UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

TÍTULO:

"Determinación de condiciones de aplicación de consorcios bacterianos para Biorremediación *In Vitro*."

PRESENTA:

Q.B.P. ALEJANDRO LEDEZMA VILLANUEVA

CD. UNIVERSITARIA SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.

NOVIEMBRE DEL 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

TITULO:

"Determinación de condiciones de aplicación de consorcios bacterianos para Biorremediación *In Vitro*."

PRESENTA:

Q.B.P. ALEJANDRO LEDEZMA VILLANUEVA

CD. UNIVERSITARIA SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.

NOVIEMBRE DEL 2012

COMITÉ DE TESIS

_____

DIRECTOR
Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal

_____

SECTRETARIO
Dra. Susana Favela Lara

_____

VOCAL 1
M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez

_____

VOCAL 2
Dra. Dvorak Montiel Condado

_____

VOCAL 3
Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

DEDICATORIA

A la memoria de quien me enseñó a leer y escribir, gracias a ella pude iniciar mi carrera, a mi queridísima hermana Lumaly Ledezma Villanueva.

Con mucho cariño para mi papá y mamá, M.C. Alejandro R. Ledezma Menxueiro y Lumali Villanueva Peña.

Por toda la ayuda y cariño de mi Tía Lilia O. Ledezma Menxueiro, mi primo Hernán G. Uresti Ledezma y la memoria de mi primo Heriberto A. Uresti Ledezma.

A mi abuelita Elizabeth Menxueiro y la memoria de mi abuelo Rogelio Ledezma. A la memoria de mis abuelitos maternos Salvador Villanueva y Rosa Peña.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la oportunidad que me brindo mi directora de tesis, Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal invitándome a ver el maravilloso mundo de la ciencia.

Con todo aprecio para el M.C: Juan Manuel Adame Rodríguez por animarme y apoyarme en todo momento a cumplir mis metas.

A la asesoría incondicional de la Dra. Susana Favela Lara y mi comité de tesis, el Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna y la Dra. Dvorak Montiel Condado.

Al Dr. José Ignacio González Rojas y al Dr. Juan Manuel Alcocer González, ejemplares líderes de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. que me han apoyado durante todo mi posgrado.

A mis compañeros de Laboratorio que cuidan y animan el trabajo de todos los días con su amistad, al M.C. Eduardo Franco, Q.F.B. Diego Josimar, Q.B.P. Yolanda Canónico, Emmanuel, Carmen, Madori, Rolando, Raúl, Héctor, Euri y todos los que me aprecian y aprecio.

INDICE

COMITÉ DE TESIS 3
RESUMEN 7
INTRODUCCION 8
JUSTIFICACION 12
ANTECEDENTES 13
OBJETIVO GENERAL 23
OBJETIVOS PARTICULARES 23
HIPOTESIS 24
METODOLOGIA 25
A. TOLERANCIA A HIDROCARBUROS. 28
B. CURVA DE DEGRADACION DE DIESEL *In Vitro.* 30
C. ENSAYO DE FERTILIDAD DEL SUELO TRATADO 34
D. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS 36
RESULTADOS 39
1) DETERMINACION DE LA TOLERANCIA A DIESEL. 40
2) DEGRADACION DE FRACCIÓN MEDIA DE HIDROCARBUROS. 43
3) EVALUACION DE LA POBLACION DE MICROORGANISMOS QUE COMPONEN LOS CONSORCIOS 44
4) CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS 45
5) ENSAYO DE FERTILIDAD DEL SUELO TRATADO 46
6) RESULTADOS ESTADISTICOS 47
DISCUSIÓN 50
CONCLUSIONES 53
RECOMENDACIONES 54
BIBLIOGRAFIA 55

RESUMEN

Hoy en día el desarrollo industrial a nivel mundial ha generado que se haga indispensable el uso de combustibles orgánicos como fuente de energía para la operación de maquinaria o elaboración de productos en la industria, el comercio y los servicios. El petróleo crudo (el combustible orgánico más importante) es refinado en diferentes productos combustibles de los cuales el más utilizado es el que proviene de la fracción media, este proceso comprende aquellos hidrocarburos de 6 a 15 moléculas de Carbono (C6-C15) y se le conoce comúnmente como diesel. El uso de este combustible permite laborar y circular a millones de vehículos industriales y maquinaria cada día en el mundo. Para su abastecimiento debe ser almacenado y dispuesto por conveniencia en muchos puntos distribuidos a lo largo de las ciudades y carreteras, lo cual requiere de su transporte en grandes cantidades vía terrestre o marítima. Las distancias que recorre este combustible y los lugares donde se disponen están expuestas a los riesgos cotidianos de derrames que muchas veces son inevitables a pesar de las grandes medidas de contingencia que se disponen en su manejo. Los derrames de Diesel en suelo o agua tienen repercusiones ambientales a corto y largo plazo y no son poco frecuentes. Esto ha hecho que se establezcan leyes y normatividades con límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelo y agua, además de sugerencias o protocolos de acciones correctivas para retirar estos hidrocarburos de los sitios naturales donde hayan sido vertidos. En el presente trabajo se establecen las condiciones esenciales que sirven como base para desarrollar un protocolo de Biorremediación básico para suelo contaminado con Diesel y así evitar el confinamiento y su destrucción térmica. Para un eficiente proceso de Biorremediación de suelo contaminado se establecieron parámetros de funcionamiento del sistema biológico utilizando consorcios microbianos capaces de biodegradar hidrocarburos de tipo Diesel en un suelo arenoso, en condiciones ambientales idóneas de pH 7, temperatura de 30°C y un 100% de humedad, oxigenación y estimulación mineral que logró un máximo de 90.8% de degradación en suelo arenoso contaminado con 3,000 ppm de Diesel en un lapso de 30 días.

INTRODUCCION

La creciente demanda de fuentes energéticas que desencadenó la revolución industrial a partir del siglo XVIII trajo importantes avances tecnológicos así como una demografía en crecimiento exponencial, donde el petróleo crudo ha representado la alternativa más eficiente a estas demandas. Del petróleo crudo se deriva una amplia gama de hidrocarburos que se pueden categorizar según la NOM 138 SEMARNAT 2003 en la fracción pesada, media y ligera. Todas estas, utilizadas como fuentes combustibles para la industria, o como base química en la producción de pinturas, textiles, alimentos, limpieza, agricultura, medicina, papel, entre otros, (Deane, 1983).

Este aporte de la industria petroquímica la hace ser una de las más destacadas y activas en cuanto a exportación, importación y producción. Para México esta industria representa el 10% del PIB colocándolo en el quinto lugar mundial como productor de petróleo crudo (Valdivia, 2008).

Las principales causas de contaminación de hidrocarburos en el ambiente se desencadena de su método de obtención y producción donde el uso de maquinaria especializada en exploración y perforación, como lo son torres y castilletes de perforación, subestructuras y soportes, poleas y elevadores entre otros, requieren un nivel máximo de organización en seguridad mientras que la tecnología petroquímica para obtener los derivados de hidrocarburos tienen un largo proceso de destilación, depuración, isomerización y alquilación por mencionar algunos, que igualmente disponen todos los protocolos de seguridad en el manejo de los petroquímicos (Leffler, 2005). Lamentablemente, aún y cuando se cuente con la mejor calidad y seguridad industrial, las emergencias que surgen con los derrames en suelo y agua en la era del combustible fósil han marcado la historia de la humanidad, como lo fue el del buque petrolero “Exxon-Valdez” en 1989 sobre las costas de Prince William Sound, Alaska, (Venosa *et al*., 2010) y en Abril del 2010, la plataforma petrolífera "Deepwater Horizon" a 80km. de Louisiana, Solo en los Estados Unidos de Norte América se han contado aproximadamente 700 millones de litros de petróleo crudo derramado (Mascarelli, 2010). Durante el comienzo de la era industrial hasta el presente, este tipo de catástrofes ecológicas han sido de gran preocupación para la población

mundial, y la causa de que se desarrollen variadas técnicas de remediación (Fingerman y Nagabhushanam, 2005), para la recomposición del ambiente natural que se ha impactado con hidrocarburos. Dichas técnicas incluyen el uso de maquinaria de excavación y transporte para su confinamiento en el caso de suelo impactado con hidrocarburos, mientras que en cuerpos de agua se puede utilizar bombas de extracción cuando es posible la recuperación del hidrocarburo para su reciclaje, cuando no es, se procede a quemar el hidrocarburo sobre el cuerpo de agua afectado para evitar su rápida propagación (Brito *et al*., 2003). Estas técnicas mecánicas donde el objetivo principal es el confinamiento rápido y seguro del hidrocarburo tiene un costo elevado ya que involucra el uso de personal capacitado (5% del costo total), maquinaria (15% del costo total), transporte (35% del costo total), confinamiento (30% del costo total) y suelo para rellenar el área impactada (15% del costo total) con la gran desventaja de no poder accesar y maniobrar de manera rápida a sitios alejados de las zonas urbanas, además estar expuestos a las inclemencias del tiempo (Zhu *et al*. 2007, Venosa *et al*. 2009). Esta situación ha generado la necesidad de diseñar alternativas donde a partir de la aplicación de nuevas tecnologías químicas y de tratamiento *In Situ* de menor costo a corto plazo y fácil manejo que permitiera descontaminar un sitio impactado con hidrocarburos, principalmente en costas marinas como la aplicación de surfactantes para facilitar la limpieza y confinamiento. Los trabajos y referencia de limpieza de zonas contaminadas por hidrocarburos avanzaron y se fueron implementando según las necesidades de atender las contingencias ambientales, pero paralelamente a estas técnicas mecánicas y químicas se fue desarrollando la Biorremediación (Brito *et al*., 2003). Esta se define según la Normatividad mexicana como el proceso que utiliza organismos vivos para eliminar contaminantes, residuos o sustancias no deseadas del suelo o del agua (Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, 2005). La Biorremediación permite dar tratamiento a los suelos y/o agua impactados con productos derivados del petróleo como lo es el Diesel que tiene un gran uso como combustible primario y una gran incidencia de accidentabilidad (Brito *et al*., 2003).

Los organismos vivos utilizados en las estrategias de Biorremediación pueden ser plantas, hongos y/o bacterias, ciertos organismos de estos reinos, tienen la capacidad de utilizar los hidrocarburos como unica fuente de carbono en su metabolismo (Saadoun y Ziad, 2005), y así degradarlo a los niveles establecidos en la NOM 138 SEMARNAT 2003, esta norma oficial mexicana establece los límites máximos permisibles de contaminación en suelos (Tabla 1), para contaminantes tales como Mezclas, Petróleo crudo, Combustóleo, Parafinas, Petrólatos, Aceites, Gasóleo, Diesel, Turbosina, Keroseno, Creosota, Gas avión, Gas solvente, Gasolinas, Gas nafta, Benceno, Etilbenceno, Tolueno, y Xileno, (BTEX). A su vez, estos compuestos se agrupan en fracciones de acuerdo la longitud de sus cadenas de carbonos, lo que se define en la NOM 138 SEMARNAT 2003 como Fracción Ligera, Fracción Media y Fracción Pesada (Tabla 1).

Los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelo tienen como valores los siguientes:

FRACCION DE HIDROCARBUROS	**Uso de suelo predominante (mg/kg base seca)**		
	Agrícola	Residencial	Industrial
Ligera	200	200	500
Media	1,200	1,200	5,000
Pesada	3,000	3,000	6,000

Tabla 1 con los límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo de la NOM 138 SEMARNAT 2003 en donde el suelo clasificado como Agrícola incluye suelo forestal, recreativo, y de conservación, el suelo Residencial incluye lugares habitacionales y el suelo Industrial incluye suelo en lugares donde existan empresas que desarrollen algún proceso laboral

De manera particular el Diesel está compuesto de 75% de hidrocarburos saturados (principalmente parafinas y cicloparafinas), y 25% de hidrocarburos aromáticos (incluyendo naftalenos, alquilbencenos y BTEX) los cuales son altamente contaminantes al suelo, agua, aire y carcinogénicos para los humanos.(Kanaly 2010). Dentro de las alternativas de remediación de bajo costo e *In Situ* para suelos y agua impactados, los microorganismos juegan un rol importante ya que representan el principal proceso en la descontaminación de los ecosistemas afectados. (Margesin y Schinner, 2005).

El desarrollo industrial y legislativo presente en México aún no define una base de datos de accidentabilidad de los hidrocarburos en suelo y agua (Brito *et al*., 2003) sin embargo, un informe de Pemex Refinación disponible al público con fecha de 1995 reporta un listado de auditorías realizadas por la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) en el que 22 instalaciones de PEMEX fueron certificadas como industrias limpias, sin embargo también se evidenciaron más de 9 mil recomendaciones para evitar derrames de combustibles a estos sitios a fin de cumplir con la normatividad ambiental y mejorar las practicas operacionales (Bojórquez y García, 1995). Por su parte PEMEX en su informe anual de 1999 declara que el derrame de hidrocarburos totales (diesel, gasolina y crudo) representó en ese año el 0.3% (871,800 barriles de petróleo crudo) de las emisiones y descargas totales. El 56% de este volumen fue consecuencia de 93 derrames ocurridos en instalaciones de refinerías (PEMEX Refinación) y el volumen restante se debió a 763 derrames en instalaciones de PEMEX Exploración y Producción (PEP).

Estos datos representan solo una fracción de la necesidad que existe en el país de desarrollar sistemas eficientes de Biorremediación de suelo impactado con hidrocarburos por lo que en el presente trabajo se probó la eficiencia y se establecieron los parámetros de inóculo de los consorcios CMic 4 y CMic 10, tolerancia de diesel, temperatura, humedad, pH, oxigenación, estimulación mineral y tiempo para lograr la máxima degradación de Diesel en suelo arenoso *in vitro*, los cuales son factores de los que depende la eficiencia del tratamiento de la aplicación de consorcios bacterianos para Biorremediación *In Situ*, esto establece las condiciones para adoptar el sistema como una opción practica y de bajo costo de Biorremediación de suelos afectados con este tipo de hidrocarburo.

