



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

BIORREMEDIACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO CON ACEITE RESIDUAL AUTOMOTRIZ MEDIANTE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

JOSÉ ROCABER VARGAS RODRÍGUEZ

DIRECTOR: DRA. GUADALUPE LÓPEZ AVILÉS

Hermosillo, Sonora

septiembre, 2022

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

UNIVERSIDAD DE SONORA

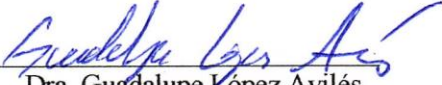
APROBACION DEL JURADO

de la tesis presentada por:

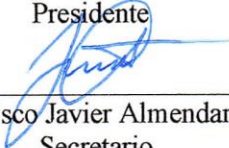
José Rocaber Vargas Rodríguez

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.


19/sep/2022
Fecha


Dra. Guadalupe López Avilés
Presidente

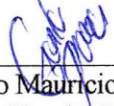
19/sep/2022
Fecha


Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia
Secretario

19/sep/2022
Fecha


Dra. Onofre Mongé Amaya
Vocal

19/sep/2022
Fecha


Dr. Gonzalo Mauricio Figueroa Torres
Sinodal Externo



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química

AUTORIZACIÓN DEL EXAMEN DE GRADO

14 de Septiembre de 2022.

Por medio de la presente se hace constar que el estudiante **JOSÉ ROCABER VARGAS RODRÍGUEZ**, ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de grado del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería.

Abraham Rogelio Martín García

DR. ABRAHAM ROGELIO MARTIN GARCÍA

COORDINADOR DE POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA:
INGENIERÍA QUÍMICA

RESUMEN

La contaminación del suelo por compuestos derivados de los hidrocarburos, como el aceite residual automotriz (ARA), es uno de los principales problemas ambientales en México y el mundo. El ARA es una mezcla de hidrocarburos generados durante el mantenimiento de los motores de los automóviles, principalmente en los talleres de mecánica automotriz, y otros tipos de maquinaria. El ARA causa problemas como la inhibición de la vida en el suelo y problemas de salud pública en las zonas cercanas al lugar afectado.

En este trabajo, se caracterizó una muestra de un suelo contaminado con ARA, proveniente de un taller de mecánica automotriz, mediante la determinación del pH, contenido de humedad, de materia orgánica y de hidrocarburos totales del petróleo (HTP). Después, se aislaron cepas bacterianas tolerantes a los hidrocarburos, diferenciándolas en base a su morfología colonial, las cuales se sometieron a pruebas bioquímicas y de tinción de Gram, con el fin de identificarlas, y a pruebas de presencia de actividad lipolítica y tolerancia a los hidrocarburos, con el objetivo de seleccionar aquellas más aptas para tolerar y degradar hidrocarburos. Tres cepas bacterianas se seleccionaron para conformar un consorcio bacteriano para el tratamiento del suelo contaminado, sin embargo, las tres fueron identificadas, por biología molecular, como *Pseudomonas protegens*, por lo que se trabajó con esta especie para el tratamiento el suelo.

Los estudios sobre el tratamiento biológico del suelo se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de vidrio de 250 mL con 50 g de suelo a 30 °C, 150 rpm y con un contenido de humedad del 20 - 40%. Los tratamientos consistieron en una bioestimulación (SMM), con un medio mineral base, una bioaumentación (SI), con *P. protegens* y una combinación de la bioestimulación y la bioaumentación (SIMM), con *P. protegens* en medio mineral. Como control (C) se empleó agua destilada para mantener la humedad. Cada una de las opciones de tratamiento se monitoreó durante 28 días, tomando muestras cada semana para medir el pH, porcentaje de humedad y concentración de

HTP. Se obtuvieron hasta un 47.85, 38.63, 37.54 y 28.4% de remoción de HTP con las opciones SMM, SI, SIMM y C, respectivamente, en un periodo de 28 días, por lo que la bioestimulación resultó como la mejor opción para la biorremediación del suelo contaminado con ARA.

ABSTRACT

Soil contamination by hydrocarbon compounds, such as spent engine oil (SEO), is one of the main environmental problems in Mexico and the world. SEO is a mixture of hydrocarbons generated during the maintenance of the cycle engine, mainly in auto mechanic workshops. SEO causes many problems such as the inhibition of life in the soil and public health problems in the areas near the affected site.

In this work, a soil sample contaminated with SEO from an auto mechanic workshop was characterized by determining the pH, moisture content, organic matter, and total petroleum hydrocarbons (TPH). Later, bacterial strains tolerant to hydrocarbons were isolated, differentiating them based on their colonial morphology, which were subjected to biochemical and Gram stain tests, to identify them, and tests for the presence of lipolytic activity and tolerance to hydrocarbons, to select those most suitable for tolerating and degrading hydrocarbons. Three bacterial strains were selected to form a bacterial consortium for the treatment of contaminated soil, however, the three were identified, by molecular biology, as *Pseudomonas protegens*, so we worked with this species for soil treatment.

The studies of the biological treatment of the soil were carried out in 250 mL glass Erlenmeyer flasks with 50 g of soil at 30 °C, 150 rpm, and with a moisture content of 20 - 40%. The treatments consisted of biostimulation (SMM) with a base mineral medium, bioaugmentation (SI) with *P. protegens*, and a combination of biostimulation and bioaugmentation (SIMM) with *P. protegens* and mineral medium. As a control (C), distilled water was used to maintain humidity. Each one of the treatment options was monitored for 28 days, taking samples every week to measure the pH, percentage of humidity, and concentration of TPH. Up to 47.85, 38.63, 37.54, and 28.4% of TPH removal were obtained with the SMM, SI, SIMM, and C options, respectively, in 28 days, so the biostimulation option resulted as the best for the bioremediation of soil contaminated with SEO.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis y todo el trabajo realizado para llegar a culminar mis estudios de maestría, a mis padres, que siempre me apoyaron en todos los ámbitos necesarios para culminar mis estudios de posgrado y crecer como persona.

A mis hermanos, por su comprensión y por el apoyo que siempre me brindaron sin importar las situaciones presentes.

A mi novia, quien estuvo presente todo el tiempo, por su apoyo, comprensión, motivación y paciencia.

A mis primos, tíos y todos mis familiares, por confiar en mí y mostrarme su gran cariño y fortaleza como personas.

A la memoria de mi abuela, por su enorme cariño, amabilidad y comprensión, y por ser un gran ejemplo de perseverancia y esfuerzo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
DEDICATORIA	VI
TABLA DE CONTENIDO.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABLAS	XIII
AGRADECIMIENTOS.....	1
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. Introducción	1
1.2. Justificación	2
1.3. Objetivo General	3
1.4. Objetivos Específicos.....	3
CAPÍTULO 2.....	4
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	4
2.1. El Suelo.....	4

2.2. Contaminación por Hidrocarburos.....	5
2.2.1. Contaminación en México	7
2.3. Biorremediación de Suelos.....	10
2.3.1. Clasificación de las tecnologías de biorremediación	12
2.3.2. Biorremediación de hidrocarburos del petróleo	14
2.3.3. Factores que afectan la biorremediación de hidrocarburos.....	15
2.3.4. Mecanismos de degradación de hidrocarburos.....	20
CAPÍTULO 3.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. Muestreo.....	22
3.2. Caracterización Físicoquímica del Suelo.....	24
3.2.1. pH.....	24
3.2.2. Contenido de humedad	24
3.2.3. Conductividad eléctrica.....	26
3.2.4. Contenido de materia orgánica	26
3.2.5. Hidrocarburos totales del petróleo (HTP)	28
3.3. Aislamiento de Bacterias.....	31
3.4. Tinción Diferencial	33
3.5. Pruebas Bioquímicas.....	35
3.5.1. Catalasa.....	35
3.5.2. Agar MacConkey	35
3.5.3. Citrato	36

3.5.4.	Agar de triple azúcar y hierro (TSI).....	37
3.5.5.	Movilidad	38
3.5.6.	Producción de ácido sulfhídrico.....	39
3.5.7.	Indol	39
3.5.8.	Rojo de metilo (MR).....	40
3.5.9.	Voges-Proskauer	40
3.5.10.	Agar de eosina y azul de metileno (EMB)	41
3.6.	Conformación del Consorcio Bacteriano	42
3.6.1.	Actividad lipolítica.....	42
3.6.2.	Tolerancia a los hidrocarburos.....	43
3.6.3.	Curva de crecimiento	43
3.7.	Identificación Molecular	44
3.8.	Tratamiento Biológico.....	45
CAPÍTULO 4.....	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
3.9.	Caracterización Físicoquímica del Suelo	47
3.9.1.	pH.....	48
3.9.2.	Contenido de humedad	49
3.9.3.	Conductividad eléctrica.....	49
3.9.4.	Contenido de materia orgánica	50
3.9.5.	Hidrocarburos totales del petróleo (HTP)	51
3.10.	Aislamiento de Microorganismos.....	53

3.11.	Identificación Preliminar	58
3.12.	Tolerancia a los Hidrocarburos	60
3.13.	Curva de Crecimiento	62
3.14.	Identificación Molecular	63
3.15.	Tratamiento Biológico	65
CAPÍTULO 5.....		71
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		71
CAPÍTULO 6.....		73
BIBLIOGRAFÍA		73
ANEXOS		82
Anexo A: Medios de Cultivo		82
Anexo B: Árbol Filogenético		88
Anexo C: Evidencia Fotográfica.....		89
Anexo D: Participación en Congreso		98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los hidrocarburos. Adaptado de Chang, 2007.	5
Figura 2. Emergencias notificadas, distribución por causante. Adaptado de PROFEPA, 2020.	7
Figura 3. Emergencias notificadas, distribución por actor. Adaptado de PROFEPA, 2020.	8
Figura 4. Residuos peligrosos detectados en operativos nacionales 2018. Adaptado de PROFEPA, 2019.	9
Figura 5. Mecanismo principal de degradación aeróbica de hidrocarburos por una célula microbiana. Adaptado de Das y Chandran, 2011.	21
Figura 6. Muestras de suelo contaminado.	23
Figura 7. Localización del lugar de muestreo. Google Maps, 2022.	23
Figura 8. Diseño experimental de la extracción por reflujo Soxhlet. Adaptado de De Química, 2022.	29
Figura 9. Metodología del aislamiento de bacterias del suelo.	31
Figura 10. Procedimiento de la tinción de Gram.	34
Figura 11. Fotografía de la colonia C1 en Agar diésel.	53
Figura 12. Fotografía de la colonia C2 en Agar diésel.	53
Figura 13. Fotografía de la colonia C3 en Agar diésel.	54
Figura 14. Fotografía a la colonia C4 en Agar diésel.	54
Figura 15. Fotografía a la colonia C5 en Agar diésel.	55
Figura 16. Fotografía a la colonia C6 en Agar diésel.	55
Figura 17. Fotografía a la colonia C7 en Agar diésel.	56
Figura 18. Fotografía a la colonia C8 en Agar diésel.	56
Figura 19. Fotografía a la colonia C9 en Agar diésel.	57
Figura 20. Fotografía a la colonia C10 en Agar diésel.	57
Figura 21. Curva de crecimiento.	62
Figura 22. Variación del pH con respecto al tiempo.	65
Figura 23. Variación del porcentaje de humedad con respecto al tiempo.	66
Figura 24. Porcentaje de remoción de HTP a los 28 días de tratamiento.	67

Figura 25. Árbol filogenético de las secuencias empleadas para la identificación molecular.	88
Figura 26. Muestras del tratamiento biológico para secado en horno.	89
Figura 27. Muestras del tratamiento biológico después de 24 h de secado en horno.	89
Figura 28. Obtención del extracto de saturación del suelo.	90
Figura 29. Reactivos para determinación del contenido de materia orgánica del suelo.	90
Figura 30. Matraz con el extracto de ARA del suelo contaminado.	91
Figura 31. Equipo para extracción Soxhlet.	91
Figura 32. Tinción de Gram a C5.	92
Figura 33. Tinción de Gram a C10.	92
Figura 34. Crecimiento de C6 en Agar MacConkey.	93
Figura 35. Prueba de Citrato de Simmons.	93
Figura 36. Prueba de Agar TSI.	94
Figura 37. Prueba de rojo de metilo a C9.	94
Figura 38. Crecimiento de C6 en Agar EMB.	95
Figura 39. Crecimiento de C9 en Agar rodamina B con actividad lipolítica.	95
Figura 40. Crecimiento de C7 en Agar MMD.	96
Figura 41. Crecimiento del cultivo de C5, C7 y C8 en Agar diésel para conteo en placa.	96
Figura 42. Preparación de los tratamientos biológicos.	97
Figura 43. Matraces en incubadora para el tratamiento biológico.	97
Figura 44. Reconocimiento por participación en congreso.	98
Figura 45. Póster presentado en congreso.	99

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación. (Volke y Velasco, 2002).....	11
Tabla 2. Interpretación de los resultados del medio Agar TSI. (MacFaddin, 2003).....	38
Tabla 3. Descripción de los tratamientos biológicos.....	45
Tabla 4. Resultados de la caracterización del suelo.....	47
Tabla 5. Interpretación de resultados de pH medido en suelos. (NOM-021-RECNAT-2000).....	48
Tabla 6. Interpretación de conductividad eléctrica. (NOM-021-RECNAT-2000).	49
Tabla 7. Interpretación de los resultados de materia orgánica. (NOM-021-RECNAT-2000).....	50
Tabla 8. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburo en suelo. (NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012).	51
Tabla 9. Resultados de la identificación preliminar de C1 a C5.....	59
Tabla 10. Resultados de la identificación preliminar de C6 a C10.....	59
Tabla 11. Resultados de la evaluación de la tolerancia a los hidrocarburos.....	60
Tabla 12. Resultados de la identificación molecular.....	63
Tabla 13. Agar nutritivo.....	82
Tabla 14. Caldo nutritivo.....	82
Tabla 15. Agar diésel.....	83
Tabla 16. Agar MacConkey.....	83
Tabla 17. Medio de Citrato de Simmons.....	84
Tabla 18. Agar TSI.....	84
Tabla 19. Medio MR-VP (rojo de metilo y Voges-Proskauer).....	85
Tabla 20. Medio SIM (Sulfuro-Indol-Movilidad).....	85
Tabla 21. Agar EMB (eosina y azul de metileno).....	86
Tabla 22. Agar rodamina B.....	86
Tabla 23. Agar MMD (medio mineral y diésel).....	87
Tabla 24. Medio Mineral (MM).....	87

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, por permitirme realizar mis estudios de licenciatura y posgrado, además de mostrarme lo valiosa e importante que es la ingeniería química. Es un orgullo estudiar en una de las mejores universidades del país.

A la División de Ingeniería y al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, por permitirme realizar esta tesis y apoyarme en lo necesario para la finalización de la parte experimental de esta tesis.

Al Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química, por haberme aceptado a su programa de Maestría y permitirme realizar y terminar mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo para la realización y culminación de mis estudios de maestría.

A mis compañeros y amigos integrantes del Laboratorio de Biorremediación de la Universidad de Sonora, por todo su apoyo, comprensión y formación en la parte experimental de esta tesis. Sin su ayuda, esto no sería posible.

A todos los maestros y compañeros que confiaron en mí, me brindaron su apoyo, me asesoraron y me dieron el criterio necesario para terminar esta investigación.

A la Dra. Guadalupe López Avilés, mi directora de tesis, quien me ayudo desde principio a fin en la realización de esta tesis, me asesoró y me dio los ánimos necesarios para poder continuar. Sin duda, una de las mejores maestras de la Universidad de Sonora.

Al Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia, quien me dio la oportunidad de realizar esta investigación, por su asesoría, comprensión y apoyo.

A mis sinodales, la Dra. Onofre Monge Amaya y el Dr. Gonzalo Mauricio Figueroa Torres, por su asesoría, apoyo y confianza

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

Actualmente, uno de los principales problemas ambientales en el mundo es la contaminación de ecosistemas terrestres debido a derrames de hidrocarburos de petróleo y sus derivados (Pardo *et al.*, 2004). De acuerdo con la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, 2018), la contaminación del suelo envenena los alimentos que comemos, el agua que bebemos y el aire que respiramos, aunado a que el potencial de los suelos para filtrar y amortiguar los contaminantes es finito, por lo que la dimensión de este tipo de contaminación es aún desconocida.

La mayoría de los contaminantes del suelo provienen de actividades antropogénicas, como las prácticas agrícolas no sostenibles, actividades industriales, la minería, residuos urbanos no tratados, entre otras actividades y prácticas no respetuosas con el entorno (SEMARNAT, 2018).

Se sabe que existen diferentes métodos para la recuperación o remediación de sitios contaminados, biológicos y no biológicos, cada uno con ventajas y desventajas, las cuales se tienen que evaluar para elegir uno u otro, o una combinación de ellos (Levin y Gealt, 1997).

En este estudio, se utilizó un tratamiento biológico (biorremediación) para la evaluación de la degradación de un suelo contaminado con aceite residual automotriz (ARA), utilizando microorganismos autóctonos. Con ello, se buscó evaluar la efectividad del método utilizado, con el fin de indagar en el tratamiento de suelos contaminados con ARA, pues a pesar de que se han reportado muchos trabajos en la biorremediación de

hidrocarburos, en general, hay muy pocos estudios que se enfocan en la biorremediación de ARA (Abdulsalam *et al.*, 2012), y en particular, en el estado de Sonora, son escasos los estudios de biorremediación de hidrocarburos, a pesar de ser una región con actividad petrolera.

1.2. Justificación

Los hidrocarburos derivados del petróleo, entre los que se encuentra el ARA, son contaminantes que causan muchos problemas en las zonas afectadas, debido a que contaminan tanto al suelo, agua y aire, pues se filtran fácilmente a las aguas subterráneas, además de que está compuesto por muchos componentes volátiles. Se han reportado problemas tanto de salud, infertilidad del suelo y abandono de la fauna silvestre de las zonas afectadas, por lo que, aunado al hecho de que México es un país productor de petróleo, y que históricamente existen una gran cantidad de problemas de contaminación de compuestos derivados del petróleo, tanto en el suelo como en el agua, es necesario una solución adecuada al problema, siendo la biorremediación, uno de los mejores métodos de tratamiento de estos contaminantes, debido a sus ventajas con respecto a los otros tipos de tecnologías de remediación. Enfocándose en el caso del ARA, existen muy pocos estudios acerca de la biorremediación de estos compuestos en suelos, tanto en México, como en el estado de Sonora, a pesar de su incorrecta disposición en la mayoría de los lugares donde son desechados, por lo que se decidió realizar este estudio para indagar más en el tratamiento de este tipo de suelos, pues se trata de un problema persistente y con una dificultad compleja.

1.3. Objetivo General

Evaluar la eficiencia de remoción de hidrocarburos de un suelo contaminado con aceite residual automotriz (ARA) utilizando bacterias aisladas del sitio contaminado.

1.4. Objetivos Específicos

Para alcanzar el objetivo general, se establecen los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar el suelo contaminado con hidrocarburos.
- Aislar bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos provenientes de la muestra de suelo contaminado.
- Identificar mediante pruebas bioquímicas y biología molecular los microorganismos del consorcio seleccionado.
- Evaluar la eficiencia del tratamiento biológico de un suelo contaminado con ARA.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1. El Suelo

El suelo es el material suelto de la superficie de la Tierra que proporciona soporte físico y nutrientes para el crecimiento de los seres vivos (Eweis *et al.*, 1999). De acuerdo con Pardo *et al.* (2004), el suelo representa el medio físico que sustenta la vida de diversas especies, tanto animales como vegetales, pues la materia orgánica e inorgánica del suelo da cabida a la coexistencia de una gran cantidad de microorganismos que se adaptan a sus características físicas y químicas, aun cuando estas sean variables. Además, Pardo *et al.* (2004) añaden que los microorganismos tienen una gran importancia ecológica en los ecosistemas terrestres, pues cumplen la función de descomponer sustancias orgánicas de desecho en sus componentes básicos, los cuales se metabolizan junto con los nutrientes obtenidos del suelo para generar nueva biomasa y llevar a cabo sus funciones vitales.

Los suelos poseen propiedades físicas y químicas, como son el tamaño de partícula, la porosidad, la humedad, el estado de aireación, la composición química, la fracción de arcilla, la capacidad de intercambio de cationes, la fracción orgánica, entre otros, los cuales influyen en la aireación, la disponibilidad de nutrientes, retención de agua y en la actividad biológica (Eweis *et al.*, 1999).

De acuerdo con Volke y Velasco (2002), el suelo está formado por cinco componentes principales (minerales, aire, agua, materia orgánica y organismos vivos), los cuales afectan y definen al tipo de suelo y el método de tratamiento o remediación de este.

2.2. Contaminación por Hidrocarburos

El petróleo se formó en la corteza terrestre mediante la descomposición anaeróbica de la materia animal y vegetal a través de la acción bacteriana, y está formado por una compleja mezcla de hidrocarburos y otros compuestos orgánicos, incluyendo algunos constituyentes organometálicos (Chang, 2007; Van Hamme *et al.*, 2003). Después de someter al petróleo a varios tratamientos físicos y químicos, denominados refinación, se obtienen los llamados derivados del petróleo, entre los que se encuentran la gasolina, el diésel, los aceites lubricantes, el asfalto, la cera, el gas LP, entre otros (Balcázar *et al.*, 2016).

Los hidrocarburos son compuestos químicos orgánicos, constituidos principalmente por átomos de carbono e hidrógeno, a los cuales se les considera derivados del petróleo, debido a que este está constituido por miles de compuestos de hidrocarburos (NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012).

Con base en su estructura molecular, los hidrocarburos pueden ser clasificados en alifáticos y aromáticos, como se muestra en la Figura 1. Los hidrocarburos alifáticos se diferencian de los aromáticos en que estos últimos tienen en su estructura un grupo benceno o anillo bencénico, mientras que los alifáticos no lo tienen (Chang, 2007).

