



# Universidad Autónoma del Estado de México



Facultad de Ciencias

**“Bioaumentación con bacterias productoras de  
biosurfactantes para la restauración de suelos  
contaminados por hidrocarburos”**

## **TESIS**

Que para obtener el título de

**Licenciado en Biotecnología**

Presenta

**Carlos Omar Ramírez Castelán**

Director

**Dr. Gustavo Yáñez Ocampo**

Co-director

**Dr. Jorge Lugo de la Fuente**

2024

# INDICE

## Contenido

<b>1. Introducción</b> .....	5
<b>2. Marco teórico</b> .....	7
2.1 <i>Hidrocarburos</i> .....	7
2.1.1. Tipos .....	7
2.1.1.1 Hidrocarburos Alifáticos .....	8
2.1.1.2. Hidrocarburos Aromáticos .....	10
2.2 <i>Suelo</i> .....	11
2.2.1 Definición .....	11
2.2.2 Composición .....	11
2.2.3 Horizontes del suelo .....	12
2.2.4 Servicios ecosistémicos del suelo .....	14
2.2.4 Propiedades fisicoquímicas del suelo .....	15
2.3 <i>Microbiota del suelo</i> .....	18
2.3.1 Bacterias productoras de biosurfactantes .....	19
2.3.2 Biosurfactantes .....	20
2.3.2.1 Propiedades .....	22
2.3.2.2 Clasificación .....	24
2.3.3 Aislamiento de bacterias productoras de biosurfactantes .....	25
2.3.4 Cultivo de bacterias productoras de biosurfactantes degradadoras de hidrocarburos .....	26
2.3.5 Mecanismo de biodegradación de los hidrocarburos .....	27
2.3.4.1 Mecanismo de biodegradación de los hidrocarburos BTEX .....	31
2.4 <i>Bioaumentación: técnica de restauración de suelos contaminados</i> .....	34

2.4.1	Definición y etapas de la bioaumentación .....	34
2.4.2	Ventajas y desventajas .....	35
2.4.3	Aplicaciones .....	37
2.4.4	Factores que afectan la biorremediación del suelo.....	37
2.5	<i>Respiración del suelo y su relación con los procesos de biorremediación.</i> .	39
<b>3.</b>	<b>Antecedentes</b> .....	40
<b>4.</b>	<b>Hipótesis</b> .....	42
<b>5.</b>	<b>Justificación</b> .....	43
<b>6.</b>	<b>Objetivos</b> .....	44
6.1	<i>Objetivo general</i> .....	44
6.2	<i>Objetivos específicos</i> .....	44
<b>7.</b>	<b>Metodología</b> .....	45
7.1	<i>Muestreo del suelo contaminado por hidrocarburos</i> .....	45
7.2	<i>Preparación del suelo</i> .....	46
7.3	<i>Caracterización de las propiedades fisicoquímicas del suelo</i> .....	46
7.3.1	Determinación del pH del suelo.....	46
7.3.2	Conductividad eléctrica .....	47
7.3.3	Determinación de la textura del suelo .....	47
7.3.4	Análisis de la materia orgánica en el suelo.....	49
7.4	<i>Caracterización microbiológica del suelo</i> .....	50
7.5	<i>Construcción de consorcios bacterianos para bioaumentar</i> .....	50
7.5.1	Reactivación de cepario de bacterias productoras de biosurfactantes	50
7.5.2	Confirmación de producción de biosurfactantes y crecimiento con hidrocarburos como fuente principal de carbono.....	51
7.5.3	Prueba de biocompatibilidad del consorcio bacteriano .....	51

7.5.4 Producción de inóculo para la bioaumentación .....	53
7.6 <i>Ensayo de bioaumentación en microcosmos</i> .....	53
7.6.1 Monitoreo de la densidad poblacional de Bacterias Heterótrofas Totales durante la bioaumentación .....	54
7.6.2 Respiración del suelo .....	54
7.7 <i>Análisis estadístico</i> .....	56
<b>8. Resultados y discusión</b> .....	<b>57</b>
8.1 <i>Caracterización fisicoquímica del suelo</i> .....	57
8.2 <i>Establecimiento de los consorcios bacterianos</i> .....	59
8.3 <i>Desarrollo de la bioaumentación</i> .....	64
8.3.1 Comportamiento de la densidad poblacional de bacterias.....	64
8.3.2 Comportamiento de la respiración del suelo.....	67
<b>9. Conclusión</b> .....	<b>70</b>
<b>10. Referencias</b> .....	<b>71</b>

