



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS
CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS,
MEDIANTE LA BIOESTIMULACIÓN CON LODOS
RESIDUALES**

Tesis
que para obtener el grado de
**Maestra en Ciencias en Biosistemática y
Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas**

Presenta
Romina Sapuppo

Dra. Patricia Zarazúa Villaseñor
Directora

Zapopan, Jalisco

Enero de 2017



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS, MEDIANTE LA BIOESTIMULACIÓN CON Lodos Residuales

Por

ROMINA SAPUPPO

Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos
Naturales y Agrícolas

Aprobado por:

Dra. Patricia Zarazúa Villaseñor
Directora de Tesis e integrante del jurado

12/Ene/2017
Fecha

Dr. Diego Raymundo González Eguiarte
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

12/Enero/2017
Fecha

Dra. Josefina Casas Solís
Asesora del Comité Particular e integrante del jurado

12/Enero/2017
Fecha

M. en C. José Pablo Torres Morán
Sinodal e integrante del jurado

12-Enero-2017
Fecha

Dr. Ramón Rodríguez Macías
Sinodal e integrante del jurado

12-Enero-2017
Fecha

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi amor y admiración a mis padres por darme una carrera para mi futuro y por creer en mis capacidades aunque hemos pasado momentos difíciles, me han siempre brindado su comprensión, apoyo y amor; son las únicas personas que me han dado siempre la oportunidad de poder seguir mis sueños; dejándome volar libre hicieron realidad esta nueva etapa de mi vida en tierra mexicana. Les debo todo a mis padres, gracias a sus sacrificios nunca me han dejado sola y no obstante la distancia siempre les tengo presentes en mi corazón y en mi alma.

A mi hermana Debora y mi hermano Salvatore, que a pesar de las diferentes formas de vida han siempre creído en mí.

A toda mi familia de Italia, tías, primas, primos, sobrinas y sobrinos que desde lejos me han apoyado con su admiración en todo mis alcances académicos.

A todos mis amigos de vida, amigos del mundo que siempre han escuchado mis ideas y me han cargado con mucha energía y luz en los momentos menos favorables, destacando Gabbo, Elena, Gregor, Ludovica, Carmela, las hermanas Stefania y Ornella, las hermanas Dina y Gaia, Silvia y Alfio.

A Michela, una maravilla de persona, amiga fallecida que siempre está presente en mi corazón y en mi mente.

A mis nuevos amigos de vida mexicana que me han dado siempre coraje en los momentos desfavorables, recordándome siempre que yo pudiera llegar a donde quisiera y haciéndome sentir siempre en mi casa, destacando Amilkar, Gabriel, Denisse, Memo y Omar. Gracias hermoso México por recibirme con amor.

Al Jefe Delegacional de La Villita el Señor Catarino Regalado Aguilar que junto al Jefe de Vigilancia Ejidal el Señor Luis Pulido me brindaron asesoría, tiempo y compañía en todos mis muestreos a la zona afectada por el derrame de hidrocarburos que fue el tema en estudio de toda esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por el apoyo recibido con la beca No. 572411, con la cual pude realizar mis estudios de maestría en México.

A mi estimada Directora de Tesis la Dra. Patricia Zarazúa Villaseñor que sin su apoyo logístico no hubiera podido llegar a hacer parte de la presente carrera de maestría CONACYT. Agradezco sus enseñanzas académicas y humanas en los momentos más penosos, tanto en el trabajo como en la vida, gracias a ella aprendí mucho en esta experiencia académica y por toda la confianza demostrada en su dirección que fue única.

A la Dra. Josefina Casas Solís por toda su paciencia ofrecida, por confiar en mí en toda la fase experimental en su laboratorio. También quisiera agradecer su comprensión y sensibilidad en otros aspectos no científicos, pero también de gran importancia para las personas.

Al Dr. Diego Raymundo González Eguarte por su asesoría, siempre estuvo disponible en brindarme consejos y justas direcciones cuando estaba un poco desequilibrada en este nuevo contexto académico.

A toda la Junta Académica porque gracias a sus tiempos de respuesta pude ser parte de este programa CONACYT; también agradezco por haberme brindado comprensión en los momentos de contrastes culturales sucedidos.

A todos los que forman parte del Laboratorio de Agrología del Departamento de Desarrollo Rural Sustentable, que me brindaron asesoría, de lo cual aprendí mucho.

Al personal del Departamento de Ingeniería de Proyectos (CEPA) del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías (CUCEI), por su asesoría en mis análisis cromatográficos y en mi estancia transcurrida en este centro universitario, destacando el apoyo de Gustavo que me ayudó a la interpretación de los cromatogramas y al Dr. Walter Ramírez Meda por transmitirme su experiencia sobre los hidrocarburos y estimularme a seguir este trabajo de investigación.

A todos mis compañeros de maestría y doctorado que me han hecho disfrutar la ciencia, espíritu científico y creatividad, Paulina, Juan Manuel, Fernando, Oscar, Benjamín, William, Gaby y Mónica, agradezco su ayuda en los momentos más pesados.

Al personal de Protección Civil de Tala para su asesoría profesional y sus recomendaciones.

ÍNDICE GENERAL

	ÍNDICE DE CUADROS	vi
	ÍNDICE DE FIGURAS	viii
	Resumen	1
	Abstract	3
1.	INTRODUCCIÓN	4
2.	ANTECEDENTES	6
2.1.	Los hidrocarburos totales de petróleo (HTP)	6
2.1.1.	Clasificación de los hidrocarburos	7
2.1.2.	Contaminación de suelo por hidrocarburos	10
2.1.3.	Regulación y legislación ambiental en materia de residuos peligrosos	13
2.1.4.	Situación en México de la aplicación de las técnicas biológicas de saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos	14
2.2.	Tecnologías de remediación	15
2.2.1.	Biorremediación	16
2.2.2.	Bioestimulación	17
2.2.3.	Biodegradación	17
2.2.4.	Factores que afectan la biorremediación	18
2.3.	Microorganismos del suelo	20
2.3.1.	Bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos	20
2.3.2.	Degradación bacteriana de los hidrocarburos	22
2.4.	Regulación de los lodos residuales y de los biosólidos estabilizados	23
2.4.1.	Uso de lodos estabilizados como fuente alterna de nutrientes	25
2.5.	Efecto de contaminantes de HTP en plantas	25
3.	HIPÓTESIS	27
4.	OBJETIVOS	28
4.1.	Objetivo general	28
4.2.	Objetivos específicos	28
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	29

5.1.	Materiales	29
5.1.1.	Área de estudio	29
5.1.2.	Materiales utilizados en campo	30
5.1.3.	Material y equipo de laboratorio	31
5.1.4.	Lodos residuales utilizados en el estudio	33
5.1.5.	Material vegetal	34
5.2.	Métodos	35
5.2.1.	Primera etapa: caracterización del suelo contaminado y no contaminado, así como la obtención de las bacterias autóctonas a utilizar en el experimento <i>ex situ</i>	35
5.2.2.	Segunda etapa: instalación del experimento <i>ex situ</i> para evaluación de tratamientos de biorremediación	38
5.2.2.1.	Determinación del contenido de HTP en el suelo al inicio del experimento <i>ex situ</i>	39
5.2.2.2.	Preparación del experimento <i>ex situ</i> de biorremediación	40
5.2.3.	Prueba biológica en plántulas de maíz	43
5.3.	Análisis estadísticos	44
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
6.1.	Primera etapa: caracterización del suelo contaminado y no contaminado, así como la obtención de las bacterias autóctonas a utilizar en el experimento <i>ex situ</i>	45
6.1.1.	Caracterización fisicoquímica del suelo	46
6.1.2.	Obtención de cepas bacterianas nativas para el experimento <i>ex situ</i>	49
6.2.	Segunda etapa: evaluación de tratamientos de biorremediación y prueba biológica	53
6.2.1.	Contenido de HTP en el suelo al inicio del experimento <i>ex situ</i>	54
6.2.2.	Contenido de HTP en el suelo al final del experimento <i>ex situ</i>	56
6.2.3.	Caracterización fisicoquímica del suelo al final del experimento <i>ex situ</i>	59
6.2.4.	Evaluación de las concentraciones de cepas bacterianas al final del experimento <i>ex situ</i>	62
6.3.	Tercera etapa: prueba biológica	65

6.3.1.	Resultados de la emergencia de plántulas de maíz	66
6.3.2.	Resultados de la longitud del tallo de plántulas de maíz	68
6.3.3.	Resultados de la longitud de raíz en plántulas de maíz	70
7.	CONCLUSIONES	73
8.	LITERATURA CITADA	75

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Clasificación de los hidrocarburos.	9
Cuadro 2	Parámetros que influyen en el transporte de contaminantes en suelo.	11
Cuadro 3	Principales ventajas y desventajas del uso aplicación de los métodos biológicos, fisicoquímico y térmicos.	16
Cuadro 4	Géneros de bacterias degradadoras de hidrocarburos utilizadas en biorremediación (Tomado de Leyva, 2006).	21
Cuadro 5	Condiciones seleccionadas en base al tipo de columna, así como a la sensibilidad de respuesta y separación de picos de los diversos compuestos que conforman la gasolina.	32
Cuadro 6	Medio de cultivo (caldo basal) usado para el aislamiento de los microorganismos presentes en el suelo contaminado con hidrocarburos.	37
Cuadro 7	Características del suelo contaminado y no contaminado.	47
Cuadro 8	Crecimiento bacteriano de las 20 cepas aisladas en $\text{Log}_{10}\text{UFC/ml}$ por el ensayo de sobrevivencia en un medio basal con levadura (0.4%) y 1% de gasolina con su respectiva morfología colonial.	50
Cuadro 9	Sobrevivencia de bacterias en medio basal con levadura (0.4%) y las concentraciones de 1.5% y 2% de gasolina.	51
Cuadro 10	Resultados de las muestras de suelo contaminado y no contaminado recolectadas el 30 de noviembre de 2015 analizadas por el método EPA 8015B-1996, por GC/FID.	55
Cuadro 11	Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo (DOF, 2005).	56
Cuadro 12	Medias climáticas mensuales de la estación meteorológica de la Base Aérea Militar No. 5, Zapopan, Jalisco.	59
Cuadro 13	Caracterización fisicoquímica de los tratamientos de biorremediación en la etapa final del experimento <i>ex situ</i> .	60
Cuadro 14	Medias y desviaciones estándar del LnUFC g^{-1} , resultantes de los	62

	tratamientos de biorremediación en el experimento <i>ex situ</i> .	
Cuadro 15	ANOVA de LnUFC g ⁻¹ de los tratamientos de biorremediación en la etapa final del experimento.	63
Cuadro 16	Etapas de germinación de las 4 semillas por maceta de cada muestra de suelo en el experimento biológico.	67
Cuadro 17	Resultado de la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis de la emergencia de plántulas en los tratamientos evaluados.	68
Cuadro 18	ANOVA de las longitudes del tallo de todos los tratamientos evaluados.	68
Cuadro 19	Prueba POST HOC Tukey de comparación de medias para la longitud de tallo de plántulas de maíz en el experimento biológico.	70
Cuadro 20	ANOVA de las longitudes de la raíz de todos los tratamientos evaluados.	71
Cuadro 21	Prueba POST HOC Tukey de comparación de medias para la longitud de raíces de plántulas de maíz en el experimento biológico.	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Las etapas de la Teoría de Engler (1911) que determinan la formación orgánica del petróleo mediante la descomposición por microorganismos.	7
Figura 2	Ubicación del ducto afectado en el kilómetro 284 de la carretera Santa Anita a Salamanca, de PEMEX, en la localidad de La Villita, en Tala, Jalisco, México.	29
Figura 3	Área afectada por el derrame de hidrocarburos en la Delegación de La Villita, Municipio de Tala, Jalisco, México.	30
Figura 4	Planta tratadora de aguas residuales (PTAR) del Municipio de Chapala, Jalisco.	33
Figura 5	Tratamientos de los lodos residuales estabilizados de la PTAR de Chapala.	34
Figura 6	Primer muestreo de suelo contaminado con hidrocarburos de 20-35 cm de profundidad en la zona afectada.	35
Figura 7	Cubetas usadas para el experimento <i>ex situ</i> y muestreo en la Delegación La Villita, Jalisco, México.	39
Figura 8	Muestras de suelo destinadas a los análisis cromatográficos en la fase inicial del experimento de biorremediación.	40
Figura 9	Vista de la instalación del experimento de biorremediación en el área del CUCBA.	41
Figura 10	Biomasa bacteriana seleccionada para el experimento de biorremediación <i>ex situ</i> .	41
Figura 11	Situación ambiental encontrada en el suelo afectado por el derrame de HTP en el muestreo realizado el lunes 30 de marzo de 2015.	46
Figura 12	Sobrevivencia con 1.5 y 2% de gasolina de cepas autóctonas aisladas del derrame de HTP en la localidad de la Villita seleccionadas en la prueba de sembradas individualmente y en consorcios.	51

Figura 13	Sobrevivencia bacteriana de cepas autóctonas de la Delegación La Villita a 1.5% de gasolina aisladas del derrame con hidrocarburos en Tala, Jalisco.	53
Figura 14	Cromatogramas de las muestras de suelo contaminado (izquierda) y no contaminado (derecha) recolectadas en el área en estudio de la Delegación de La Villita, Jalisco, México el lunes 30 de noviembre de 2015 previo a la instalación del experimento de biorremediación <i>ex situ</i> .	55
Figura 15	Cromatogramas de todos los tratamientos del experimento de biorremediación en la etapa final.	57
Figura 16	Cromatograma de la muestra de suelo contaminado recolectada en el área en estudio de la Delegación de La Villita, Jalisco, México el martes 19 de abril de 2016.	58
Figura 17	Gráfica “Box plot” de las concentraciones de UFC g ⁻¹ entre los tratamientos del experimento.	64
Figura 18	Semillas de maíz germinadas por cada muestra de suelo evaluado el lunes 5 de mayo de 2016.	66
Figura 19	Vista de la prueba biológica de todas las muestras del suelo en estudio contaminado con HTP y no contaminado, en la etapa final de la biorremediación.	70

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó el proceso de biorremediación con bacterias autóctonas en un suelo contaminado por un derrame de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) originado en Jalisco, mediante la bioestimulación de lodos residuales estabilizados (biosólidos) proveniente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) del municipio de Chapala. El suelo afectado está ubicado en la delegación La Villita, municipio de Tala, Jalisco, México. Se realizó el experimento dentro del área del CUCBA bajo condiciones naturales, por lo cual se extrajeron aproximadamente 150 kg de suelo contaminado de la delegación de La Villita, los cuales se homogeneizaron y se sometieron por triplicado a los siguientes tratamientos: el primer Tratamiento consistió en la aplicación de una masa bacteriana seleccionada degradadora de hidrocarburos; el segundo incluyó la aplicación de lodos biosólidos al primero, y el tercero consistió en un grupo de control sin tratamiento (manteniendo las condiciones encontrados en el derrame de HTP). En primer lugar se realizó el aislamiento bacteriano de las cepas presentes en el suelo y, mediante pruebas de sobrevivencia al medio contaminado por gasolina, se incrementó la concentración del contaminante por 1, 1.5 y 2% en las muestras, para seleccionar las cepas bacterianas que manifestaron mayor crecimiento y resistencia al sobrevivir en este medio contaminado. Posteriormente, se instaló el experimento de biorremediación por una duración de 90 días y se cuantificaron los HTP en la fase inicial y final del experimento mediante el análisis cromatográfico de gases. Se evaluaron las características fisicoquímicas del suelo contaminado al inicio y al final de los tratamientos y se compararon los efectos de los tratamientos de biorremediación en el suelo contaminado tratado. También se recolectó una muestra de suelo sin alteraciones próximo a la zona afectada por el derrame de hidrocarburos, para obtener sus características fisicoquímicas con el fin de determinar los efectos fitotóxicos del contaminante en todas las muestras mediante la prueba biológica de germinación y para observar los resultados en relación al desarrollo vegetativo de semillas de maíz que se germinaron en las muestra. Con los resultados obtenidos se determinó que el suelo en estudio tratado con la técnica de biorremediación puede tener un uso alternativo también con fines agrícolas.

Esta investigación provee la información necesaria para poder evaluar la factibilidad de un tratamiento de biorremediación para un suelo afectado por los derrames de HTP con las ventajas de bajos costos y alta eficiencia de remoción medio plazo.

ABSTRACT

In the present investigation, the process of bioremediation of soil contaminated with hydrocarbons (HTP). Was evaluated using local bacteria. Thus, stabilized and biostimulated sewage sludge from the wastewater treatment plant (PTAR) in Chapala (Jalisco) applied to soil samples which were contaminated by a previous petrol spill. The contaminated soil originates from the political delegation of *La Villita*, municipality of *Tala*, Jalisco, Mexico. Experimentation was performed inside the CUCBA under natural conditions. Therefore, thus approximately 150 kg of contaminated soil was extracted from the above-mentioned site, homogenized and treated by the following treatments: application of a selected bacterial mass which degrades hydrocarbons; same procedure as the first, with the addition of solid bioactive sludge; and a control group without any treatment (maintaining the conditions at the site of the spill). Firstly, the bacterial strains contained in the soil were isolated and underwent a selection process (augmenting the hydrocarbon concentration in the samples by steps of 1, 1.5 and 2%) in order to determine the viability of the strains, as well as their growth and resistance in the contaminated medium.

The second step in the application consisted of observing the bacteria samples over a 90-day experimentation period, where the initial and final concentrations of hydrocarbons, were determined by gas chromatography. The physicochemical properties of the soil samples at the beginning and the end of the experimentation period were compared in order to determine the efficiency of the bioremediation treatments.

Furthermore, a non-contaminated soil sample was taken from a nearby site in *La Villita* for the determination of the phytotoxic effects of the contaminant on the germination of corn grains (biological germination test).

The obtained results approve the use of soils, which were treated by the technology of bioremediation under the methods described above in agricultural applications. The present investigation provides the necessary information for judging the feasibility of a bioremediation treatment on soil contaminated by hydrocarbons. The additional beneficial factors such as low implementation cost and high biodegradation efficiency on a midterm time scale sustain the technology of bioremediation of soils as a viable alternative.

1. INTRODUCCIÓN

En México, los problemas de contaminación son de gran importancia, considerando su impacto ambiental creciente sobre la degradación de suelo y la generación de residuos. Durante muchos años y hasta hace poco, nadie se preocupaba por el destino de los residuos generados, dando por hecho que la naturaleza limpiaba el ambiente, pero fue cambiando la naturaleza y composición de los residuos, y al aumentar su cantidad y complejidad, esta capacidad (degradadora y amortiguadora) empezó a alterarse, y en México, en donde no existe registro cabal de todos estos sitios contaminados, resulta un problema muy grave (Romero *et al.*, 2009). De acuerdo con datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática); la superficie de suelos degradados por causas de contaminación en 1999 fue de 25,967 Km² (Martínez-Prado *et al.* 2011); aunado a lo anterior, la intensa actividad de otras industrias, junto con accidentes durante el almacenamiento, transporte o trasvase de sustancias (fugas, derrames, incendios, robos de combustible) y la disposición clandestina e incontrolada de residuos (Posada *et al.*, 2005; Vallejo *et al.*, 2005) citados por Narváez-Flores *et al.* (2008), contribuyen en gran medida a la contaminación de suelos por hidrocarburos (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, SEMARNAT, 2002) citado por Volke y Velasco (2002).

En el año 2009 se detectaron 11 sitios contaminados con hidrocarburos en Veracruz, 5 en Tamaulipas y 8 en Oaxaca. De consecuencia, en referencia a las emergencias ambientales, se reporta que en el periodo de 1993 a 2003 se presentó en México un promedio de 521 emergencias asociadas con materiales y residuos peligrosos. Dentro de los compuestos peligrosos más comúnmente involucrados se identificaron el petróleo, con el 42.1% y sus derivados, con el 20.02% (gasolina, combustible, diésel); el gas licuado de petróleo con el 3.19%, el gas natural con el 2.3%, y otras sustancias que constituyeron el 27.71%. Estas estadísticas muestran la magnitud de los impactos ocasionados por los hidrocarburos, y de esta forma la necesidad de aplicar proyectos de saneamiento de estos suelos contaminados por hidrocarburos totales de petróleo (HTP) (Cuevas *et al.*, 2012).

Esta investigación se enfoca en el estudio de la técnica de Biorremediación que surge como una alternativa eco-tecnológica para reducir o mitigar el daño causado en el suelo por los derrames de estos compuestos dando una respuesta a mediano plazo y, por estas razones la biorremediación biológica se ha perfilado como una opción muy atractiva por ser relativamente económica y amable con el ambiente al disminuir el daño, independientemente de la zona afectada (suelos, lagos, zonas freáticas, ríos o playas) por procesos biológicos y físicos, ya que de otro modo los hidrocarburos tienen como destino final los mares y océanos (Shanidul y Tanaka, 2004) citados por Narváez-Flores *et al.* (2008).