La evaluación de conformidad de este sistema se realizó por un laboratorio que cuenta con una acreditación ante la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) certificando los niveles de Diesel en las muestras.

JUSTIFICACION

La creciente necesidad de combustibles del tipo diesel a nivel mundial ha forzado al desarrollo de sistemas de transporte de este a gran escala. Lo cual ha aumentado el riesgo y el número de derrames de manera global. Actualmente existen más de 14.3 barriles de hidrocarburos líquidos transportados que se derraman, (Ortínez, 2003). Una vez impactado un sitio terrestre se generan los primeros efectos a corto plazo, los hidrocarburos tienden a filtrarse en el suelo hasta alcanzar los mantos acuíferos subterráneos y así, propagarse por largos kilómetros según sea la hidrología subterránea del sitio, para terminar afectando grandes poblaciones urbanas, por ser suministros de consumo habituales. En la Unidad de Manipulación Genética del LMYF se cuenta hoy en día con dos consorcios microbianos aislados de suelos contaminados con petróleo que son capaces de degradar BTEX *in vitro* (Cmic 4 y Cmic 10). Por lo que se requiere determinar su eficiencia en fracciones de hidrocarburos que representan alto riesgo para la salud humana y un peligro ecológico como el Diesel en condiciones cercanas a las que se presentan in situ, como lo son: Temperatura ambiente, humedad, pH y tipo de suelo. Es por ello que en el presente trabajo se pretende establecer un sistema de biodegradación en suelo a pequeña escala para poder establecer una metodología de aplicación eficiente de consorcios microbianos de Biorremediación en zonas afectadas en la región. De acuerdo a lo establecido por la NOM 138 SEMARNAT 2003 para lograr reducir niveles permisibles de hidrocarburos en suelos afectados.

ANTECEDENTES

El uso de consorcios microbianos para degradar hidrocarburos y otros contaminantes del suelo y agua tuvo sus primeros registros legales como patente en los trabajos de Raymond *et al.* (1972, No. de patente US 3, 846,290) donde se describen métodos para eliminar los hidrocarburos contaminantes del agua y suelo subterránea mediante la estimulación de los microorganismos nativos con nutrientes y oxígeno. Debido al éxito de estas técnicas de Biorremediación (Colleran, 1997), se reflejó un notorio aumento en el interés en el aislamiento de los microorganismos responsables de llevar acabo la degradación de los contaminantes que generó en el aumento de solicitudes de protección a través de patentes en Estados Unidos que permitieron elaborar productos biológicos para ser aplicados en sitios contaminados por residuos peligrosos como lo son los hidrocarburos (Gill 1996, Perriello 2000, Kukor *et al.* 2003, Kerfoot 2008, Nelson *et al*. 2010, Brigmon *et al*. 2007, Satyanarayana 2001, Park *et al*. 2008, Saul *et al*. 2012, Helmke *et al*. 2010, Jeon *et al*. 2011, Ganti 2011, Sinko 2012). La Tabla 2, presenta un resumen de las patentes más destacadas (consultadó en Goggle patents, 2012) que utilizan consorcios microbianos para la degradación de Diesel y diversos compuestos contaminantes derivados de hidrocarburos.

Tabla 2. Patentes destacas para la remediación de Hidrocarburos.

Autor	Año	Numero de Patente	Microorganismos	Contaminante	Porcentaje de degradación y Tiempo
Paul E. Gill.	1996 - 1997	5,525,139	*Achromobacter; Arthrobacter, Aspergillus, Azotobacter, Bacillus, Cunninghamella, Fusarium, Mucor, Norcordia, Penicillium, Phanerochete, Proteus, Pseudomonas, Pythium, Rhizotonia, Rhizopus, Saccharomyces, Sclerotium, Streptomyces, Trichoderma, Verticilium, Xantomonas.*	Mezclas derivadas de HC y Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT)	100% tiempo indefinido.

Perriello.	2000	6,110,372	*P. putida,* *P. rubrisubalbicans,* *P. aeruginosa,* *Variovorax paradoxus,* *Nocardia asteroides,* *Nocardia Brasiliensis,* *Nocardia restricta,* *Nocardia globerula,* *C.indologenes,* *C. acidiovorans,* *Acidovorax delafieldii,* *R.rhodochrous,* *R. erythropolis,* *Rhodococcus fascians,* *Aureobacterium barkei,* *A. esteroaromaticum,* *A. saperdae,* *Micrococcus varians,* *Micrococcus kirstinae,* *Aeromonas caviae,* *Stenotrophomonas Maltophilia,* *S.thalpophilum,* *S. spiritivorum,* *S. putrefaciens B,* *P. myrsinacearum,* *C.michiganense,* *A. xylosoxydans,* *Gordona terrae,* *C.aquaticum B,* *Cytophaga johnsonae*	Combustibles derivados de HC, mezclas derivadas de HC	100% en 25 semanas.
Satyanarayana	2001	US 2001/0019 030 A1	*P.pseudoalkaligenes,* *P. immobile,* *S. maltophilia,* *Gluconobacter cerinus,* *A. radiobacter* *P. alcaligenes*	Hidrocarburos (Crudo, Diesel y derivados)	44% en 8 semanas.

Kukor *et al.*	2003 - 2004	6,623,211	*S. yanoikuyae, Shingomonas spp,, Pseudomonas spp. Burkholderia spp., Ochrobactrum spp., Actinomyces spp. P. aeruginosa*, *Pseudomonas spp.*, *Alcaligenes fecalis*, *Alcaligenes eutrophus*, *Rhodotorula rubra*, *Rhodococcus globerulus X. maltophilia*.	HAP	98-99% en 3 semanas.
Kerfoot.	2008 - 2010	7,442,313	*Micobacterium spp., Gordonia spp., Hydrogenophaga spp., Nocardia spp., Rodococcus spp., Spingomonas spp., Xanthobacteria spp., Algallenes spp., Mycobacteria spp., Rubrivivax spp., Arthrobacter, Acidovorax spp., Burkholderia., Variovarax spp., Pseudomonas spp.,*	HAP, BTEX, Compuestos Orgánicos Tóxicos.	100% en 5 semanas.
Nelson *et al.*	2010	7,658,851	*P. fluorescens, B.subtilis, B. licheniformis, B. thuringensis, Starkeya novella*	Deshechos en agua y suelo de compuestos de carbono (Petróleo Crudo, Diesel, BTEX), Nitrógeno y Sulfuro.	100% tiempo indefinido.

Brigmon *et al.*	2007 - 2011	7,906,315 B2	*Alcaligenes piechaudii*, *Ralstonia Picketii*, *Pseudomonas putida*, *Flexibacter spp.*, *P. frefriksbergensis*, *Staphylococcus warneri*, *Sphingomonas spp.*, *Phylobacterium spp.*, *Serratia ficaria*, *A. tumefaciens*y *Rhizobium spp.*	HAP	100% en 14 meses.
Park *et al.*	2008	US 2008/0020 947 A1	*R. baikoneurensis*, *Acinetobacter johnsonni* *A. haemolyticus*.	Suelo contaminado con HTP	78% en 1 semana.
Saul *et al.*	2012	8,187,862	*Pseudomonas putida*	HAP	100% en 1 semana.
Helmke *et al.*	2010	US 2010/0051 541 A1	*Rhodococcus spp.*, *Dietzia Shewanella*, *Marinobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Oleispiria spp*, *Marinobacter spp.*, *Marinomonas spp.*, *Pseudoalteromonas spp.*, *Psychrobacter spp.*, *Jannaschia spp.*	HTP en suelos y agua ártica	100% en 24 semanas
Jeon *et al.*	2011	US 2011/0129 902 A1	*Alteromonas spp.*	HAP	100% en 3 semanas
Ganti	2011	US 2011/0151 100 A1	*P. pseudoalkaligenes,* *P. immobile,* *S. maltophilia,* *Gluconobacter cerinus,* *A. radiobacter* *P.alcaligenes*	HTP en agua	70% en 3 semanas
Sinko	2012	US 2012/0100 598 A1	Mezcla de Ácido Linoleico y *Rhodococcus rhodochrous.*	Diesel en suelo	70% en 4 semanas

HC: Hidrocarburos, HAP: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, HTP: Hidrocarburos Totales de Petróleo, BTEX: Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno.

Actualmente existen 5,110 técnicas de Biorremediación de Hidrocarburos en la base de datos Goggle Patents hasta el mes de Septiembre 2012 (www.google.com/patents, la mayoría de origen Estadounidense). En estos sistemas se utilizan reactores, bacterias, hongos y/o sus enzimas para degradar los hidrocarburos. Pero la eficiencia en la degradación de cada uno varía dependiendo de sus condiciones físicas y químicas como la humedad, temperatura, nutrientes, oxigeno disponible y pH (Gianfreda *et al*. 2006).

Para determinar las condiciones de máxima eficiencia de diferentes sistemas de degradación de hidrocarburos se han realizado algunas aproximaciones. Por ejemplo; Arotiowa *et al*. en el 2008 comprobó un modelo teórico de crecimiento cinético en la degradación de petróleo tipo diesel en suelo usando como biodegradador a *Pseudomonas aeruginosa* en condiciones controladas de temperatura, nutrientes, pH y aireación, y obtuvo un 100% de degradación de Diesel. Por otro lado, Milić *et al*. en el 2008, estudiaron el comportamiento de un consorcio natural en 150 m^3 de suelo impactado con hidrocarburos (TPH) derivados del petróleo crudo y productos de la refinería Pančevo en Serbia. Despues de 5.5 meses adicionando el suelo impactado con nutrientes orgánicos, lograron la degradación de hidrocarburos (de 29.80 a 3.29 g/kg representando el 89% de reducción total), ellos encontraron que los factores más importantes para la el crecimiento de los microorganismos son la administración adecuada de oxígeno, pH, contenido de Fosforo y Nitrogeno, temperatura estable en incubadora (30°C) así como la concentración y clase adecuada de hidrocarburo. En otro estudio, Fava *et al*. en el 2010 determinaron la capacidad de degradar Diesel de dos consorcios microbianos (ENZ-G1 y ENZ-G2) *In Vitro* administrando un sustrato de Medio Mínimo Mineral con diferentes concentraciones de Diesel a una temperatura de 30°C, demostrando así la capacidad para degradar Diesel de los 2 consorcios antes mencionados cuyos componentes fueron caracterizados en la siguiente tabla

Tabla 3 Filotipos encontrados de consorcios degradadores de hidrocarburos aislados de suelo contaminado con Diesel (Milić *et al*., 2008)

Consorcio	Filum	Microorganismo de mayor parentesco	Similitud
ENZ-G1 & ENZ-G2	Bacteroidetes	*Chryseobacterium taichungensetype* cepa CC-WGS18 [AJ843132]	98%
ENZ-G2	α-proteobacteria	*Sphingopyxis taejonensis* cepa JSS-54 [AF131297]	99%
ENZ-G1	β-proteobacteria	*Paracoccus versutus* cepa Tcn3 [AF437875]	99%
ENZ-G1		*Paracoccus versutus* cepa Tcn3 [AF437875]	89%
ENZ-G1 & ENZ-G2		*Alcaligenes spp*. NyZ215 [EF540877]	100%
ENZ-G2 & ENZ-G2	γ-proteobacteria	*Achromobacter spp*. clon OUT11 [EU372808]	99%
ENZ-G1 & ENZ-G2		*Acinetobacter baumannii* cepa NBRAJG89 [EU661706]	99%
ENZ-G1 & ENZ-G2		*Acinetobacter baumannii* cepa NBRAJG89 [EU661706]	99%
ENZ-G1 & ENZ-G2		*Pseudomonas stutzeri* cepa SA1 [DQ059546]	99%
ENZ-G1 & ENZ-G2		*Stenotrophomonas acidaminiphila* cepa NK 2.Ha-5 [EU352763]	95%
ENZ-G2		Bacteria clon (no identificada) BANW729 [DQ264639]	95%

Sumándose a estas investigaciones, Malkawi *et al*. en el 2009 con el objetivo de desarrollar consorcios bacterianos activos que pudieran ser usados en la Biorremediación de petróleo crudo e hidrocarburos en suelos contaminados, aislaron 34 bacterias de suelo contaminado en la refinería de petróleo de la ciudad de Zarka, en Jordania. Cada una de las bacterias aisladas de estos consorcios se probaron individualmente y en conjunto como consorcio para determinar su potencia de degradación con una mezcla de hidrocarburos en medio mínimo, la cual fue pentano, heptano y benceno, otro medio fue el tolueno, antraceno y naftaleno, el tercero y último fue el naftaleno, tolueno y heptano. Los aislados bacterianos fueron capaces de degradar del 22% al 46.2%. Al momento de crecer en estas dosis de hidrocarburos donde gran parte del éxito se tuvo cuando el crecimiento de los

microorganismos se desarrollo a 28°C, con una estimulación en medio mínimo Stanier´s y una administración de oxigeno constante por agitación de los matraces de cultivo a 160 rpm. En una investigación similar, Arbabi *et al*. en el 2009, comprobarón la capacidad degradadora de hidrocarburos de microorganismos nativos en suelos contaminados por estos, los sitios donde se aislaron fue en Irán, específicamente en la refinaría de Tehran y la zona petrolera de Busher (suelo arenoso). Sus ensayos consistieron en la elaboración de un reactor en laboratorio sobre el cual estimularon los microorganismos nativos del suelo impactado con hidrocarburos procedente de refinerías mediante oxigenación (inyección de aire), regulación de temperatura (20-25°C), control de humedad (70-100%) y de pH (6.8-7.1), logrando remover eficientemente los hidrocarburos presentes en las muestras (1,000 mg/kg) en lapsos no mayores a 19 semanas.

