colombia.
- Arroyo M., Quesada, J. (2004). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. Geocisa. División de Protección Ambiental; Guadalajara-México.

- Arvin E, Jensen B.K. y Gundersen A.T. (1989). Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. *Appl Environ Microb.* 55, 3221–3225.
- Asish K.P., Bhavanath Jha. (2010). Salt tolerance mechanisms in mangroves: a review. *Trees* 24:199-217.
- Atlas R. and Bartha. (1987). *Microbial ecology: fundamentals and applications.* (2a. ed.) The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California.
- Baldrian P. (2003). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and microbial technology.* 32, 78-91.
- Beltrán, J.E. 1993. Los impactos del petróleo. *In: Tabasco: Realidad y perspectivas.* Gobierno del Estado de Tabasco. Villahermosa.
- Biancotto V, Minerdi D, Perotto S and Bonfante P (1996) Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasma.* 193:121-131.
- Boonchan S., Margaret L.B., Grant A.S., (2000). Degradation and mineralization of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and environmental microbiology.* Vol 66, p. 1007-1019.
- Bouchard, D. C., Enfield, C. G., and Piwoni, M. D. (1989). Transport processes involving organic chemicals. **In:** *Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils.* Special Publication No. 22. Madison, WI, Soil Science Society of America and American Society of Agronomy.
- Bouyoucos G.J.(1962). Hydrometer method improved for making particle size analysis of soil. *Agron.J.*, 54: 464-465.
- Boyd S.A. and Sun S. (1990). Residual and polychlorobiphenyl oils as sorptive phases for organic contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 24:142-144.
- Branco, S.M., (1984). *Limnología sanitaria, estudio de la polución de aguas continentales.* Monografía científica No 28, serie Biología, OEA. pp 119.
- Calamari, D. 1993. *Chemical Exposure Predictions.* Lewis Publishers Inc, Chelsea.
- Camenzuli D. & Freidman B.L. (2015). On-site and in-situ remediation technologies applicable to petroleum hydrocarbon contaminated sites in antartic and Artic. *Polar Research/Review article.* 34, 24492, <http://dx.doi.org/10.3402/polar.v34.24492>.

- Cerniglia, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, 1992, 3:351-368.
- Chávez-Gómez B., Quintero R., Esparza-García F., Mesta-Horward A.M. Zavala Díaz de la Serna F.J., Hernández-Rodríguez C.H., Gillén T., Poggi-Varaldo H.M., Cortés-Barrera J. (2003). Removal phenanthrene from soil by co-cultures of bacteria and fungi pregrown on sugarcane bagasse pith. *Bioresour Technol.* 89(2), 177-83.
- Chen G., Strevett K.A., Vanegas B.A., (2001). Naphthalene, phenanthrene and surfactant biodegradation. *Biodegradation* 12, 433-442.
- Chrzanowski L, Kaczorek E and Olszanowsk (2006) The ability of Candida Maltosa for hydrocarbon and emulsified hydrocarbon degradation. Pol Environ Stud 15: 47-51.*
- Christopher W and Christopher L (2004) Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Applied Environmental Microbiology* 7:1777-1785.
- Cookson J. (1995). Análisis y evaluación de los parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos. Graw-Hill. Pp 359-342.
- Cooper D. and Goldenberg B.G. (1987). Surface active agents from two bacillus species. *Applied and environmental microbiology.* P 224-229.
- Cuevas Díaz M.C., Espinoza Pérez G., Llizaliturri Hernández C.A., Mendoza Cantú A.(2012). Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. pp 87.
- D'Annibale A., Marika Ricci, Vanessa Leonardi, Daniele Quaratino, Enrico Mincione, Maurizio Petruccioli. (2004). Degradation of Aromatic Hydrocarbons by White-Rot Fungi in a Historically Contaminated Soil. *Biotechnol Bioeng.* 90, 6.
- Das P, Mukherjee S and Sen R (2008) Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chem* 72(9), 1229-1234.
- Das Palashpriya Luyan Z. Ma. (2013). Pyocyanin pigment assisting biosurfactant-mediated hydrocarbon emulsification. International Biodeterioration & Biodegradation.
- De Lorenzo V. (2008). Systems biology approaches to bioremediation. *Curr Opin Biotechnol* 19:579-589.doi:10.1016/j.copbio 208.10.004.