La biorremediación biológica juega un papel importante en donde diversos microorganismos como bacterias degradan, remueven o transforman diversos hidrocarburos presentes en suelos, trabajando de manera individual o mediante sinergias, dentro de un consorcio microbiano autóctono del suelo examinado. Esta estrategia biológica depende de las actividades catabólicas de los organismos, y por consiguiente de su capacidad para utilizar los contaminantes como fuente de alimento alternativo de energía (Van Deuren *et al.*, 1997) citado por Velasco y Volke (2007); sin embargo, el crecimiento bacteriano nativo en este ambiente contaminado está limitado por diversos factores, tales como la baja biodisponibilidad de algunos nutrientes, especialmente nitrógeno (N). Por lo anterior, en este trabajo se utilizaron dos estrategias para contrarrestar dichas limitaciones y fomentar la actividad degradadora de la flora microbiana nativa: 1) la bioestimulación de lodos residuales estabilizados (biosólidos) provenientes de la Planta Tratadora de Aguas Residuales de Chapala, Jalisco, y 2) la bioaugmentación a través de adición de cepas microbianas nativas seleccionadas con atributos especiales para sobrevivir en este medio contaminado. Con la adición de un material rico en nitrógeno y fósforo, como son los lodos residuales estabilizados, se propiciará el incremento microbiano de las cepas nativas seleccionadas en el suelo en estudio.

Jalisco presentó más de 1000 casos de robo de combustible en el período de 2010 a 2015 (Toledo, 2016), varios de los cuales han presentado fugas considerables, provocando un incremento en la contaminación de suelos, tal es el caso del suelo contaminado por un robo de combustible en el ducto de Petróleos Mexicanos (PEMEX) Santa Anita-Salamanca en la Delegación de La Villita, Jalisco, que se presentó el día 18 de mayo de 2014.

2. ANTECEDENTES

En México existen extensas áreas contaminadas con hidrocarburos de petróleo debido principalmente a derrames, así como a las actividades propias de la industria petrolera. Este tipo de compuestos, se acumulan en ecosistemas marinos y suelos, siendo responsables de su deterioro. Algunos suelos contaminados en México, contienen concentraciones de hidrocarburos hasta de 450,000 mg kg⁻¹ (Gallegos-Martínez *et al.*, 2000), citados por Riveroll-Larios *et al.* (2015). Por dichas razones, hoy en día una de las preocupaciones de las autoridades ambientales y de investigación científica es el desarrollo de tecnologías eficientes y económicamente factibles que permitan la eliminación de este tipo de contaminantes.

En 2013, Jalisco se situó en el tercer sitio entre las entidades federativas con más casos de robo de combustible en los ductos de PEMEX, varios de los cuales han presentado fugas considerables, provocando un incremento en la contaminación de suelos. El día 18 de mayo de 2014 se presentó una fuga de combustible en el ducto de PEMEX Santa Anita-Salamanca en la Delegación de La Villita, Jalisco, México (Informador.mx, 2014). El derrame de combustible con una altura aproximada de 20 m, contaminó un promedio de 400 m² visibles de superficie, siguiendo el derrame, posteriormente, a introducirse en una grieta y al subsuelo. El problema de los suelos contaminados con hidrocarburos es grave en cuanto son tóxicos para los seres vivos, ya que son mutagénicos y carcinogénicos (Flores *et al.*, 2001) (citados por Álvarez y Díaz, 2016).

2.1. Los hidrocarburos totales de petróleo (HTP)

Los hidrocarburos totales de petróleo (HTP) son compuestos formados únicamente por átomos de carbono e hidrógeno y como se describe en la fórmula del origen del petróleo donde se constituye la Teoría de Engler de 1911, (Instituto Mexicano del Petróleo, IMP, 2014), (Figura 1).

2.1.1. Clasificación de los hidrocarburos

Los hidrocarburos son compuestos formados por átomos de carbono e hidrógeno, de gran abundancia en la naturaleza, presentes principalmente en el petróleo (Chappin, 1998) (citado por Ortínez *et al.*, 2007). Se consideran como una mezcla compleja de gases, líquidos y sólidos, existiendo cantidades combinadas de nitrógeno, oxígeno y azufre; además contienen compuestos de hierro, níquel, vanadio y otros metales.

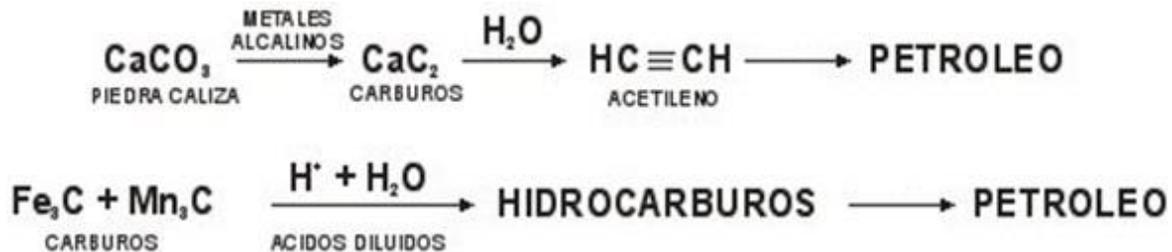


FIGURA 1. Las etapas de la Teoría de Engler (1911) que determinan la formación orgánica del petróleo mediante la descomposición por microorganismos.

Los hidrocarburos se clasifican de la siguiente forma:

Hidrocarburos biogénicos.

Son sintetizados por casi todas las plantas, animales terrestres y marinos, incluyendo la microbiota, bacterias, plancton marino, diatomeas, algas y plantas superiores.

La síntesis de este tipo de hidrocarburo está controlada por rutas metabólicas, lo cual trae como resultado mezclas de compuestos de limitada complejidad estructural relacionada directamente con la función biológica específica. Estos pueden ser biosintetizados por los organismos o bien pueden ser ingeridos con el alimento y alterados después de su ingestión. La formación de compuestos aromáticos y alifáticos de bajo peso molecular es dado conforme al tiempo de la descomposición de la materia orgánica; estos compuestos pueden ser condensados para dar lugar a sustancias de mayor peso molecular (Schnitzer & Khan, 1978) (citados por Castro, 2007) como parte de la teoría de la biosíntesis confirmada por un gran

número de compuestos de bajo peso molecular que es un buen indicador de la presencia microbiana en el suelo.

Hidrocarburos antrópicos.

Son aquellos hidrocarburos producidos como resultado de cualquier tipo de actividad humana. Los procesos de combustión industrial contribuyen con niveles mucho más altos debido principalmente al humo generado por carbón, combustibles fósiles y petróleo refinado; las descargas de aguas municipales, las actividades de transporte y los derrames.

Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).

Constituyen contaminantes orgánicos relacionados con las actividades humanas. Los compuestos que más conciernen de los hidrocarburos del petróleo y de la pirólisis de combustibles, son los hidrocarburos aromáticos policíclicos, sus homólogos alquil y los HAP sustituidos con sulfuro o nitrógeno.

Se ha reportado que los HAP son producidos a altas temperaturas de 400 a 500°C, mientras sus homólogos alquil sustituidos se producen a bajas temperaturas de 100 a 150°C. (Lesser, 1995). Los HAP están formados por dos o más anillos de benceno fusionados, los cuales difieren en el número y posición del anillo aromático. Hay dos clases de HAP (Cabrera, 2011):

- Los de bajo peso molecular que tienen de 2 a 3 anillos aromáticos, como el naftaleno, fluoreno, fenantreno y antraceno, y derivados;
- Los de alto peso molecular que tienen de 4 a 7 anillos aromáticos como el criseno.

Sus características físicas y químicas varían de acuerdo a su peso molecular y, en consecuencia, a su distribución y condición del ambiente, lo mismo sus efectos en los sistemas biológicos. Su importancia está relacionada a su movilidad, debido a su peso molecular, presentándose en un intervalo de 128.16 a 300.36 unidades de masa atómica (Da) para el naftaleno y coroneno, respectivamente. Los HAP de alto peso molecular son relativamente inmóviles y, por ende, de baja volatilidad, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno,

fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoreno, benzo(k)fluoreno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(ah)antraceno y benzo(ghi)perileno son considerados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental (EPA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comunidad Económica Europea (CEE) debido a sus efectos carcinogénicos. (Menzie *et al.*, 1992) (citado por Rosales 2008). En el Cuadro 1 se resumen los hidrocarburos.

La liberación de los HAP al ambiente por vía atmosférica es debida a los procesos de combustión de materiales orgánicos que emiten los HAP en fase de vapor en forma particulada, aunque otros mecanismos de descargas más localizados pueden ser también el depósito de residuos sólidos municipales e industriales, aguas residuales y lodos de tratamiento que pueden tener cantidades considerables de HAP y los derrames y descargas directas de petróleo y sus derivados en cuyo caso el receptor primario de los HAP es el suelo o el sistema acuático (Cram *et al.*, 2004).

CUADRO 1. Clasificación de los hidrocarburos.

Hidrocarburos		
Biogénicos		Son los HTP que tienen origen en las erupciones de los volcanes y en los incendios forestales
		Etano (C ₂ H ₆)
Alifáticos	Alcanos	
	Alquenos	Eteno (C ₂ H ₄)
	Alquinos	Etino (C ₂ H ₂)
	Alifáticos cíclicos	Ciclobutano (C ₄ H ₈)
Antrópicos	Aromáticos	Benceno (C ₆ H ₆)
		Naftaleno (C ₁₀ H ₈)
		Benzopireno (C ₂₀ H ₁₂)

Fuente: Modificado de Cabrera (2011).

Por lo general, los HAP de bajo peso molecular son más volátiles, solubles en agua y menos lipofílicos que los compuestos de alto peso molecular. La transferencia a otros compartimentos del ambiente y la degradación es más alta para los compuestos de bajo peso molecular que para los de alto peso molecular. Los HAP son susceptibles a la descomposición

(foto y térmica) en el aire, lo que restringe sus tiempos de residencia en la atmósfera a un par de días. Los que no son degradados son transferidos a aguas superficiales o suelos por deposición húmeda o seca. Generalmente mientras más anillos bencénicos presente la molécula, tendrá menor solubilidad, movilidad y degradación; pero favorece la adsorción, acumulación y persistencia en el ambiente. (Cram *et al.*, 2004).

En los suelos, la mayoría de los HAP son fuertemente adsorbidos por la materia orgánica, reduciendo su disponibilidad tanto para ser biodegradados, como para ser absorbidos por las plantas y lixiviados al acuífero (Cram *et al.*, 2004).

2.1.2. Contaminación del suelo por hidrocarburos

Flores *et al.* (2004) mencionan que la densidad de los hidrocarburos es inferior a la del agua, y por tanto flotan sobre ésta al estar en contacto. Petróleo, combustóleo y desechos petroleros, por su color y aspecto, se hacen evidentes a simple vista cuando se encuentran en la superficie.

Por otro lado, Clemente y Azuara (2011), indican que si son depositados en el suelo, prácticamente no penetran al subsuelo debido a su alta viscosidad, pero los lixiviados generados por las lluvias arrastran los compuestos solubles, en el caso que estos compuestos se encuentren distribuidos en el suelo. Las principales consecuencias ambientales que se presentan después de un evento de contaminación son los efectos pronunciados que provocan sobre sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas, pudiendo impedir o inhibir el crecimiento de la vegetación sobre el área contaminada y cambios en la dinámica poblacional de la fauna y de la biota microbiana.

La contaminación de suelos por hidrocarburos se conoce como el impacto negativo que se produce en las propiedades que regulan la vida del suelo por efectos de procesos químicos, como por ejemplo, la acidificación y la toxicidad. El comportamiento de los contaminantes orgánicos está en función de sus características físicas y químicas (Cuadro 2). Además las

características del medio, como la unidad del suelo, permeabilidad, estructura, tamaño de las partículas, contenido de humedad y de materia orgánica, igual que la profundidad del manto freático, factores climatológicos como la temperatura y la precipitación pluvial tienen una gran influencia a dicho comportamiento. (Ortínez *et al.*, 2007).

Todas las variables en su conjunto definen el tamaño y la distribución tridimensional del frente de contaminación en una zona específica.

CUADRO 2. Parámetros que influyen en el transporte de contaminantes en el suelo.

Parámetros del contaminante	Parámetros del suelo	Parámetros ambientales
Solubilidad	Contenido y retención de agua	Temperatura
Presión de vapor	Porosidad, densidad y permeabilidad	Precipitación
Número y tipo de grupos funcionales	Contenido de arcilla	Evapotranspiración
Polaridad	Contenido de materia orgánica	
	Profundidad de agua subterránea	

Fuente: Ortínez *et al.* (2007).

Los compuestos orgánicos ligeros como gasolinas, aceites y petróleo crudo tienden a formar una capa en forma de nata en el nivel freático y se mueven horizontalmente en dirección al flujo del agua subterránea, creando así manchas de contaminación de gran superficie. (Ortínez *et al.*, 2007).

La presencia de contaminantes en el suelo se ha conceptualizado a través de observaciones indirectas que indican su acumulación en asociación con adsorbentes naturales (Luthy *et al.*, 1997) (citados por Ortínez *et al.*, 2007), estableciéndose los siguientes procesos:

- Absorción a la materia orgánica en forma, amorfa o natural o en Líquidos de la Fase no Acuosa (LFNA), como es el caso del petróleo.
- Absorción a la materia orgánica condensada o en polímeros o residuos de combustión.
- Adsorción a superficies orgánicas húmedas (hollín).
- Adsorción en superficies minerales (cuarzo).

- Adsorción dentro de los microporos o en minerales microporosos (zeolitas) con superficie porosa a saturación de agua < 100 %.

Las propiedades químicas de los suelos más afectados por un derrame de hidrocarburos de acuerdo con Ortíz *et al.* (2007), son:

- Aumento de carbono orgánico, ya que el 75% del carbono del petróleo crudo es oxidable.
- Disminución del pH, debido a la acumulación del carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos.
- Aumento del manganeso y hierro intercambiable.
- Aumento del fósforo disponible.

Los efectos tóxicos de los hidrocarburos en el ambiente dependerán de:

- La cantidad y composición del petróleo.
- La frecuencia y tiempo de exposición.
- El estado físico del derrame, puede ser en forma de gas, líquido o sólido.
- Las características del sitio donde sucedió el derrame, así como el uso de suelo (industrial, residencial o agrícola).
- Variables ambientales como temperatura, humedad y oxígeno.
- El uso de dispersantes químicos.
- La sensibilidad de la biota específica del ecosistema impactado.

A pesar que los HTP enriquecen al suelo en materia orgánica, la presencia de grandes cantidades de HTP, generalmente por contaminación antropogénica en los suelos, llegan a causar fitotoxicidad provocando cambios perjudiciales en el funcionamiento, aspecto y crecimiento de las plantas (OECD, 2006). Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía (2004), mencionan que varias especies de gramíneas pueden ser bioindicadoras de la calidad del suelo, ya sea que su exposición a un suelo sea por reciente contaminación de HTP o a un contaminante intemperizado de al menos 20 años.

Vázquez-Luna *et al.* (2010), detectaron diferencias significativas en los días a emergencia, altura de planta y longitud radicular en plantas de leguminosas expuestas a diferentes niveles de HTP, determinando un índice relativo de impacto fisiológico que fue de cero para el tratamiento testigo (0 mg kg⁻¹ de HTP), hasta valores de 0.70 en el tratamiento más alto (80 000 mg kg⁻¹ de HTP), asociado a una reducción del 45% en el número de hojas, y una reducción del 53% en biomasa radicular, respecto al testigo.

2.1.3. Regulación y legislación ambiental en materia de residuos peligrosos

En México no se cuenta con un estimado de las emisiones totales de los hidrocarburos al ambiente, por lo que todas aquellas fuentes fijas y móviles reportadas en la literatura y que se llevan a cabo en México emitirán una cierta cantidad de HTP, que en un futuro próximo se tendrán que cuantificar. Mucho de lo que se ha estudiado en suelos y sedimentos está relacionado con actividades petroleras y prácticamente no existen datos de su concentración en las fuentes de emisión y su destino en el ambiente (Cram *et al.*, 2004).

En otros países, por ejemplo Estados Unidos de América y Canadá tienen disponible una base de datos llamada “*Bioremediation in the Field Search System*”, que presenta información sobre la ubicación donde se llevó o se sigue llevando a cabo la remediación de suelo, sedimento, lodo, agua subterránea o superficial, el tipo de contaminante tratado, las tecnologías utilizadas, los costos, la velocidad de descontaminación, entre otros datos (EPA, 1995).

El conocimiento del tipo de contaminación y su concentración es fundamental para establecer las condiciones de los sitios, los riesgos que representan y la selección de posibles tecnologías de recuperación (Arce *et al.*, 2004) mencionados por Rosales (2008). Los límites de limpieza para hidrocarburos en suelos y aguas dependerán de los criterios o normas vigentes en México.

La Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA), (DOF, 2012), establece los siguientes aspectos para atender la contaminación de suelos en los

siguientes artículos:

- Art. 134. Menciona los criterios de la prevención y control de la contaminación; párrafo I. Corresponde al estado y la sociedad prevenir la contaminación del suelo; II. Deben controlarse los residuos en tanto que constituyen la principal fuente de contaminación del suelo; V. En los suelos contaminados por la presencia de materiales o residuos peligrosos, deberán llevarse a cabo acciones necesarias para recuperar o restablecer sus condiciones, de tal manera que puedan ser utilizados en cualquier tipo de actividad prevista por el programa o de ordenamiento ecológico que resulte aplicable.
- Art. 136. Los residuos que se acumulen o puedan acumularse y se depositen o infiltren en los suelos deberán reunir las condiciones necesarias para prevenir o evitar: I. Contaminación del suelo; II. Las alteraciones nocivas en el proceso biológico de los suelos; III. Las alteraciones en el suelo que perjudiquen su aprovechamiento, uso o explotación; IV. Riesgos y problemas de salud.
- Art. 139. Toda descarga, depósito o infiltración de sustancias o materiales contaminantes en los suelos se sujetará a lo que disponga esta Ley, la Ley de Aguas Nacionales, sus disposiciones reglamentarias y las Normas Oficiales Mexicanas.
- Art. 140. La generación, manejo y disposición final de los residuos de lenta degradación deberá sujetarse a lo que establezcan las Normas Oficiales Mexicanas que al respecto expida la Secretaría, en coordinación con la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

Por otro lado, la Norma Oficial Mexicana NOM-EM-138-ECOL-2002, establece que los límites máximos permisibles de contaminación en los suelos con uso agrícola, o de conservación o forestal, no deben rebasar los 1000 mg kg⁻¹ de HTP en suelo seco (NOM, 2002).

2.1.4. Situación en México de la aplicación de las técnicas biológicas de saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos

De acuerdo con datos de la SEMARNAT (2006) citado por Leyva (2006) de un total de 170 empresas autorizadas para remediar suelos contaminados, el 93% se dedican a la

remediación de sitios contaminados con hidrocarburos, solamente seis ofrecen servicios para la restauración de suelos contaminados con metales pesados, cinco para ácidos y bases, y una para sales.

De acuerdo con Botello en 1996 y Cortinas en 2002 (citados por Leyva, 2006), en México las actividades de extracción, producción y formulación de petróleo y sus derivados, han traído como consecuencia la contaminación por hidrocarburos de zonas de alta vulnerabilidad ecológica, tanto en zonas terrestres, como en zonas costeras. De acuerdo con Adams *et al.* (1999) citados por Leyva (2006), algunas de las empresas que están saneando sitios en el sureste mexicano usan su experiencia empírica ganada en otros lugares cuyas características parecen similares, en lugar de realizar procedimientos que consideren diversos factores como alta concentración de materia orgánica, textura del suelo y condiciones climáticas, es decir, tratamientos para cada caso en particular.

2.2. Tecnologías de remediación

Existen numerosas tecnologías de remediación de suelos contaminados, según Volke y Velasco (2002) se pueden agrupar en 3 tipos:

- Tratamientos biológicos (biorremediación), en donde utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) que permiten la degradación, transformación o remoción de los contaminantes a productos metabólicos inocuos;
- Tratamientos fisicoquímicos donde se aprovechan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación;
- Tratamientos térmicos en los cuales se utiliza calor para promover la volatilización (separación), quemar, descomponer o fundir (inmovilización) los contaminantes en un suelo.

En el Cuadro 3, se muestran las principales ventajas y desventajas del uso o aplicación de los métodos biológicos, fisicoquímicos y térmicos.

2.2.1. Biorremediación

La Biorremediación es una tecnología biológica usada para suelos contaminados por hidrocarburos totales de petróleo (HTP), y suele describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (bacterias, hongos, levaduras, plantas) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos (Van Deuren *et al.*, 2002) citados por Leyva (2006). Esta tecnología tiene la ventaja de ser un proceso más barato y menos agresivo al ambiente que los convencionales, sin embargo, se requieren tiempos de tratamiento de acuerdo a la actividad microbiológica, bioquímica, genética, procesos metabólicos, estructura y función de las comunidades microbianas naturales (Van Cauwenberghe y Roote, 1998) citados por Leyva (2006).