Otro factor importante para establecer las condiciones óptimas de remediación de los hidrocarburos mediante la estimulación de consorcios bacterianos es tomar en cuenta el tipo de hidrocarburo que se desea remediar, así como la consideración del tiempo (semanas o meses) en el que se realizará el proceso (Venosa y Zhu, 2005) ya que los microorganismos presentan susceptibilidad a ciertos tipos de hidrocarburos y también a las altas concentraciones de estos como lo evidencian una investigación de Perry en 1984 quien determinó que la susceptibilidad de hidrocarburos para ser degradados por microorganismos es más alta para los más pesados y tóxicos como los n-alcanos, seguido de los alcanos ramificados, en tercera instancia se presentan los compuestos aromáticos de bajo peso molecular y finalmente los menos tóxicos y más fácil de degradar, los alquenos cíclicos. Junto con estas investigaciones Das y Chandran en el 2011 mencionan que algunos compuestos como los hidrocarburos aromáticos Policíclicos (HAP) de alto peso molecular quizá nunca se puedan degradar por degradación microbiana. En trabajos de similares donde se estudiaron cepas bacterianas capaces de usar el naftaleno, floureno, fenantreno, fluorantreno o pireno como única fuente de carbono se llevó a cabo por Bouchez *et al.* en 1995 donde todas las cepas individualmente fueron capaces de cometabolizar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en un rango variable entre cada una pero mostrando un fenómeno de inhibición que describe el autor como algunas veces drástico que se observó con frecuencia observado en los consorcios así como también las interacciones sinérgicas

entre los mismos. Particularmente el naftaleno fue tóxico para todas las cepas utilizadas pero la asociación entre ellas fue eficiente para aliviar el fenómeno de inhibición, incluyendo el efecto tóxico del naftaleno. En otro aspecto que puede afectar los procesos de Biorremediación, dentro de esta misma investigación se observó que la acumulación de metabolitos secundarios producto del metabolismo de los HAP tuvo efectos negativos para las comunidades microbianas presentes en la degradación. Bouchez *et al.* cuatro años después (1999) muestra como sus consorcios degradaban o se inhibían si eran puestos como microorganismos individuales o en consorcio frente a Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) como el antraceno, fluorantreno y pireno. Mientras que los microorganismos probados individualmente se inhibían ante la alta concentración de HAP, como los consorcios degradaron satisfactoriamente comprobando así que los microorganismos agrupados compensan la inhibición de algunas de sus cepas ante altas concentraciones de contaminante.

El proceso que involucra adicionar microorganismos preseleccionados a un sitio contaminado con el propósito de incrementar y/o extender la Biorremediación de contaminantes se conoce como Bioaumentación (Saadoun y Al-Ghzawi, 2005). La cantidad a inocular en el sitio contaminado no sigue un patrón establecido, como demuestran Margesin y Schinner (1997) que realizarón una Bioaumentación en cinco diferentes suelos contaminados con Diesel y partieron de una concentración inicial de un consorcio con alta eficiencia de degradación de $1x10^8$ cel/g. teniendo resultados de degradación hasta del 53% en 20 días. Mientras que una diferente cantidad de inoculo inicial en orto proceso de Bioaumentación fue implementado por Johsen *et al*. en 2007 quienes inocularon un consorcio microbiano dominado por *Mycobacteriom spp*. a un valor inicial de $1x10^4$ mostro valores satisfactorios en la degradación completa (100%) en 16 semanas de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) en suelo.

Similarmente, Thomassin-Lacroix *et al*., en el 2002 realizarón una Biorremediación de suelo ártico a bajas temperaturas, impactado con combustible diesel. El estudio se llevó acabo tanto *In-Situ* en celdas circulares a pequeña escala como en laboratorio. El sitio de estudio de campo fue en la isla Ellesmere (82º00`00``Latitud Norte y 20º 00`00``Longitud

W) lugar donde se construyeron 6 celdas de 1m de diámetro (50 cm de alto y 50 cm^3 de volumen) y se designaron 3 para control y otras 3 para el tratamiento con estimulación mineral (urea granular y fosfato diamonico), surfactante comercial con base de aceites naturales (Biosolve), fibra de coco como anti aglomerante y finalmente la inoculación de 10^8 cel/g de un consorcio microbiano previamente aislado y caracterizado por el mismo equipo de trabajo (Thomassin-Lacroix *et al*., 2001) el cual contenía 17 microorganismos de los que destacan mayoritariamente *Rhodococcus erythropolis, Sphingomonas spp* y *Pseudomonas synxantha*. Simultaneamente se preparó un ensayo bajo las mismas condiciones en laboratorio con el mismo suelo impactado, mismas condiciones de temperatura (2°C a 7°C) misma estimulación mineral y misma cantidad de inoculo obteniendo resultados favorables a los 90 días en los que se redujo la cantidad de hidrocarburos inicial de 2.5 mg/g a 0.5 mg/g en diferencia significativa los resultados en capo lograron reducir 2.9 mg/g de hidrocarburos a 0.5 mg/g en solamente 65 días.

Al parecer, un punto vital en los procesos de Biorremediación es la obtención de consorcios microbianos que tengan capacidad de tolerar y degradar los hidrocarburos, estudiando las diferentes técnicas de aislamiento de microorganismos, encontramos que Viñas *et al.* (2005) evaluó la capacidad biodegradadora microorganismos nativos en un suelo altamente contaminado con cresota (3,000 ppm) que fue dispuesto en diferentes concentraciones de agua (5%, 20%, 40%, 60% y 75% de humedad) y estimulado por tratamientos individuales como nutrientes minerales ($KNO_3$and K_2HPO_4), surfactante comercial (MAT 10), nutrientes minerales con microorganismos degradadores de hidrocarburos comerciales (consorcio AM) y nutrientes minerales con octato de fierro. También se consideraron incluir un tratamiento sin nutrientes y otro donde se esterilizo el suelo y se dejó sin humedad (control negativo). Los HTPs y HAPs bajaron drásticamente de cantidad después de 45 días logrando hasta un 87% de degradación en el tratamiento que fue dispuesto sin nutrientes gracias a la oxigenación administrada (agitadores de vidrio manuales) y la disponibilidad de agua presente en el tratamiento (75% de humedad). La variación de microorganismos responsables de la degradación de los hidrocarburos fue observada utilizando técnicas moleculares como la Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) que permitió observar una similitud en los microorganismos del

grupo α-*Proteobacteria* (generos *Sphingomonas* y *Azospirillum*) en los primeros días de tratamiento y después presentar un domino del grupo γ-*Proteobacteria* (genero *Xanthomonas*) en el tratamiento sin nutrientes. En un caso diferente, Kim *et al.* en el 2010 lograron disminuir la cantidad de Tricloroetiltolueno encapsulando en polímeros de polietilen glicol (PGE) con *Pseudomonas putida* KCTC1644 y *Bacillus spp*. aislados mediante un enriquecimiento mineral de un lodo activado que provenía de una planta de tratamiento de aguas en la ciudad de Ansan, Korea con el objetivo de remediar Tricloroetiltolueno (TCE). Su método de trabajo fue encapsular a los cultivos en Polietilenglicol (PEG) ya que esto les permitía una mayor difusión de sus enzimas catalíticas a diferencia de los medios en donde las células se encuentran suspendidas (O'Reilly y Crawford 1989; Fokina *et al.* 1996) con la única desventaja que el sustrato tarda en llegar hasta las células que se encuentran inmovilizadas en el polímero (O'Reilly y Crawford 1989; Chenetai 2007). Sus resultados mostraron que la cepa de *Bacillus spp*. aislada de lodos activados fue significativamente más eficiente que *Pseudomonas putida* en la degradación de Tricloroetiltolueno (TCE) en ambos casos (encapsulación y difusión libre). En otra estrategia para remediar hidrocarburos, Desouky *et al*. en el 2009, aisló *Pseudomonas geniculata* y *Achromobacter xylosoxidans* de suelo contaminado con hidrocarburos de la zona industrial en ciudad de Umm-Saied, del país de Catar y comprobó su eficiencia cultivándolos a 30°C y 120 rpm por siete días en diferentes Medios Minimos Minerales impactados con 100 ppm de Naftaleno, Fenantreno y Antraceno, obteniendo 85% de degradación, comprobando que el uso de la diversidad de microorganismos en suelos impactados con hidrocarburos es una rápida estrategia de Biorremediación.

En el presente trabajo se determinó la capacidad de los consorcios CMic 4 y CMic 10 aislados previamente en la Unidad de Manipulación Genética del Laboratorio de Micología y Fitopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., para degradar Diesel en suelo arenoso contaminado con 3,000 ppm. Se logró establecer las condiciones que servirán como base para desarrollar sistemas de Biorremediación *In Situ*, dichas condiciones incluyen a parámetros como: concentración de inoculo, temperatura, humedad, pH, administración de oxígeno y estimulación mineral.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la capacidad de degradación de Diesel en suelo arenoso (100% arena) de consorcios microbianos y las condiciones idóneas para ello.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la tolerancia a hidrocarburos de los consorcios CMic 4 y CMic 10.

2. Establecer la concentración de inoculo, la concentración de Diesel, la humedad, temperatura, pH y tiempo ideales para la proliferación de los consorcios CMic 4 y CMic 10 en suelo arenoso.

3. Evaluar la capacidad de degradar Diesel de los consorcios CMic 4 y CMic 10 bajo condiciones ambientales controladas en suelo arenoso.

HIPOTESIS

Los consorcios microbianos probados en este estudio son capaces de degradar diesel en suelo arenoso si son expuestos a este en las condiciones ambientales y durante el tiempo adecuado

METODOLOGIA

El desarrollo de esta investigación se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Unidad de Micología y Unidad de Manipulación genética del LMYF.

La metodología propuesta se desarrolló en las siguientes cuatro etapas:

A) **Tolerancia a hidrocarburos:** Se expusieron los consorcios CMic 4 y CMic 10 junto con 2 controles al diesel para determinar la inhibición y/o crecimiento de estos.

B) **Curva de degradación de Diesel *In Vitro*:** Se estandarizaron las condiciones adecuadas de inoculo, temperatura, pH y humedad en 700 gramos de arena impactadas con 3,000 partes por millón (ppm) de diesel observando su degradación durante 30 días.

C) **Ensayo de fertilidad de suelo:** Una vez Biorremediado el suelo fue dispuesto en un ensayo de fertilidad utilizando la lombriz de tierra *Eisenia foetida* como bioindicador.

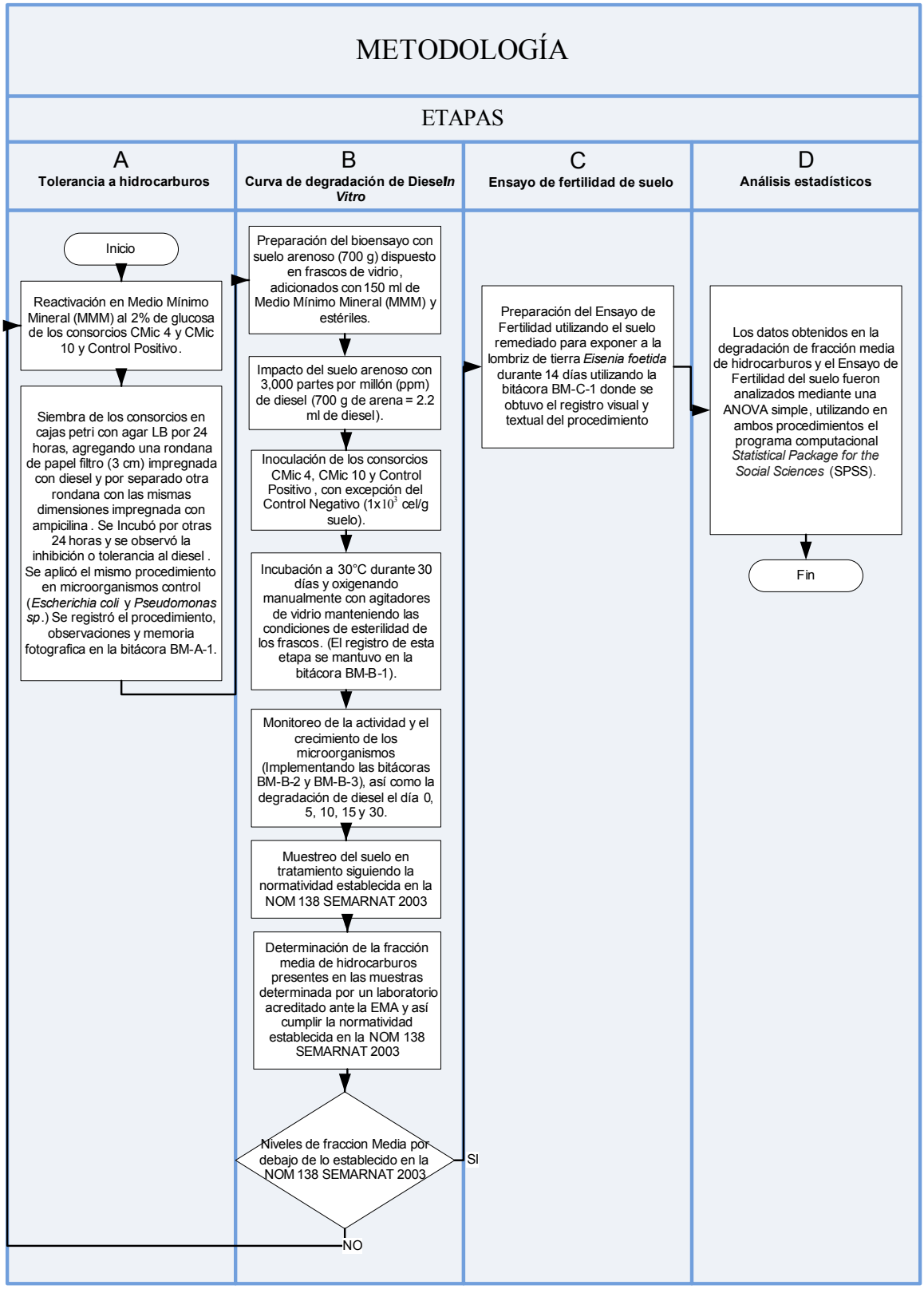
D) **Análisis estadísticos:** Se realizó un análisis estadístico de ANOVA simple para los resultados de la degradación de diesel por los consorcios y el ensayo de fertilidad de suelo.

