

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE FRACCIÓN MEDIA MEDIANTE  
BIOAUMENTACIÓN CON UN CONSORCIO  
BACTERIANO HIDROCARBONOLASTA EN UN SISTEMA DE BIOPILAS

Por

ALEXIA SARAHI MATA DÁVILA

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con  
orientación en MICROBIOLOGÍA APLICADA.

MONTERREY, N.L.

MAYO 2020

DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE FRACCIÓN MEDIA MEDIANTE  
BIOAUMENTACIÓN CON UN CONSORCIO BACTERIANO  
HIDROCARBONOCLASTA EN UN SISTEMA DE BIOPILAS.

Aprobación de la tesis:

---

Dr. Ulrico Javier López Chuken

**Presidente**

---

**Secretario**

---

**Vocal**

---

Dra. María Elena Cantú Cárdenas  
Sub-Directora de Estudios de Posgrado

DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE FRACCIÓN MEDIA MEDIANTE  
BIOAUMENTACIÓN CON UN CONSORCIO BACTERIANO  
HIDROCARBONOCLASTAS EN UN SISTEMA DE BIOPILAS.

Revisión de la tesis:

---

Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado  
Co-asesora

---

Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredo  
Comité Tutorial

---

Dr. Juan Manuel Alfaro Barbosa  
Comité Tutorial

---

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez  
Comité Tutorial

## RESUMEN

Alexia Sarahi Mata Dávila

Fecha de graduación: 01-Jun-21

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de estudio: DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE FRACCIÓN MEDIA MEDIANTE BIOAUMENTACIÓN CON UN CONSORCIO BACTERIANO HIDROCARBONOCLASTAS EN UN SISTEMA DE BIOPILAS.

Número de páginas: 104 Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología aplicada.

Área de estudio: Microbiología aplicada.

**Propósito y método de estudio:** La presente investigación se realizó con la finalidad de evaluar las técnicas de naturaleza biológica que son de bajo costo para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos, que a su vez puedan ser empleadas a gran escala.

**Contribuciones y conclusiones:** Se diseñó un sistema de biopilas para evaluar el nivel de degradación de los hidrocarburos de fracción media. En el diseño de experimentos se manejaron 3 variables con dos niveles cada una. Bacterias hidrocarbonoclastas ( $10^6$  y  $10^9$  cél/mL), un cosustrato de origen vegetal (1% y 0.5%) y un surfactante comercial (0.1% y 0.05%). Todas las biopilas recibieron aireación (1 hora por día en intervalos de 10 min cada 3 horas). Las bacterias hidrocarbonoclastas a emplear fueron aisladas de un afloramiento natural de petróleo para posteriormente ser acondicionadas en reactores con nutrientes y a una concentración del 10% del HFM (diésel). Dichas bacterias fueron identificadas como *Pseudomonas*, de las que destacan las siguientes especies: *citronellolis* (NBRC 103043), *panipatensis* (Esp-1), *multiresinivorans* (ATCC 700690), *knackmussii* (B13), *nitritireducens* (WZBFD3-5A2), *delhiensis* (RLD-1) siendo estas algunas especies representativas del consorcio. Los resultados cromatográficos arrojaron que el tratamiento B3 (0.1% S y E+09) fue el proceso más eficiente, obteniendo un 81% de remoción del contaminante; seguido del tratamiento B4 (0.5% C y E+06) y B8 (1% C y 0.05% S) ambas con un 78% de remoción. En las biopilas con consorcio y cosustrato añadido, se mostró una mayor degradación del contaminante.

---

Dr. Ulrico Javier López Chuken

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACyT por la beca otorgada ya que gracias a este apoyo pude cumplir esta meta en mi vida.

A mi asesor el doctor Ulrico Javier López Chuken por aceptarme como su estudiante, por brindarme de su apoyo y gran experiencia la cual mucho me ha servido para poder sacar este proyecto adelante. Muchas gracias doctor.

A mi familia. Mi mamá que siempre me apoyó y ayudó dentro y fuera del proyecto. A Samuel que con mucho gusto me llevaba al CIByN y que entre los dos esperaban pacientes a que terminara mis experimentos. Mi hermano que me brindó su ayuda y fue mi relevo en algunas situaciones.

A Cristian. Me apoyó a llevar este reto, además de contribuir a él. Se esforzaba por llevarme a clases para que llegara temprano, comprendió que a veces no podíamos vernos y me daba mi espacio para realizar mis deberes. Gracias por tu comprensión, eres el mejor.

A mis compañeras y amigas Ana y Aglaeé. Entre las tres nos apoyamos, ayudamos e impulsamos para poder sacar a flote nuestros proyectos de investigación, siempre estuvieron ahí para mí, dándome apoyo moral. Son las mejores amigas que pude haber tenido en esto.

A mis amigas, esas que son para siempre: Deyanira, Hilda y Maggie. Me daban ánimos y comprendían cuando no podía verlas porque tenía que acabar esto, va para ustedes también.

A la señora Martha y a su familia por permitirme entrar a su hogar. Se preocupó por mí y me dio un espacio donde quedarme mientras realizaba la estancia de investigación, muchas gracias.

A la doctora Ma. Elena Cantú, siempre a disposición de sus alumnos, gracias también por su retroalimentación en los seminarios. A Karina Navarro por su ardua labor ayudándonos y explicándonos con paciencia cada uno de los procedimientos.

A mi co-asesora la doctora Melissa Marlene Rodríguez. Siempre puesta para ayudar, con ese carisma que la caracteriza y esa paciencia para escuchar que me producía mucha tranquilidad y confianza.

A la doctora Lina Raquel Riego del IPICYT. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de conocer personas con muy buena vibra, que siempre estuvieron dispuestos para ayudarme e hicieron que mi estancia en su instituto fuera muy buena. A Nicolás Gómez Hernández por enseñarme todas esas técnicas moleculares de las cuales no tenía idea, muchas gracias por darme un poco de tu experiencia, aprendí muchas cosas.

A Francisco Balderas y al doctor Morones por ayudarme y proporcionarme los reactivos para la extracción del ADN del consorcio.

A los técnicos de servicios profesionales y a la doctora Yolanda Gracia por ayudarnos con el análisis de las fracciones hidrocarbonadas.

Y por último pero no menos importante a mi comité tutorial; el doctor Juan Manuel Alfaro Barbosa y el doctor Edgar Allan Blanco Gámez por sus valiosas contribuciones en la revisión de este proyecto. Así como también a la doctora Alma Elizabeth Gómez Loredo, muchas gracias por ofrecerme su ayuda cuando lo requería y aconsejarme de la mejor manera. Gracias por brindarme su apoyo.

## DEDICATORIA

Con cariño para todas esas personas importantes en mi vida, que me han apoyado y confiado en mí antes que yo misma.

A mi madre, que hasta donde he llegado ha sido gracias a ella. Se esforzó y sacó adelante para darme lo mejor y se lo agradeceré siempre, es por eso por lo que le dedico todos mis logros, quiero que esté orgullosa de la hija que crio, así como lo estoy yo de ella, te amo mamá. Gracias por ser comprensiva conmigo y entender cuando estaba ocupada

A ti Cristian, siempre me has apoyado desde que nos conocimos, nunca te lo dejaré de agradecer, este trabajo también va para ti. Espero algún día lo leas.

*Los quiero mucho, mis personas favoritas.*

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>15</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Contaminación de los suelos por hidrocarburos</b> .....	<b>17</b>
2.1.1 Clasificación de los sitios contaminados.....	17
2.1.2 Problemática ambiental por hidrocarburos en México .....	17
2.1.3 Legislación ambiental de los suelos contaminados .....	18
2.1.3.1 NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.....	19
<b>2.2 El suelo</b> .....	<b>20</b>
2.2.1 Estructura y componentes del suelo.....	20
2.2.1.1 Fracción mineral.....	21
2.2.1.2 Densidad aparente .....	21
2.2.1.3 Porosidad .....	21
2.2.1.4 Humedad.....	22
2.2.1.5 Materia orgánica.....	22
2.2.1.6 Microbiología del suelo.....	23
<b>2.3 Hidrocarburos</b> .....	<b>24</b>
2.3.1 Composición por familias de hidrocarburos derivados del petróleo.....	24
2.3.2 Contaminación por HFM en México.....	25
2.3.2.1 Efectos toxicológicos en seres vivos .....	25
<b>2.4 Remediación de suelos</b> .....	<b>26</b>
2.4.1 Tecnologías de remediación.....	26
2.4.1.1 Biorremediación .....	28
2.4.1.1.1 Biopilas.....	29
<b>2.5 Poblaciones microbianas en procesos de biorremediación</b> .....	<b>30</b>
2.5.1. Bacterias hidrocarbonoclastas.....	31
2.5.2 Biodegradación mediante cepas aisladas .....	31
2.5.3 Biodegradación por cultivos mixtos .....	32
2.5.4 Degradación metabólica de los hidrocarburos.....	32
2.5.4.1 La degradación a nivel enzimática .....	33
<b>2.6 Ventajas y limitaciones de los procesos de biorremediación</b> .....	<b>34</b>
2.6.1 Factores que condicionan la biorremediación del suelo .....	35
2.6.2 Agentes potenciadores de la biodegradación.....	36



2.6.2.1 Cosustratos .....	36
2.6.2.2 Surfactantes .....	37
<b>2.7 Antecedentes .....</b>	<b>38</b>
<b>2.8 Justificación .....</b>	<b>41</b>
<b>2.9 Hipótesis.....</b>	<b>42</b>
<b>2.10 Objetivos.....</b>	<b>42</b>
2.10.1 Objetivo general.....	42
2.10.2 Objetivos específicos .....	42
<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Acondicionamiento del consorcio BHCC .....</b>	<b>43</b>
3.1.1 Obtención del suelo de una chapopotera .....	43
3.1.2 Acondicionamiento del consorcio .....	43
3.1.3 Evaluación del crecimiento del consorcio BHCC .....	44
3.1.3.1 Medición de la densidad óptica .....	44
3.1.3.2 Conteo en cámara de Neubauer .....	44
3.1.3.3 Modelo de Gompertz.....	45
3.1.4 Determinación de las propiedades fisicoquímicas del medio .....	46
3.1.5 Propiedades emulsificantes del sobrenadante .....	47
3.1.5.1 Desplazamiento de aceite. ....	47
3.1.5.2 Índice de emulsificación (%I.E.) .....	47
3.1.5.3 Estabilidad de la emulsión (E24) .....	47
<b>3.2 Caracterización molecular del consorcio BHCC .....</b>	<b>48</b>
3.2.1 Cultivo y purificación de las colonias .....	48
3.2.2 Extracción del ADN genómico .....	48
3.2.3 Amplificación del gen ribosomal 16S .....	49
3.2.4 Análisis de las secuencias obtenidas .....	51
<b>3.3 Propiedades del suelo a remediar .....</b>	<b>52</b>
3.3.1 Obtención del suelo a biorremediar .....	52
3.3.2 Determinación de las propiedades del suelo .....	52
3.3.2.1 Determinación de pH del suelo. ....	52
3.3.2.2 Humedad.....	52
3.3.2.3 Materia Orgánica.....	53

3.3.2.4	Textura del suelo .....	54
3.3.2.5	Capacidad de campo.....	54
3.3.2.6	Densidad aparente. ....	55
3.3.2.7	Porosidad. ....	55
3.3.2.8	Conductividad eléctrica. ....	55
3.3.3	Determinación de las propiedades microbiológicas del suelo .....	56
3.3.3.1	Conteo celular por dilución y vertido en placa .....	56
<b>3.4</b>	<b>Construcción y evaluación de las biopilas.....</b>	<b>57</b>
3.4.1	Diseño de experimentos .....	57
3.4.1.1	Ensamblaje de las biopilas .....	58
3.4.2	Evaluación de las biopilas .....	58
3.4.2.1	Determinación del pH.....	59
3.4.2.2	Determinación de la CE.....	59
3.4.2.3	Monitoreo de humedad.....	59
3.4.2.4	Monitoreo de la temperatura .....	60
3.4.2.4.1	Monitoreo temperatura del suelo .....	60
3.4.2.4.2	Monitoreo de temperatura ambiental.....	60
3.4.3	Método analítico para la determinación de los HFM.....	60
3.4.3.1	Determinación de la de masa seca. ....	60
3.4.3.2	Método de extracción de los hidrocarburos.....	61
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>62</b>
<b>4.1</b>	<b>Acondicionamiento del consorcio BHCC .....</b>	<b>62</b>
4.1.1	Evaluación del crecimiento del consorcio BHCC .....	62
4.1.2	Determinación de las propiedades fisicoquímicas del medio .....	65
4.1.2.1	Determinación del pH.....	65
4.1.2.2	Determinación de la CE.....	66
4.1.3	Propiedades emulsificantes del consorcio .....	67
4.2	Caracterización molecular del consorcio BHCC .....	69
4.3	Propiedades del suelo a remediar .....	72
4.4	Ensayo de biorremediación en las biopilas .....	73
4.4.1	Determinación de la materia orgánica. ....	74
4.4.2	Determinación de las propiedades fisicoquímicas del suelo.....	74

4.4.2.1 Determinación del pH.....	74
4.4.2.2 Determinación de la conductividad eléctrica del suelo .....	76
4.4.3 Determinación de la humedad.....	77
4.4.4 Monitoreo de la temperatura.....	78
4.4.5 Evaluación de los hidrocarburos extraídos de las biopilas .....	79
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO. ....</b>	<b>90</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>99</b>

## ABREVIACIONES Y SIMBOLOS USADOS

<b>BHCC</b>	Bacterias Hidrocarbonoclastas
<b>BTEX</b>	Benceno-Tolueno-Etilbenceno-Xileno
<b>CG-DIF</b>	Cromatografía de Gases acoplado con Detector de Ionización de Flama
<b>CG-EM</b>	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nation
<b>HAP</b>	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
<b>HFL</b>	Hidrocarburos de Fracción Ligera
<b>HFM</b>	Hidrocarburos de Fracción Media
<b>HFP</b>	Hidrocarburos de Fracción Pesada
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>HTP</b>	Hidrocarburos Totales del Petróleo
<b>ISRIC</b>	International Soil Reference and Information Center
<b>ISSS</b>	International Society of Soil Science
<b>LAU</b>	Licencia Ambiental Única
<b>LGPGIR</b>	Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos
<b>MO</b>	Materia Orgánica
<b>NMX</b>	Norma Mexicana
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana
<b>PEMEX</b>	Petróleos Mexicanos
<b>PROFEPA</b>	Procuraduría Federal de Protección al Ambiente
<b>SEMARNAT</b>	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visible

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Sumario de las normas mexicanas establecidas para el uso en modelos de remediación.	<b>19</b>
<b>Tabla 2.</b>	Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo (mg/kg) en México.	<b>20</b>
<b>Tabla 3.</b>	Principales técnicas de remediación para sitios contaminados con diversos tipos de sustancias contaminantes.	<b>27</b>
<b>Tabla 4.</b>	Descripción de las técnicas de descontaminación por tratamientos biológicos para diversos tipos de sustancias contaminantes.	<b>29</b>
<b>Tabla 5.</b>	Estudios enfocados en la degradación de HTP empleando biopilas como tecnología de biorremediación.	<b>38</b>
<b>Tabla 6.</b>	Investigaciones de los últimos años enfocadas en la degradación de HFM empleando bioaumentación.	<b>39</b>
<b>Tabla 7.</b>	Diseño experimental; combinación de variables.	<b>58</b>
<b>Tabla 8.</b>	Método cromatográfico.	<b>62</b>
<b>Tabla 9.</b>	Valores cinéticos estimados para el crecimiento del consorcio bacteriano hidrocarbonoclasta.	<b>65</b>
<b>Tabla 10.</b>	Caracterización fisicoquímica del sobrenadante centrifugado de la biomasa producido por el consorcio bacteriano en el reactor.	<b>69</b>
<b>Tabla 11.</b>	Características microscópicas y macroscópicas de las colonias aisladas por agotamiento de estría en cuatro campos.	<b>70</b>
<b>Tabla 12.</b>	Bacterias identificadas con 98-99% de identidad basados en las secuencias del rADN 16S del repositorio de secuencias del NCBI.	<b>70</b>
<b>Tabla 13.</b>	Resultados de las pruebas fisicoquímicas y microbiológicas del suelo a remedia procedente de la zona minera de Zacatecas, México.	<b>73</b>
<b>Tabla 14.</b>	Porcentaje de %MO previo al experimento y al agregar el cosustrato.	<b>75</b>
<b>Tabla 15.</b>	Composición de las biopilas y su porcentaje de disminución de la fracción media a los en 30 y 60 días de muestreo.	<b>83</b>
<b>Tabla 16.</b>	Tabla compilatoria de las características fisicoquímicas al inicio y al final del experimento.	<b>86</b>
<b>Tabla 17.</b>	Concentración final teórica calculada para las biopilas analizadas.	<b>87</b>
<b>Tabla 18.</b>	Concentración de ADN genómico y relación A260/280.	<b>93</b>
<b>Tabla 19.</b>	Análisis de la concentración de los amplicones.	<b>93</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Disposición de los componentes del suelo.	<b>21</b>
<b>Figura 2.</b>	Tecnologías de remediación de suelos utilizadas en México por empresas autorizadas.	<b>26</b>
<b>Figura 3.</b>	Componentes característicos de una biopila.	<b>30</b>
<b>Figura 4.</b>	Observaciones del medio de crecimiento a lo largo del experimento.	<b>63</b>
<b>Figura 5.</b>	Evaluación del crecimiento del consorcio hidrocarbonoclasta. Gráfico basado en la absorbancia.	<b>64</b>
<b>Figura 6.</b>	Evaluación del crecimiento del consorcio hidrocarbonoclasta. Gráfico basado en conteo en cámara.	<b>64</b>
<b>Figura 7.</b>	Curva de pH en el medio de crecimiento del consorcio hidrocarbonoclasta.	<b>66</b>
<b>Figura 8.</b>	Curva de conductividad eléctrica en el medio del crecimiento del consorcio hidrocarbonoclasta.	<b>67</b>
<b>Figura 9.</b>	Apariencia de la fase oleosa (HFM) a lo largo de la duración del experimento.	<b>68</b>
<b>Figura 10.</b>	Disposición de las 10 biopilas.	<b>74</b>
<b>Figura 11.</b>	Determinación del pH del suelo de las biopilas.	<b>76</b>
<b>Figura 12.</b>	Determinación de la conductividad eléctrica en el suelo de las biopilas.	<b>77</b>
<b>Figura 13.</b>	Monitoreo de la humedad en las biopilas.	<b>78</b>
<b>Figura 14.</b>	Monitoreo de la temperatura del suelo de las biopilas.	<b>79</b>
<b>Figura 15.</b>	Monitoreo de la temperatura ambiental de las biopilas.	<b>79</b>
<b>Figura 16.</b>	Cromatogramas de la determinación de la fracción media de los hidrocarburos en las biopilas, muestreadas a 30 y 60 días.	<b>81</b>
<b>Figura 16A.</b>	Cromatogramas correspondientes al análisis de la fracción media de los hidrocarburos de la biopila 1.	<b>81</b>
<b>Figura 16B.</b>	Cromatogramas correspondientes al análisis de la fracción media de los hidrocarburos de la biopila 4.	<b>83</b>
<b>Figura 16C.</b>	Cromatogramas correspondientes al análisis de la fracción media de los hidrocarburos de la biopila 8.	<b>85</b>
<b>Figura 17.</b>	Etapas del acondicionamiento del consorcio.	<b>90</b>
<b>Figura 18.</b>	Características fenotípicas de las colonias bacterianas aisladas.	<b>84</b>
<b>Figura 19.</b>	Aislamiento de colonias en agar nutritivo por estría en tres campos.	<b>91</b>
<b>Figura 20.</b>	Aislamiento de colonias en agar nutritivo por agotamiento de estría en cuatro	<b>91</b>
<b>Figura 21.</b>	Extracción del ADN genómico de las colonias aisladas	<b>92</b>
<b>Figura 22.</b>	Amplicones del gen 16S.	<b>92</b>

## INTRODUCCIÓN

La sociedad está en constante movimiento para encontrar soluciones a las problemáticas de contaminación que afectan a los ecosistemas. Nuevas tecnologías se desarrollan día a día para el tratamiento de aguas contaminadas. El monitoreo ambiental es constante para diseñar alternativas que ayuden a disminuir los gases de efecto invernadero que emitimos a la atmósfera. Así como el agua y el aire son importantes, el suelo lo es de igual manera y debemos atender los casos que lo afectan.

La problemática originada por la contaminación de suelos ha generado que se empiece a buscar soluciones efectivas para degradar los contaminantes que yacen en dicha matriz. Dentro de los principales contaminantes del suelo se encuentran los hidrocarburos, estos están presentes en la vida cotidiana y el impacto que originan en los ecosistemas es preocupante, por lo cual se busca mejorar las alternativas existentes que ayuden a disminuir su huella en el medio ambiente. Ciertos hidrocarburos han sido descritos como extremadamente contaminantes, ya que son altamente persistentes en el ambiente y tienen un alto potencial mutagénico para los seres humanos, lo cual eleva la creciente demanda por neutralizarlos o eliminarlos. Dentro de los tratamientos empleados para la disminución de contaminantes se encuentran los biológicos, que llevan a cabo la tarea de disminuir dichos compuestos de una forma más amigable con el medio ambiente y más fáciles de emplear sin la necesidad de equipos o tecnología de alto costo y difícil acceso como es el caso de las tecnologías fundamentadas en reacciones químicas o procesos fisicoquímicos.

Existen diferentes alternativas para aplicar los tratamientos biológicos. La biorremediación es una de ellas y se fundamenta empleando organismos vivos para atenuar o neutralizar los contaminantes presentes. Dentro de la biorremediación se encuentra la bioaumentación, que consiste en adicionar

microorganismos exógenos encargados de degradar los contaminantes a compuestos de menor peso molecular. Por otro lado, en la bioestimulación, una carga de nutrientes se adiciona al suelo para ser captados por los microorganismos nativos presentes con el objetivo de obtener una remoción del contaminante en menor tiempo. Las bacterias que degradan los hidrocarburos del petróleo son conocidas como bacterias hidrocarbonoclastas y se cuenta con información que respalda la capacidad de aislar consorcios hidrocarbonoclastas a partir de afloramientos naturales de petróleo crudo<sup>1</sup>. Se ha evaluado su potencial de degradación haciéndolas candidatas efectivas para ser empleadas en zonas contaminadas con estos compuestos tóxicos. Los procesos de biorremediación se han empleado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con hidrocarburos del petróleo.

Las biopilas involucra los tratamientos biológicos que incluyen las tecnologías de bioaumentación y bioestimulación. Consiste en apilar el suelo contaminado y adicionarle bacterias capaces de degradar el compuesto a remover, así como adicionar los nutrientes necesarios para estimular el crecimiento de dichas bacterias. El objetivo de emplear esta tecnología en este proyecto es disminuir los hidrocarburos de fracción media presentes en un suelo minero hasta la normativa mexicana vigente.



## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Contaminación de los suelos por hidrocarburos**

Gran parte de los productos y servicios que utilizamos dependen en gran medida del petróleo y sus derivados. El petróleo es el pilar energético de la sociedad actual, forma parte de los procesos industriales y cotidianos, inevitablemente generan residuos que son emitidos a la atmósfera o vertidos a cuerpos de agua y al suelo, impactando a los elementos ambientales. En la mayoría de los casos estos residuos pueden ser tóxicos para los seres vivos ya que, producen lixiviados que se filtran a los cuerpos de agua superficiales o subterráneos adyacentes a las zonas contaminadas, ocasionando problemas de toxicidad, eutrofización y acidificación<sup>2</sup> que desencadenan en problemas graves para las especies que ahí habitan.

#### **2.1.1 Clasificación de los sitios contaminados**

La SEMARNAT clasifica los sitios contaminados en dos tipos:

- Los pasivos ambientales: amplios territorios contaminados a causa del uso industrial del suelo y el manejo inadecuado de los residuos peligrosos, con alta necesidad de remediación debido a que no fueron atendidos oportunamente para impedir la dispersión de los contaminantes.
- Y los causados por emergencias ambientales; que ocurre cuando la contaminación del sitio deriva de una circunstancia o evento indeseado o inesperado.<sup>3</sup>

#### **2.1.2 Problemática ambiental por hidrocarburos en México**

En México, entre el 2008 y 2015, el 63% de sitios contaminados estuvieron ligados a actividades de PEMEX y reportados como emergencias ambientales. Dentro de estas emergencias los contaminantes involucrados fueron los hidrocarburos totales del petróleo con un 29.8% de los casos, la gasolina con el

26.8%, el diésel con 14.1% y el petróleo crudo con 11.7%. Se realizó un seguimiento por la PROFEPA dentro de ese lapso para verificar que las emergencias ambientales estuvieran neutralizadas. El 21% de las visitas atendió la emergencia, en el 78.4% de las visitas restantes se encontraron anomalías, y en el porcentaje menor se encontraron irregularidades mayores que fueron motivo de clausura del lugar<sup>4</sup>. Concluyendo así que las estadísticas indican que los casos donde se busca una solución para contrarrestar el problema son minoría, requiriendo de urgencia alternativas de remediación del suelo que puedan ser empleadas por los generadores de sitios contaminados.

Se identificaron 625 casos de sitios contaminados en el territorio mexicano en el año 2015. Los sitios mayormente contaminados fueron los estados de Veracruz con 73, Querétaro con 58, Guanajuato, Jalisco y Colima con 49, 42 y 40 sitios respectivamente<sup>5</sup>.

### **2.1.3 Legislación ambiental de los suelos contaminados**

Dentro de las 14 normas mexicanas establecidas para regular la gestión de sitios contaminados, 6 son referentes a hidrocarburos. Las NOM establecen los límites máximos permisibles e instituyen especificaciones para la remediación, dando certidumbre a la efectividad de los resultados obtenidos en el empleo de la remediación de los sitios contaminados. A su vez estas NOM se complementan con las NMX las cuales proporcionan la metodología para analizar los hidrocarburos<sup>6</sup>. En la **tabla 1** se muestran las normas asociadas a la remediación de hidrocarburos.

**Tabla 1**

*Sumario de las normas mexicanas establecidas para el uso en modelos de remediación.*

Norma	Objetivo
<i>Norma Oficial Mexicana</i>	
NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012	Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelo y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación.
<i>Normas Mexicanas</i>	
NMX-AA-105-SCFI-2014	Hidrocarburos de fracción ligera (FL) por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (CG-FID) o espectrometría de masas (CG-EM).
NMX-AA-145-SCFI-2008	Hidrocarburos de fracción media (FM) por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (CG-FID).
NMX-AA-134-SCFI-2006	Hidrocarburos de fracción pesada (FP) por extracción y gravimetría. Método de prueba.
NMX-AA-146-SCFI-2008	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) por cromatografía de gases con espectrometría de masas (CG-EM) o cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detectores de fluorescencia y ultravioleta visible (UV-Vis). Método de prueba.
NMX-AA-141-SCFI-2014	Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xilenos (BTEX) por cromatografía de gases con espectrometría de masas (CG-EM) y fotoionización. Método de prueba.

*Tomada de: SEMARNAT, Dirección General de Gestión Integral de Materiales y Actividades Riesgosas, 2016. En: Programa Nacional de Remediación de Sitios Contaminados. [http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi\\_apps/WFServlet?IBIF\\_ex=D3\\_R\\_SITIOS01\\_04&IBIC\\_user=dgeia\\_mce&IBIC\\_pass=dgeia\\_mce](http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D3_R_SITIOS01_04&IBIC_user=dgeia_mce&IBIC_pass=dgeia_mce)*

### **2.1.3.1 NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012**

La SEMARNAT es el organismo mexicano encargado de impulsar la protección, restauración y conservación de los ecosistemas y recursos naturales.

Para eliminar o neutralizar los impactos ambientales ocasionados por los contaminantes anteriormente mencionados, la SEMARNAT realiza la gestión de los pasivos ambientales con la finalidad de evaluar los programas de remediación que se están llevando a cabo en dichos sitios. Junto con otras instancias gubernamentales se realizan estas evaluaciones para conocer a nivel nacional los sitios contaminados y generar información actualizada, ya que, actualmente siguen en desarrollo políticas y programas para prevenir estas emergencias ambientales. Los límites máximos permisibles en México de HFM<sup>7</sup> se presentan en la **tabla 2**.