CUADRO 3. Principales ventajas y desventajas del uso aplicación de los métodos biológicos, fisicoquímico y térmicos.

	VENTAJAS	DESVENTAJAS
TRATAMIENTOS BIOLÓGICOS	<p>Son efectivos en cuanto a costos</p> <p>Son tecnologías más benéficas para el ambiente.</p> <p>Los contaminantes generalmente son destruidos.</p> <p>Se requiere un mínimo o ningún tratamiento posterior.</p>	<p>Requieren mayores tiempos de tratamiento.</p> <p>Es necesario verificar la toxicidad de sustancias intermediarias y/o productos resultantes.</p> <p>No pueden emplearse si el tipo de suelo no favorece el crecimiento microbiano.</p>
TRATAMIENTOS FISICOQUÍMICOS	<p>Son efectivos en cuanto a costos</p> <p>Pueden realizarse en periodos cortos.</p> <p>El equipo es accesible y no se necesita de mucha energía ni ingeniería</p>	<p>Los residuos generados por técnicas de separación, deben tratarse o disponerse requiriendo otros procesos lo que aumenta los costos y la necesidad de permisos</p> <p>Los fluidos de extracción pueden aumentar la movilidad de los contaminantes: necesidad de sistemas de recuperación.</p> <p>Es el grupo de tratamientos más costoso.</p>
TRATAMIENTOS TÉRMICOS	<p>Permite tiempos rápidos de limpieza</p>	<p>Los costos aumentan en función del empleo de energía y equipo.</p> <p>Intensivos en mano de obra y capital.</p>

Fuente: Modificado de Volke y Velasco, 2002.

La biorremediación consiste básicamente en una alternativa de mitigación o corrección de impactos, mejorando las condiciones del medio que fue afectado, es decir, su principio consiste en brindar los elementos necesarios para que los microorganismos se reproduzcan exponencialmente y puedan obtener su fuente de nutriente mediante los compuestos del contaminante encontrado en el área afectada (Martínez-Prado *et al.* 2011). Dicho metabolismo está determinado por aspectos genéticos (Sukla *et al.*, 2014).

2.2.2. Bioestimulación

La bioestimulación es la adición de sustratos para promover el incremento de la población microbiana y así aumentar la remoción del contaminante, esta metodología es empleada en la biorremediación; al suelo contaminado se le adicionan soluciones acuosas que contengan nutrientes u otras formas alternas como los lodos residuales biosólidos estabilizados, para estimular la actividad de los microorganismos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos (Van Deuren *et al.*, 2002) citado por Leyva (2006).

2.2.3. Biodegradación

Teóricamente, en este metabolismo el resultado es la producción de CO₂, H₂O y biomasa para obtener una mineralización completa de los hidrocarburos. La degradación aeróbica de los HAP inicia con la acción de dioxigenasa, agregando un átomo de oxígeno a dos átomos de carbono de un anillo de benceno. El resultado es cis-hidrodiol y la apertura del anillo. En seguida se forman dihidroxilados intermedios por la acción de la enzima deshidrogenasa y la reacción del rompimiento del anillo produce compuestos intermedios del ciclo del ácido tri-carboxílico, de acuerdo con Chauan *et al.*, además Sukla *et al.* (2014). Ghazali *et al.* (2004), mencionan que la biodegradación de hidrocarburos complejos, requiere de la cooperación de más de una sola especie de microorganismo, sobre todo cuando se desea una mineralización completa hasta CO₂ y H₂O. La capacidad degradativa de cualquier consorcio no es únicamente un efecto aditivo de las cepas en lo individual, sino que se llega a presentar una reacción en cadena por los diferentes microorganismos, tal como lo reportado por Komukai-Nakamura *et al.* (1996) mencionados por Ghazali *et al.* (2004), quienes

reportaron una degradación secuencial del petróleo crudo por cepas de *Acinetobacter* sp., seguida por *Pseudomonas putida*.

2.2.4. Factores que afectan la biorremediación

En suelos contaminados con hidrocarburos, la velocidad de biodegradación depende de factores como la naturaleza química del contaminante, la adaptación de los microorganismos al suelo, la toxicidad de la sustancia a tratar, el pH, la temperatura, el grado de agitación y la humedad del medio. Muchas pruebas de laboratorio demuestran que bajo condiciones apropiadas de humedad y cantidad de nutrientes, principalmente, algunos microorganismos utilizan los hidrocarburos, sin embargo, los mecanismos y las tasas de biodegradación son diferentes según los diversos tipos de petróleo, de acuerdo con su composición (Volke y Velasco, 2002). Los microorganismos producen una serie de catalizadores biológicos denominados enzimas, que atacan las moléculas de hidrocarburos transformándolas en productos más fácilmente asimilables (Araujo *et al.*, 2006).

Uno de los aspectos más cuestionados en el uso de la técnica de biorremediación, son las reacciones de oxidación por ser las de mayor importancia en la biodegradación de hidrocarburos en condiciones aerobias y están catalizadas por monoxigenasas, dioxigenasas, lacasa y peroxidasas. En las reacciones quimiotróficas, una parte del sustrato es oxidado para obtener energía y otra parte es asimilado dentro de la masa celular. Cuando la degradación se ocupa de hidrocarburos alifáticos saturados, el proceso es aerobio y el oxígeno es necesario para iniciar el ataque microbiano a la molécula; al contrario, cuando la degradación es de hidrocarburos alifáticos insaturados puede efectuarse en forma aerobia y anaerobia, como se procede con los hidrocarburos aromáticos (Ércoli *et al.*, 2001) citados por Leyva (2006).

En términos generales, y con lo mencionado, la biorremediación es afectada por los siguientes factores ambientales:

- La concentración del contaminante en el suelo: si se presenta con valores altos pueden

- existir efectos de toxicidad sobre la población microbiana y, por consiguiente, la deficiencia de nutrientes en el suelo como nitrógeno y fósforo;
- La temperatura: tiene una gran influencia en la biodegradación por su efecto sobre la naturaleza física y química del petróleo y sus derivados. A bajas temperaturas la viscosidad de los hidrocarburos aumenta, la volatilización de los alcanos de cadena corta se reduce y también disminuye la solubilidad del O₂ en H₂O, afectando de esta manera la biodegradación. En efecto, las tasas de degradación aumentan cuando la temperatura se incrementa (Pardo *et al.*, 2004; Ríos, 2005) citados por Ñustez *et al.* (2014).
 - La humedad: es otro factor importante porque actúa como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula ya que forma parte de su protoplasma bacteriano; este proceso es indispensable para su crecimiento y desarrollo. Se considera que la humedad óptima tiene que estar entre 20 - 75% de la capacidad de campo (Gómez, *et al.*, 2008).
 - Los nutrientes: representan uno de los factores más relevantes por ser sustancias químicas necesarias para la actividad microbiana y metabólica de los microorganismos; estos constituyentes se deben encontrar disponibles para su asimilación y síntesis. Por lo tanto aumentan la disponibilidad de los nutrientes y así la eficiencia de la biorremediación (Gómez, *et al.*, 2008).
 - Los aceptores de electrones: son otro factor importante porque aumentan la actividad de las poblaciones microbianas nativas o inoculadas (Hamdi, *et al.*, 2007) citados por Duque (2015). Por lo mismo, la energía necesaria para el crecimiento microbiano se obtiene durante el proceso de oxidación de materiales reducidos, donde las enzimas microbianas catalizan la transferencia de electrones (los más utilizados son el oxígeno y los nitratos).
 - Los microorganismos: son necesarios para la biodegradación de HTP en suelo y agua, dado que a través de la actividad bioquímica, oxidan los hidrocarburos lo que se lleva a cabo principalmente por bacterias, seguidas por los hongos, levaduras y algas, entre otros (Ríos, 2005) citado por Ñustez *et al.* (2014). En los ecosistemas, en donde las poblaciones microbiológicas no son degradadoras, se emplean microorganismos nativos, con el propósito de incrementar la tasa de degradación de los hidrocarburos.

2.3. Microorganismos del suelo

En el suelo están siempre presentes los microorganismos: procariotas y eucariotas (bacterias, protozoos, algas y hongos). Estos juegan un papel muy importante en los procesos de biorrecuperación, ya que ellos participan en los ciclos del carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y otros minerales.

Las bacterias casi siempre son degradadoras primarias, desempeñando un papel importante en la biodegradación de contaminantes orgánicos en suelos. A diferencia de éstas, compiten en menor grado los hongos metabolizando los compuestos orgánicos en estos sistemas. Por ejemplo, en un suelo bien aireado, las bacterias y los hongos son importantes, sin embargo en suelos pobremente aireados, las bacterias son las principales responsables de los cambios biológicos y químicos que en él suceden (Alexander, 1980). Además, existen también plantas microscópicas que sirven como superficie sobre las cuales crecen organismos que a través de su fotosíntesis actúan como fuente de oxígeno; también los animales microscópicos sirven como captadores de macromoléculas, con la función de eliminar restos de partículas flotantes. Igualmente, los protozoos consumen materia orgánica incluyendo a otros microorganismos, a diferencia las algas son fotosintéticas y proveen oxígeno a los sistemas microbianos y eliminan nutrientes inorgánicos (Alexander, 1980).

2.3.1. Bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos

Los microorganismos son muy importantes en el suelo por sus diferentes funciones metabólicas implicadas en procesos ecosistemáticos que incluyen: ciclos biogeoquímicos, transformación y mineralización de materia orgánica y degradación de compuestos xenobióticos (Torsvik *et al.*, 1990; Whitman *et al.*, 1998; Schlöter *et al.*, 2003), citados por Yanine (2010). Existen bacterias que degradan una gran cantidad de sustancias tóxicas, reduciendo su carácter nocivo o incluso, volviéndolas inocuas para el medio ambiente.

En la biodegradación de hidrocarburos participan bacterias con alta capacidad degradativa, entre las que destacan los géneros: *Brevibacterium*, *Spirillum*, *Xanthomonas*,

Alcaligenes, Arthrobacter, Nocardia, Flavobacterium, Vibrio, Achromobacter, Acinetobacter, Micrococcus, Bacillus, Pseudomonas (P. aeruginosa, P. mendocina, P. aureofasciens), Serratia (S. rubidae), entre otras (Leyva, 2006). (Cuadro 4).

Cabe resaltar que se ha reportado la degradación de los HAP por bacterias de los géneros: *Pseudomonas, Alcaligenes, Arthrobacter, Bacillus, Mycobacterium, Nocardia* y *Xanthomonas*, por ejemplo, el naftaleno es degradado por *Alcaligenes denitrificans, Mycobacterium sp., Pseudomonas putida, P. fluorescens, P. paucimobilis, P. vesicularis, P. cepacia, Rhodococcus sp., Corynebacterium venale, Bacillus cereus, Moraxella sp., Streptomyces sp., Vibrio sp.* Y *Cyclotrophicus sp.*, y en fenantreno por *Aeromonas sp., Alcaligenes faecalis, A. denitrificans, Arthrobacter polychromogenes, Beijerinckia sp., Micrococcus sp., Mycobacterium sp., Pseudomonas putida, P. paucimobilis, Rhodococcus sp., Vibrio sp., Nocardia sp., Flavobacterium. sp., Streptomyces sp. y Bacillus sp.*, (Samanta *et al.*, 2002).

CUADRO 4. Géneros de bacterias degradadoras de hidrocarburos utilizadas en biorremediación.

GÉNEROS DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE HTP		
<i>Achromobacter</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Proteus</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Sarcinia</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Serratina</i>
<i>Chromobacterium</i>		<i>Streptomyces</i>

Tomado de Leyva (2006).

Entre los géneros de bacterias degradadoras de hidrocarburos se ubican como las más usadas: *Pseudomonas* y *Micrococcus*. Las bacterias del género *Pseudomonas* pertenecen a la familia Pseudomonadaceae y poseen la habilidad de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono. Las *Pseudomonas* son bacterias Gram negativas, constituyendo un género específico de los bacilos formados por bacterias oxidasa positivas y Gram negativas, destacando sus aplicaciones en descontaminaciones ambientales (Maposita *et al.* 2011).

Al contrario, en el género *Micrococcus* se tienen bacterias cocos Gram positivas, de

tipo estricto y pertenecen a la familia Micrococcaceae. Estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la superficie de objetos inanimados, partículas de polvo y suelos contaminados por hidrocarburos. Estos géneros de bacterias degradadoras de hidrocarburos poseen capacidades degradadoras sobre un rango de sustratos mayores que las *Pseudomonas*. Además poseen una mayor tasa de crecimiento sobre el fenantreno y el DBT (biodesulfuración de dibenzotiofeno), (Bossert y Bartha, 1984) citados por Loya (2013).

2.3.2. Degradación bacteriana de los hidrocarburos

El primer paso en la degradación microbiana de hidrocarburos aromáticos de petróleo (HAP) es la acción de la dioxigenasa, la cual incorpora átomos de oxígeno a dos átomos de carbono de un anillo de benceno, resultando en la formación de cis-dihidrodiol el cual se somete a la rearomatización por deshidrogenasa para formar dihidroxilados intermedios. Éstos se someten a una división de los anillos y forman ácido tricarbóxico que interviene en el ciclo de Krebs. (Samanta *et al.*, 2002).

La degradación de materiales orgánicos en ambientes naturales se realiza principalmente por dos grupos de microorganismos: bacterias y hongos; las más utilizadas en este proceso son las bacterias. Las bacterias representan a los procariontes con amplia distribución en la biosfera; su rápido metabolismo y crecimiento, su plasticidad genética y su habilidad para adaptarse rápidamente a varios ambientes, las hace ser altamente eficientes en procesos de biorremediación. Durante la pasada década, una gran variedad de microorganismos ha sido aislada y caracterizada por su habilidad para degradar diferentes HAP. Para mejorar la degradación de los contaminantes, los microorganismos cuentan con cierta capacidad química, conocida como quimiotaxis, la cual les permite la atracción o repulsión a la presencia de cierto compuesto químico. Algunos compuestos orgánicos tóxicos son quimioatrayentes de diferentes especies de bacterias tales como *Pseudomona* sp. y *Ralstonia* sp., se ha encontrado un gen relacionado a la quimiotaxis en algunas especies tal como *P. putida* (Samanta, 2002).

Aun así, existen otros factores que pueden afectar la actividad microbiana degradadora

de hidrocarburos, entre los cuales se tiene a la temperatura que afecta la actividad metabólica de los microorganismos y la tasa de biodegradación. En líneas generales, se puede decir que las especies bacterianas crecen en intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 18 y 30° C, o sea en condiciones mesófilas. En los casos que se superan los 40° C se produce una disminución de la actividad microbiana, en cambio hay una rotación poblacional hacia especies más resistentes a las altas temperaturas o puede decrecer la biorremediación debido a la desnaturalización de enzimas y proteínas. Cuando la temperatura se encuentra a 0° C se detiene sustancialmente la biodegradación (Gómez *et al.*, 2008); estos efectos fueron también reportados en temperaturas extremas, por ejemplo a 10° C en suelos subárticos y subalpinos, a 5° C en suelos árticos, a 60° C por una cepa termófila de *Bacillus stearothermophilus* aisladas de un suelo contaminado con crudo de petróleo del desierto Kuwaití (Torres y Zuluaga, 2009).

Otro factor que afecta la degradación de los hidrocarburos es el pH, debido a que es un factor importante que determina el grado de adsorción de iones por las partículas del suelo, afectando así su solubilidad, movilidad, disponibilidad y sus formas (Volke y Velasco, 2002).

Por lo mencionado, las formas catiónicas (NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) son más solubles a pH ácido mientras que formas aniónicas (NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , Cl^-) son más solubles a pH alcalino. El pH afecta las poblaciones microbianas, por la biodisponibilidad de fuentes de carbono y energía y, en condiciones de pH extremadamente alcalinos o extremadamente ácidos, la biodegradación se hace lenta. Los suelos contaminados por hidrocarburos tienden a ser ácidos, y este aspecto limita el crecimiento y la actividad de los microorganismos. El rango óptimo para la biodegradación está entre 6 a 8 unidades de pH; incluso el pH afecta a la disponibilidad de nutrientes, debido a que afecta la solubilidad y estado de los compuestos. La solubilidad del fósforo se maximiza a pH de 6.5, mientras que el plomo se encuentra menos soluble a pH de 7 a 8. En general para minimizar el transporte de metales se recomienda un pH mayor a 6 (Ríos, 2005), citado por Ñustez *et al.* (2014).

2.4. Regulación de los lodos residuales y de los biosólidos estabilizados

Se estima que en México, los lodos residuales generados por las 2,029 Plantas

Tratadoras de Aguas Residuales (PTAR), se encuentran entre 640,000 y 10'000,000 toneladas al año (Rojas y Mendoza, 2012), con promedios de producción de biosólidos base húmeda que van de 58 t año⁻¹ por PTAR en Zacatecas a 11,915 t año⁻¹ por PTAR en Nuevo León (Mejía, 2016).

De acuerdo con Jiménez y Wanh (2006) citados por Rojas y Mendoza (2012), de las 640,000 toneladas de lodos residuales que se generan, el 51% es estabilizado mediante digestión anaeróbica; por consiguiente, no se recupera el biogás generado durante este proceso, ya que el 76% de los lodos residuales, independientemente de su tratamiento, es depositado como relleno a cielo abierto. (Rojas y Mendoza, 2012).

Los principales constituyentes del agua residual en las plantas de tratamiento incluyen basuras, arena, espuma y lodo; este último dependerá de las características del agua residual, su edad y proceso de tratamiento, y es fuente potencial de materia orgánica y energía, pero por su alto contenido de patógenos y metales pesados, requiere un proceso de estabilización. (Pérez, 2016).

La Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003), establece las especificaciones y los límites máximos permisibles de contaminantes en los lodos y biosólidos provenientes del desazolve de los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, de las plantas potabilizadoras y de las plantas de tratamiento de aguas residuales, con el fin de posibilitar su aprovechamiento o disposición final y proteger al medio ambiente y la salud humana. Su aplicación consiste en observancia obligatoria para las personas físicas y morales que generen lodos y biosólidos provenientes del desazolve de los sistemas de alcantarillado urbano o municipal, de las plantas potabilizadoras y de las plantas de tratamiento de aguas residuales.

Para que los biosólidos puedan ser aprovechados, deben cumplir con la especificación y lo establecido de la presente Norma Oficial Mexicana. La aplicación de los biosólidos en terrenos con fines agrícolas y mejoramiento de suelos se sujetará a lo establecido en la Ley federal de Sanidad Vegetal y conforme a la normatividad vigente en la materia. Para la disposición final de los lodos y biosólidos, éstos deben cumplir con los límites máximos

permisibles para el contenido del indicador de contaminación, patógenos y parásitos especificados en Norma. Los lodos y biosólidos que cumplan con lo establecido en la presente Norma Oficial Mexicana (DOF, 2003). Esta Norma Oficial Mexicana no concuerda con ninguna norma o lineamiento internacional, tampoco existen normas mexicanas que hayan servido de base para su elaboración.

2.4.1. Uso de los lodos estabilizados como fuente alterna de nutrientes

En la biorremediación se han reportado muchos casos exitosos del uso de los lodos residuales estabilizados (biosólidos), que sirven como una forma alternativa de nutrientes para estimular a los microorganismos que actúan en la descontaminación de suelos contaminados con hidrocarburos.

De acuerdo con Metcalf y Eddy (2013), citados por Pérez, (2016), los lodos residuales dependiendo de la fase de producción, pueden contener los siguientes valores: Nitrógeno de 1.5 a 5 % base sólido total (BST), Fósforo de 0.8 a 11% BST, Proteína de 20 a 41% BST, Hierro de 2 a 8% BST y Contenido Energético de 14,000 a 29,000 KJ kg⁻¹ BST.

Araujo *et al.* (2006) y Martínez-Prado *et al.* (2011), como resultado de la aplicación de lodos residuales a un suelo contaminado por hidrocarburos, consignan una remoción de los HTP del 66 al 93%, lo cual atribuyeron al enriquecimiento en el suelo con los nutrimentos contenidos en los lodos, así como a la humedad y aireación en el suelo.

Para seleccionar la tecnología de remediación adecuada se debe tener en consideración: características del sitio; tipo de contaminante, concentración; propiedades fisicoquímicas y tipo de suelo a tratar; y por último el costo.

2.5. Efecto de contaminantes de HTP en plantas

Los bioensayos con plantas están siendo considerados, de manera creciente, para el diagnóstico ecotoxicológico, ya que constituyen una excelente herramienta en la evaluación del riesgo ambiental. Representan una metodología ventajosa al brindar información acerca de

alguna sustancia que resulte tóxica en el medio, es decir, algún agente que pueda producir un efecto adverso en el sistema biológico, dañar su estructura o función, o producir la muerte. (Pentreath *et al.*, 2015).

Existen varias pruebas conducidas con la finalidad de determinar la curva de respuesta a concentraciones de diversos contaminantes, entre ellos los hidrocarburos en suelos contaminados, evaluando el efecto en el establecimiento de la semilla en la siembra-emergencia, la floración y la maduración del fruto, entre otros. (OECD, 2006).