## 1. Introducción

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos, considerados como una fuente importante de energía, sin embargo, tienen un impacto negativo en el medio ambiente cuando no se manipulan y eliminan adecuadamente (Devatha et al., 2019). Cuando hay un derrame de hidrocarburos en el suelo estos modifican sus propiedades fisicoquímicas tales como niveles de humedad, conductividad hidráulica, carbono orgánico total, nitrógeno total, fósforo disponible, pH, etc.;(Ugaz et al., 2020). De manera que este ambiente se vuelve tóxico para la flora, fauna, seres humanos y microorganismos benéficos. Además, los hidrocarburos pueden filtrarse en las aguas subterráneas y contaminar los suministros de agua potable. (Rodriguez et al., 2019).

México es un país con reservas de petróleo y parte de su economía se basa en la exploración, explotación,refinación del crudo y transporte de petrolíferos. Durante el período de 2000 a 2018, se registraron un total de 13,180 emergencias químicas, mayormente relacionadas con la filtración de gasolina, diésel, petróleo crudo y combustóleo, siendo el transporte a través de ductos el escenario principal de estas contingencias (PROFEPA, 2022).

La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales informó sobre 550 emergencias entre 2018 y 2019, con aproximadamente un tercio atribuido a los derrames de hidrocarburos. Además, se han identificado 1,430 sitios contaminados por hidrocarburos entre 2008 y 2017 (SEMARNAT, 2019). Aunque Petróleos Mexicanos (PEMEX) es ampliamente señalado como un protagonista clave en estos incidentes, el fenómeno del "huachicoleo", la extracción ilegal de combustible, ha emergido como un factor adicional significativo en la contaminación del suelo. Ejemplificando esto, en 2017, se sustrajeron clandestinamente 15,208 millones de barriles de hidrocarburos de los ductos de PEMEX, generando la contaminación de 675 hectáreas de suelo (Bautista, 2021).

La naturaleza hidrofóbica de los hidrocarburos hace que estos compuestos sean poco accesibles y se adhieran fuertemente a las moléculas del suelo. Para favorecer su degradación se ha propuesto el uso de compuestos tensioactivos, ya que estos aumentan su disponibilidad (Raiger & López, 2009). Algunos microorganismos poseen la capacidad de sintetizar este tipo de compuestos, cuando estas moléculas tienen origen biológico se les denomina “biosurfactantes” (Saleger, 2002).

Se ha investigado la efectividad de las bacterias productoras de biosurfactantes y se ha demostrado que pueden contribuir significativamente a la eliminación de contaminantes en el suelo. Esto se logra mediante la técnica de bioaumentación, la cual consiste en incrementar la densidad poblacional de microorganismos específicos y eficientes capaces de degradar agentes contaminantes con microorganismos (Nzila et al., 2016).

Además, se ha investigado ampliamente el potencial de producción de biosurfactantes de numerosos géneros bacterianos, como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes* y *Corynebacterium*, y se ha demostrado que su bioaumentación genera una degradación eficiente de los hidrocarburos (Sah et al., 2022).

Debido a lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo fue usar bacterias productoras de biosurfactantes para la remediación de suelo contaminado por hidrocarburos en un modelo a escala de laboratorio, ya que estos estudios contribuyen en gran medida a reducir los riesgos para la salud y proteger el medio ambiente.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Hidrocarburos

El término hidrocarburo se refiere a una molécula orgánica que está compuesta exclusivamente de átomos de hidrógeno y carbono. Aunque están compuestos por solo dos tipos de átomos, existe una amplia variedad de hidrocarburos. Estos pueden consistir en diferentes longitudes de cadenas, cadenas ramificadas, y anillos de átomos de carbono, o combinaciones de estas estructuras. Además, los hidrocarburos pueden diferir en los tipos de enlaces carbono-carbono presentes en sus moléculas. (McMurry et al., 2023).