**Tabla 2**

*Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo (mg/kg) en México.*

Fracción de hidrocarburos	Uso de suelo predominante (mg/kg base seca)			Método analítico
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación.	Residencial y recreativo	Industrial y comercial	
Ligera	200	200	500	NMX-AA-105-SCFI-2014
Media	1 200	1 200	5 000	NMX-AA-145-SCFI-2008
Pesada	3 000	3 000	6 000	NMX-AA-134-SCFI-2006

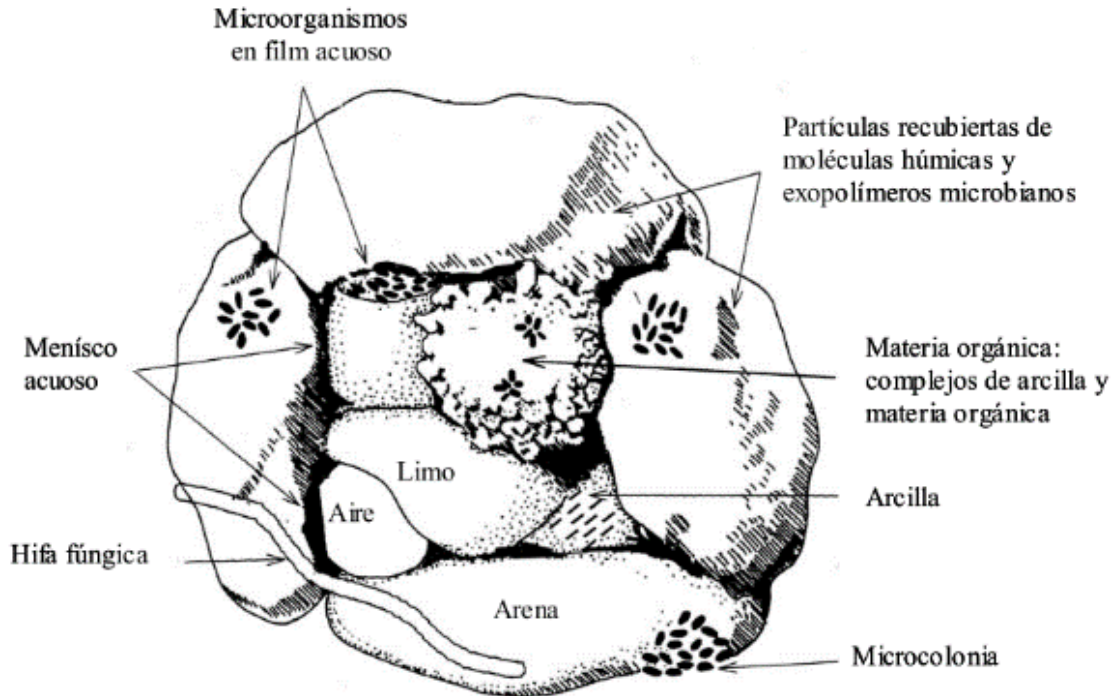
*Tomada de: Diario Oficial de la Federación, 2013. En: Norma Oficial Mexicana, NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. <https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/6646/1/nom-138-semarnat.ssa1-2012.pdf>*

## 2.2 El suelo

Se denomina suelo a la parte superficial de la corteza terrestre, en ella se desempeñan funciones naturales y antropogénicas. Está constituido por minerales (meteorización de rocas), orgánicos (biomasa viva o muerta, humus y sus derivados), gas (presente entre el espacio de los poros) y agua. Existen diferentes texturas del suelo, las tres principales y de las que están derivados los demás tipos son: arenosos, limosos y arcillosos. El suelo representa un recurso natural de vital importancia, ya que en él se llevan a cabo diversos procesos y funciones que han servido para establecernos nosotros mismos como especie. Lamentablemente, dañarlo resulta más rápido y fácil que lo que este tarda en renovarse<sup>8</sup>.

### 2.2.1 Estructura y componentes del suelo

Los minerales y la materia orgánica del suelo se distribuyen generando una estructura porosa. El agua y aire son partícipes en los poros, siendo fundamentales para la actividad metabólica de microorganismos que ahí colonizan, pero la cantidad de estos pueden variar, siendo favorables o desfavorables para el crecimiento microbiano. En la **figura 1** se ilustra mejor lo antes mencionado.



**Figura 1.** Disposición de los componentes del suelo.  
 Tomada de: Viñas, M. & Solanas, A., 2005. En: *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicología*. Figura 3.1.  
<https://www.tdx.cat/handle/10803/2396;jsessionid=6359C03A56BA0979D492E7935D00FA0D>

### 2.2.1.1 Fracción mineral.

La materia inorgánica presente en el suelo se conoce como la fracción mineral. Estos minerales determinan la textura del suelo que puede ser: grava, arena gruesa, arena fina, limo o arcilla. La importancia de conocer la textura del suelo es debido a la influencia que tiene de manera directa con las propiedades físicas, químicas y biológicas de la matriz<sup>9,10</sup>.

### 2.2.1.2 Densidad aparente

Las partículas varían en cuanto a composición y tamaño. Saber la densidad de partículas es importante para calcular las propiedades del suelo como la porosidad. La densidad aparente del suelo es la relación entre el peso del suelo seco y el volumen total, volumen que incluye el espacio poroso<sup>11</sup>.

### 2.2.1.3 Porosidad

Conocer la porosidad permite predecir la filtración y pérdida del agua, así como la retención de humedad y la aireación del suelo. Además, es importante conocerla para ajustar los parámetros o variables a utilizar y obtener un resultado

prometedor en la remoción del contaminante. La porosidad puede ser determinada a partir del valor de densidad aparente. Una baja porosidad tiene efectos negativos en la biorremediación, ya que afecta las propiedades físicas del suelo, proporciona una menor aireación<sup>12</sup>, una menor capacidad de filtración de agua e impide el crecimiento adecuado de los microorganismos presentes en el suelo<sup>11</sup>. Poros menores a 3 µm no son accesibles para las bacterias<sup>13</sup>.

#### **2.2.1.4 Humedad**

La cantidad de agua contenida en el suelo referida como porcentaje (% p/p) se conoce como humedad del suelo y es uno de los principales determinantes en una buena biorremediación, ya que, esta influye en propiedades físicas como la densidad aparente y la porosidad del suelo<sup>14</sup>. Dicha humedad es dependiente del clima, la vegetación y la profundidad de la matriz, y va ligada al tipo de suelo. Suelos arenosos tendrán menor porcentaje de humedad a diferencia de los limosos o arcillosos<sup>11</sup>.

La humedad es un factor determinante para la elección de una tecnología de remediación en suelos contaminados. Esto es una desventaja para suelos con alto contenido de humedad, donde el transporte de aire se ve impedido, afectando así los procesos biológicos de remediación. Esto es debido a que, sin aire, los microorganismos aerobios degradadores de los contaminantes no serían capaces de crecer<sup>15</sup>.

#### **2.2.1.5 Materia orgánica**

La humedad del suelo está directamente relacionada con la materia orgánica presente, la cual está constituida por desechos vegetales y animales. La materia orgánica se encuentra como materia orgánica fresca o como humus del suelo. La materia orgánica fresca está constituida por algunos polisacáridos como la celulosa y lignina, así como de otros compuestos de alto y bajo peso molecular. La segunda variante denominada como humus de suelo, es materia orgánica que ya ha sido degradada por los procesos del suelo y/o microorganismos<sup>16</sup>. Si el contenido de humus es alto, se disminuye la movilidad de los compuestos

orgánicos, nutrientes y microorganismos afectando la eficiencia de las tecnologías de bioremediación<sup>15,17</sup>.

La presencia de materia orgánica es importante debido al valor nutrimental que esta aporta a los microorganismos presentes, además de que mejora las características físicas del suelo. Cuando el suelo es carente de un buen porcentaje de materia orgánica se buscan alternativas para aumentarla, como es el caso de la adición de abonos y otros residuos vegetales utilizados como fuente de nutrientes, también conocidos como agentes de carga<sup>18</sup>.

#### **2.2.1.6 Microbiología del suelo**

El espacio de los poros proporcionado por las diferentes texturas del suelo confiere las condiciones óptimas para que las bacterias y otros microorganismos puedan colonizar el suelo. Las condiciones favorables que proporciona la red de poros del suelo a las bacterias son: una mejor captación de oxígeno, agua y otros nutrientes<sup>19</sup>. Los microorganismos pueden estar distribuidos en el suelo, situados en poros pequeños que van desde los 0.8 a 3  $\mu\text{m}$ , formando microcolonias separadas de unos 100  $\mu\text{m}$  de distancia<sup>20</sup>. Por lo tanto, es de esperarse que una amplia variedad de poblaciones de estos microorganismos esté directamente relacionada con las propiedades fisicoquímicas del suelo, entre las que destacan la porosidad, materia orgánica y capacidad de campo.

Cuando el suelo ya cuenta con años previos de contaminación con el compuesto a remediar, la composición microbiana del suelo estará adaptada para metabolizar dicho contaminante, contribuyendo a mejores resultados de degradación, favoreciendo el proceso de biorremediación. Para el caso de compuestos contaminantes más recalcitrantes, se puede adicionar bacterias especializadas en la degradación de dichas sustancias, que, en conjunto con las bacterias nativas presentes del suelo potencializan la biodegradación de los contaminantes.

## 2.3 Hidrocarburos

Los compuestos químicos formados por átomos de carbono e hidrogeno son conocidos como hidrocarburos y según su estructura química están divididos en parafínicos, olefínicos, nafténicos y aromáticos. Los hidrocarburos parafínicos son moléculas orgánicas de cadena lineal, también conocidos como hidrocarburos saturados o alcanos. Los hidrocarburos olefínicos contienen uno o más enlaces dobles entre las moléculas de carbono y, al contener menos hidrógenos que los alcanos pero la misma cantidad de carbonos, se les conoce como hidrocarburos no saturados o alquenos o alquinos (dependiendo el número de enlaces). Los nafténicos son hidrocarburos cíclicos con cadenas carbonadas que se cierran en sus extremos, formando así los ciclos o anillos (que pueden ser saturados o insaturados). Los compuestos aromáticos son moléculas cíclicas conjugadas, las cuales a su vez son subdivididas en monoaromáticos, diaromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).

El petróleo y sus derivados incluyen las estructuras antes mencionadas, una parte está formado solo por átomos de carbono e hidrogeno y una parte menor de otros elementos como lo son el nitrógeno, azufre, oxígeno y algunos metales<sup>21</sup>. Los hidrocarburos al ser de uso cotidiano y de fácil alcance, son los contaminantes ambientales de mayor persistencia en la naturaleza<sup>22</sup>.

### 2.3.1 Composición por familias de hidrocarburos derivados del petróleo

Los hidrocarburos se clasifican por el número de carbono que los componen y se catalogan como; fracción ligera, fracción media o fracción pesada<sup>7</sup>.

*Hidrocarburos de fracción ligera (HFL):* Los participantes de este grupo son mezclas de hidrocarburos cuyas moléculas comprenden de cinco a diez átomos de carbono (C5-C10). Un ejemplo de este grupo es la gasolina.

*Hidrocarburos de fracción media (HFM):* Los hidrocarburos de fracción media comprenden moléculas que contiene entre diez y veintiocho átomos de carbono (C10-C28). En este grupo resaltan el diésel (gasóleo) y el queroseno.



*Hidrocarburos de fracción pesada (HFP):* Aquellos compuestos por moléculas entre veintiocho y cuarenta átomos de carbono pertenecen a los hidrocarburos de fracción pesada (C28-C40). Pertenecen a este grupo el combustóleo pesado y los asfaltos.

### **2.3.2 Contaminación por HFM en México**

Se ha mencionado anteriormente que los derrames de hidrocarburos son un peligro para el medio ambiente. Dentro de la amplia gama de los hidrocarburos derivados del petróleo se encuentra la fracción media, los cuales son los más comúnmente usados. En México el segundo combustible mayormente utilizado es el diésel<sup>23</sup> (solo por debajo de la gasolina). Utilizado como combustible de medios de transporte de productos y servicios, el diésel es una mezcla compleja de alcanos y compuestos aromáticos y es usualmente un contaminante habitual del suelo debido a las fugas en los tanques de almacenamientos y los derrames accidentales<sup>24</sup>. El crecimiento industrial de los últimos años en el país ha generado un gran impacto ambiental representando una fuente fija de contaminación. Los mayores generadores de residuos son las industrias<sup>25</sup> que tratan con estos combustibles, ya que al no tener un adecuado manejo y/o tratamiento generan sitios contaminados y/o pasivos ambientales. Análisis aleatorios en áreas contaminadas han arrojado que los principales contaminantes en instalaciones industriales fueron principalmente el diésel con un 90% de incidencias<sup>26</sup>.

#### **2.3.2.1 Efectos toxicológicos en seres vivos**

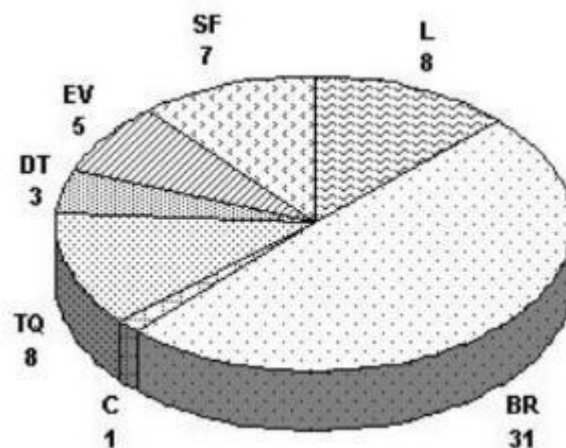
Al bioacumularse en las cadenas alimenticias, los hidrocarburos obstaculizan las actividades bioquímicas o fisiológicas de muchos microorganismos, generando carcinogénesis de algunos órganos; la mutagénesis en el material genético<sup>27</sup>. Otros derivados de estos hidrocarburos pueden afectar también al sistema nervioso, causando fuertes dolores de cabeza y algunos mareos. Se han realizado estudios en animales donde se han demostrado que estos hidrocarburos afectan los pulmones, el sistema nervioso central, hígado y riñones

por su prologada exposición a estos contaminantes. Otros estudios demostraron un daño en la reproducción, así como daño en los fetos de los animales estudiados<sup>28</sup>.

## 2.4 Remediación de suelos

Actualmente existen empresas que ofrecen servicios de remediación de sitios contaminados con hidrocarburos, lodos aceitosos, lodos de perforación y recortes de perforación, empleando diferentes tecnológicas.

Se recopiló información procedente de 40 empresas encargadas de remediar suelos contaminados con diferentes tipos de contaminantes<sup>29</sup>. La mayoría de estas empresas (31 empresas) utilizan tratamientos biológicos para remediar dichos suelos. Dentro de estos tratamientos, las tecnologías mayormente empleadas son el composteo y la biolabranza. En la **figura 2** se mencionan algunas de las técnicas de remediación de suelos más empleadas en México.



**Figura 2.** Tecnologías de remediación de suelos utilizadas en México por empresas autorizadas. BR: Biorremediación; L: Lavado; SF: Separación Física; EV: Extracción de vapores; DT: Desorción Térmica; TQ: Tratamiento Químico; C: Centrifugación. Tomada de: SEMARNAT, 2002. En: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/372/tecnomexico.html>

### 2.4.1 Tecnologías de remediación

Las tecnologías para el tratamiento de sitios contaminados degradan, incineran, contienen o inmovilizan los contaminantes para evitar su futura dispersión y transporte hacia otros medios.

Los tipos de tratamientos para descontaminar un suelo se engloban en tres grupos y se explican a continuación<sup>30</sup>:

- Tratamiento de contención: aíslan el contaminante sin actuar sobre este, empleando barreras físicas en el suelo.
- Tratamiento de confinamiento: reducen la movilidad del contaminante modificando las condiciones fisicoquímicas del suelo para evitar su migración.
- Tratamiento de descontaminación: empleadas para disminuir la concentración de los contaminantes en el suelo.

En la siguiente tabla se presentan las tecnologías derivadas de los tipos de tratamientos.

**Tabla 3**

*Principales técnicas de remediación para sitios contaminados con diversos tipos de sustancias.*

Tratamiento	Tecnología		Aplicación	
<b>Contención</b> Barreras	Verticales	Hidráulicas	<i>In situ</i>	
	De suelo seco	Horizontales		
<b>Confinamiento</b>	Estabilización fisicoquímica		<i>Ex situ</i>	
	Inyección de solidificantes		<i>In situ</i>	
	Vitrificación		<i>Ex situ/In situ</i>	
<b>Descontaminación</b>	Lavado	Oxidación Ultravioleta	<i>Ex situ</i>	
	Extracción	Barreras permeables activas	<i>In situ</i>	
	Fisicoquímico	<i>Flushing</i>	Inyección de aire comprimido	
		Biotransformación de metales	Fitorrecuperación	<i>In situ</i>
Biológico	<i>Landfarming</i>	Compostaje	<i>Ex situ</i>	
	Biopilas	Lodos biológicos		
Térmico	Incineración	Desorción térmica	<i>Ex situ</i>	
	Mixto	Extracción multifase	Atenuación natural	<i>In situ</i>

*Tabla adaptada de: Ortiz, B., Sanz, J., Dorado, M. & Villar, S, (2007). En: Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Univ. Alcalá. Dir. Gen. Universidades e Investig. <https://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/3650/Biorremediaci?sequence=1>*

### 2.4.1.1 Biorremediación

Una solución a la problemática de suelos contaminados con diésel y otros derivados del petróleo es la biorremediación, la cual consiste en utilizar organismos para eliminar o neutralizar los compuestos tóxicos del suelo. La biorremediación es la tecnología que se emplea como primera opción a la solución de problemas ocasionados por estos contaminantes<sup>31</sup>. Es una tecnología eficaz y económica, aplicable a grandes áreas, además de ser amigable con el medio ambiente, ya que, a diferencia de las tecnologías físicas o químicas, la remediación biológica no genera algún residuo del que se deba disponer. A diferencia de las físicas y químicas, en la mayoría de los casos donde se aplica la biorremediación el contaminante es mineralizado con éxito<sup>32</sup>.

La biorremediación se divide en tres técnicas<sup>27,33</sup>:

- Atenuación natural: la concentración del contaminante disminuye gracias a los microorganismos nativos presentes en el suelo sin la necesidad de adicionar nutrientes y oxígeno.
- Bioestimulación: al suelo contaminado se le adicionan nutrientes, sustratos o aditivos (los fertilizantes inorgánicos y orgánicos estimulan el crecimiento de las bacterias degradadoras de hidrocarburos). Se les proporciona aireación, luz, temperatura, agua o una combinación de estos para estimular el crecimiento de los microorganismos nativos que participan en la degradación del contaminante, acelerando la tasa de biodegradación y mejorando su efectividad<sup>34,35</sup>.
- Bioaumentación: al suelo contaminado se le añaden microorganismos adaptados al contaminante o modificados genéticamente para degradar dichos compuestos<sup>36</sup>.

En la **tabla 4** se describen algunas de las técnicas de descontaminación mediante tratamientos biológicos.

**Tabla 4**

*Descripción de las técnicas de descontaminación por tratamientos biológicos para diversos tipos de sustancias contaminantes.*

Tratamiento	Agente degradador	Descripción
Fitorrecuperación	Plantas	Extraen, acumulan, inmovilizan y/o transforman los contaminantes.
Compostaje	Bacterias nativas	La capacidad degradadora es aumentada debido a un balance de nutrientes en condiciones térmicas transformando los contaminantes en sustancias inocuas.
Lodos biológicos		El suelo es tamizado a un tamaño de partícula menor para permitir el mayor contacto con los microorganismos degradadores.
Biodegradación asistida	Bacterias nativas e inoculadas.	Biotransforman los componentes a compuestos orgánicos inocuos gracias a la adición de nutrientes que aumentan la capacidad degradadora.
Biopilas		El suelo se apila, airea y se le adicionan nutrientes para estimular la actividad microbiana.

*Tabla adaptada de: Ortiz, B., Sanz, J., Dorado, M. & Villar, S. (2007). En: Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Univ. Alcalá. Dir. Gen. Universidades e Investig. <https://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/3650/Biorremediaci?sequence=1>*

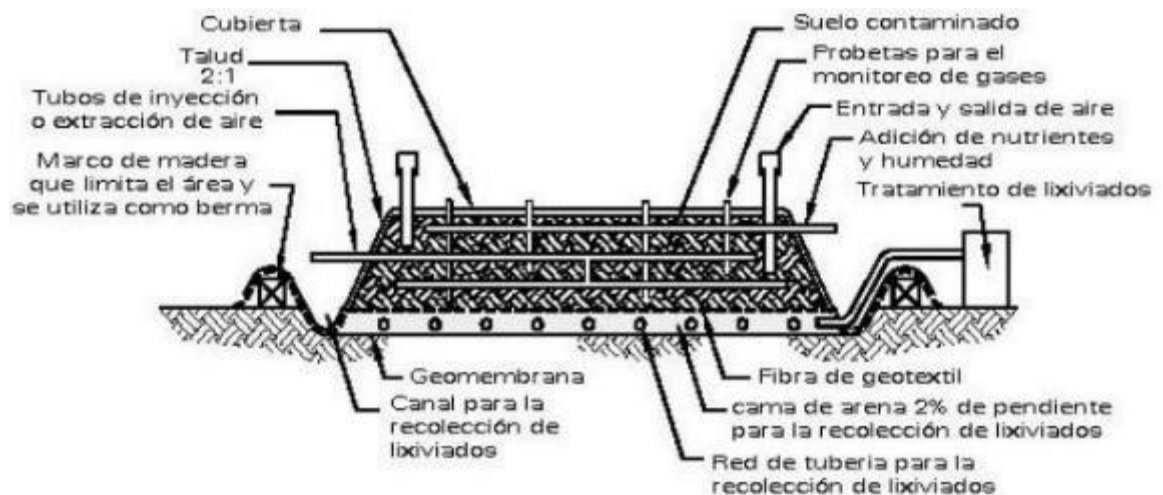
#### 2.4.1.1.1 Biopilas

Las biopilas son definidas como un proceso biológico que se fundamenta en la reducción de la concentración de contaminantes orgánicos, principalmente derivados del petróleo. Estos contaminantes son biodegradados y mineralizados en suelos con excavación a partir de un sistema cerrado con control de hidrocarburos volátiles, lixiviados y variables de diseño, mediante el suministro de nutrientes y oxígeno. Son utilizadas para reducir las concentraciones de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) de zonas contaminadas.

La disposición espacial de las biopilas consiste en formar pilas con el suelo contaminado, estimular la actividad microbiana mediante aireación y/o con la adición de nutrientes así como, mantener una humedad controlada para que el proceso puede llevarse a cabo. Una vez dispuestas como se menciona, deben

ser cubiertas con plástico o geomembranas para evitar la pérdida de humedad o saturación de agua debido a los cambios climatológicos<sup>37</sup>.

Los parámetros necesarios para aplicar un sistema de biopilas son los siguientes: los contaminantes deben ser no halogenados y en una concentración menor a 50 000 ppm. Es necesario que el suelo tenga una concentración microbiana mayor a 1 000 UFC/g. Una humedad del 40 al 85% de su capacidad de campo o de 15 a 30% en humedad relativa. Una materia orgánica del 5 al 10%<sup>30</sup>. La temperatura ideal para su montaje va desde los 10 a 45 °C. La textura del suelo debe contener baja proporción de arcillas. El pH debe oscilar entre 6 y 8. Una baja concentración de metales pesados (menor a 2 500 ppm). La concentración de nutrientes en el suelo debe ser de 100:10:1 de carbono: nitrógeno: fósforo respectivamente<sup>17</sup>. En la **figura 3** se ilustra un ejemplo de una biopila convencional y sus principales componentes<sup>37,38</sup>.



**Figura 3.** Componentes característicos de una biopila. Tomada de: EPA, (1994). En: *Technologies fo bioremediation for soil contaminated with hydrocarbons*. <http://www.epa.usace.army.mil/net/usace-docs/eng/pamphlets/epa200-1-10/c-4/pdf>.

## 2.5 Poblaciones microbianas en procesos de biorremediación

Las bacterias necesitan un pH y una temperatura adecuada para su crecimiento, así como también de nutrientes inorgánicos, fuentes de carbono, donadores y aceptores de electrones<sup>39</sup>. Los organismos más abundantes en el suelo son las bacterias, degradan compuestos orgánicos naturales y xenobióticos, pueden

iniciar la degradación primaria de dichos compuestos o crecer en compuestos resultantes de la degradación parcial de compuestos orgánicos complejos, o de los residuos de degradación primarios<sup>17</sup>.

### **2.5.1. Bacterias hidrocarbonoclastas.**

Las bacterias especializadas en degradar hidrocarburos del petróleo son conocidas como bacterias hidrocarbonoclastas (BHCC). Su abundancia en el medio ambiente depende de las condiciones ambientales y de las zonas con una exposición prolongada a estos contaminantes, haciéndolas potencialmente mejores que las que han sido adaptadas con medios comerciales en un laboratorio<sup>40</sup>. Entre las BHCC se encuentran géneros bacterianos que solo pueden degradar hidrocarburos alifáticos o las que solo degradan hidrocarburos aromáticos, un género bacteriano que se ha estudiado por degradar ambos exitosamente es el género *Pseudomonas sp.* en el caso de suelos<sup>41</sup>. Los géneros bacterianos que más inciden en los estudios de degradación de hidrocarburos con cepas bacterianas, son los pertenecientes a los géneros de *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.* y *Bacillus sp.* por mencionar algunos<sup>42</sup>.

### **2.5.2 Biodegradación mediante cepas aisladas**

Por lo general son microorganismos que han sido estudiados por un largo tiempo, especializados para degradar y obtener buenos resultados debido a que degradan una amplia gama de hidrocarburos.

Algunos autores reportan que para obtener mejor degradación de los contaminantes es recomendable emplear un consorcio<sup>43</sup>.

### 2.5.3 Biodegradación por cultivos mixtos

La utilización de consorcios es una alternativa al empleo de cepas especializadas. Los consorcios se categorizan como definidos y no definidos.

- Consorcios definidos: combinación de cepas aisladas de las cuales se conoce su capacidad degradadora además de ser complementarias entre sí<sup>44,45</sup>. Estos consorcios pueden formar metabolitos intermediarios al momento de la degradación del contaminante, provocando toxicidad para otras cepas pertenecientes al mismo consorcio<sup>45,46</sup>.
- Consorcios no definidos: son el resultado de procesos directos de enriquecimiento a partir de muestras de suelos que tiene historial de contaminación previa<sup>44,47</sup>. Este a diferencia del definido, cuenta con una mayor ventaja debido a que dicho consorcio se ha seleccionado de forma natural, cooperando con las cepas nativas del suelo contaminado, generando una sinergia al momento de degradar el contaminante<sup>48</sup>.

### 2.5.4 Degradación metabólica de los hidrocarburos.

La oxidación biológica de los contaminantes orgánicos se da cuando estos están vinculados a enzimas extracelulares y son transportados a través de la membrana celular. Los microorganismos que utilizan hidrocarburos como fuente de carbono deben tener enzimas denominadas oxigenasas, que, mediante una serie de reacciones de transformación separan los electrones del compuesto y se oxida la estructura del carbono. Cuando los contaminantes orgánicos han sido convertidos en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O es cuando se ha producido la mineralización en los casos exitosos<sup>49</sup>. La susceptibilidad de la degradación de los hidrocarburos está dada por el siguiente modelo<sup>39</sup> donde:

*N-alcanos > alcanos ramificados > compuestos aromáticos de bajo peso molecular > alcanos cíclicos.*

Siendo así los compuestos de bajo peso molecular más susceptibles y los de alto peso molecular los que presentan mayor resistencia a la degradación.



### 2.5.4.1 La degradación a nivel enzimática

El fundamento bioquímico de la biorremediación con BHCC se basa en que la cadena transportadora de electrones produce una serie de reacciones oxidorreducción con el objetivo de degradar los hidrocarburos. El ataque intracelular inicial de hidrocarburos orgánicos es un proceso oxidativo, la activación e incorporación de oxígeno es la reacción enzimática clave catalizada por las oxigenasas<sup>50,51</sup>. Estas enzimas son producidas y secretadas por las BHCC, utilizan el oxígeno como aceptor de electrones siendo útiles en la degradación de los hidrocarburos<sup>52</sup>.