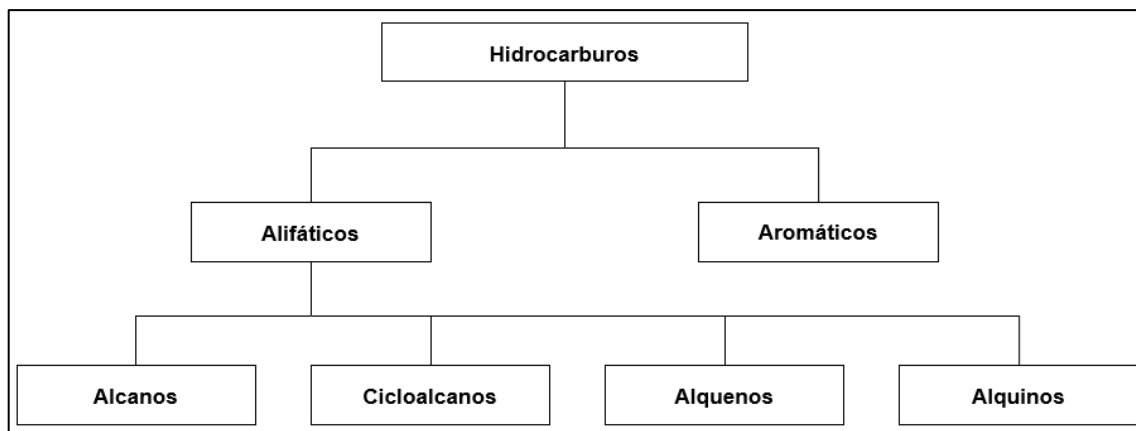


Figura 1. Clasificación de los hidrocarburos. Adaptado de Chang, 2007.

La contaminación por hidrocarburos del petróleo ocurre inevitablemente en todas las etapas de su producción, provocando impactos negativos en el medio ambiente (Al-Hawash *et al.*, 2018). La contaminación del suelo por hidrocarburos ocasiona problemas como la reducción o inhibición del desarrollo de la flora, fauna y microorganismos, contaminación de aguas subterráneas, y problemas económicos, sociales y de salud pública en las zonas cercanas al lugar afectado, sumado a que se ha reportado que algunos compuestos de los hidrocarburos del petróleo, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), son cancerígenos y neurotóxicos para el ser humano y otros mamíferos (Pardo *et al.*, 2004; Atlas y Cerniglia, 1995; Das y Chandran, 2011).

En México, uno de los principales contaminantes del suelo es el aceite residual automotriz (ARA), una mezcla de hidrocarburos alifáticos, aromáticos, entre otros compuestos, generados durante el ciclo de lubricación de motores y mantenimiento de maquinaria agrícola e industrial, los cuales inhiben la vida en el suelo y reducen la producción agrícola, además de alterar las propiedades fisicoquímicas del suelo, como el pH (reduciéndolo), retención de agua, porosidad, entre otros efectos adversos (Escalante *et al.*, 2017; Udonne y Onwuma, 2014).

El ARA proviene de los aceites lubricantes, los cuales se utilizan en la vida diaria para permitir el funcionamiento de una gran variedad de motores y mecanismos. Estos aceites, al pasar el tiempo, van perdiendo sus propiedades y son alterados (debido a la descomposición de sus aditivos, contaminación por los productos de la combustión y contaminación por metales provenientes del desgaste del motor y los componentes metálicos), por lo que son desechados y deben ser reemplazados por un aceite lubricante nuevo (Abdulsalam y Omale, 2009; Ugoh y Moneke, 2011).

A pesar de todo, este tipo de aceites son derramados en el suelo, puesto que no son dispuestos adecuadamente en gran parte de los talleres de mecánica automotriz, por lo que se acumulan continuamente, creando una gran preocupación debido a los peligros asociados a la contaminación de suelos por los hidrocarburos de los que está compuesto, esto sumado al incremento en la demanda de automóviles a nivel mundial, resultando en la generación de grandes volúmenes de este tipo de contaminantes (Abdulsalam *et al.*, 2012; Udonne y Onwuma, 2014).

2.2.1. Contaminación en México

México se ha convertido en uno de los más grandes productores de petróleo en el mundo. En el año 2021 se produjeron aproximadamente 1,925,000 barriles de hidrocarburos líquidos, y tiene suficientes reservas de petróleo para producir por varios años más, teniendo como consecuencia altos índices de contaminación por hidrocarburos (PEMEX, 2022).

La Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) cuenta con el Centro de Orientación para la Atención de Emergencias Ambientales (COATEA), los cuales aseguran que en 2019 se recibieron 968 notificaciones sobre emergencias ambientales. La distribución de estas se muestra en la Figura 2 y la Figura 3, en las que se pueden observar que la mayoría de las notificaciones se asocian con la industria de los hidrocarburos y derrames de estos y otras sustancias químicas (PROFEPA, 2020).

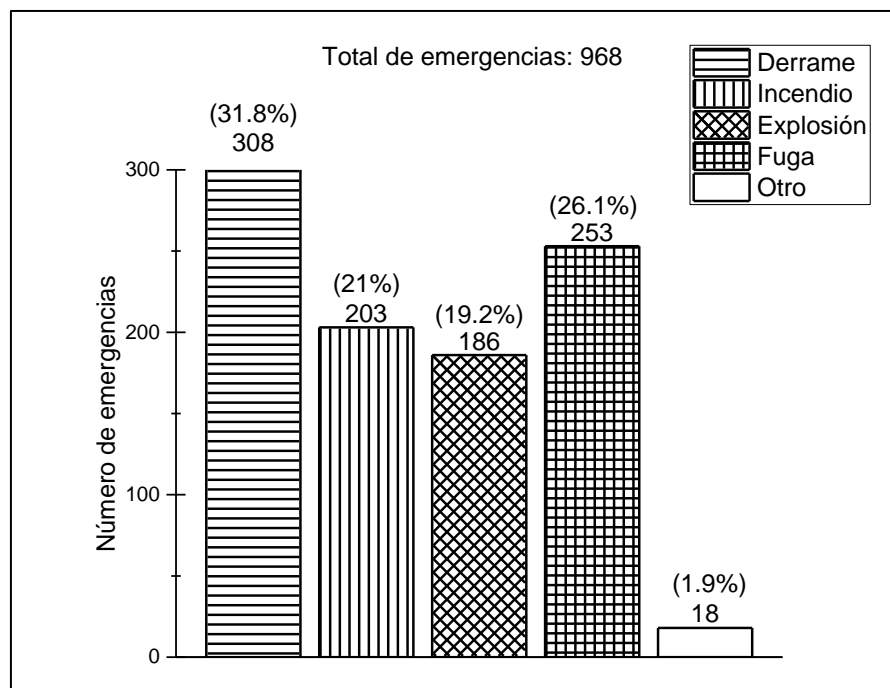


Figura 2. Emergencias notificadas, distribución por causante. Adaptado de PROFEPA, 2020.

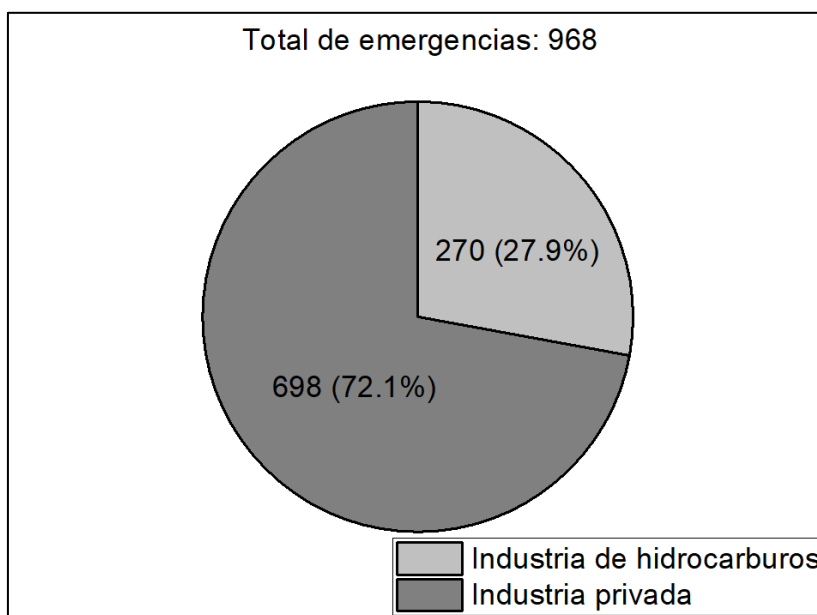


Figura 3. Emergencias notificadas, distribución por actor. Adaptado de PROFEPA, 2020.

Durante el 2018, la PROFEPA realizó operativos nacionales en diversos puntos del país, en los cuales se verificaron 32,190 unidades de carga que transportaban diferentes tipos de sustancias y materiales peligrosos regulados por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). En la Figura 4 se pueden observar los diferentes tipos de sustancias y materiales peligrosos verificados durante estos operativos, en la que la tierra contaminada con hidrocarburos ocupa el tercer lugar con 35.5 toneladas.

Además, Volke y Velasco (2002) mencionan que los residuos peligrosos encontrados con mayor frecuencia en tiraderos clandestinos son los provenientes de la industria minera y petroquímica, incluyendo aceites gastados provenientes de talleres mecánicos.

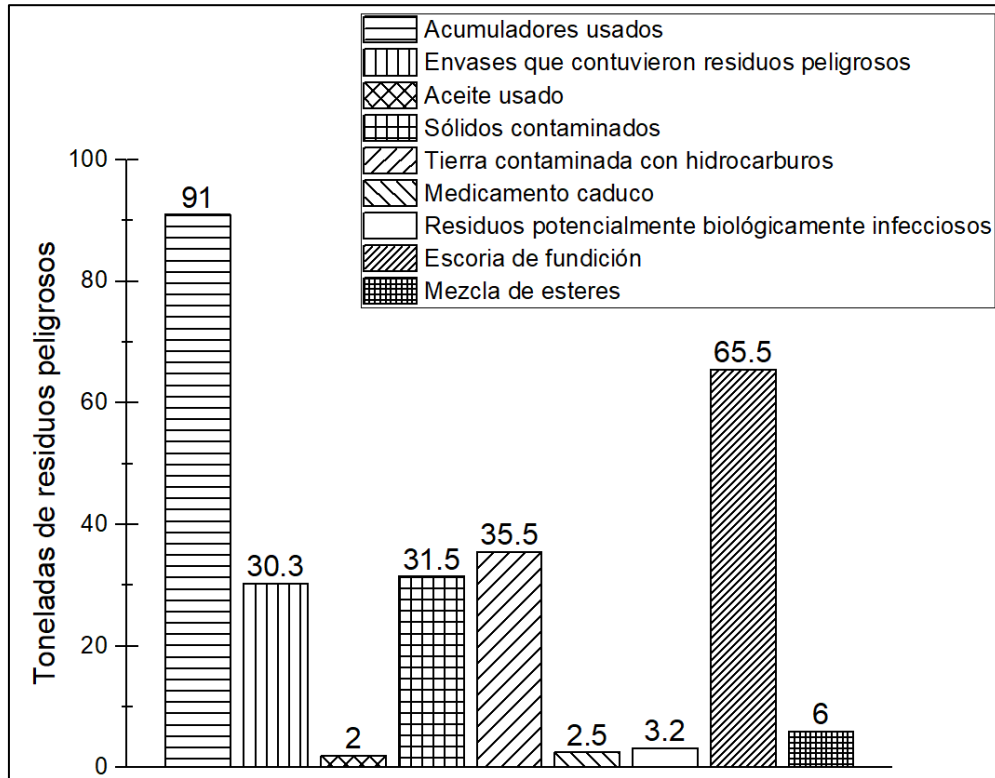


Figura 4. Residuos peligrosos detectados en operativos nacionales 2018. Adaptado de PROFEPA, 2019.

2.3. Biorremediación de Suelos

La remediación es la eliminación, degradación o transformación de contaminantes a sustancias inocuas o menos dañinas, incluyendo métodos que reducen la movilidad de los contaminantes a áreas no contaminadas (Yuniati, 2018; Volke y Velasco, 2002).

De acuerdo con Volke y Velasco (2002), los tipos de tratamiento en los que se basa la remediación de suelos pueden ser:

- Biológicos (biorremediación): Utilizan la actividad metabólica de ciertos microorganismos para la remediación de los suelos contaminados.
- Fisicoquímicos: Utilizan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o el medio para la remediación de los suelos contaminados.
- Térmicos: Utilizan el calor para incrementar la volatilización, quemar, descomponer o fundir los contaminantes de los suelos.

En la Tabla 1 se muestran las ventajas y desventajas de los anteriores tipos de remediación, en la que se puede observar que la biorremediación es el tipo de tratamiento más recomendable, debido a sus ventajas económicas y positivas al medio ambiente.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación. (Volke y Velasco, 2002).

Tipo de tratamiento	Ventajas	Desventajas
Biológicos (biorremediación)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Son efectivos en cuanto a costos. ➤ Son tecnologías más benéficas para el ambiente. ➤ Los contaminantes generalmente son destruidos. ➤ Se requiere un mínimo o ningún tratamiento posterior. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Requieren mayores tiempos de tratamiento. ➤ Es necesario verificar la toxicidad de intermediarios y/o productos. ➤ No pueden emplearse si el tipo de suelo no favorece el crecimiento microbiano.
Fisicoquímicos	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Son efectivos en cuanto a costos. ➤ Pueden realizarse en periodos cortos. ➤ El equipo es accesible y no se necesita de mucha energía ni ingeniería. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Los residuos generados por técnicas de separación deben tratarse o disponerse, lo que genera un aumento en costos y necesidad de permisos. ➤ Los fluidos de extracción pueden aumentar la movilidad de los contaminantes, lo que genera una necesidad de sistemas de recuperación.
Térmicos		<ul style="list-style-type: none"> ➤ Es el grupo de tratamientos más costoso.

Como se mencionó anteriormente, los métodos de biorremediación son aquellos en los que se utilizan organismos vivos (plantas, bacterias, hongos, entre otros) para transformar, degradar o remover compuestos tóxicos a productos inocuos o menos dañinos. Estos métodos se aplican con gran facilidad a la transformación de algunos contaminantes orgánicos en suelos, lodos y sedimentos, como los hidrocarburos derivados del petróleo, que son biodegradados de manera relativamente fácil (Eweis *et al.*, 1999; Volke y Velasco, 2002).

2.3.1. Clasificación de las tecnologías de biorremediación

Las tecnologías de biorremediación de suelos se pueden clasificar en *in situ* o *ex situ*, según el lugar en donde se realiza la remediación. Las diferentes tecnologías *in situ* se explican a continuación de acuerdo con Volke y Velasco (2002):

- Bioventilación o bioventeo. Su objetivo es la biodegradación natural de cualquier compuesto biodegradable en condiciones aerobias. Se introduce aire u oxígeno en la zona contaminada, a través de pozos de extracción, además de nutrientes por infiltración o por inyección (Eweis *et al.*, 1999).
- Bioestimulación. Su objetivo es estimular la actividad de los microorganismos autóctonos mediante la circulación de soluciones acuosas, que contienen nutrientes y oxígeno, a través del suelo contaminado. También puede implicar la inmovilización de los contaminantes inorgánicos.
- Bioaumentación. Consiste en la adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante en cuestión. Es utilizado cuando se requiere el tratamiento inmediato del sitio o cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o en capacidad degradadora.
- Biolabranza. La superficie del suelo contaminado es tratada en el mismo sitio por medio del arado, con el objetivo de favorecer su aireación. Además, el suelo contaminado se mezcla con agentes de volumen y nutrientes.

La biorremediación *in situ* suele ser un proceso de bajo costo, bajo mantenimiento y amigable con el medio ambiente, mientras que la biorremediación *ex situ* suele ser más costosa, debido principalmente a los costos de excavación (Yuniati, 2018). Las diferentes tecnologías *ex situ* se explican a continuación de acuerdo con Eweis *et al.* (1999):

- Compostaje. Se mezcla el material contaminado con agentes esponjantes orgánicos, como el estiércol, y se dispone en pilas o hileras, las cuales se voltean y se les agrega agua periódicamente.
- Biorreactores. Constituyen sistemas en suspensión, en los que el terreno contaminado se introduce en un recipiente de contención con suficiente agua para permitir una mezcla ininterrumpida, a la que se le pueden controlar el flujo de oxígeno y de gases producidos.

Según Yuniati (2018), los dos enfoques (*in situ* y *ex situ*) difieren no solamente en el lugar en donde se realiza la remediación, sino también en la tasa de biodegradación y en la consistencia de los resultados.

Volke y Velasco (2002) también describen otro tipo de tecnología de biorremediación, la fitorremediación, la cual utiliza plantas en lugar de microorganismos para remover o disminuir los contaminantes en un suelo, y se puede aplicar tanto *in situ* como *ex situ*. Cabe destacar que la mayoría de las empresas en México autorizadas para remediar suelos contaminados utilizan métodos biológicos, en su mayoría el composteo y la biolabranza (Volke y Velasco, 2002).

2.3.2. Biorremediación de hidrocarburos del petróleo

Las principales moléculas del petróleo y sus productos refinados son biodegradables, y eventualmente abandonarán el ambiente a medida que son consumidos por los microorganismos. Sin embargo, la velocidad de este proceso es muy baja y la biorremediación se encarga de estimular este proceso, acelerando la biodegradación de los hidrocarburos mediante la optimización de las condiciones del proceso, como son la aireación, adición de nutrientes o el control de la temperatura, pH y contenido de humedad (Prince, 1993; Abdulkarim *et al.*, 2019).

Asimismo, la biorremediación de hidrocarburos es una de las alternativas de remediación menos costosa, más efectiva y con más alta aceptación social, comparado con los métodos fisicoquímicos y térmicos, pues permite la degradación o mineralización de los contaminantes utilizando la actividad biológica en el mismo sitio (Riojas *et al.*, 2010; Vidali, 2001).

Una gran variedad de microorganismos, en su mayoría bacterias, tiene la capacidad de degradar hidrocarburos debido a sus capacidades metabólicas, entre los más importantes se encuentran los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, entre muchos otros, sin embargo, se ha reportado que, en suelos contaminados con aceites residuales derivados de hidrocarburos, las especies más frecuentemente encontradas son los géneros *Arthrobacter* y *Pseudomonas* (Atlas y Cerniglia, 1995; Jensen, 1975).

De acuerdo con Trujillo y Ramírez (2012), las bacterias y otros microorganismos se encargan de transformar los componentes orgánicos de los hidrocarburos en CO₂, H₂O y materia orgánica, teniendo como subproductos algunos metales y componentes inorgánicos. Sin embargo, la tasa de biodegradación de los hidrocarburos está afectada por la población microbiana presente en el ambiente y las capacidades fisiológicas de los mismos, el estado físico y la toxicidad de los hidrocarburos, además de otros factores abióticos o ambientales, como la presencia de nutrientes, oxígeno, humedad, temperatura, entre otros (Atlas, 1991; Riojas *et al.*, 2010).

2.3.3. Factores que afectan la biorremediación de hidrocarburos

Como se mencionó anteriormente, existen una gran variedad de factores que afectan la biodegradación de contaminantes en un suelo, los cuales varían para el tipo de contaminante, suelo o matriz en el que está el contaminante, además de factores abióticos, de tal forma que, en un ambiente dado, un contaminante puede persistir indefinidamente, mientras que, a otras condiciones, este mismo contaminante puede ser completamente degradado en un tiempo relativamente corto (Atlas, 1981). A continuación, se mencionan algunos factores que afectan la biorremediación de hidrocarburos del petróleo en el suelo, con sus efectos.

- **Temperatura.** La biodegradación de los hidrocarburos del petróleo depende enormemente de la temperatura, pues, a mayor temperatura, la degradación es más rápida debido a que aumenta la actividad enzimática de las bacterias. Sin embargo, la temperatura no suele ser el factor limitante para la degradación de hidrocarburos en un ambiente dado, a menos que esto afecte el estado físico de los contaminantes y la disponibilidad de agua, dificultando los métodos de biorremediación (Atlas, 1981).

Las bacterias en un suelo crecen más rápidamente en un rango de temperaturas de entre 5 a 40 °C, aunque la temperatura óptima de crecimiento depende de cada especie, se ha reportado que 30 °C es una temperatura óptima para la degradación de hidrocarburos en suelos. Considerando lo anterior, en condiciones por debajo de la temperatura óptima, la degradación del contaminante aumenta enormemente al aumentar la temperatura, sumado a que, a bajas temperaturas, la solubilidad del contaminante disminuye y su viscosidad aumenta, dificultando el acceso del contaminante a las bacterias (Atlas, 1975; Varjani y Upasani, 2017; Eweis *et al.*, 1999; Prescott *et al.*, 1999).

- **pH del suelo.** De acuerdo con Prescott *et al.* (1999), el pH afecta el crecimiento microbiano, pues cada especie tiene un rango definido de pH para su crecimiento, así como un pH óptimo. La mayoría de las bacterias son neutrófilas, es decir, que su pH óptimo se encuentra entre 5.5 y 8. Además, Das *et al.* (2011) reportan que para las bacterias degradadoras de hidrocarburos, el pH óptimo se encuentra entre 6 y 9.