Para registrar física y digitalmente las cuatro etapas (A, B, C y D) se implementaron bitácoras de registro manual las cuales se describen en la siguiente tabla:

Clave de la bitácora	Nombre de la bitácora	Función de la bitácora
BM-A-1	Tolerancia a hidrocarburos.	Registro del procedimiento escrito y fotográfico de la tolerancia a hidrocarburos.
BM-B-1	Bioensayo para la degradación de diesel.	Registro del procedimiento escrito y fotográfico de la degradación de hidrocarburos.
BM-B-2	Tinción Gram de los consorcios durante el bioensayo.	Registro del procedimiento escrito y fotográfico de los consorcios durante el bioensayo.
BM-B-3	Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).	Registro del procedimiento escrito y fotográfico de la determinación de UFC en el suelo arenoso durante el Bioensayo para la realización de la curva de crecimiento de microorganismos.
BM-C-1	Ensayo de Fertilidad del Suelo.	Registro del procedimiento escrito y fotográfico del Ensayo de Fertilidad del Suelo.

Tabla 4. Control de bitácoras

Figura 1. Diagrama general de la metodología del proyecto "Determinación de condiciones de aplicación de consorcios bacterianos para Biorremediación *In Vitro*."



Descripción de la metodología:

A. TOLERANCIA A HIDROCARBUROS.

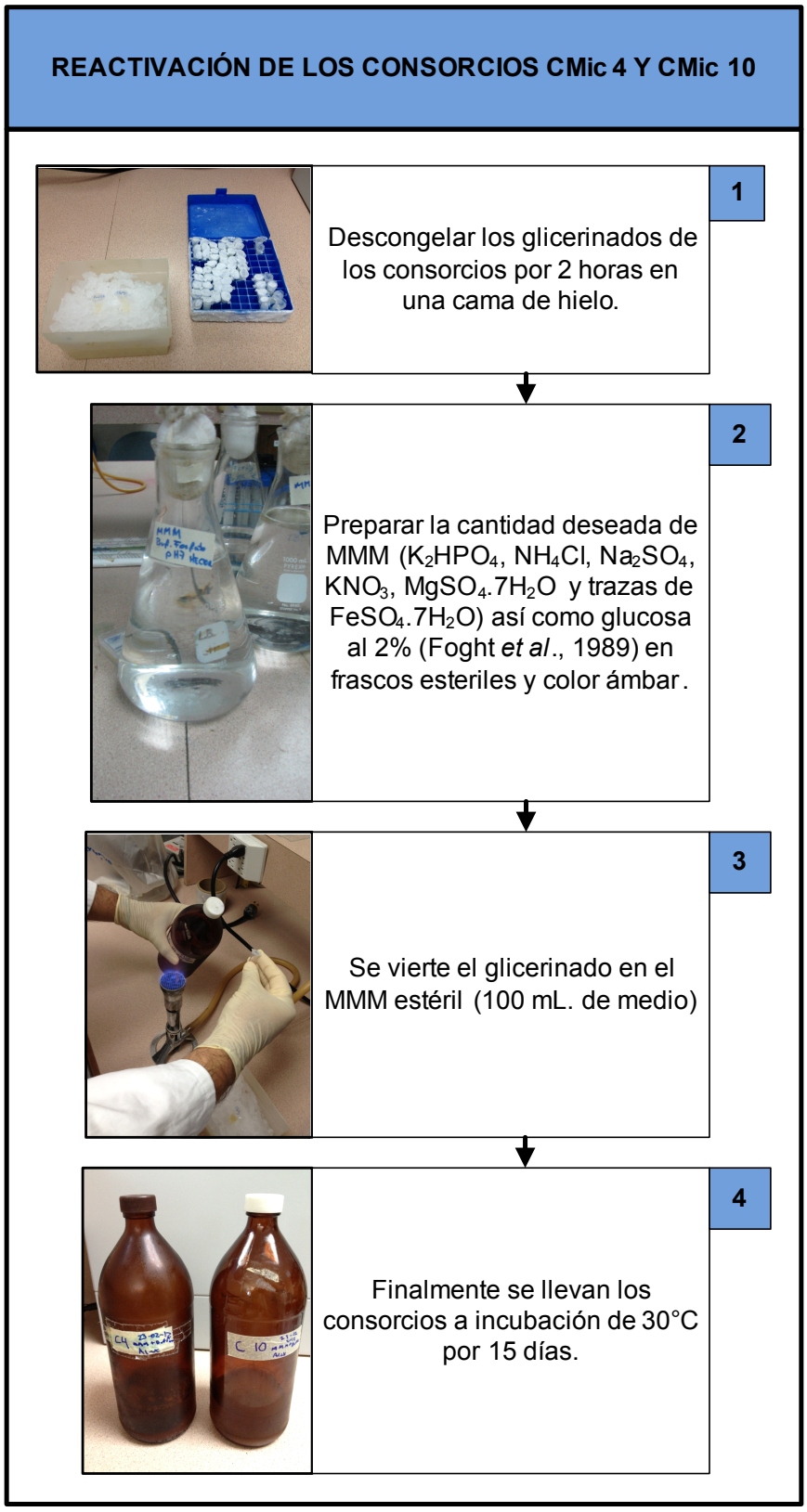
Se realizaron determinaciones de tolerancia a una concentración máxima de Diesel por parte de los consorcios utilizando como control a *Pseudomonas spp.* con tolerancia a hidrocarburos superior a 3,000 ppm (Molina, 2011) y *Escherichia coli*

1) Reactivación de los consorcios: a partir de los consorcios glicerinados y preservados a -80°C se descongelaron en una cama de hielo durante 2 horas y después se tomó 1 mL y se cultivó en Medio Mínimo Mineral estéril (0.5 g de K_2HPO_4, 1.0 g de NH_4Cl, 2.0 g de Na_2SO_4, 2.0 g de KNO_3, 0.2 g de $MgSO_4.7H_2O$ y trazas de $FeSO_4.7H_2O$) al 2% de glucosa (Foght *et al*., 1989). El tiempo de incubación fue de 15 dias a 30°C.

2) Una vez listos los consorcios, se prepararon 8 cajas Petri con agar LB (10 g peptona de caseína, 5g de extracto de levadura, 10 g de NaCl, 12 g de Agar. Lennox E. S. 1995) donde se inocularon con isopo la totalidad de las cajas cuidando en todo momento la esterilidad del proceso y se incubaron a 30°C por 48 horas. Simultáneamente se cultivó los microorganismos control (*Pseudomonas spp.* y *Escherichia coli*) bajo el mismo procedimiento.

3) Teniendo las cajas Petri cultivadas con los consorcios CMic 4, CMic 10, *Pseudomonas sp* y *Escherichia coli* (cada experimento se realizó por duplicado), se colocó dentro de cada placa Petri, un disco de papel filtro con dimensiones de 3 cm de circunferencia, un disco estaba impregnada con diesel y la otra estaba impregnada con ampicilina, concluyendo este paso se llevó de nuevo a incubación de 30°C durante 24 horas. Finalmente se visualizaron los resultados de esta etapa teniendo como control de datos la bitácora BM-A-1.

Diagrama de la etapa A



B. CURVA DE DEGRADACION DE DIESEL *In Vitro.*

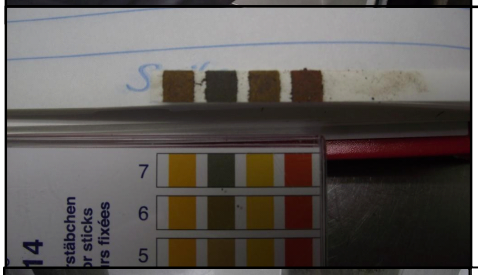
1) En 4 recipientes de vidrio de boca ancha de 1 L. de capacidad y tapa con sello de teflón se dispusieron 700 gramos de arena a un 100% de humedad con 150 ml de Medio Mínimo Mineral (MMM) y un pH de 7, finalmente se esterilizaron 3 veces a 121°C durante 15 minutos.

2) El suelo arenoso se impactó con 3,000 ppm de Diesel (2.1 g/frasco), esto se calculó mediante una regla de tres simple donde las ppm equivalen a mg/kg, por lo tanto en 1 kg de suelo se pesarían 3,000 mg de Diesel para impactarlo con 3,000 ppm de Diesel y aplicando la operación para 0.7 kg (700 g de suelo) se necesitó 2,100 mg (2.1 g) de Diesel para impactar 700 g de suelo a 3,000 ppm de Diesel.

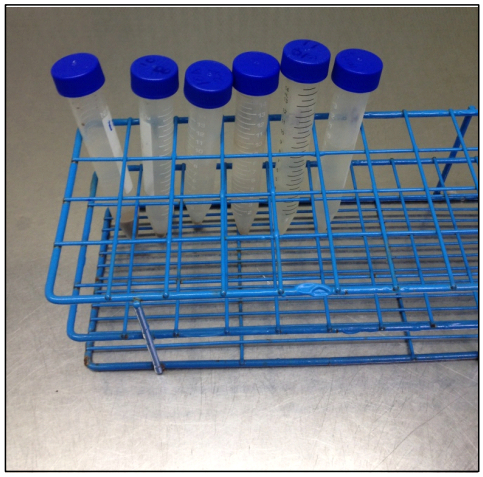
3) La arena se inoculo con cada uno de los consorcios y un control positivo comercial (*Bacillus spp.*) a una cantidad de $1x10^3$ cel/g. con excepción del control negativo. La inoculación fue realizada en condiciones de esterilidad.

4) Cada uno de los frascos fueron incubados a 30°C donde se mantuvieron las condiciones de temperatura, humedad y pH durante 30 días. Cada día se dio aproximadamente 5 minutos de aeración a los frascos cuidando las condiciones de esterilidad y registrando las observaciones de este ensayo en la bitácora BM-B-1. Se decidió monitorear los tratamientos el día 0, 5, 10, 15 y 30 teniendo para cada uno de estos días diferentes actividades para determinar como la degradación de la fracción media de hidrocarburos mediante cromatografía liquida de alta eficiencia (HPLC) como lo marca la NOM 138 SEMARNAT 2003, el monitoreo de los consorcios se realizó mediante una suspensión de células a partir de muestras de suelo para realizarles tinción gram (bitácora BM-B-2) y finalmente realizar una dilución y siembra en agar LB de las muestras colectadas para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes durante el lapso de tiempo del bioensayo (bitácora BM-B-3).

Diagrama de las metodologías propuestas en la etapa B:

DEGRADACION DE HIDROCARBUROS DE FRACCIÓN MEDIA		
	Preparación de frascos con las condiciones de humedad y pH adecuadas.	1
	Inoculación de los consorcios bajo condiciones de esterilidad.	2
	Monitoreo de pH con tiras reactivas durante el proceso.	3
	Proceso de oxigenación en condiciones de esterilidad.	4
	Aspecto de los bioensayos.	5

DETERMINACION DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA(UFC)

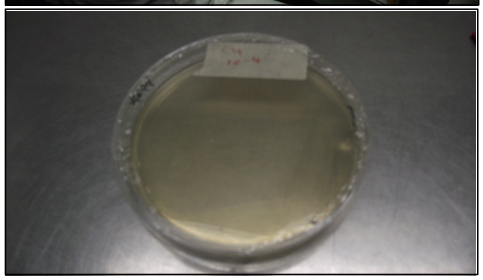


Diluciones 1/9 de suelo en solución salina.

1

Diluciones $1x10^{-2}$ hasta $1x10^{-5}$ y siembra en placas petri con agar LB.

2



Incubación a 30°C por 24 horas de placas petri con agar LB.

3

MONITOREO DE LA POBLACION BACTERIANA MEDIANTE TINCIÓN GRAM

Tinción Gram para cada uno de los tratamientos y visualización de las laminillas teñidas en microscopio a un objetivo de 100x

1

C. ENSAYO DE FERTILIDAD DEL SUELO TRATADO

1) Al final del Bioensayo se trasladó el suelo a nuevos recipientes de vidrio en los que se agregó un 10% de suelo agrícola y 10 lombrices de tierra *Eisenia foetida* en el suelo de cada tratamiento (Cuevas-Díaz *et al*., 2008).

2) Se sometieron a reposo las lombrices en papel filtro por 2 horas para que vaciaran su tracto digestivo y se pesaron para finalmente ser dispuestas en los recipientes que contenían el suelo de los tratamientos. El ensayo se llevó durante 14 días en los que de nuevo se pesó a las lombrices el día 7 y finalmente el día 14. Los datos y observaciones se realizaron en la bitácora BM-C-1.

Diagrama del Ensayo de Fertilidad del Suelo.

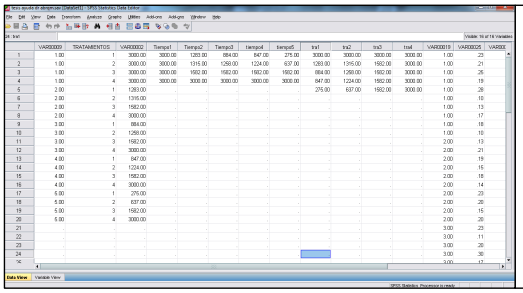
ENSAYO DE FERTILIDAD DE SUELO		
	La lombriz de tierra *Eisenia foetida* es seleccionada en su etapa adulta y reposa 2 horas en papel filtro para que vacié su tracto digestivo, se seleccionaron 10 lombrices para los 4 tratamientos (CMic 4, CMic 10, Control Positivo y Control Negativo). Por ultimo se agrego un ultimo control el cual se nombro Control Lombrices el cual contuvo a las lombrices en un suelo natural.	1
	Después del reposo las lombrices, se capturo su peso inicial (Día 0) y se colocaron en el suelo correspondiente a su tratamiento. El suelo previamente se seco y se homogenizo con 10% de suelo agrícola.	2
	El ensayo se mantuvo a temperatura ambiente durante 14 días, pesando de nuevo a las lombrices el día 7 y el día 14.	3

D. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados en los que se obtuvieron datos numéricos como lo fue la **degradación de fracción media de hidrocarburos** durante los días 0, 5, 10, 15 y 30, así como el peso de las lombrices registrado a los días 0, 7 y 14, se procesaron en el programa estadístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) mediante el análisis de ANOVA simple y prueba de Tukey, las cuales permiten caracterizar diferencias significativas entre los tratamientos (Zar, 2009). En el único caso del análisis de la degradación de fracción media de hidrocarburos se realizó una prueba complementaria de Friedman (Daniel, 2004) para ver las diferencias de los tratamientos con respecto al tiempo y así detallar más el resultado estadístico.