La NOM-138/SEMARNAT/SS-2003 (DOF, 2005) establece como límites máximos permisibles de HTP en el suelo de uso agrícola y/o de conservación, valores que van de 200 mg kg⁻¹ suelo base seca para la fracción ligera a 3,000 mg kg⁻¹ suelo base seca para la fracción pesada.

Al respecto, Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía (2004), determinaron en su estudio que concentraciones elevadas de petróleo promueven la germinación de semillas y yemas, sin embargo, se inhibió el crecimiento, longitud de raíz, biomasa y nodulación.

Por su parte, Vázquez-Luna *et al.* (2010), expresan que altas concentraciones de HTP en el suelo, desencadenan daños fisiológicos como el retraso y disminución de tasas de emergencia para *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. Este efecto puede atribuirse a que el petróleo forma una capa que limita la absorción de agua y nutrimentos por la raíz, lo cual puede afectar el posterior desarrollo y fructificación.

Así mismo, Quiñones-Aguilar *et al.* (2003), refieren que ciertas recolecciones de maíz, expresan una mejor respuesta en emergencia y crecimiento de raíz en suelo contaminado con concentraciones de HTP de 25,000 mg kg⁻¹ de suelo base seca, aunque al incrementarse la concentración de hidrocarburos se inhibió el crecimiento. Chaineau *et al.* (1997) citados por Quiñones-Aguilar *et al.* (2003), mencionan que la resistencia de semillas de algunas especies vegetales a la contaminación con petróleo muestra el siguiente decremento: girasol > frijol > trigo > trébol > maíz > cebada > lechuga.

3. HIPÓTESIS

Dado que los microorganismos son los agentes primarios de la degradación de contaminantes orgánicos en el suelo, al incrementar, mediante la bioestimulación con lodos residuales estabilizados, la densidad de microorganismos nativos resistentes en un suelo contaminado, se acelera la degradación de los hidrocarburos totales de petróleo (HTP). El nivel de degradación que se logra mediante la acción microbiana de cepas nativas bioestimuladas con lodos residuales estabilizados, permite las condiciones adecuadas para una buena germinación y emergencia de plantas, presentando las mismas características que las plantas germinadas en un suelo no contaminado en la zona.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la efectividad de los lodos residuales en la bioestimulación de microorganismos nativos que degraden hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en suelos contaminados.

4.2. Objetivos específicos

1) Aislar y seleccionar los microorganismos resistentes nativos de un suelo contaminado con hidrocarburos.

2) Evaluar el efecto del uso de microorganismos resistentes a hidrocarburos y lodos residuales estabilizados sobre las características físicas y químicas de un suelo contaminado con hidrocarburos.

3) Evaluar el efecto de los tratamientos de diferente concentración de hidrocarburos en el desarrollo inicial de maíz.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. Área de estudio

Para este trabajo se seleccionó un sitio afectado recientemente por una fuga de combustible debido a un robo del ducto de 16" en el km 284 de Santa Anita a Salamanca propiedad de PEMEX, coordenadas 20°33'20.5" N y 103°3'63" W (Figura 2), de acuerdo a lo reportado por el periódico en línea El Informador.mx (Informador.mx, 18 de mayo de 2014) y la revista en línea Proceso (Proceso.com.mx, 19 de mayo de 2014). El derrame se presentó en el oleoducto de Pemex donde se localizaron dos tomas clandestinas con dos válvulas de cierre rápido de 2" cada una, sucedido el domingo 18 de mayo 2014. La fuga de más de 30 m de altura (El Informador.mx, 18 de mayo de 2014), afectó un área de la Delegación de La Villita (Figura 3), Municipio de Tala, Jalisco, México; de esta fuga se derivó un derrame de gasolina contaminando 400 m² de superficie junto a un camino, en torno del cual hay sembradíos de caña y pastizales (Informador.mx, 18 de mayo de 2014).

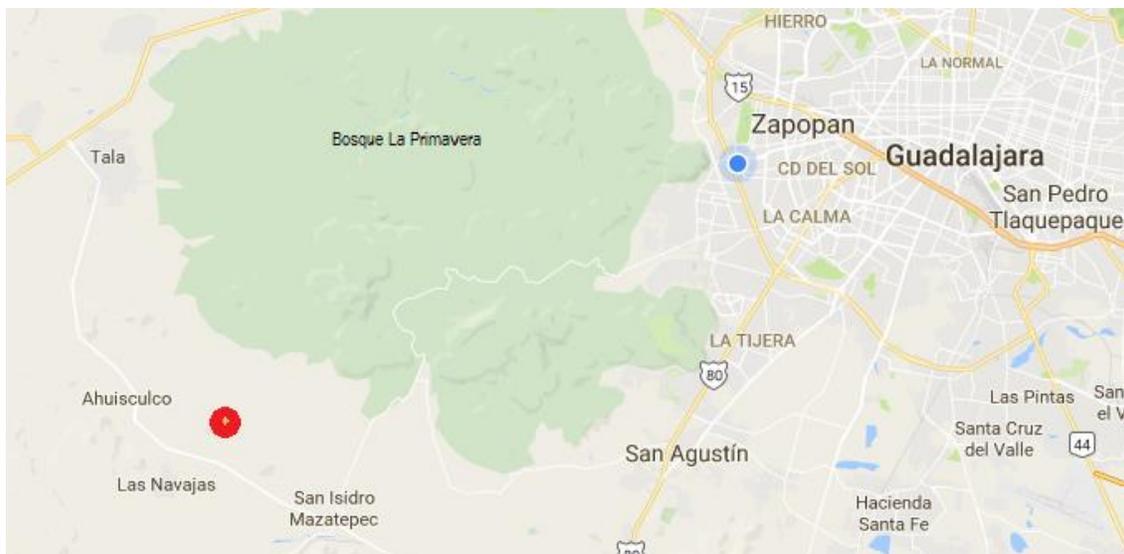


FIGURA 2. Ubicación del ducto afectado en el kilómetro 284 de la carretera Santa Anita a Salamanca de PEMEX, en la localidad de La Villita, en Tala, Jalisco, México.

La zona en estudio se caracteriza por un clima semicálido subhúmedo con lluvias en verano. Su temperatura media anual es de 18 - 22 °C y su precipitación anual es de un rango de 800 – 1,100 mm. El tipo de suelo en esta zona es Phaeozem (70.3%), Arenosol (17.6%) y Leptosol (9.7%), principalmente (IIEG, 2016).



FIGURA 3. Área afectada por el derrame de hidrocarburos en la Delegación de La Villita, Municipio de Tala, Jalisco, México.

5.1.2. Materiales utilizados en campo

- Medidor meteorológico de bolsillo, Kestrel® 4000 Pocket Weather Tracker.
- Nueve cubetas de plástico de capacidad de 20 L para el experimento al exterior de biorremediación, perforadas con 5 poros de 1 mm de diámetro en su base para la lixiviación.
- Tres cubetas de plástico con tapas de capacidad de 20 L para el transporte de los lodos residuales biosólidos, desde la Planta Tratadora de Aguas Residuales (PTAR) del municipio de Chapala, Jalisco, México.
- Nueve bolsas de plásticos de color blanco libres de contaminantes para el interior de las cubetas de plástico que transportan las muestras de suelo contaminado por el derrame de hidrocarburos en estudio.
- Tres plásticos de color negro resistente de tamaño 3x3 m para la mezcla del suelo.

- Nueve frascos de vidrio con capacidad para 500 g para la recolección de las muestras de suelo contaminado por el derrame de hidrocarburos, para ser transportado al laboratorio para sus análisis cromatográfico.
- Palas de acero con manija de madera con punta mango anilla, para excavación de 15 - 30 cm de profundidad.
- Espátula de acero inoxidable para la toma de muestras de suelo para su análisis en el cromatógrafo.
- Guantes de látex para el muestreo.
- Jabón extrán® para la limpieza de las palas usadas durante el muestreo.
- Agua destilada para la limpieza de la espátula antes de recolectar cada muestra.
- Hielera de plástico de 40 L de capacidad para el transporte al laboratorio de las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos.
- 2 bolsas de 7 Kg de hielo para el transporte de las muestras de suelo para el análisis cromatográfico y mantener a una temperatura de 4 °C, aproximadamente.

5.1.3. Material y equipo de laboratorio

Reactivos, material y equipo utilizado en estudio microbiológico:

Agar Soya Trypticaseína. Marca DIBICO SA de CV.

Caldo de Soya Trypticaseína. Marca DIBICO SA DE CV.

Extracto de Levadura. Marca BD BIOXON®.

Sulfato de Amonio. Marca JT BAKER®.

Fosfato de Potasio Dibásico, Anhidro. Marca Baker Analyzed®, Reactivo.

Fosfato de Potasio Monobásico, Cristal. Marca JT BAKER®.

Sulfato de Magnesio Pentahidratado. Marca MERCK.

Autoclave Eco: Jencons Sealpette.

Campana de flujo laminar: Fomes. Modelo S179.

Pipetor: Biohit Midi Plus.

Micropipetas: Rainin Pipet•Lite.

Estufa de incubación: Shel-Lab. Modelo 1510 E.

Incubadora bacteriológica: Felisa®.

Agitador: Orbital Shaker. Modelo OS-200.
 Contador de colonia de Quebèc: Novatech. Modelo CC-100.
 Microscopio de campo claro: Nikon serie Eclipse. Modelo E100.
 Potenciómetro: Beckman. Modelo +40 pH meter digital.
 Agitador Orbital: T-E-M-A.
 Conductímetro: YSI. Modelo 35 conductance meter.
 Horno de secado: Felisa. Modelo FE-293 AD.

Equipo utilizado para el análisis cromatográfico:

La identificación de los derivados de petróleo, como son los hidrocarburos, se realizó mediante la comparación de los cromatogramas de las muestras analizadas. La cuantificación está basada en la respuesta del detector de ionización de flama en modalidad estándar externo. En el Cuadro 5 se muestran las condiciones en las que se realizaron las determinaciones de los hidrocarburos en las muestras de suelo, estimadas en base a los valores considerados como contaminantes de acuerdo a la EPA (1996).

CUADRO 5. Condiciones seleccionadas en base al tipo de columna, así como a la sensibilidad de respuesta y separación de picos de los diversos compuestos que conforman la gasolina.

Parámetro	Valor del parámetro
GAS ACARREADOR	NITRÓGENO
PRESIÓN	5 lb pul ⁻²
FLUJO	0.9 m min ⁻¹
VELOCIDAD	19.7 cm seg ⁻¹
FLUJO DE DIVISIÓN	43 mL min ⁻¹
TEMPERATURA INICIAL	40 °C de 40 a 80 °C (5 °C min ⁻¹) 80 °C de 80 a 200 °C (15°C min ⁻¹) 200 °C de 200° a 295°C (25°C min ⁻¹)
TEMPERATURA FINAL	295°C
TEMPERATURA DEL INYECTOR	220°C
TEMPERATURA DEL DETECTOR	250°C

Balanza analítica: Adventure™ OHAUS, muestra a analizar en base húmeda (3.5 g aprox).

Ultrasonido: Ultrasonik Ney.

Cromatatógrafo de Gases (CG): Hp. Modelo 5890A SERIES II.

CG – Fid: con un detector de ionización por flama.

Columna: Alltech:

FHASE: SE-54

ECONO-CAP

ID columna: 0.53 mm, longitud de la columna: 30 m.

5.1.4. Lodos residuales utilizados en el estudio

Los lodos residuales utilizados en el experimento proceden de la planta tratadora de aguas residuales (PTAR) del municipio de Chapala (Figura 4). Estas muestras de lodos residuales o biosólidos, se obtuvieron mediante donación de la Comisión Estatal del Agua de Jalisco (CEA), cumpliendo ciertos requisitos para su trasportación y tomando en cuenta las recomendaciones que se hicieron por parte de la dependencia estatal según el uso que se pretendió dar a estos lodos ya estabilizados.



FIGURA 4. Planta Tratadora de Aguas Residuales (PTAR) del Municipio de Chapala, Jalisco.

Estos lodos son tratados de acuerdo a la norma NOM-004-SEMARNAT-2002 (DOF, 2003), y resultan del saneamiento del agua en esta planta de Chapala, los cuales son calificados como excelentes en función de su contenido de metales pesados, así como agentes

patógenos y parásitos, representando una grande oportunidad para sus usos. El tratamiento que se les dió a los lodos estabilizados usados en el experimento fue a través de un proceso de digestión anaerobia (en ausencia de oxígeno), a temperatura de 38 °C, de lo que resultan los lodos biosólidos (Figura 5), con características que los hacen aptos para la recuperación de suelos contaminados (Mantilla, 2015).



FIGURA 5. Tratamientos de los lodos residuales estabilizados de la PTAR de Chapala.

5.1.5. Material vegetal

Para realizar la prueba de desarrollo vegetal del suelo en estudio se utilizaron 14 macetas con capacidad de 500 g y 56 semillas de *Zea mays*, variedad JS-913, marca Semillas JS proveniente de la empresa Neekxita S.P.R. de RL.

5.2. MÉTODOS

5.2.1. Primera etapa: caracterización del suelo contaminado y no contaminado, así como la obtención de las bacterias autóctonas a utilizar en el experimento *ex situ*

El primer muestreo del suelo (30 de marzo de 2015), se realizó para las determinaciones físico-químicas del suelo, así como para el estudio y obtención de bacterias autóctonas que mostraran capacidad de sobrevivencia en condiciones de derrame de hidrocarburos. Para esto se inició con un recorrido del área afectada por el derrame de hidrocarburos (gasolina) tomando al azar y mediante un muestreo sistemático semialineado y a una profundidad de 15 a 20 cm una muestra compuesta por 5 submuestras (Figura 6).

Para la muestra de suelo utilizada en la obtención de bacterias autóctonas, en esta misma zona afectada y en los mismos puntos, se procedió a tomar una muestra compuesta haciendo uso de una espátula que fue desinfectada con alcohol previamente en cada submuestreo, colocando las submuestras en frasco de vidrio esterilizado.



FIGURA 6. Primer muestreo de suelo contaminado con hidrocarburos de 20-35 cm de profundidad en la zona afectada.

Así mismo, en el área colindante que no sufrió afectaciones por el derrame y siguiendo la misma técnica del muestreo de suelos, se tomó otra muestra compuesta formada por cinco

submuestras, esta muestra de suelo no contaminado se usó como referencia de las condiciones naturales del suelo sin contaminar.

A. Caracterización física y química de las muestras de suelo.

Todas las muestras de suelos recolectadas en este primer muestreo en el área en estudio, se sometieron a determinaciones físicas y químicas establecidas en la NOM-021-RECNAT-2000, (DOF, 2002). Textura del suelo se realizó por el método del Hidrómetro de Bouyoucos; Potencial Hidrógeno (pH) en el suelo se realizó por el método electrométrico (Determinación de Acidez activa y Acidez intercambiable) en una relación suelo:agua de 1:2; Conductividad Eléctrica (C.E.) en el suelo se realizó a través del método del conductímetro en una relación suelo:agua de 1:2; Materia orgánica del suelo, se realizó mediante el método de Walkley y Black; Capacidad de intercambio catiónico (CIC) del suelo se realizó a través el método del Acetato de Amonio; Densidad aparente (D_a) del suelo se realizó por el método de la parafina o método del terrón; Densidad real (D_r) del suelo se realizó por el método del Picnómetro; Porosidad del suelo se realizó por el cálculo a partir de los valores de Densidad aparente (D_a) y Densidad Real (D_r), a través la siguiente fórmula:

$$Porosidad\% = \frac{D_r - D_a}{D_r} \times 100$$

La determinación de la humedad ($W\%$) del suelo es la relación, se realizó mediante el cálculo del contenido de humedad de la muestra, mediante la siguiente fórmula:

$$W\% = \frac{W_H - W_S}{W_S} \times 100$$

En donde:

$W\%$ = es el contenido de humedad de la muestra en porcentaje.

W_H = Peso húmedo del suelo en gramos.

W_S = Peso seco de la muestra en gramos.

La determinación de los nutrientes: nitrato (NO_3^-), amonio (NH_4^+), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca) y magnesio (Mg), se realizó por el Método de Morgan en todas las muestras de suelos de los tratamientos del experimento y de las muestras recolectadas en el área afectada por el derrame de hidrocarburos en La Villita, Municipio de Tala, Jalisco, México.

B. Contenido de hidrocarburos.

La determinación del contenido de hidrocarburos se realizó siguiendo la metodología EPA 8015B (EPA, 1996), para moléculas de hidrocarburos que contienen cadenas lineales entre 12 a 28 átomos, es decir C_{12} a C_{28} .

C. Aislamiento y selección de las bacterias autóctonas del suelo contaminado con hidrocarburos.

De las muestras de suelo en el primer muestreo proveniente del derrame de hidrocarburos se analizaron en laboratorio de Microbiología Celular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), se separaron 10 g de la muestra de suelo en condiciones aséptica se depositaron en un matraz que contenía 90 ml de agua destilada estéril. Esta mezcla fue agitada vigorosamente para su homogeneización, y se obtuvo la primera dilución de 10^{-1} .

CUADRO 6. Medio de cultivo (caldo basal) usado para el aislamiento de los microorganismos presentes en el suelo contaminado con hidrocarburos.

COMPUESTO	CANTIDAD
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Sulfato de Amonio	7.0 g
KH_2PO_4 Fosfato de Potasio Monobásico, cristal	5.7 g
K_2HPO_4 Fosfato de Potasio Dibásico, anhidro	2.3 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Sulfato de Magnesio Pentahidratado	2.2 g
H_2O DESTILADA	1000 ml

De esta dilución, se extrajo con una pipeta estéril 1 ml de la mezcla y se depositó en un tubo que contenía 9 ml de agua destilada estéril y se obtuvo una dilución de 10^{-2} . Se realizaron diluciones seriadas hasta la dilución 10^{-7} . De cada una de las diluciones por separado se inoculó 1 ml en cajas de Petri con Agar soya tripticaseína (marca Dibico). Posteriormente

fueron incubadas a 30 °C por 24 a 48 horas. Posteriormente se determinó la cantidad de mesófilos aerobios en la muestra de suelo gramo de muestra, se seleccionaron y aislaron colonias de acuerdo a su morfología bacteriana (Cuadro 6).

En total de colonias seleccionadas fueron cultivadas de manera individual en medio basal suplementado con y sin levadura se seleccionó el medio de cultivo que presento más crecimiento y posteriormente se observa el desarrollo a diferentes concentraciones de hidrocarburo (gasolina) con la finalidad de determinar si las cepas bacterianas son capaces de crecer en presencia de una concentración mayor de hidrocarburo, de la presente en el suelo contaminado muestreado. Se sembraron por triplicado cada cepa bacteriana a una concentración de 1×10^7 UFC en caldo basal (Cuadro 6) con extracto de Levadura (0.4%) más 1% de gasolina, ajustado a un pH a 5.3, durante 48 horas a 30 °C posteriormente se cuantificaron en cajas de agar soya tripticaseina para determinar la sobrevivencia de cada cepa bacteriana.

De las bacterias que presenten desarrollo a hidrocarburos se sometieron a concentraciones mayores para seleccionar aquellas que tengan mayor capacidad de sobrevivir a altas concentraciones de este compuesto, tanto de manera individual como en consorcio.

Las bacterias seleccionadas que mostraron mayor crecimiento bacteriano en los ensayo de sobrevivencia de esta primera etapa, con el medio basal con levadura más las concentraciones de gasolina, se clasificaron de acuerdo a características tintoriales.

5.2.2. Segunda etapa: instalación del experimento *ex situ* para evaluación de tratamientos de biorremediación

En la segunda etapa se instaló un experimento para evaluar el efecto de la biorremediación, en macetas colocadas en un área del CUCBA, llamado experimento *ex situ*.

5.2.2.1. Determinación del contenido de HTP en el suelo al inicio del Experimento

ex situ.

Para el experimento *ex situ*, se realizó un segundo muestreo del suelo en la zona contaminada por hidrocarburos, el día 30 de noviembre de 2015, para lo cual se seleccionaron 5 puntos de los que se tomaron entre 15 a 18 kg de suelo, depositándolo en las cubetas de plástico de 20 L de capacidad (Figura 7), las cuales fueron utilizadas para el experimento de biorremediación.



FIGURA 7. Cubetas usadas para el experimento *ex situ* y muestreo en la Delegación La Villita, Jalisco, México.

Para tener un comparativo del nivel de contaminación en el suelo en este segundo muestreo, se tomaron dos muestras, una en la zona contaminada y la otra en la zona no contaminada. Estas dos muestras representativas de ambas áreas, fueron de aproximadamente 400 g, y recolectadas mediante una espátula de acero inoxidable limpia y libre de contaminantes y depositadas en frascos de vidrio (Figura 8). Las muestras se protegieron de tal forma que se evitara la fuga del contaminante al exterior, así como daños que pudieran producirse durante su traslado, lo cual se aseguró con una hielera con hielo para tener una temperatura de 4° C aproximadamente; fueron trasladadas al laboratorio del Centro de Estudios y Proyectos Ambientales del Departamento de Ingeniería de Proyectos del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías de la Universidad de Guadalajara, lo más rápido posible para evitar pérdidas mayores del hidrocarburo de acuerdo a la NOM-138-

SEMARNAT/SS-2003 (SEMARNAT, 2005), en el cual se determinó el nivel de contaminación en suelo mediante el método EPA 8015B, (EPA, 1996).