Degradación aerobia:  $\text{Sustrato} + \text{Microorganismos} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Biomasa} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ .

Estas enzimas catabolizan dichos compuestos mediante el acoplamiento oxidativo permitiendo la transferencia de electrones de los reductores a los oxidantes, liberando iones, CO<sub>2</sub> y metanol.

Sobre la base del número de moléculas de oxígeno involucradas, las oxigenas se clasifican en dos subclases:

- Monooxigenasas: transfieren un átomo de oxígeno al sustrato y reducen el otro átomo de oxígeno en agua<sup>53,54</sup>.
- Dioxigenasas: esta subclase incorpora ambos átomos de oxígeno molecular en el sustrato<sup>51</sup>, siendo capaz de degradar los compuestos más difíciles como lo son los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

El mecanismo de acción de la degradación de alcanos consiste en ser oxidados con el oxígeno incorporado por la enzima en la última molécula de carbono, el complejo multienzimático es el encargado de realizar dicho proceso. Adicionado el oxígeno a la molécula de carbono, se convierte en un grupo hidroxilo muy reactivo que, con la ayuda de enzimas presentes en el medio, puede oxidarse aún más, pasando de alcohol a aldehído para finalmente llegar a ácido

carboxílico, obteniendo una molécula similar a la de un ácido graso que puede ser degradado a acetil coenzima A por la  $\beta$ -oxidación<sup>55-57</sup>.

El mecanismo de acción para los hidrocarburos aromáticos consiste en catalizar la escisión de los enlaces carbono-carbono al agregar una o dos moléculas de oxígeno, rompiendo el anillo, generando dos moléculas muy comunes en la que la mayoría de los compuestos aromáticos degradados convergen; dichas moléculas son el protocatecuato y catecol<sup>53</sup>. Mediante enzimas como las dioxigenasas, estas moléculas pueden degradarse a moléculas menores, desencadenando así las reacciones de simplificación de los compuestos a compuestos más simples y menos tóxicos capaces de ser utilizados por la célula como intermediarios de su metabolismo central, como es el caso del ciclo de Krebs.

## **2.6 Ventajas y limitaciones de los procesos de biorremediación**

Una de las ventajas más atractivas de la biorremediación, es el alto potencial de éxito que tiene al disminuir la concentración de compuestos tóxicos y convertirlos en inocuos a diferencia de los métodos químicos o físicos que además alteraran o eliminan la microbiota presente por ser técnicas altamente abrasivas, alterando el equilibrio natural del entorno, aunado a que la remediación con esas técnicas producen desechos que tiene que ser confinados o trasladados y requieren de recursos extras, incumpliendo con los criterios de sostenibilidad<sup>25</sup>. Además de ser atractivamente rentables a diferencia de las otras técnicas, los costos oscilan<sup>15</sup> entre 30 a 100 USD/m<sup>3</sup>.

Dentro de las limitaciones del proceso se encuentra el tiempo, que, a diferencia de las físicas o químicas, las biológicas lleva más tiempo alcanzar los niveles buscados.

### **2.6.1 Factores que condicionan la biorremediación del suelo**

Los factores que pueden afectar el éxito de la biorremediación son los siguientes:

- pH: una variación del pH en el suelo afecta directamente en el crecimiento bacteriano, además de afectar las características fisicoquímicas del suelo impidiendo una buena solubilización de la absorción de los contaminantes y de los iones presentes.
- Temperatura: la temperatura óptima para el crecimiento bacteriano, según estudios previos oscila entre un rango medio de 10 a 45°C. Por debajo o encima de esas temperaturas el crecimiento bacteriano se podría ver afectado<sup>58</sup>.
- Humedad: un déficit de agua afecta el transporte de nutrientes y contaminantes haciéndolos menos disponibles para las bacterias, además de que es impedimento para el transporte de estas. Un exceso proporciona condiciones anaeróbicas en el suelo por su distribución a través de los poros del suelo<sup>58,59</sup>.
- Estructura química: limitante para una buena degradación, los hidrocarburos de la fracción ligera y media son más fácilmente degradables que los de la fracción pesada lo cual está directamente relacionado con su baja solubilidad en agua<sup>60</sup>.
- Biodisponibilidad: es la capacidad de transferencia de masa que tiene el compuesto contaminante para estar disponible para su metabolismo. Los fenómenos de adsorción, absorción, desorción, disolución y difusión del compuesto<sup>61</sup> condicionan la disponibilidad que tiene el microorganismo por metabolizar dicho contaminante.

- Presencia de aceptores/donadores de electrones: la presencia de oxígeno es vital para las bacterias aeróbicas, la importancia de suministrarlo al sistema de remediación yace, en que estas bacterias tienen mejores resultados en la degradación de los hidrocarburos que las bacterias anaerobias<sup>61,52</sup>.
- Nutrientes inorgánicos: la baja o alta concentración de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo pueden ser limitantes en el incremento de la población microbiana así como en las actividades metabólicas de degradación de dichos microorganismos. Adicionar estos elementos generalmente tiene un efecto positivo debido a que incrementa las tasas de biodegradación de los hidrocarburos, pero también puede ser contraproducente. Estudios demuestran que llegan a tener efectos inhibitorios en la mineralización de los contaminantes, sin mencionar que un exceso de estos puede comprometer la eficacia del tratamiento<sup>62,63</sup>.

### **2.6.2 Agentes potenciadores de la biodegradación.**

Con la finalidad superar los obstáculos o limitaciones que puedan afectar el proceso de degradación de hidrocarburos, se buscan alternativas que funcionen como agentes adyuvantes para la biodegradación, agentes que mejoren las propiedades fisicoquímicas del suelo o agentes que ayuden a mejorar la biodisponibilidad del contaminante. Estos agentes elevan las posibilidades de obtener resultados favorecedores en la biorremediación.

#### **2.6.2.1 Cosustratos**

Cuando las características del suelo no son adecuadas para llevar a cabo una buena remediación debido a su baja porosidad (que influye directamente en el transporte de oxígeno, nutrientes, agua y la movilidad bacteriana) o cuando la materia orgánica es baja y no puede proporcionar los nutrientes necesarios para llevar a cabo los procesos metabólicos bacterianos, se utilizan agentes de carga que ayudan a mejorar estas limitaciones<sup>64</sup>. Los agentes de carga se encargan de

mejorar la composición del suelo permitiendo la correcta difusión del agua, mejoran la biodisponibilidad de los contaminantes para la degradación microbiana, logrado por la disminución de la densidad del suelo y un aumento en la porosidad, permeabilidad y difusión de oxígeno<sup>18</sup>. Estos pueden ser de origen vegetal, como: bagazo de caña de azúcar, cáscara de coco, aserrín, paja y corteza o astillas de madera o cualquier otro material orgánico.

#### **2.6.2.2 Surfactantes**

Al ser de naturaleza hidrófoba los hidrocarburos pueden no estar disponibles para la degradación bacteriana. Con el objetivo de mejorar la disponibilidad de dichos compuestos se emplea el uso de tensoactivos o surfactantes químicos. Son empleados para eliminar compuestos orgánicos de baja solubilidad, compuestos no acuosos y compuestos derivados del petróleo. Los surfactantes están compuestos de una parte hidrofóbica y una hidrofílica de naturaleza catiónica o aniónica<sup>30</sup>.

En la degradación de hidrocarburos por bacterias hidrocarbonoclastas, las bacterias también producen surfactantes biológicos conocidos como biosurfactantes. Estos son compuestos producidos extracelularmente como parte de la membrana celular de las bacterias y otros microorganismos. Se componen de glicolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, fosfolípidos y ácidos grasos<sup>65-67</sup>.

El mecanismo de acción de los surfactantes y biosurfactantes consiste en mejorar la interacción con los contaminantes pocos solubles mejorando su transferencia a fase acuosa. Reducen la tensión superficial, tienen capacidad espumante y emulsificante, mejoran la eliminación de los hidrocarburos al aumentar su solubilidad. Los biosurfactantes influyen en la hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana permitiendo una mejor asociación de los sustratos hidrofóbicos a las células bacterianas<sup>68</sup>.

## 2.7 Antecedentes

**Tabla 5**

*Estudios enfocados en la degradación de HTP empleando biopilas como tecnología de biorremediación.*

AUTORES, AÑO Y PAÍS	ESTUDIO	SUELO Y CONTAMINACIÓN	MICROORGANISMO(S) Y ADITIVOS.	CONDICIONES EXPERIMENTALES	DEGRADACIÓN
<b>DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS REPORTADOS COMO TOTALES DEL PETRÓLEO.</b>					
<b>GERMAINE, K. J., ET AL, 2015.</b>  <b>IRLANDA.</b>	<i>Ecopiling</i> : un sistema combinado de fitorremediación y <i>biopiling</i> pasivo para remediar suelos impactados por hidrocarburos a escala de campo.	Un suelo limo arenoso procedente de la República de Irlanda.  12 000 ppm	Consortio nativo.  <b>Concentración:</b> <b>2.0x10<sup>6</sup> UFC/mL.</b>	Duración: 730 días. pH: 8.7 MO: 5.7% Humedad: 16% Aeración: cada 2 semanas.	72 – 83%
<b>POI, G., ET AL, 2017.</b>  <b>SINGAPUR</b>	Bioaumentación a gran escala de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo utilizando un consorcio mixto microbiano.	Suelo procedente de Singapur.  B1: 7 189 ppm B2: 15 984 ppm B3: 26 240 ppm B4: 54 841 ppm	<i>Bacillus lentus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Arthrobacter sp.</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Brevibacillus brevis</i> <b>Concentración:</b> <b>2.00x10<sup>6</sup> UFC/mL</b>	Duración: 63 días. Aireación: si, no específica tasa.	B1: 93% B2: 96% B3: 97% B4: 96%
<b>MICLE, V., ET AL, 2018.</b>  <b>RUMANIA</b>	Investigación experimental a escala de laboratorio sobre la biorremediación <i>ex situ</i> de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo.	Suelo franco arenoso procedente de Covasna, Rumania.  B1- B8: 7 600 ppm	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Bacillus sp.</i>  320 mL y 640 mL del consorcio. <b>Concentración:</b> <b>9.40x10<sup>4</sup> UFC/mL</b>	Duración: 126 días. pH: 8.0 MO: 3.6% Aireación; 1 y 2 horas por día. Humedad: 44 y 60%	B6: 75%  Con 640 mL de consorcio, 44% H y 1 hora de aireación.

**Tabla 6** (parte A)

*Investigaciones de los últimos años enfocadas en la degradación de HFM empleando bioaumentación.*

AUTORES, AÑO Y PAÍS	ESTUDIO	SUELO Y CONTAMINACIÓN	MICROORGANISMO(S) Y ADITIVOS.	CONDICIONES EXPERIMENTALES	DEGRADACIÓN
<b>DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE FRACCIÓN MEDIA REPORTADOS COMO DIÉSEL.</b>					
<b>ARRIETA, M., ET AL, 2012.</b>  <b>COLOMBIA</b>	Caracterización fenotípica y molecular de poblaciones bacterianas aisladas de un suelo contaminado con diésel y sometido a dos tecnologías de biorremediación.	Suelo arcilloso procedente de Medellín, Colombia.  40 000 ppm	<i>Bacillus sp</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Arthrobacter sp</i> <i>Sanguibacter soli</i> <b>Concentración:</b> <b>1.4x10<sup>5</sup> UFC/mL</b>	Duración: 120 días. pH: 5.6% MO: 10.7% Humedad: Aireación; una vez por semana.	98%
<b>ROJO-SANTIESTEBAN, 2013.</b>  <b>MÉXICO</b>	Biorrecuperación de suelos contaminados con diésel mediante biopilas, utilizando estrategias de bioaumentación y bioestimulación.	Suelo franco-arenoso proveniente de la CDMX, México. B1: 49 141 ppm B2: 56 249 ppm BC: 62 752 ppm	B1: <i>Pseudomonas sp.</i> y sustancias húmicas. B2: <i>Pseudomonas sp.</i>  <b>Concentración:</b> <b>1.80x10<sup>9</sup> UFC/mL.</b>	Duración: 120 días. pH: 8.1 MO: 14.8% Aire: 3x/semana.	B1: 89% B2: 79% BC: 79%
<b>ANZA-CRUZ, 2016.</b>  <b>MÉXICO</b>	Biorremediación de suelos contaminados con aceite automotriz usado mediante un sistema de biopilas.	Suelo arenoso proveniente de Chiapas, México.  BT: 30 000 ppm B2: 10 000 ppm B3: 30 000 ppm B4: 50 000 ppm	<i>Acinetobacter sp.</i> <i>Sphingobacterium sp.</i> <i>Stenotrophomona sp.</i> <b>Concentración:</b> <b>2.25x10<sup>8</sup> UFC/mL</b>	Duración: 90 días. pH: 7.6 MO: 7.4% Humedad: 30.6%	Alifáticos: 87-94% Aromáticos: 95 %

**Tabla 6** (parte B)

*Investigaciones de los últimos años enfocadas en la degradación de HFM empleando bioaumentación.*

AUTORES, AÑO Y PAÍS	ESTUDIO	SUELO Y CONTAMINACIÓN	MICROORGANISMO(S) Y ADITIVOS.	CONDICIONES EXPERIMENTALES	DEGRADACIÓN
<b>KOSHLAF, E., ET AL, 2016</b>  <b>LIBIA</b>	Potencial de biorremediación de suelo libio contaminado con diésel.	Suelo franco arenoso procedente de Tripoli, Libia.  18 966 ppm	<i>Bacillus sp.</i> <b>Concentración:</b> <b>1.80x10<sup>6</sup> UFC/mL.</b>  B1: con paja de guisante. B2: con paja de guisante y consorcio.	Duración: 84 días. pH: 7.5 MO: 8.0% Humedad: 12.5% Paja de guisante al 3%.	B1: 96% B2: 95%
<b>RAMADASS, K., ET AL, 2018.</b>  <b>AUSTRALIA.</b>	Biodisponibilidad de hidrocarburos degradados en suelos contaminados con aceite de motor: Impacto de la bioacumulación mediada por <i>Pseudomonas spp.</i> en biorremediación.	Suelo franco limoso procedente del sur de Australia.  39 000 – 41 000 ppm	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <b>Concentración:</b> <b>5.0x10<sup>10</sup> UFC/mL</b> B1: <i>P. putida</i> B2: <i>P. aeruginosa</i> B3: <i>P. p.</i> + NKP B4: <i>P. a.</i> + NKP	Duración: 210 días. pH: 7.0 MO: 4.7%	B1: 77% B2: 75% B3: 36% B4: 35%



## **2.8 Justificación**

La presente investigación fue realizada con la finalidad de encontrar soluciones escalables, de bajo costo y fácil empleo para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos de fracción media. Debido a que los casos de sitios contaminados aumentan por la elevada demanda de los hidrocarburos en el día a día, agregado que, México es territorio petrolero es necesario atender las emergencias ambientales a la brevedad posible. Esto con la finalidad de disminuir las consecuencias que estos compuestos son capaces de generar a los seres vivos que habitan en las zonas aledañas al derrame.

## **2.9 Hipótesis**

Mediante un sistema de biopilas bioaumentadas con un consorcio microbiano del tipo hidrocarbonoclasta y empleando un cosustrato de origen vegetal y un surfactante comercial como agentes bioestimulantes, es posible reducir la concentración de HFM en el suelo de una zona de uso mixto industrial-habitable al cumplimiento de la normativa mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 en un periodo menor a 30 días.

## **2.10 Objetivos**

### **2.10.1 Objetivo general**

Remediar un suelo de origen minero contaminado con hidrocarburos de fracción media (C8-C40) en un sistema de biopilas utilizando un consorcio bacteriano hidrocarbonoclasta al cumplimiento de la normativa mexicana vigente NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.

### **2.10.2 Objetivos específicos**

1. Adaptar un consorcio bacteriano hidrocarbonoclasta en un medio enriquecido con un HFM (diésel).
2. Caracterizar fenotípica y molecularmente la diversidad del consorcio hidrocarbonoclasta.
3. Analizar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del suelo contaminado.
4. Diseñar y evaluar un sistema de biopilas a nivel laboratorio evaluando las variables de concentración bacteriana, surfactante, cosustrato.
5. Determinar los parámetros en las biopilas que se adapten mejor a los fines de remediación del suelo de la zona contaminada con base en los resultados obtenidos.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Acondicionamiento del consorcio BHCC

##### 3.1.1 Obtención del suelo de una chapopotera

Se obtuvo una muestra representativa del suelo de un afloramiento natural de petróleo (chapopotera) para la obtención del consorcio bacteriano hidrocarbonoclasta. El sitio de muestreo se encuentra ubicado en el municipio de Tancoco en el estado de Veracruz, México. Las coordenadas geográficas del sitio son 21° 17' latitud norte y 97° 47' longitud oeste. De este sitio se tomó un bloque de aproximadamente 10 kilos de suelo mezclado con abundante petróleo crudo para ser dispuesto en palanganas plásticas. El suelo se mantuvo con su vegetación natural (pasto) y en condiciones de humedad para evitar que se secase. Fue transportado al estado de Nuevo León para las pruebas experimentales posteriores.

##### 3.1.2 Acondicionamiento del consorcio

El medio utilizado fue un fertilizante comercial MiracleGro™ (The Scotts Company LLC, EUA) con una composición de: Nitrógeno total 15%, Fosfato soluble 30%, Potasa soluble 15%, Boro 0.02%, Cobre 0.07%, Hierro 0.15%, Molibdeno 0.0005% y Zinc 0.06%. Se preparó una solución *stock* para la cual se mezclaron 7 g de producto por cada litro de agua.

*Reacondicionamiento en tubos.*

Para inducir al crecimiento de las bacterias presentes en el suelo de la chapopotera, se tomaron 3 gramos del suelo y se agregaron a un tubo de 50 mL de capacidad junto con 27 mL de la solución *stock* de nutrientes y 3 mL de diésel comercial. Se llevó a incubación durante 4 días a 37°C con 110 rpm (a condiciones aerobias). Este paso se realizó por duplicado. Una vez transcurrido el tiempo se sacaron los tubos de incubación y se dejaron reposar durante media hora para sedimentar el suelo presente en el tubo.

### *Acondicionamiento en reactores.*

Cuando se cumplió el lapso, fue posible diferenciar las capas del medio; la acuosa y oleosa. Se extrajeron ambas fases cuidando de no extraer el sedimento y se adicionó a un reactor con 150 mL de la solución *stock* de nutrientes y 300 mL de agua. Como fuente de carbono se adicionó 50 mL de diésel comercial. Se encendió el sistema de agitación a 4.5 V en temperatura ambiente.

Se preparó un reactor testigo el cual consistió en adicionar a 450 mL de agua, sobrenadante del pre-tratamiento y 50 mL de diésel. Así como un control negativo compuesto por la solución de nutrientes (150 mL de la solución *stock* con 300 mL de agua) y diésel.

### **3.1.3 Evaluación del crecimiento del consorcio BHCC**

Para describir el comportamiento del consorcio bajo la fuente de carbono, se realizaron las mediciones de densidad óptica a 600 nm<sup>69</sup> y el conteo de células viables en cámara de Neubauer, integrando los datos en el modelo matemático de Gompertz que proporcionó los datos para comprender el mecanismo cinético bacteriano.

#### **3.1.3.1 Medición de la densidad óptica**

Se detuvo la agitación de los reactores. Se esperó a que las fases del medio en el reactor se hicieran distinguibles (aproximadamente 1 min para que esto se llevara a cabo). Se introdujo una pipeta Pasteur al centro de la fase acuosa y se tomó 2 mL, los cuales se diluyeron con la misma solución de nutrientes para ajustar a 0.5 en la escala de McFarland como lectura inicial que fue leída a 600 nm. Se utilizó la misma solución de nutrientes inicial como blanco. Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 5 (Thermo Spectronic, EUA). Este procedimiento se realizó cada dos horas.

#### **3.1.3.2 Conteo en cámara de Neubauer**

Para asegurar la viabilidad de las bacterias en el reactor, se realizaron conteos celulares. La metodología se llevó a cabo en una campana de extracción en condiciones asépticas. Previo a cada ronda de conteos se realizó un conteo

prueba utilizando 10 µL de agua estéril utilizada para las diluciones, esto con la finalidad de cerciorarse de la esterilidad de los materiales utilizados. Cada 3 horas los reactores fueron apagados y llevados a la campana. Se tomaron 100 µL de la fase acuosa y se diluyeron con 900 µL de agua estéril (se repitió este paso hasta una dilución 1:100). Se colocaron 10 µL de dilución en la cámara de Neubauer (Superior Marienfeld, Alemania), se colocó en el microscopio y se realizó el conteo en cinco cuadros centrales de área de 0.2 mm<sup>2</sup>. Para obtener las unidades formadoras de colonias en µL de muestra, se realizaron los cálculos necesarios a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{células por } \mu\text{L de volumen} = \frac{(CC)(D)}{(SC)(PC)} \quad (\text{ec. 1})$$

*Donde:*

*CC: células contadas*

*SC: superficie contada (mm<sup>2</sup>)*

*PC: profundidad de la cámara (0.1 mm)*

*D: dilución*

### 3.1.3.3 Modelo de Gompertz

Utilizando el procedimiento de regresión no lineal del programa TIBCO® Statistica™ versión 13.5.0.17 (TIBCO Software Inc., EUA) con la ecuación de Gompertz<sup>70</sup> (ec. 2) se obtuvieron las variables B, C y M.

$$L(t) = A + Ce^{-e^{-B(t-M)}} \quad (\text{ec. 2})$$

*Donde:*

*L(t): el recuento logarítmico de bacterias en el tiempo (t) en horas (log UFC/mL).*  
*A: el nivel inicial de bacterias (el registro asintótico de bacterias a medida que el tiempo disminuye indefinidamente)*

*C: el número de ciclos logarítmicos de crecimiento (la cantidad asintótica de crecimiento que ocurre en t aumenta indefinidamente) (log UFC / mL)*

*M: el momento en que el crecimiento absoluto es máximo (h)*

*B: la tasa de crecimiento relativo en M ((log UFC/mL)/hora)*

Dichas variables se emplearon para calcular parámetros de crecimiento utilizando las siguientes ecuaciones:

*Tasa de crecimiento exponencial:*

$(\log(\text{UFC/mL})/h)$

$$TCE = \frac{BC}{e} \quad (\text{ec. 3})$$

*Tasa de generación:*

$(h)$

$$TG = \frac{(\text{Log}(2))e}{B} \quad (\text{ec. 4})$$

*Duración de la fase Lag:*

$(h)$

$$DFL = M - \left(\frac{1}{B}\right) \quad (\text{ec. 5})$$

*Densidad de la población máxima:*

$(\log(\text{UFC/mL}))$

$$DPM = (A + C) \quad (\text{ec. 6})$$

*Tiempo de adaptación en el nuevo medio:*

$(h)$

$$Ta = DFL - TG \quad (\text{ec. 7})$$

#### **3.1.4 Determinación de las propiedades fisicoquímicas del medio**

Se detuvo la agitación de los reactores, se esperó a que las fases del medio en el reactor se hicieran distinguibles (aproximadamente 1 min para que esto se llevara a cabo). Se introdujo una pipeta Pasteur al centro de la fase acuosa y se

tomó 1 mL del medio. En un vaso se le añadió 9 mL de agua para obtener una dilución 1:10. Se midió el pH y la conductividad eléctrica introduciendo el equipo *Waterproof Tester Combo pH & CE* (Hanna Instruments, Italia) a la dilución. Esto se realizó cada dos horas. Se consideró el factor de dilución para obtener el valor real de la conductividad eléctrica la cual se reportó como dS/m.

### **3.1.5 Propiedades emulsificantes del sobrenadante**

#### **3.1.5.1 Desplazamiento de aceite.**

En una placa de Petri de 15.5 cm de diámetro se colocaron 50 mL de agua desionizada y 20  $\mu$ L de diésel comercial, se le adicionó 10  $\mu$ L del sobrenadante obtenido de la emulsión producida en el reactor (centrifugada a 7,500  $xg$  durante 10 min). Se midió el halo que el surfactante produjo en el hidrocarburo y se reportó como área de diésel desplazado. Se siguió el mismo procedimiento con 10  $\mu$ L de Tritón X-100 y detergente comercial utilizados como control positivo ambos a una concentración de 5 mg/mL<sup>42</sup>.

#### **3.1.5.2 Índice de emulsificación (%I.E.)**

A 500  $\mu$ L de sobrenadante obtenido del centrifugado se le adicionó un volumen igual de diésel comercial, se agitó vigorosamente por un minuto en vortex a máxima velocidad. Se dejó reposar durante dos minutos<sup>65</sup>. Para calcular la capacidad de emulsión se empleó la siguiente ecuación:

$$\%IE = \frac{HE}{HT} \times 100 \quad (\text{ec. 8})$$

*Donde:*

*HE: altura de emulsión (cm)*

*HT: altura total de la mezcla (cm)*

#### **3.1.5.3 Estabilidad de la emulsión (E24)**

En el caso de ser positiva la prueba de emulsificación se probó su estabilidad. Se añadió 2 mL de muestra de biosurfactante con 2 mL de diésel comercial, se mezcló en vortex a máxima velocidad durante dos minutos. Se dejó reposar la emulsión durante 24 horas<sup>65</sup>. Cumplido el tiempo, la estabilidad se calculó con la ecuación 8.

## 3.2 Caracterización molecular del consorcio BHCC

### 3.2.1 Cultivo y purificación de las colonias

Al cuarto día de crecimiento en los reactores, se tomó 1 mL del reactor. Se realizaron diluciones seriadas hasta 1:10<sup>6</sup> con 9 mL de agua estéril y se depositó 1 mL de cada dilución en placas Petri. Se vertió agar nutritivo y se agitó en movimientos suaves para homogenizar la muestra. Se incubaron a 37°C por 7 días. Una vez transcurrido el tiempo, se seleccionó la caja de la dilución 1:10<sup>4</sup>. Se observaron las características morfológicas de las colonias y se realizaron tinciones de GGRram de las colonias más representativas. Dichas colonias representativas fueron aisladas en placas de agar nutritivo por agotamiento de estría en tres campos e incubadas a 37°C por 3 días. Una vez transcurrido el tiempo, se tomó una colonia aislada de dichas cajas y se sometieron a un aislamiento mediante estría en cuatro campos, incubadas a 37° durante 3 días. Se realizó tinción de Gram, se registraron sus características macroscópicas y microscópicas. De los cultivos puros se tomaron colonias aisladas y fueron inoculadas en 5 mL de medio LB a 37°C durante 24 horas para la extracción del ADN.

### 3.2.2 Extracción del ADN genómico

Para la extracción del DNA se utilizó el kit *One 4-all genomic DNA mini-prep* (Bio Basic Inc., Canadá). A tubos de microcentrífuga se les transfirieron 1.5 mL del medio LB inoculado de los aislados, se centrifugaron a 10,000 *xg* durante 30 s, se descartó el sobrenadante. A los *pellets* formados se les añadió 180 µL de buffer ACL y 20 µL de Proteinasa K, se mezclaron por vortex, se incubaron a 56°C por una hora, se les añadió 200 µL de buffer CL y se agitaron en vortex. Se les añadió 200 µL de etanol al 96% y se mezcló por inversión suave, se transfirieron las muestras a columnas EZ-10 Spin® acopladas a tubos de recolección de 2 mL. Las columnas se centrifugaron a 9,000 *xg* por 1 min y se descartó el eluato, se añadieron 500 µL de CW1 y se centrífugo a 9,000 *xg* por 1 min, se descartó el eluato nuevamente, se añadieron 500 µL de CW2 y se centrífugo a 9,000 *xg* por 1 min, el filtrado se descartó. Se colocaron las columnas



en los tubos de recolección para secar la membrana mediante centrifugación a 9,000  $xg$  durante 2 min, el líquido obtenido de la última centrifugación se descartó. Las columnas se transfirieron a tubos limpios de 1.5 mL, se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos hasta la evaporación completa del etanol. Se añadieron 70  $\mu L$  de buffer CE directamente al centro de la membrana y se incubaron a temperatura ambiente por 2 min, se llevaron a centrifugar a 9,000  $xg$  durante 2 min. Las columnas se descartaron y el ADN extraído se almacenó en los mismos tubos de recolección a 4°C para su posterior análisis.