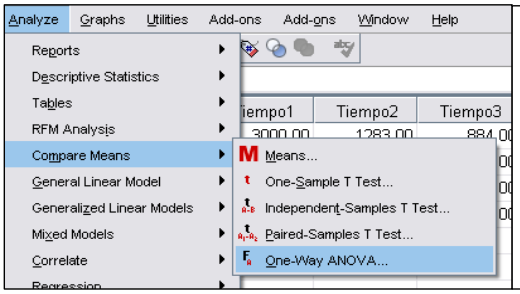
Diagrama del análisis estadístico.

DIAGRAMA DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE ANOVA SIMPLE CON TUKEY EN SPSS



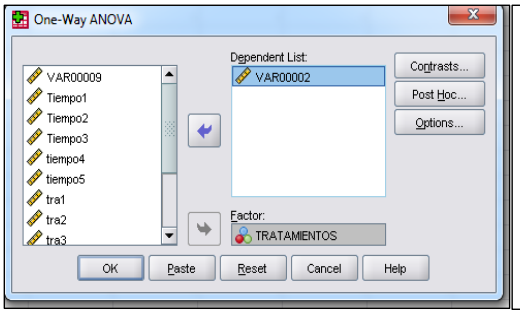
Se ingresan los datos definiendo en una columna los tratamientos (valor nominal) y en otra columna los resultados obtenidos (valor a escala).

1



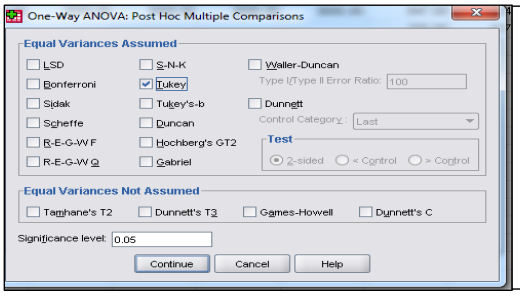
Se ingresa al menú de Analyze (Analizar), Compare Means (Comparación de Medias), One-Way ANOVA (ANOVA simple).

2



Se selecciona el valor a escala el cual contiene los resultados de la degradación ó el peso de las lombrices en la sección de Dependent List (Lista Dependiente) y el valor de escala nominal (tratamientos) en la sección de Factor (El Factor), por ultimo se ingresa al menú Post Hoc (Pruebas Posteriores).

3



En el menú de Post Hoc (Pruebas Posteriores) se selecciona la prueba Tukey palomeando el recuadro de esta, se continua el análisis aceptado las opciones y finalmente se obtiene el resultado

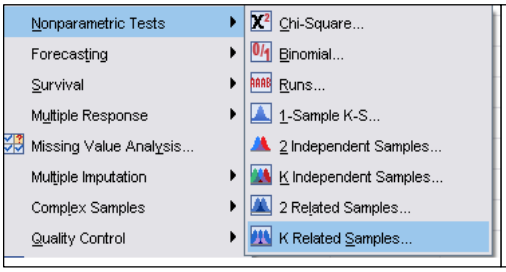
4

DIAGRAMA DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE PRUEBA DE FRIEDMAN EN SPSS

tra1	tra2	tra3	tra4
3000.00	3000.00	3000.00	3000.00
1283.00	1315.00	1582.00	3000.00
884.00	1258.00	1582.00	3000.00
847.00	1224.00	1582.00	3000.00
275.00	637.00	1582.00	3000.00
.	.	.	.

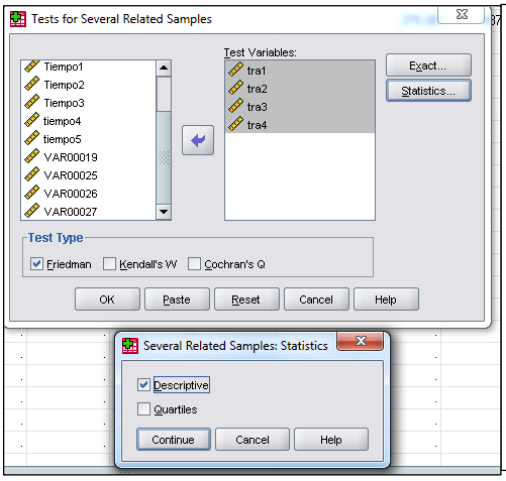
Se ingresan los datos definiendo en diferentes columnas los tratamientos con respecto al tiempo (valor inicial tiempo 0 hasta el valor final tiempo 5).

1



Se selecciona en el menú de Analyze (Analizar) la sección de Nonparametric Test (Pruebas No Perimétricas) seguida de la opción K Related Samples (Muestras Relacionadas K).

2



Finalmente se seleccionan las columnas capturadas en el recuadro de Test Variables (Pruebas Variables) para escoger en la parte inferior el Tipo de Prueba (Test Type) la opción de Friedman y en el botón de Statics (Estadísticas) seleccionar la opción de Descriptiva (Descriptive) para así continuar y aceptar las opciones y obtener el resultado.

3

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se despliegan en el siguiente orden:

1) **Tolerancia a Diesel:** Se muestran las fotografías de los cultivos en cajas petri donde se crecieron los consorcios CMic 4 y CMic 10 así como los controles *Pseudomonas spp.* y *Escherichia coli.*

2) **Degradación de la Fracción Media de hidrocarburos:** Se muestra la grafica de degradación de diesel (fracción media) la cual está elaborada en base a los resultados obtenidos de la cromatografía liquida de alta eficiencia (HPLC).

3) **Evaluación de los microorganismos que componen los consorcios:** Se incluyen las imágenes el monitoreo a los consorcios mediante una tinción gram directa del suelo en tratamiento durante los días de muestreo (0, 5, 10, 15 y 30).

4) **Crecimiento de los microorganismos:** Se presenta la gráfica obtenida del conteo de las Unidades Formadoras de Colonia realizadas los días de muestreo (0, 5, 10, 15 y 30).

5) **Ensayo de la Fertilidad del Suelo Tratado:** A manera de gráfica, se presenta la supervivencia de las lombrices de tierra del género y especie *Eisenia foetida* después de haber sido expuestas al suelo resultante de la Biorremediación de los consorcios CMic 4 y CMic 10 así como los controles positivo y negativo.

6) **Resultados Estadisticos:** Se muestran las tablas resultantes arrojadas por el programa estadístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) en el cual se realzaron determinaciones de ANOVA simple para la degradación de los hidrocarburos y el peso obtenido de las lombrices.

1) DETERMINACION DE LA TOLERANCIA A DIESEL.

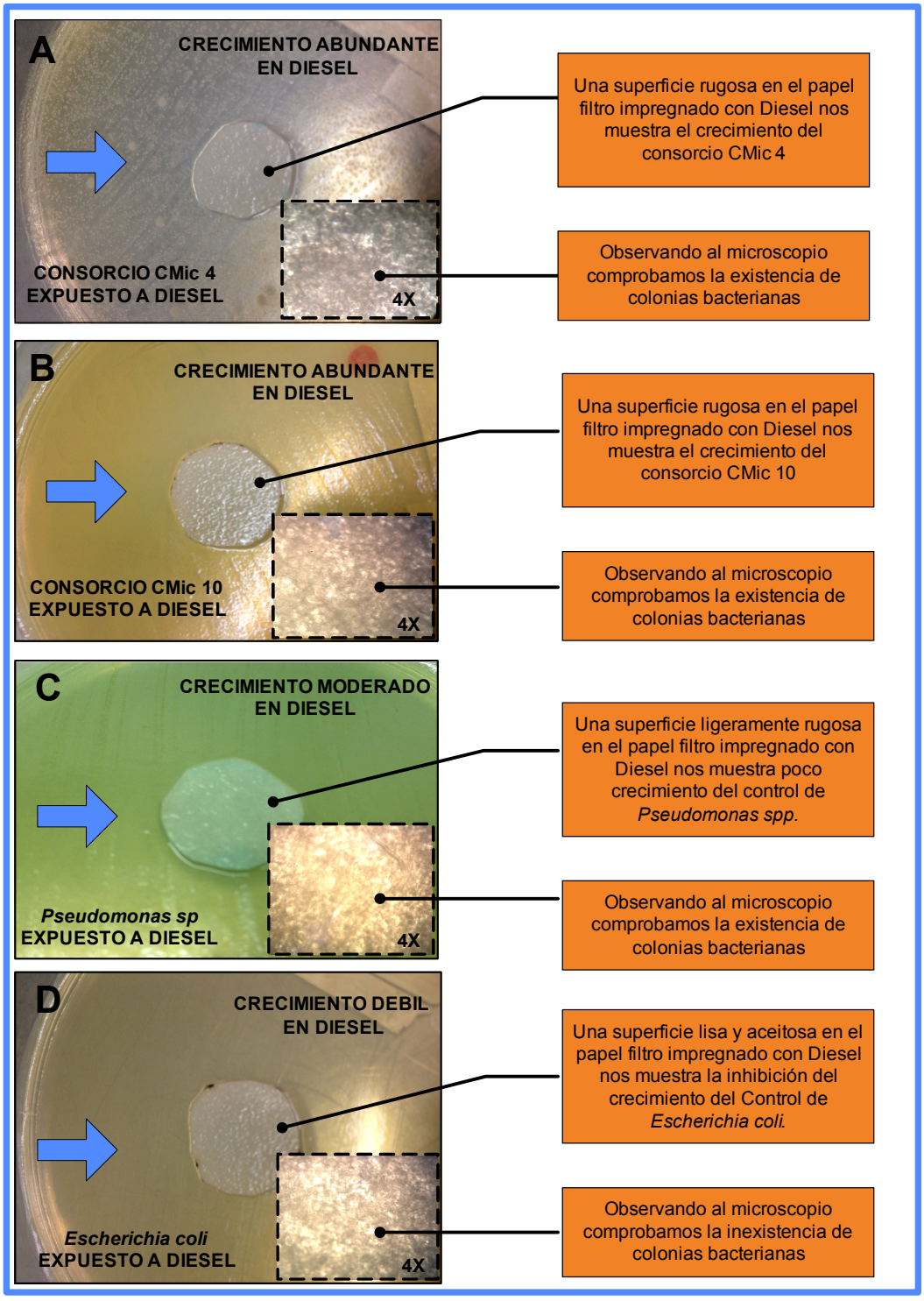


Figura 2. Resultados de la tolerancia a Diesel por parte de los consorcios y controles. Las imágenes A y B muestran el crecimiento de los consorcios CMic 4 y CMic 10 que formaron colonias bacterianas en la superficie del papel filtro impregnado con Diesel. Mientras que las imágenes C y D no muestran el mismo crecimiento en Diesel.

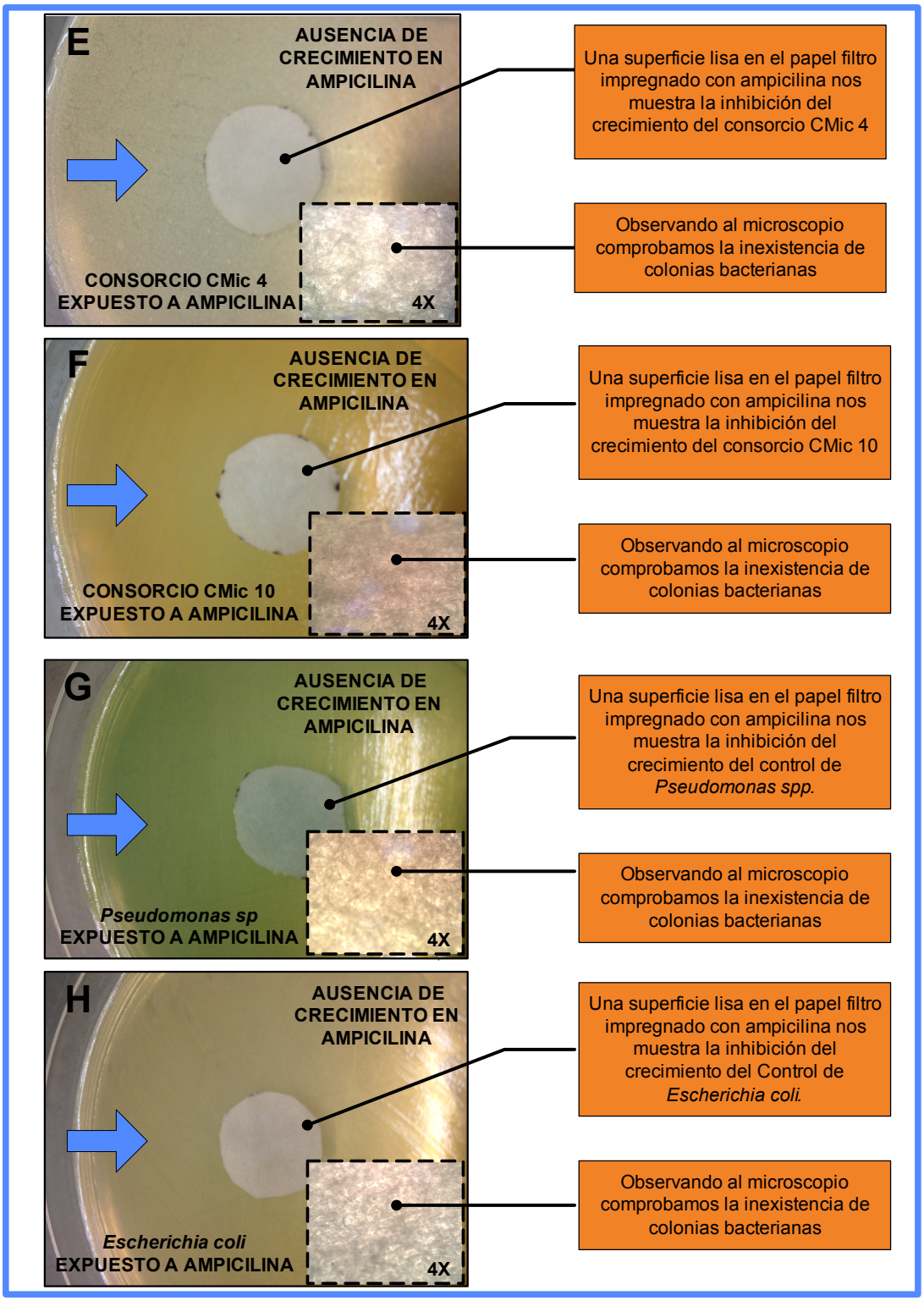


Figura 3. Como sustancia control se realizó la misma determinación de tolerancia a la ampicilina, obteniendo resultados negativos para el crecimiento de los consorcios CMic 4 y CMic 10 así como para la cepa de *Pseudomonas spp*. y *Escherichia coli*.