FIGURA 8. Muestras de suelo destinadas a los análisis cromatográficos en la fase inicial del experimento de biorremediación.

5.2.2.2. Preparación del experimento *ex situ* de biorremediación

El experimento se instaló el martes 1 de diciembre de 2015 (un día después del segundo muestreo del suelo contaminado), en un área del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara y delimitada con palitos de madera y constituida con base de tarimas cubiertas con lona de plástico de color negro. El área de la instalación del experimento de Biorremediación fue de 4x6 m y se establecieron 9 unidades experimentales, cada una conformada por un recipiente de plástico de 20 litros de capacidad y a una distancia de 1m entre estas unidades (Figura 9).

El experimento se realizó bajo un diseño completamente aleatorio con tres tratamientos, incluido el testigo, y tres repeticiones. Cada unidad experimental contenía un total de 15 Kg de suelo contaminado proveniente del área afectada por el derrame de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) del 18 de mayo de 2014, en la Delegación de La Villita.



FIGURA 9. Vista de la instalación del experimento de biorremediación en el área del CUCBA.

El Tratamiento1 constó del cultivo mixto ($\approx 5 \times 10^6$ UFC/ml) de las cepas bacterianas autóctonas seleccionadas en la primer etapa de este estudio. El consorcio de las cepas bacterianas seleccionadas para remediar el suelo contaminado se inocularon mediante una pipeta con la concentración $\approx 5 \times 10^6$ UFC ml⁻¹ por tratamiento (Figura10) y se realizó el martes 1 de diciembre de 2015 alrededor de las 11:30 PM en la instalación del experimento de Biorremediación.



FIGURA 10. Biomasa bacteriana seleccionada para el experimento de biorremediación *ex situ*.

El Tratamiento 2 consistió en la aplicación de los lodos residuales provenientes de la Planta Tratadora de Aguas Residuales de Chapala más cultivo mixto bacteriano ($\approx 5 \times 10^6$ UFC ml⁻¹). Los lodos residuales fueron pesados para tener 2.7 kg y posteriormente mezclados con el suelo contaminado para homogeneizar sobre una lona de plástico negro libre de contaminante, y se le agregó a cada unidad el cultivo mixto bacteriano. De esta forma se aplicó en cada unidad 2.7 Kg de lodo residual estabilizado y cultivo mixto bacteriano ($\approx 5 \times 10^6$ UFC ml⁻¹).

El Tratamiento 3 se consideró como Testigo conteniendo sólo el suelo contaminado en las condiciones naturales propuestas del experimento sin la aplicación de ningún material extra; este tratamiento será mencionado como Testigo1.

El primer día del experimento fue fechado el miércoles 2 de diciembre de 2015 y la duración de todo el experimento propuesto de Biorremediación fue de un lapso de 90 días por lo que el último día del experimento fue el lunes 29 de febrero de 2016.

Una vez finalizado el experimento se obtuvieron muestras de las unidades experimentales para la determinación de niveles contaminantes de hidrocarburos, lo cual se hizo siguiendo la recomendación de toma y manejo de muestras de la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (SEMARNAT, 2005), llevando las muestras en hielera a una temperatura aproximada de 4°C, al laboratorio del Centro de Estudios y Proyectos Ambientales del CUCEI de la Universidad de Guadalajara, para su determinación mediante cromatografía de gases de acuerdo al método EPA 8015B (EPA, 1996). Así mismo, se caracterizó de nuevo el suelo de cada tratamiento mediante las determinaciones fisicoquímicas con las técnicas establecidas para ello en la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002). Posteriormente, se realizaron los conteos de bacterias para evaluar el desarrollo microbiano en cada tratamiento.

5.2.3. Prueba biológica en plántulas de maíz

La toxicidad se evalúa mediante bioensayo y determina los parámetros para observar la toxicidad que puede ocasionar un derrame de hidrocarburos a un organismo vegetal, en este caso semilla de maíz; se pretendió además conocer los efectos fitotóxicos que provocan los HTP permitiendo valorar y determinar los efectos de riesgo asociados a su exposición.

Posteriormente a la etapa final del experimento de Biorremediación, el jueves 21 de abril de 2016 a las 12:40 pm se instaló el experimento de desarrollo vegetal donde se sembraron con la misma profundidad de 2 cm por cada maceta con capacidad de 500 g (14 en total), 4 semillas de *Zea mays*, variedad JS-913, marca Semillas JS proveniente de la empresa Neekxita S.P.R. de RL, en condiciones naturales y sin adición de fertilizante.

Esta prueba requirió de 14 macetas y tuvo como duración 15 días para observar el comportamiento del desarrollo vegetal de estas semillas de la misma variedad, con estas diferentes condiciones propuestas, bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento.

Los tratamientos estudiados fueron: Tratamiento 1 el suelo resultante del experimento *ex situ* de la aplicación de la cepas bacterianas autóctonas; el Tratamiento 2 el suelo resultante del experimento *ex situ* tratado con la mezcla de lodos residuales estabilizados + cepa bacteriana autóctona; el Tratamiento 3 se consideró el suelo testigo del experimento *ex situ*; Tratamiento 4 una muestra de suelo contaminado extraído recientemente de la zona de estudio previo a este experimento y con niveles elevados de HTP; y se utilizó como Testigo una muestra de suelo extraído recientemente de la zona no contaminada. Estos dos últimos tratamientos utilizaron muestras de suelo recolectadas el martes 19 de abril de 2016.

Como variables de estudio en este experimento se consideraron días a emergencia contados como el número de días transcurridos desde la siembra y hasta la emergencia de plántula. A los 15 días de la siembra se extrajeron las plantas, se lavaron con mucho cuidado las raíces y se les midió la longitud final de raíz en centímetros a partir de la base del tallo y

hasta la punta del pelo radical más largo, y altura total de planta medida en centímetros desde la base del tallo hasta la parte de inicio de la hoja recientemente formada.

5.3. Análisis estadísticos

Los datos se procesaron elaborando una base de datos en el programa Minitab versión 16.1.0 (Minitab Inc., 2010). Se establecieron como variables independientes las UFC gr^{-1} , la longitud Tallo-Raíz, la longitud Tallo-Ápice y como variables de respuesta se tomaron: Testigo1; Tratamiento1; Tratamiento2; Suelo Contaminado; Suelo No Contaminado. Con estos datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para determinar las diferencias significativas entre todos los tratamientos analizados. Posteriormente se realizó un ANVA entre todos los tratamientos del experimento de biorremediación entre las variables de la materia orgánica, el pH y la conductividad eléctrica.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para llevar a cabo el estudio de biorremediación del suelo contaminado, éste se dividió en tres etapas: la primera abarca el diagnóstico de las condiciones del suelo contaminado y el aislamiento de bacterias a utilizar en la biorremediación; la segunda etapa constó del establecimiento del experimento de biorremediación, mencionado como experimento “*ex situ*”, ya que las muestras del suelo contaminado fueron tratadas fuera de la zona de contaminación, debido a que en dicha zona se corrían riesgos de inseguridad al encontrarse en un área aislada; por último, la tercera etapa se realizó para evaluar la capacidad el suelo resultante de los tratamientos de biorremediación en el experimento *ex situ*, para permitir el desarrollo de una especie vegetal sin efectos de toxicidad.

6.1. Primera etapa: caracterización del suelo contaminado y no contaminado, así como la obtención de las bacterias autóctonas a utilizar en el experimento *ex situ*

El muestreo y trabajo analítico para la caracterización de los suelos contaminados por derrames de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) son costosos; sin embargo, también resulta costoso la restauración o eliminación del contaminante cuando el daño excede a las concentraciones aceptables como en el caso en estudio del derrame de hidrocarburos del pasado 18 de mayo de 2014 que contaminó un área de la delegación La Villita, Municipio de Tala, Jalisco, México.

En el primer muestreo se realizó con el fin de recolectar muestras de suelo contaminado para la etapa microbiológica de aislamiento y selección de las cepas bacterianas utilizadas posteriormente en el experimento de biorremediación, se encontró el área afectada con cambio en el color del suelo, sin vegetación, con residuos oleosos de hidrocarburos (gasolina) y percibiendo un fuerte olor de gasolina (Figura 11).



FIGURA 11. Situación ambiental encontrada en el suelo afectado por el derrame de HTP en el muestreo realizado el lunes 30 de marzo de 2015.

6.1.1. Caracterización fisicoquímica del suelo

Para esta caracterización, el suelo fue clasificado como suelo contaminado y suelo no contaminado, extraídos de la zona afectada con HTP y zona no afectada adyacente, respectivamente.

El suelo en estudio recolectado en el área de la delegación La Villita (Jalisco) proveniente del derrame de hidrocarburos ocasionado el 18 de mayo de 2014, una vez caracterizado, presentó las características indicadas en el Cuadro 7, en el que se muestra tanto el suelo contaminado como el suelo no contaminado cercano a la zona del derrame de HTP.

Los resultados obtenidos al analizar el suelo contaminado con HTP y el suelo no contaminado cercano al área en estudio, presentan aspectos visibles caracterizados por un color oscuro en seco y en húmedo, colores que se atribuyen a la presencia del contaminante (gasolina) derramado en el suelo y, en efecto esto se observó sólo en el suelo derramado por HTP.

Con referencia a los datos del Cuadro 7 se observa que ambos suelos, suelo contaminado y suelo no contaminado, muestran valores de pH ácido lo que puede ser debido a la presencia de los hidrocarburos que acidifican el suelo y por la degradación de la materia orgánica que genera ácidos orgánicos que acidifican el mismo medio (Martínez y López,

2001), sin embargo estos valores de pH no se encontraron en un intervalo adecuado para la degradación del contaminante, ya que las condiciones favorables están entre 6.0 y 8.0 unidades como mencionan Martínez y López (2001).

Cuadro 7. Características del suelo contaminado y no contaminado.

	SUELO CONTAMINADO	SUELO NO CONTAMINADO
pH	4.93	4.68
CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA (C.E. dS m ⁻¹)	0.3	0.7
MATERIA ORGÁNICA (M.O.%)	0.84	1.88
ARENA (%)	88.08	72.92
ARCILLA (%)	2.28	4.8
LIMO (%)	9.64	22.28
CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO (C.I.C. cmol _c kg ⁻¹)	8.75	13.69
DENSIDAD APARENTE (D.A. g cc ⁻¹)	1.32	1.29
DENSIDAD REAL (D.R. g cc ⁻¹)	2.26	2.16
POROSIDAD (%)	41.59	40.27
HUMEDAD (%)	11.93	-----
NITRATOS (NO ₃ ⁻ ppm)	2.057	4.5
AMONIO (NH ₄ ⁺ ppm)	< 12	< 12
FÓSFORO (P ppm)	25	25
POTASIO (K ppm)	250	> 250
CALCIO (Ca ppm)	1.200	1.600
MAGNESIO (Mg ppm)	125	50

Los valores de la C.E. en ambos suelos no presentaron diferencias notorias y quedan en una clasificación de “efectos despreciables de salinidad” de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000. Este parámetro en presencia de la gasolina aumenta, pero en este caso no aumentó, además tiene un valor dentro los rangos óptimos para el desarrollo vegetal de la mayoría de los cultivos sembrados en la zona.

La M.O. en ambos suelos resultó en nivel bajo de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002), lo que puede deberse a que de acuerdo con Martínez y

López (2001), el método de Walkley y Black no logra oxidar compuestos de hidrocarburos con cadenas C₂₅ a C₃₅, que están presentes en el combustóleo.

Comparando los valores del tamaño de partículas del suelo, como % de arena, limo y arcilla en el triángulo de texturas como se indica en la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002), el suelo no contaminado muestra textura franco arenoso a diferencia del suelo contaminado que presentó una textura arenosa, ambos tipos de textura favorecen la transferencia de oxígeno atmosférico permitiendo una mejor degradación de los hidrocarburos, de acuerdo a lo mencionado por Marin *et al.* (2005) y Trindade *et al.* (2005), mencionados por Ferreira *et al.* (2013).

La D.A. muestra variaciones mínimas considerando que el suelo presentó altos valores de hidrocarburos no permisibles según lo establecido en la norma oficial NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (DOF, 2005). La D.R. es afectada en altas concentraciones de hidrocarburos, y el valor que resultó en el suelo contaminado no es así tan afectado y por lo mismo presentó un valor similar al no contaminado; esto comportamiento se manifiesta cuando las partículas del suelo adsorben gasolina y el mismo se ve afectado directamente con la disminución de la D.R. < de 1 g cc⁻¹. La porosidad no fue preocupante en el suelo contaminado, debido también a que la contaminación por gasolina no produjo alteraciones significativas.

La humedad es una de las variables más importantes para favorecer la degradación de contaminantes orgánicos por los microorganismos; el rango de humedad recomendado para una técnica de biorremediación es de 25 a 75% (Gómez, *et al.* 2008), y el suelo en este estudio resultó con un bajo valor de humedad, lo que pudiera haber inhibido la actividad microbiana.

La C.I.C. resultó baja y acorde al tipo de textura franco arenosa y arenosa, así como valores bajos de materia orgánica en ambos suelos. Estos valores indican bajo poder de retención de iones de hidrocarburos, así mismo no se presentan cambios notorios en la CIC por efecto de la presencia de hidrocarburos, lo que concuerda con los resultados reportados

por Martínez y López (2001), quienes no consignan cambios en la CIC debidos a la concentración y tipo de hidrocarburos.

El contenido nutrimental en ambos suelos, resulta en niveles bajos para N, P, K y medio para Ca y Mg, estos valores indican condiciones pobres para el desarrollo microbiano, de acuerdo a lo indicado por Gómez *et al.* (2008). Para un buen desarrollo microbiano, se requiere de una buena fuente de carbono, como son los hidrocarburos, pero al mismo tiempo, es importante contar con fuentes de los otros nutrimentos, que permitan el incremento de microorganismos y así la degradación de los materiales contaminantes.

6.1.2. Obtención de cepas bacterianas nativas para el experimento *ex situ*

A. Aislamiento de cepas bacterianas nativas del suelo contaminado y selección de las de mayor crecimiento

Después de haber aislado las cepas bacterianas presentes en el suelo derramado con hidrocarburos de la delegación La Villita, Jalisco, se sometieron a una primera prueba de sobrevivencia en un medio basal con levadura y el 1% de gasolina de acuerdo a lo reportado por Maposita *et al.* (2011), las 20 cepas bacterianas diferentes de acuerdo con características morfológicas (Cuadro 8 se muestra la descripción realizada de cada una de las cepas aisladas).

Con base en estos datos de desarrollo bacteriano en condiciones de HTP se seleccionaron las cuatro cepas bacterianas que presentaron un mayor crecimiento real de la colonia en el medio basal líquido adicionado con gasolina, identificadas como BACT. 7 con $5.52 \text{ Log}_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$, BACT. 8 con $5.50 \text{ Log}_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$, BACT. 13 con $5.59 \text{ Log}_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$ y BACT. 17 con $5.32 \text{ Log}_{10} \text{ UFC ml}^{-1}$.

B. Ensayo de sobrevivencia a diferentes niveles de contaminante

En el segundo ensayo de sobrevivencia en medios de cultivo con dos niveles de hidrocarburo (1.5% y 2% de gasolina) añadido al medio basal con levadura, incubadas a 30 °C de 24 a 48 horas, todo por duplicado a los que fueron sometidas las cuatro cepas bacterianas

seleccionadas y los 10 consorcios entre ellas, se obtuvieron los resultados mostrados en la Figura 12.

CUADRO 8. Crecimiento bacteriano de las 20 cepas aisladas en Log₁₀UFC ml⁻¹ por el ensayo de sobrevivencia en un medio basal con levadura (0.4%) y 1% de gasolina con su respectiva morfología colonial.

CEPA	Log₁₀UFC ml⁻¹	Morfología Colonial: Color, forma, borde.
BACTERIANA		
BACT. 1	NO SE PRESENTÓ CRECIMIENTO	
BACT. 2	4.66	Color amarillo, forma irregular, borde ondulado
BACT. 3	4.55	Color blanco amarillado, forma irregular, borde dentado
BACT. 4	4.13	Color amarillo claro, forma irregular, borde dentado
BACT. 5	4.61	Color blanco, forma irregular, borde ondulado
BACT. 6	4.72	Color blanco amarillado claro, forma irregular, borde ondulado
BACT. 7	5.52	Color amarillo, forma irregular, borde ondulado
BACT. 8	5.50	Color blanco amarillado claro, forma circular, borde entero
BACT. 9	4.70	Color amarillo claro, forma irregular, borde dentado
BACT. 10	4.77	Color blanco amarillado, forma circular, borde entero
BACT. 11	5.21	Color amarillo, forma irregular, borde ondulado
BACT. 12	4.84	Color blanco amarillado, forma circular, borde entero
BACT. 13	5.59	Color blanco, forma irregular, borde lobulado
BACT. 14	4.87	Color blanco amarillado, forma irregular, borde ondulado
BACT. 15	4.85	Color amarillo claro, forma irregular, borde ondulado
BACT. 16	4.61	Color blanco, forma irregular, borde rizoide
BACT. 17	5.32	Color blanco, forma irregular, borde ondulado
BACT. 18	4.69	Color amarillo claro, forma irregular, borde ondulado
BACT. 19	4.87	Color blanco, forma irregular, borde ondulado
BACT. 20	4.77	Color amarillo, forma irregular, borde ondulado

De acuerdo con los resultados reportados en esta figura, las cepas bacterianas muestran un mejor desarrollo con el tratamiento del 1.5% de gasolina, debido a que el medio de la concentración de 2% empezó a inhibir ligeramente el desarrollo microbiano de las cuatros cepas bacterianas sembradas y sus consorcios, excepto con la cepa individual 13, la cual muestra un incremento de UFC en el tratamiento de 2% de gasolina.

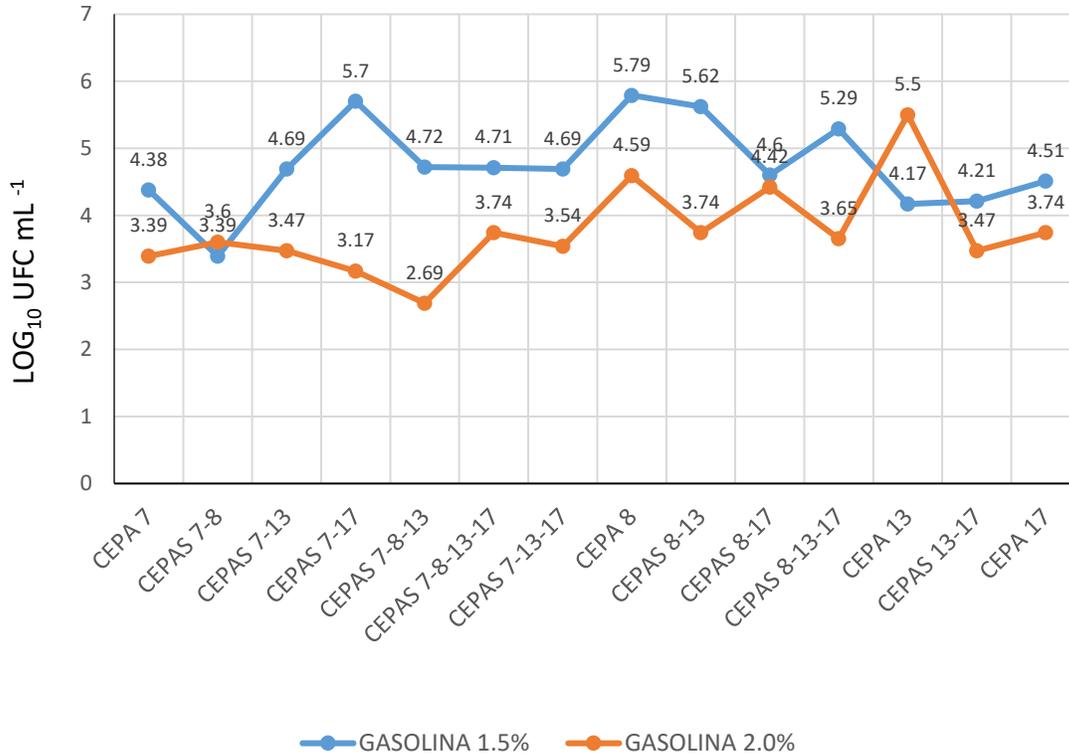


FIGURA 12. Sobrevivencia con 1.5 y 2% de gasolina de cepas autóctonas aisladas del derrame de HTP en la localidad de la Villita seleccionadas en la prueba de sembradas individualmente y en consorcios

C. Selección de la cepa nativa con sobrevivencia a condiciones contaminantes para ser utilizada en pruebas de biorremediación

Las cepas con mayor crecimiento fueron sometidas a una última prueba de sobrevivencia con el tratamiento de 1.5% de gasolina, con el propósito de evaluar el incremento de la población en cada consorcio seleccionado en la prueba anterior y también en cada cepa individual sembrada. Las cepas seleccionadas y los consorcios formados para este ensayo se muestran en el Cuadro 9.