#### *Análisis del ADN.*

En un BioSpec-nano® (Shimadzu, EUA) se colocaron 2  $\mu L$  del buffer de elución como blanco, una vez ajustado a cero se colocaron 2  $\mu L$  de cada muestra de ADN. El equipo determinó el radio OD 260/280 y la concentración de ADN en  $ng/\mu L$ .

Se verificó la presencia y pureza del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Para la preparación del gel: en un matraz Erlenmeyer se adicionaron 0.14 g de agarosa y se disolvieron en 20 mL de TBE, se calentó la muestra en un horno de microondas durante 5 segundos, se agregó Eco-stain; ready to use® (Bio Basic Inc., Canadá) se agitó ligeramente, se vació en el molde, se colocó el peine y una vez solidificado el gel se colocó en la cámara. Se agregó TBE 0.5X en la cámara de electroforesis. Se tomaron 3  $\mu L$  de muestra y se mezclaron con 2  $\mu L$  de buffer de carga. Los 5  $\mu L$  totales se cargaron en los pocillos del gel. Se cargó un marcador de peso molecular de 100-5000 pb marca DNA Marker Plus, ready to use (Bio Basic Inc., Canadá) y este y las muestras se corrieron en una cámara de electroforesis BlueGel™ (miniPCR, Amplyus, EUA) a 100 V durante 45 minutos. La visualización del ADN se realizó por el fotodocumentador Mini-Imager™ (Maestrogen, Taiwan). Las muestras fueron almacenadas a 4°C para el análisis molecular.

### **3.2.3 Amplificación del gen ribosomal 16S**

Las muestras de DNA genómico se diluyeron a una concentración de 25  $ng/\mu L$  basándose en los resultados previos obtenidos en el BioSpec-nano® (Shimadzu,

EUA). Se utilizaron los oligonucleótidos 533F (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA-3') y 1391R (5'-GAC GGG CGG TGT GTR CA-3'). Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó una mezcla con 12.5  $\mu$ L de GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, EUA), 0.2  $\mu$ M de cada primer, 1  $\mu$ L de DMSO, 9.5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y 1  $\mu$ L de DNA molde, para un volumen final de 25  $\mu$ L. Se preparó un control negativo. Se utilizó un termociclador Aeris (ESCO, EUA). Las condiciones de amplificación fueron: *Desnaturalización inicial* a 94°C durante 5 min, 35 ciclos de *desnaturalización* a 94°C por 30 s, *alineamiento* a 62°C por 30 s, *extensión* a 72°C por 45 s y la *extensión final* a 72°C por 10 min.

Los productos de PCR fueron cargados en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (10  $\mu$ g/ $\mu$ L). Para la preparación del gel se pesó 1 g de agarosa y se mezcló con 100 mL de TAE, se calentó por un minuto en horno de microondas y se le añadieron 4  $\mu$ L de bromuro de etidio, ya vertido en la placa se le colocaron los peines. Una vez solidificado el gel se colocó en una cámara para electroforesis Owl™ EasyCast™B2 (ThermoFisher Scientific Inc., EUA). Se le adicionó buffer TAE hasta quedar 1 cm por encima del gel. Se tomaron 2  $\mu$ L de cada producto de reacción y se mezclaron con 3  $\mu$ L de buffer de carga, se cargaron en el gel de agarosa junto con el marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, EUA). Las condiciones a las que se corrió el gel en la cámara de electroforesis fueron de 110 V por 45 min. Los productos de PCR fueron visualizados en el GelCapture (DNR Bio-Imaging Systems, Israel).

Así mismo estos productos se purificaron utilizando el kit QIAquick® Spin (QIAGEN, Alemania). A 20  $\mu$ L de producto de reacción se le añadieron 100  $\mu$ L de Buffer PB, se mezcló ligeramente y cada muestra se colocó en una columna de QIAquick® con filtro, acoplada a un tubo recolector de 2 mL. Se centrifugó cada columna durante un minuto a 17,900  $xg$ , se descartó el eluato. Se acopló la columna nuevamente al tubo de recolección, la columna se lavó con 700  $\mu$ L de Buffer PE y se llevó a centrifugar durante un minuto a 17,900  $xg$ , se descartó el

eluato. Se acopló la columna al tubo recolector para centrifugar bajo las mismas condiciones durante 1 min. Se desmontó la columna y se colocó en un nuevo tubo de recolección de 1.5 mL, le fueron añadidos 40  $\mu$ L de Buffer EB previamente calentado a 65°C, se centrifugó a 21,100 xg durante 3 min. Una vez ocurrido esto se desechó la columna y se reservó el tubo con el ADN purificado. Se corrió en un gel de agarosa al 1% para verificar la pureza de dichos productos bajo las condiciones y el equipo mencionado anteriormente. Para determinar la concentración de ADN se utilizó el Epoch® microplate spectrophotometer (BioTek Instruments Inc., EUA), se colocaron 2  $\mu$ L del buffer EB como blanco, posterior a esto se colocaron 2  $\mu$ L de cada muestra en la placa del equipo y se cuantificó el ADN. Las concentraciones del ADN se ajustaron 20 ng/ $\mu$ L mediante diluciones con agua ultrapura. Una vez ajustada la concentración se mandaron secuenciar las muestras por ambos sentidos utilizando los mismos oligonucleótidos 533 F y 1391 R. La secuenciación estuvo a cargo del LANBAMA, IPICYT, México. Los equipos utilizados fueron los secuenciadores automatizados 3130 y 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA).

#### **3.2.4 Análisis de las secuencias obtenidas**

Los cromatogramas de la secuenciación fueron analizados en el programa A plasmid editor (ApE. Wayne Davis, 2016). Una vez verificada la calidad de las secuencias se alinearon sentido y anti-sentido en Align Sequences Nucleotide del BLAST (Altschul, et al., 1990). Confirmando que ambas secuencias procedentes de los dos oligonucleótidos eran complementarias entre sí, se compararon con las reportadas en la base de datos del Standard Nucleotide del BLAST (Altschul, et al, 1990). Ambas con dirección en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Se seleccionó el género y la especie con base al mayor porcentaje de identidad de las secuencias ya reportadas en la base de datos.

### **3.3 Propiedades del suelo a remediar**

#### **3.3.1 Obtención del suelo a biorremediar**

Se eligieron zonas al azar en área de resguardo del suelo contaminado por HFM establecido por la mina. Se tomó una muestra representativa de aproximadamente 30 kg de suelo la cual se cribó y colocó en bolsas de plástico oscuras para su inmediato transporte al laboratorio donde fueron almacenadas a una temperatura de 4°C. Una submuestra de 3 kg de suelo fue reservada bajo las mismas condiciones para las pruebas de caracterización del suelo.

#### **3.3.2 Determinación de las propiedades del suelo**

##### **3.3.2.1 Determinación de pH del suelo.**

Se pesaron 10 g de suelo en un frasco de vidrio, se adicionó 20 mL de agua destilada y con una varilla de vidrio se agitó suavemente. La agitación manual se realizó a intervalos de 5 minutos durante un lapso de 30 minutos. Se dejó reposar durante 15 minutos<sup>71</sup>. El medidor de pH utilizado fue el Hanna pH 20 (Hanna Instruments, Italia) fue calibrado con los buffers correspondientes de pH 4.00 y 7.00. Se agitó para resuspender la solución y se introdujo el electrodo. Se registró el pH una vez la lectura se estabilizó.

##### **3.3.2.2 Humedad**

*Método 1 Gravimetría*<sup>71</sup>: Se tararon charolas de aluminio a 105°C hasta peso constante, se registró el peso ( $P1$ ). Se pesaron 30 g de suelo en ellas, se registró el peso ( $P2$ ) y se secó a 105°C durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo se sacó de la estufa y se registró el peso, se introdujo nuevamente a la estufa durante 1 hora, se sacó, se dejó enfriar en un desecador por 30 minutos y se registró nuevamente el peso, se repitió este proceso hasta llegar a peso constante ( $P3$ ). Para la determinación de la humedad se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%H = \left( \frac{P2 - P3}{P3 - P1} \right) \times 100 \quad (\text{ec. 9})$$

*Donde:*

*P1: peso de la charola de aluminio previamente tarada (g)*

*P2: peso de la charola tarada más el peso del suelo húmedo (g)*

*P3: peso de la charola tarada más el peso del suelo seco (g)*

*Método 2 Soil Moisture Meter MO750 (Extech Instruments, USA):* El suelo reservado para las pruebas fisicoquímicas (aproximadamente 3 kg) se depositó en una charola de plástico, se introdujo la punta del medidor de humedad en suelo MO750 a una profundidad de 15 cm, se esperó unos segundos a que la lectura se estabilizara y se registró el valor de humedad obtenido. Esta prueba no es destructiva por lo cual se volvió a almacenar el suelo para pruebas posteriores.

### **3.3.2.3 Materia Orgánica.**

Fue necesario tarar crisoles de 12 mL de capacidad. La tara se realizó en una mufla a una temperatura de 550°C durante 1 hora. Se sacó de la mufla y se colocó en el interior de una estufa a 125°C durante 15 minutos, una vez transcurrido el tiempo se colocó en un desecador para el enfriamiento. Una vez atemperado se registró el peso del crisol (*P1*). Dos gramos de suelo fueron pesados en el crisol (*P2*). El crisol fue llevado a una plancha de calentamiento a 250°C, se mantuvo en calentamiento hasta que la muestra dejara de emitir vapores. Se introdujo el crisol con la muestra en la mufla a 550°C durante 1 hora. Pasada la hora se colocó dentro de la estufa a 125°C por 15 minutos, se colocó en el desecador para enfriar y posteriormente registrar el peso (*P3*). La materia orgánica se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\%MO = \left( \frac{P2 - P3}{P3 - P1} \right) \times 100 \quad (\text{ec. 10})$$

*Donde:*

*P1: peso del crisol previamente tarado (g)*

*P2: peso del crisol tarado más el peso del suelo húmedo (g)*

*P3: peso del crisol tarado más el peso del suelo seco (g)*

### 3.3.2.4 Textura del suelo

Determinación mediante método Tames<sup>72</sup>. Se tomó aproximadamente 10 g de suelo cribado sin rocas ni partículas mayores a 1 mm. Se humedeció con agua, la necesaria para formar una pasta moldeable. Se tomó una cantidad del suelo entre los dedos (pulgar, índice y anular) enrollándolo al comprimir la muestra para formar una cintilla o un alambre fino de suelo. Si se forma una cintilla estable, se trata de una textura (fina) arcillosa. Para un suelo franco arcilloso se formará la cintilla corta pero no tan duradera. Se volvió a agregar más agua a la muestra y se siguió el mismo procedimiento, se tomó nuevamente la muestra entre los dedos para formar la cintilla, si no se forma y se desmorona se trata de una textura (gruesa) arenoso (es fácilmente perceptible de tratarse de un suelo arenoso ya que la arena proporciona una textura áspera a diferencia del limoso que da una sensación suave). Franco arcillo arenoso si se forma una cintilla moderadamente estable, pero con un tacto muy áspero. Si se forma una cintilla larga e inestable se trata de una textura limoso. Franco arcillo limoso si se forma una cintilla medianamente estable, pero con un tacto suave.

### 3.3.2.5 Capacidad de campo

*Método aproximado de la probeta:* Se secaron 100 g suelo cribado sin rocas ni partículas mayores a 1 mm y se colocaron en una probeta de 100 mL. El suelo se comprimió lo más posible, ayudado de ligeros golpes contra la mesa de trabajo. Una vez el suelo se acomodó en la probeta se midió el volumen que ocupa dicho suelo ( $V_1$ ) y se le añadió 3 mL de agua ( $V$ ). Se cubrió la boca del instrumento con *parafilm* para evitar la evaporación del agua. Transcurridas las 24 horas se midió el volumen del suelo seco ( $V_2$ )<sup>16</sup>. La capacidad de campo se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% \theta_{cc} = \left( \frac{V}{V_1 - V_2} \right) \times 100 \quad (\text{ec. 11})$$

*Donde:*

$V$ : volumen de agua añadido para suelos arenosos ( $\text{cm}^3$ )

$V_1$ : volumen que ocupan los 100 g de suelo ( $\text{cm}^3$ )

$V_2$ : volumen que ocupa el suelo seco pasadas las 24 horas ( $\text{cm}^3$ )

### 3.3.2.6 Densidad aparente.

Se estimó utilizando los datos recabados en la determinación de la capacidad de campo; el peso del suelo seco y el valor obtenido de  $V_1$ . Se empleó la siguiente ecuación para calcular la densidad aparente aproximada:

$$da = \left( \frac{g}{V_1} \right) \quad (\text{ec. 12})$$

Donde:

$g$ : peso del suelo seco utilizado en la determinación de la  $\theta_{cc}$  (aprox. 100 g)

$V_1$ : volumen que ocupan los 100 g de suelo ( $\text{cm}^3$ )

### 3.3.2.7 Porosidad.

Se determinó por estimación. Se consideró la densidad aparente obtenida ( $da$ ) y se utilizó el valor de densidad real ( $dr$ ) el cual corresponde a  $2.65 \text{ g/cm}^3$ . Se empleó la siguiente ecuación:

$$\%P = \left( 1 - \frac{da}{dr} \right) \times 100 \quad (\text{ec. 13})$$

Donde:

$da$ : densidad aparente obtenida ( $\text{g/cm}^3$ )

$dr$ : densidad real de un suelo arenoso ( $\text{g/cm}^3$ )

### 3.3.2.8 Conductividad eléctrica.

Se pesaron 10 g de suelo en un frasco de vidrio, se adicionaron 20 mL de agua destilada y con una varilla de vidrio se agitó suavemente a intervalos de 5 minutos durante un lapso de 30 minutos, se dejó reposar durante 15 minutos. El medidor de conductividad eléctrica utilizado fue el *Waterproof Tester Combo pH & CE* (Hanna Instruments, Italia) fue calibrado con la solución estándar KCl 0.010 N. Se agitó para resuspender la solución y se introdujo el electrodo, se registró la conductividad eléctrica una vez estabilizada la lectura. Se reportó como  $\text{dS/m}$ .

### 3.3.3 Determinación de las propiedades microbiológicas del suelo

#### 3.3.3.1 Conteo celular por dilución y vertido en placa

Para la dilución en serie, previamente se agregaron 1 g del suelo de la mina en un tubo de 15 mL de capacidad con 9 mL de agua estéril, se agitaron por 200 rpm durante 5 minutos. Se tomó 1 mL del sobrenadante y se transfirió a un tubo de ensayo con 9 mL de solución salina estéril. Se realizaron diluciones seriadas de 1 a  $10^6$ , de cada dilución se tomó 0.1 mL y se depositó en placas Petri, se les adicionaron aproximadamente 15 mL de agar nutritivo. Se incubó de manera invertida a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. Se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias, se consideró solo las placas que tenían de 25 a 250 colonias<sup>73,74</sup>. Para calcular las unidades formadoras de colonias se utilizó la siguiente ecuación.

$$\frac{UFC}{g} = (NC)(FD) \quad (\text{ec. 14})$$

*Donde:*

*NC: número de colonias en placa*

*FD: factor de dilución*



### 3.4 Construcción y evaluación de las biopilas

Se diseñaron 9 biopilas con diferentes tratamientos de bioaumentación y bioestimulación. Se corrió a demás una biopila testigo (atenuación natural).

Las dimensiones de cada biopila fueron: 24 cm largo, 15 cm de ancho y 11 cm de alto, cada una con 2.5 kg de suelo contaminado con HFM.

#### 3.4.1 Diseño de experimentos

Para obtener una combinación de las variables (consorcio, cosustrato, surfactante) en las 9 biopilas, se utilizó el software Minitab18® (Minitab LCC., EUA). Las variables fueron introducidas al programa basándose en el método experimental de Taguchi. Las combinaciones se presentan en la siguiente tabla.

**Tabla 7**

*Diseño experimental; combinación de variables.*

Biopilas (B)	C (%)	S (%)	Consorcio (cél/mL)
1*	-	-	-
2	-	0.05	E+06
3	-	0.10	E+09
4	0.50	-	E+06
5	0.50	0.05	E+09
6	0.50	0.10	-
7	1.00	-	E+09
8	1.00	0.05	-
9	1.00	0.10	E+06
10* (Testigo)	-	-	-

C: cosustrato. S: surfactante. \*La diferencia entre estas dos biopilas es que la biopila 1 tiene aireación y la testigo no (atenuación natural asistida y atenuación natural respectivamente).

#### *Preparación del cosustrato.*

Se pesaron 150 g de aserrín (previamente secado en estufa a  $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  durante 5 horas para eliminar la humedad). Se sumergió en 700 mL de solución stock de nutrientes mencionada en el apartado 3.1.2. Se sumergió durante 2 horas, se sacó de la solución y se secó nuevamente en la estufa por dos horas más. Trascurrido el tiempo en la estufa se secó a temperatura ambiente. Las biopilas adicionadas con el cosustrato se prepararon 24 horas previas al montaje del experimento. Se midió al inicio del experimento el %MO a cada biopila a la

que se le adicionó el cosustrato, siguiendo la metodología mencionada en el apartado **3.3.2.3**.

#### *Preparación del surfactante.*

Las diluciones se realizaron con base a lo establecido por el fabricante del producto utilizado, Evolve® (Evolve Verde, México).

#### *Preparación del consorcio hidrocarbonoclasta.*

Basados en los resultados de las propiedades fisicoquímicas, se decidió adicionar 250 mL del medio de cultivo del consorcio BHCC. Para la concentración de  $10^6$  cél/mL se tomó 10 mL del medio de cultivo y se diluyó con medio de nutrientes hasta obtener dicha concentración. Para la concentración celular de  $10^9$  cél/mL se tomó directo del reactor. Se cercioró la concentración celular mediante conteos en cámara siguiendo el procedimiento del apartado **3.1.3.2**.

### **3.4.1.1 Ensamblaje de las biopilas**

Palanganas de plástico fueron perforadas con dos orificios de 1 cm de diámetro. Se les introdujo dos mangueras de plástico de 0.9 cm de diámetro que previamente había sido perforadas con una serie de pequeños orificios para suministrar el aire a las biopilas. Estas mangueras fueron conectadas a un compresor. Las nueve biopilas contaron con una tasa de aireación total de 0.27 m<sup>3</sup>/min, generando así una tasa de aireación por biopila de 0.03 m<sup>3</sup>/min. El tiempo total de aireación fue de 1 hora por día, en intervalos de 10 min cada 3 horas. Fueron colocadas al aire libre cubiertas con una membrana de plástico para evitar el daño de factores externos como lluvia, granizo y otros efectos meteorológicos.

### **3.4.2 Evaluación de las biopilas**

#### *Procedimiento del muestreo*

El muestreo se llevó de manera aleatoria a distintos puntos de profundidad. Se tomó el suelo en un frasco y se mezcló para las determinaciones correspondientes.

Para la determinación de la concentración de hidrocarburos se tomó aproximadamente 70 g del suelo el cual fue almacenado a 4°C para su posterior análisis. Esto se realizó cada 10 días durante los dos meses de experimentación.

#### *Determinación de la materia orgánica después de la adición del cosustrato*

Para evaluar el nuevo nivel de materia orgánica en el suelo se siguió el procedimiento mencionado en el apartado **3.3.2.3**. La determinación se realizó para las diez biopilas.

##### **3.4.2.1 Determinación del pH**

Se pesó 1 g de suelo en un frasco de vidrio, se adicionó 20 mL de agua destilada y con una varilla de vidrio se agitó suavemente. La agitación manual se realizó a intervalos de 5 minutos durante un lapso de 30 minutos. Se dejó reposar durante 15 minutos. El medidor de pH utilizado fue el *Waterproof Tester Combo pH & CE* (Hanna Instruments, Italia) fue calibrado con los buffers correspondientes de pH 4.00 y 7.00. Se agitó para resuspender la solución y se introdujo el electrodo, se registró el pH una vez la lectura se estabilizó. Esta determinación se realizó cada 5 días.

##### **3.4.2.2 Determinación de la CE**

Se utilizó la misma suspensión utilizada para el registro de pH. El medidor de conductividad eléctrica utilizado fue el *Waterproof Tester Combo pH & CE* (Hanna Instruments, Italia) fue calibrado con la solución estándar KCl 0.010 N. Se agitó para resuspender la solución y se introdujo el electrodo, se registró la conductividad eléctrica una vez estabilizada la lectura. Los datos se reportaron como dS/m. La determinación se realizó cada 5 días.

##### **3.4.2.3 Monitoreo de humedad**

Se midió la humedad con el *Meter MO750 (Extech Instruments, USA)*. Se introdujo la punta del medidor en suelo a una profundidad de 5 cm aproximadamente, se esperó unos segundos a que la lectura se estabilizara y se registró el valor de humedad obtenido. Se siguió el mismo procedimiento en

diferentes puntos de la biopila. Este procedimiento se realizó a diario para determinar la frecuencia de riego que demandaba el suelo de cada biopila.

### **3.4.2.4 Monitoreo de la temperatura**

#### **3.4.2.4.1 Monitoreo temperatura del suelo**

Para determinar la temperatura del suelo de la biopila: debajo de la membrana se colocó un termómetro de mercurio el cual se incrustó en el suelo en distintos puntos, se promediaron las lecturas. Dichas lecturas fueron tomadas a las 14:00 horas de cada día.

#### **3.4.2.4.2 Monitoreo de temperatura ambiental**

Se monitorearon las temperaturas alcanzadas en los días de experimentación, basadas en la información proporcionada por el pronóstico meteorológico *AccuWeather*.

### **3.4.3 Método analítico para la determinación de los HFM.**

#### **3.4.3.1 Determinación de la de masa seca.**

Crisoles fueron tarados a  $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante. Se dejó enfriar en un desecador por lo menos 45 minutos. La masa del contenedor se reportó como  $m_0$ . Diez gramos de muestra de suelo se depositaron en el crisol, el peso del crisol con el suelo se identificó como  $m_1$ . Se dejó secar la muestra durante 16 horas a  $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Se enfriaron dentro de un desecador por 45 min. Se determinó la masa del contenedor con el suelo seco y se identificó como  $m_2$ . Para calcular el porcentaje de masa seca se empleó la siguiente ecuación:

$$\%masa\ seca = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \quad (\text{ec. 15})$$

*Donde:*

$m_0$ : masa del crisol tarado (g)

$m_1$ : masa del crisol y el suelo húmedo (g)

$m_2$ : masa del crisol y el suelo seco (g)

#### **3.4.3.2 Método de extracción de los hidrocarburos.**

En un vaso de vidrio se depositaron 2 g de muestra de suelo. Se le adicionó sulfato de sodio anhidro a la muestra y se mezcló hasta obtener una muestra arenosa. Se le adicionó 10 mL de disolvente de extracción, cloruro de metileno: acetona (1:1 v/v). Se sometió la muestra en un lapso de 2 min en el sonicador, cuidando de sumergir 1.2 cm la punta del disruptor por debajo del disolvente sin tocar la muestra. Se ajustó el equipo a un modo de pulsaciones de 50% de su capacidad, así mismo el control de salida de energía estuvo a un 5% de su potencia. Se decantó y filtró el extracto a través de un embudo de filtración rápida con sulfato de sodio anhidro como desecante. Se recolectó en el matraz. El recolectado se le adicionó 10 mL de disolvente de extracción y se sometió por 2 min al sonicador tal como se indicó anteriormente. El procedimiento en el sonicador se realizó dos veces más.

*Método cromatográfico por utilizar.*

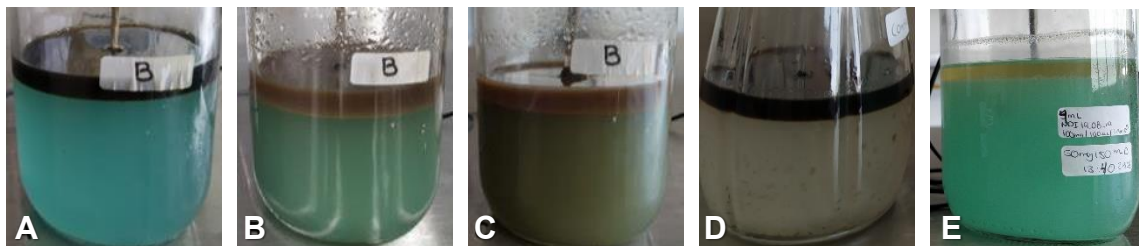
El análisis de las muestras fue llevado a cabo por el departamento de servicios profesionales ubicado en la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 Acondicionamiento del consorcio BHCC

En diversos estudios se ha experimentado con bacterias degradadoras de hidrocarburos para determinar las condiciones adecuadas para su crecimiento y aplicación en técnicas de biorremediación. Los niveles de HFM que han reportado como óptimos para el crecimiento de las bacterias hidrocarbonoclastas van desde el 1%<sup>75</sup> al 25%<sup>55</sup> v/v. El consorcio obtenido de la chapopotera de Veracruz se aclimató en un medio de sales utilizando un fertilizante comercial con una proporción de diésel al 10% v/v.

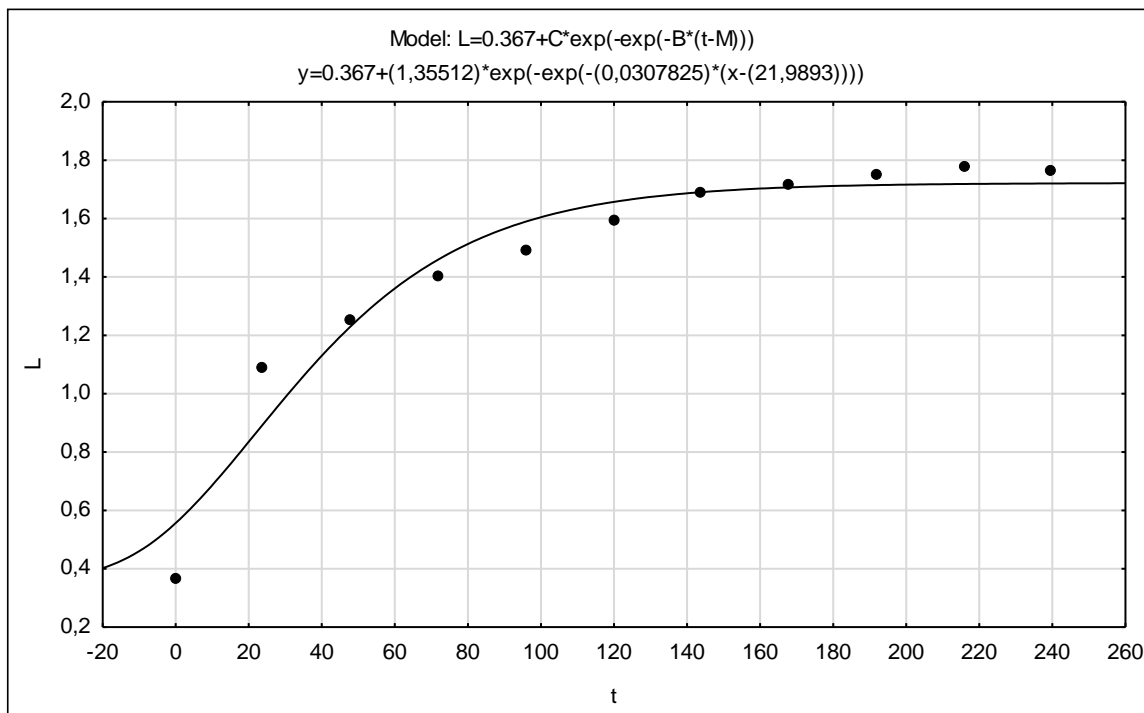
Basados en las observaciones de la despigmentación de la fase oleosa como indicativo visual de la degradación de los HFM (**figura 4**) se aprecia que trascurridos los primeros 3 días, la fase oleosa se tornó de un color pardo claro a diferencia del primer día, lo que sugiere que ocurrió una degradación del contaminante. En el reactor testigo y control negativo no se detectaron cambios visibles en el aspecto del medio.