De forma natural, los hidrocarburos se originan a partir de fósiles de plantas y animales que se formaron por las fuerzas de temperatura y peso durante milenios. Se encuentran principalmente en las profundidades subterráneas, en formaciones rocosas porosas, como arenisca, piedra caliza y esquisto; mientras que otros se han sintetizado en el laboratorio (Herndon, 2017).

Los hidrocarburos son muy importantes para la economía moderna. Son responsables de más del 80% del consumo mundial de energía. Esta cifra en realidad puede subestimar el papel de los hidrocarburos en la economía por un margen significativo porque se utilizan en una amplia gama de aplicaciones, aparte de su uso como fuente de energía. Por ejemplo, el petróleo refinado se ha utilizado para producir muchos materiales derivados que juegan un papel crítico en la economía global, como plásticos, solventes y lubricantes (Jason, 2022).

#### 2.1.1. Tipos

Los químicos del siglo XIX clasificaron los hidrocarburos como alifático o aromático sobre la base de sus fuentes y propiedades. Alifático (del griego aleiphar, “grasa”), descritos como derivados de productos químicos de degradación de grasas o aceites. Por otra parte, están los Hidrocarburos aromáticos los cuales constituían un grupo de sustancias obtenidas por degradación química de ciertos extractos de plantas de olor agradable (Oluwaseun, 2022).

Los términos alifático y aromático se conservan en la terminología moderna, pero los compuestos que describen se distinguen en función de la estructura y no del origen, esto conduce a diferencias en las geometrías y en la hibridación de los orbitales de carbono (Carey, 2023).

#### 2.1.1.1 Hidrocarburos alifáticos

El término 'alifático' se refiere a hidrocarburos no aromáticos. Son hidrocarburos basados en cadenas de átomos de carbono (C). Existen diferentes tipos de hidrocarburos alifáticos:

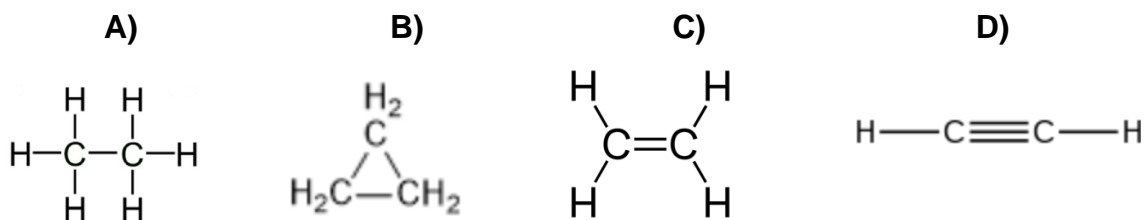
- Alcanos: También se denominan parafinas o hidrocarburos saturados, con fórmula química  $C_nH_{(2n+2)}$ . Los alcanos se caracterizan por cadenas ramificadas o no ramificadas de átomos de carbono con átomos de hidrógeno unidos y contienen solo enlaces carbono-carbono sencillos sin enlaces dobles o enlaces triples entre átomos de carbono (Krishna & Mishra, 2012). Los alcanos son materias primas importantes de la industria química y el componente principal de la gasolina y los aceites lubricantes (Wade, 2019).
- Naftenos: También conocidos como cicloalcanos. Al igual que los alcanos, estos hidrocarburos están compuestos de átomos de hidrógeno y carbono unidos con enlaces únicos; sin embargo, difieren de los alcanos en que no forman estructuras de cadena sino que forman estructuras cíclicas (King, 2023). Muchos cicloalcanos se utilizan en combustible de motor, gas natural, queroseno, diesel y otros aceites pesados, aunque también son usados como disolventes, lubricantes, materias primas químicas y en perfumería o cosmética (Suman, 2021)
- Alquenos: también se denominan olefinas o isoparafinas, con una fórmula química de  $C_nH_{(2n-2)}$ . Los alquenos se caracterizan por cadenas ramificadas



o no ramificadas de átomos de carbono, similares a los alcanos excepto por la presencia de átomos de carbono con doble enlace. Los alquenos generalmente no se encuentran en los aceites crudos, pero son comunes en los productos refinados, como la gasolina (Pizaña, 2013). El uso más importante de los alquenos es como materia prima para la elaboración de plásticos (Kennepohl et al., 2016).