Los consorcios microbianos CMic 4 y CMic 10 son capaces de tolerar una concentración del 100% de Diesel con respecto a *Pseudomonas spp.* y *Escherichia coli* incapaces de crecer en presencia del hidrocarburo. En la fig 2 se observa en el cuadro A el crecimiento colonial del consorcio CMic 4 sobre la rondana de papel filtro impregnada con Diesel y fotografiada al microscopio a un objetivo 4X en contraste con el cuadro E (pag. 38) donde la nitidez de la rondana de papel filtro impregnada con ampicilina no se observa crecimiento colonial del consorcio. Los mismos resultados se pueden observar para el Consorcio CMic 10 ubicados en los cuadros B y F. En contraste a los consorcios, los microorganismos control *Pseudomonas spp.* y *Escherichia coli* quedan inhibidos en su crecimiento colonial en la rondana impregnada con Diesel y ampicilina (cuadros C. D, G y H).

2) DEGRADACION DE FRACCIÓN MEDIA DE HIDROCARBUROS.

Grafica 1:

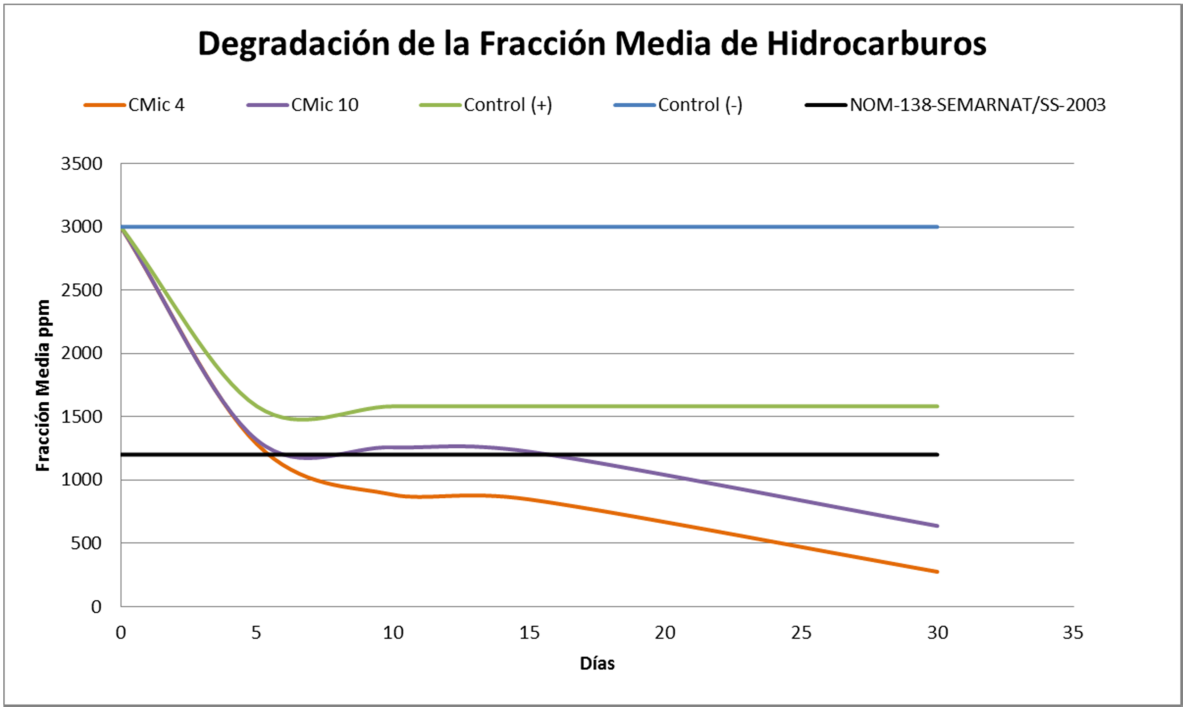


Figura 4. Curva de degradación de la Fracción Media de Hidrocarburos (Diesel) en 30 días. Naranja consorcio CMic 4, Morado consorcio CMic 10, Verde control positivo, Azul control negativo sin bacterias, Negro límite máximo permisible.

En el presente trabajo se demostró la capacidad de degradar hidrocarburos del tipo Diesel siendo los principales degradadores el consorcio CMic 4 (color naranja) que para el décimo día de exposición se observó que se había desarrollado la máxima tasa de degradación (211.6 ppm/día) llegando a un total de degradación de diesel en los que las 3,000 ppm iniciales (control negativo) fueron degradadas en un 90.8% en 30 días, mientras que el consorcio CMic 10 tuvo una tasa de degradación de las mismas 3,000 ppm iniciales del 78.7% degradando los primeros 10 días un total de 174.2 ppm/día. Con resultados no satisfactorios por la NOM 138 SEMARNAT/SS-2003 para el día 15 se encuentra el Control Positivo con una tasa de degradación del 52.7% y el Control Negativo el cual mantuvo la cantidad inicial de 3,000 ppm de hidrocarburos. Estos resultados fueron validados mediante análisis estadístico por análisis ANOVA (Tablas 5 y 6).

3) EVALUACION DE LA POBLACION DE MICROORGANISMOS QUE COMPONEN LOS CONSORCIOS

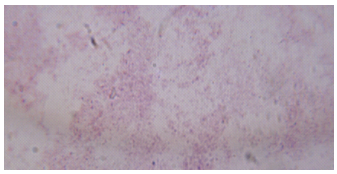
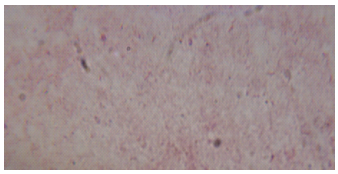
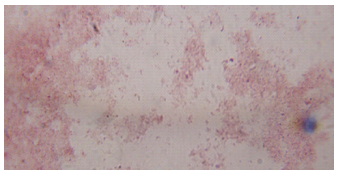
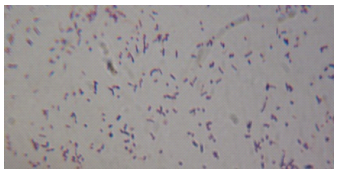
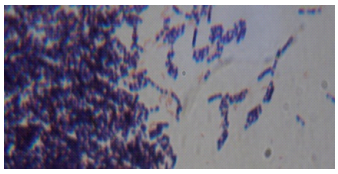
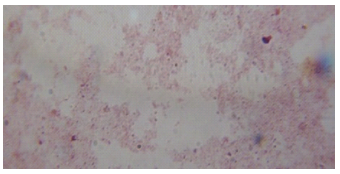
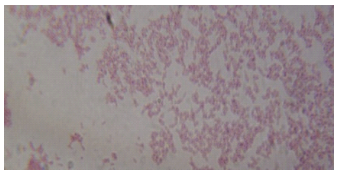
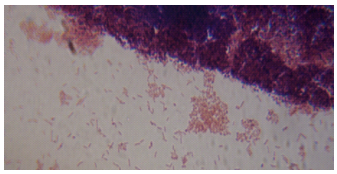
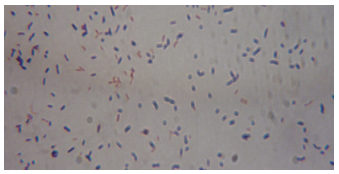
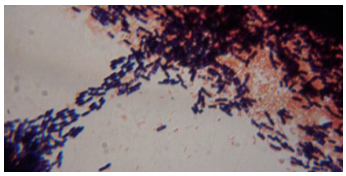
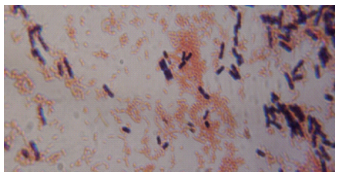
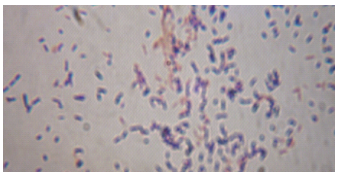
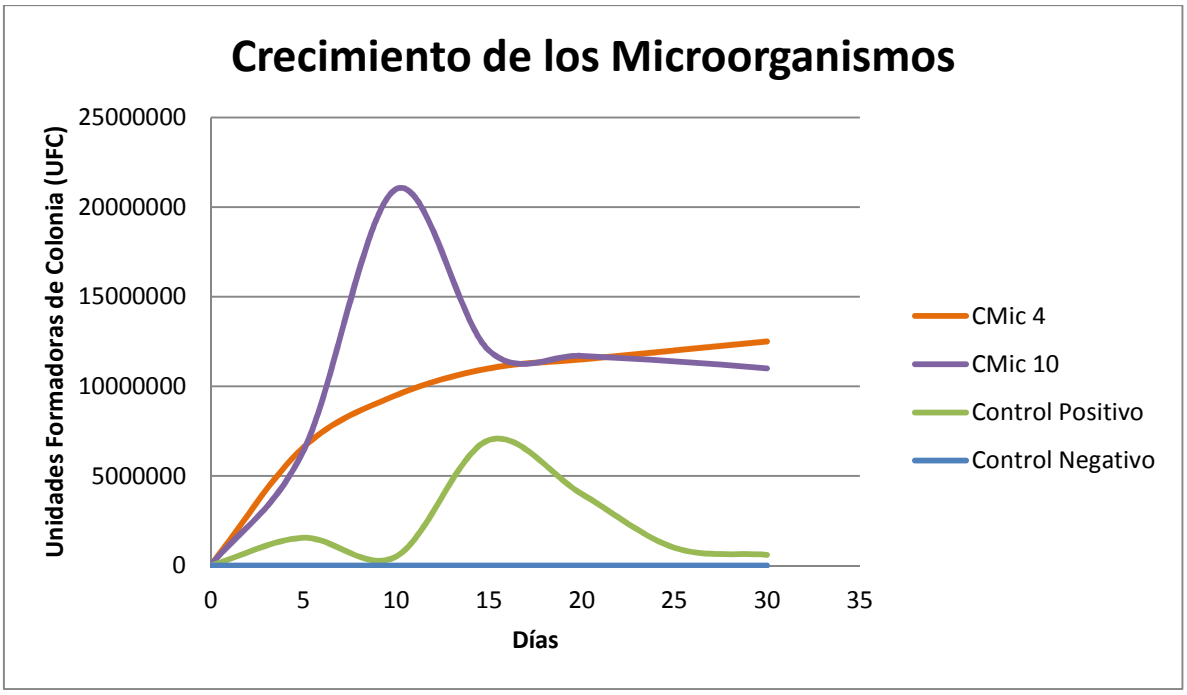
CONSORCIO CMic 4	CONSORCIO CMic 10	CONTROL POSITIVO
 DIA 5: Dominio de bacterias Gram Negativas	 DIA 5: Dominio de bacterias Gram Negativas	 DIA 5: Dominio de bacterias Gram Negativas
 DÍA 10: Población equilibrada de bacterias Gram Negativas y Positivas	 DÍA 10: Población equilibrada de bacterias Gram Negativas y Positivas	 DÍA 10: Dominio de bacterias Gram Negativas
 DÍA 15: Dominio de bacterias Gram Negativas	 DÍA 15: Población equilibrada de bacterias Gram Negativas y Positivas	 DÍA 15: Población equilibrada de bacterias Gram Negativas y Positivas
 DÍA 30: Población equilibrada de bacterias Gram Negativas y Positivas	 DÍA 30 Población equilibrada de bacterias Gram Negativas y Positivas	 DÍA 30: Población equilibrada de bacterias Gram Negativas y Positivas

Figura 5. Con el fin de observar la variación en la población de microorganismos conforme los periodos de degradación se realizaron tinciones gram de muestras de suelo en tratamiento obteniendo un resultado variable entre microorganismos gram negativos los primeros 10 días, y un aumento en los gram positivos los últimos días.

4) CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS



La figura 6 muestra el crecimiento de los microorganismos durante la degradación del diesel donde los microorganismos del consorcio CMic 4 presentan un crecimiento uniforme durante el tiempo. En contraste con el consorcio CMic 10 mantuvo un crecimiento irregular. En el caso del Control Positivo y Control Negativo se obtuvo muy poco o nulo crecimiento en comparación de los consorcios CMic 4 y CMic 10

Tiempo	UFC			
	CMic 4	CMic 10	Control (+)	Control (-)
0 días	$1x10^3$	$1x10^3$	$1x10^3$	0
5 días	$6.6x10^6$	$6.4x10^6$	$1.6\ x10^6$	0
10 días	$9.5x10^6$	$2.1x10^7$	$5\ x10^5$	0
15 días	$1.1x10^7$	$1.2x10^6$	$7\ x10^6$	0
30 días	$1.2x10^7$	$1.1x10^6$	$6\ x10^5$	0

Tabla 5. Resultados de las unidades formadoras de colonia durante el Bioensayo

5) ENSAYO DE FERTILIDAD DEL SUELO TRATADO

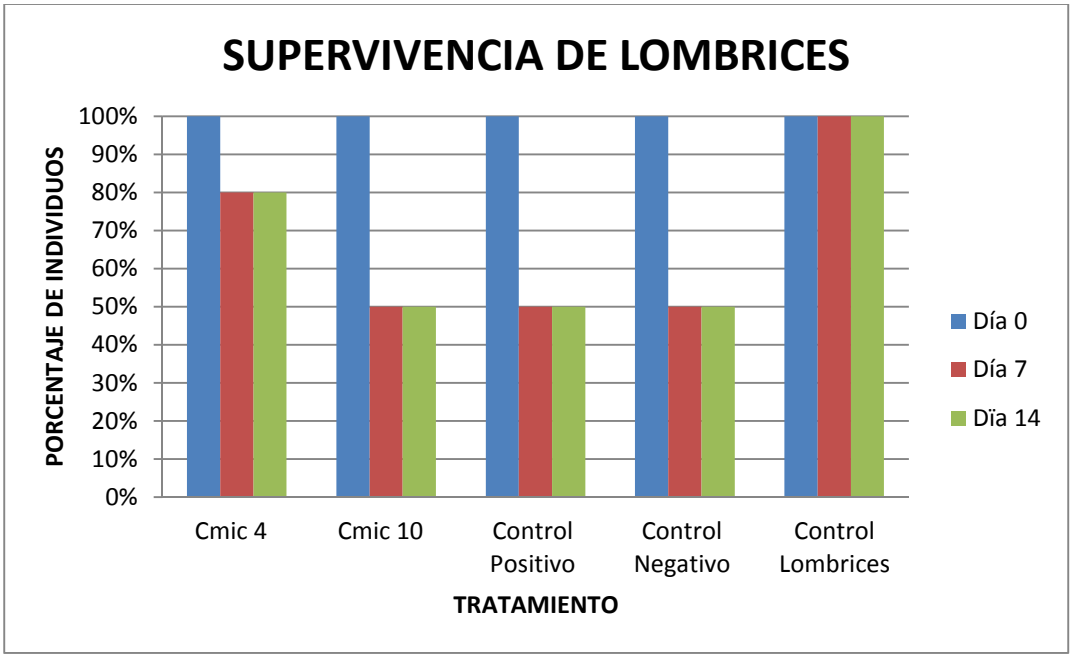


Figura 7 Porcentaje de supervivencia de lombrices dispuestas a crecer en suelo arenoso sometido a Biorremediación con los consorcios CMic 4, CMic 10 y sus respectivos controles.

Podemos apreciar que el suelo en el que hubo mayor sobrevivencia de las lombrices fue el suelo remediado por el consorcio CMic 4 con un 80% de supervivencia, mientras que el consorcio CMic 10, Control Positivo y Control negativo tuvo un 60 % de supervivencia en comparación con el Control de Lombrices en el que en un suelo natural se obtuvo el 100% de supervivencia de lombrices.

6) RESULTADOS ESTADISTICOS

Tabla 5 Subconjuntos Homogéneos: HSD de Tukey para la Degradación de Hidrocarburos.

Grupo	N	Subconjuntos para alfa = 0.05	
		1	2
CMic 4	5	1257.8000	
CMic 10	5	1486.8000	
Control Positivo	5	1865.6000	1865.6000
Control Negativo	5		3000.0000
p-valor		.591	.121

Variable Dependiente: Fracción media de hidrocarburos (ppm).

La tabla de Subconjuntos Homogéneos utiliza una prueba estadística de Tukey para distinguir nuestros tratamientos aplicados en 2 subconjuntos de alfa (α), el subconjunto 1 es para valores de $\alpha > 0.05$ y el subconjunto 2 es también para valores de $\alpha > 0.05$. El resultado en la tabla nos indica que el tratamiento de los consorcios microbianos (subconjunto 1) muestra una diferencia significativa al Control Negativo (subconjunto 2)

Tabla 6 Comparaciones Múltiples (ANOVA) para la Degradación de Hidrocarburos.

(I) TRATAMIENTOS	(J) TRATAMIENTOS	Diferencia de Medias (I-J)	Error Típico	p-valor	Intervalo de Confianza al 95%	
					Límite Inferior	Límite Superior
CMic 4	CMic 10	-229.00000	476.49021	.962	-1592.2479	1134.2479
	Control Positivo	-607.80000	476.49021	.591	-1971.0479	755.4479
	Control Negativo	-1742.20000	476.49021	.010	-3105.4479	-378.9521
CMic 10	CMic 4	229.00000	476.49021	.962	-1134.2479	1592.2479
	Control Positivo	-378.80000	476.49021	.856	-1742.0479	984.4479
	Control Negativo	-1513.20000	476.49021	.027	-2876.4479	-149.9521
Control Positivo	CMic 4	607.80000	476.49021	.591	-755.4479	1971.0479
	CMic 10	378.80000	476.49021	.856	-984.4479	1742.0479
	Control Negativo	-1134.40000	476.49021	.121	-2497.6479	228.8479
Control Negativo	CMic 4	1742.20000	476.49021	.010	378.9521	3105.4479
	CMic 10	1513.20000	476.49021	.027	149.9521	2876.4479
	Control Positivo	1134.40000	476.49021	.121	-228.8479	2497.6479

Variable Dependiente: Fracción media de hidrocarburos (ppm).

La tabla de Comparaciones Múltiples nos arroja un resultado para comparar las diferencias significativas de un tratamiento (Tratamientos I) entre el resto de los tratamientos (Tratamientos J), siendo de consideración aquellos valores que tengan un resultado de p-valor menor a 0.05. El resultado a considerar son los consorcios CMic 4 y CMic 10 los cuales muestran una diferencia significativa con respecto al Control Negativo ($\alpha < 0.05$).

Tablas 7 y 8 Prueba de Friedman para la Degradación de Hidrocarburos.

Rangos	
	Rango de Medias
Tiempo 1	4.50
Tiempo 2	3.38
Tiempo 3	2.88
Tiempo 4	2.38
Tiempo 5	1.88

Estadísticas de la Prueba de Friedman	
N	4
Chi-Cuadrada	10.400
df	4
Asymp. Sig.	.034

Utilizando una prueba de Friedman podemos observar como los Rangos de Medias respectivas al tiempo de la degradación de los tratamientos es diferente para cada uno de ellos, teniendo como referencia que en el Tiempo 1 y 2 fue donde se llevó la mayor parte de la degradación y en el Tiempo 5 donde hubo la menor degradación.

Tabla 9 Subconjuntos Homogéneos: HSD de Tukey para la Fertilidad del Suelo.

Suelo Remediado	N	Subconjuntos para alfa = 0.05	
		1	2
Control Negativo	5	.1980	
CMic 10	5	.2220	
Control Positivo	5	.2500	
CMic 4	8	.2738	
Control Suelo Natural	10		.3830
p-valor		.257	1.000

Similarmente, la tabla de Subconjuntos Homogéneos mediante la prueba de Tukey nos muestra que para el ensayo de Fertilidad de suelo existe una diferencia significativa entre los suelos del tratamiento y el Control de Suelo Natural.

Tabla 10. Comparaciones múltiples para el desarrollo de la lombriz de Tierra *Eisenia foetida* dentro del ensayo de Fertilidad del Suelo.

(I) TRATAMIENTOS	(J) TRATAMIENTOS	Diferencia de Medias (I-J)	Error Típico	p-valor	Intervalo de Confianza al 95%	
					Límite Inferior	Límite Superior
CMic 4	CMic 10	.05175	.03615	.613	-.0536	.1571
	Control Positivo	.02375	.03615	.964	-.0816	.1291
	Control Negativo	.07575	.03615	.250	-.0296	.1811
	Control Suelo Nat.	-.10925	.03007	.009	-.1969	-.0216
CMic 10	CMic 4	-.05175	.03615	.613	-.1571	.0536
	Control Positivo	-.02800	.04010	.955	-.1448	.0888
	Control Negativo	.02400	.04010	.974	-.0928	.1408
	Control Suelo Nat.	-.16100	.03473	.001	-.2622	-.0598
Control Positivo	CMic 4	-.02375	.03615	.964	-.1291	.0816
	CMic 10	.02800	.04010	.955	-.0888	.1448
	Control Negativo	.05200	.04010	.695	-.0648	.1688
	Control Suelo Nat.	-.13300	.03473	.006	-.2342	-.0318
Control Negativo	CMic 4	-.07575	.03615	.250	-.1811	.0296
	CMic 10	-.02400	.04010	.974	-.1408	.0928
	Control Positivo	-.05200	.04010	.695	-.1688	.0648
	Control Suelo Nat.	-.18500	.03473	.000	-.2862	-.0838
Control Suelo Nat.	CMic 4	.10925	.03007	.009	.0216	.1969
	CMic 10	.16100	.03473	.001	.0598	.2622
	Control Positivo	.13300	.03473	.006	.0318	.2342
	Control Negativo	.18500	.03473	.000	.0838	.2862

Finalmente la Tabla de Comparaciones múltiples nos indica que en el suelo Biorremediado con los consorcios CMic 4 y CMic 10 la lombriz tuvo un buen desarrollo (aumentó de peso) y presentan diferencia significativa con el Control de Suelo Natural (α <0.05).

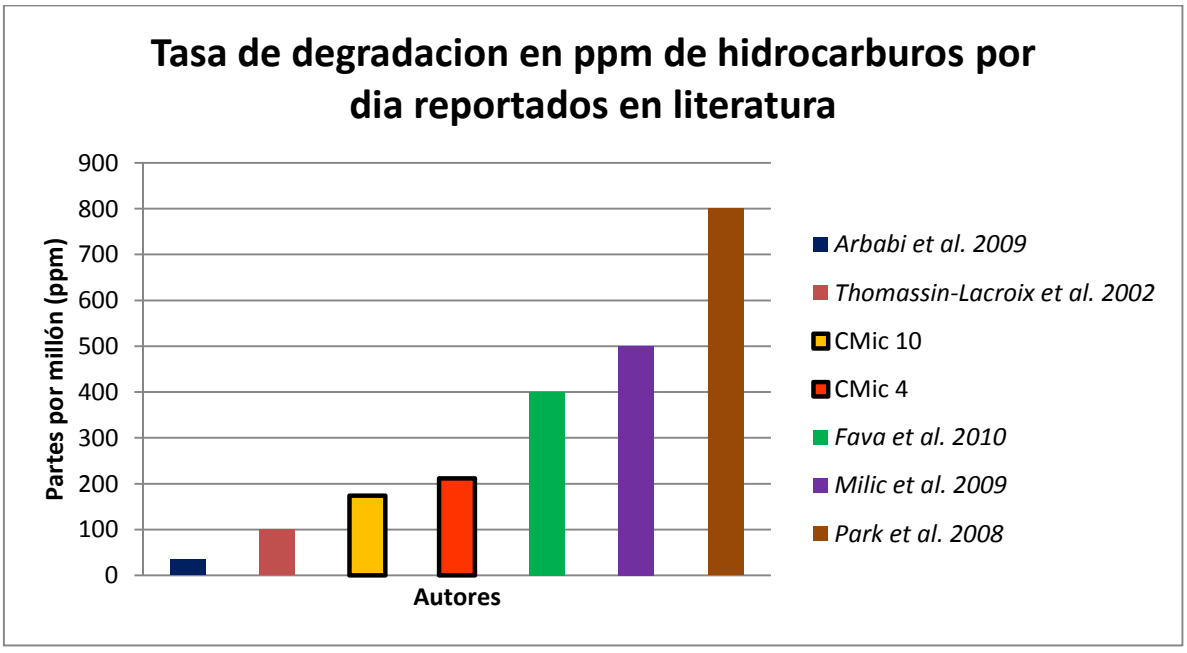
DISCUSIÓN

La tolerancia que presentan los microorganismos a diferentes concentraciones de hidrocarburos es factor fundamental para la remediación de sitios impactados (Venosa y Zhu, 2005). Dichas concentraciones fueron dispuestas en su máxima capacidad en el ensayo de Tolerancia a Hidrocarburos del tipo Diesel (página 26) donde los consorcios CMic 4 y CMic 10 aplicados en este trabajo soportaron el impacto de Diesel y proliferaron rápidamente al observarse un crecimiento colonial observado macro y microscópicamente (4X) sobre el papel filtro impregnado con el hidrocarburo, generando así un método alternativo a lo sugerido por autores como Malkawi *et al*.(2009) quienes decidieron probar sus aislados bacterianos por separado y en conjunto a diferentes concentraciones de Hidrocarburos obteniendo como resultado que el consorcio microbiano supera los resultados de degradación obtenido individualmente por cada bacteria, lo cual deja en segundo término un objetivo importante que en este trabajo se decidió establecer como objetivo individual, ya que al mezclar la capacidad de los microorganismos para llevar a cabo la Biorremediación con la tolerancia de los microorganismos al hidrocarburo se vuelve más importante ver que tan eficaz fue la degradación. Según nuestros resultados los consorcios muestran una alta capacidad para realizar la Biorremediación *In Situ*.

Los factores de crecimiento (condiciones Físicas, Químicas y Ambientales) suministrados a los sistemas *In Vitr*o e *In Situ* de Biorremediación determinan la velocidad con la que esta se lleva a cabo (Fingerman, M. y Nagabhushanum, 2005). Los Consorcios CMic 4 y CMic 10 sometidos a estimulación mineral (MMM), temperatura estable a 30°C, pH 7 y aireación constante (5 min./día) obtuvieron resultados satisfactorios por la NOM 138 SEMARNAT/SS-2003 a los 5 días de tratamiento en suelo arenoso impactado con 3,000 ppm. Similarmente Arbabi *et al*. (2005) trabajaron una Biorremediación *In Vitr*o con estimulación mineral, 30°C, pH 7, variando únicamente la oxigenación constante en agitadores automatizados a 200 rpm, obteniendo resultados favorables en 7 días de tratamiento. Una recopilación de autores (Bartha y Bossert-1984, Cooney-1984, Foght *et al*.-1996, Venosa y Zhu-2003, Pelletier *et al*.-2004, Delille *et al*.-2004) quienes utilizaron condiciones similares de degradación fue realizada por Nilanjana y Preethy (2010) teniendo en consideración la importancia de una estimulación mineral de nitrógeno y fosforo, una

temperatura entre 30 y 40°C combinada con un estímulo de oxigenación, conlleva a estimular el metabolismo de microorganismos capaces de utilizar a los hidrocarburos como fuente de carbono, Biorremediando diferentes tipos de suelo en menos de 15 días. Los microorganismos responsables de la Biorremediación (CMic 4 y CMic 10) se monitorearón mediante una tinción gram del suelo, obteniendo resultados variables entre bacterias gram negativas los primeros 15 días, y bacterias gram positivas durante el resto de los 30 días, lo cual depende completamente de la población de los consorcios que en el caso de Milic *et al* (2008) represento en su totalidad microorganismos gram positivos y en el caso de Nelson *et al* (2010), Helmke *et al.* (2010) y Ganti *et al.* (2011) represento en la mayoría microorganismos gram negativos al tener presente mayoritariamente en sus consorcios a microorganismos como *Pseudomonas spp*. responsables de la mayor parte de la degradación de hidrocarburos.