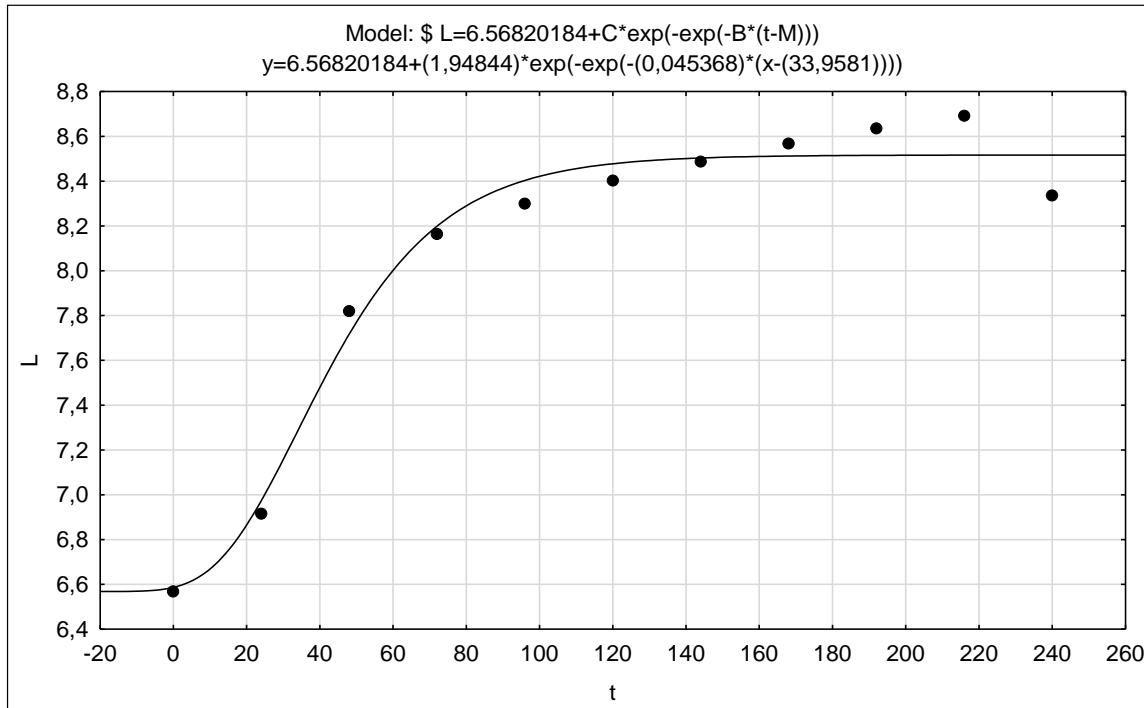
**Figura 4.** Observaciones del medio de crecimiento a lo largo del experimento. Medio salino comercial MiracleGro™ (The Scotts Company LLC, EUA) suplementado con diésel al 10% v/v. A: Día inicial. B: Tercer día. C: Noveno día. D: Reactor testigo. E: Reactor control negativo.

#### 4.1.1 Evaluación del crecimiento del consorcio BHCC

Para evaluar el crecimiento del consorcio, se midió la  $OD_{600}$  y se realizó un conteo de células en cámara de Neubauer. Dichos datos se modelaron con la ecuación de Gompertz. En la **figura 5 y 6** se pueden observar las curvas arrojadas por el software, que muestran el comportamiento del consorcio en el medio. Los parámetros calculados del crecimiento bacteriano se muestran en la **tabla 9**.



**Figura 5.** Evaluación del crecimiento del consorcio hidrocarbonoclasta. Gráfico basado en la absorbancia utilizando el modelo de Gompertz en el software TIBCO® Statistica™ versión 13.5.0.17 (TIBCO Software Inc., EUA). L: absorbancia leída a 600 nm. t: tiempo en horas.



**Figura 6.** Evaluación del crecimiento del consorcio hidrocarbonoclasta. Gráfico basado en conteo en cámara de Neubauer utilizando el modelo de Gompertz en el software TIBCO® Statistica™ versión 13.5.0.17 (TIBCO Software Inc., EUA). L: log de CFU/mL. t: tiempo en horas.

**Tabla 9**

*Valores cinéticos estimados para el crecimiento del consorcio bacteriano hidrocarbonoclasta.*

Método de medición	Tasa de crecimiento exponencial (log UFC/mL/h)	Tiempo de generación (h)	Duración de la fase Lag (h)	Tiempo de adaptación (h)	Densidad de población máxima (log UFC/mL)
DO <sub>600</sub>	0.02	19.62	-10.50	---	1.72
Conteo Neubauer	0.03	9.26	11.92	2.66	8.52

Se determinó que el tiempo de replicación de las células en este medio osciló entre las 9 a 19 horas. Según las referencias, los tiempos de generación para bacterias como *Pseudomonas sp.* en medios salinos y utilizando hidrocarburos como principal fuente de carbono oscilan entre las 23 hasta las 70 horas<sup>76</sup>. En la **figura 5** no se aprecia un periodo de latencia (fase lag) y en la **figura 6** el valor calculado para dicha fase es de 11 horas. La fase logarítmica ocurre dentro de las primeras 28 horas (>1 día) hasta las 143 horas (5.95 días). La densidad poblacional máxima nos ayuda a conocer a que tiempo ocurre la fase estacionaria, para ambas curvas la fase estacionaria ocurre a las 144 horas (sexto día). A partir de las 240 horas (10 días) se comienza a observar un declive en la absorbancia y el conteo celular, lo que indica que el consorcio está entrando en fase de muerte. Los resultados obtenidos por ambos métodos muestran una estrecha relación entre sí, confirmando que el sexto día es el día óptimo para realizar los escalamientos del consorcio, así como hacer uso de él para sus aplicaciones en la biorremediación.

Un estudio con resultados similares a los aquí obtenidos fue el que se realizó en China<sup>75</sup> donde se midió el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en un medio Bushnell-Hass suplementado con diésel al 1.5% v/v. La curva presentó similitudes en los tiempos de la fase de crecimiento con los obtenidos en esta investigación. Dicha curva alcanzó la fase de crecimiento exponencial del día inicial al sexto día, fase estacionaria del sexto al décimo, donde al final de ese

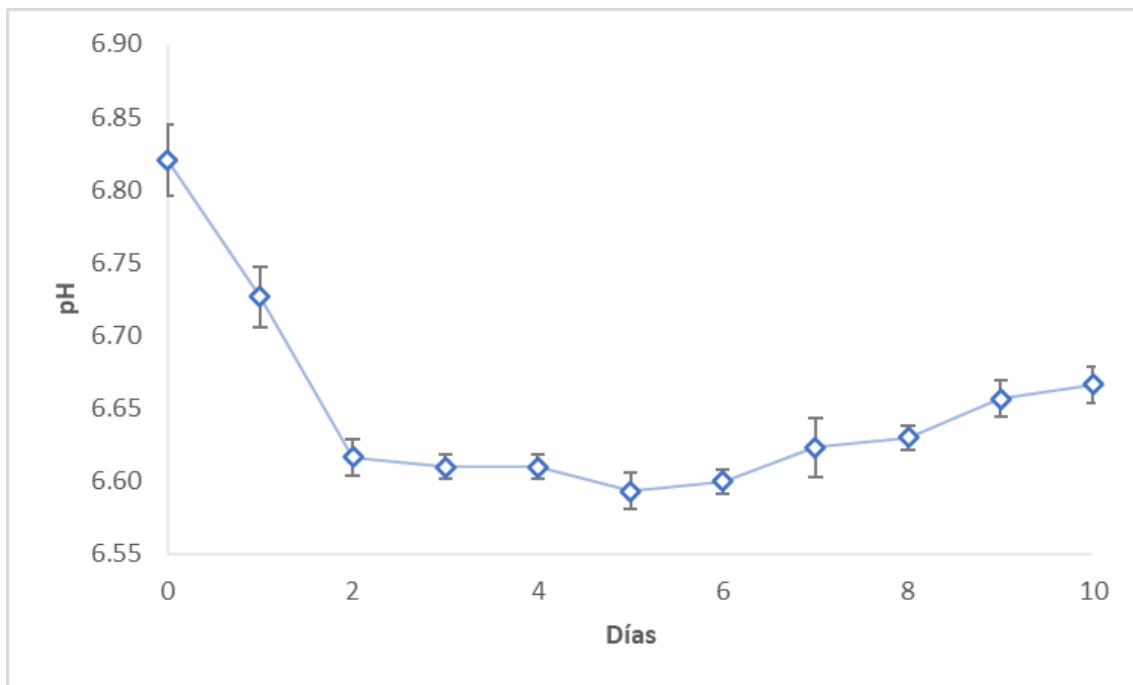


día se comenzó a notar un declive en la curva, indicando el inicio de la muerte celular hasta el día 14. Se evaluó la capacidad de degradación la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* obteniendo una degradación del 58% de diésel para el día 14.

#### 4.1.2 Determinación de las propiedades fisicoquímicas del medio

##### 4.1.2.1 Determinación del pH

La **figura 7** muestra un pH inicial del medio de 6.82 el cual disminuye a 6.62, esta disminución puede estar causada por la acumulación de ácidos grasos<sup>55,77</sup>. El pH se mantiene estable hasta el quinto día. A partir del sexto día se observa que la lectura comienza a tener un ligero aumento hasta el décimo día, alcanzando un pH final de 6.67. El aumento podría deberse a la acumulación de compuestos como el alcohol y otros derivados de alcanos, productos del proceso de la biodegradación de HFM<sup>55</sup>.

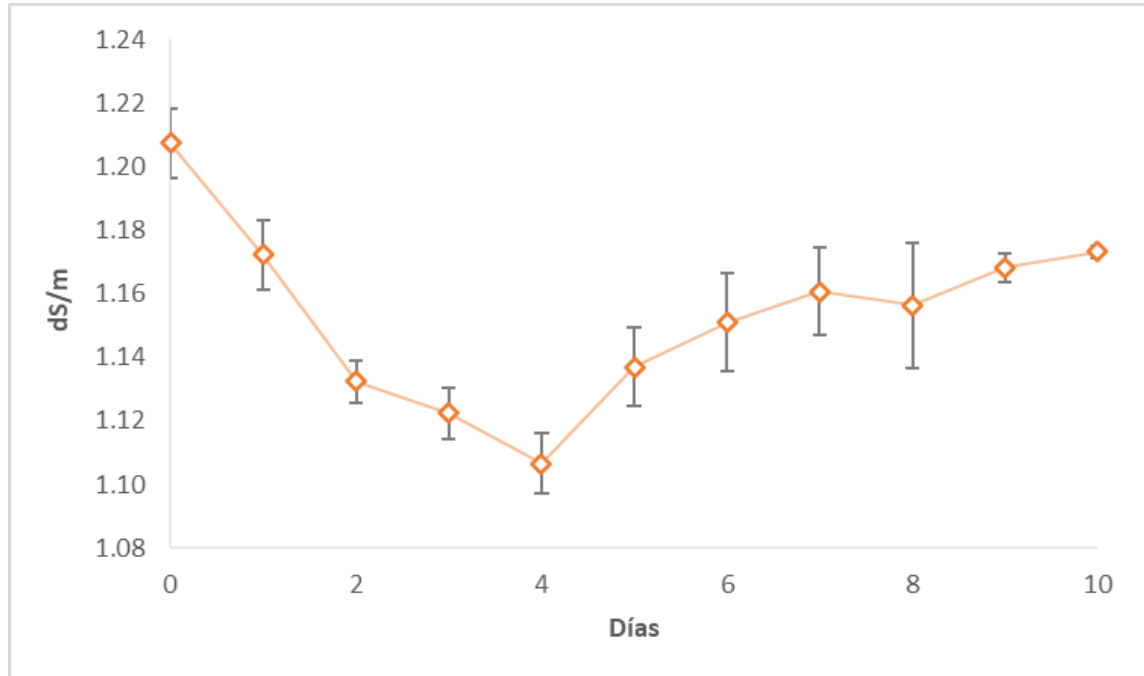


**Figura 7.** Curva de pH en el medio de crecimiento del consorcio hidrocarbonoclasta realizado con el equipo Waterproof Tester Combo pH & CE (Hanna Instruments, Italia).

En un estudio realizado en Brasil se evaluó la degradación de HFM por un consorcio aislado de un suelo contaminado. Se acondicionó el consorcio en un medio salino Bushnell-Hass y diésel al 10% v/v con aireación proporcionada por la agitación a 150 rpm. Se obtuvieron valores de pH similares a los aquí obtenidos, en un rango de 7.0 a 5.7. Dicho consorcio bacteriano mostró un alto potencial para el uso de biorremediación de HFM<sup>78</sup> debido a que obtuvo una tasa de degradación del 68% durante 6 días en una temperatura de 25°C.

#### 4.1.2.2 Determinación de la CE

Un medio con una conductividad eléctrica mayor a 4 dS/m es considerado salino<sup>71</sup>. Un aumento en la salinidad del medio impediría el óptimo crecimiento de bacterias no halófilas. Las sales inorgánicas juegan un rol importante manteniendo el equilibrio de la membrana celular y regulando la presión osmótica<sup>79</sup>. Monitorear los niveles salinos en el medio es importante para evaluar la tasa de captación de los nutrientes del medio por las bacterias presentes en él. En la **figura 8** se ven graficados los valores de conductividad eléctrica.

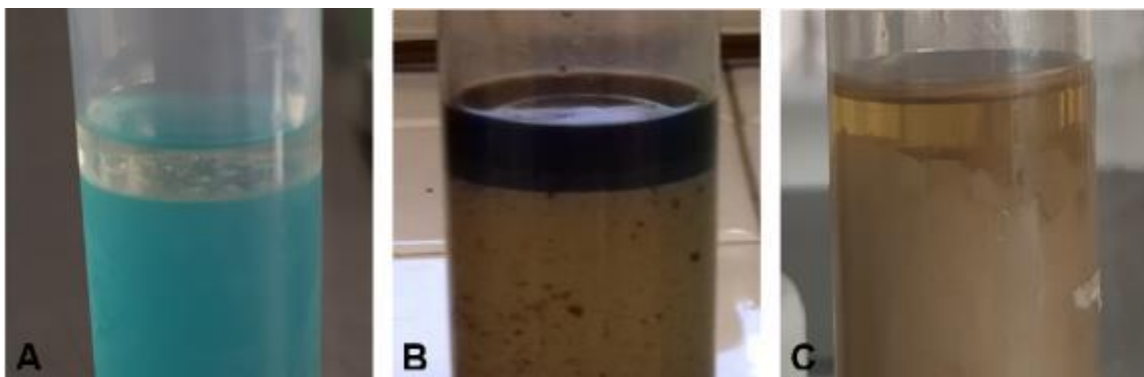


**Figura 8.** Curva de conductividad eléctrica (expresada en dS/m) en el medio del crecimiento del consorcio hidrocarbonoclasta realizado con el equipo Waterproof Tester Combo pH & CE (Hanna Instruments, Italia).

Se nota una disminución marcada del día inicial al tercer día. Esto posiblemente se debe a que las bacterias se encontraban en fase exponencial; en constante replicación, por lo que los nutrientes en el medio disminuyen, notándose una marcada disminución de la CE<sup>61</sup>. Del cuarto día en adelante se vio un ligero aumento en la conductividad eléctrica, esto debido a una acumulación de desechos tóxicos que pudieran salinizar el medio<sup>80</sup> provocados por los procesos de degradación de los hidrocarburos.

#### 4.1.3 Propiedades emulsificantes del consorcio

Se observó espuma en la fase oleosa en respuesta a la emulsión producida por la agitación, pero además se detectaron rastros de un sobrenadante de aspecto dorado en dicha fase. La centrifugación de la emulsión (fase oleosa) tuvo como resultado un 88% de biomasa y 12% del sobrenadante que se especula pudiera ser diésel remanente y algunos biosurfactantes producidos por el consorcio. Se descartó que este sobrenadante fuera en su totalidad diésel remanente. Al realizar una prueba rápida al tacto no se percibió las características oleosas del diésel, la textura de este sobrenadante era más ligera.



**Figura 9.** Apariencia de la fase oleosa (HFM) a lo largo de la duración del experimento. A: primer día del pre-tratamiento. B: el inicio del acondicionamiento en los reactores. C: después de la centrifugación de la emulsión producida en el reactor al día 10.

Los resultados de las pruebas fisicoquímicas realizadas al sobrenadante (**tabla 10**) indican que sus propiedades son similares con la del detergente comercial (un surfactante comunmente empleado para disminuir la tensión superficial en grasas y aceites) tanto en el desplazamiento de aceite como en el índice de emulsión, lo que se interpreta como altamente competente para reducir la tensión superficial<sup>68,81</sup>. En cuanto al resultado de la estabilidad (E24), no se obtuvieron

buenos resultados, una estabilidad igual o mayor a 50% indica una buena concentración del surfactante. La baja estabilidad puede deberse a una baja concentración de biosurfactantes en la muestra tomada. La presencia de biosurfactante es una prueba más que demuestra la adaptación del consorcio en el medio de cultivo donde se está llevando a cabo la degradación del contaminante<sup>67</sup>.

**Tabla 10**

*Caracterización fisicoquímica del sobrenadante producido en el reactor.*

Caracterización	Desplazamiento de aceite (cm <sup>2</sup> )	IE (%)	E24 (%)
Sobrenadante	7 ± 0.24	42 ± 2.45	16 ± 1.25
Tritón-X100	8 ± 0.57	55 ± 1.25	48 ± 7.79
Detergente comercial	8 ± 0.24	50 ± 1.25	46 ± 1.63
Diésel	1 ± 0.24	5 ± 1.41	0.00

El Tritón X-100 y el detergente comercial se encuentran en una concentración de 5mg/mL. IE: Índice de emulsión. E24: estabilidad de la emulsión transcurridas 24 horas. n=3 ± Desviación estándar.

Las bacterias involucradas en producir biosurfactantes de bajo peso molecular son algunos géneros de *Pseudomonas sp.*<sup>75,82-84</sup>, *Acinetobacter sp.*<sup>85</sup> y *Bacillus sp.*<sup>68,80,86</sup> por mencionar las más comúnmente encontradas en suelos contaminados con estos tipos de compuestos. Estos bioproductos buscan incrementar la biodisponibilidad del sustrato para mejorar su aprovechamiento por los géneros bacterianos.

## 4.2 Caracterización molecular del consorcio BHCC

En la **tabla 11** se muestran las características de algunas de las colonias aisladas del reactor en su fase estacionaria, todas identificadas como Gram negativas.

**Tabla 11**

*Características microscópicas y macroscópicas de las colonias aisladas por agotamiento de estría es cuatro campos.*

Colonia	Morfología	Características fenotípicas
1	Bacilos cortos segmentados.	Colonias con tintes blancos, mayor pigmentación en el centro de la colonia. Colonias bien definidas.
2	Bacilos medianos segmentados.	Colonias intensamente blancas con un halo blanco casi transparente, sin bordes definidos.
3	Bacilos cortos.	Colonias blancas casi transparentes con bordes rugosos.
4	Bacilos medianos.	Colonias blancas bien definidas.
5	Bacilos largos.	Las colonias no aisladas crecen como derrame, con tintes blancos-transparentes y amorfas.
6	Bacilos cortos segmentados.	Colonias con tintes blancos y mayor pigmentación en el centro de la colonia. Colonias bien definidas.

El análisis de las secuencias arrojó las bacterias mostradas en la **tabla 12**.

**Tabla 12**

*Bacterias identificadas con 98-99% de identidad basado en las secuencias del rADN 16S del repositorio de secuencias del NCBI.*

Identificación molecular	Longitud (pb)	Similitud (%)	Número de acceso de GenBank
<i>Pseudomonas citronellolis</i> (NBRC 103043)	1 452	99.75%	NR_114194.1
<i>Pseudomonas panipatensis</i> (Esp-1)	1 447	99.62%	NR_044209.1
<i>Pseudomonas multiresinivorans</i> (ATCC 700690)	1 437	99.37%	NR_119225.1
<i>Pseudomonas knackmussii</i> (B13)	1 430	99.24%	NR_121733.1
<i>Pseudomonas nitritireducens</i> (WZBFD3-5A2)	1 430	99.24%	NR_133020.1
<i>Pseudomonas delhiensis</i> (RLD-1)	1 430	99.24%	NR_043731.1

La baja diversidad en la población bacteriana obtenida se puede atribuir a la baja resistencia y adaptabilidad de las especies iniciales en el reactor de crecimiento en comparación con las bacterias identificadas al final del proceso de biodegradación debido a las condiciones específicas del medio, como: la concentración y el tipo de hidrocarburo, haciendo más selectivo el crecimiento de solo algunas especies microbianas<sup>66,87</sup>.

Las especies identificadas en este trabajo ya han sido reportadas por su activa participación en la degradación de hidrocarburos, a continuación se presentan los estudios donde han sido identificadas y su protagonismo en ellos.

En Veracruz, México, se realizaron experimentos en suelos contaminados en donde se adicionó el consorcio microbiano nativo que previamente fue adaptado con crudo Maya. Se obtuvo una degradación en el suelo del 97% de los hidrocarburos en un periodo de 28 días, entre los microorganismos responsables de dicha degradación se identificaron *Pseudomonas citronellolis*, *Pseudomonas delhiensis* y *Pseudomonas knackmussii*<sup>88</sup>.

Asimismo en un suelo en una refinería en la India se aisló e identificó a *Pseudomonas panipatensis*, bacteria capaz de degradar el citronelol, componente del lodo aceitoso<sup>89</sup>. Este lodo es uno de los residuos más importantes generados en la industria petrolera conocido como *oily sludge*, el cual está compuesto de hidrocarburos del petróleo, agua, metales pesados y otras partículas<sup>90</sup>.

También se ha estudiado la degradación de petróleo crudo por *Pseudomonas multiresinivorans*. La degradación se llevó a cabo en matraces. Los resultados del estudio arrojaron una degradación del 20 al 40% de dicho contaminante en un periodo de 7 días<sup>91</sup>.

*Pseudomonas knackmussii* fue identificada como una de las primeras bacterias capaces de degradar los hidrocarburos aromáticos clorados, siendo candidata para su aplicación en la limpieza de sitios contaminados con estos compuestos<sup>92</sup>.

En Okinawa, Japón, se evaluó la capacidad de degradación de hidrocarburos de un consorcio bacteriano aislado de manglares contaminados con estos compuestos. Se identificó la composición del consorcio responsable de llevar a cabo dicha remediación. Los experimentos se realizaron en matraces con los hidrocarburos. Los resultados evidenciaron que el consorcio degradó más del 20% del contaminante, ese porcentaje corresponde a los alcanos de la fracción pesada de los hidrocarburos, todo esto en un lapso de 21 días y se reveló que los participantes de dicha remediación fueron en su mayoría especies del género *Pseudomonas*. El 40% de la totalidad del consorcio identificado corresponde a *Pseudomonas delhiensis*, resaltando así el papel crítico que juegan las *Pseudomonas spp.* en la degradación de hidrocarburos contaminantes en suelos<sup>87</sup>

### 4.3 Propiedades del suelo a remediar

**Tabla 13**

*Resultados de las pruebas fisicoquímicas y microbiológicas del suelo a remediar procedente de la mina de Zacatecas, México.*

Determinación	Resultados	Valores comunes*	Interpretación
<b>pH</b>	7.0	6.6 – 7.3	Neutro
<b>Humedad <math>\Delta</math></b>	3.4 %	---	Baja
<b>Humedad <math>\Omega</math></b>	3.6 %	---	Baja
<b>Materia orgánica</b>	1.1 %	0.6 – 1.5 %	Baja
<b>Capacidad de campo</b>	14 %	10-20 %	Baja
<b>Densidad aparente</b>	1.5 g/cm <sup>3</sup>	1.4-1.6 g/cm <sup>3</sup>	Arenosos
<b>Porosidad</b>	43 %	40-47 %	Media
<b>Conductividad eléctrica</b>	2.0 dS/m	1.1-2.0 dS/m	Muy ligeramente salino
<b>Textura del suelo</b>	Al formar una esfera con el suelo húmedo esta no se desmoronó al ejercer presión	Franco-arenosa	
<b>Bacterias heterótrofas</b>	2.4x10 <sup>4</sup> UFC/g.	---	---

\*Valores comunes para un suelo de textura franco arenoso descritos por Flores & Alcalá, 2010<sup>11</sup> y la NOM-021-SEMARNAT-2000<sup>71</sup>.  $\Delta$ : método gravimétrico.  $\Omega$ : equipo medidor de humedad.

Un estudio realizado en EUA concluye que, así como el tipo de mezcla de los contaminantes a degradar influye en la tasa de degradación, las características del suelo, en especial el de la materia orgánica puede ser un determinante al momento de la remoción de hidrocarburos ya que, el contenido orgánico es un factor importante en la sorción de los productos orgánicos no polares<sup>93</sup>.

Existen antecedentes de estudios utilizando suelos de textura franco-arenosa en donde se han obtenido resultados favorables en la mejoría de sus características fisicoquímicas, obteniendo resultados positivos pese a sus limitadas características de humedad, capacidad de campo y materia orgánica. En un estudio realizado en México a un suelo contaminado con diésel de textura franco-arenosa, le fue modificada su capacidad de retención de agua aplicando a dicha matriz residuos vegetales en descomposición, esto benefició los tratamientos para la remoción de hidrocarburos. Los microorganismos fueron capaces de adaptarse y degradar exitosamente los contaminantes obteniendo una degradación de hasta el 88% de diésel en el suelo<sup>49</sup>



#### 4.4 Ensayo de biorremediación en las biopilas

En la **figura 10** se pueden apreciar las biopilas montadas en este proyecto.



**Figura 10.** Disposición de las 10 biopilas. De izquierda a derecha de la 1 a la 10. A: día inicial del montaje del experimento. B: día 30 del experimento.

#### 4.4.1 Determinación de la materia orgánica.

La **tabla 14** muestra el contenido de materia orgánica en las biopilas a las que se les adicionó el cosustrato. Para la biopila 8 con 1% de cosustrato se tiene un resultado alto esperado. Las biopilas 6 y 4 adicionadas con 0.5% presentaron los mejores niveles de materia orgánica de las 6 biopilas bioestimuladas con cosustrato, además de ser las que mejor mantuvieron los niveles de humedad establecidos. Cumpliendo con uno de los objetivos propuestos de la adición del cosustrato. Un aumento en la adición del cosustrato por encima del 5% p/p puede ser perjudicial para la actividad microbiana en el suelo<sup>94</sup>.

**Tabla 14**

*Porcentaje de % MO previo y después de agregar el cosustrato.*

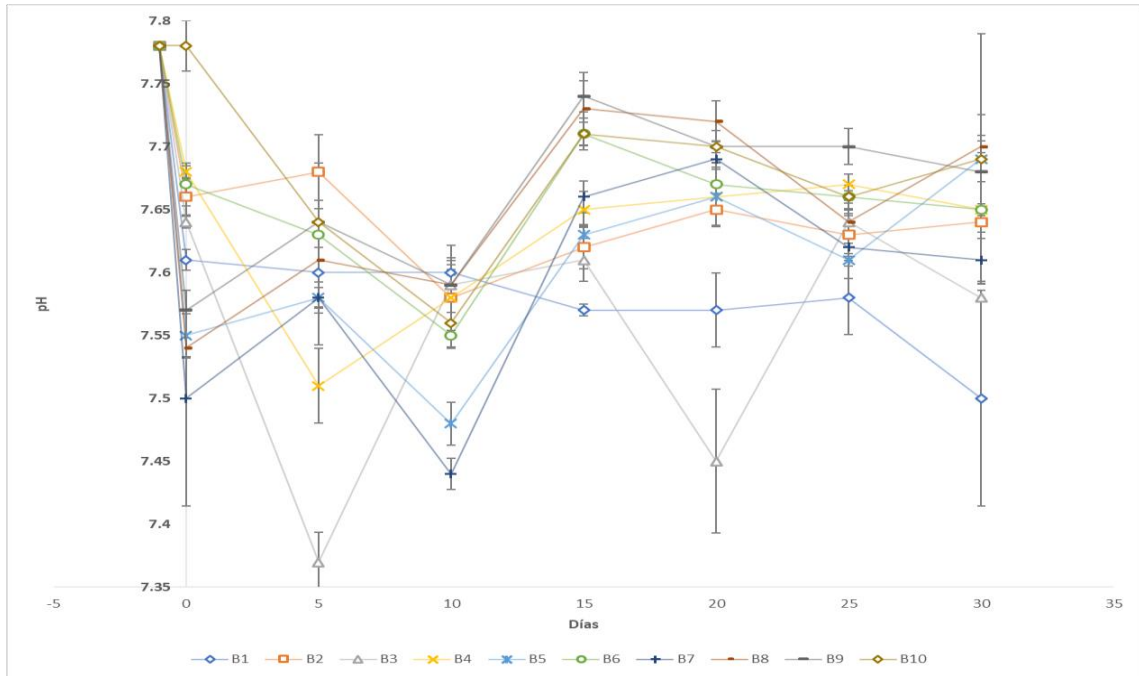
Día	% Materia orgánica					
	B4	B5	B6	B7	B8	B9
Previo			1.13			
Inicial	2.79	2.01	3.21	1.84	2.93	2.29

*Debido a la clausura del centro de investigación no fue posible realizar las otras dos replicas faltantes. Dichas muestras se almacenaron en condiciones adecuadas para repetir estas determinaciones, para verificar que en efecto las biopilas (B4, B5, B6) adicionadas con 0.5% de cosustrato presentaron mayor % MO.*

#### 4.4.2 Determinación de las propiedades fisicoquímicas del suelo.

##### 4.4.2.1 Determinación del pH

La **figura 11** muestra la disminución del pH dentro de los primeros días (día 0 al 10) esto puede deberse a la acumulación de productos de ácidos grasos, seguido de un aumento en el día 15 el cual puede estar relacionado con la acumulación de compuestos alcohólicos derivados de los compuestos alcanicos<sup>55</sup>. Ambos comportamientos están asociados al proceso de degradación de los hidrocarburos de fracción media<sup>95</sup>. En la degradación aeróbica de los hidrocarburos se producen compuestos oxidados como alcoholes y aldehídos. El rebote que ocurre en los días del 25 al 30 puede estar relacionado con la transformación de los ácidos grasos a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sup>96</sup>.