- **Disponibilidad de oxígeno.** La presencia de oxígeno determina si la degradación es en un sistema aerobio (presencia de oxígeno) o anaerobio (ausencia de oxígeno), sin embargo, se ha determinado que la degradación inicial de hidrocarburos requiere de condiciones aerobias, debido a la acción de enzimas oxigenasas, que requieren la presencia de oxígeno molecular, las cuales son necesarias para romper ciertos enlaces en las moléculas de hidrocarburos (Atlas, 1991). Asimismo, la más rápida y completa degradación de los hidrocarburos se da bajo condiciones aerobias, pues, aunque se tiene evidencia de la degradación bajo condiciones anaerobias, como en sedimentos anóxicos, esta es muy lenta, persistiendo los contaminantes indefinidamente en el ambiente (Yuniati, 2018; Atlas, 1981).
- **Humedad.** La humedad constituye un factor muy importante para la degradación de contaminantes en un suelo, debido a que todos los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano se obtienen de soluciones. Sin embargo, altos contenidos de humedad también indican baja disponibilidad de oxígeno, debido a que los poros del suelo ocupados por agua, impidiendo el paso del oxígeno (Eweis *et al.*, 1991).

De acuerdo con Vidali (2001), un contenido de humedad para una óptima degradación de compuestos como los hidrocarburos varía de entre 30 – 90%, sin embargo, hay estudios que se han tratado suelos con ARA, con diferentes diseños experimentales, manteniendo la humedad del suelo de entre 10 – 60%.

- **Nutrientes.** Estudios han revelado que el papel de los nutrientes es acelerar y estimular la degradación de los contaminantes, pues la deficiencia de estos nutrientes limita la tasa de degradación (Kim *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2002). Los nutrientes que generalmente se necesitan son el nitrógeno y el fósforo, pues los hidrocarburos fungen como fuente de carbono y energía para el metabolismo microbiano (Eweis *et al.*, 1991; Varjani, 2017).

Diversos estudios han utilizado fertilizantes, estiércol o lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales para añadir los nutrientes necesarios para estimular el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos (Ogbeh *et al.*, 2018; Choi *et al.*, 2002; Martínez-Prado *et al.*, 2011). No obstante, se ha reportado que la ausencia de nutrientes afecta positivamente la degradación de

hidrocarburos aromáticos, mientras que la adición de estos (nitrógeno y fósforo), acelera la degradación de los hidrocarburos alifáticos. Por otro lado, un exceso de nutrientes puede tener efectos tóxicos en la comunidad microbiana (Atlas, 1981).

- **Tipo y concentración de hidrocarburos.** Una gran variedad de hidrocarburos del petróleo es totalmente biodegradable, incluidos los alifáticos y aromáticos. Sin embargo, hay otros que son más lentamente degradados o que son recalcitrantes, es decir, no pueden ser degradados, aunado a que una alta concentración de hidrocarburos puede inhibir enormemente el metabolismo microbiano, provocando una deficiente degradación de los contaminantes e incluso la muerte celular (Atlas *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2018). Además, Atlas *et al.* (1995) agregan que la dificultad para biodegradar los hidrocarburos aumenta cuando su solubilidad en agua disminuye.

La susceptibilidad de un hidrocarburo a ser degradado varía con el tipo y tamaño de su estructura molecular, siendo los alcanos lineales los más biodegradables, aumentando su dificultad de degradación conforme aumenta el número de carbonos y ramificaciones en su estructura. Además, los cicloalcanos son menos degradables que sus isómeros de cadenas lineales, y su biodegradabilidad disminuye conforme aumenta el número de anillos en su estructura. En cambio, los cicloalcanos sustituidos con un grupo alquilo son más fácilmente degradables que los que no están sustituidos (Eweis *et al.*, 1991; Atlas y Bartha, 2002).

En contraparte, los hidrocarburos aromáticos son compuestos muy estables, por lo tanto, son difícilmente degradables, y su biodegradabilidad disminuye con el aumento de sus anillos y del número de sustituyentes alquilo. Además, algunos de estos compuestos como los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) y los HAP son considerados recalcitrantes. A pesar de todo, se ha reportado que los HAP pueden ser biodegradados de forma más eficiente en biorreactores y por mecanismos de cometabolismo (Eweis *et al.*, 1991; Wilson y Jones, 1993).

Por último, algunos autores han reportado que la biodegradación de compuestos individuales de hidrocarburos se ve afectada por la presencia de otros hidrocarburos en la mezcla, como lo obtuvieron Olson *et al.* (1999). Ellos encontraron que los hidrocarburos aromáticos presentes en una muestra de

diésel fueron degradados de forma satisfactoria si se encontraban en él hasta un 63% de hidrocarburos alifáticos.

- **Tipo de suelo.** De acuerdo con Vidali (2001), el tipo de suelo, y su estructura, son factores que afectan enormemente la degradación de los contaminantes, pues un suelo con baja permeabilidad impide el movimiento del oxígeno, agua y nutrientes a través del suelo, negando su acceso para lo comunidad microbiana.
- **Comunidad microbiana.** La biorremediación de un sitio contaminado suele ser el resultado de una comunidad de diversas especies de microorganismos (Vidali, 2001). Las ventajas de una comunidad microbiana diversa, como un consorcio, se deben a que presentan diferentes características genéticas que permite degradar una diversidad de compuestos, debido principalmente a efectos sinérgicos y otro tipo de interacciones tanto positivas como negativas entre las diversas especies microbianas, como de simbiosis o comensalismo (Xu *et al.*, 2018; Atlas y Bartha, 2002).

Asimismo, se ha reportado que una óptima degradación de hidrocarburos está relacionada con la concentración del inóculo, sin embargo, a mayor concentración de microorganismos, se aumenta la fase de latencia (lag) en el crecimiento de la comunidad. Algunos autores han reportado diferentes concentraciones microbianas para una óptima degradación de hidrocarburos, como 10^6 UFC/g de suelo o 2% v/v como las concentraciones óptimas (Varjani y Upasani, 2017).

Al mismo tiempo, diferentes especies pueden metabolizar diferentes tipos de hidrocarburos, debido a sus capacidades enzimáticas, siendo el género *Pseudomonas* uno de los más versátiles, pues se ha reportado la degradación de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y compuestos recalcitrantes, tanto en suelo y agua, en diferentes condiciones (Xu *et al.*, 2018)

- **Salinidad.** Diversos estudios han encontrado que un aumento en la salinidad disminuye el metabolismo bacteriano, por lo que afecta negativamente la biodegradación de los hidrocarburos. Este efecto es especialmente importante en ambientes extremadamente salinos (Atlas, 1981).
- **Biodisponibilidad.** Muchos contaminantes, como los hidrocarburos, tienen baja solubilidad en el agua y, por lo tanto, baja biodisponibilidad para los

microorganismos, provocando que la eficacia de la remoción del contaminante disminuya enormemente, siendo uno de los principales factores que restringe la biodegradación (Riojas *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2018).

Para evitar la baja biodisponibilidad de los contaminantes se utilizan surfactantes, los cuáles son moléculas que tienen una fracción hidrofílica polar y otra fracción hidrofóbica no polar. El objetivo de estas moléculas es aumentar la solubilidad y la biodisponibilidad de los contaminantes no polares, mejorando la velocidad de degradación (Riojas *et al.*, 2010). Además, Riojas *et al.* (2010) mencionan que el efecto más importante del surfactante entre el suelo y el contaminante es la estimulación del transporte de masa del contaminante desde el suelo hasta la fase acuosa, donde se da la biodisponibilidad.

Existe una gran variedad de surfactantes, con características y efectos diferentes, que incluso pueden ser tóxicos para el medio ambiente o las bacterias, o competir como fuente de carbono con los hidrocarburos, por lo cual, la elección de un surfactante adecuado, y su concentración, es necesaria para la prevención de una contaminación secundaria por el surfactante o que retrase la remediación del sitio contaminado.

Debido a la dificultad de los microorganismos para acceder a los contaminantes hidrofóbicos, algunos han desarrollado mecanismos para producir sus propios surfactantes, denominados biosurfactantes (Van Hamme *et al.*, 2003). Estos se pueden clasificar de acuerdo con su composición química en glicolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, fosfolípidos, ácidos grasos y poliméricos. Los biosurfactantes presentan las mismas ventajas que los surfactantes sintéticos, aunado a que son más amigables con el medio ambiente, pues son menos tóxicos y biodegradables, sin embargo, presentan la desventaja de que actualmente son muy caros de producir (Riojas *et al.*, 2010).

2.3.4. Mecanismos de degradación de hidrocarburos

Distintos tipos de microorganismos, como las bacterias, son capaces de degradar, bajo diferentes condiciones, los hidrocarburos del petróleo, utilizando diferentes enzimas que permiten y aumentan la velocidad de degradación de los contaminantes, la cual involucra una serie de reacciones metabólicas o rutas de biodegradación que son catalizadas por estas enzimas (Varjani, 2017; Peixoto *et al.*, 2011).

Xu *et al.* (2018) mencionan que las rutas de biodegradación de la gran variedad de hidrocarburos utilizan reacciones de oxidación, sin embargo, estas rutas difieren enormemente, pues diferentes hidrocarburos pueden requerir enzimas específicas e incluso la producción de biosurfactantes, por lo tanto, ciertas especies bacterianas pueden metabolizar ciertos hidrocarburos (Xu *et al.*, 2018; Das y Chandran, 2011). Por ejemplo, algunas especies bacterianas pueden metabolizar ciertos alcanos, mientras que otras rompen las fracciones aromáticas de los mismos. Este fenómeno está relacionado con la estructura química de los componentes de los hidrocarburos del petróleo. Diversos autores han reportado diferentes especies bacterianas y el tipo de hidrocarburos que degradan preferentemente, sin embargo, esto depende de muchos factores, como la biodisponibilidad de los hidrocarburos, sus efectos tóxicos, condiciones ambientales, entre otros (Xu *et al.*, 2018).

La ruta de degradación general para los hidrocarburos por bacterias bajo condiciones aerobias se describe en la Figura 5, en la que se puede observar como la degradación inicial de hidrocarburos requiere de condiciones aerobias debido a un proceso oxidativo catalizado por enzimas oxidasas. Después, los mecanismos de degradación periféricos, que varían de microorganismo en microorganismo y del tipo de hidrocarburos, convierten los compuestos orgánicos en intermediarios del metabolismo, incorporándose en el ciclo de Krebs. Al final, como productos del metabolismo se sintetiza biomasa celular (crecimiento celular) y agua y dióxido de carbono como productos de la respiración celular (Das y Chandran, 2011).

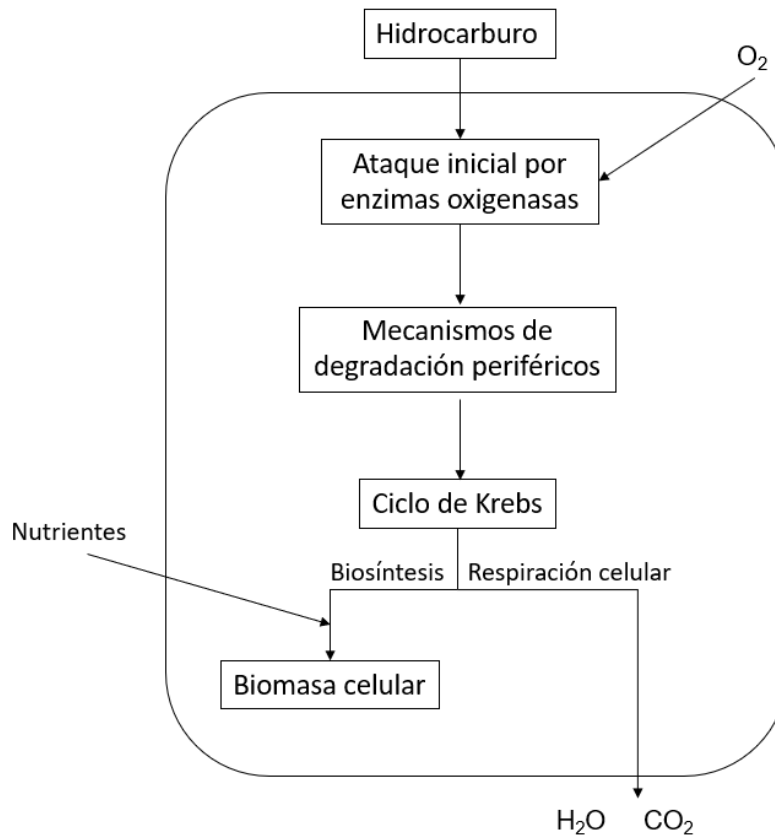


Figura 5. Mecanismo principal de degradación aeróbica de hidrocarburos por una célula microbiana. Adaptado de Das y Chandran, 2011.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestreo

Se recolectaron muestras de suelo, de un taller mecánico automotriz abandonado, el 28 de septiembre de 2019 en el municipio de Empalme, Sonora. Estas muestras, que se pueden observar en la Figura 6, fueron transportadas en bolsas de plástico, cerradas herméticamente, al Laboratorio de Biorremediación de la Universidad de Sonora, donde se almacenaron a una temperatura de 4 °C para su posterior análisis. En la Figura 7 se puede observar la localización de dicho taller mecánico, que cuenta con las siguientes coordenadas de latitud y longitud, respectivamente: 27.958464, -110.802380.



Figura 6. Muestras de suelo contaminado.



Figura 7. Localización del lugar de muestreo. Google Maps, 2022.

3.2. Caracterización Físicoquímica del Suelo

Para conocer las características del suelo con el que se está trabajando, es necesario caracterizarlo. Para ello, el suelo se tamizó con una malla de 2 mm de diámetro de poro, con el objetivo de homogenizarlo y eliminar los restos de rocas, hojas, raíces y otras posibles interferencias (Abdulsalam y Omale, 2009).

Como pruebas de caracterización, se realizaron la determinación del pH, contenido de humedad, conductividad eléctrica, contenido de materia orgánica y la cuantificación de hidrocarburos totales del petróleo, las cuales se describen en las siguientes secciones.

3.2.1. pH

El pH es una de las mediciones más comunes e importantes en los análisis químicos rutinarios del suelo, ya que controla reacciones químicas y biológicas del suelo (NOM-021-RECNAT-2000). Para la determinación del pH en el suelo se utilizó el método AS-02 de la NOM-021-RECNAT-2000, que consistió en medir el pH a una solución de suelo y agua destilada, compuesta por 20 mL de agua destilada en 10 g de suelo. La solución fue agitada a intervalos de 5 minutos por 30 minutos y se dejó reposar 15 minutos, para después medir el pH con un potenciómetro Fisher Scientific accumet XL60, calibrado adecuadamente.

3.2.2. Contenido de humedad

De acuerdo con Topp *et al.* (2008), el contenido de humedad en el suelo es vital en el ciclo hidrológico, ya que controla el intercambio de agua con la atmósfera y las aguas subterráneas. Además, el agua actúa como lubricante y aglutinante entre los materiales particulados del suelo, lo que influye en la estabilidad estructural y resistencia del suelo. Asimismo, Topp *et al.* (2008) mencionan que el agua sirve como agente de transporte para los químicos inorgánicos disueltos y los compuestos biológicos suspendidos que están involucrados en los procesos de degradación y desarrollo del suelo, y concluyen, que la medición del contenido de humedad es importante para cuantificar el balance

hídrico y para la caracterización de la mayoría de los procesos físicos, químicos y biológicos del suelo.

El agua es un requisito indispensable para el desarrollo bacteriano, porque en su composición, las bacterias poseen 80% de agua, además de que para sobrevivir requieren ambientes húmedos, pues el ambiente excesivamente seco es lesivo para la mayoría de los microorganismos (Montoya, 2008).

Para la determinación del contenido de humedad del suelo, se utilizó el método propuesto por Fernández *et al.* (2006), el cual es un método gravimétrico que consistió en determinar únicamente la cantidad de agua en el suelo, por diferencia de peso entre una misma muestra antes y después de ser secada en un horno, hasta que se obtuvo un peso constante. Para esto, se prepararon muestras de suelo (1 g) en charolas de aluminio, y se colocaron en un horno de convección Thermo Scientific 6530 a 80 °C de 12 a 24 horas, hasta que se obtuvo un peso constante. Después, las muestras se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron.

Después de haber secado la muestra, el porcentaje de humedad se calculó mediante la Ec. (1).

$$\% \text{Humedad} = \left(\frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \right) (100\%) \quad (1)$$

Donde:

%Humedad = Porcentaje de humedad de la muestra

Peso inicial = Peso de la muestra de suelo antes de secarla en el horno

Peso final = Peso de la muestra de suelo después de secarla en el horno

3.2.3. Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica es la propiedad de un material que le permite conducir el flujo de la electricidad (NOM-021-RECNAT-2000). De acuerdo con Fernández *et al.* (2006), la conductividad eléctrica es una medida indirecta de la salinidad del suelo.

La determinación de la conductividad eléctrica se midió en el extracto de saturación del suelo, con un conductímetro HI 8633, siguiendo el método AS-18 de la NOM-021-RECNAT-2000. Para poder determinar la conductividad eléctrica del suelo, se preparó el extracto de saturación, por el método AS-16 de la misma norma, por succión al vacío de la pasta de saturación. Para la succión al vacío de la pasta de saturación se utilizaron filtros de microfibras de vidrio Whatman.

La NOM-021-RECNAT-2000 define la pasta de saturación como una mezcla particular entre el suelo y agua, donde la pasta tiene la propiedad de reflejar la luz, fluir la mezcla, y que tiende a unirse cuando es cortada con una espátula. Por otro lado, el término extracto de saturación se usa en este método para designar al extracto acuoso que se obtiene por filtración al vacío de la pasta de saturación.

3.2.4. Contenido de materia orgánica

El contenido de materia orgánica del suelo se refiere a su fracción orgánica, que está compuesta por residuos de plantas, animales, células microbianas y productos resultantes de su metabolismo, también denominado humus, el cual constituye una mezcla compleja de compuestos, los cuales son ligeramente solubles en agua, y en algún grado, resistentes a la biodegradación (Eweis *et al.*, 1999). Alba (2011) señala que la materia orgánica tiene funciones específicas en la fertilidad del suelo, productividad y preservación del ambiente, funcionando como alimento para los microorganismos del suelo y afectando a las propiedades físicas del mismo.

Para la determinación del contenido de materia orgánica en el suelo, se utilizó el método AS-07, de Walkley y Black, propuesto en la NOM-021-RECNAT-2000. El método consistió en la determinación de la materia orgánica a través del contenido de carbono

orgánico, midiendo este último con su oxidación por medio de una disolución de dicromato de potasio y el calor generado al mezclarlo con ácido sulfúrico concentrado.

El porcentaje de carbono orgánico se obtuvo mediante la Ec. (2).

$$\% \text{Carbono Orgánico} = \left(\frac{B - T}{g} \right) (N)(0.39)FH \quad (2)$$

Donde:

B = Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar el blanco de reactivos en mL

T = Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar la muestra en mL

N = Normalidad del sulfato ferroso

g = Peso de la muestra empleada en g

FH = Factor de corrección de humedad

El factor de corrección de humedad (FH) se obtuvo por la Ec. (3).

$$FH = 1 - \frac{\% \text{Humedad}}{100} \quad (3)$$

El porcentaje de materia orgánica se estimó utilizando el factor de Van Benmelen de 1.724 o 1/0.58, el cual supone que la materia orgánica contiene un 58% de carbono orgánico. Lo anterior se expresó mediante la Ec. (4).

$$\% \text{Materia orgánica} = (\% \text{Carbono Orgánico})(1.724) \quad (4)$$

3.2.5. Hidrocarburos totales del petróleo (HTP)

Una de las partes fundamentales de la caracterización del suelo para este estudio, es la cuantificación de los hidrocarburos. La extracción de los hidrocarburos se efectuó con la técnica de extracción por reflujo (Soxhlet), reportada por Fernández *et al.* (2006). La técnica de extracción Soxhlet, es una técnica de extracción para sólidos, en el que la muestra se hace contacto en repetidas ocasiones con un solvente, aumentando la eficiencia de extracción. Es muy utilizada para la extracción de componentes semivolátiles (Weisman, 1998).

La extracción de hidrocarburos por Soxhlet provee fracciones de hidrocarburos desde 6 carbonos hasta 50 carbonos. Para una óptima extracción de los compuestos orgánicos, los sólidos deben estar reducidos a pequeñas partículas antes de comenzar la extracción. El desarrollo de este método incluye encontrar un solvente con alta afinidad a los analitos y baja afinidad a la matriz de muestra sólida (suelo), además de tener alta volatilidad, para poder ser removido fácilmente al final de la extracción (Fernández *et al.*, 2006).

El método consistió en adicionar el solvente extractante a un matraz de bola, con perlas de vidrio, a peso constante. El matraz se colocó en el equipo de extracción Soxhlet (con la muestra de suelo) y se llevó al punto de ebullición del solvente. El solvente se evaporó y, cuando los vapores pasaron por el condensador, se condensaron, cayendo al recipiente en donde se encontraba la muestra de suelo, por lo que el solvente empezó a extraer los hidrocarburos. Una vez que se llegó a cierto nivel de altura del líquido en el recipiente de extracción, se creó un sifón, por lo que el solvente y los hidrocarburos extraídos cayeron al matraz de bola, completándose un ciclo de extracción. Esto se repitió hasta que se extrajeron completamente los hidrocarburos, lo cual se detectó por la coloración del solvente. En este caso, el solvente utilizado fue hexano, debido a su bajo punto de ebullición y su selectividad, además se utilizaron cartuchos de celulosa con tapón de algodón para colocar la muestra de suelo. En la Figura 8 se muestra el diseño experimental de la extracción Soxhlet.