- Diallo, M.; Cagin, T.; Faulon, J. y Goddard W. Thermodynamic properties of asphaltenes: a predictive approach based on computer assisted structure elucidation and atomistic simulation. En Petroleum Sciences Series, Yen T y Chilingirian G., Eds.; Elsevier Science Amsterdam, 2000. pp. 103-127.
- Días R.L., Ruberto L., Hernández E., Vázquez S.C., Lo Balbo A., Del Panno M. T., Marc Cormack W. P. (2012). Bioremediation of an aged diesel oil-contaminated antarctic soil: Evaluation of the “on site” bioestimulation strategy using different nutrient sources. *Int Biodeter Biodegr.* 75, 96-103.
- DOF (2012). Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2003. Límites Máximos permisibles de hidrocarburos en suelos contaminados en suelos y lineamientos para muestreo y la remediación. Diario Oficial de la Federación. 10 de Septiembre del 2013.
- DOF 2012. NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Segunda sección
- Erickson D., Loehr R., Neuhauser E. (1993). PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soil. *Water Research* 27, 911-919.
- Fall, R., Brown, J. and Schaffer, T. (1979) ‘Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbon by *Pseudomonas citronellolis*’ *Applied Environment Microbiology*, Vol. 38, pp. 715-722.
- Faisal I. K.; Thir H.; Ramzi H. (2004). An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management* 71(2004) 95-122.
- Garapati Vamsi Krishna (2012). Biodegradation of petroleum hydrocarbons. Thesis. Department of chemical engineering national institute of technology. Rourkela Odisha. La India.
- García A.M.C (2012). Rehabilitación de un suelo con bajo perfil de nutrientes aplicando biosólidos como fertilizante. Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México, 189 pp.
- García-Rivero M. (2003). Transferencia de masa y biodegradación de hidrocarburos de un suelo intemperizado en un cultivo de suelo en suspensión. Tesis. Universidad Autónoma Metropolitana.

- Gargouri, B., Mhiri, N., Karray, F., Aloui, F. and Sayadi, S. (2015) 'Isolation and Characterization of Hydrocarbon-Degrading Yeast Strains from Petroleum t929424, pp.11.
- Gros J., Reddy C.M., Aeppli C., Nelson R., Carmichael C.A. and Arey A.S. (2014). Resolving biodegradation patterns of persistent saturated hydrocarbons in weathered oil samples from the deepwater horizon disaster. *Environmental science&tecnology*. 48(3), 1628-1637.
- Hernández-Rivera M.A., Ojeda-Morales M.E., Martínez – Vázquez J.G., Villegas-Comello V.M. and Córdova-Bautista. (2011). Optimal parameters for *In Vitro* development of the hydrocarbonoclastic microorganism *Proteus sp.* *Journal soil science plant nutrition*. 11 (1).
- Hernández J., Orihuela D., Pérez-Mohedano S., Marijuan L., Furet N., Madrid E. H.-T. S. y Cuba I. (2003). Efecto de la modificación del pH sobre la lixiviación de cationes en columnas de suelos calizos. *Estudios de la Zona no Saturada del Suelo* 6, 99-104.
- Holguin G., Vazquez P., Bashan Y., (2001). The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biology, Fertility and Soils* 33, 265-278.
- Huesemann M. y Moore K. (1993). Composition changes during landfarming of weathered Michigan crude oil-contaminated soil. *J. Soil Contamination*. 2: 245-264.
- Jiménez V., Ricardo G., Cuevas-Díaz M., (2013). Development of an alternative technology for the remediation of coastal soils contaminated with weathered hydrocarbons by coupling conventional remediation technology. Paper presented at the 22nd. International Conference on Production Research (ICPR).
- Ke L., Wang W.Q., Wong T. W.Y., Wong Y.S. Tam N.F.Y., (2003). Removal of pyrene from contaminated sediments by mangrove microcosms. *Chemosphere* 51 (2003). 25-34.
- Kenna M, and Heath R (1976) Biodegradation of polynuclear aromatic hydrocarbon pollutants by soil and water microorganisms. WRC research report No. 113.
- Kulakow P.A., Schwab A.P., Banks M.K. (2000). Screening plant species for growth on weathered, petroleum hydrocarbon-contaminated sediments. *International Journal of phytoremediation*. 2(4):297-318.