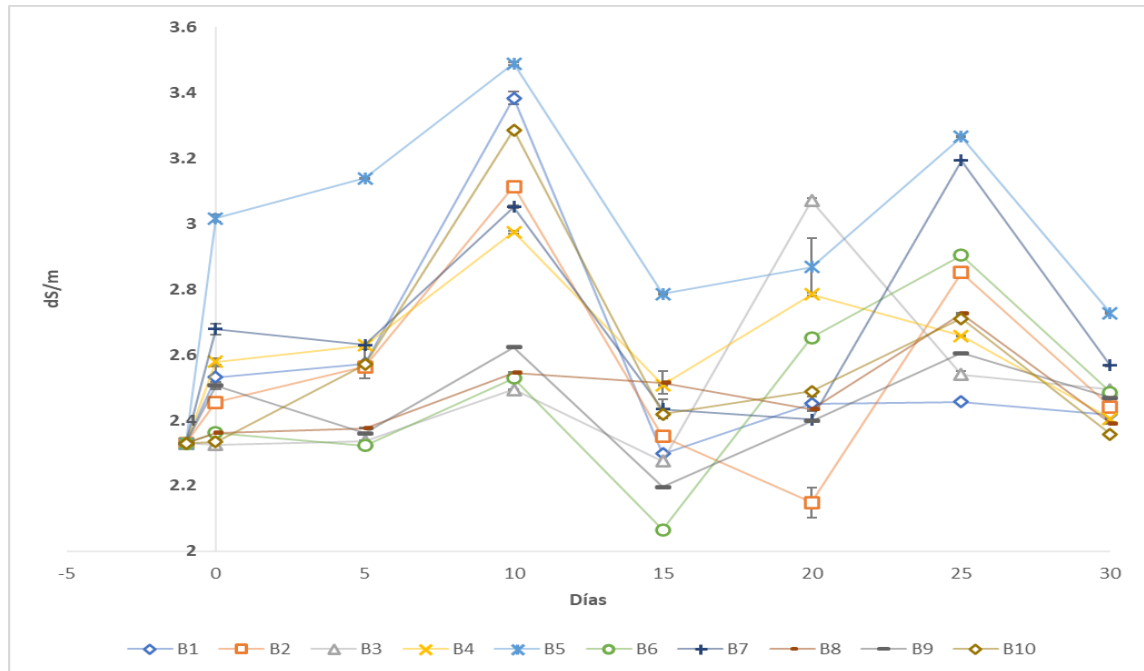


**Figura 11.** pH del suelo de las biopilas. Realizado con el equipo Waterproof Tester Combo pH & CE (Hanna Instruments, Italia). El registro en el punto -1 (eje x) corresponde a la determinación previa al montaje del experimento.

Basándonos en esta información, las biopilas; B3 (●0.1% S y E+09); B7 (●1% C y E+09); B1 (●ANA) y B5 (●0.5% C, 0.05% S y E+09) mostraron niveles bajos de pH, lo cual es favorable, puede indicar que, en estas biopilas se llevó a cabo una mayor degradación del contaminante a diferencia de las biopilas restantes. La B10 (●AN) fue la que menos variaciones de pH tuvo desde el día 0 al día 30, por lo cual, siguiendo el mismo criterio del pH alto, el caso contrario se puede suponer que fue la que menor degradación tuvo y esto se podría sustentar con el hecho de ser la biopila testigo (atenuación natural). Una posible explicación al aumento del pH en el día 15 de las biopilas B8 (●1% C y 0.05% S) y B9 (●1% C, 0.1% S y E+06) se puede deber a que ambas tienen la concentración más alta de cosustrato (1%) que adicionado con surfactante pueden elevar el pH ya que, dicho cosustrato; un residuo vegetal, al descomponerse se transforma en humus, este humus puede aumentar el pH<sup>97</sup> debido a que produce  $\text{NH}_4^+$  que se desprotona a  $\text{NH}_3^-$  producto de la nitrificación, los iones  $\text{H}^+$  liberados ocasionan el descenso del pH<sup>39,98</sup>. Dichos resultados de pH se mantuvieron dentro del rango que favorece la degradación del contaminante<sup>15,37</sup>.

#### 4.4.2.2 Determinación de la conductividad eléctrica del suelo

La **figura 12** muestra los niveles de conductividad eléctrica que se interpretan como la salinidad presente en el suelo.



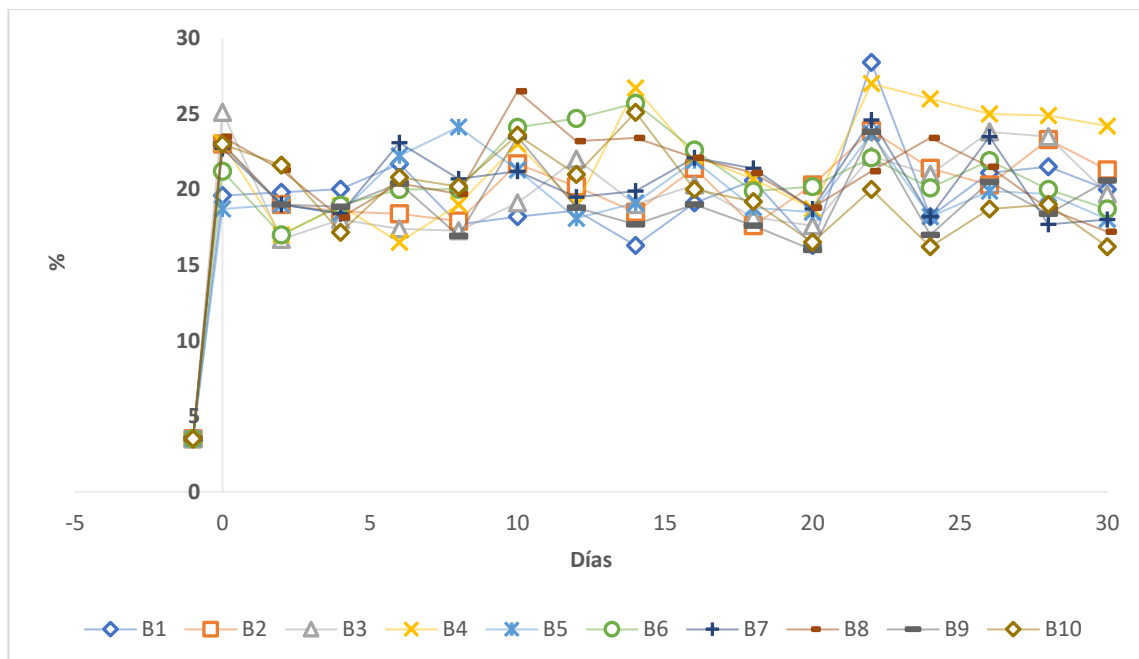
**Figura 12.** Conductividad eléctrica en el suelo de las biopilas. Realizado con el equipo Waterproof Tester Combo pH & CE (Hanna Instruments, Italia). El registro en el punto -1 (eje x) corresponde a la determinación previa al montaje del experimento.

El aumento en los niveles indica una producción de compuestos de degradación de hidrocarburos que, al ser desechados por las bacterias, salinizan el microambiente donde se encuentran.

En el gráfico se aprecia el nivel inicial antes del montaje de las biopilas hasta el día 30. La B5 (●0.5% C, 0.05% S y E+09) muestra los niveles más altos de salinidad seguido de la B7 (●1% C y E+09) y B4 (●0.5% C y E+06). Se puede notar que las biopilas que tienen niveles más elevados de CE son las que están bioaumentadas. Dicha salinidad se le puede atribuir a la biodegradación del contaminante y no solo por la salinidad del medio adicionado, debido a que, la B10 (●AN) y B1 (●ANA) también tuvieron mayores niveles de CE solo por debajo de las tres antes mencionadas, estas no fueron bioaumentadas por lo cual atribuirle la salinidad del suelo por la adición del medio de cultivo se descarta y se reconsidera el hecho de que haya sido por la biodegradación de los HFM.

#### 4.4.3 Determinación de la humedad

La humedad se mantuvo dentro del rango establecido (de 15 a 30%) como se muestra en la **figura 13**.

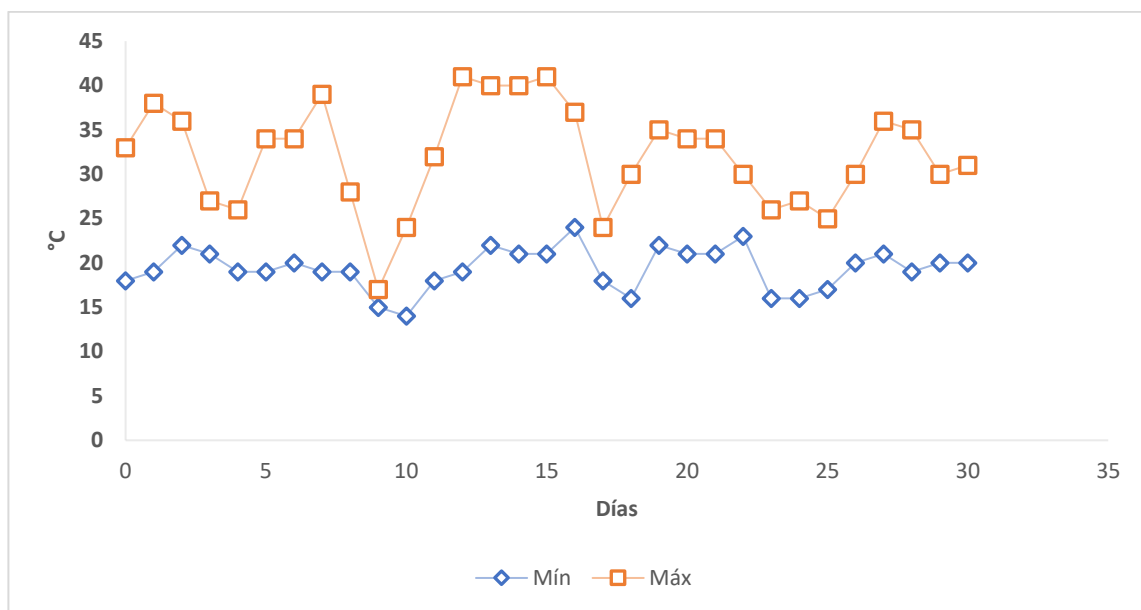


**Figura 13.** Humedad en las biopilas. Realizadas con el medidor de manual MO750 (Extech Instrumentes, USA). El registro en el punto -1 (eje x) corresponde a la determinación previa al montaje del experimento.

La humedad se procuró mantener cerca de la línea media (22.5%). Si los días eran calurosos la exigencia de agua requerida por las biopilas iba de 2 a 3 días, si las temperaturas eran bajas, el requerimiento variaba de 4 a 5 días. Un volumen de 100 mL fue el necesario para mantener el objetivo de humedad establecido. La temporada de experimentación contó con varios días de chubascos por lo cual se estuvo en constante monitoreo para evitar humedades excesivas indeseables<sup>37</sup>. La biopila que mejor mantuvo la humedad y un bajo nivel de pH fue la biopila B7 (●1% C y E+09). A lo que se le puede atribuir la concentración de cosustrato y la del consorcio bacteriano, la humedad se mantenía constante por el cosustrato, mientras el consorcio aprovechaba los nutrientes del cosustrato para degradar los contaminantes ocasionando la disminución del pH.

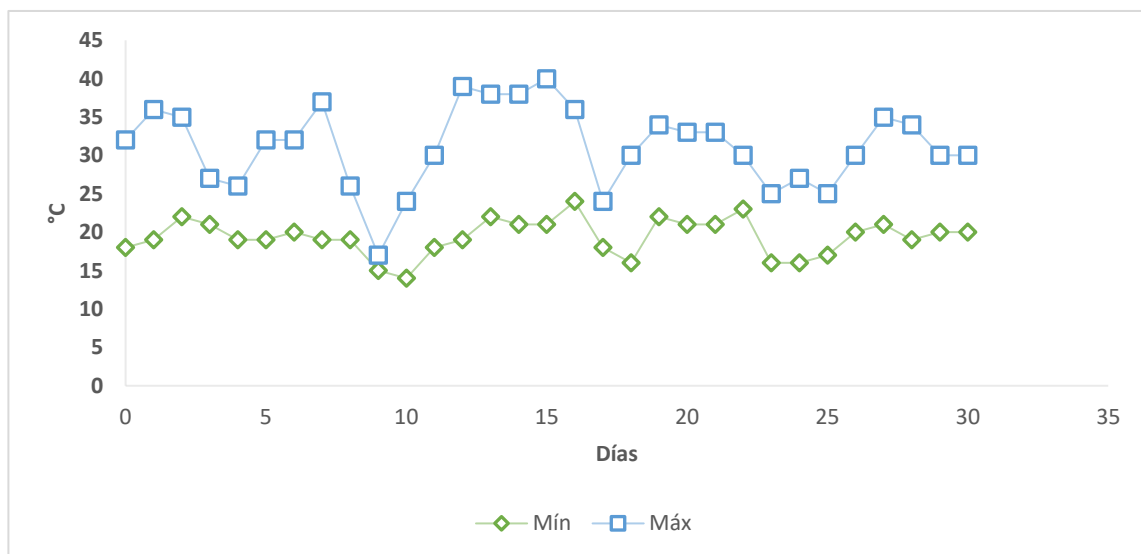
#### 4.4.4 Monitoreo de la temperatura

La temperatura del suelo debajo de la membrana se muestra en la **figura 14**.



**Figura 14.** Temperatura del suelo de las biopilas. Basada en las lecturas proporcionadas por el termómetro de mercurio.

La temperatura ambiental a la que estaban expuestas las biopilas fue monitorizada diariamente (**figura 15**).



**Figura 15.** Temperatura ambiental de las biopilas. Basada en la información proporcionada por AccuWeather.com

La temperatura mínima monitoreada en el suelo fue de 14°C y la máxima de 41°C, estando dentro del rango ideal para llevar a cabo el proceso de la

bioremediación del suelo<sup>17</sup>. En la temporada de experimentación (12 de Marzo al 12 de Abril del 2020) hubo una gran variación de temperaturas como se aprecia en la **figura 15**. Se presentaron días muy calurosos y también días fríos, estos cambios pudieron ocasionar un efecto negativo en la adaptación consorcio, por ende, afectando la tasa de degradación del contaminante.

Las temperaturas más altas incrementan la actividad metabólica de sus procesos bioquímicos favoreciendo la tasa de degradación del contaminante<sup>99</sup>. El pH y las temperaturas máximas correlacionan dentro de los primeros quince días, donde se presentan los niveles de pH más bajos a temperaturas más altas, lo que podría indicar que dicha disminución del pH fue favorecida por las altas temperaturas. En varios trabajos se han encontrado dicha correlación positiva entre la temperatura y la tasa de mineralización, donde se demostró que las tasas de degradación más rápidas ocurrían a temperaturas más altas debido a que la mayoría de los microorganismos hidrocarbonoclastas son mesofílicos, más activos a temperaturas máximas de 35 a 45°C<sup>49</sup>.

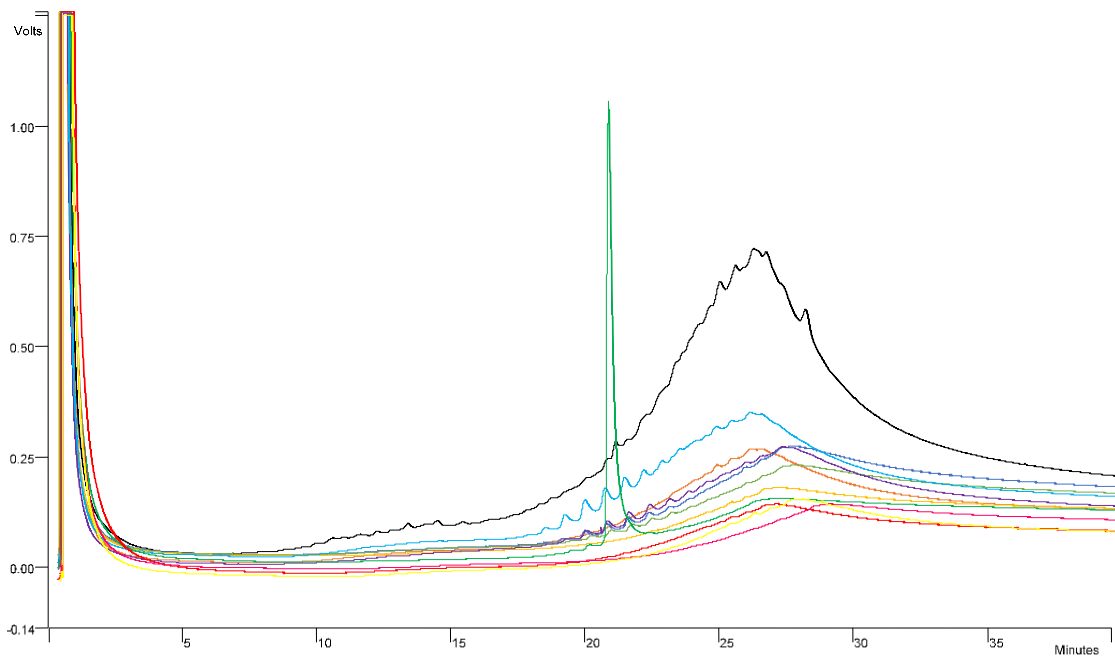
#### **4.4.5 Evaluación de los hidrocarburos extraídos de las biopilas**

La evaluación de la presencia de hidrocarburos en biopilas se realizó por cromatografía de gases en el departamento de Servicios Profesionales ubicado en la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

Debido a inconvenientes técnicos y logísticos derivados del repentino cierre de labores académicas por la declaración de pandemia debido al virus SARS-Cov-2, se decidió realizar mediciones representativas en las biopilas.

Por lo cual, se realizó un análisis comparativo para observar el porcentaje de disminución en la intensidad del pico de interés ante las distintas condiciones de la biopila.

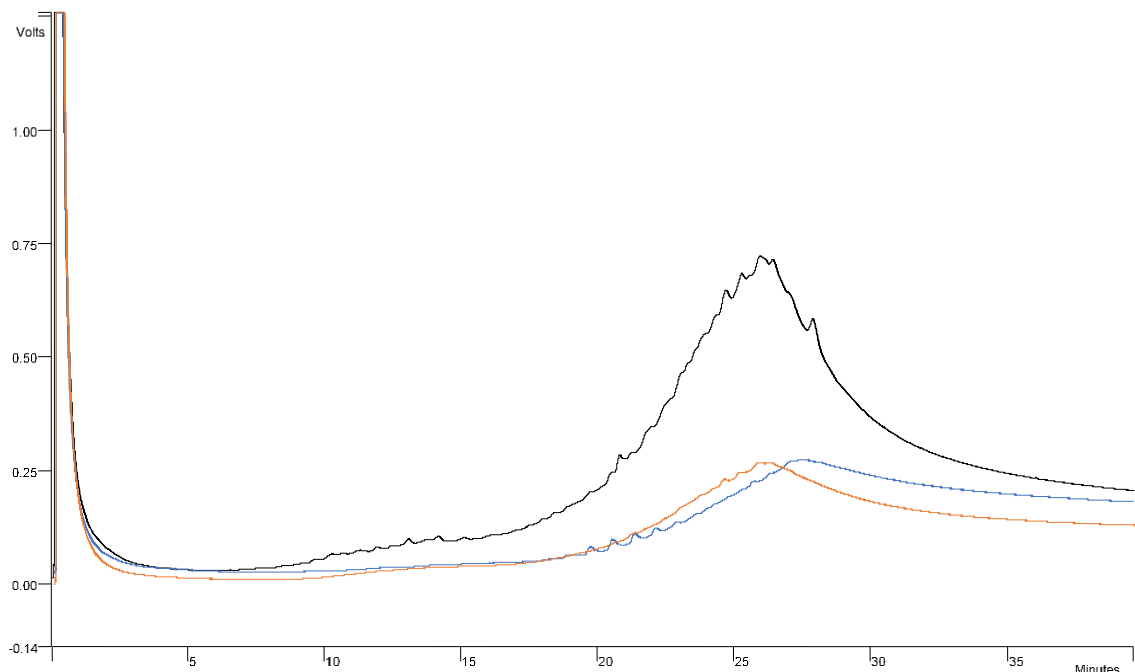
En la **figura 16** se pueden apreciar los cromatogramas de la medición de hidrocarburos de la fracción media (C8-C40), muestreado en las biopilas a los 0, 30 y 60 días. En el cromatograma del suelo inicial (día 0) se pueden observar picos de interés a un tiempo de retención de 26 min. Para realizar una comparación en el efecto que tuvieron las distintas biopilas en la disminución del hidrocarburo, se tomó como referencia el pico más predominante cuyo valor de intensidad fue de 0.73V.



**Figura 16.** Cromatogramas de la determinación de la fracción media de los hidrocarburos en las biopilas, muestreadas a 30 y 60 días. ● Día 0: Suelo a remediar. Día 30: ● Biopila 1 ● Biopila 2 ● Biopila 4 ● Biopila 5 ● Biopila 8. Día 60: ● Biopila 1 ● Biopila 3 ● Biopila 4 ● Biopila 8 ● Biopila 9.

En la **figura 16A** se muestra el comportamiento de la biopila 1 (composición ANA, ver Tabla 15), que presentó un porcentaje de disminución del 64% al día 30, siendo insignificante la disminución que sucedió en los 30 días posteriores (3% de disminución). Cabe mencionar que esta biopila no fue adicionada con ningún consorcio.

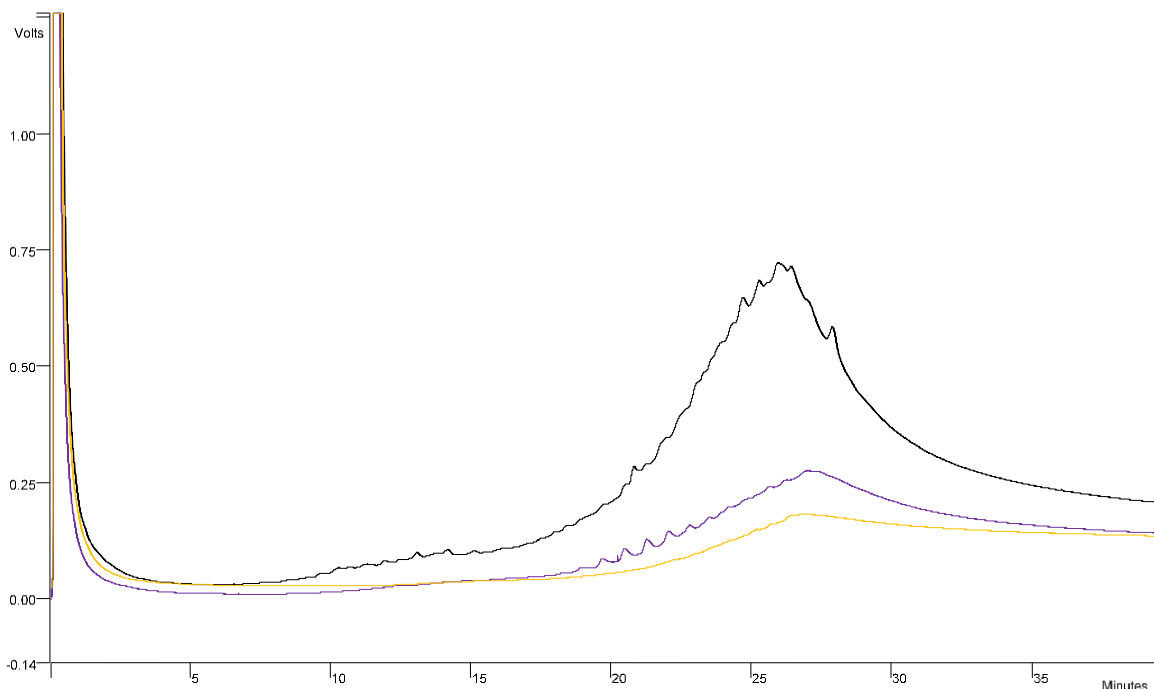




**Figura 16A.** Cromatogramas correspondiente al análisis de la fracción media de los hidrocarburos de la biopila 1. ● Día 0 ● Día 30 ● Día 60.

Mientras tanto, en la **figura 16B** se muestra el comportamiento de la biopila 4 (0.5% C y E+06) la cual al día 30 presentó una disminución del 63%, mientras que en los 30 días posteriores alcanzó un 78%. A pesar de que, a los 30 días no existe una diferencia significativa en el porcentaje de disminución entre las biopilas 1 (B1) y 4 (B4), se observa que en los 30 días posteriores la biopila 4 alcanza un 15% más en comparación con el 3% de la biopila sin consorcio (biopila 1). Por lo cual, se infiere que la adición del consorcio tiene un efecto positivo en la eliminación del hidrocarburo, esto posiblemente se debió a la resistencia del consorcio a causa de su adaptación previa en el reactor, la cual le permitió resistir los metabolitos producidos en el suelo para poder seguir eliminando el contaminante. A este consorcio se le atribuye la capacidad inherente de resistencia y adaptabilidad a altos niveles de contaminación<sup>66</sup> a diferencia de las bacterias nativas en la B1, que al no estar previamente adaptadas no resistieron más de un mes. La disminución en la tasa de remoción del hidrocarburo en la biopila 4 al día 60 pudiera estar relacionada con una inhibición de la actividad microbiana por las sustancias presentes en el suelo, la cual de acuerdo con Leahy & Colwell, está relacionada a la disminución en la capacidad degradadora

del consorcio<sup>100</sup>. Además en relación con el pH, la B4 no mostró una disminución significativa (**tabla 16**) sirviendo como indicativo de que la capacidad degradadora se vio disminuida.



**Figura 16B.** Cromatogramas correspondiente al análisis de la fracción media de los hidrocarburos de la biopila 4. ● Día 0 ● Día 30 ● Día 60.