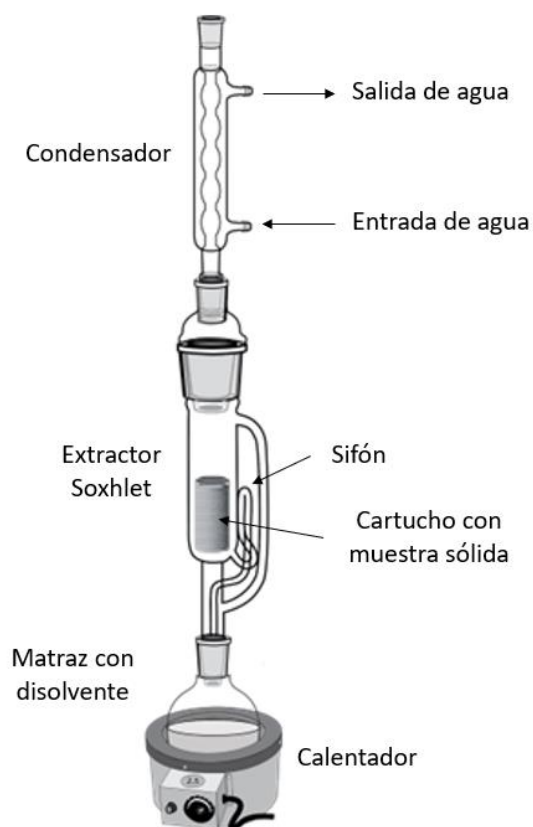


Figura 8. Diseño experimental de la extracción por reflujo Soxhlet. Adaptado de De Química, 2022.

Una vez extraídos los hidrocarburos, se utilizó un método gravimétrico para la cuantificación de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP), reportado por Fernández *et al.* (2006), en el que se evaporó el solvente del matraz, quedando únicamente con el extracto orgánico (hidrocarburos), y después se pesó en una balanza analítica. La concentración de HTP se reportó en mg/kg de sólido seco, por medio de la Ec. (5).

$$\text{HTP} = \frac{1000(R_B - R_A)}{P \cdot \text{FH}} \quad (5)$$

Donde:

HTP = Hidrocarburos totales del petróleo de la muestra de suelo en mg/kg de suelo seco

R_A = Peso del recipiente vacío a peso constante en mg

R_B = Peso del recipiente con el hidrocarburo concentrado en mg

P = Cantidad de suelo extraído en g

FH = Factor de corrección de humedad

El factor de corrección de humedad (FH) se calculó con la Ec. (3), así como en la determinación del contenido de materia orgánica.

La medición de los HTP es una indicación bastante aceptable del grado de contaminación de suelos afectados por derivados del petróleo, debido a que cuando los productos del petróleo se liberan al ambiente, estos participan en una gran cantidad de procesos de degradación y descomposición que alteran sus propiedades fisicoquímicas (Méndez *et al.*, 2010).

3.3. Aislamiento de Bacterias

Con el objetivo de aislar las bacterias autóctonas del suelo contaminado, se trabajó con la siguiente metodología, descrita en la Figura 9.

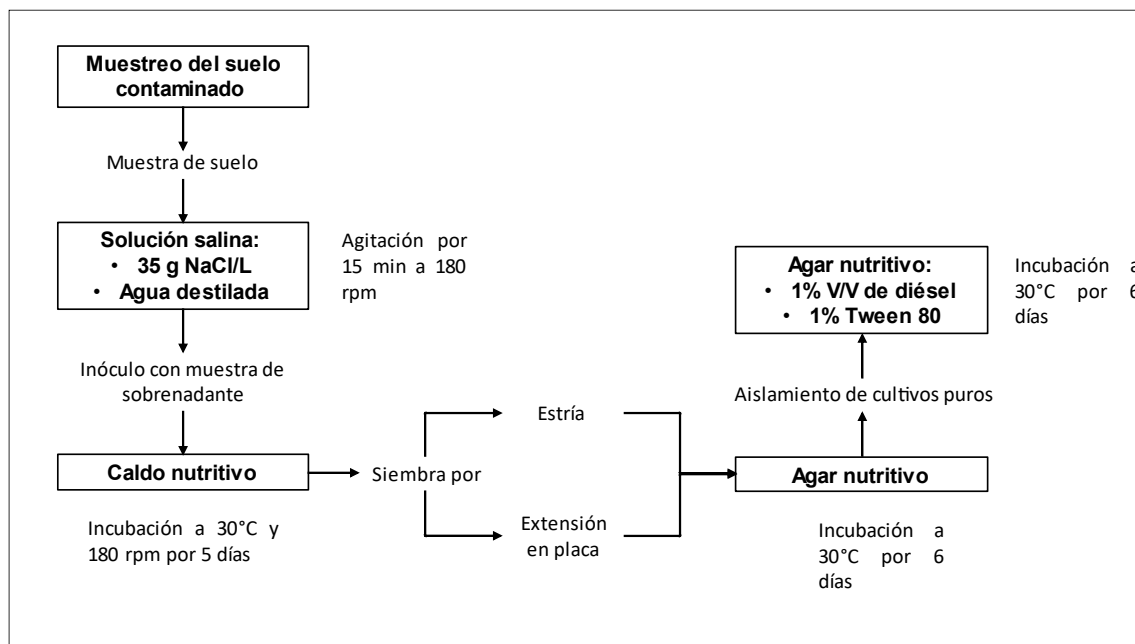


Figura 9. Metodología del aislamiento de bacterias del suelo.

Primero, siguiendo el procedimiento de Narváez *et al.* (2008), se agregaron 11.11 g de una muestra del suelo contaminado a 100 mL de una solución salina esterilizada (con una concentración de 35 g/L de NaCl en agua destilada). Esta solución suelo-salina se agitó a 180 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Se extrajeron 10 mL del sobrenadante y se transfirieron a 90 mL de Caldo nutritivo (Anexo A) previamente esterilizado, el cual se incubó a 30 °C y 180 rpm por 5 días en una incubadora CScientific CVP – 500.

Ya que se observó crecimiento en el Caldo nutritivo, se realizó una inoculación en medio sólido con Agar nutritivo (Anexo A) en placas Petri, utilizando dos técnicas de sembrado

(estría simple y extensión en placa). Las placas Petri inoculadas fueron incubadas a 30 °C por 6 días en una incubadora Lindberg Blue M.

Una vez que se observaron diferentes tipos de colonias de microorganismos del suelo contaminado en las placas Petri, se procedió a aislarlos en cultivos bacterianos puros, diferenciándolos en base a la morfología y características de la colonia (Jensen, 1975). Un cultivo puro es una población de microorganismos de un mismo tipo que se producen a partir de una sola cepa (Hernández, 2003). Para lo anterior, se resembraron las colonias en placas Petri con Agar nutritivo, consecutivamente, hasta obtener cultivos puros (crecimiento de un solo tipo de colonias en las placas), utilizando la técnica de sembrado de estría por agotamiento. Después, las placas fueron incubadas a 30 °C por 6 días. En todo el procedimiento del aislamiento se utilizaron controles de esterilidad.

Para seleccionar las cepas bacterianas con tolerancia a los hidrocarburos y que potencialmente los degraden, los cultivos puros seleccionados se resembraron en medio sólido enriquecido con diésel, denominado Agar diésel (Anexo A), preparado con Agar nutritivo, al que se le adiciono 1% v/v de diésel, como fuente de hidrocarburo, y 1% v/v de Tween 80, como agente surfactante. Todas las cepas se incubaron a 30 °C por 6 días en una incubadora Lindberg Blue M.

Se decidió utilizar una concentración baja de diésel debido a que los hidrocarburos son compuestos lipofílicos, que a concentraciones altas pueden inhibir el crecimiento de microorganismos, produciendo intoxicación, induciendo en las bacterias una respuesta de estrés y cambios celulares a nivel de la membrana, enzimas y proteínas (Narváez *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2018). Además, se utilizó Tween 80 como agente surfactante, debido a que algunos autores han demostrado que este es uno de los mejores surfactantes para la degradación de hidrocarburos (Palanisamy *et al.*, 2014), como lo demostraron Celik *et al.* (2008), quienes compararon el efecto de los surfactantes Tween 80 y TritonX-100 sobre la biodegradación de hidrocarburos en un medio mineral, utilizando diferentes cepas bacterianas a distintas concentraciones de petróleo crudo. Ellos concluyeron que ambos surfactantes aumentaron el porcentaje de degradación, siendo el Tween 80 el más efectivo a concentraciones bajas (1% en volumen), debido a que a concentraciones mayores puede llegar a ser tóxico para los microorganismos.

3.4. Tinción Diferencial

Con el fin de identificar las diferentes cepas bacterianas aisladas, primero se realizó una identificación preliminar por medio de una tinción diferencial, utilizando la tinción de Gram. Este método se utilizó para clasificar a las bacterias en dos clases: gramnegativas y grampositivas. De acuerdo con Prescott *et al.* (1999) una de las principales diferencias entre estos dos tipos de bacterias radica en su pared celular, puesto que la pared de una célula grampositiva está formada por una única capa homogénea, de 20 a 80 nm de grosor, situada por fuera de la membrana celular, mientras que la pared de una célula gramnegativa posee una capa de 2 a 7 nm de grosor rodeada por una membrana externa de 7 a 8 nm.

El procedimiento general para la tinción de Gram se muestra en la Figura 10, y consistió en lo siguiente:

1. Colocar una muestra de una cepa bacteriana pura en un portaobjetos limpio.
2. Fijar la muestra al portaobjetos pasándola suavemente por el mechero, evitando quemar la muestra.
3. Cubrir la muestra con el colorante violeta de genciana y esperar un minuto.
4. Escurrir el colorante, cubrir con solución de Gram Yodo y esperar un minuto.
5. Lavar la muestra con solución de alcohol acetona hasta decoloración. Sacudir la muestra para evaporar la solución de alcohol acetona.
6. Cubrir la muestra con el colorante de safranina y esperar un minuto.
7. Lavar la muestra repetidas veces con agua destilada, hasta que no se observen residuos de colorante.
8. Esperar a que se seque la muestra y observar al microscopio.

Al finalizar la tinción, las bacterias grampositivas retienen el colorante de violeta de genciana, y las gramnegativas el colorante de safranina. Reynoso *et al.* (2015) mencionan que las bacterias reaccionan de forma distinta a la tinción de Gram porque las diferencias estructurales en sus paredes determinan la retención o el escape del complejo cristal violeta/yodo. Por lo tanto, las gramnegativas permanecen incoloras hasta que se agrega el colorante de contraste rojo.

Después de realizar la tinción de Gram, se observaron las muestras teñidas en un microscopio óptico National DC3-163 con un objetivo de 100X utilizando aceite de inmersión.

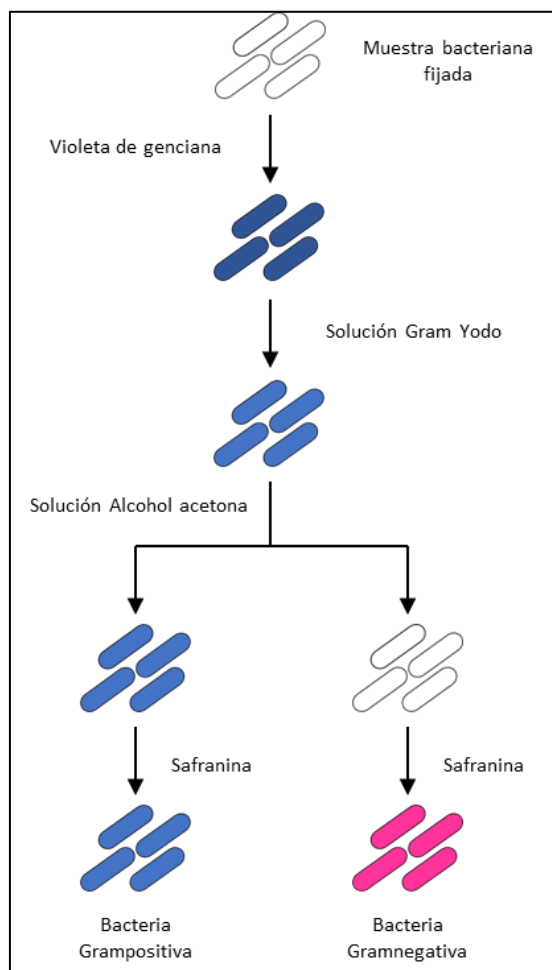


Figura 10. Procedimiento de la tinción de Gram.

3.5. Pruebas Bioquímicas

A continuación, se muestran las pruebas bioquímicas utilizadas para determinar el género y la especie de las cepas bacterianas aisladas.

3.5.1. Catalasa

La catalasa es una enzima que está presente en la mayoría de las bacterias aerobias y aerobias facultativas. Esta enzima tiene el objetivo de descomponer el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno (O_2) y agua (H_2O), con el objetivo de proteger los componentes celulares, debido a que el peróxido de hidrógeno es un compuesto tóxico que se genera en presencia de oxígeno, razón por la cual esta enzima está presente en la mayoría de los organismos aerobios (Madigan *et al.*, 2015).

Para evaluar la presencia de la enzima catalasa se utilizó el método en portaobjeto (MacFaddin, 2003), por duplicado. El método consistió en recoger, con un asa bacteriológica, el centro de una colonia de un cultivo puro de 18 a 24 h de incubación. Esta muestra se colocó en un portaobjetos de vidrio limpio, para después agregarle una gota de H_2O_2 al 30%. En este método se debe observar la producción de burbujeo (liberación de gas) y registrar el resultado, siendo un resultado positivo (+) la producción de O_2 , es decir, la presencia de burbujeo, y un resultado negativo (-) la ausencia de burbujeo.

3.5.2. Agar MacConkey

El medio de cultivo Agar MacConkey (Anexo A) es un medio selectivo que inhibe el crecimiento de las bacterias grampositivas, debido a la presencia de sales biliares y el cristal violeta en la formulación del medio. Este medio se utiliza para la diferenciación de las bacterias que pueden fermentar la lactosa y las que no pueden hacerlo. Esto se puede observar debido a la presencia del rojo neutro como indicador de pH, pues la fermentación de la lactosa disminuye el pH, produciendo un cambio de color del medio (rojo neutro en su estado normal) y la absorción en las colonias, además de la posible precipitación de las sales biliares (Britanialab, 2021).

Para esta prueba, se preparó el medio de Agar MacConkey en un matraz y se esterilizó en una autoclave, para después vaciarse en placas Petri en condiciones de esterilidad. Se inocularon las placas Petri con las cepas bacterianas, con la técnica de sembrado de estría por agotamiento, utilizando asas bacteriológicas, con el objetivo de obtener colonias separadas. Se incubaron las placas Petri a 35 °C durante 24 horas, y se observaron los resultados. Si se tienen colonias rosadas-rojizas, además de un cambio de color a un rojo más intenso en el medio, con la posible precipitación de las sales biliares, es indicador de un microorganismo fermentador de lactosa (Lac +), mientras que, si se tienen colonias incoloras o del color del medio, se tiene un microorganismo no fermentador de la lactosa (Lac -).

3.5.3. Citrato

De acuerdo con MacFaddin (2003), el objetivo de la prueba de citrato es determinar si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento, con alcalinidad resultante.

Para la prueba de citrato se utilizó el medio sólido de Citrato de Simmons (Anexo A), que contiene el citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) como única fuente de carbono, y azul de bromotimol como indicador de pH, siendo que el medio presenta un color verde al prepararse y no presentar crecimiento bacteriano (pH neutro), color amarillo a un pH ácido y color azul a un pH alcalino.

Se preparó el medio de Citrato de Simmons en tubos de ensayo a los que se les añadió 10 mL del medio, y fueron esterilizados, con tapón de algodón, en una autoclave. Después, se dejaron enfriar en posición inclinada, para que se forme un pico de flauta largo, y un extremo inferior corto. Luego, se inocularon los tubos de ensayo, utilizando los cultivos bacterianos, por duplicado, por estría en la superficie del medio, y se incubaron a 35 °C por 48 horas. Al finalizar el periodo de incubación se observaron los tubos de ensayo, siendo un resultado positivo (+) un crecimiento en el medio con un intenso color azul en el pico de flauta, y un resultado negativo (-), ausencia de crecimiento y ningún cambio en el color del medio (verde).

3.5.4. Agar de triple azúcar y hierro (TSI)

De acuerdo con MacFaddin (2003), el objetivo de la prueba en agar de triple azúcar y hierro (Agar TSI) es determinar la capacidad de un microorganismo para atacar un hidrato de carbono específico, con producción de gas o sin ella, junto con la determinación de la producción de ácido sulfhídrico (H_2S). El medio de Agar TSI (Anexo A) es un medio diferencial que contiene tres hidratos de carbono, lactosa, glucosa (dextrosa) y sacarosa, que ayuda a diferenciar las diferentes bacterias de acuerdo con que hidrato de carbono es fermentado. El medio contiene también tiosulfato de sodio para la producción de ácido sulfhídrico, y sulfato de hierro y amonio para su detección (color negro). Además, contiene rojo de fenol, como indicador de pH, debido a que la fermentación de azúcares produce ácidos, provocando que el medio cambie de su color basal (rojo) a amarillo. Por otro lado, las fermentaciones de hidratos de carbono pueden producir gas en forma de dióxido de carbono (CO_2) e hidrógeno (H_2).

Debido a que este medio se tiene que solidificar en tubos de ensayo en posición inclinada, la fermentación de los hidratos de carbono puede ser en aerobiosis (pico de flauta o parte superior del medio), o en anaerobiosis (en el fondo del medio).

Primero se preparó el medio distribuido en tubos de ensayo con tapones de algodón, a los cuales se les agregó 10 mL del medio preparado, se esterilizaron en una autoclave y se dejaron enfriar en posición inclinada, dejando que se forme un pico de flauta con fondo profundo. Después, se inocularon los tubos de ensayo utilizando los cultivos bacterianos, por duplicado, con una aguja de inoculación, punzando el centro del medio hasta la mitad de profundidad y luego estriando la superficie. Se incubaron los tubos de ensayo a $35\text{ }^{\circ}C$ por 24 horas y, pasado ese tiempo, se revisaron para su interpretación. En este medio existen tres posibles resultados, los cuales se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Interpretación de los resultados del medio Agar TSI. (MacFaddin, 2003).

Reacción	Interpretación
Alc/A ^a (rojo/amarillo)	Sólo la glucosa es fermentada. Las peptonas fueron utilizadas.
A/A ^b (amarillo/amarillo)	Glucosa y lactosa fermentadas
Alc/Alc ^c (rojo/rojo)	Ausencia de fermentación de la glucosa y la lactosa. Las peptonas fueron utilizadas.

^a Pico de flauta alcalino (rojo) y fondo ácido (amarillo). ^b Pico de flauta y fondo ácidos (amarillo). ^c Pico de flauta y fondo alcalinos (rojo).

Además, la presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican que el microorganismo produce gas. Por otro lado, el ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.

3.5.5. Movilidad

Según MacFaddin (2003), el objetivo de la prueba de movilidad es determinar si un microorganismo es móvil o inmóvil. Las bacterias pueden ser móviles por medio de flagelos, y pueden presentar uno o varios. Para evaluar esta prueba se utilizó el medio semisólido SIM (Anexo A), que se utiliza para determinar la producción de ácido sulfhídrico, indol y la movilidad de microorganismos. Primero se preparó el medio distribuido en tubos de ensayo con tapones de algodón, a los cuales se les agregó 10 mL del medio y se esterilizaron en una autoclave. Después se procedió a inocular los tubos de ensayo preparados, con los cultivos bacterianos, con una aguja de inoculación, punzando el centro del medio hasta la mitad de profundidad. Se incubaron los tubos de ensayo a 35 °C y se revisaron para su interpretación a las 24 y 48 horas de incubación. Un resultado positivo (+) de movilidad se muestra como un crecimiento difuso hacia fuera de la línea de inoculación, o turbidez en el medio, mientras que un resultado negativo (-) no lo muestra.

3.5.6. Producción de ácido sulfhídrico

De acuerdo con MacFaddin (2003), el objetivo de la prueba de ácido sulfhídrico es determinar si se ha liberado enzimáticamente ácido sulfhídrico (H_2S) gaseoso a partir de los aminoácidos azufrados. Un microorganismo productor de H_2S cultivado en un medio orgánico como la peptona, reduce el azufre por hidrogenación, produciendo H_2S gaseoso. Para detectar la presencia de H_2S , se utilizan indicadores de sulfuro, los cuales varían entre los medios de cultivo. Para esta prueba se utilizaron dos medios de cultivo diferentes, el Agar TSI y el medio SIM, para los cuales su preparación se discutió en la prueba de Agar TSI y de movilidad, respectivamente. En ambos medios, la detección de H_2S se verificó por ennegrecimiento en el medio a las 24 h de incubación después de su respectiva inoculación.

3.5.7. Indol

El objetivo de la prueba de indol es determinar la capacidad de un microorganismo para separar indol a partir del triptófano. El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias, debido a la presencia de enzimas triptofanasa, a indol, escatol y ácido indolacético. El indol liberado de la molécula de triptófano puede detectarse por medio de un reactivo que involucra una combinación química que produce un color definido (MacFaddin, 2003).

En esta prueba se utilizó el medio SIM para evaluar la producción de indol. Se preparó el medio en tubos de ensayo, al igual que en las pruebas de ácido sulfhídrico y de movilidad. Después de incubar los tubos de ensayo a 35 °C por 36 horas, se agregaron 5 gotas del reactivo de Kovacs a cada tubo, para detectar la presencia de indol, debido a que el indol se combina con la capa de alcohol (que contiene el reactivo de Kovacs), produciendo un cambio en la coloración. Un resultado positivo (+) presenta un anillo rojo (fucsia brillante) entre la superficie del medio y la capa alcohólica, mientras que un resultado negativo (-) no muestra ningún cambio de color o muestra un anillo turbio. Por otro lado, un resultado variable (\pm) muestra un color anaranjado en la superficie del medio.

3.5.8. Rojo de metilo (MR)

La prueba de rojo de metilo (MR) es una prueba basada en el uso de un indicador de pH, el rojo de metilo, para determinar el pH cuando un microorganismo fermenta la glucosa o la dextrosa. Los microorganismos MR positivos producen ácidos estables, lo que mantiene el pH bajo, mientras que los MR negativos producen ácidos menos estables, en la que los ácidos orgánicos se degradan a carbonatos y dióxido de carbono (MacFaddin, 2003).