CUADRO 9. Sobrevivencia de bacterias en medio basal con levadura (0.4%) y las concentraciones de 1.5% y 2% de gasolina

IDENTIFICACION DE CEPA BACTERIANA	
1	= BACT. 7 (INDIVIDUAL)
2	= BACT. 7-8 (CONSORCIO)
3	= BACT. 7 -13 (CONSORCIO)
4	= BACT. 7 -17 (CONSORCIO)
5	= BACT. 7 – 8 – 13 (CONSORCIO)
6	= BACT. 7 – 8 – 13 – 17 (CONSORCIO)
7	= BACT. 7 – 13 -17 (CONSORCIO)
8	= BACT. 8 (INDIVIDUAL)
9	= BACT. 8 – 13 (CONSORCIO)
10	= BACT. 8 – 17 (CONSORCIO)
11	= BACT. 8 – 13 – 17 (CONSORCIO)
12	= BACT. 13 (INDIVIDUAL)
13	= BACT. 13 – 17 (CONSORCIO)
14	= BACT. 17 (INDIVIDUAL)

En la Figura 13 se reporta el crecimiento de los microorganismos autóctonos microbianos del suelo contaminado en estudio; esta prueba tuvo el objetivo de evaluar diferentes combinaciones de las cepas bacterianas que presentaron mayores incrementos en su desarrollo; dando como resultado un mayor crecimiento de UFC del consorcio 8-13 debido a su mejor adaptación en su medio ambiente nativo contaminado por el derrame de HTP.

Con el resultados de las pruebas anteriores se seleccionó el consorcio de las cepas bacterianas autóctonas 8-13 del suelo contaminado con hidrocarburos de la delegación de La Villita, como inóculos de los microorganismos degradadores de hidrocarburos para el siguiente experimento de Biorremediación. Esta selección concuerda con los resultados obtenidos por Marchal *et al.* (2003), quienes concluyeron que uno de los factores que permite el éxito en la degradación de hidrocarburos es la combinación de cepas, es decir la formación de consorcios.

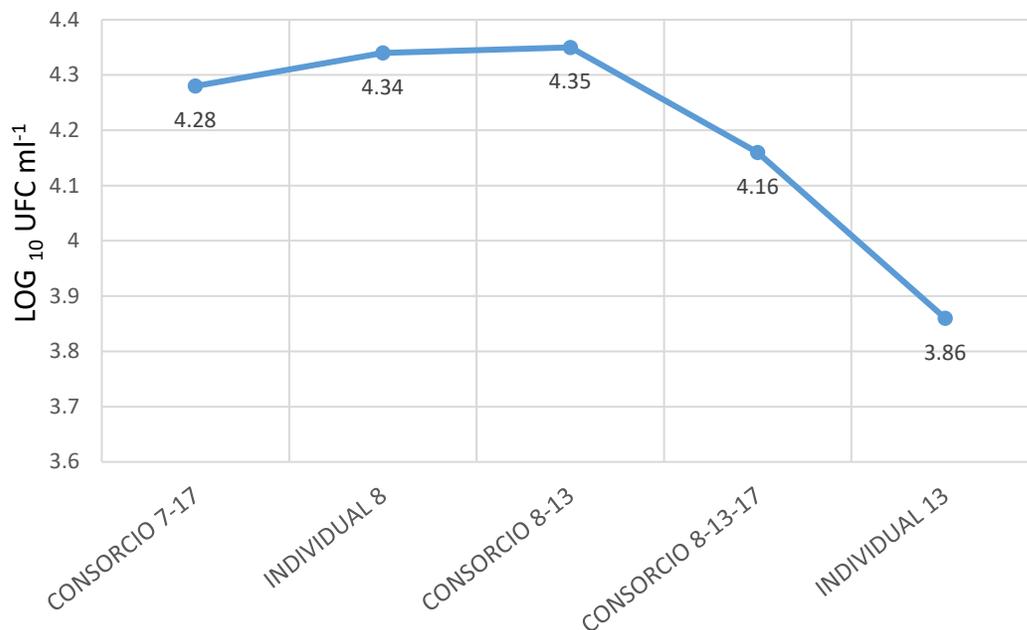


FIGURA 13. Supervivencia bacteriana de cepas autóctonas de la Delegación La Villita a 1.5% de gasolina aisladas del derrame con hidrocarburos en Tala, Jalisco

Las cepas seleccionadas para preparar los tratamientos a aplicar en el experimento *ex situ* se conformaron por las siguientes cepas:

BACT. 8, Gram +, género *Micrococcus* sp.

BACT. 13, Gram +, género *Bacillus* sp.

La selección de dos cepas Gram positivas, no concuerda con los resultados obtenidos por Van-Hamme *et al.* (2003) y Echeverri *et al.* (2010), quienes establecen en su estudio, que las bacterias Gram negativas tienen una ventaja importante en la degradación de HTP frente a las Gram positivas, debido a que las primeras tienen lipopolisacáridos en su membrana, lo que les permite la formación y estabilización de emulsiones de hidrocarburos y por lo tanto un incremento en la superficie de ataque del contaminante.

6.2. Segunda etapa: evaluación de tratamientos de biorremediación y prueba biológica

El lunes 30 de noviembre de 2015, día de la instalación del experimento dentro el área del CUCBA para realizar caracterización fisicoquímica, se encontró el suelo todavía con

perturbaciones ambientales detectadas visualmente y la gasolina derramada presente todavía en los primeros centímetros de profundidad del suelo, no obstante el lapso de tiempo transcurrido desde el derrame de hidrocarburos.

Se presentaron casi las mismas condiciones que se observaron en el primer muestreo realizado el 30 de marzo de 2015, con la única diferencia que se observó el crecimiento lento de unas malezas, que fue debido a mezcla de suelo libre de contaminante con lo contaminado, pero en el mismo tiempo la gasolina derramada tendió a dispersarse entre las parcelas cercanas, provocando que los hidrocarburos pudieran afectar área cercana al sitio donde ocurrió tal derrame de HTP.

6.2.1. Contenido de HTP en el suelo, al inicio del experimento *ex situ*

Previo a la instalación del experimento *ex situ*, las muestras de suelo contaminado y no contaminado fueron analizadas para medir la concentración de hidrocarburos, con los resultados mostrados en la Figura 14.

El pico en el minuto uno del cromatograma del suelo contaminado (Figura 14) corresponde al solvente que se utilizó en el cromatograma y los picos que aparecen después del minuto uno corresponden a los hidrocarburos que componen a la gasolina. Para determinar la cantidad de gasolina que se extrajo se integra matemáticamente cada pico del cromatograma después del minuto uno y así obtener un área de cada uno de ellos; se suman y se obtiene un área total, la cual se comprara con el área de un blanco conocido y la relación de áreas es proporcional a la cantidad de miligramos de gasolina por kilogramo de suelo. Esto se observa en el Cuadro 10, en el que la suma de estos picos para el suelo contaminado da un valor de 11,193.4 mg kg⁻¹ en base húmeda. Este valor queda muy por arriba a los límites máximos permitidos en la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (DOF, 2005) que se muestran en el Cuadro 11.

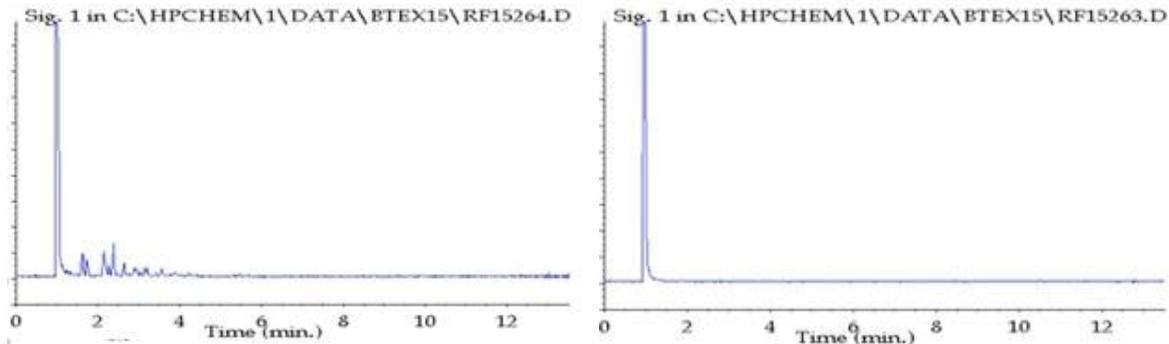


FIGURA 14. Cromatogramas de las muestras de suelo contaminado (izquierda) y no contaminado (derecha), recolectadas en el área en estudio de la delegación de La Villita, Jalisco, México el lunes 30 de noviembre de 2015, previo a la instalación del experimento de biorremediación *ex situ*.

Como comparación, este resultado es obtenido después de haber transcurrido 18 meses del derrame del hidrocarburo, esto es, inicialmente la concentración debió haber sido mucho mayor. Tal es el caso del estudio realizado por Martínez-Prado *et al.* (2011) quienes informan de valores de HTP de hasta 51,191 mg kg⁻¹ en base seca de un suelo proveniente del taller de una empresa minera que estuvo en constante contaminación.

CUADRO 10. Resultados de las muestras de suelo contaminado y no contaminado recolectadas el 30 de noviembre de 2015 analizadas por el método EPA 8015B-1996, por GC/FID.

MUESTRAS	HTP fracción ligera y media, mg kg ⁻¹ base	
	húmeda	
SUELO CONTAMINADO	11,193.4	
SUELO NO CONTAMINADO	< 10	

Por el contrario, en el suelo no contaminado, se observa el pico en el minuto uno del cromatograma que corresponde al solvente utilizado, pero no se detecta ningún complejo de hidrocarburos de la gasolina, ya que no aparece ningún pico después del minuto uno, esto es, que la muestra analizada no contiene ningún contaminante, por lo tanto este suelo se encuentra dentro del rango permisible según lo establecido en la norma oficial NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (DOF, 2005) (Cuadro 11).

CUADRO 11. Límites máximos permisibles del contenido de hidrocarburos en suelo. (DOF, 2005)

FRACCIÓN DE HIDROCARBUROS	USO DE SUELO PREDOMINANTE (mg kg ⁻¹) BASE HÚMEDA		
	AGRÍCOLA, FORESTAL, PECUARIO Y DE CONSERVACIÓN	RESIDENCIAL Y RECREATIVO	INDUSTRIAL Y COMERCIAL
LIGERA	200	200	500
MEDIA	1200	1200	5000
PESADA	3000	600	6000

6.2.2. Contenido de HTP en el suelo al final del experimento *ex situ*

Al transcurrir los 90 días del experimento de biorremediación con los tres tratamientos a evaluar, suelo contaminado (Testigo), suelo contaminado inoculado con el consorcio de cepas autóctonas con mejor sobrevivencia a los HTP (Tratamiento 1) y suelo contaminado inoculado por el consorcio de cepas autóctonas más aplicación del 15% de lodos residuales estabilizados (Tratamiento 2), se determinó la concentración de HTP en cada unidad experimental, obteniendo los resultados mostrados en la Figura 15.

De acuerdo con los resultados del contenido de HTP en los tratamientos del lunes 29 de febrero de 2016, día último del experimento de Biorremediación, se reportan todos los cromatogramas del Testigo, Tratamiento 1 y Tratamiento 2 como se observa en la Figura 16, con valores negativos. El único pico que se observa es el del solvente en el minuto uno, lo que significa que en las nueve muestras (tres repeticiones por cada tratamiento), no se tiene presencia de hidrocarburos totales de petróleo (HTP). Se observa que incluso las unidades experimentales del Tratamiento Testigo, no muestran contenido de HTP, por lo que se procedió a realizar un tercer muestreo en la zona afectada con la finalidad de corroborar estos resultados.

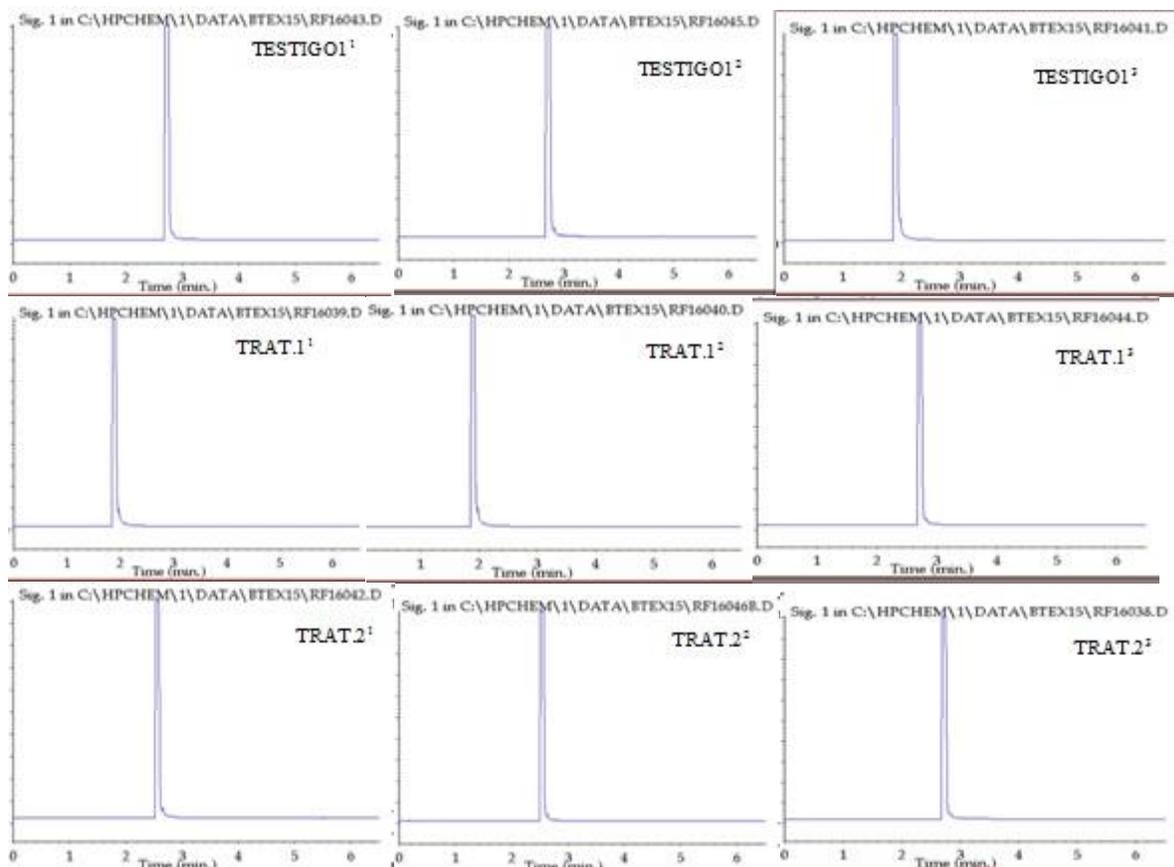


FIGURA 15. Cromatogramas de todos los tratamiento del experimento biorremediación en la etapa final.

Como resultado de la muestra obtenida el 19 de abril del 2016, 22 meses después del derrame del hidrocarburo, el cromatograma indicó presencia de HTP, como se observa en la Figura 16, con un valor acumulado de HTP de $4,835 \text{ mg kg}^{-1}$ base húmeda. Este resultado sigue siendo superior al máximo permitido para un uso agrícola, pecuario, forestal o de conservación de acuerdo al Cuadro 11, por lo que es necesario explicar por qué en el experimento *ex situ*, aún el Tratamiento Testigo, no reportó hidrocarburos.

Se consideró que las causas de la no presencia de HTP en el suelo testigo y que pudieron también afectar el resultado en los otros tratamientos, fueron principalmente las condiciones ambientales presentadas durante el periodo del experimento, del 1 de diciembre de 2015 al 29 de febrero de 2016, en el cual durante el mes de diciembre se presentaron

precipitaciones altas como se observa en el Cuadro 12; esto pudo provocar la lixiviación de los HTP, ya que las macetas que conformaron cada unidad experimental no eran muy profundas, aproximadamente de 30 cm, y el suelo en estudio tuvo una textura arenosa; así mismo durante los meses de enero y febrero se presentaron condiciones de fuerte viento, lo que también pudo provocar la volatilización más rápida de los HTP.

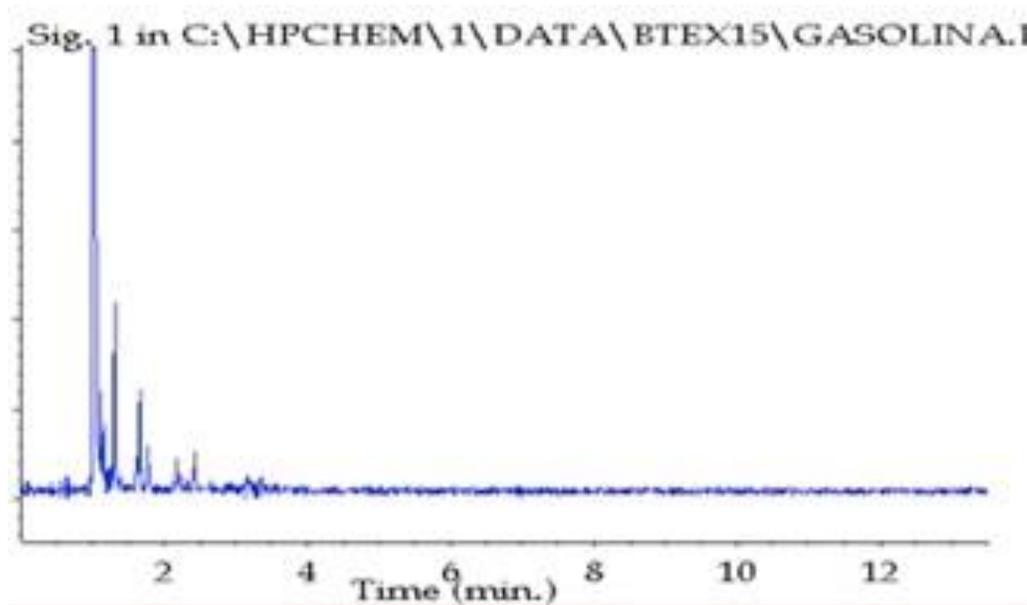


FIGURA 16. Cromatograma de la muestra de suelo contaminado recolectada en el área en estudio de la delegación de La Villita, Jalisco, México el martes 19 de abril de 2016.

Otro factor importante de mencionar es que la obtención del suelo contaminado para el experimento *ex situ*, se realizó mediante un muestreo aleatorio en el área afectada por el derrame y las sub-muestras obtenidas fueron mezcladas para el llenado de las macetas, proceso en el cual el mismo manejo del suelo permitió una aireación lo que probablemente provocó la volatilización de parte de los HTP. Al respecto, Volke y Velasco (2002), mencionan que dentro de las técnicas utilizadas para la eliminación de hidrocarburos del suelo, se encuentran el lavado del suelo y la aireación forzada, por lo que son viables las suposiciones antes mencionadas. Esto permitió evaluar adecuadamente los tratamientos a probar, pero aun así, se prosiguió con el estudio.

CUADRO 12. Medias climáticas mensuales de la estación meteorológica de la Base Aérea Militar No. 5, Zapopan, Jalisco.

	DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO
TEMPERATURAS	16.4 °C	14.4 °C	17.1 °C
VIENTOS	9.6 Km h ⁻¹	12.7 Km h ⁻¹	11.0 Km h ⁻¹
HUMEDAD RELATIVA	68.9 %	54 %	42.1%
%			
PRECIPITACIÓN	27.5 mm	-----	5 mm

6.2.3. Caracterización fisicoquímica del suelo al final del experimento *ex situ*

Al final del experimento, que tuvo una duración de 90 días, se caracterizaron todos los testigos y tratamientos por triplicado con un total de nueve unidades. Se analizaron sus propiedades físicas y químicas (Cuadro13) para observar si se presentó alteración en ellas en la etapa final experimento de Biorremediación y poder hacer así una comparación con las propiedades del suelo contaminado caracterizado al inicio del experimento.

De acuerdo con el Cuadro13, los resultados obtenidos del pH de todos los tratamientos fueron moderadamente ácido y ácido, con sólo dos excepciones del Tratamiento1 en el cual se presentó al final del experimento un pH neutro y el Tratamiento2 que presentó el pH más ácido respecto a los demás analizados. Al iniciar el experimento, el suelo contaminado por HTP tenía un pH de 4.93 (ácido), sin embargo a los 90 días de instalado el experimento se detectaron en casi todos los tratamientos un aumento de pH, con las únicas diferencias de dos tratamientos con los lodos residuales estabilizados en los que se detectó una disminución de pH.