- Jorgensen, K. S., Puustinen, J., and Suortti, A.-M. (2000). Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil by Composting in Biopiles. *Environ. Pollut.*, Vol. 107, pp. 245-254.
- Labardini-Flores T., Ramírez-Delgado A. (2002). *Química Orgánica*. Esfinge Grupo editorial, 14 edición. Pp57-78.
- Lee J., Crum J. R. and Boyd S. A. (1989). Enhanced retention of organic contaminants by soils exchanged with organic cations. *Environ. Sci. Technol.* **23**:1365–1372.
- Leitão AL (2009). Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field. *Int J Environ Res Public Health* 6:1393-1417.
- Li JL, Chen BH. (2009). Effect of nonionic surfactants on biodegradation of phenantrene by a marine bacteria of *Neptunomonas naphthovorans*. *Journal hazardous materials*. 162: 66-73.
- Liang Y.N., Britt D.W., McLean J.E., Sorensen D.L., Sims R.C. (2007). Humic acid effect on pyrene degradation: finding an optimal range for pyrene solubility and mineralization enhancement. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 1368-1375.
- Luthy, R. G., G. R. Aiken, M. L. Brusseau, S. D. Cunningham, P. M. Gschwend, J. J. Pignatello, M. Reinhard, S. J. Traina, W. J. Weber Jr. & J. C. Westall. (1997). Sequestration of Hydrophobic Organic Contaminants by Geosorbents. *Environmental Science & Technology*. 31:3341-3347.
- Luo M, Xing J, Gou Z, Li S, Lui H, Chen JY (2003) Desulfurization of dibenzothiophene by lyophilized cells of *Pseudomonas delafieldii*R-8 in presence of dodecane. *Biochem Eng J* 13:1-6.
- Maier Raina Pepper M, Ian L. and Gerba P Charles., (2000). *Environmental Microbiology*. Academic press.
- Maletić, S.; Dalmacija, B.; Rončević, S.; Agbaba, J.; Petrović, O. Degradation kinetics of an aged hydrocarbon-contaminated soil. (2009). *Water Air Soil Poll.*, 202, 149–159.
- Mancera-López M.E, Esparza-García, Chavéz-Goméz, Rodríguez-Vazquez R., Saucedo-Castañeda G., Barrera-Cortéz J. (2008). Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 61, 151-160.

- Mayes W, Batty L, Younger P, Jarvis A and Vohlac M (2011). Wetland treatment at extremes of pH: A review. *Sci Total Environ* 407: 3944-3957.
- McCarthy, J. F. and Zachara, J. M. 1989. Subsurface transport of contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 23(5):496–502.
- Medina-Chena A., Salazar-Chimal T.E., Álvarez -Palacios J.L. (2010). *Fisiografía y suelos*. Digital. Universidad Veracruzana.
- Metcalf y Eddy, (1996). *Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización*. Volumen 1. Mc Graw-Hill. Pp 409-504.
- Miller J.T. and Fisher R.B. (1999). Structural determination by XAFS spectroscopy of non-porphyrin nickel and vanadium in Maya residuum, hydrocracked residuum, and toluene-insoluble solid. *Energy & Fuels* 13: 719-727
- Mollea C., Bosco F., Ruggeri B. (2005). Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. *Chemosphere* 60, 636-643.
- Moore B.J., Hardisty P.E., Headley J.V. (1985). Hydrocarbon attenuation in natural wetlands. 520-531.
- Montgomery D.C.(2006). *Diseño y análisis de experimentos*. 2da ed. Limusa, Wiley, Arizona, EUA, 686 pp.
- Moreira I.T.A., Oliveira O.M.C., Triguís J.A., dos Santos A.M.P., Queiroz A.F.S. Martins C.M.S., Silva C.S.S., Jesus R.S. (2011). Phytoremediation using *Rizophora mangle* L., in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's). *Microchemical Journal* 99, 376-382.
- Nascimento, T, Oliveira, J. and Franca, F. (2012) 'Potential of glycerol and soybean oil for bioremediation of weathered oily-sludge contaminated soil' *Brazilian journal of petroleum and gas*, Vol. 6, pp. 43-51.
- Nocentini M., Pinelli D., Fava F., (2000). Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures: the residual concentration problem. *Chemosphere* 41, 1115-1123.
- Ojeda MM, Hernández RM, Martínez VJ, Díaz F, Rivera CM (2012). Tres dosis inoculantes con *Proteus sp* en la biodegradación de petróleo crudo. *Rev Int Contam Ambie* 28: 323-332.