Para esta prueba se preparó el medio líquido MR-VP (Anexo A), basado en la fórmula de Clark y Lubs, en tubos de ensayo (con tapón de algodón), a los cuales se les agregó 10 mL del medio y se esterilizaron en autoclave. Después se inocularon con las cepas bacterianas de cultivos preparados en Agar TSI reciente (18 – 24 h), con un asa bacteriológica, y se incubaron a 35 °C. Se prepararon suficientes tubos de ensayo para realizar la prueba a las 48, 72 y 96 horas de incubación. Finalizado el periodo de incubación, se agregaron 5 gotas del indicador de rojo de metilo y se interpretó el resultado. Un resultado positivo (+) se muestra por una coloración roja brillante en la superficie del medio e indica que el cultivo produce los suficientes ácidos para disminuir el pH del medio. Un resultado negativo (-) se muestra por una coloración amarilla en la superficie del medio. En cambio, una reacción tardía (±) verifica por una coloración naranja rojiza en la superficie del medio, indicando que el microorganismo produce menos ácido a partir de la dextrosa (en comparación con un microorganismo con reacción positiva).

3.5.9. Voges-Proskauer

La prueba de Voges-Proskauer (VP) se basa en determinar la capacidad de algunos microorganismos para producir un producto final neutro (acetoína) a partir de la fermentación de la glucosa o dextrosa (MacFaddin, 2003). Al igual que en la prueba de MR, para esta prueba también se utilizó el medio MR-VP, en tubos de ensayo, los cuales se esterilizaron y se inocularon con las cepas de cultivos preparados en Agar TSI reciente (18 – 24 h), con un asa bacteriológica. Posteriormente se incubaron a 35 °C, y se interpretaron los resultados a las 24 y 48 horas de incubación.

Para interpretar los resultados de la prueba de VP, se prepararon los reactivos VP de Barrit: α -naftol (5 g en 100 mL de etanol absoluto) e hidróxido de sodio (NaOH) al 40%. Al terminar la incubación, se agregaron 6 gotas de α -naftol y 2 gotas NaOH al 40% a los tubos de ensayo, respectivamente, y se agitaron durante 1 minuto. Se dejaron reposar los tubos de ensayo hasta 1 hora para seguir con la interpretación de la prueba. Un resultado VP positivo (+) se muestra con una coloración rosado-rojo en la superficie del medio, lo cual indica que hay acetoina presente. Un resultado VP negativo (-) no muestra cambio de color en los reactivos agregados en la superficie del medio (color cobrizo).

En cuanto a la química de acción de los reactivos de Barrit, estos se utilizaron para la detección de la acetoina. El α -naftol es un catalizador que actúa como intensificador del color, y debe ser agregado en primer lugar, mientras que el NaOH al 40% se agrega para absorber el CO₂ producido en el medio, y actúa como agente oxidante en la reacción entre la acetoina y el α -naftol, produciendo un color rosado-rojo al reaccionar con la peptona presente en el medio (MacFaddin, 2003).

3.5.10. Agar de eosina y azul de metileno (EMB)

El Agar EMB (Anexo A) es un medio selectivo y diferencial. Es un medio selectivo, debido a que solo permite el crecimiento de bacilos gramnegativos, y diferencial, debido a que permite la diferenciación entre organismos que fermentan la lactosa y/o la sacarosa, y los que no pueden fermentar ni la lactosa ni la sacarosa. Este medio logra la selectividad debido a la presencia de la eosina y el azul de metileno, pues estos compuestos inhiben el crecimiento de una amplia variedad de bacterias grampositivas (Britanialab, 2021).

Para evaluar esta prueba, primero se prepararon placas Petri con Agar EMB en condiciones de esterilidad. Se inocularon las placas con los cultivos bacterianos, con un asa bacteriológica, por la técnica de estría por agotamiento, para obtener las colonias separadas. Se incubaron las placas a 35 °C por 24 horas, y se observaron las colonias para obtener los resultados.

Un resultado positivo (+) se puede apreciar con la formación de colonias de color negro azulado o amarronado, que pueden tener el centro oscuro y brillo metálico, mientras que un resultado negativo presenta colonias del color del medio, es decir, incoloras. Un

resultado positivo indica que los microorganismos son capaces de fermentar la lactosa y/o la sacarosa, mientras que un resultado negativo indica que no pueden fermentar ninguna de las azúcares que componen el medio (Britanialab, 2021).

3.6. Conformación del Consorcio Bacteriano

Con el objetivo de seleccionar las cepas bacterianas más aptas para formar parte del consorcio bacteriano para el tratamiento del suelo contaminado, se evaluó la actividad lipolítica y la tolerancia a los hidrocarburos.

3.6.1. Actividad lipolítica

De acuerdo con Gupta *et al.* (2003), la actividad lipolítica indica la presencia de enzimas lipasas, las cuales catalizan reacciones metabólicas, como la hidrólisis de los triglicéridos, liberando ácidos grasos o glicerol. Las lipasas son enzimas especiales, debido a que interactúan en la interfase agua/aceite, por lo que son de interés especial para la biorremediación de compuestos hidrofóbicos, como son los hidrocarburos. Además, Carvalho-Gonçalves y Gorchach-Lira (2018) han relacionado la producción de lipasas con la producción de biosurfactantes, siendo estos últimos, otro tipo de compuestos que está involucrado en el metabolismo de compuestos hidrófobos.

Para detectar la actividad lipolítica de las cepas bacterianas, se utilizó un método cualitativo, utilizando el medio de Agar rodamina B (Anexo A) en placas Petri, pues es un método que no es sensible a los cambios de pH y permite el aislamiento de microorganismos (Kouker y Jaeger, 1987). Para la preparación del medio de cultivo, se esterilizaron todos los componentes, disueltos en agua destilada, a excepción de la solución de rodamina B, la cual fue esterilizada por filtración utilizando un filtro de 40 μm . Después, el medio se vació en placas Petri, para inocularlas con las cepas bacterianas por la técnica de sembrado de estría por agotamiento.

La actividad lipolítica se detectó en los medios de cultivo después de 48 h de incubación a 30 °C, irradiando las placas Petri con una lámpara de luz UV (ultravioleta) a una longitud de onda de 395 nm. La presencia de lipasas se observó por la aparición de un

halo de fluorescencia de color naranja alrededor de las colonias cuando fueron irradiadas con luz UV, debido a que la rodamina B forma un complejo fluorescente con los ácidos grasos, los cuáles son un producto de la hidrólisis de las lipasas (Kouker y Jaeger, 1987; Gupta *et al.*, 2003).

3.6.2. Tolerancia a los hidrocarburos

Se evaluó la tolerancia a los hidrocarburos a las cepas bacterianas que mostraron un resultado positivo a la actividad lipolítica, con el fin de seleccionar las más aptas para degradar hidrocarburos. Para ello, se prepararon placas Petri con Agar diésel (Anexo A), variando únicamente la concentración de diésel (hidrocarburo), siendo 1%, 3% y 5% v/v las concentraciones elegidas. Después, se inocularon con las cepas seleccionadas, y se incubaron a 30 °C, monitoreando su crecimiento a las 24 y 48 h.

También se hizo otra prueba evaluando la utilización de los hidrocarburos como única fuente de carbono, en un medio mineral sólido con diésel como única fuente de carbono, denominado Agar MMD (Anexo A), basándose en el medio agar Bushnell Haas, variando la concentración de diésel (1% y 3% v/v). Al igual que con el medio anterior, se inocularon las cepas seleccionadas en placas Petri con el medio Agar MMD, y se incubaron a 30 °C por 5 días, para monitorear su crecimiento.

3.6.3. Curva de crecimiento

Una vez seleccionadas las cepas más tolerantes a los hidrocarburos y con un resultado positivo a la actividad lipolítica, se procedió a conformar el consorcio bacteriano en matraces Erlenmeyer de vidrio de 250 mL conteniendo 100 mL de Caldo nutritivo, a los cuales se le agregaron una concentración de 10^6 UFC/ml de cada cepa seleccionada (Narváez *et al.*, 2008).

Para lo anterior, cada cepa seleccionada se cultivó individualmente en matraces Erlenmeyer de vidrio de 250 mL con 100 mL de Caldo nutritivo, el cual se inoculó con cultivo proveniente de Agar nutritivo, con un asa bacteriológica. Los matraces con cada cepa se incubaron a 30 °C y 150 rpm en una incubadora CScientific CVP – 500. Para conocer la concentración celular de cada cultivo, se utilizó la técnica de conteo en placa,

siguiendo el procedimiento reportado en la NOM-092-SSA1-1994, utilizando placas Petri con Agar diésel para el conteo, con el fin de obtener únicamente cultivos que toleren los hidrocarburos y evitar posibles contaminaciones y errores en el conteo, y se incubaron a 30 °C por 24 h.

Una vez conformado el consorcio bacteriano, se prepararon varios matraces Erlenmeyer de vidrio de 250 mL con 100 mL de Caldo nutritivo con el consorcio seleccionado, con el objetivo de monitorear el crecimiento a 30 °C y 150 rpm para elaborar una curva de crecimiento, pues se requiere conocer el tiempo en que el cultivo se encuentra en su fase exponencial, debido a que es la etapa del crecimiento de una población microbiana en la que se encuentra más uniforme química y fisiológicamente (Prescott *et al.*, 1999). El crecimiento también se monitoreó utilizando la técnica de conteo en placa.

3.7. Identificación Molecular

Para tener una certeza de las cepas bacterianas que conforman el consorcio seleccionado, se enviaron muestras para su identificación molecular al Laboratorio de Ecología Molecular de la Rizósfera del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional del Instituto Politécnico Nacional (Unidad Sinaloa).

La identificación molecular de las cepas bacterianas se obtuvo por una secuenciación capilar direccional de la región parcial del 16S del ADNr, empleando secuencias de 627 nucleótidos.

3.8. Tratamiento Biológico

Los estudios sobre el tratamiento biológico se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de vidrio de 250 mL con 50 g de suelo a 30 °C, 150 rpm y con un contenido de humedad (%Humedad) del 20 – 40%. Los tratamientos consistieron en una bioestimulación (SMM) con un medio mineral (MM, ver Anexo A), una bioaumentación (SI) con *P. protegens* en una proporción del 10% en el agua utilizada para mantener la humedad, y, por último, una combinación de la bioestimulación y la bioaumentación (SIMM) con *P. protegens* al 10% en medio mineral (MM). Como control (C) se empleó agua destilada para mantener la humedad en una concentración de 1 mL/g de suelo. En la Tabla 3 se describen los tratamientos.

Tabla 3. Descripción de los tratamientos biológicos.

Tratamiento	Agua destilada (mL/g suelo)	Medio mineral (MM) (mL/g suelo)	Inóculo (mL/g suelo)
Control (C)	1	-	-
Suelo con medio mineral (SMM)	-	1	-
Suelo con inóculo (SI)	0.9	-	0.1
Suelo con inóculo y medio mineral (SIMM)	-	0.9	0.1

Todos los tratamientos se realizaron por duplicado y se mantuvieron a 30 °C y 150 rpm durante 28 días en una incubadora CScientific CVP – 500. Se tomaron muestras cada semana con el fin de monitorear el pH, %Humedad y concentración de HTP del suelo con la misma metodología que se mencionó en el apartado de caracterización fisicoquímica del suelo. La cantidad de agua que se agregó a todas las opciones de tratamiento fue con el fin de mantener un %Humedad de 20 – 40%, pues es un rango de humedad óptimo para la actividad microbiana y la biodegradación de los contaminantes.

Por último, se calculó el porcentaje de remoción de HTP (%Remoción de HTP) comparando la concentración de HTP al inicio y al final del experimento mediante la Ec. (6).

$$\% \text{Remoción de HTP} = \left(\frac{[\text{HTP}]_0 - [\text{HTP}]}{[\text{HTP}]_0} \right) (100\%) \quad (6)$$

Donde:

%Remoción de HTP = Porcentaje de remoción de HTP

[HTP]₀ = Concentración de HTP al tiempo 0 en mg/kg

[HTP] = Concentración de HTP al tiempo final en mg/kg

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.9. Caracterización Físicoquímica del Suelo

Los resultados de la caracterización del suelo se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados de la caracterización del suelo.

Propiedad	Valor	Unidades
pH	6.42	-
Contenido de Humedad	0.54	%
Conductividad Eléctrica ^a	1.52	ds/m
Contenido de Materia Orgánica	6.05	%
HTP	425,822.26	mg/kg de sólido seco

^aEl valor reportado es a 25 °C.

En las siguientes secciones se discuten los resultados de la caracterización y se comparan con otros obtenidos por diferentes autores y con las Normas Oficiales Mexicanas.

3.9.1. pH

En la Tabla 5 se muestra la clasificación de los suelos, por la NOM-021-RECNAT-2000, de acuerdo con su pH.

Tabla 5. Interpretación de resultados de pH medido en suelos. (NOM-021-RECNAT-2000).

Clasificación	pH
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1 – 6.5
Neutro	6.6 – 7.3
Medianamente alcalino	7.4 – 8.5
Fuertemente alcalino	> 8.5

Acorde con la clasificación de la Tabla 5, la muestra de suelo de este estudio es clasificada como moderadamente ácida, pues tiene un valor de 6.42, cercano a la neutralidad, por lo que el crecimiento de microorganismos no es afectado por el nivel de acidez o alcalinidad, pues un valor de pH en el suelo entre 5.5 y 8.8 asegura una buena actividad microbiana, mientras que una óptima degradación de hidrocarburos se encuentra entre pH del suelo de 6.5 y 8 (Vidali, 2001). Además, Palanisamy *et al.* (2014) estudiaron el efecto del pH en el crecimiento de una bacteria aislada en un suelo contaminado con diésel (*Acinetobacter baumannii*), y encontraron su punto máximo de crecimiento a un pH neutro, siendo que el crecimiento disminuía a medida que el pH se volvía más ácido o alcalino.

3.9.2. Contenido de humedad

Los datos obtenidos muestran que el contenido de humedad es muy bajo (0.54%), por lo que esto no impediría el movimiento de aire a través del suelo, permitiendo condiciones aerobias (Eweis *et al.*, 1991). Sin embargo, también afecta negativamente a la degradación de los contaminantes, debido a tan bajo valor de humedad (Yuniati, 2018). Según Abdulsalam *et al.* (2012), los bajos contenidos de humedad en un suelo contaminado con hidrocarburos se pueden atribuir al bloqueo de los poros por las partículas de hidrocarburo, provocando una baja retención de agua, lo cual afecta negativamente los métodos de biorremediación.

3.9.3. Conductividad eléctrica

En la Tabla 6 se muestra la interpretación de los datos de conductividad eléctrica para los suelos a 25 °C, según la NOM-021-RECNAT-2000.

Tabla 6. Interpretación de conductividad eléctrica. (NOM-021-RECNAT-2000).

Conductividad eléctrica a 25 °C (ds/m)	Efectos
< 1.0	Efectos despreciables de la salinidad
1.1 – 2.0	Muy ligeramente salino
2.1 – 4.0	Moderadamente salino
4.1 – 8.0	Suelo salino
8.1 – 16.0	Fuertemente salino
> 16.0	Muy fuertemente salino

Como se observa en la Tabla 6 y comparándola con los resultados obtenidos, el suelo se clasifica como uno muy ligeramente salino, con una conductividad eléctrica de 1.52 ds/m, teniendo poca presencia de sales y constituyentes inorgánicos, lo que afecta positivamente al crecimiento microbiano (Atlas, 1981).

3.9.4. Contenido de materia orgánica

En la Tabla 7 se muestra la clasificación de los suelos según el porcentaje de contenido de materia orgánica, de acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000.

Tabla 7. Interpretación de los resultados de materia orgánica. (NOM-021-RECNAT-2000).

Clase	Materia Orgánica (%)	
	Suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	< 4.0	< 0.5
Bajo	4.1 – 6.0	0.6 – 1.5
Medio	6.1 – 10.9	1.6 – 3.5
Alto	11.0 – 16.0	3.6 – 6.0
Muy alto	> 16.0	> 6.0

Conforme con los datos presentados en las Tablas 4 y 7, el suelo se clasifica como uno con muy alta concentración de materia orgánica, pues tiene en su composición un 6.05% de contenido de materia orgánica, sabiendo que se trata de un suelo no volcánico. Por lo tanto, la alta concentración de materia orgánica del suelo disminuye la eficiencia de las tecnologías de remediación y la degradación y sorción de los contaminantes (Yuniati, 2018). Por otro lado, que el suelo tengo muy alta concentración de materia orgánica también significa que tiene un alto grado de contaminación por hidrocarburos, pues estos son compuestos orgánicos.

3.9.5. Hidrocarburos totales del petróleo (HTP)

En la Tabla 8 se muestran los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelo para México, de acuerdo con la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.

Tabla 8. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburo en suelo. (NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012).

Fracción de hidrocarburos	Uso de suelo predominante (mg/kg de sólido seco)		
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación	Residencial y recreativo	Industrial y comercial
Ligera	200	200	500
Media	1 200	1 200	5 000
Pesada	3 000	3 000	6 000

Debido a que el ARA es una mezcla de hidrocarburos alifáticos, aromáticos, entre otros compuestos, y que durante la extracción de los HTP se extraen tanto las fracciones ligera, media y pesada de hidrocarburos, se debe tomar en cuenta el límite máximo permisible más estricto (Escalante *et al.*, 2017; NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012). Por ende, sabiendo que las muestras de suelo se obtuvieron de uno industrial/comercial, y comparando los resultados obtenidos con los límites máximos permisibles, se llega a la conclusión de que la concentración de HTP del suelo sobrepasa la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, pues el suelo tiene una concentración de 425,822.26 mg/kg de HTP, por lo que una tecnología de biorremediación se justifica totalmente.

Por otra parte, se ha estudiado la biorremediación de suelos contaminados con ARA, sin embargo, estas concentraciones han sido mucho menores, como la de Ogbeh *et al.* (2018), quienes encontraron un óptimo requerimiento de nutrientes para el tratamiento de un suelo contaminado con 3,548 mg/kg de HTP, o el estudio de Ibiene *et al.* (2021),

donde simularon la contaminación de ARA en un suelo, variando la concentración de ARA, uno con 16,631.86 mg/kg y el otro con 18,464.73 mg/kg.

Asimismo, otros autores han tratado suelos contaminados, por biorremediación, con concentraciones mayores de HTP que los anteriores, sin embargo, estos han sido con suelos contaminados en el mismo laboratorio (contaminación simulada), como el estudio de Balderas-León y Sánchez-Yáñez (2015), donde utilizaron una doble bioestimulación y una fitorremediación para la degradación de un suelo contaminado con 75,000 mg/kg de HTP.

Además, de acuerdo con los resultados obtenidos por Abdulkarim *et al.* (2019), donde trataron un suelo contaminado con ARA utilizando un reactor de lecho empacado, altas concentraciones de HTP disminuyen la tasa de biodegradación del contaminante, pues esto representa grandes problemas para el metabolismo de los microorganismos del suelo. Por lo tanto, aunado al hecho de que en este estudio se tiene un suelo contaminado con una concentración de HTP mucho mayor al de otros estudios realizados, se puede concluir que el tratamiento biológico es mucho más complicado.

3.10. Aislamiento de Microorganismos

Con base a la morfología y color, se aislaron y seleccionaron diez colonias diferentes de microorganismos, las cuales se pueden observar en las placas Petri de las Figuras 11 - 20, y se etiquetaron desde C1 hasta C10.

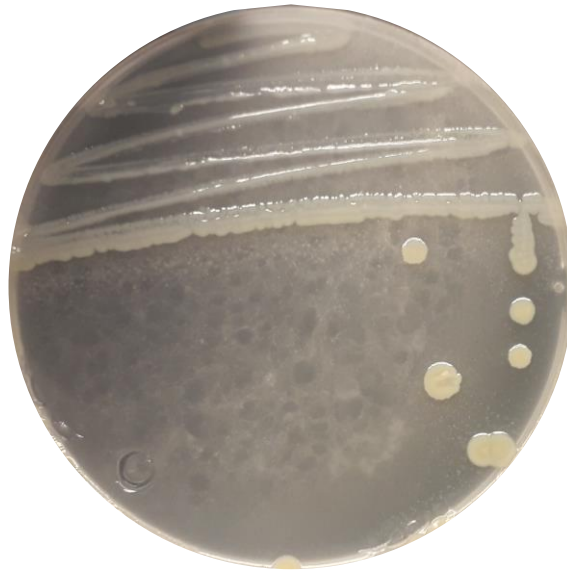


Figura 11. Fotografía de la colonia C1 en Agar diésel.

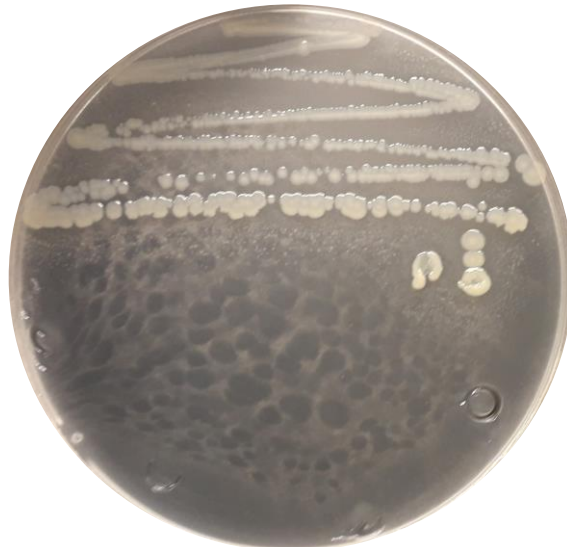


Figura 12. Fotografía de la colonia C2 en Agar diésel.



Figura 13. Fotografía de la colonia C3 en Agar diésel.



Figura 14. Fotografía a la colonia C4 en Agar diésel.



Figura 15. Fotografía a la colonia C5 en Agar diésel.