**Tabla 15**

*Composición de las biopilas y su porcentaje de disminución de la fracción media basados en la disminución de la altura de los picos predominantes a los 30 y 60 días de muestreo.*

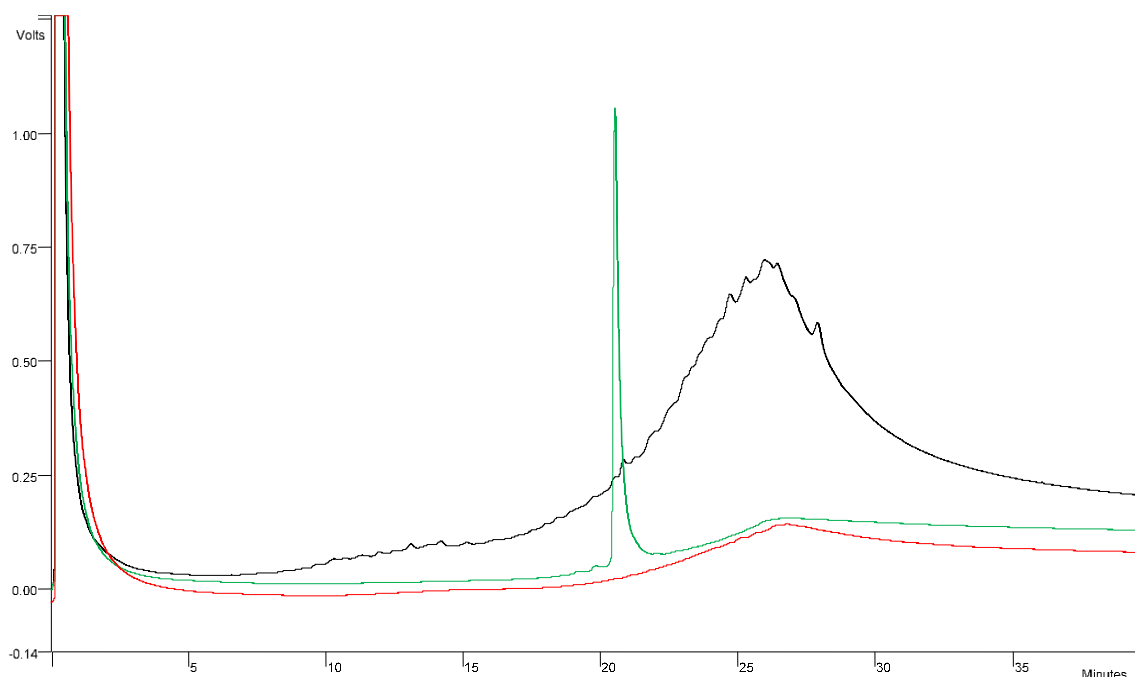
Biopila	Composición	Porcentaje de disminución al día 30	Porcentaje de disminución al día 60
1	ANA	64%	67%
2	0.05% S y E+06	68%	ND
3	0.1% S y E+09	ND	81%
4	0.5% C y E+06	63%	78%
5	0.5% C, 0.05% S y E+09	62%	ND
6	0.5% C y 0.1% S	ND	ND
7	1% C y E+09	ND	ND
8	1% C y 0.05% S	79%	78%
9	1% C, 0.1% S y E+06	ND	75%
10	AN	ND	ND

C: cosustrato. S: surfactante. ANA: atenuación natural asistida. AN: atenuación natural. ND: no determinado.

El cromatograma de la biopila 8 en el día 30 (**figura 16C**), se muestra un pico a un tiempo de retención de 21 minutos y una altura cerca de 0.92 V. Este pico es del Pentacosano (C25) según el estándar reportado. Este cromatograma nos sirve como referencia del posicionamiento en los tiempos de retención de las fracciones arriba de C25, lo que nos indica que los picos que se observan en el cromatograma de la muestra inicial se tratan de hidrocarburos de la fracción media-pesada (>C25-C40) tales como los HAP.

Por otro lado, se observa que la biopila 8 (**figura 16C**) presenta un 79% de disminución a los 30 días, el cual no cambió al siguiente mes. Cabe mencionar que esta biopila no posee ningún consorcio. Sin embargo, tuvo un porcentaje de eliminación muy cercano al de la B4, el cual sí tenía *Pseudomonas*. Por lo cual la composición de 1% C y 0.05% S pudo haber jugado un papel importante en esta biopila. La adición agentes de carga compuestos por fibra vegetal son más efectivos cuando se agregan a concentraciones menores del 5%, esto en conjunto con la aireación, participan en el aumento de la actividad microbiana presente en el suelo<sup>18,94</sup>.

Asociando los valores de pH con los niveles de disminución del hidrocarburo, se puede observar que los valores casi neutros de suelo favorecieron la eliminación del contaminante<sup>63</sup> ya que, al inicio del experimento se presentó un valor de pH de 7.8 (**figura 11**). El consorcio conformado por el género de las *Pseudomonas* es bien conocido por su afinidad indiscriminada a distintas clases de sustratos entre ellos los HAP, por eso hay concordancia en que dicho consorcio haya sido capaz de mostrar una buena reducción en hidrocarburos entre C-30 - C40<sup>43</sup>. Esto podría deberse al hecho de que los consorcios microbianos de este género pueden biodegradar los componentes con alto contenido de hidrocarburos sin selectividad<sup>101</sup>. Lo anterior nos indica que el sistema de biopilas B4 tiene el potencial de favorecer la eliminación hidrocarburos derivados del petróleo de peso molecular cercano a los 40 carbonos.



**Figura 16C.** Cromatogramas correspondiente al análisis de la fracción media de los hidrocarburos de la biopila 8. ● Día 0 ● Día 30 ● Día 60.

En el caso de la biopila 2 (**ver figura 16**), esta tuvo 68% de disminución en comparación del día 0, mientras que la biopila 5 fue de 62%; ambas medidas a los 30 días. Las muestras de la biopila 2 y 5 del día 60 no pudieron ser analizadas. Por otro lado, la biopila 3 mostró el mejor porcentaje de disminución (81%) a los 60 días. Mostró un incremento en la conductividad eléctrica y una disminución en el pH en el transcurso del experimento. En particular esta biopila tenía una composición 0.1% S y E+09, y su buen desempeño se debe a la adición del consorcio a E+09 de concentración, por lo que hizo que el tratamiento tuviera mejores resultados en comparación con los que no cuentan con consorcio añadido, ya que, estos consorcios que han sido previamente enriquecidos en un medio salino presentan alto potencial en la degradación de los derivados de fracción pesada de los hidrocarburos<sup>87</sup>.

**Tabla 16***Tabla compilatoria de las características fisicoquímicas al inicio y al final del experimento.*

Biopilas	Composición	Conductividad eléctrica		pH		Humedad		Remoción de hidrocarburos	
		dS/m				%		%	
		Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Día 30	Día 60
1	ANA	2.53	2.42	7.61	7.50	19.6	20	64%	67%
2	0.05% S y E+06	2.45	2.44	7.66	7.64	23	21.3	68%	ND
<b>3</b>	<b>0.1% S y E+09</b>	<b>2.33</b>	<b>2.49</b>	<b>7.64</b>	<b>7.58</b>	<b>25.1</b>	<b>19.7</b>	<b>ND</b>	<b>81%</b>
<b>4</b>	<b>0.5% C y E+06</b>	<b>2.58</b>	<b>2.40</b>	<b>7.68</b>	<b>7.65</b>	<b>23.1</b>	<b>24.2</b>	<b>63%</b>	<b>78%</b>
5	0.5% C, 0.05% S y E+09	3.02	2.73	7.55	7.69	18.7	18	62%	ND
6	0.5% C y 0.1% S	2.36	2.49	7.67	7.65	21.2	18.7	ND	ND
7	1% C y E+09	2.68	2.57	7.50	7.61	22.7	18	ND	ND
8	1% C y 0.05% S	2.36	2.39	7.54	7.70	23.5	17.2	79%	78%
9	1% C, 0.1% S y E+06	2.51	2.47	7.57	7.68	23	20.6	ND	75%
10	AN	2.33	2.36	7.78	7.69	23	16.2	ND	ND

Inicial: día 0. Final: día 30. Un ascenso en la conductividad eléctrica, un descenso en el pH y una humedad cercana al 25% son características favorables para obtener una buena degradación del contaminante. La biopila que mejor encaja en estas características es la biopila 3<sup>1</sup>. La biopila 4 no sigue el esquema planteado sobre el aumento en la CE e igualmente muestra buenos resultados de degradación (basándonos en los cromatogramas).

<sup>1</sup> Nota: faltaron realizar pruebas microbiológicas y fisicoquímicas del suelo para la evaluación de las biopilas. Así como analizar los hidrocarburos presentes y la degradación obtenida. La parte experimental del proyecto fue retrasándose por motivos ajenos a uno. Parte del trabajo que se comenzó en el semestre Ago-Dic 2018 se perdió por la mudanza al CIByN y ahora la pandemia también fue motivo de atraso en los últimos meses.

Con base a una determinación previa de HFM en el suelo contaminado<sup>2</sup>, se pudo estimar la concentración final teórica de HFM en el suelo de las biopilas a los 30 y 60 días.

**Tabla 17**

*Concentración final teórica calculada para las biopilas analizadas.*

Concentración inicial teórica, C <sub>Ti</sub> (ppm)	Biopilas (60 días)	Remoción teórica, R <sub>T</sub> (%)	Remoción teórica, R <sub>T</sub> (ppm)	Concentración final teórica, C <sub>Tf</sub> (ppm)	Límite máximo permisible** (ppm)
3 159	1*	64	2 022	1 137	1 200
	1	67	2 117	1 042	
	2	68	2 149	1 010	
	3	81	2 559	600	
	4	78	2 464	695	
	5*	62	1 959	1 200	
	8	78	2 464	695	
	9	79	2 496	663	

\*Biopilas al día 30. \*\*Según lo establecido en la norma NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.

<sup>2</sup> Concentración de HFM obtenida del análisis anexo al final de este trabajo.

## CONCLUSIONES

El consorcio presentó una buena adaptación en el medio de crecimiento salino, suplementado con diésel como fuente de carbono. El día óptimo para realizar el escalamiento del consorcio para ser empleado en los procesos de biorremediación es el sexto día (inicio de la fase estacionaria). Este consorcio fue capaz de producir surfactantes según lo indica el índice de emulsión y su desplazamiento de aceite.

Ninguna secuencia obtenida en este experimento coincide con una identidad del 100% respecto a las secuencias proporcionadas en la base de datos, por lo cual no se concluye que se trate de una sola especie. Se reporta que el consorcio está compuesto por siguientes especies de *Pseudomonas*: *citronellolis* (NBRC 103043); *panipatensis* (Esp-1); *multiresinivorans* (ATCC 700690); *knackmussii* (B13); *nitritireducens* (WZBFD3-5A2); *delhiensis* (RLD-1). Las bacterias identificadas en este trabajo han sido reportadas en la literatura como especies que desempeñan papeles importantes en los procesos de degradación de los HTP.

Después de analizar la información obtenida se puede interpretar que el suelo tiene una calidad media baja para llevar a cabo una buena degradación del contaminante ya que, para el diseño de biopilas se deben cumplir ciertos criterios físicos, químicos y biológicos. Entre los aspectos que cumplen se encuentra: el pH neutro (7.03), un suelo no salino, (2.0 dS/m) y como criterio biológico una concentración mayor a  $1 \times 10^3$  UFC/g, cumpliendo con este aspecto ( $2.4 \times 10^4$  UFC/g). Entre los criterios que no cumplen se encuentran: la baja capacidad de retención de agua (capacidad de campo del 14%), materia orgánica (1.13%) y humedad (3.57%). Por lo cual se decidió adicionar el cosustrato como aditivo para mejorar las características del suelo.

Según lo observado en los cromatogramas de las biopilas 3 y 4, los tratamientos necesitan de un consorcio añadido para obtener una mayor degradación del contaminante. Los porcentajes de degradación obtenidos muestran que el

tratamiento B3 (81%) fue el proceso más eficiente seguido del tratamiento B4 (78%) y B8 (78%). En las biopilas con cosustrato añadido se muestra una mayor degradación del contaminante como lo son las B4 y B8. Como perspectiva se plantea que en trabajos futuros se realice un estudio que permita confirmar si el proceso de remoción del hidrocarburo es debido a la mineralización, lo anterior a través de la cuantificación de CO<sub>2</sub> mediante pruebas de respirometría.

Mediante un análisis previo anexo en este trabajo, fue posible calcular la concentración final teórica en las biopilas analizadas. Al primer mes de experimentación, la biopila 5 (0.5% C, 0.05% S y E+09) mostró una remoción teórica de 1 200 ppm de HFM, encontrándose dentro del límite establecido por la normativa vigente. Por lo tanto, la hipótesis planteada en el proyecto la cual establece que un sistema de biopilas bioaumentadas con un consocio hidrocarbonoclasta, un cosustrato y un surfactante como agentes bioestimulantes será capaz de reducir la concentración de HFM en 30 días al límite máximo permisible para zonas industrial-habitable según la norma NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, se cumple.



## **Disposición de los residuos generados**

Los residuos generados durante el desarrollo experimental fueron dispuestos de acuerdo con el procedimiento establecido para la clasificación de residuos peligrosos de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL, por medio de los contenedores proporcionados por el departamento de Medio Ambiente y Seguridad. Mismo que se aseguró de llevar a cabo las labores pertinentes al almacenaje previo a la disposición final de residuos.

Para la disposición de medios de cultivo, caldos y placas Petri con microorganismos, se realizó la esterilización correspondiente en autoclave y se dispuso en la bolsa de residuos peligrosos biológico-infecciosos de desechos biológicos.

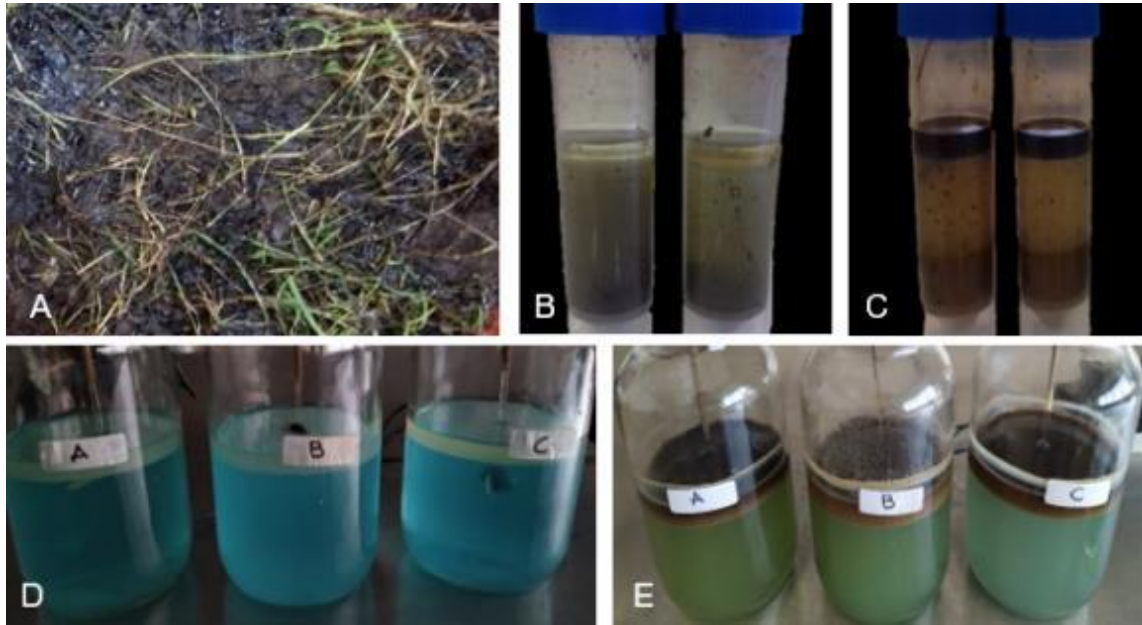
Colorantes y Lugol; se dispusieron en los contenedores correspondientes a ellos.

Hidrocarburos derivados del petróleo; dispuestos en el contenedor E orgánico.

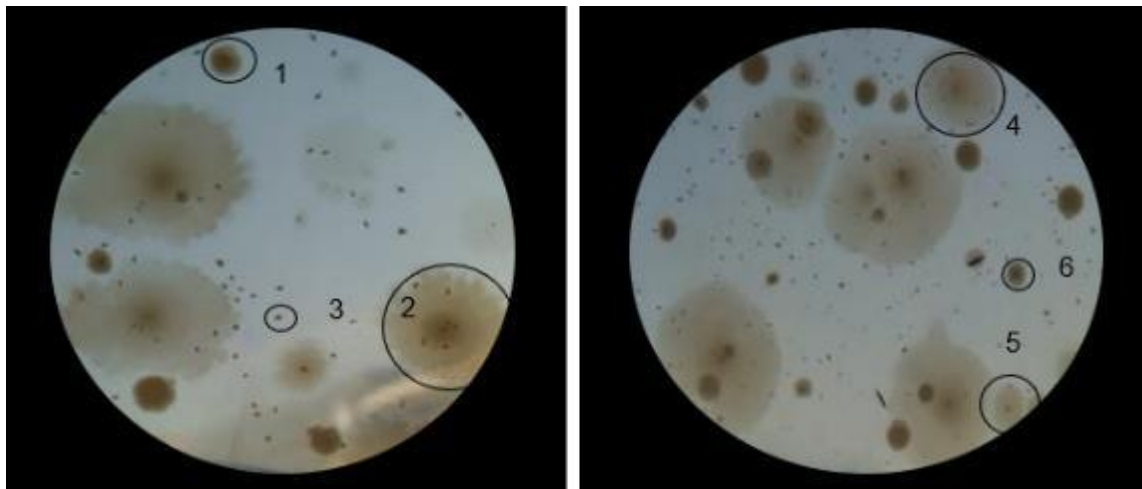
Los residuos generados de uso diario como guantes, gasas, sanitas etc. fueron dispuestos en la cubeta verde de basura industrial.

## ANEXO

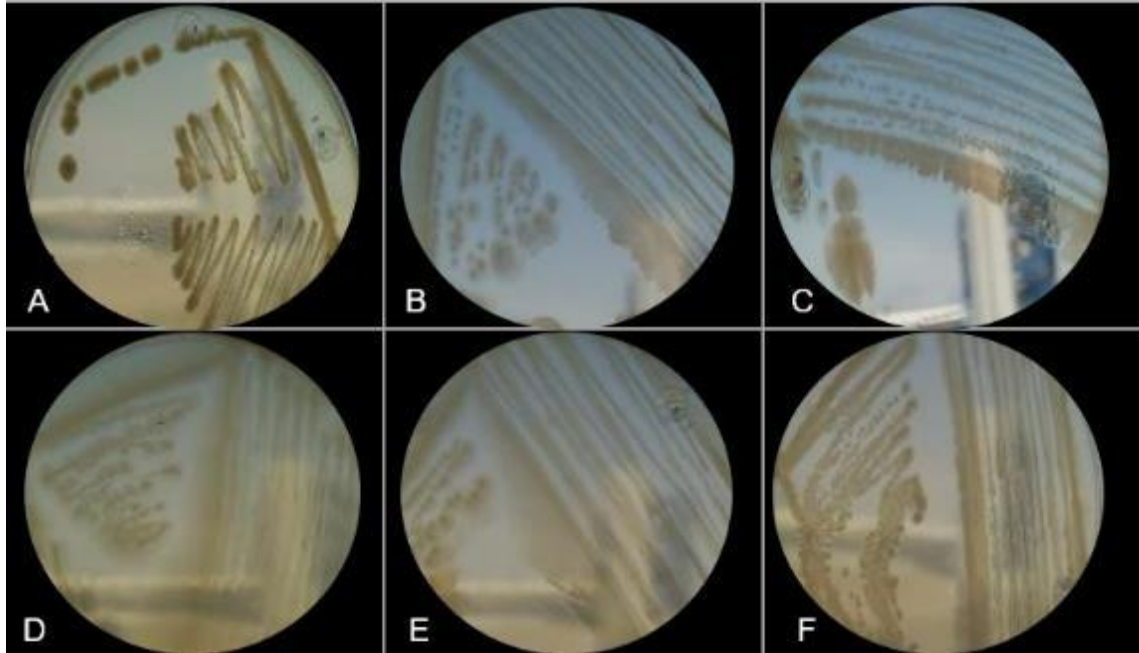
Preparación del consorcio procedente de un suelo contaminado y las características del medio de acondicionamiento.



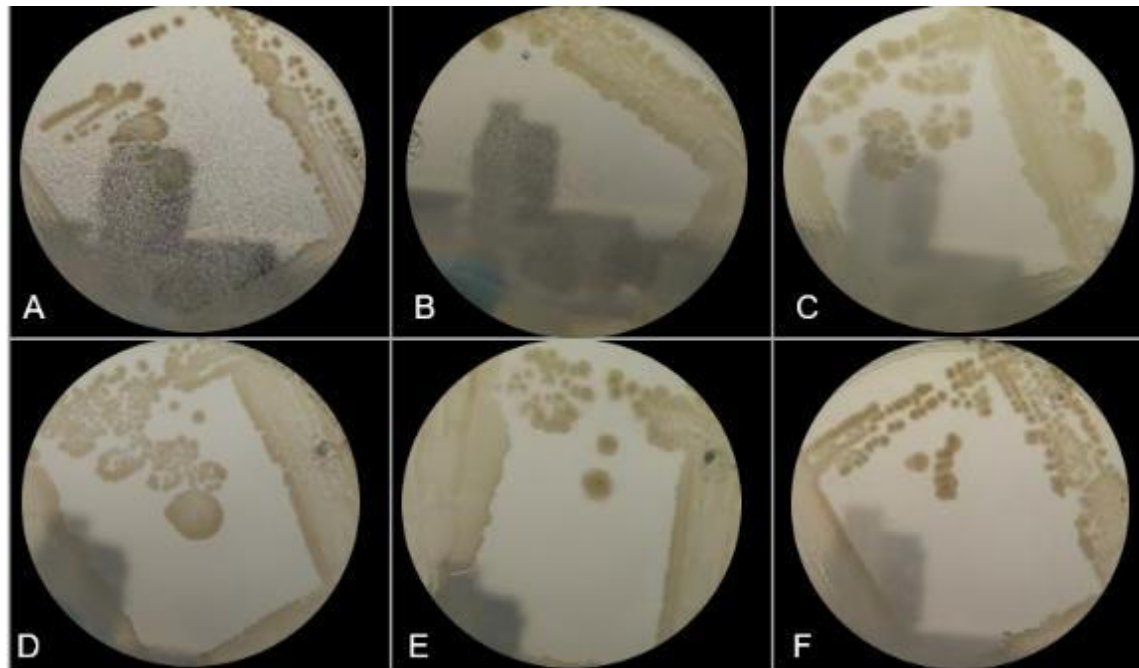
**Figura 17.** Etapas del acondicionamiento del consorcio. A: suelo procedente de la chapopotera ubicada en el estado de Veracruz, México. B: pre-acondicionamiento del consorcio con diésel al 10% con la solución comercial de nutrientes y el suelo de la chapopotera. C: tubos después de la incubación y agitación. D: reactores con la solución de nutrientes y diésel listos para ser inoculados (con su respectivo control sin inóculo). E: Reactores tres días después de ser inoculados con el medio de los tubos del preacondicionamiento.



**Figura 18.** Características fenotípicas de las colonias bacterianas aisladas.



**Figura 19.** Aislamiento de colonias en agar nutritivo por estría en tres campos. A: colonia 1. B: colonia 2. C: colonia 3. D: colonia 4. E: colonia 5. F: colonia 6.

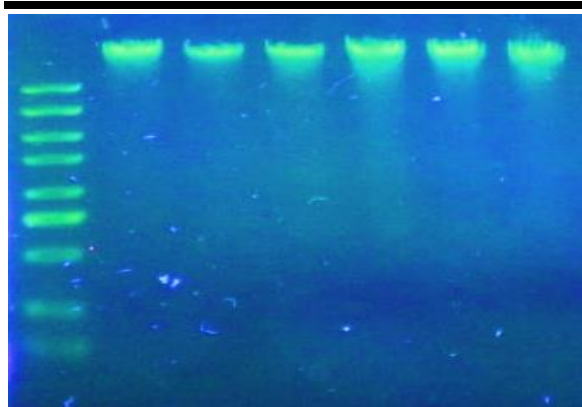


**Figura 20.** Aislamiento de colonias en agar nutritivo por agotamiento de estría en cuatro campos. A: colonia 1. B: colonia 2. C: colonia 3. D: colonia 4. E: colonia 5. F: colonia 6.

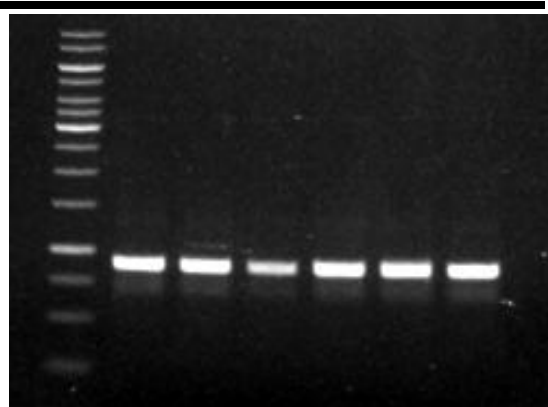
Análisis del ADN genómico.

**Tabla 18.** Concentración de ADN genómico y relación A260/280.

Muestra	Concentración [ng/μL]	Relación A260/280
1	62.2	2.0
2	38.3	2.0
3	30.9	2.0
4	93.9	1.9
5	68.6	2.0
6	43.2	2.1



**Figura 21.** Extracción del ADN genómico de las colonias aisladas. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: colonia 1. Carril 3: colonia 2. Carril 4: colonia 3. Carril 5: colonia 4. Carril 6: colonia 5. Carril 7: colonia 6.



**Figura 22.** Amplicones del gen 16S. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: amplicón de la colonia 1. Carril 3: amplicón de la colonia 2. Carril 4: amplicón de la colonia 3. Carril 5: amplicón de la colonia 4. Carril 6: amplicón de la colonia 5. Carril 7: amplicón de la colonia 6. Tamaño aproximado del amplicón 858 pb.

**Tabla 19.** Análisis de la concentración de los amplicones.

Muestra	Concentración [ng/μL]	Relación A260/280
1	53.0	2.0
2	40.6	2.0
3	22.3	2.0
4	33.7	1.9
5	38.3	2.0
6	38.4	2.1

## Secuencias.

Secuencias obtenidas del análisis de 16S rADN. Los nucleótidos en gris son aquellos que no mostraron picos definidos una vez analizadas las secuencias en el programa ApE (A plasmid editor. Wayne Davis, 2016).