- Ortiz I., Velasco A., Revah S. (2006). Effect of toluene as gaseous substrate in bioremediation of hydrocarbon-polluted soil. *Journal of hazardous materials B* 131 112-117.
- Perotto S, Bonfante P (1997) Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere, *Trends Microbiol* 5:496-501.
- Place M.C., Coonfere C.T., Chen A.S.C., Hoepfel R.E. y Rosansky S.H. (2001). Principles and practices of bioslurping. Battelle Press. California, EUA, 190 pp.
- Providenti M.A., Hung Lee and Trevors J. T., (1993). Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *Journal of industrial Microbiology*, 12, 379-395.
- Popoviciu D.R. and Bercu R. (2014). Effects of nutrients and hydrogen peroxide on hydrocarbon biodegradation in marine sandy sediments microcosms. *Annals of R.S.C.B.* 19, 27-31.
- Sihag S., Pathak H., and Jaroli D. (2014). Factor affecting the rate of biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *International journal of pure & applied bioscience*. 2(3):185-202.
- Rajasekar A., Maruthamuthu S., Muthukumar N., Mohanan S., Subramanian P., Palaniswamy N. (2005). Bacterial degradation of naphthalene and its influence on corrosion. *Corrosion Science*. 47: 257-271.
- Ramírez M.E., Zapién C., Zegarra H.G., Rojas N.G. y Fernández L.C. (2009). Assessment of hydrocarbon biodegradability in clayed and weathered polluted soils. *Int. Biodeterior. Biodeg.* 63, 347-353.
- Reda AB. (2009). Bacterial bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in heavy oil contaminated soil. *Journal Applied Science Resources*. 5: 197-211
- Riser-Roberts E. (1992). Bioremediation of petroleum contaminated sites. Boca Raton (FL): CRC Press Inc.
- Riser-Roberts (1997). Remediation of petroleum contaminated soils. Lewis Publishers, Washington., pp. 150.
- Rivera-Cruz M.C., Trujillo-Narcia A. (2004). Estudio de toxicidad vegetal en los suelos con petróleo nuevo e intemperizado. *Interciencia*. 29, 7.



- Rodriguez-Vazquez R. (2003). Removal of phenanthrene from soil by co-cultures of bacteria and fungi pregrown on sugarcane bagase pith. *Bioresource technology* 89, 177-183.
- Ruixia H, Anhuai L (2007) Conversion and degradation of crude oil by bacillus SP3. *Chin J Geochem* 26: 201-206.
- Samuel C.T., Yu, Du Env. (1994). Transport and fate of chlorinated hydrocarbons in the vadose zone. A literature review with discussions on regulatory implications. *Journal of soil contamination*, 3(4).
- Satyanarayana T., Bhavdish Narain Johri, Anil Prakash. (2012). Microorganisms in environmental management. *Microbes and environment*. Springer. doi: 10.1007/978-94-007-2229-3.pp 85-86.
- Schaeffer T, Cantwell S, Brown J, Watt D and Fall R (1979) Microbial growth on hydrocarbons: Terminal branching inhibits biodegradation. *Appl Environ Microb* 38:742-746.
- SEMARNAT (2004). Oficio No. DGGIMAR. 710/003255. Autorización para el tratamiento de residuos peligrosos. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Autorización No. 30-108-GM-V-04-2004. No. de registro ambiental PREM00901611.
- SEMARNAT (2006) NMX-AA-134-SCFI-2006. Para la determinación de hidrocarburos de fracción pesada por extracción y gravimetría- Método de Prueba. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Diario Oficial de la Federación. Marzo 2005.
- SEMARNAT (2008) NMX-AA-145-SCFI-2008. Para la de determinación de hidrocarburos fracción media por cromatografía de gases con detector de ionización de flama- Método de prueba. Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. Diario Oficial de la Federación. Marzo 2005.
- Steliga T. and Piotr. (2010). Optimisation research of petroleum hydrocarbon biodegradation in weathered drilling wastes from waste pits. *Waste Management & Research*.
- Song, D., Katayama, A., 2010. Approach for estimating microbial growth and the biodegradation of hydrocarbon contaminants in subsoil based on field