Figura 16. Fotografía a la colonia C6 en Agar diésel.

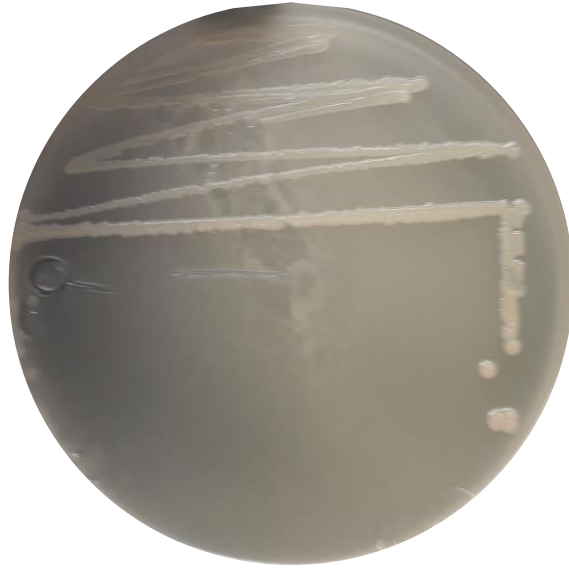


Figura 17. Fotografía a la colonia C7 en Agar diésel.

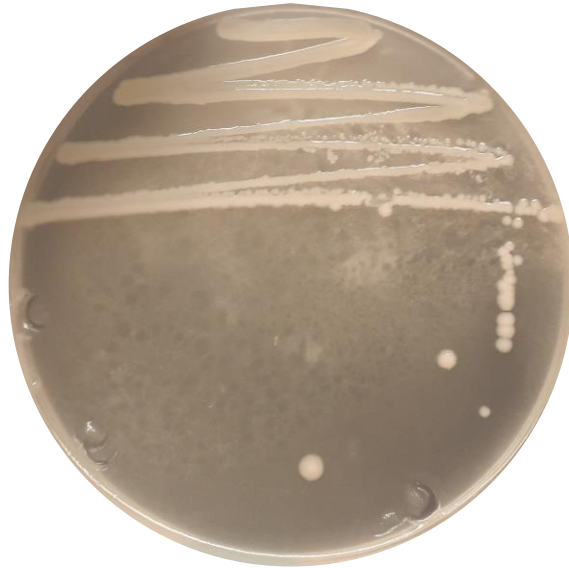


Figura 18. Fotografía a la colonia C8 en Agar diésel.

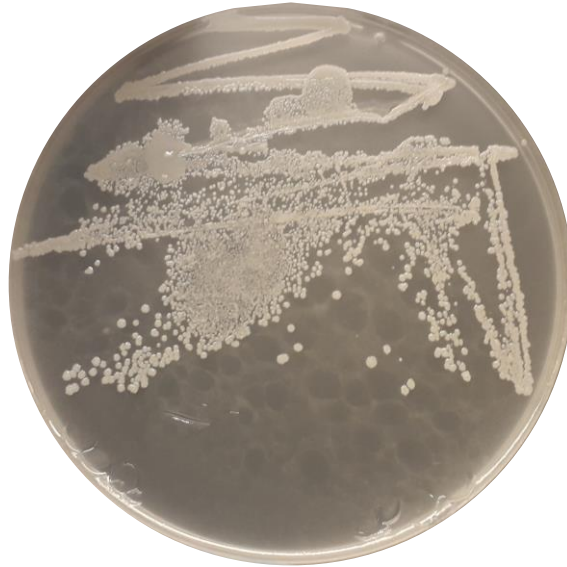


Figura 19. Fotografía a la colonia C9 en Agar diésel.

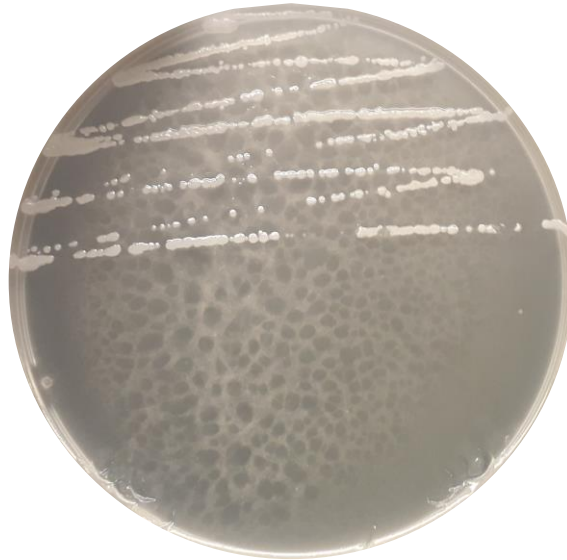


Figura 20. Fotografía a la colonia C10 en Agar diésel.

Otros autores han podido aislar una gran cantidad de cepas bacterianas de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Geetha *et al.* (2013) aislaron hasta 14 bacterias diferentes de sitios contaminados con hidrocarburos del petróleo. Asimismo, Narváez *et al.* (2008), aislaron 31 cepas bacterianas a partir de sedimentos del caribe colombiano en un medio salino con hidrocarburos.

Por otra parte, Saucedo-Martínez *et al.* (2017) e Ibiene *et al.* (2021), aislaron e identificaron 47 y 28 cepas bacterianas diferentes, respectivamente, de un suelo en el que se simuló la contaminación por ARA, sin embargo, Jesubunmi (2014) logró aislar hasta 5 cepas bacterianas diferentes de un suelo contaminado con ARA.

3.11. Identificación Preliminar

Con el fin de identificar de manera bioquímica a los microorganismos seleccionados, se les realizó la tinción de Gram, pruebas bioquímicas, así como la evaluación de la actividad lipolítica con Agar rodamina B. Estos resultados se muestran en las Tablas 9 y 10.

De acuerdo con la tinción de Gram, la morfología bacilar y las pruebas bioquímicas, la cepa C10 fue identificada con el género *Bacillus*. Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes para la identificación del género y especie del resto de las cepas bacterianas, por lo que se decidió identificar por biología molecular aquellas cepas de mayor interés.

En relación con lo anterior, Ugoh y Moneke (2011) y Jesubunmi (2014) encontraron que los géneros más comúnmente encontrados en suelos contaminados con ARA son *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Bacillus* y *Serratia*.

Tabla 9. Resultados de la identificación preliminar de C1 a C5.

Prueba	Cepa				
	C1	C2	C3	C4	C5
Gram	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+
MacConkey	Lac -	Lac -	Lac -	Lac -	Lac -
TSI	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/A	Alc/Alc
Sulfuro	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
Movilidad	+	+	+	-	+
Citrato	+	+	+	-	+
MR	±	±	±	±	±
VP	-	-	-	-	-
EMB	+	+	+	+	+
Rodamina B	-	-	-	-	+

Tabla 10. Resultados de la identificación preliminar de C6 a C10.

Prueba	Cepa				
	C6	C7	C8	C9	C10
Gram	-	-	-	-	+
Catalasa	+	+	+	+	+
MacConkey	Lac -	Lac -	Lac -	Lac -	NC
TSI	Alc/Alc, H ₂ S	Alc/Alc, H ₂ S	Alc/Alc, H ₂ S	Alc/A	Alc/A
Sulfuro	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
Movilidad	-	-	-	-	+
Citrato	-	-	+	+	+
MR	±	±	±	+	+
VP	-	-	-	-	-
EMB	+	+	NC ^a	+	NC
Rodamina B	+	+	+	+	-

^a Indica que no se presentó crecimiento en el medio de cultivo.

3.12. Tolerancia a los Hidrocarburos

En la Tabla 11 se muestran los resultados de la evaluación a la tolerancia a los hidrocarburos con las cepas candidatas a formar el consorcio bacteriano, es decir, las cepas etiquetadas como C5, C6, C7, C8 y C9, pues mostraron un resultado positivo a la actividad lipolítica.

Tabla 11. Resultados de la evaluación de la tolerancia a los hidrocarburos.

Medio	Cepa				
	C5	C6	C7	C8	C9
Agar diésel 1% (24 h)	+ ^a	+	+	+	+
Agar diésel 3% (24 h)	+	- ^b	+	+	-
Agar diésel 3% (48 h)	+	-	+	+	+
Agar diésel 5% (24 h)	+	-	+	+	-
Agar diésel 5% (48 h)	+	-	+	+	-
Agar MMD ^c 1% diésel (5 días)	+	+	+	+	+
Agar MMD 3% diésel (5 días)	+	+	+	+	-

^a Indica que se observó crecimiento en el medio en el tiempo de incubación correspondiente. ^b Indica que no se observó crecimiento en el medio en el tiempo de incubación correspondiente. ^c Medio de cultivo compuesto por Agar, medio mineral y diésel como única fuente de carbono (Anexo A).

En la Tabla 11 se puede observar que la cepa C6 mostró crecimiento en el medio de Agar diésel con 1% v/v de diésel a las 24 h de incubación, sin embargo, no mostró crecimiento a concentraciones más elevadas. No obstante, si creció en el medio de Agar MMD a ambas concentraciones, por lo que puede utilizar el diésel como única fuente de carbono. Adicionalmente, la cepa C9 también mostró crecimiento en la concentración más baja de diésel en el medio de Agar diésel, pero esto no fue cierto a concentraciones más elevadas, mostrando únicamente crecimiento a la concentración de 3% v/v a las 48 h de incubación. Además, sólo creció en la concentración más baja de diésel en el agar MMD, por lo que puede utilizar el diésel como única fuente de carbono, pero su crecimiento se inhibió a una concentración más alta.

Las cepas que dieron un resultado positivo a todas las pruebas de tolerancia fueron las etiquetadas como C5, C7 y C8, por ende, fueron las que se seleccionaron para conformar el consorcio bacteriano y, por lo tanto, se enviaron para su identificación molecular.

3.13. Curva de Crecimiento

En la Figura 21 se muestra la curva de crecimiento obtenida del consorcio bacteriano en Caldo nutritivo, en donde se puede observar una ausencia de fase de latencia. Esto puede ser debido a que las bacterias se adaptaron rápidamente a las condiciones del medio de cultivo (Prescott *et al.*, 1999).

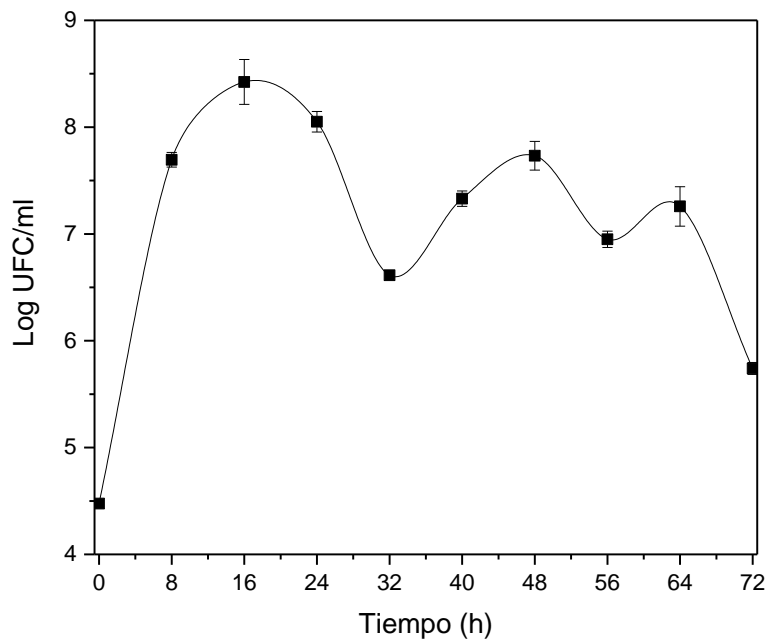


Figura 21. Curva de crecimiento.

También se puede observar un crecimiento exponencial que llega a su máximo a las 16 horas de incubación, tiempo a partir del cual se observa un decrecimiento en la población bacteriana, interpretándose como una fase de muerte, sin embargo, la curva se comporta de manera inestable, pues se muestran varios máximos y mínimos, que pueden ser interpretados como interacciones positivas y negativas entre las poblaciones bacterianas, es decir, comportamientos de cooperación y competencia, ya que estas aumentan al incrementarse la densidad de población bacteriana (Atlas y Bartha, 2002).

3.14. Identificación Molecular

Los resultados de las cepas enviadas para su identificación molecular (C5, C7 y C8) se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados de la identificación molecular.

Cepa	Nombre científico	% de identidad
C5	<i>Pseudomonas protegens</i>	99.84
C7	<i>Pseudomonas protegens</i>	99.84
C8	<i>Pseudomonas protegens</i>	99.84

Además, se obtuvo un árbol filogenético de las secuencias de la región parcial 16S del ADNr empleadas para la identificación molecular de las cepas C5, C7 y C8 (Anexo B). Los datos de la Tabla 12 muestran que las tres cepas seleccionadas se tratan de la misma especie (*Pseudomonas protegens*), por lo que se trabajó únicamente con esa especie, a pesar de los resultados diferentes que se mostraron en las pruebas bioquímicas y en la morfología en el medio Agar diésel.

Por otra parte, a pesar de que el género *Pseudomonas* es aislado frecuentemente de suelos contaminados con hidrocarburos, existen muy pocos estudios sobre el aislamiento de *P. protegens*, pues solo se ha aislado de sitios contaminados (tanto suelo como agua) con petróleo crudo. Además, hay muy poca evidencia de la degradación de hidrocarburos del petróleo con *P. protegens*, a pesar de que sea muy común estudios de degradación de hidrocarburos con el género *Pseudomonas*. En ese sentido, no existen estudios que muestren evidencia de la biodegradación de ARA por *P. protegens* o su aislamiento de sitios contaminados por ARA.

No obstante, Obianuju *et al.*, (2022) estudiaron la eficiencia de degradación de diferentes cepas bacterianas aisladas de suelos contaminados con petróleo crudo, entre las que se encontraba *P. protegens*, y encontraron que esta cepa podía crecer en un medio de cultivo con petróleo crudo como única fuente de carbono y degradar hasta un 59.75% de HTP en un periodo de 28 días a temperatura ambiente y agitación constante, reportando que era capaz de degradar completamente hasta once diferentes hidrocarburos del petróleo.

3.15. Tratamiento Biológico

En la Figura 22 se muestra la variación del pH con respecto al tiempo en cada una de las opciones de tratamiento, donde se puede observar que el pH varió desde un rango de 6 a 7, aproximadamente, encontrándose dentro del rango para un óptimo crecimiento bacteriano y degradación de hidrocarburos.

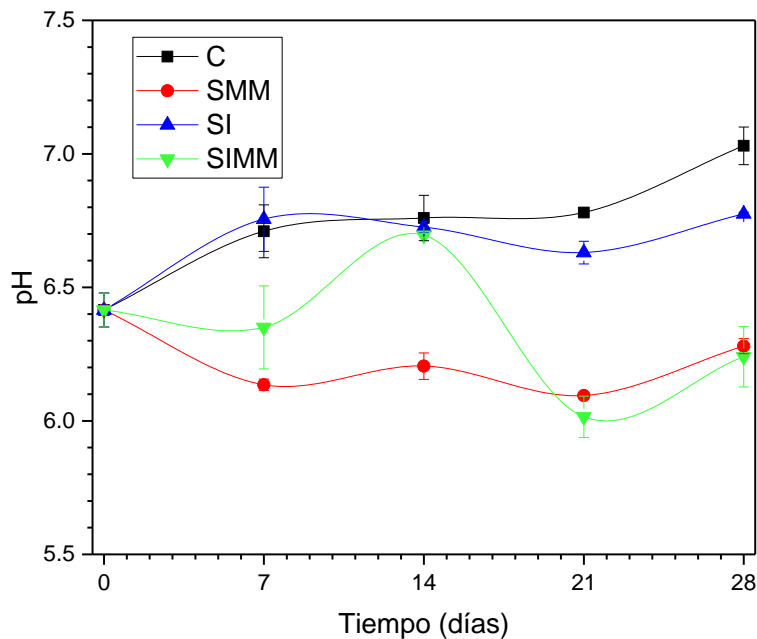


Figura 22. Variación del pH con respecto al tiempo.

Cabe destacar que el pH del medio de control (C) fue el que presentó un aumento, a diferencia de las otras opciones de tratamiento. En el caso de la opción de la bioaumentación (SI), el pH aumentó ligeramente y se mantuvo estable, lo cual se puede interpretar como resultado de la actividad microbiana con producción de OH^- y HCO_3^- . Un caso contrario es el de la bioestimulación (SMM), pues el pH disminuyó ligeramente, sin embargo, se mantuvo estable durante la mayor parte del tratamiento y después aumento ligeramente. La acidificación en un medio de cultivo puede deberse a procesos

fermentativos con producción de H^+ . Por otro lado, la opción de tratamiento de bioestimulación y bioaumentación (SIMM) tuvo las variaciones más drásticas de pH, pues aumentó y descendió abruptamente en un periodo relativamente corto de tiempo, para después mantenerse estable hasta el final del tratamiento. Por último, comparando las opciones SMM y SIMM, las cuales tienen medio mineral como fuente de nutrientes, ambas tuvieron un descenso en el pH, lo cual puede ser atribuido a los componentes del Medio Mineral (MM) que se les agregó, contrario a las otras opciones, las cuales mostraron un aumento del pH.

En la Figura 23 se muestra la variación del %Humedad de cada una de las opciones de tratamiento, donde se puede observar el drástico aumento del %Humedad al principio del tratamiento, debido a la adición de agua para mantener el %Humedad en un rango de 20 – 40%, el cual se logró a partir de la primera semana. Asimismo, la disminución del %Humedad a partir de la semana 2 se debe a la evaporación del agua.

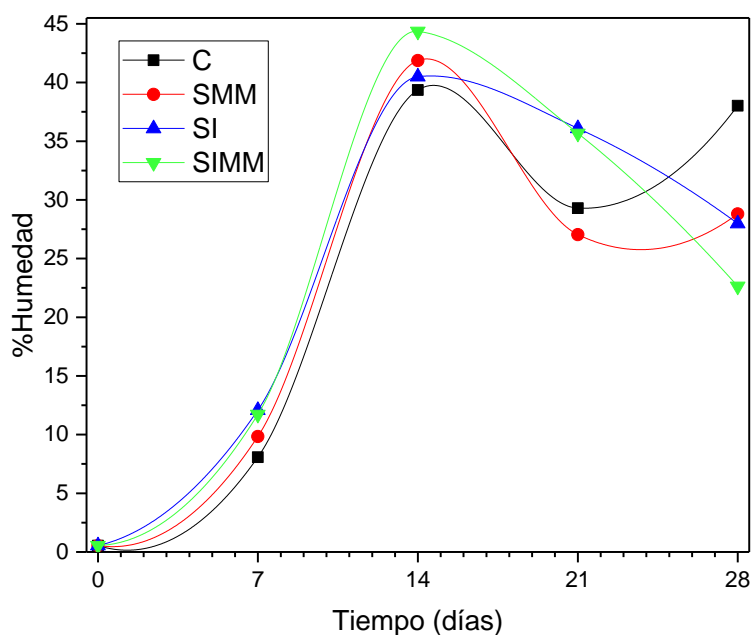


Figura 23. Variación del porcentaje de humedad con respecto al tiempo.

En la Figura 24 se puede observar el %Remoción de HTP al final del experimento.

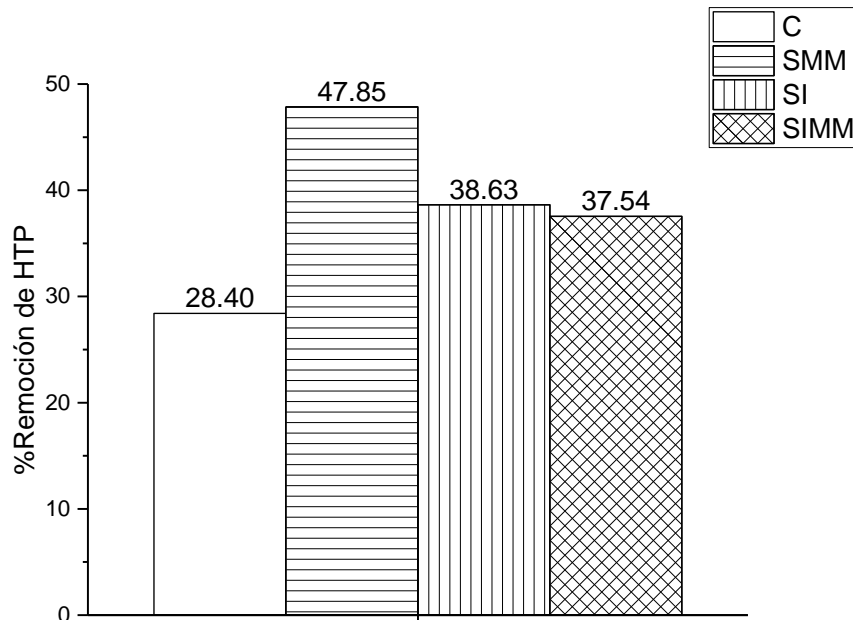


Figura 24. Porcentaje de remoción de HTP a los 28 días de tratamiento.

En la Figura 24 se puede observar que los %Remoción de HTP que obtuvieron las opciones C, SMM, SI y SIMM fueron 28.4%, 47.85%, 38.63% y 37.54%, respectivamente. De acuerdo con los %Remoción de HTP, la mejor opción de tratamiento fue la bioestimulación (SMM), seguida de la bioaumentación con *P. protegens*, y en tercer lugar fue la combinación entre la bioestimulación y la bioaumentación (SIMM). También se puede observar como el control (C) obtuvo el menor %Remoción entre todas las opciones, teniendo sentido ya que solo se agregó agua para aumentar el contenido de humedad, por lo que no se estimuló adecuadamente la población microbiana del suelo.