### I. 1-Forward\_A01\_16dic19\_sec\_2019-12-16-09-43-43

GATTAGGGTTATCGGGGAATACTGGGCGTAAGCGCGCTAGGTGGTTTGGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGG  
CTCAACCTGGGAAGTGCATCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGG  
TGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGC  
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCCGTTGGG  
ATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAC  
CAAATGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACC  
TGGCCTTGACATGTCCGGAATCCTGCAGAGATGCGGGGAGTGCCTTCGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATG  
GCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAG  
CACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGACGTGGGGATGACGTCAAGTCATC  
ATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAGCCGCGAGGTGGAGCT  
AATCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCCGTGAAGTCGAATCCGCTAGTAATC  
GTGAATCAAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACCCCGCCCCGTCCAGGA

### II. 1-Reverse\_B01\_16dic19\_sec\_2019-12-16-09-43-43

GGAATAGGTGAATTTCTGATTCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTCAGACTGCGATCCGGA  
CTACGATCGGTTTTCTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGT  
GTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCC  
TTAGAGTGCCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCAACATCT  
CACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCCGATTCCCGAAGGCACTCCCGCATCTCTGCAGG  
ATTCCGGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAAACCACATGCTCCACCCTTGTGCG  
GGCCCCGTCATTCATTTGAGTTTTAACCTTGGCGCGTACTCCCCAGGCGGTGCACTTATCGCGTTAGCTGC  
GCCACTAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT  
GTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCC  
TATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGTCAGGCAGTTATGGATG  
CAGTTCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCATCTTACCAAACACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATT  
CCGATTAACGCTTGCACCCTTCGATTACCAGCGCCCGCGCGTGGGCAACAAAA

### III. 2-Forward\_C01\_16dic19\_sec\_2019-12-16-09-43-43

AGTACGGCTATCGGGATACTGGGCGTAAGCGCGCTAGGTGGTTTGGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCT  
CAACCTGGGAAGTGCATCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTG  
AAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAA  
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCC  
TTGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAA  
TGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGG  
CCTTGACATGTCCGGAATCCTGCAGAGATGCGGGGAGTGCCTTCGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTG  
TCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACG  
TTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGG  
CCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAA  
TCCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCCGTGAAGTCGAATCGCTAGTAATCGT  
GAATCAGAAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAACCCCGCCCCCGTCCAAAA

### IV. 2-Reverse\_D01\_16dic19\_sec\_2019-12-16-09-43-43

CGAATCGCGAATTCTGATTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGA  
CTACGATCGGTTTTCTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCAGGTGT  
GTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCC  
TTAGAGTGCCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCT  
CACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCCGATTCCCGAAGGCACTCCCGCATCTCTGCAGG  
ATTCCGGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCCAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCG  
GGCCCCGTC AATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCGTACTCCCAGGCGGTGCACTTATCGCGTTAGCTGC  
GCCACTAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT  
GTTTGTCTCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTTCGCTTCCGCACTGGTGTTCCTTCC  
TATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGTCAGGCAGTTATGGATG  
CAGTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCATCTTACCAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATT  
CCGATTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACCGCGCGCGGGCTGGGCAACAAAAA

**V. 3-Forward\_E01\_16dic19\_sec\_2019-12-16-09-43-43**

GATGCGCTATCGGATACTGGGCGTAAGCGCGCTAGGTGGTTTGGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCA  
ACCTGGGAAGTGCATCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAA  
ATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAA  
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCT  
TGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTGCACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAT  
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGC  
CTTGACATGTCCGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGT  
CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGT  
TATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGC  
CCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAAT  
CCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTG  
AATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAACCCGCGCCCGTTCAAAAACG

**VI. 3-Reverse\_F01\_16dic19\_sec\_2019-12-16-09-43-43**

TGCATCGTCCGAGGATCGTCTTCTGATTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGC  
GATCCGGACTACGATCGGTTTTCTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTA  
GCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGG  
CAGTCTCCTTAGAGTGCCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACC  
CAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCCGATTCCCGAAGGCACTCCCGCATCT  
CTGCAGGATTCCGGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCCAATTAACCACATGCTCCACCG  
CTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCGTACTCCCAGGCGGTGCACTTATCGGG  
TTAGTGTGCGCCACTAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTAT  
CTAATCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTTCGCTTCCGCACTGGT  
TTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTCTACCGTACTCTAGTCAGGCAGTT  
ATGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCATCTTACCAAACCACCTACGCGCGCTTTACGCC  
CAGTAATTCGATTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACCGCGCCGGGTCTGGGCAAAAAA

**VII. 4-Forward\_G01\_16dic19\_sec\_2019-12-16-09-43-43**

GATCGCTATCGGATACTGGGCGTAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAAC  
CTGGGAAGTGCATCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAAT  
GCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGC  
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTG  
AGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTGCACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAATGA  
ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTT  
GACATGTCCGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGT  
CAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTATG  
GTGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTT

ACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCA  
GAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGAATC  
AGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACCCCCGCGCCGTCAAAAT

**VIII. 4-Reverse\_H01\_16dic19\_sec\_2019-12-16-09-43-43**

CGAATCGAGCTTCTGATTCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACT  
ACGATCGTTTTCTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGT  
AGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCAATCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTT  
AGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCA  
CGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCCGATTCCCGAAGGCACTCCCGCATCTCTGCAGGATT  
CCGGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG  
CCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTTCGCGCCGTACTCCCAGGCGGTGCACTTATCGCGTTAGCTGCGC  
CACTAAGATCTCAAGGATCCCCAACGGCTAGTCGACATCCTTTTACGGCGGGGACGAACAAGGTAGCTATCCTG  
TTTTGTTTTGCTCGCTTTTCTTCTCACCTCAGTGTCAATATCAGTGGGGGTGGGTGCGCTTCGCCACTGGTGTT  
CTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATCCACAACCCTTACCCTACTCTAGTCAGCAGTTATGG  
ATGCAGTCCCATGTTGAGCCGGGGATTTACATCCATCTTATCAAACAACACTACGCAGCGTTACGCCAGTAAT  
CGATTAACGCTTGCACACATTCGTATTACGCGCTGGGCTGGGCGCGAAAAA

**IX. 5-Forward\_A02\_16dic19\_sec\_2019-12-16-09-43-43**

AATAGGCTATCGGATACTGGGCGTAAGCGCGCTAGGTGGTTTGGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA  
CCTGGGAAGTGCATCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAA  
TGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAG  
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGACTAGCCGTTGGGATCCTT  
GAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAATG  
AATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCT  
TGACATGTCCGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTG  
TCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGTTAT  
GGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCT  
TACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCC  
AGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTGAAT  
CAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACCCCCCGCCCCGCTTCCAAAA

**X. 5-Reverse\_B02\_16dic19\_sec\_2019-12-16-09-43-43**

GGAAATCGGAGCTTCTGATTCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGG  
ACTACGATCGGTTTTCTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGT  
GTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCAATCCACCTTCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCC  
TTAGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCT  
CACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCCGATTCCCGAAGGCACTCCCGCATCTCTGCAGG  
ATTCCGGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCG  
GGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTTCGCGCCGTACTCCCAGGCGGTGCACTTATCGCGTTAGCTGC  
GCCACTAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT  
GTTTGCTCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCC  
TATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTTACCCTACTCTAGTCAGGCAGTTATGGATG  
CAGTTCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCATCTTACCAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAAT  
CCGATTAACGCTTGCACCCTTCGTATTACGCGCGGGCGGTGGGCCACAAAA

**XI. 6-Forward\_C02\_16dic19\_sec\_2019-12-16-09-43-43**

AGTTACGCTATCGGATACTGGGCGTAAGCGCGCTAGGTGGTTTGGTAAGATGGATGTGAAATCCCCGGGCTCA  
ACCTGGGAAGTGCATCCATAACTGCCTGACTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAA  
ATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAA

GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCT  
TGAGATCTTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAAACCTCAAAT  
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGC  
CTTGACATGTCCGGAATCCTGCAGAGATGCGGGAGTGCCTTCGGGAATCGGAACACAGGTGCTGCATGGCTGT  
CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACGT  
TATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGC  
CCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAAT  
CCCAGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGTG  
AATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAACCGCGCCCGGGTTCAAAA

**XII. 6-Reverse\_D02\_16dic19\_sec\_2019-12-16-09-43-43**

GGATCGCGCTTCTGATTCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACT  
ACGATCGGTTTTCTGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGT  
AGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCTCCGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCTT  
AGAGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCA  
CGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCCGATTCCCGAAGGCACTCCCGCATCTCTGCAGGATT  
CCGGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG  
CCCCCGTCAATTCATTTAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGCACTTATCGCGTTAGCTGCGC  
CACTAAGATCTCAAGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT  
TGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTAT  
ATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCACCACCCTTACCCTACTTAGTCAGGCAGTTATGGATGCAG  
TTCCAGGTTGAGCCCGGGATTTACATCCATCTTACCAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATCCG  
ATTAACGCTTGACCCTTCGTATTACCGCCGCGGCGCGGGGCCACAGTG



## INFORME DE ENSAYO

NO. DE REPORTE	
FECHA DE EMISIÓN:	
PAGINA:	1 DE 2

NOMBRE DE LA EMPRESA:	
ATENCIÓN:	

EMPRESA QUE REALIZO EL MUESTREO:	VER ANEXO PLAN DE MUESTREO, HOJAS DE CAMPO Y CADENA DE CUSTODIA
PLAN DE MUESTREO:	ALS-INDEQUIM, S.A. DE C.V.
LUGAR DE MUESTREO:	
FECHA DE MUESTREO:	
IDENTIFICACION DE LA MUESTRA:	MATERIAL DE RELLENO CONTAMINADO
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA:	SOLIDO CAFE

FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA:	
CONDICIONES DE LA MUESTRA:	ADECUADAS PARA SU ANÁLISIS

### RESULTADOS ANALITICOS

#### MEDICIONES DE LABORATORIO

PARAMETRO	VALOR OBTENIDO	D	UNIDADES	ANALISTA (INICIALES)		METODOLOGÍA UTILIZADA
HUMEDAD	3.91	1	%	MZ		Anexo AS-05 de la NOM-021-SEMARNAT-2000
HIDROCARBUROS FRACCIÓN MEDIA	3.159	1	mg/kg B. S.	TGT		NMX-AA-145-SCFI-2008

#### NOTAS:

- (\*) **LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN**: NIVEL MAS BAJO DE LA CURVA DE CALIBRACION DETERMINADO A CONDICIONES OPERATIVAS DEL LABORATORIO CON ESTÁNDARES ACUOSOS Y CONSIDERANDO EL LÍMITE DE DETECCIÓN DEL INSTRUMENTO, EL LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO Y EL TRATAMIENTO (DILUCIÓN O CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA SIN CONSIDERAR EL EFECTO DE LA MATRIZ)
- (% U) **LA INCERTIDUMBRE EXPANDIDA** ES ESTIMADA CON UN FACTOR DE COBERTURA IGUAL A 2, QUE REPRESENTA UN INTERVALO DE CONFIANZA DE APROXIMADAMENTE 95%, PARA OBTENER LA INCERTIDUMBRE EN UNIDADES DE CONCENTRACION REALIZAR LA SIGUIENTE OPERACION:  
 $U = \% \text{ U EXPANDIDA} / 100 \times \text{CONCENTRACION OBTENIDA DEL PARAMETRO}$
- (S) **LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (MÉTODOS NO INSTRUMENTALES)**: MENOR CONCENTRACIÓN DE UN ANALITO O SUSTANCIA EN UNA MUESTRA QUE PUEDE SER CUANTIFICADA CON PRECISIÓN Y EXACTITUD ACEPTABLES BAJO LAS CONDICIONES EN QUE SE LLEVA A CABO EL MÉTODO.
- (D) FACTOR DE DILUCIÓN UTILIZADO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LA MUESTRA. ESTE FACTOR DEBERÁ SER MULTIPLICADO POR EL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (\*) SOLO CUANDO EL RESULTADO SEA MENOR A ESTE VALOR, PARA OBTENER EL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DE LA MUESTRA.
- (B. S.) BASE SECA  
 NA NO APLICA

Revisión 10  
FO-50-12

# INFORME DE ENSAYO

NO. DE REPORTE	██████████
FECHA DE EMISIÓN:	██████████
PAGINA:	2 DE 2

OBSERVACIONES:  
NINGUNA.

ESTAMOS A SUS ÓRDENES PARA CUALQUIER ACLARACIÓN  
ATENTAMENTE

QFB. ██████████  
SIGNATARIO AUTORIZADO



LABORATORIO DE PRUEBAS CON ACREDITACIÓN NO. R-0258-021/11 VIGENCIA DE ACREDITACIÓN A PARTIR DE 2011-03-18  
ACREDITACIÓN OTORGADA BAJO LA NORMA NMX-EC-17025-IMNC-2006 (ISO/IEC 17025:2005)  
REQUISITOS GENERALES PARA LA COMPETENCIA DE LABORATORIOS DE ENSAYO Y DE CALIBRACIÓN

LOS RESULTADOS CONTENIDOS EN ESTE INFORME SOLO AMPARAN EL MATERIAL SOMETIDO A PRUEBA.  
ESTE DOCUMENTO NO DEBERÁ REPRODUCirse PARCIALMENTE SIN LA APROBACIÓN POR ESCRITO DEL LABORATORIO

FIN DE INFORME

Revisión 10  
FO-50-12

## REFERENCIAS

1. Barbosa Mireles, E. E. Aislamiento, caracterización y aplicación de consorcios bacterianos hidrocarbonoclastas para la degradación de hidrocarburos totales en suelos contaminados. (Universidad Autónoma de Nuevo León, 2016).
2. Allen, A. Containment landfills: The myth of sustainability. *Eng. Geol.* **60**, 3–19 (2001).
3. SEMARNAT. El Medio Ambiente en México. 1 (2014). Available at: [http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe\\_resumen14/07\\_residuos/7\\_4\\_1.html](http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_resumen14/07_residuos/7_4_1.html). (Accessed: 7th October 2018)
4. SEMARNAT. Residuos: Riesgo Ambiental. (2015). Available at: <http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe15/tema/cap7.html#tema5>. (Accessed: 5th October 2018)
5. SEMARNAT. Residuos: Emergencias Ambientales. (2016). Available at: <http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe15/tema/cap7.html#tema6>. (Accessed: 5th October 2018)
6. SEMARNAT. Normas sobre la remediación de sitios contaminados. *Programa Nacional de Remediación de Sitios Contaminados* 1 (2018). Available at: [http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi\\_apps/WFServlet?IBIF\\_ex=D3\\_R\\_SITIOS01\\_04&IBIC\\_user=dgeia\\_mce&IBIC\\_pass=dgeia\\_mce](http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D3_R_SITIOS01_04&IBIC_user=dgeia_mce&IBIC_pass=dgeia_mce). (Accessed: 22nd February 2020)
7. Diario Oficial de la Federación. *Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012*. 1–16 (2013).
8. Ortiz, B., Sanz, J., Dorado, M. & Villar, S. *Técnicas de recuperación de suelos contaminados*. Universidad de Alcalá. Dirección General de Universidades e Investigación (2007).
9. Miller, G. T. *Ecología y medio ambiente: introducción a la ciencia ambiental, el desarrollo sustentable y la conciencia de conservación del planeta tierra*. (Grupo Editorial Iberoamericana, 1994).
10. Castro Varela, G. *Diseño de monitoreo frente derrames de hidrocarburos*. (2007).
11. Flores, L. & Alcalá, R. *Manual de procedimientos analíticos física de suelos*. Instituto de Geología (2010). doi:10.1007/s00431-003-1251-6
12. Haghollahi, A., Fazaelpoor, M. H. & Schaffie, M. The effect of soil type on the bioremediation of petroleum contaminated soils. *J. Environ. Manage.* **180**, 197–201 (2016).
13. Akbari, A. & Ghoshal, S. Bioaccessible porosity in soil aggregates and implications for biodegradation of high molecular weight petroleum compounds. *Environ. Sci. Technol.* **49**, 14368–14375 (2015).
14. Anza Cruz, H. G. *et al.* Biorremediación de suelos contaminados con aceite automotriz usados mediante sistema de biopilas. *Espac. I+D. Innovación más Desarro.* **5**, 49–77 (2016).
15. Volke-Sepúlveda, T. . & Velasco-Trejo, J. A. *Tecnologías de remediación para suelos*. (2002).
16. Andrades, M., Moliner, A. & Masaguer, A. *Prácticas de edafología: métodos didácticos para análisis de suelos*. (Servicio de publicaciones: Universidad de la Rioja, 2015).
17. Eweis, J. B., Ergas, S. J., Chang, D. P. & Schroeder, E. D. *Bioremediation Principles*. (McGraw-Hill International Editions, 1998).

18. Boodoosingh, R., Swan, C., Marie Desmarais, A., Beckles, D. M. & Marie, A. The effect of bulking agent and initial contaminant concentration on the biodegradation of total petroleum hydrocarbons. in *Proceedings of the Annual International Conference on Soils, Sediments, Water and Energy* **12**, 23 (2010).
19. Chang Huayasco, I. W. Evaluación del efecto del encalado (calcita), en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. (Universidad Nacional Agraria de la Selva, 2013).
20. Harms, H. & Bosma, T. M. P. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 97–105 (1996).
21. Villanueva Rodríguez, T. ¿Qué son los hidrocarburos? *Los Hidrocarburos* 3 (2009).
22. Casellas, M., Grifoll, M., Sabate, J. & Solanas, A. M. Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. *Can. J. Microbiol.* **44**, 734–742 (1998).
23. Colín-Castillo, S. El consumo y la gestión ambiental de combustibles y lubricantes en México. *Gestión ambiental de combustibles y lubricantes* 213–220 (2000).
24. Gallego, J. R., Loredó, J., Llamas, J. F., Sánchez, J. & Vázquez, F. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation* **12**, 325–335 (2000).
25. Ulrici, W. Contaminated soil areas, different countries and contaminants monitoring of contaminants. in *Environmental Process II. Soil Decontamination Biotechnology* 5–42 (2000). doi:10.1002/9783527620951.ch1
26. Castro, A., Acevedo-Berruecos, D., Urbieto, J., Iturbe, R. & Delgado-Rodríguez, O. Geochemical and geoelectric characterization of a hydrocarbon-contaminated site in Puebla state, Mexico. *Boletín la Soc. Geol. Mex.* **65**, 405–418 (2013).
27. Mroziak, A. & Piotrowska-Seget, Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiol. Res.* **165**, 363–375 (2010).
28. ATSDR: Agency for toxic substances and disease registry. *Total petroleum hydrocarbons*. 1–2 (1999).
29. Gobierno de México. Riesgo Ambiental. Available at: <https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/informe15/tema/cap7.html>. (Accessed: 30th March 2020)
30. Kaifer-Brasero, J. *et al.* Guía de Tecnologías de Recuperación de suelos contaminados. *Comunidad Madrid, Cons. del Medio Ambient. y Ord. del Territ.* **1**, (2006).
31. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. Tecnologías de remediación para suelos contaminados por EPT. Available at: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/459/cap4.html>. (Accessed: 19th October 2018)
32. Frankenberger, W. T. The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. in *Hydrocarbon contaminated soils and groundwater* (eds. Kosteki, P. T. & Calabrese, E. J.) 237–293 (1992).
33. Seklemova, E., Pavlova, A. & Kovacheva, K. Biostimulation based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation* **12**, 311–316 (2001).
34. Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R. & de Carvalho, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation* **22**, 231–241 (2011).

35. Wu, M. *et al.* Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **107**, 158–164 (2016).
36. Barathi, S. & Vasudevan, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* fluorescence isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environmental Int.* **26**, 413–416 (2001).
37. Roldán-Martín, A. & Iturbide-Arguelles, R. Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas. *J. Chem. Inf. Model.* **16** (2002). doi:10.1017/CBO9781107415324.004
38. EPA. Technologies for bioremediation for soil contaminated with hydrocarbons. (1994).
39. Coyne, M. *Microbiología del suelo. Un enfoque exploratorio.* (Paraninfo S.A., 2000).
40. Omenn, G. S. *Environmental Biotechnology: Reducing Risks from Environmental Chemicals through Biotechnology.* (Springer US, 1988). doi:10.1007/978-1-4899-0824-7
41. Teramoto, M., Queck, S. Y. & Ohnishi, K. Specialized Hydrocarbonoclastic Bacteria Prevailing in Seawater around a Port in the Strait of Malacca. *PLoS One* **8**, 1–7 (2013).
42. Guzmán, V., Ceruti, R., Marino, F. & Manzo, R. Diésel y biodiésel empleando bacterias degradadoras aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos de la región de Santa Fe. *XX Encuentro Jóvenes Investig. la Univ. Nac. del Litoral* 1–14 (2014).
43. Salam, L. B. Metabolism of waste engine oil by *Pseudomonas* species. *3 Biotech* **6**, 98 (2016).
44. Komukai-Nakamura, S. *et al.* Construction of bacterial consortia that degrade Arabian light crude. *J. Ferment. Bioeng.* **82**, 570–574 (1996).
45. Casellas, M., Grifoll, M., Sabaté, J. & Solanas, A. M. Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. *Can. J. Microbiol.* **44**, 734–742 (1998).
46. Kazunga, C., Aitken, M. D., Gold, A. & Sangaiah, R. Fluoranthene-2,3- and -1,5-diones are novel products from the bacterial transformation of fluoranthene. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 917–922 (2001).
47. Budzinski, H. *et al.* Aerobic biodegradation of alkylated aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *Geochem.* **28**, 337–348 (1998).
48. Grifoll, M., Selifonov, S. A., Gatlin, C. V. & Chapman, P. J. Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3711–3723 (1995).
49. Rojo Santiesteban, S. Biorrecuperación de suelos contaminados con diesel, mediante biopilas utilizando estrategias de bioaumentación y bioestimulación. (Instituto Politécnico Nacional, 2013).
50. Peixoto, R. S., Vermelho, A. B. & Rosado, A. S. Petroleum-Degrading Enzymes: Bioremediation and New Prospects. *Enzyme Res.* 1–7 (2011). doi:10.4061/2011/475193
51. Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M. & Naidu, R. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **176**, 670–699 (2015).
52. Maroto Arroyo, M. E. & Rogel Quesada, J. M. *Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos.* (2007).
53. Van Hamme, J. D., Singh, A. & Ward, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology.

*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 503–549 (2003).

54. Auffret, M. D., Yergeau, E., Labbé, D., Fayolle-Guichard, F. & Greer, C. W. Importance of Rhodococcus strains in a bacterial consortium degrading a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives revealed by metatranscriptomic analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 2419–2430 (2015).
55. Safitri, R. M., Mangunwardoyo, W. & Ambarsari, H. Biodegradation of diesel oil hydrocarbons using Bacillus subtilis InaCC B289 and Pseudomonas aeruginosa InaCC B290 in single and mixed cultures. in *AIP Conference Proceedings* **2021**, 030013 (American Institute of Physics Inc., 2018).
56. Alejandro-Marín, C. M. Catabolismo y tolerancia a hidrocarburos en el linaje Roseobacter. Aproximación multiómica. (Universitat de les Illes Balears, 2018).
57. Jiménez Zarco, J. I. Análisis genómico del catabolismo de compuestos aromáticos en Pseudomonas putida kt2440: caracterización molecular de la ruta de degradación del ácido nicotínico. (Universidad Complutense de Madrid, 2006).
58. Menn, F. M., Sayler, G. S. & Easter, J. P. Bacterial activity enhancement and soil decontamination. in *Biotechnology Environmental processes II. Soil decontamination* (eds. Rehm, H. J., Reed, G., Pühler, A. & Stadler, P.) 425–439 (Wiley-VCH, 2000).
59. Alexander, M. *Biodegradation and Bioremediation*. (Academic Press, Inc., 1999).
60. Chaïneau, C. H., Morel, J. L. & Oudot, J. Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 1615–1621 (1995).
61. Viñas Canals, M. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. (Universidad de Barcelona, 2005).
62. Zhou, E. & Crawford, R. L. Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. *Biodegradation* **6**, 127–40 (1995).
63. Margesin, R. & Schinner, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 650–663 (2001).
64. Smith, E. *et al.* Remediation trials for hydrocarbon-contaminated soils in arid environments: Evaluation of bioslurry and biopiling techniques. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **101**, 56–65 (2015).
65. Rizzo, C. *et al.* Efficiency in hydrocarbon degradation and biosurfactant production by Joostella sp. A8 when grown in pure culture and consortia. *J. Environ. Sci. (China)* **67**, 115–126 (2018).
66. Morales-Guzmán, G. *et al.* Diesel degradation by emulsifying bacteria isolated from soils polluted with weathered petroleum hydrocarbons. *Appl. Soil Ecol.* **121**, 127–134 (2017).
67. Fracchia, L., Cavallo, M., Giovanna, M. & M., I. Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications – present status and future potentials. *Biomed. Sci. Eng. Technol.* **1**, 325–370 (2012).
68. Ben Ayed, H. *et al.* Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from Bacillus amyloliquefaciens An6. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **99**, 8–14 (2015).
69. Arredondo-Vega, B. O. & Voltolina, D. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. in *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. 21–29 (2007).

70. Silk, T. M., Roth, T. M. T. & Donnelly, C. W. Comparison of growth kinetics for healthy and heat-injured *Listeria monocytogenes* in eight enrichment broths. *J. Food Prot.* **65**, 1333–1337 (2002).
71. Diario Oficial de la Federación. *Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000*. 1–85 (2003).
72. Thompson, L. M. & Troeh, F. R. *Los suelos y su fertilidad*. (Reverté, 2002).
73. Arrieta, O. *et al.* Caracterización fenotípica y molecular de poblaciones bacterianas aisladas en un suelo contaminado con diesel y sometido a dos tecnologías de biorremediación. *Rev. Gest. y Ambient.* **15**, 65–76 (2012).
74. Standardization, I. O. for. *ISO 6887-1-2017*. (2017).
75. You, Z. *et al.* Comparison of Petroleum Hydrocarbons Degradation by *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Sci.* **8**, 2551 (2018).
76. Oboh, B. O., Ilori, M. O., Adebusoye, S. A. & Akinyemi, J. O. Hydrocarbon Degrading Potentials of Bacteria Isolated from a Nigerian Bitumen (Tarsand) Deposit. *Nat. Sci.* **4**, 51–57 (2006).
77. Kumar, A., Kumar, S. & Kumar, S. Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194. *Biochem. Eng. J.* **22**, 151–159 (2005).
78. Pereira Silva, D. de S. *et al.* Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **97**, 85–89 (2015).
79. Shen, T. *et al.* Biodegradation of different petroleum hydrocarbons by free and immobilized microbial consortia. *Environ. Sci. Process. Impacts* **17**, 2022–2033 (2015).
80. Mnif, I., Ellouze-Chaabouni, S., Ayedi, Y. & Ghribi, D. Treatment of diesel and kerosene contaminated water by *B. subtilis* SPB1 biosurfactant producing strain. *Water Environ. Res.* **86**, 707–716 (2014).
81. Morikawa, M., Hirata, Y. & Imanaka, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1488**, 211–218 (2000).
82. Onwosi, C. O. & Odibo, F. J. C. Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 937–942 (2012).
83. Feng, W., Swift, S. & Singhal, N. Effects of surfactants on cell surface tension parameters and hydrophobicity of *Pseudomonas putida* 852 and *Rhodococcus erythropolis* 3586. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **105**, 43–50 (2013).
84. Liu, W. *et al.* Rhizobacteria (*Pseudomonas* sp. SB) assist phytoremediation of oily-sludge-contaminated soil by tall fescue (*Testuca arundinacea* L.). *Plant Soil* **371**, 533–542 (2013).
85. Maneerat, S. & Phetrong, K. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **29**, 781–791 (2007).
86. Mnif, I. *et al.* Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**, 14852–14861 (2015).
87. Bacosa, H. P., Suto, K. & Inoue, C. Degradation potential and microbial community structure of heavy oil-enriched microbial consortia from mangrove sediments in Okinawa, Japan. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* **48**, 835–846

- (2013).
88. Jiménez Hernández, V. & Guerra Sánchez, R. Obtención de un medio enriquecido para hacer más eficiente la biodisponibilidad de los hidrocarburos intemperizados en un suelo costero. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **32**, 413–424 (2016).
  89. Gupta, S. K., Kumari, R., Prakash, O. & Lal, R. *Pseudomonas panipatensis* sp. nov., isolated from an oil-contaminated site. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 1339–1345 (2008).
  90. Hu, G., Li, J. & Zeng, G. Recent development in the treatment of oily sludge from petroleum industry: A review. *J. Hazard. Mater.* **261**, 470–490 (2013).
  91. Hamzah, A. *et al.* *Selection of potential petroleum hydrocarbon-degrading bacteria.* (Battelle Press, 2007).
  92. Miyazaki, R. *et al.* Comparative genome analysis of *Pseudomonas knackmussii* B13, the first bacterium known to degrade chloroaromatic compounds. *Environ. Microbiol.* **17**, 91–104 (2015).
  93. Hamamura, N., Ward, D. M. & Inskeep, W. P. Effects of petroleum mixture types on soil bacterial population dynamics associated with the biodegradation of hydrocarbons in soil environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**, 168–178 (2013).
  94. Alvim, G. M. & Pontes, P. P. Aeration and sawdust application effects as structural material in the bioremediation of clayey acid soils contaminated with diesel oil. *Int. Soil Water Conserv. Res.* **6**, 253–260 (2018).
  95. Ijah, U. J. J. & Ukpe, L. I. Biodegradation of crude oil by bacillus strains 28A and 61B isolated from oil spilled soil. *Waste Manag.* **12**, 55–60 (1992).
  96. Ma, J. *et al.* Effects of adding bulking agent, inorganic nutrient and microbial inocula on biopile treatment for oil-field drilling waste. *Chemosphere* **150**, 17–23 (2016).
  97. Atagana, H. I., Haynes, R. J. & Wallis, F. M. Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Biodegradation* **14**, 297–307 (2003).
  98. Arcila Quiroga, L. A. Análisis comparativo de la eficiencia de productos para la biorremediación de suelos contaminados con diesel utilizando métodos de biostimulación y bioaumentación a escala piloto. (Universidad de la Salle, 2016).
  99. Ferguson, S. H. *et al.* Effects of temperature on mineralisation of petroleum in contaminated antarctic terrestrial sediments. *Chemosphere* **52**, 975–987 (2003).
  100. Leahy, J. G. & Colwell, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* **54**, 305–315 (1990).
  101. Wang, S.-Y., Kuo, Y.-C., Hong, A., Chang, Y.-M. & Kao, C.-M. Bioremediation of diesel and lubricant oil-contaminated soils using enhanced landfarming system. *Chemosphere* **164**, 558–567 (2016).