CUADRO 13. Caracterización fisicoquímica de todos los tratamientos de biorremediación en la etapa final del experimento *ex situ*.

	TEST. 1 ¹	TEST. 1 ²	TEST. 1 ³	TRATAM. 1 ¹	TRATAM. 1 ²	TRATAM. 1 ³	TRATAM. 2 ¹	TRATAM. 2 ²	TRATAM. 2 ³
pH	6.02 Moderad. Ácido	5.19 Moderad. Ácido	5.30 Ácido	6.05 Neutro	5.39 Ácido	5.02 ácido	5.02 Ácido	4.42 Extrem. Ácido	4.63 Ácido
C.E. dS m ⁻¹	0.04	0.04	0.04	0.06	0.05	0.03	1.14	1.59	1.42
M.O. %	0.69 Muy pobre	0.75 Muy pobre	0.94 Muy pobre	0.94 Muy pobre	1.00 Pobre	0.94 Muy pobre	1.25 Pobre	1.06 Pobre	1.30 Pobre
%H	17.39	6.25	19.98	33.10	20.04	28.85	31.99	26.39	45.54
NO ₃ ⁻ ppm	2.057 Bajo	4.15 Medio	2.057 Bajo	1.027 Muy bajo	1.025 Muy bajo	1.010 Muy bajo	24.55 Muy alto	24.55 Muy alto	24.55 Muy alto
NH ₄ ⁺ ppm	12 Bajo	35 Medio	12 Bajo	80 Medio alto	12 Bajo	12 Bajo	280 Muy alto	80 medio alto	150 Alto
P ppm	25 Medio	25 Medio	25 Medio	25 Medio	25 Medio	25 Medio	> 150 Muy alto	100 Alto	100 Alto
K ppm	60 Bajo	60 Bajo	60 Bajo	120 Medio	60 Bajo	60 Bajo	> 250 Muy alto	> 250 Muy alto	> 250 Muy alto
Ca ppm	500 Bajo	500 Bajo	500 Bajo	500 Bajo	500 Bajo	500 Bajo	1600 Alto	1200 Medio alto	1200 Medio alto
Mg ppm	50 Medio alto	50 Medio alto	12 Bajo	125 Alto	125 Alto	50 Medio alto	> 125 Muy alto	> 125 Muy alto	125 Alto

Resultados similares son reportados por Gómez *et al.* (2009), quienes indican un incremento en el pH de 5.4 al inicio del experimento a 7.4 al final del tratamiento de biorremediación. No así lo obtenido por Martínez y López (2001), quienes no reportaron variaciones en el pH del suelo estudiado.

La conductividad eléctrica (C.E.) no muestra diferencias con respecto al valor de C.E al inicio del experimento con excepción de las réplicas del Tratamiento 2 que resultaron con un aumento de algunas unidades y este comportamiento fue debido a la adición de lodos residuales estabilizados. Al realizar el análisis de varianza entre la conductividad eléctrica y los tratamientos en estudio se determinó que existe diferencia significativa ($P < 0.05$) para el Tratamiento 2; esto demuestra que el suelo contaminado sometido al Tratamiento de biorremediación produce efectos sobre este parámetro y se atribuye esta significancia a la adición de los lodos estabilizados que contienen cantidades de sales (Martínez-Prado *et al.*, 2011).

La M.O. es un parámetro que aumenta en forma proporcional a la concentración de hidrocarburos, pero estos efectos se manifiestan cuando el suelo contaminado es de textura arcillosa, mientras, en el caso del suelo en estudio la M.O. presentó en todas sus unidades experimentales valores de M.O. muy pobre tanto al inicio como al final del experimento de biorremediación. Estadísticamente el parámetro materia orgánica en todos los tratamientos del experimento resultó, mediante el análisis de varianza, que no existe diferencia significativa ($P < 0.05$), aún en el Tratamiento 2 correspondiente a la aportación de lodos residuales estabilizados, probablemente también afectados por las condiciones de lixiviación antes mencionadas.

La humedad es también una de las variables más importantes para favorecer la degradación de los hidrocarburos por los microorganismos autóctonos del suelo en estudio, siendo un nivel óptimo entre el 30 y 90% (Gómez *et al.*, 2008). Así como la presencia de humedad favorece la degradación de HTP; también es necesaria la presencia de aire entre los poros del suelo. En el presente estudio, solo 3 de las 9 unidades experimentales reportaron valores dentro de este rango, pero debe recordarse que se presentaron

condiciones de precipitación durante los tres meses que duró el experimento, lo cual aseguraría un adecuado desarrollo microbiano.

En lo referente a los nutrientes, las unidades experimentales correspondientes a Testigo y Tratamiento 1, muestran valores de muy bajo a medio, mientras que las unidades del Tratamiento 2 mostraron valores nutrimentales entre medio alto a muy alto, esto último debido a las aportaciones hechas por los lodos residuales estabilizados. Al respecto Xu y Lu (2010), Ta-Chen *et al.* (2010) y Taccaria *et al.* (2012), citados por Ñustez *et al.* (2014) mencionan que las aportaciones de fuentes de N y P originan cambios en la población microbiana y aumentos de la degradación de hidrocarburos, favoreciendo el crecimiento de especies dominantes. Así mismo, aunque en este estudio no se realizó un análisis nutrimental de los lodos residuales utilizados, se observa un incremento notable en el contenido de calcio, lo cual concuerda con lo reportado por Campos *et al.* (2009), quien encontró valores de calcio en lodos residuales estabilizados de 53 mg g⁻¹ de material seco, y que tiene efectos directos en el valor de la conductividad eléctrica del suelo.

6.2.4. Evaluación de las concentraciones de cepas bacterianas al final del experimento *ex situ*

Para cada una de las unidades experimentales se realizaron por triplicado los conteos de las UFC por gramo de suelo. En el Cuadro 14 se observan los promedios y desviaciones estándar por cada tratamiento.

Cuadro 14. Medias y desviaciones estándar del LnUFC g⁻¹, resultantes de los tratamientos de biorremediación en el experimento *ex situ*.

FUENTES	REPLICAS	MEDIA	DEVIACIÓN ESTÁNDAR
TESTIGO1	9	7.799	0.194
TRATAM.1	9	12.009	0.078
TRATAM.2	9	12.986	0.085

Desviación conjunta = 0.130

Se observa un mayor desarrollo de UFC para los Tratamientos 1 y 2, los cuales recibieron el consorcio de cepas resistentes a las condiciones de contaminación de HTP de la zona de estudio. Al respecto Rivera-Cruz *et al.* (2004) y Gómez *et al.* (2009), reportan valores cercanos a 9 LnUFC g⁻¹ para el Tratamiento de atenuación natural, equiparable a nuestro Testigo, un valor cercano a 23 LnUFC g⁻¹ para el Tratamiento de bioestimulación que correspondería al Tratamiento 1 y sólo reportado por Gómez *et al.* (2009), valores entre 19 a 23 LnUFC g⁻¹ para el Tratamiento de bioaumentación, similar a nuestro Tratamiento 2 recordando que se inocularon en ambos tratamientos la misma cantidad del mixto bacteriano ($\approx 5 \times 10^6$ UFC ml⁻¹). Dichos valores son mayores a los reportados en el presente estudio, ya que en ambos estudios se utilizaron como inóculo cepas bacterianas recolectadas en suelos que se mantenían en condiciones de contaminación de HTP de manera constante. Este tipo de bacterias degradadoras de hidrocarburos presentan alta resistencia a enzimas de los contaminantes, permitiendo que puedan sobrevivir y degradar los HTP de acuerdo a lo mencionado por Hernández-Acosta *et al.* (2003), Gómez *et al.* (2009) y Echeverri *et al.* (2010).

Se realizó una transformación de Box-Cox y se aplicó un análisis de varianza de la variable UFC g⁻¹, obteniendo como resultados los mostrados en el Cuadro 15.

CUADRO 15. ANOVA de las UFC gr⁻¹ de los tratamientos de biorremediación en la etapa final del experimento.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F	P
TRATAMIENTOS	2	136.75	68.378	74015.7	< 0.05
	7		9		1
RESIDUALES	24	0.4087	0.0170		

Valor crítico F = 3.53

Las concentraciones de las UFC g⁻¹ en los conteos de los microorganismos presentes en todos los tratamiento del experimento de biorremediación en su etapa final mostraron mediante el análisis de varianza diferencia significativa (P<0.005) entre los tratamientos evaluados. Se concluye que los promedios de las unidades formadoras de

colonias por gramo son diferentes para todos los tratamientos (suelo contaminado en sus condiciones naturales, suelo contaminado con mixto bacteriano seleccionado y suelo contaminado con mixto bacteriano y lodo residual estabilizado), quedando como intervalos de confianza al 95% los valores estimados para el Testigo 2: 147.91 – 2,767.63 UFC g⁻¹; para el Tratamiento 1: 156,066.99 – 172,812.07 UFC g⁻¹; y para el Tratamiento 2: 412,696.06 – 461,175.21 UFC g⁻¹.

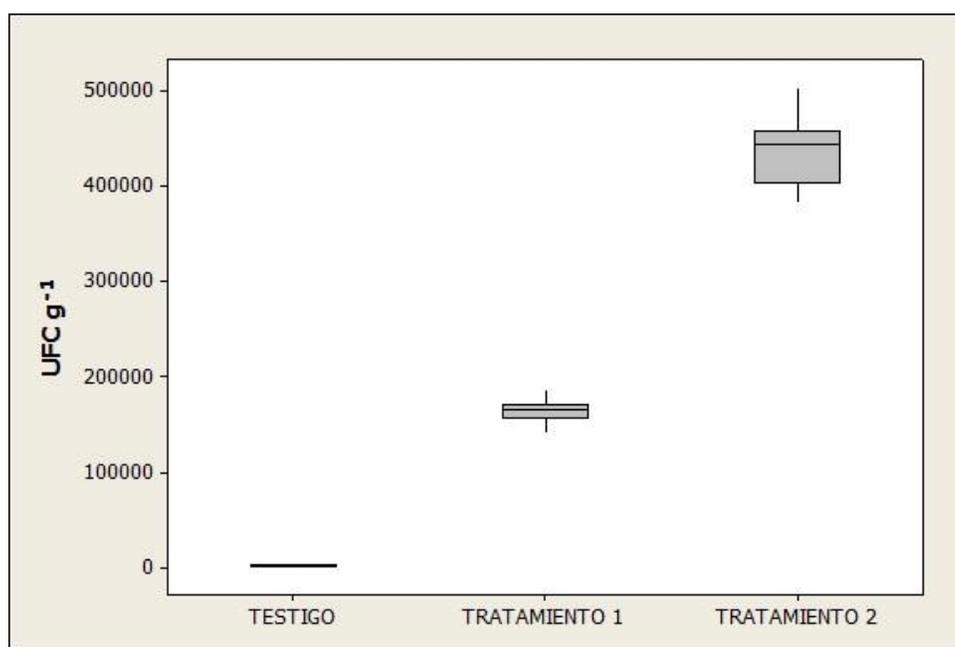


FIGURA 17. Gráfica “Boxplot” de las concentraciones de UFC g⁻¹ entre los tratamientos del experimento.

En la gráfica de caja (Figura 17) se observa una diferencia muy marcada entre los promedios de los tres tratamientos. El Tratamiento Testigo muestra la menor cantidad de UFC comparado con el Tratamiento 1 que recibió el inóculo del consorcio; esta diferencia responde a que el consorcio logró incrementar su desarrollo debido a que las cepas seleccionadas en la primer etapa de este estudio, sí fueron degradadoras de hidrocarburos y su combinación (Cepa 8 y Cepa 13), incrementó ese efecto. Respecto al Tratamiento 2, se observa el efecto de los lodos residuales estabilizados que se aplicaron al suelo, ya que esta fuente nutrimental benefició al consorcio. Acorde a Morgan-Sagastume *et al.* (2008), los

microorganismos asilados en suelos con lodos estabilizados poseen mayores actividades de peroxidasas y oxigenasas, que permiten la oxidación de algunas fracciones de petróleo y mediante esta oxidación cambian las propiedades de los compuestos haciéndolos susceptibles a ataques secundarios y facilitando su conversión a bióxido de carbono y agua (Torres, 2003).

Como resultado de la inoculación en los tratamientos de suelo contaminado con HTP en el experimento *ex situ* para evaluar biorremediación, a pesar de no haber logrado el control total, al final de dicho experimento se observó mayor desarrollo de microorganismos de las dos cepas bacterianas seleccionadas por su sobrevivencia a las condiciones de contaminación de HTP en el suelo en comparación con el suelo contaminado y no tratado. Este crecimiento mostrado tanto en el suelo contaminado que sólo recibió el inóculo, como el suelo contaminado que recibió inóculo y aportación de lodos residuales, es un indicativo de que las bacterias autóctonas pueden ser seleccionadas para la biorremediación, y más aún, si se combinan con algún método de bioestimulación como el uso de los lodos residuales estabilizados.

6.3. Tercera etapa: prueba biológica

Debido a los problemas presentados durante el experimento *ex situ* relacionados con el clima y manejo del suelo contaminado, se decidió realizar este experimento con los suelos de los tratamientos provenientes del experimento *ex situ*, agregando dos tratamientos más, uno correspondiente al suelo no contaminado y otro correspondiente al suelo contaminado de la zona de estudio sin tratamiento alguno.

Para esto se realizó un tercer muestreo el día 19 de abril. En dicho muestreo se observó que el suelo contaminado aún presentaba características visuales de contaminación y aún persistía el fuerte olor a hidrocarburos, siendo que ya habían transcurrido 22 meses desde el derrame del contaminante. Esta muestra de suelo contaminado presentó una concentración de HTP de 4,835 mg kg⁻¹ base húmeda, como se mencionó en el inciso B del apartado 7.2.1. Este valor queda todavía arriba del límite permisible para suelos agrícolas, de

acuerdo a la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (DOF, 2005) cuyos valores se muestran en el Cuadro 11 del inciso B de este apartado.

6.3.1. Resultado de la emergencia de plántulas de maíz

En este ensayo biológico se observaron diferencias de la emergencia de las plántulas de maíz, como se muestra en la Figura 18, en la que en condiciones de laboratorio, fueron sometidas cuatro semillas de maíz en cada uno de los tres tratamientos del experimento *ex situ*, más dos tratamientos que se añadieron, uno con el suelo contaminado recién muestreado y otro con suelo no contaminado, y a los 15 días después de la siembra se realizó el conteo de plántulas emergidas.



FIGURA 18. Semillas de maíz germinadas por cada muestra de suelo evaluado el lunes 5 de mayo de 2016.

En el Cuadro 16 se registraron los resultados del porcentaje de emergencia obtenido en cada uno de los tratamientos y sus repeticiones. Todos los tratamientos tuvieron una

emergencia del 100% con excepción del Tratamiento del suelo contaminado recientemente muestreado, en el que dos de sus repeticiones presentaron 75% de emergencia y la restante el 50%.

Se observa una disminución de germinación en las unidades experimentales correspondientes al Tratamiento de suelo contaminado recientemente muestreado de la zona afectada, esto indica que aún se muestran cantidades residuales de HTP que afectan la emergencia de la planta.

CUADRO 16. Etapas de germinación de las 4 semillas por maceta de cada muestra de suelo en el experimento biológico.

TRATAMIENTO Y REPETICIÓN	SIEMBRA	PLÁNTULAS EMERGIDAS	EMERGENCIA (%)
TESTIGO1 ¹	4 SEMILLAS MAÍZ	4	100
TESTIGO1 ²	4 SEMILLA MAÍZ	4	100
TESTIGO1 ³	4 SEMILLAS MAÍZ	4	100
TRATAMIENTO1 ¹	4 SEMILLAS MAÍZ	4	100
TRATAMIENTO1 ²	4 SEMILLAS MAÍZ	4	100
TRATAMIENTO1 ³	4 SEMILLAS MAÍZ	4	100
TRATAMIENTO2 ¹	4 SEMILLAS MAÍZ	4	100
TRATAMIENTO2 ²	4 SEMILLAS MAÍZ	4	100
TRATAMIENTO2 ³	4 SEMILLAS MAÍZ	4	100
SUELO CONTAMINADO1 ¹	4 SEMILLAS MAÍZ	2	50
SUELO CONTAMINADO1 ²	4 SEMILLAS MAÍZ	3	75
SUELO CONTAMINADO1 ³	4 SEMILLAS MAÍZ	3	75
SUELO NO CONTAMINADO1 ¹	4 SEMILLAS MAÍZ	4	100
SUELO NO CONTAMINADO1 ²	4 SEMILLAS MAÍZ	4	100

Como se muestra en el Cuadro 17, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos utilizados en este ensayo, para la variable emergencia de plántulas de maíz.

CUADRO 17. Resultado de la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis de la emergencia de plántulas en los tratamientos evaluados.

Valor de χ^2	Valor p
33.89	<0.0001

Este comportamiento advierte que el suelo contaminado no es muy apto para un buen desarrollo vegetal (Sarmiento *et al.*, 2003), tal como lo demuestran Quiñones-Aguilar *et al.* (2003), quienes consignan resultados similares a los del presente trabajo para semillas de diferentes variedades de maíz, con porcentajes de emergencia a los 15 días después de la siembra de más del 70% para cinco variedades en suelo no contaminado y del 40% al 75% para cinco variedades en suelo contaminado con 25,000 mg kg⁻¹ de suelo, valor cinco veces mayor a lo presentado en el suelo contaminado de reciente muestreo. El suelo resultante del experimento *ex situ* en el presente estudio, mostró un comportamiento similar al suelo no contaminado.

6.3.2. Resultados de la longitud del tallo de plántulas de maíz

Respecto a los valores obtenidos de la longitud del tallo, el análisis de varianza mostrado en el Cuadro 18, indica diferencias significativas entre los tratamientos, siendo las longitudes de tallo más cortas las obtenidas en el suelo contaminado de reciente muestreo.

CUADRO 18. ANOVA de las longitudes del tallo de todos los tratamientos evaluados.

FUENTES	GL	SC	SC AJUSTADO	CM AJUSTADO	F	P
TRATAMIENTOS	4	532.36	532.09	133.02	9.07	0.007
RÉPLICAS	2	11.03	11.03	5.52	0.38	0.699
ERROR	7	102.62	102.62	14.66		
TOTAL	13	646.01				

Los valores de medias obtenidos para cada tratamiento se muestran en el Cuadro 19. Se observa que el Tratamiento 2 correspondiente al suelo contaminado e inoculado con el consorcio de bacterias y bioestimulado con lodos residuales, mostró la mejor respuesta en la longitud de tallo de plántulas, lo que puede deberse al enriquecimiento nutricional aportado por los lodos residuales y que se demostró en los análisis del suelo al finalizar el experimento *ex situ*.

Respecto a los Tratamientos Testigo 1 (suelo contaminado sin tratar), Tratamiento 1 (suelo contaminado inoculado con el consorcio de bacterias), ambos obtenidos al finalizar el experimento *ex situ*, y el Tratamiento del suelo no contaminado, se observan medias muy similares. Por el contrario, el Tratamiento del suelo contaminado recientemente muestreado (tomado en campo el 19 de abril de 2016, dos días antes del ensayo biológico), arrojó el valor de media de longitud de tallo de plántula más bajo de todos los tratamientos, indicando el efecto residual de los HTP después de 22 meses de ocurrido el derrame en la zona de estudio, resultados similares a los reportados por Ogbo (2009).

CUADRO 19. Prueba POST HOC Tukey de comparación de medias para la longitud de tallo de plántulas de maíz en el experimento biológico.

TRATAMIENTO	MEDIA
Tratamiento 2 (suelo contaminado tratado con inóculo y lodos residuales) (experimento <i>ex situ</i>)	23.35 a*
Testigo 1 (suelo contaminado no tratado) (experimento <i>ex situ</i>)	17.89 ab
Tratamiento 1 (suelo contaminado con inóculo) (experimento <i>ex situ</i>)	16.96 b
Suelo no contaminado	14.53 b
Suelo contaminado de reciente muestreo	5.13 c

* Letras iguales indican tratamientos estadísticamente similares.

De acuerdo con Bossert y Bartha (1985) y Salanitro *et al.* (1997), mencionados por Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía (2004), ciertas fracciones del petróleo funcionan como auxinas promotoras del crecimiento, favoreciendo un mejor desarrollo, aunque el efecto tóxico de los HTP puede afectar a las plantas si éstas permanecen más tiempo en contacto con el contaminante, como se establece en el estudio de estos autores quienes indican que a

los 150 días después de la emergencia, se observan tallos con menor altura que el Tratamiento con menor contenido de HTP. Ortiz (2001), citado por Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía (2004), indica que estas variaciones pueden ser debidas al tipo de material derivado del petróleo, el tipo de suelo y la especie vegetal en cuestión.

6.3.3. Resultados de la longitud de raíz en plántulas de maíz

En la Figura 19 se muestran las plántulas de maíz obtenidas a los 15 días después de la siembra. Se observa en las fotografías de la penúltima fila, correspondientes al Tratamiento de suelo contaminado recientemente muestreado y con un contenido de 4,835 mg kg⁻¹ de HTP, un notorio efecto sobre la longitud de la raíz.