Otros autores han obtenido diferentes resultados, sin embargo, han utilizado diferentes diseños experimentales para el tratamiento de suelo contaminado con ARA. A continuación, se resumen algunos estudios donde simularon la contaminación de los suelos con ARA, es decir, fueron contaminados en el mismo laboratorio.

- Abdulsalam, y Omale (2009) trataron un suelo contaminado con 40,000 mg/kg de ARA, utilizando cajas de madera como diseño experimental, y compararon la bioestimulación del suelo (con fertilizantes) con la bioaumentación del mismo utilizando *Bacillus subtilis*, suplementado con fertilizantes. Obtuvieron un mayor porcentaje de remoción de HTP con la bioestimulación (69.2% de remoción), seguido de una combinación de la bioaumentación y bioestimulación (con 65.2% de remoción) en un periodo de 6 semanas. Asimismo, estudiaron la variación del pH en el suelo en cada una de las opciones de tratamiento, encontrando que variaba de 5.5 a 7.5 con respecto al tiempo.
- Balderas-León y Sánchez-Yáñez (2015) trataron un suelo contaminado con 75,000 mg/kg de ARA en jarras de Leonard (biorreactores). Utilizaron una doble bioestimulación, la primera con una solución mineral y la segunda con semillas de la planta *Phaseolus vulgaris* (con abono verde), reduciendo la concentración de ARA hasta 32500 mg/kg (56.67% de remoción) en 30 días, con la primera bioestimulación, y hasta 10,100 mg/kg (86.54% de remoción) en 90 días, con la segunda bioestimulación.
- Saucedo-Martínez *et al.* (2017), trataron un suelo contaminado con 60,000 mg/kg de ARA, utilizando matraces Bartha como diseño experimental, por medio de una bioestimulación integral. La primera bioestimulación con agentes emulsificantes, la segunda con nutrientes inorgánicos, y la tercera con peróxido de hidrógeno como fuente de oxígeno, logrando reducir la concentración de ARA hasta 27,200 mg/kg (54.67% de remoción) en 23 días.
- Ibiene *et al.* (2021), trataron un suelo contaminado utilizando recipientes de plástico como biorreactores, donde variaron la concentración de ARA, y utilizaron estiércol de cerdo como fuente de nutrientes. Lograron remover hasta un 80.27% y 62.26% la concentración de HTP de un suelo contaminado con 16631.86 mg/kg (muestra A) y 18464.73 mg/kg (muestra B), respectivamente, en un periodo de

28 días. Asimismo, el pH se redujo de 6.65 a 6.21 para la muestra A, y de 6.87 a 6.57 para la muestra B.

Por otra parte, al igual que el presente estudio, se resumen estudios de biorremediación de suelos contaminados de forma antropogénica con ARA.

- Abdulsalam *et al.* (2012), estudiaron la biodegradación de un suelo contaminado con ARA en biorreactores de lecho empacado en un periodo de 70 días, donde compararon el efecto de la adición de nutrientes, la esterilización del suelo y la adición de un consorcio bacteriano compuesto por *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*. Encontraron que la mejor opción de tratamiento fue la bioestimulación con nutrientes, obteniendo hasta un 75% de remoción de HTP de un suelo con una concentración inicial de 192 mg/kg de HTP. Además, monitorearon el %Humedad del suelo, que varió desde 0 hasta 20%, y el pH del suelo, que tuvo variaciones desde 5 hasta 10, saliéndose del rango óptimo para el crecimiento de los microorganismos y la degradación de los hidrocarburos.
- Ogbey *et al.* (2018) utilizaron un diseño experimental Box-Behnken-Design, que consistió en macetas, que desempeñaron el papel de biorreactores. Luego, variaron la concentración de nutrientes para encontrar la óptima concentración para maximizar la biodegradación del contaminante, utilizando estiércol de vaca, estiércol de aves y fertilizante como fuentes de nutrientes. En este estudio, el suelo estaba contaminado con una concentración de 3548 mg/kg de HTP, logrando remover hasta un 66.92% de los HTP en 42 días.
- Abdulkarim *et al.* (2019), estudiaron la biorremediación de un suelo contaminado con ARA en biorreactores aerobios de lecho empacado. El suelo fue bioestimulado, con nutrientes, e inoculado con un consorcio compuesto por *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*. Variaron la fuente del estimulante orgánico entre estiércol de camello, burro, cerdo y caballo, y obtuvieron que el estiércol de vaca y caballo, son las mejores opciones como fuente de nutrientes y estimulante orgánico para la biodegradación de los contaminantes, pues redujeron el %HTP del suelo hasta 0.414% y 2.997%, respectivamente, en un periodo de 35 días.

En retrospectiva, los estudios de biorremediación de suelos contaminados con ARA, de forma antropogénica, muestran resultados favorables para el %Remoción de HTP. Sin embargo, la mayoría fueron para mayores tiempos de biodegradación y en suelos contaminados con concentraciones mucho menores de HTP. Por lo tanto, se puede concluir que el suelo que se trata en este trabajo requiere de mayores tiempos de tratamiento y, posiblemente, utilizando diferentes cepas bacterianas en un consorcio.

De igual forma, los resultados de %Remoción de HTP de los estudios de biorremediación de suelos contaminados de forma simulada con ARA, son bastante satisfactorios, incluso tomando en cuenta que se trabaja con suelos con mayores concentraciones de HTP. Sin embargo, la contaminación del suelo de estos estudios se realizó en el laboratorio, por lo que las condiciones fueron mucho más controladas y la distribución del ARA en el suelo pudo ser más homogénea para su biodegradación.

Por otra parte, en los estudios que se compararon la bioestimulación con la bioaumentación, la bioestimulación resultó la mejor opción, similar al caso de este estudio.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este estudio, se caracterizaron las muestras de suelo contaminado, confirmándose que posee un alto grado de contaminación de HTP, superando los límites máximos permisibles de la Norma Oficial Mexicana (NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012).

De las muestras de suelo contaminado se aislaron cepas bacterianas capaces de tolerar hidrocarburos, donde tres de ellas fueron seleccionadas como las más aptas para tolerar y degradar hidrocarburos. Los resultados de la identificación por biología molecular demuestran que las tres cepas seleccionadas corresponden a la especie *Pseudomonas protegens*, las cuales pueden ser utilizadas para el tratamiento de suelos contaminados con aceite residual automotriz.

De los biotratamientos, la bioestimulación con medio mineral (SMM) fue la que presentó una mayor remoción de los HTP con un 47%, mientras que la bioaumentación y la combinación de la bioestimulación con bioaumentación presentaron una remoción similar de HTP, con un 38%. Por otro lado, el control removió un 28% de los HTP.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la adición de sales minerales y la inoculación con los microorganismos son un mecanismo viable para el tratamiento de suelos contaminados con aceite residual automotriz.

Las recomendaciones propuestas se enlistan a continuación:

- Realizar más pruebas de caracterización del suelo, con el fin de conocer la composición de sus nutrientes, su capacidad de retención de humedad y tipo de suelo, con el objetivo de tener un tratamiento más certero.
- Utilizar otro diseño experimental para el tratamiento del suelo contaminado, como el compostaje o un biorreactor de lecho empacado, durante un periodo de tiempo más largo.
- Probar diferentes fuentes de nutrientes o estimulantes orgánicos para el tratamiento del suelo contaminado, como lodos residuales, estiércol, residuos orgánicos, entre otros.
- Utilizar otra técnica para cuantificar los HTP de manera más exacta y que permita conocer la composición del ARA, como la cromatografía de gases.
- Identificar la población microbiana del suelo contaminado, así como cuantificarla, con el fin de saber si la población aumenta con la degradación de los HTP, teniendo otra manera de monitorear la biodegradación de los contaminantes.
- Estudiar el efecto de los surfactantes y la producción de los biosurfactantes de la población microbiana.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

- Abdulkarim, A. Y.; Bello, A. A.; Abdulsalam, S.; Umar, S. A.; Sadiq, M. B. Bioremediation of soil contaminated with spent motor oil. *Iconic Research and Engineering Journals*, **2019**, 3, 16-22.
- Abdulsalam, S.; Adefila, S. S.; Bugaje, I. M.; Ibrahim, S. Bioremediation of soil contaminated with used motor oil in a closed system. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, **2012**, 3, 172-179.
- Abdulsalam, S.; Omale, A. B. Comparison of biostimulation and bioaugmentation techniques for the remediation of used motor oil contaminated soil. *Brazilian Archives of biology and technology*, **2009**, 52, 747-754.
- Alba, G. Estudio comparativo de tres diferentes métodos de remediación de suelo tipo Gleysol contaminado con hidrocarburo. Tesis de Maestría, Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, marzo 2011.
- Al-Hawash, A. B.; Zhang, X.; Ma, F. Removal and biodegradation of different petroleum hydrocarbons using the filamentous fungus *Aspergillus* sp. RFC-1. *MicrobiologyOpen*, **2018**, 8, e00619.
- Atlas, R. M.; Bartha, R. Ecología microbiana y Microbiología ambiental; Pearson Educación, S.A.: Madrid, 2002; pp 59-523.
- Atlas, R. M.; Cerniglia, C. E. Bioremediation of Petroleum Pollutants: Diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. *BioScience*, **1995**, 45, 332-338.

- Atlas, R. M. Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. *Applied microbiology*, **1975**, 30, 396-403.
- Atlas, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological reviews*, **1981**, 45, 180-209.
- Atlas, R. M. Microbial hydrocarbon degradation—bioremediation of oil spills. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **1991**, 52, 149-156.
- Balcázar, M.; Encinas, K.; Montiel, A. Proceso de transporte en poliducto PEMEX-Hermosillo y su mejoramiento. Proceso de transporte de combustibles en poliducto y su mejoramiento; Editorial Académica Española: Saarbrücken, 2016, pp 1-6.
- Balderas-León, I.; Sánchez-Yáñez, J. M. Biorremediación de suelo contaminado con 75000 ppm de aceite residual automotriz por bioestimulación y fitorremediación con *Sorghum vulgare* y *Bacillus cereus* y/o *Burkholderia cepacia*. *Journal of the Selva Andina Research Society*. **2015**, 6, 23-32.
- Britanialab. E.M.B. Agar (con Eosina y Azul de Metileno). Laboratorios Britania S.A., 2021. Recuperado el 08 de agosto de 2022 de: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e713a290e.pdf.
- Britanialab. MacConkey Agar. Laboratorios Britania S.A., 2021. Recuperado el 08 de agosto de 2022 de: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60707267ecda2.pdf.
- Carvalho-Gonçalves, L. C. T. D.; Gorlach-Lira, K. Lipases and biosurfactants production by the newly isolated *Burkholderia* sp. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, **2018**, 5, 57-68.

- Celik, G. Y.; Aslima, B.; Beyatli, Y. Enhanced crude oil biodegradation and rhamnolipid production by *Pseudomonas stutzeri* strain G11 in the presence of Tween-80 and Triton X-100. *J Environ Biol*, **2008**, 29, 867-870.
- Chang, R. Química orgánica. En Química; McGraw-Hill: D.F., 2007, pp 1002-1004.
- Choi, S. C.; Kae, K. K.; Jae, H. S.; Sang-Jin, K. I. M. Evaluation of fertilizer additions to stimulate oil biodegradation in sand seashore mesocosms. *Journal of microbiology and biotechnology*, **2002**, 12, 431-436.
- Das, N.; Chandran, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, **2011**, 2011.
- De Química. Extracción sólido-líquido (Soxhlet). 2022. Recuperado el 08 de agosto de 2022 de: <https://www.dequimica.info/extraccion-solido-liquido>.
- Escalante-Canizal, S.; Márquez-Benavides, L.; Baltierra-Trejo, E.; Saucedo-Martínez, B. C.; Sánchez-Yáñez, J. M. Biorremediación y fitorremediación de un suelo impactado por aceite residual automotriz con *Helianthus annuus* y *Burkholderia vietnamiensis*. *Journal of the Selva Andina Research Society*, **2017**, 8, 104-114.
- Eweis, J.; Ergas, S.; Chang, D.; Schroeder, E. Principios de Biorrecuperación: Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos; McGraw-Hill: Madrid, 1999; pp 15-137.
- Fernández, L.; Rojas, N.; Roldán, T.; Ramírez, M.; Zegarra, H.; Uribe, R.; Reyes, R.; Flores, D.; Arce, J. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados; Instituto Mexicano del Petróleo, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales e Instituto Nacional de Ecología: D.F., 2006; pp. 19-101.
- Geetha, S. J.; Joshi, S. J.; Kathrotiya, S. Isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacterial isolate from oil contaminated sites. *APCBEE procedia*, **2013**, 5, 237-241.

- Google Maps. Localización del lugar de muestreo. [Figura]. Recuperado del 08 de agosto de 2022 de: <https://www.google.com/maps/place/27%C2%B057'30.5%22N+110%C2%B048'08.6%22W/@27.9582069,-110.8024157,199m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x0:0xce9ba8f9ded065b8!8m2!3d27.9584722!4d-110.8023889>.
- Gupta, R.; Rathi, P.; Gupta, N.; Bradoo, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **2003**, 37, 63-71.
- Hernández, A. Microbiología Industrial; Editorial Universidad Estatal a Distancia: San José, 2003; p 16.
- Ibiene, A. A.; Aleruchi, O.; Nnodim, L. C.; Ihunwo, R. U. Bioremediation of Soil Contaminated with Spent Engine Oil using Pig Dung. *Journal of Advances in Microbiology*, **2021**, 21, 68-78.
- Jensen, V. Bacterial Flora of Soil after Application of Oily Waste. *Oikos*, **1975**, 26, 152-158.
- Jesubunmi, C. O. Isolation of oil-degrading microorganisms in spent engine oil-contaminated soil. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, **2014**, 4, 191-195.
- Kim, S. J.; Choi, D. H.; Sim, D. S.; Oh, Y. S. Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand. *Chemosphere*, **2005**, 59, 845-852.
- Kouker, G.; Jaeger, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied and environmental microbiology*, **1987**, 53, 211-213.
- Levin, M.; Gealt, M. Capítulo 1: Visión general del biotratamiento y su futuro. En *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos*; McGraw-Hill: D.F., 1997; pp 1-20.

- MacFaddin, J. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica; Editorial Médica Panamericana S.A.: Buenos Aires, 2003.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Bender, K. S.; Buckley, D. H.; Stahl, D. A. Crecimiento y control microbiano. En Biología de los microorganismos; Pearson Educación, S.A.: Madrid, 2015; pp 149-180.
- Martínez-Prado, A.; Pérez-López, M.; Pinto-Espinoza, J.; Gurrola-Nevárez, B. A.; Osorio-Rodríguez, A. L. Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Revista internacional de contaminación ambiental*, **2011**, 27, 241-252.
- Méndez, M.; Rennola, L.; Peña, M.; Rodríguez, P. Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) usando CG-FID en suelos de un patio de tanques en desuso situado en Catia La Mar-Venezuela. *Ciencia e Ingeniería*, **2010**, 32, 31-37.
- Montoya, H. Nutrición y metabolismo de las bacterias. En Microbiología básica para el área de la salud y afines; Editorial Universidad de Antioquía: Colombia, 2008; p 69.
- Narváez-Flórez, S.; Gómez, M. L.; Martínez, M. M. Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras – INVEMAR*, **2008**, 37, 61-75.
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreos y análisis, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 31 de diciembre de 2002.
- Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 12 de diciembre de 1995.

- Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 10 de septiembre de 2013.
- Obianuju Obiajulu, N.; Ogbonna, J. C.; Anyanwu, C. Crude oil hydrocarbon degradation efficiency of indigenous bacterial strains isolated from contaminated sites in Nigeria. *Bio-Research*, **2022**, 20, 1606-1619.
- Olson, J. J.; Mills, G. L., Herbert, B. E.; Morris, P. J. Biodegradation rates of separated diesel components. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, **1999**, 18, 2448-2453.
- Ogbeh, G. O.; Tsokar, T. O.; Salifu, E. Optimization of nutrients requirements for bioremediation of spent-engine oil contaminated soils. *Environmental Engineering Research*, **2018**, 24, 484-494.
- Palanisamy, N.; Ramya, J.; Kumar, S.; Vasanthi, N. S.; Chandran, P.; Khan, S. Diesel biodegradation capacities of indigenous bacterial species isolated from diesel contaminated soil. *Journal of environmental health science & engineering*, **2014**, 12, 1-8.
- Pardo Castro, J. L.; Perdomo Rojas, M. C.; Benavides López de Mesa, MSC, J. L. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Nova*, **2004**, 2, 40-49.
- Peixoto, R. S.; Vermelho, A. B.; Rosado, A. S. Petroleum-degrading enzymes: bioremediation and new prospects. *Enzyme research*, **2011**, 2011.
- Petróleos Mexicanos (PEMEX). Estadísticas petroleras: informe mensual sobre producción y comercio de hidrocarburos. Gobierno de México, 2022.
- Prescott, L.; Harley, J.; Klein, D. Microbiología; McGraw-Hill: Madrid, 1999; pp 26-132.

- Prince, R. C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Critical reviews in microbiology*, **1993**, 19, 217-240.
- Procuraduría Federal de Protección Al Ambiente (PROFEPA). Informe de actividades 2018. Gobierno de México, 2019.
- Procuraduría Federal de Protección Al Ambiente (PROFEPA). Informe de actividades 2019. Gobierno de México, 2020.
- Reynoso, M.; Magnoli, C.; Barros, G.; Demo M. Capítulo II. Fundamentos de microscopía, montaje y coloraciones de muestras. En Manual de microbiología general; UniRío editora: Río Cuarto, 2015; pp 13-14.
- Riojas González, H. H.; Torres Bustillos, L. G.; Mondaca Fernández, I.; Balderas Cortés, J. J.; Gortáres Moroyoqui, P. Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química Viva*, **2010**, 9, 120-145.
- Ruberto, L.; Vazquez, S. C.; Mac Cormack, W. P. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **2003**, 52, 115-125.
- Saucedo-Martínez, B.C.; Farías-Rodríguez, R.; Santoyo-Pizano, G.; Sánchez-Yáñez, J.M. Bioestimulación integral de un suelo contaminado por 60000 ppm de aceite residual automotriz. *Journal of the Selva Andina Research Society*, **2017**, 8, 91-103.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Contaminación del suelo, un peligro que acecha bajo nuestros pies. Gobierno de México, 2018. Recuperado el 08 de agosto de 2022 de: <https://www.gob.mx/semarnat/es/articulos/contaminacion-del-suelo-un-peligro-que-acecha-bajo-nuestros-pies?idiom=es>.

- Trujillo Toro, M. A.; Ramírez Quirama, J. F. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, **2012**, 3, 37-48.
- Topp, G.; Parkin, G.; Ferré, T. Chapter 70: Soil Water Content. En *Soil Sampling and Methods of Analysis*; Carter, M.; Gregorich, E.; Taylor & Francis Group: New York, 2008; p 939.
- Udonne, J. D.; Onwuma, H. O. A study of the effects of waste lubricating oil on the physical/chemical properties of soil and the possible remedies. *Journal of Petroleum and gas Engineering*, **2014**, 5, 9-14.
- Ugoh, S. C.; Moneke, L. U. Isolation of bacteria from engine oil contaminated soils in auto mechanic workshops in Gwagwalada, Abuja, FCT-Nigeria. *Academia Arena*, **2011**, 3, 28-33.
- Van Hamme, J. D.; Singh, A.; Ward, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and molecular biology reviews*, **2003**, 67, 503-549.
- Varjani, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource technology*, **2017**, 223, 277-286.
- Varjani, S. J.; Upasani, V. N. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **2017**, 120, 71-83.
- Vidali, M. Bioremediation. An overview. *Pure and applied chemistry*, **2001**, 73, 1163-1172.
- Volke, T.; Velasco, J. Tecnologías de remediación para suelos contaminados; Instituto Nacional de Ecología y Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales: D.F., 2002; pp 9-60.
- Weisman, W. Analysis of petroleum hydrocarbons in environmental media; Amherst Scientific Publishers: Amherst, 1998; Vol. 1, pp 7-12.

Wilson, S. C.; Jones, K. C. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental pollution*, **1993**, 81, 229-249.

Xu, X.; Liu, W.; Tian, S.; Wang, W.; Qi, Q.; Jiang, P.; Gao, X.; Li, F.; Li, H.; Yu, H. Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. *Frontiers in microbiology*, **2018**, 9, 2885.

Yuniati, M. Bioremediation of petroleum-contaminated soil: A Review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **2018**, 118, 012063.

ANEXOS

Anexo A: Medios de Cultivo

A continuación, en las Tablas 13 – 24 se muestran los medios de cultivos empleados y su composición. En cada caso, se utilizó agua destilada como solvente, es decir, las concentraciones están dadas por cada litro de agua destilada. Además, todos los medios de cultivo, al prepararse, fueron esterilizados en una autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión 15 lb/in² por 15 min.

Tabla 13. Agar nutritivo.

Reactivo	Concentración
Peptona de gelatina	5 g/L
Extracto de carne	3 g/L
Agar	15 g/L

Tabla 14. Caldo nutritivo.

Reactivo	Concentración
Peptona de gelatina	5 g/L
Extracto de carne	3 g/L

Tabla 15. Agar diésel.

Reactivo	Concentración
Peptona de gelatina	5 g/L
Extracto de carne	3 g/L
Agar	15 g/L
Diésel	10 mL/L
Tween 80	10 mL/L

Tabla 16. Agar MacConkey.

Reactivo	Concentración
Peptona de caseína	1.5 g/L
Peptona de gelatina	17 g/L
Peptona de carne	1.5 g/L
Lactosa	10 g/L
Sales biliares	1.5 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Agar	13.5 g/L
Rojo neutro	0.03 g/L
Cristal violeta	0.001 g/L

Tabla 17. Medio de Citrato de Simmons.