- measurements: 1. Model development and verification. *Environ. Sci. Technol.* 44, 767–773.
- Syafruddin S., Wieshammer G., Puschenreiter M., Langer I., Wieshammer-Zivkovic M., Wenzel W.W. (2010). Effect of N and P fertilisation and aeration on biodegradation of crude oil in aged hydrocarbon contaminated soils. *Plant Soil Environ.* 56(4) 149-155.
- Tang J., Lu X., Sun Q., Zhu W. (2012). Aging effect of petroleum hydrocarbons in soil under different attenuation conditions. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 149, 109-117.
- Tam N.F.Y. Wong Y.S. (2008). Effectiveness of bacterial inoculum and mangrove plants on remediation of sediment contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbon. *Marine pollution Bulletin* 57 (2008) 716-726.
- Tomei M.C. & Daugulis A.J. 2013. Ex situ bioremediation of contaminated soils: an overview of conventional and innovative technologies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 43, 21072139.
- Townsend R.T., Bonner, J.S., Autentieth R. L., Mills M.A., McDonald T.J. (2000). Microbial dynamics and hydrocarbon degradation following a simulated oil spill in a coastal wetland. *Bioremediat J.* 4(3), 203-218.
- Van Hamme, J. D. and Ward, O. P. (1999). Influence of chemical surfactant on the biodegradation of crude oil by a mixed bacterial culture. *Can. J. Microbiol.* 41:418-424.
- Vega A.F.; Covelo F.E; Reigosa M.J.; Andrade H.L. (2009). Degradation of fuel oil in Salt marsh soils affected by the prestige oil spill. *J. Hazard. Mater.* (166,) 1020-1029.
- Volkman J (1984) Biodegradation of aromatic hydrocarbons in crude oils from the Barrow Sub-basin of Western Australia. *Org Geochem* 6:619-632.
- Walkley & Black (1934). An examination of the method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science. An interdisciplinary approach to soil research* 37, 29–38.
- Weed S.B and Weber J.B. 1969. The effect of cation exchange capacity on the retention of diquat and paraquat by three layer type minerals. I. Adsorption and release. *Soil Science Society American. Proc.* 33, 379.

- Weissenfels W., Klewer H., Landhoff. (1992). Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: Influence on biodegradability and biotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36, 689-696.
- Wyndham R. y Costerton W. (1981). Heterotrophic potentials and hydrocarbons biodegradation potentials of sediment microorganism within the athabasca oil sands. *Appl Environ Microbiol.* 41(3): 783-790.
- Yu K., Wong A., Yau K., Tam N. (2005). Natural attenuation, bioestmulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar Pollut Bull.* 51, 8-12.
- Vega F. A, Covelo E. F., Reigosa M. J. Andrades M. L (2009). Degradation of fuel oil in salt marsh soils affected by the prestige oil spill. *Journal of Hazardous Materials.* 166 (1020-1029).
- Zavala CJF, Gavi RRH, Adams SHR, Ferrera-Cerrato DJ, Palma-López DJ, Vaquera Hy, Domínguez EJM (2005). Derrames del petróleo en suelos y adaptación de pastos tropicales en el Activo cinco presidentes, Tabasco. *Terra* 23:294-302.
- Zilbilske L.M. (1994). Carbon mineralization. En Klute A. (Ed). *Methods of soil analysis, part 2. Microbiological and Biochemical properties. Second edition.* American – society of Agronomy, Inc.

## PAGINAS WEB

<http://www.iie.org.mx/>. Comparación de propiedades entre petróleos mexicanos (Olmeca, Istmo y Maya)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Base de datos NCBI para la obtención de las secuencias del gen obtenido para cada cepa.