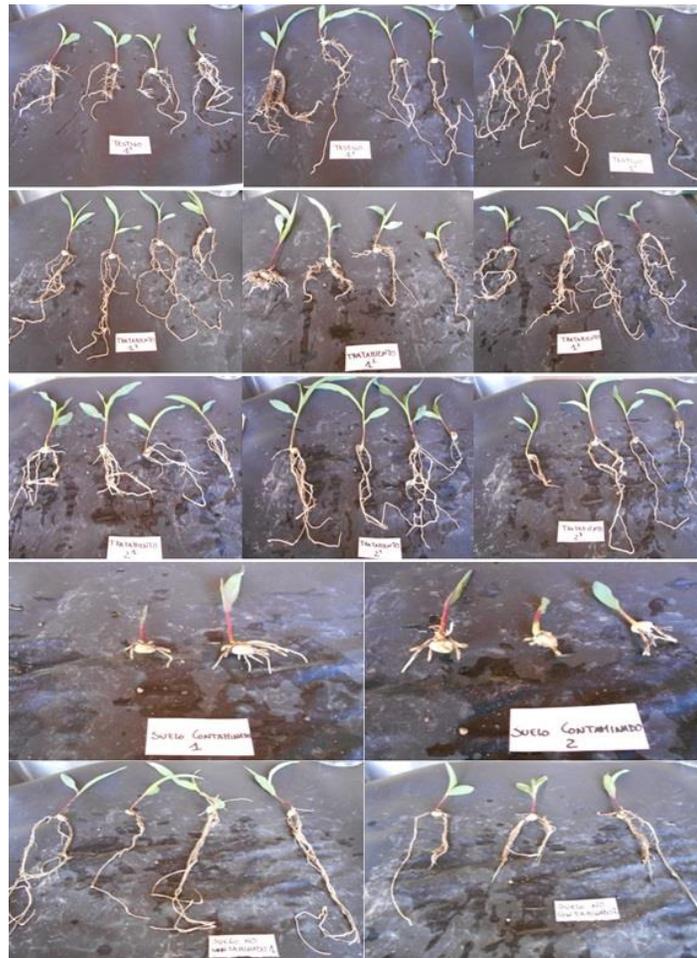


FIGURA 19. Vista de la prueba biológica de todas las muestras de suelo contaminado con HTP y no contaminado, en estudio en la etapa final de la biorremediación.

En el Cuadro 20 se muestra el análisis de varianza de la variable longitud de raíz; los resultados indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los cinco tratamientos estudiados en este experimento biológico. Se encontró que la longitud de la raíz de plántulas fue similar para todos los tratamientos, excepto para el suelo contaminado recientemente muestreado, el cual aún contenía niveles de HTP con valores superiores al máximo permitido para suelos agrícolas establecido por SEMARNAT en 2003 (DOF, 2005).

CUADRO 20. ANOVA de las longitudes de la raíz de todos los tratamientos evaluados.

FUENTES	GL	SC	SC AJUSTADO	CM AJUSTADO	F	P
TRATAMIENTOS	4	1288.95	1328.11	332.03	5.38	0.027
RÉPLICAS	2	270.05	270.05	135.02	2.19	0.183
ERROR	7	431.81	431.81	61.69		
TOTAL	13	1990.82				

Estos resultados se muestran en el Cuadro 21, observando una diferencia muy marcada entre el promedio de las plántulas del suelo contaminado y los promedios de los otros tratamientos.

CUADRO 21. Prueba POST HOC Tukey de comparación de medias para la longitud de raíces de plántulas de maíz en el experimento biológico.

TRATAMIENTO	MEDIA
Testigo 1 (suelo contaminado no tratado) (experimento <i>ex situ</i>)	27.98 a*
Suelo no contaminado	26.46 a
Tratamiento 1 (suelo contaminado con inóculo) (experimento <i>ex situ</i>)	25.23 a
Tratamiento 2 (suelo contaminado tratado con inóculo y lodos residuales) (experimento <i>ex situ</i>)	22.00 a
Suelo contaminado de reciente muestreo	2.46 a

*Letras iguales indican tratamientos estadísticamente similares.

Al respecto, Quiñones-Aguilar *et al.* (2003), reportan resultados similares para plantas de maíz, con una marcada diferencia de la longitud de raíz entre el testigo (20.7 cm

de longitud a los 22 días después de la siembra), y de 7 cm en el Tratamiento con 15,000 mg kg⁻¹ de petróleo. En dicho estudio se evaluó diferente germoplasma, por lo que se puede considerar que las características genéticas de la planta también influyen en los efectos por la contaminación, tal como lo mencionan Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía (2004). Así mismo, Ogbo (2009), reporta para maíz una longitud de radícula de 3.2 cm a los 3 días de emergencia para el Tratamiento control, mientras que el Tratamiento con 5% de contaminante diesel tuvo una longitud de radícula a los tres días de emergencia de 0.16 cm.

Con los resultados obtenidos en el experimento biológico, se comprueba el efecto residual del contaminante en un suelo que no recibió tratamiento alguno y en el cual, las concentraciones de los HTP, aún se encuentran por arriba de los valores de la NOM correspondiente a pesar de haber transcurrido un período bastante largo (22 meses), y encontrando que dichas concentraciones todavía producen efectos adversos sobre las semillas y plántulas de maíz.

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son presentadas en forma particular para cada objetivo propuesto.

1. En las unidades del Tratamiento con lodos residuales estabilizados en el conteo bacteriano en la etapa final del experimento se detectó un mayor crecimiento UFC g⁻¹ de las bacterias autóctonas presentes en el suelo contaminado con hidrocarburos. Además, en las muestras de suelos analizadas del Tratamiento con lodos residuales se registraron valores superiores de nutrientes como nitrato, amonio, fósforo, potasio, calcio y magnesio; también factores como pH, conductividad eléctrica, materia orgánica y humedad resultaron con valores dentro de los rangos recomendables para favorecer el proceso de biorremediación y estimular la actividad microbiana presente en el suelo contaminado en estudio.

2. Se logró aislar bacterias que sobrevivieron a condiciones altas de contaminación de hidrocarburos, a partir de un suelo afectado por un derrame de estos contaminantes de hacía un año y medio. Estas mismas bacterias nativas empleadas en el proceso de biorremediación se tuvieron que aclimatar inicialmente al contaminante presente, resultando en una mejor respuesta a la sobrevivencia del contaminante, el consorcio conformado por dos cepas bacterianas.

3. Debido a factores que no se pudieron controlar, el experimento *ex situ* no permitió comprobar la eficiencia de los tratamientos con el consorcio de cepas bacterianas autóctonas y el Tratamiento de consorcio de cepas más lodos residuales, lo anterior debido al movimiento que se hizo del suelo contaminado para su traslado a las instalaciones del CUCBA en donde se desarrolló dicho experimento, lo cual pudo permitir la aireación de los contaminantes, y aunado a la precipitación presentada en la zona, factores que pudieron afectar dichos resultados. La alternativa de utilizar una técnica de biorremediación con bacterias nativas y también con la bioestimulación de lodos residuales en áreas muy extensas, es la recomendación en la literatura, y por los problemas presentados en el

presente trabajo, sería conveniente realizar estas técnicas in situ, ya que para obtener una limpieza a mediano y largo plazo, dependerá siempre de la concentración del contaminante y de las condiciones ambientales del área a tratar.

4. Logramos por nuestro último objetivo a someter todos los tratamiento del experimento de biorremediación en su etapa final y también el suelo recolectado el 19 de abril de 2016 desde la zona afectada por el derrame de hidrocarburos y otra muestra de suelo desde una área colindante no contaminada a una prueba biológica y, hemos observado que todas las muestras de suelo contaminado en estudio que fueron tratados o no, obtuvieron un desarrollo de la siembra de las semillas de maíz. Esto nos indica que no obstante las muestras de suelo contaminado tenían concentraciones considerables de hidrocarburos, la prueba de germinación de las semillas de maíz fue efectiva, aunque no de forma similar para todos los casos propuestos pero con respuesta positiva.

8. LITERATURA CITADA

- Ahumada A., M.B. y Gómez I., R.K. 2009. Evaluación y selección de bacterias degradadoras de fenol por respirometría. Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
- Aitken C.M., Jones D.M. and Larter S.R. 2004. Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. NATURE Vol. 431.
- Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT. 491 p.
- Álvarez G., J.A. y Díaz D., M.A. 2016. Alternativas para la remediación de ecosistemas contaminados por hidrocarburos. Página Web: www.monografias.com/trabajos16/remediar-contaminacion/remediar-contaminacion.shtml
- Araujo I., Montilla M., Cárdenas C., Herrera L., Angulo N. y Morillo G. 2006. Lodos estabilizados y cepas bacterianas en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. INTERCIENCIA Vol. 31 No. 4: 268-276.
- Cabrera L., G. 2011. Disipación de fenantreno y antraceno en un suelo con alto contenido de sales enmendado con biosólidos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Campos M.E., García R.N., Velázquez R.A. y García F.M. 2009. Análisis básico del reuso de lodos residuales de una planta de tratamiento de aguas residuales en suelos de pradera del Parque Nacional Nevado de Toluca. Quivera Vol. 11, No. 2. Pp 35-51
- Castro V., G. 2007. Informe final: diseño monitoreo frente derrames de hidrocarburos. Proyectos y Asesorías Ambientales. Gobierno de Chile. Página Web: www.sag.gob.cl/sites/default/files/INFORME_FINAL_ASESORIA_SAG_HCS2.pdf
- Clemente S., A. y Azuara P., J. 2011. Saneamiento y tapado de la Presa del Pozo Presidente Alemán No. 221 ubicado en el municipio de Papantla, Veracruz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Veracruzana.
- Cram S., Ortiz R. y Páez R. 2004. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. En: Las

- sustancias tóxicas persistentes. Compiladores: Fernández B., A., Yarto R., M. y Castro D., J.). Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT.
- Cuevas D., M.C.; Espinosa R., G.; Ilizaliturri H., C.A. y Mendoza C., A. 2012. Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT.
- DOF Diario Oficial de la Federación. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.
- DOF Diario Oficial de la Federación. 2003. Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002, Protección ambiental - Lodos y biosólidos - Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final.
- DOF Diario Oficial de la Federación. 2005. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación.
- DOF Diario Oficial de la Federación. 2012. Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Secretaría General Gobierno de los Estados Unidos Mexicanos.
- Duque C., C. 2015. Revisión del potencial biológico de las bacterias sulfato-reductoras para la mitigación de metales pesados contaminantes en aguas de uso industrial. Tesis de licenciatura. Universidad Militar Nueva Granada. Colombia.
- Echeverri J. E.G., Manjarrez P.G. y Cabrera O.M. 2010. Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la bahía de Cartagena, Colombia. NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas Vol. 8 No. 13: 76-86.
- EPA Environmental Protection Agency. 1995. Eastern Research Group, Inc. Bioremediation in the field search system (BFSS) - User Documentation. U.S.
- EPA Environmental Protection Agency. 1996. Method 8015B. Nonhalogenated organics using GC/FID. Página Web: www.caslab.com/EPA-Method-8015B/. Consultado el 6 de marzo de 2015.
- Ferreira D.N., T.C., Santos O., F.J. y Pessoa D.F., F. 2013. Biorremediación de un suelo

- tropical contaminado con residuos aceitosos intemperizados. *Rev. Int. Contam. Ambie.* Vol. 29 No.1: 21-28.
- Flores P., M.A.; Torras O. y Téllez G., R. 2004. Medidas de mitigación para uso de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos en infraestructura de transporte terrestre. Publicación Técnica No. 257. Instituto Mexicano del Transporte. Secretaría de Comunicaciones y Transportes.
- Ghazali, F.M.; Rahman, R.N.Z.A.; Salleh A.B. and Basri M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration and Biodegradation.* Vol. 54: 61-67.
- Gómez R.S.E., Gutiérrez B.D.C., Hernández M.A.M., Hernández R.C.Z., Losada C.M. y Mantilla V.P.C. 2008. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas* Vol. 6 No. 9: 101-212.
- Gómez W., Gavira J. y Cardona S. 2009. Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina - diesel. *Dyna.* Vol. 76 No. 160: 83-93.
- Hernández-Acosta E., Ferrera-Cerrato R., Gutiérrez-Castorena M.C., Rodríguez-Vázquez R., Rubiños-Panta J.E. y Fernández-Linares L. 2003. Bacterias y hongos carbonoclastas de rizósfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo. *TERRA Latinoamericana* Vol. 21 No. 4 493-502.
- IIEG (Instituto de Información Estadística y Geográfica). 2016. Tala. Diagnóstico del Municipio. Gobierno del Estado de Jalisco.
- IMP Instituto Mexicano del Petróleo. 2014. El petróleo. SENER. Página Web: www.imp.mx/petroleo/?imp=engler
- Informador.Mx.(a) (18 de mayo de 2014). Controlan fuga de combustible en Tala. 18 de mayo de 2014. Periódico El Informador.Mx. Recuperado de <http://www.informador.com.mx/jalisco/2014/528633/6/controlan-fuga-de-combustible-en-tala.htm>
- Informador.Mx.(b) (18 de mayo de 2014). Luchan por controlar fuga de combustible en Tala. El Informador.Mx. Recuperado de <http://www.informador.com.mx/jalisco/2014/528578/6/luchan-por-controlar-fuga->

[de-combustible-en-tala.htm](#)

- Lesser I., J.M. 1995. Prospección de contaminación de acuíferos por hidrocarburos. Revista del Colegio de Ingenieros Geólogos de México. Vol. 1 No. 6: 5-8. Página web: www.lesser.com.mx/publicaciones.html
- Leyva C., I.D.O. 2006. Comparación de técnicas de saneamiento en un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo en Tabasco. Tesis de Maestría. Ingeniería Ambiental- Suelo y Aguas Subterráneas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- López D.M., J.B., Quintero G., Guevara V., A.L., Jaimes C., D.C., Gutiérrez R., S.M. y Miranda G., J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados de petróleo. NOVA Publicación Científica. Vol. 4 No. 5: 82-90.
- Loya D.A.,I. (2013). Tecnologías para la restauración de suelos contaminados por hidrocarburos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Veracruzana.
- Mantilla O., G.A. 2015. Validación de uso de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas residuales tipo UASB como insumo en recuperación de suelos agrícolas. Revista ESAICA, Vol. 1(1): 18-23
- Maposita M.S., Calle W.O., Fiallos C.M. y Burgos F. (2011). Caracterización microbiológica en suelos contaminados por hidrocarburos, de tipo pseudomonas en el sector río bonanza, provincia de pastaza. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Centro de Investigación Científica y Tecnológica. Ecuador.
- Marchal R., Penet S., Solanp-Serena F. and Vandecasteele J.P. 2003. Gasoline and diesel oil biodegradation. Oil and Gas Science and Technology Rev. IFP. Vol. 58 No. 4: 441-448.
- Martínez M., V.E. y López S., F. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. TERRA Latinoamericana. Vol. 19 No. 1: 9-17.
- Martínez-Prado A., Pérez-López M.E., Pinto-Espinoza J., Gurrola-Nevárez B.A. y Osorio-Rodríguez A.L. 2011. Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. Rev. Int. Contam. Ambie. 27 (3): 241-252.
- Mejía M. E. 2016. Taller sobre manejo y aprovechamiento de lodos provenientes de

plantas de tratamiento, Aspectos técnicos y legales del manejo de lodos en México. Academia de Ingeniería de México. Sitio web: <http://www.ai.org.mx/ai/archivos/talleres/aprovechamiento-lodos/Aspectos%20tecnicos%20y%20legales%20del%20manejo%20de%20lodos%20en%20Mexico.pdf>

Minitab Inc. 2010. MINITAB ® 16.1.0.

Morgan-Sagastume F., Lund N., J. and Halkjaer N., P. 2008. Substrate-dependent denitrification of abundant probe-defined denitrifying bacteria in activated sludge. *DEMS Microbiol Ecol* 66: 447-461.

Narvárez-Flores S., Gómez M.L. y Martínez M.M. 2008. Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos, aisladas a partir de sedimentos del caribe colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost. Vol. 37 No. 1*: 63-77.

Ñustez C., D.C., Paredes C., D. y Cubillos V., J. 2014. Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible. *Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia Vol. 37 No. 1*: 20-28.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development. 2006. Página Web: www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-208-terrestrial-plant-test-seedling-emergence-and-seedling-growth-test_9789264070066-en

Ogbo E.M. 2009. Effects of diesel fuel contaminaton on seed germination of four crop plants - *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *African Journal of Biotechnology Vol. (2)*: 250-253.

Ortínez B., O.; Ize L., I. y Gavilán G., A. 2007. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. Instituto Nacional de Ecología. Página Web: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/gacetitas/422/restauracion.html>

Ortiz E., Núñez R., Fonseca E., Oramas J., Almazán V., Cabranes Y., Miranda A., Barbán O., Martínez C., Díaz Y. y Borges G. 2005. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Contribución a la Educación y a la Protección del Medio Ambiente. No. 6*: 51-60.

Pentreath V., González E., Barquín M., Maris R.S. y Perales S. 2015. Bioensayo de toxicidad aguda con plantas nativas para evaluar un derrame de petróleo. *Rev. Salud Ambiental. Vol. 15(1)*: 4-12.

- Pérez Z., M.E. 2016. Tratamiento de lodos residuales provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales mediante procesos electroquímicos para la disminución de metales pesados (PB). Tesis de Licenciatura. Ingeniería Ambiental. Universidad Politécnica Salesiana. Ecuador.
- Proceso.com.mx (19 de mayo de 2014). Se multiplica 18 veces la ordeña de ductos de PEMEX en Jalisco. Proceso. Recuperado de <http://www.proceso.com.mx/372624/se-multiplica-18-veces-la-ordena-de-ductos-de-pemex-en-jalisco>
- Quiñones-Aguilar E.E., Ferrera-Cerrato R., Gavi-Reyes F., Fernández-Linares L., Rodríguez-Vázquez R. y Alarcón A. 2003. Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia* No. 37: 585-594.
- Rivera-Cruz M.C. y Trujillo-Narcía A. 2004. Estudio de toxicidad vegetal, en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. *INTERCIENCIA* Vol. 29 No. 7: 369-377.
- Rivera-Cruz M.C., Ferrera-Cerrato R., Sánchez-García P., Volke-Haller V., Fernández-Linares L. y Rodríguez-Vázquez R. 2004. Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán (*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.). *Agrociencia* No. 38: 1-12.
- Riveroll-Larios, J., Escalante-Espinosa, E., Fócil-Monterrubio R.L. and Díaz-Ramírez I.J. 2015. Biological activity assessment in mexican tropical soils with different hydrocarbon contamination histories. *Water Air Soil Pollut* 223-353. Springer.
- Rojas R., R. y Mendoza E., L.G. 2012. Utilización de biosólidos para la recuperación energética en México. *Revista Producción+Limpia*. Vol. 7(2): 74-94.
- Romero T., T.; Cortinas De Nava C. y Gutiérrez A., V.J. 2009. Diagnóstico nacional de los contaminantes orgánicos persistentes en México. SEMARNAT. Instituto Nacional de Ecología. 1a. Edición.
- Rosales M., L.A. 2008. Biorremediación de suelos contaminados con aceite usado de automóvil con el hongo de la pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* (setas) en Durango. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Samanta S.K., Singh O.V. & Jain R.K. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology*. 20 (6): 243-248.

- Sarmiento T., M.R., Ortiz E., E. y Álvarez R., J. 2003. Emergencias ambientales asociadas a sustancias químicas en México. *Gaceta Ecológica*. No. 066: 1405-2849.
- Sukla, S.K., Mangwani N., Rao T.S. and Das S. 2014. Biofilm-mediated bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: *Microbial biodegradation and bioremediation*. Ed: Das S. Elsevier Insights.
- Toledo E. 2016. Robo de combustibles a PEMEX: 90% de los casos quedan impunes. PANAMPOST. Noticias y Análisis de Las Américas. Página Web: <https://es.panampost.com/elena-toledo/2016/11/22/robo-de-combustible-a-pemex-90-de-los-casos-quedan-impunes/>
- Torres D.K. y Zuluaga M.T. 2009. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Minas. Universidad Nacional de Colombia.
- Torres R.D. 2003. El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Ecosistemas* No. 2.
- Vázquez-Luna D., Castelán-Estrada M., Rivera-Cruz M.C., Ortiz-Ceballos A.I. y Izquierdo R. F. 2010. *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (LEGUMINOSAE): especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos de petróleo en el suelo. *Rev. Int. Contam. Ambien.* Vol. 26 No. 3: 183-191.
- Velasco T., J.A. y Volke S., T.L. 2007. El composteo: alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. Instituto Nacional de Ecología. Página Web: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/gacetas/381/volke.html>
- Volke S.T. y Velasco T.J.A. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT. 64 pp.
- Yanine A.F. 2010. Evaluación de la diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de suelos de las cuencas de los ríos Otún y La Vieja. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.