La eficiencia de los Consorcios es comparada con los resultados obtenidos por autores destacados que mencionamos en la sección de Antecedentes, observando la siguiente gráfica:



La figura 8, nos muestra una comparativa entre la tasa de degradación de diferentes consorcios reportados en literatura comparados con los reportados en la presente investigación.

Comparando los resultados de degradación de hidrocarburos por día los consorcios microbianos CMic 4 (211.6 ppm/día) y CMic 10 (174.2 ppm/día) superan a la degradación obtenida por Arababi *et al*. (35 ppm/día) y Thomassin-Lacroix *et al.*(100 ppm/día). Sin embargo los consorcios se ven ampliamente superados por otros resultados de consorcios probados por Fava *et al*.(400 ppm/día), Milic *et al*. (500 ppm/día) y Park *et al*.(800 ppm/día). Esta diferencia en degradación por día, es una característica única que posee cada consorcio al estar expuestos bajo diferentes condiciones ambientales además de interactuar con diversos contaminantes recalcitrantes (Abd-El-Haleem *et al*., 2009) por lo que nuestros consorcios tienen un resultado aceptable para estar catalogados dentro de los tratamientos más eficaces de Biorremediación.

Los bioensayos con lombrices de tierra (*Eisenia foetida*) son ampliamente reconocidos como prueba para evaluar la toxicidad de suelos contaminados (Dorn *et al*., 1998; Wilson et al., 2002, Cuevas-Díaz *et al.* 2008) debido a la capacidad de esta para mejorar la difusión de nutrientes en los ecosistemas reflejando condiciones favorables de vida para los organismos superiores (flora y fauna). Complementario a una remediación de suelo contaminado por hidrocarburos de tipo Diesel, sugerimos la implementación de esta prueba *In Situ* bajo diferentes condiciones para asegurar que se restablecerán las condiciones de suelo fértil al observar que el tratamiento aplicado con los consorcios CMic 4 y CMic 10 presenta diferencia significativa con respecto a un suelo natural ($\alpha<0.05$) reflejando este resultado en un aumento del peso de la lombriz de tierra *Eisenia foetida*.

CONCLUSIONES

Los consorcios microbianos CMic 4 y CMic 10 toleran condiciones de concentración absoluta a hidrocarburos de tipo Diesel sin detener su crecimiento a 30°C.

Las condiciones de temperatura (30°C), estimulación mineral (MMM), pH (7) y oxigenación (agitación) estimulan el crecimiento de los consorcios aplicados que lograron degradar el Diesel a niveles satisfactorios por la NOM 138 SEMARNAT/SS-2003 en 5 días y casi su degradación total en 30 días de tratamiento In Vitro.

Las condiciones naturales de un suelo impactado pueden ser restablecidas gracias a una remediación de los consorcios microbianos CMic 4 y CMic 10 considerando los resultados del ensayo de toxicidad donde el suelo remediado con los consorcios presenta las mismas características que cualquier suelo natural.

Las tasas de degradación de CMic 4 y CMic 10 son competitivas comparadas con el resto de los consorcios reportados en literatura y pueden ser utilizados para Biorremediar suelos impactados.

RECOMENDACIONES

El aislamiento de microorganismos con capacidad degradadora de hidrocarburos abre una posibilidad para futuras aplicaciones de los consorcios en tratamientos de Biorremediación *In Situ* como opción al confinamiento y/o destrucción térmica del suelo contaminado con estos. La identificación molecular de consorcios microbianos mediante técnicas como la Pirosecuenciación, son ampliamente recomendadas para caracterizar de los consorcios responsables de llevar acabo la degradación de hidrocarburos. Una vez determinada la población microbiana de los consorcios, se podrá realizar curvas de crecimiento mediante técnicas moleculares durante la Biorremediación, teniendo como principal beneficio el análisis cuantitativo de la tasa de crecimiento comparada con la tasa de degradación de hidrocarburos.

BIBLIOGRAFIA.

A. D. Venosa and X. Zhu, "Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands," Spill Science and Technology Bulletin, vol. 8, no. 2, pp. 163–178, 2003.

Abalos,*et al*. 2001 Physico chemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by Pseudomonas aeruginosa AT10 from soybean oil refinery wastes. Langmuir. pp. 17:1367-1371.

Abd-El-Haleem *et al*. 2009. Isolation and characterization of polyaromatic hydrocarbons-degrading bacteria from different Qatari soils. African Journal of Microbiology Research Vol. 3(11) pp. 761-766

Albert D. Venosa y Xueqing Zhu (2005). Bioremediation of aquatic and terrestrial ecosystems. Enfield, NH, USA: Science Publishers.

Alexander, M. 1999. Biodegradation and Bioremediation. Segunda edición.Academic Press, Inc.,San Diego

Andreoni, *et al.* 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. Chemosphere. pp. 57: 401-412.

Arbabi *et al*. 2009. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Petroleum Contaminated Soils. Iran. J. Chem. Chem. Eng. Vol. 28, No. 3.

Arotiowa *et al.* 2008. Kinetic Model for Bioremediation of Crude Oil Polluted Soil Using Pseudomonas aeruginosas as a Biodegrader. International Journal of Soft Computing. 1816-9503

Atagana, *et al*. 2003. Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. Biodegradation. pp. 14: 297–307

Barkay, *et al.* 1999 Enhancement of Solubilization and Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons by the Bioemulsifier Alasan Applied and Environmental Microbiology. pp. 2697–2702

Bouchez *et al*. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. Appl. Microbiol. Biotechnol. pp. 43:156-164.

Bouchez, *et al*. 1999. Efficiency of defined strains and of soil consortia in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures. Biodegradation. pp. 10:429-435.

Brigmon et al. 2011. Surfactant biocatalyst for remediation of recalcitrant organics and heavy metals. No. Pat: 7906315.

Cubitto MA *et al*. 2004 Effects of Bacillus subtilis O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. Biodegradation 15: 281-287

Cuevas-Díaz *et al.* 2008. Ensayos Toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo, La experiencia en México. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. 978-968-817-882-9. pp. 211-223.

D. Delille, F. Coulon, and E. Pelletier, "Effects of tem-perature warming during a bioremediation study of natu-ral and nutrient-amended hydrocarbon-contaminated sub-Antarctic soils,"Cold Regions Science and Technology, vol. 40, no. 1-2, pp. 61–70, 2004.

Daniel C. Harris 2007. Análisis Químico Cuantitativo. Sexta Edición. Editorial Reverté S.A.

Daniel, W. W. 2004. Bioestadística. Limusa Wiley. Cuarta Edición. p. 298-308

Deane. 1983. The First Industrial Revolution. Cambridge University Press. Second Edition. Pp. 13-20

Dorn, P. B., T. E. Vipond J. P. Salanitro y H. L. Wisniewksi. 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soil using earthworms, microtox and plants. Che-mosphere37(5):845-860.

E. Pelletier, D. Delille, and B. Delille, "Crude oil bioremedi-ation in sub-Antarctic intertidal sediments: chemistry and toxicity of oiled residues," Marine Environmental Research, vol. 57, no. 4, pp. 311–327, 2004.

Fava *et al.* 2010. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. Microbial Cell Factories.9:10

Fenyvesi *et al.* 2005 Chemosphere, Volume 60, Issue 8. pp. 1001-1008

Fingerman, M. y Nagabhushanum, R. (2005). Bioremediation of aquatic and terrestrial
Ganti Satyanarayana. 2011. Green Process for Production of Biosurfactants or Biopolymers through Waste Oil Utilization. No. Pat: US 2011/0151100.

Gerardo Gil Valdivia y Susana Chacón Domínguez, coordinadores Abril 2008. La crisis del petróleo en México. Foro Consultivo Científico y Tecnológico. pp.15-25

Gill et al. 1996. Process for bioremediation of soils. No. Pat: 5525139

Helmke et al. 2010. Bioremediation method for accelerated biological decomposition of petroleum hydricarbons in sea ice-covered polar regions, and bacteria and enzyme mixtures as agents for carring out that method. No. Pat: US 2010/0051541.

J. J. Cooney, "The fate of petroleum pollutants in fresh water ecosystems," in Petroleum Microbiology,R.M. Atlas, Ed., pp. 399–434, Macmillan, New York, NY, USA, 1984

J. M. Foght, D. W. S. Westlake, W. M. Johnson, and H. F. Ridgway, "Environmental gasoline-utilizing isolates and clinical isolates ofPseudomonas aeruginosaare taxonomically indistinguishable by chemotaxonomic and molecular tech-niques,"Microbiology, vol. 142, no. 9, pp. 2333–2340, 1996.

Jeon et al. 2011. Microbial strain Alteromonas SP. SN2 for degrading polycyclic aromatic Hydrocarbon. No. Pat: US 2011/0129902.

Jerrold H. Zar. 2009. Biostatistical Analysis. Pearson. 5th Edition.

Anders R. Johnsen, Stine Schmidt, Trine K. Hybholt, Sidsel Henriksen, Carsten S. Jacobsen, Ole Andersen. 2007. Strong Impact on the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Degrading Community of a PAH-Polluted Soil but Marginal Effect on PAH Degradation when Priming with Bioremediated Soil Dominated by Mycobacteria. Applied and Environmental Microbiology, Mar. 2007, p. 1474–1480.

Kanaly RA, Harayama S. 2010. Advances in the field of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. Microb Biotechnol. Mar;3(2):136-64. doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00130.x

Kerfoot. 2008. Environmental remediation method and system. No. Pat: 7442313.

Kukor et al. 2003. Remediation of contaminates including low bioavailability hydrocarbons. No. Pat: 6623211.

Leffler *et al*. 2005 Oil & Gas Production in Nontechnical Language October. Edition 3 Corporation. pp. 40-55.

Lennox E. S. 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. Virology. 1:190-206.

Malkawi *et al*. 2009. Investigation in the ability of soil bacterial isolates to degrade petroleum hydrocarbons. International Journal of integrative biology. 097-8363

Mascarelli A. 2010. Deepwater Horizon: After the oil. Nature. Sep 2;467(7311):22-4 O.A. Olu-Arotiowa, R.O. Yusuf, F. Adelowo-Imoekparia. 2008. Kinetic Model for Bioremediation of Crude Oil Polluted Soil Using Pseudomonas aeruginosas as a Biodegrader. International Journal of Soft Computing. 1816-9503.

Milić, *et al.* 2009. Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: composition of the microbial consortium. Journal of the Serbian Chemical Society. JSCS–3846

Molina *et al*. 2011 The pGRT1 plasmid of Pseudomonas putida DOT-T1E encodes functions relevant for survival under harsh conditions in the environment. Environ Microbiol. (8):2315-27.

Nelson et al. 2010. Method of growing bacteria for use in wastewater treatment. No. Pat: 7658851.

Ortínez Brito *et al.* 2003. La Restauración de Suelos Contaminados con Hidrocarburos en México. Gaceta Ecológica, Octubre-Diciembre, Numero 069. Instituto Nacional de Ecología. pp. 83.92

Park et al.2008. Novel microorganisms having oil biodegradability and method for Bioremediation of oil-contaminated soil. No. Pat: US 2008/0020947

Perriello et al. 2000. Bioremediation of petroleum pollutants with alkane-utilizing bacteria. No. Pat: 6110372.

R. Bartha and I. Bossert, 1984 "The treatment and disposal of petroleum wastes," in Petroleum Microbiology,R.M.Atlas. Macmillan, New York, NY, USA,. pp. 553–578

Richard L. Raymond et al. 1972 Reclamation of hydrocarbon contaminated ground waters. No. Pat: 3846290

Robert A. Kanaly and Shigeaki Harayama. 2000. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. Journal of Bacteriology. Vol. 182, No. 8. pp. 2059–2067

Ruiz. 1991. Aceites lubricantes para motores a gasolina. En: Curso de educación continuada fundamentos básicos de lubricación. Bogotá D.E.

Satyanarayana. 2001. Biodispersion as a method for removal of hydrocarbon oil from marine aqueous environments. No. Pat: US 2001/0019030.

Saul et al. 2012. Bioremediation methods No. Pat:8187862.

Saval. 1997. La Biorremediación como alternativa para la limpieza de sitios contaminados con hidrocarburos. En Memorias del Seminario Internacional sobre Restauración de Sitios Contaminados, Instituto Nacional de Ecología, México, pp. 141-147.

Sinko Morgan Walker. 2012. R. rhodochrous and Linoleic Acid As Bioremediation Agents of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Diesel-Contaminated Soil. No. Pat: US 2012/0100598

Thomassin-Lacroix EJM, Yu Z, Eriksson M, Reimer KJ, Mohn WW (2001) DNA- and culture-based characterization of a hydrocarbon-degrading consortium enriched from Arctic soil. Can J Microbiol 47:1107–1115

Thomassin-Lacroix *et al.* 2002 Biostimulation and bioaugmentation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. Applied Microbiology and Biotechnology. 59: 551-556

Venosa. *et al*. 2010. Biodegradability of Lingering Crude Oil 19 Years after the Exxon Valdez Oil Spill. Environ. Sci. Technol. 44, 7613–7621

Viñas *et al*. 2005Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil Applied and Environmental Microbiology, Nov. 2005, p. 7008–7018.

Wilson, J. J., J. Hathcer y J. S. Goudey. 2002. Ecotoxicological endpoints for contaminated site remediation. Annalli dell' Istituto Superiore di Sanitá38(2): 143-147.

Zhu *et al* 2007. Enhanced crude oil biodegradability of Pseudomonas aeruginosa
ZJU after preservation in crude oil-containing medium. World J Microbiol Biotechnol 23:7–14