Reactivo	Concentración
Fosfato dihidrogenado de amonio	1 g/L
Fosfato dipotásico	1 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Citrato de sodio	2 g/L
Sulfato de Magnesio	0.2 g/L
Agar	15 g/L
Azul de bromotimol	0.08 g/L

Tabla 18. Agar TSI.

Reactivo	Concentración
Peptona de caseína	10 g/L
Peptona de carne	10 g/L
Cloruro de sodio	5 g/L
Lactosa	10 g/L
Sacarosa	10 g/L
Dextrosa	1 g/L
Sulfato de hierro y amonio	0.2 g/L
Tiosulfato de sodio	0.2 g/L
Rojo de fenol	0.025 g/L
Agar	13 g/L

Tabla 19. Medio MR-VP (rojo de metilo y Voges-Proskauer).

Reactivo	Concentración
Peptona tamponada	7 g/L
Fosfato dipotásico	5 g/L
Dextrosa	5 g/L

Tabla 20. Medio SIM (Sulfuro-Indol-Movilidad).

Reactivo	Concentración
Peptona de caseína	20 g/L
Peptona de carne	6.1 g/L
Sulfato de hierro y amonio	0.2 g/L
Tiosulfato de sodio	0.2 g/L
Agar	3.5 g/L

Tabla 21. Agar EMB (eosina y azul de metileno).

Reactivo	Concentración
Peptona de gelatina	10 g/L
Lactosa	5 g/L
Sacarosa	5 g/L
Fosfato dipotásico	2 g/L
Agar	13.5 g/L
Eosina	0.4 g/L
Azul de metileno	0.065 g/L

Tabla 22. Agar rodamina B.

Reactivo	Concentración
Peptona de gelatina	5 g/L
Extracto de carne	3 g/L
Agar	15 g/L
Solución de rodamina B (1 g/L)	10 mL/L
Diésel	10 mL/L
Tween 80	5 mL/L
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	1 g/L
Cloruro de sodio (NaCl)	4 g/L

Tabla 23. Agar MMD (medio mineral y diésel).

Reactivo	Concentración
Agar	20 g/L
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.2 g/L
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	0.02 g/L
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	1 g/L
Nitrato de potasio NH ₄ NO ₃	1 g/L
Fosfato de amonio (NH ₄) ₂ HPO ₄	1 g/L
Sulfato férrico Fe ₂ (SO ₄) _{2n} H ₂ O	0.0089 g/L
Tween 80	5 mL/L
Diésel	10 mL/L

Tabla 24. Medio Mineral (MM).

Reactivo	Concentración
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	0.2 g/L
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	0.02 g/L
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	1 g/L
Nitrato de potasio NH ₄ NO ₃	1 g/L
Fosfato de amonio (NH ₄) ₂ HPO ₄	1 g/L
Sulfato férrico Fe ₂ (SO ₄) _{2n} H ₂ O	0.0089 g/L

Anexo B: Árbol Filogenético

La Figura 25 muestra el árbol filogenético de las secuencias de la región parcial 16S del ADNr empleadas para la identificación molecular de las cepas C5, C7 y C8.

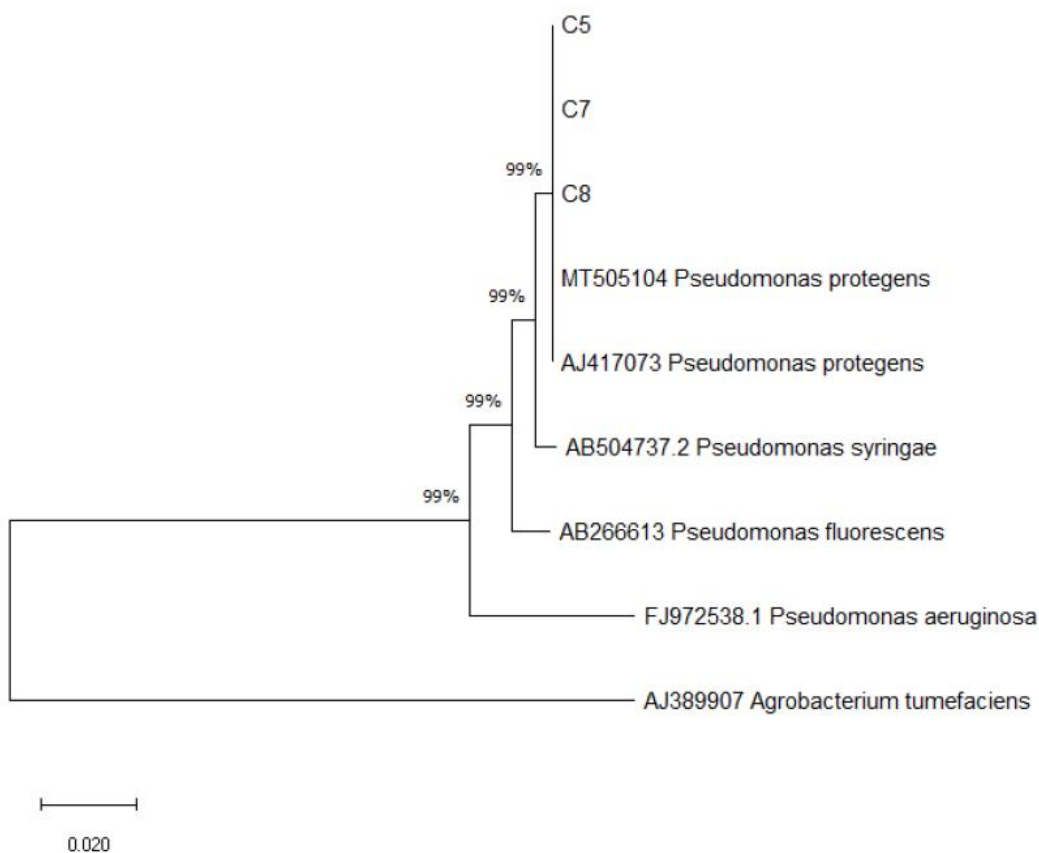


Figura 25. Árbol filogenético de las secuencias empleadas para la identificación molecular.

En la figura anterior, las secuencias parciales de la región parcial del 16S ADNr fueron obtenidas por secuenciación capilar direccional de los aislados a identificar, empleando secuencias de 627 nucleótidos. El árbol fue construido por el método de Neighbour joining con Mega X (Bootstraps = 1000), usando un modelo de sustitución Kimura de dos parámetros con una distribución gamma. Los valores de bootstrap se indican como porcentajes, sin embargo, sólo se muestran aquellos con un porcentaje mayor al 50%. La barra indica el número de sustituciones de nucleótidos por sitio. Seis secuencias de referencia se utilizaron para construir el árbol filogenético.

Anexo C: Evidencia Fotográfica

A continuación, las Figuras 26 – 43 muestran las evidencias fotográficas del presente trabajo.



Figura 26. Muestras del tratamiento biológico para secado en horno.



Figura 27. Muestras del tratamiento biológico después de 24 h de secado en horno.

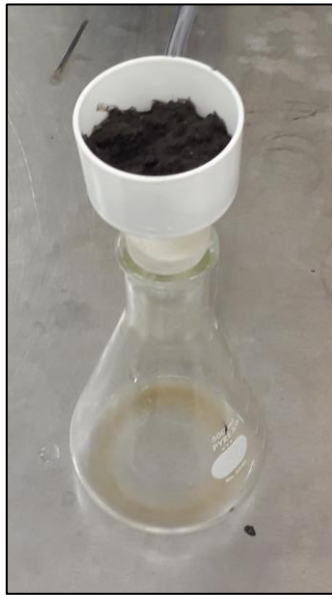


Figura 28. Obtención del extracto de saturación del suelo.



Figura 29. Reactivos para determinación del contenido de materia orgánica del suelo.

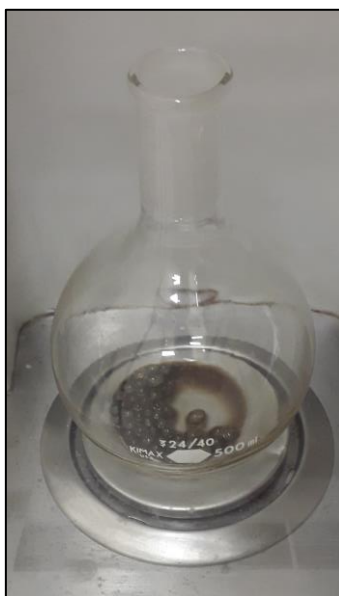


Figura 30. Matraz con el extracto de ARA del suelo contaminado.



Figura 31. Equipo para extracción Soxhlet.

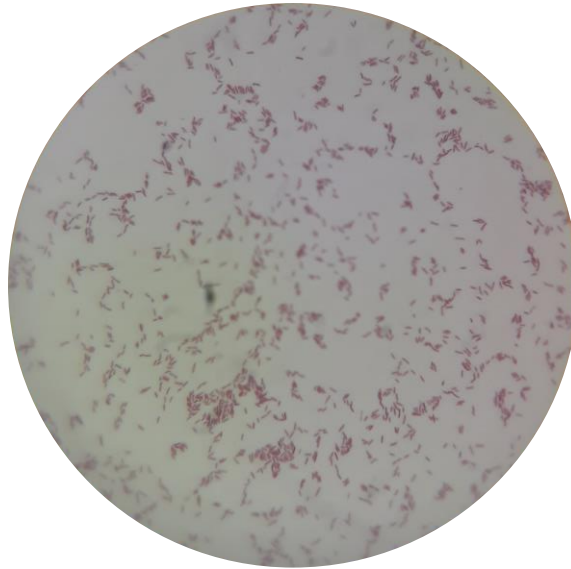


Figura 32. Tinción de Gram a C5.



Figura 33. Tinción de Gram a C10.

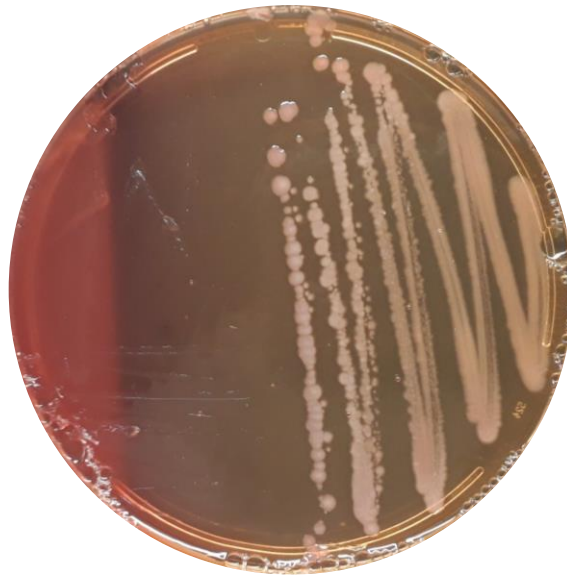


Figura 34. Crecimiento de C6 en Agar MacConkey.



Figura 35. Prueba de Citrato de Simmons.



Figura 36. Prueba de Agar TSI.



Figura 37. Prueba de rojo de metilo a C9.

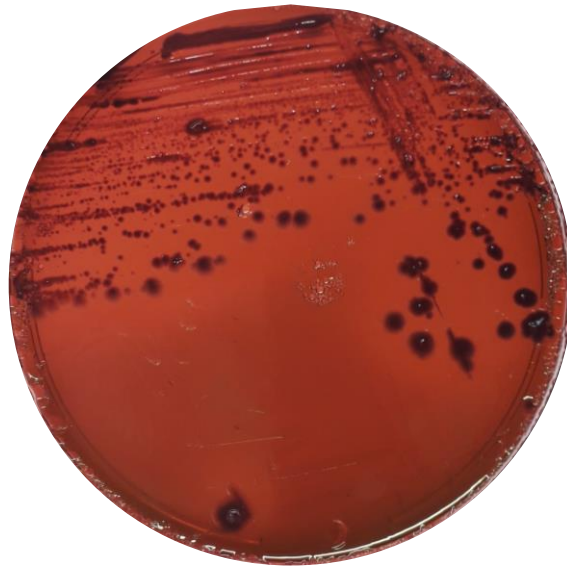


Figura 38. Crecimiento de C6 en Agar EMB.



Figura 39. Crecimiento de C9 en Agar rodamina B con actividad lipolítica.



Figura 40. Crecimiento de C7 en Agar MMD.

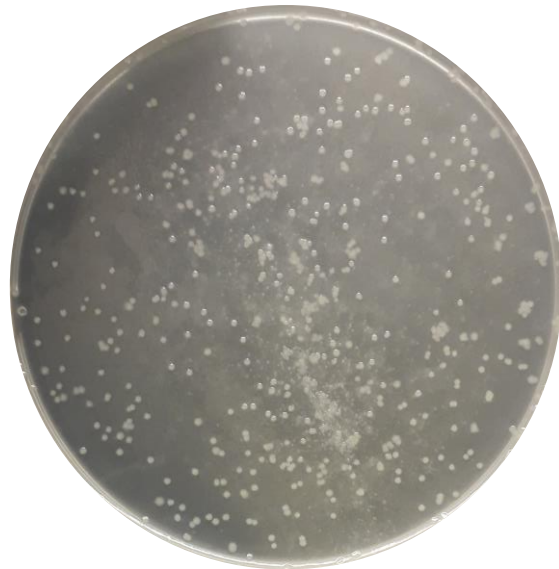


Figura 41. Crecimiento del cultivo de C5, C7 y C8 en Agar diésel para conteo en placa.



Figura 42. Preparación de los tratamientos biológicos.

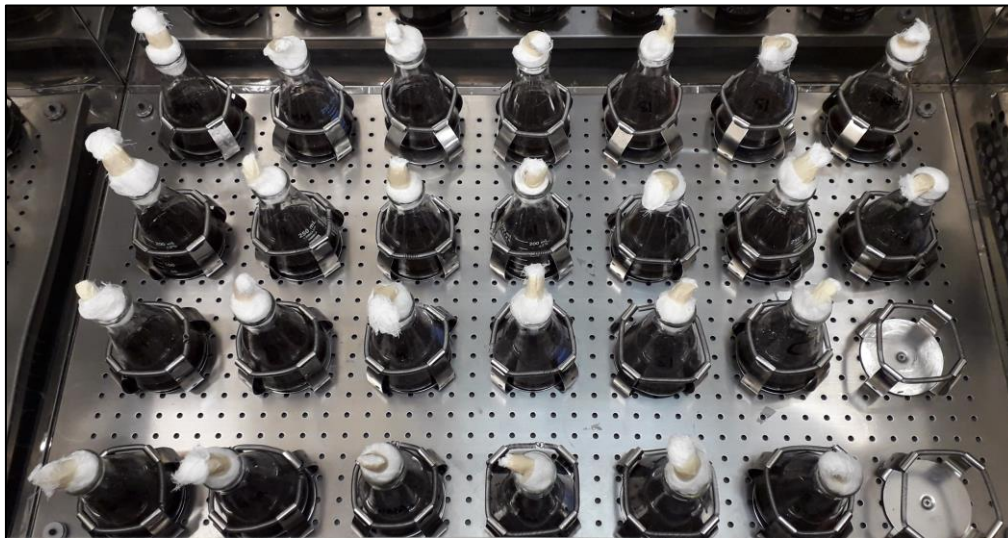


Figura 43. Matrices en incubadora para el tratamiento biológico.


Anexo D: Participación en Congreso

En la Figura 26 se muestra el reconocimiento por la participación en el 6TH CONFERENCE IWA-MEXICO YOUNG WATER PROFESSIONALS 2022, y en la Figura 27 se muestra el póster correspondiente.



Figura 44. Reconocimiento por participación en congreso.


ISOLATION AND IDENTIFICATION OF HYDROCARBON-DEGRADING BACTERIA FROM SPENT ENGINE OIL CONTAMINATED SOIL



J. R. Vargas Rodríguez¹, G. López Avilés¹, F. J. Almandariz Tapia¹, O. Monge Amaya¹, A. Alvarez Villa¹, G. M. Figueroa Torres²

¹Department of Chemical Engineering and Metallurgy, University of Sonora (e-mail: rocaberv96@gmail.com)

²Department of Chemical Engineering and Analytical Science, The University of Manchester



ABSTRACT

The contamination of soil by petroleum hydrocarbons, like spent engine oil (SEO), is one of the main environmental problems in Mexico and the world. SEO is a mixture of hydrocarbons generated during the lubrication cycle of the engine, which causes many problems such as the inhibition of life in the soil, and the reduction of agricultural production. In this work, bacteria strains are isolated from soil contaminated with SEO from an automotive mechanic workshop in Sonora, Mexico. First, the contaminated soil samples were characterized by determining pH, moisture content, electrical conductivity, organic matter content, and total petroleum hydrocarbons quantification. Ten different bacterial strains were isolated in diesel-agar plates. Then, they were subjected to gram stain and biochemical tests. After that, the bacterial strains were tested to select the most convenient to form a bacterial consortium for the bioremediation of contaminated soil, through an evaluation of lipolytic activity, using rhodamine B agar and tolerance to hydrocarbons, using diesel as the hydrocarbon source in diesel-agar, and as the sole carbon source in mineral medium agar. Three bacterial strains were selected as the most suitable to form a bacterial consortium in future research because they showed lipolytic activity and tolerance to hydrocarbons.

INTRODUCTION

One of the main environmental problems in Mexico and the world is the contamination of terrestrial ecosystems due to spills of petroleum hydrocarbons and their derivatives, among which is spent engine oil (SEO), a mixture of hydrocarbons generated during the cycle of engine lubrication. SEO inhibits life in the soil and reduces agricultural production (Escalante, et al. 2017). The conventional techniques used for remediation have been to dig up contaminated soil and remove it to a landfill or to cap and contain the contaminated areas of a site, but they have some drawbacks. Bioremediation is an option that offers the possibility to destroy or render harmless various contaminants using natural biological activity. Also, it uses relatively low-cost and low-technology techniques, which generally have a high public acceptance (Vidali, 2001). The objective of this study is to isolate and select a bacterial consortium for the bioremediation of soil contaminated with SEO, using indigenous microorganisms, because the degradation of these pollutants in contaminated soils of our entity has not been studied.

METODOLOGY

1. Soil characterization. That includes the determination of pH, moisture content, organic matter content, electrical conductivity, and quantification of total petroleum hydrocarbons (TPH).
2. Isolation of Bacterial Strains in pure cultures, based on different morphology and color.
3. Biochemical Tests. That includes the following tests: gram stain, catalase, citrate, triple sugar iron (TSI), mobility, hydrogen sulfide (H₂S), indole, methyl red (MR), and Voges-Proskauer (VP).
4. Evaluation of Lipolytic Activity, using rhodamine B agar (RB agar).
5. Evaluation of Tolerance to hydrocarbons in agar-diesel and mineral medium agar (MM agar).

RESULTS

The results of the characterization of the contaminated soil were as follows: pH = 6.95, moisture content = 0.38%, electrical conductivity = 1.52 ds/m, organic matter content = 6.75% and TPH = 309 512.1 mg/kg of dry solid. Ten different bacterial strains were isolated from the contaminated soil, nine being identified as gram-negative and the other as gram-positive, and they were labeled as C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, and C10. The following tables shows the results of the bacterial strains that showed lipolytic activity, excluding the rest of the strains, because the lipolytic activity indicates the presence of lipase enzymes, and indirectly, the production of biosurfactants, affecting positively the degradation of hydrocarbons (Carvalho-Gonçalves & Gorlach-Lira, 2018). Also, the results of the biochemical tests were not conclusive, so another method, such as molecular identification, will be used to identify the bacterial strains.

Test	Bacterial Strains				
	C5	C6	C7	C8	C9
Gram	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+
TSI	Alc/Alc	Alc/Alc, H ₂ S	Alc/Alc, H ₂ S	Alc/Alc, H ₂ S	Alc/A
Mobility	+	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-
MR	±	±	±	±	+
VP	-	-	-	-	-
RB agar	+	+	+	+	+

Medium	Bacterial Strain				
	C5	C6	C7	C8	C9
Agar-diesel 1% (24 h)	+	+	+	+	+
Agar-diesel 3% (24 h)	+	-	+	+	-
Agar-diesel 5% (24 h)	+	-	+	+	-
MM agar 1% diesel (120 h)	+	+	+	+	+
MM agar 3% diesel (120 h)	+	+	+	+	-

CONCLUSIONS

The soil sample was characterized and was confirmed that it has a high degree of contamination by TPH, exceeding the maximum permissible limits of hydrocarbon fractions in the soil, reported in NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, for which reason justifies the use of a remedial method. Ten different strains were successfully isolated from the contaminated soil and their lipolytic activity was evaluated. Five strains showed a positive result, which indicates that they produce lipase enzymes, and possibly biosurfactants, these being mechanisms that facilitate the degradation of hydrophobic compounds, such as fats and oils, making them feasible for their conformation in a bacterial consortium for the soil bioremediation. Therefore, tolerance to hydrocarbons was evaluated to select the most suitable for the bioremediation, being C5, C7, and C8 being the most suitable. In future research, C5, C7, and C8 strains will be identified by molecular identification, cause biochemical tests were not conclusive. Also, a bacterial consortium will be formed with these strains to treat the contaminated soil, in a batch study, to evaluate its ability to degrade TPH.

REFERENCES

Carvalho-Gonçalves, I. C. T. D., & Gorlach-Lira, K. (2018) Lipases and biosurfactants production by the newly isolated *Burkholderia* sp. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 5(9), 57-68.
 Escalante-Casinal, S., Márquez-Benavides, L., Baliterra-Trejo, E., Saucedo-Martínez, B. C. & Sánchez-Yañez, J. M. (2017) Bioremediación y fitoremediación de un suelo impactado por aceite residual automotriz con *Helianthus annuus* y *Burkholderia vietnamiensis*. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(2), 104-114.
 Vidali, M. (2001). *Bioremediation: An overview*. Pure and applied chemistry, 73(7), 1163-1172.




YOUNG WATER
PROFESSIONALS
MEXICO



Figura 45. Póster presentado en congreso.