- Alquinos: Su fórmula general es  $C_nH_{(n-2)}$ , estos poseen un triple enlace, la cual es la característica distintiva de la estructura de los alquinos y este mismo triple enlace hace que la molécula sea muy reactiva (Pizaña, 2013). Los alquinos son utilizados principalmente como combustibles, el alquino de mayor importancia comercial es el acetileno o etino. Su aplicación comercial más importante es como combustible de los sopletes oxiacetilénicos, ya que las temperaturas obtenidas de su combustión son muy altas (2800 °C) (Lozano, 2017)

La disponibilidad y capacidad para formar enlaces químicos diversos convierten a los hidrocarburos alifáticos en componentes clave en numerosos procesos industriales y en la vida cotidiana (Amosu et al., 2015). En la **figura 1** se presenta el ejemplo más simple de los diferentes tipos de hidrocarburos alifáticos.



**Figura 1.** Estructura más simple de los tipos hidrocarburos alifáticos siendo: A) Alcano; B) Cicloalcano; C) Alqueno; D) Alquino (Clayden et al., 2012).

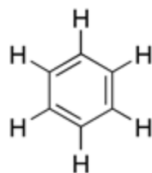
### 2.1.1.2. Hidrocarburos Aromáticos

Son los hidrocarburos que contienen al menos un anillo aromático, el cual consta de enlaces dobles y simples alternados entre los átomos de carbono. Los aromáticos con dos o más anillos se conocen como hidrocarburos aromáticos policíclicos y pueden ir desde uno a seis por molécula (Lawal, 2017). La **figura 2** muestra un ejemplo del hidrocarburo aromático más simple que existe.

El término 'aromático' se acuñó antes del mecanismo físico que determina la aromaticidad y se derivó del hecho de que muchos de los compuestos tienen un olor dulce. Se sabe que son el componente tóxico más agudo del petróleo crudo y también están asociados con efectos cancerígenos y crónicos. Muchos aromáticos de bajo peso son solubles en agua, lo que aumenta el potencial de exposición a los recursos acuáticos (Krishna & Mishra, 2012).

Son excelentes solventes, se utilizan en la fabricación de combustibles, pesticidas, lacas, pinturas, detergentes y más. Un ejemplo importante de un hidrocarburo aromático es el benceno, una estructura de anillo de seis carbonos (Roberts & Caseiro, 2014).

Estos compuestos pueden persistir en el aire y el agua durante períodos prolongados, lo que aumenta la preocupación sobre su impacto en la calidad del aire y la salud humana. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son objeto de regulaciones y monitoreo estricto en muchos países debido a su potencial para causar daños tanto en la salud humana como en los ecosistemas acuáticos y terrestres (Lawal, 2017).



**Figura 2.** Estructura más simple de un hidrocarburo aromático (benceno) (Clayden et al., 2012).

## 2.2 Suelo

### 2.2.1 Definición

El suelo es el material orgánico y mineral no consolidado que se encuentra en la superficie de la Tierra. Es producto de la intemperización y fragmentación de la roca madre, por varios factores: la influencia del clima, el relieve (elevación, orientación y pendiente del terreno), actividad bioquímica de organismos y materiales parentales del suelo (minerales originales) que interactúan en el tiempo (miles de años). Por ello, es considerado un recurso natural no renovable, al mismo tiempo es un ecosistema megadiverso, ofrece un hábitat para múltiples organismos (Voroney, 2007).

El suelo es un sistema de reciclaje de nutrientes y desechos orgánicos, un regulador de la calidad del agua, un modificador de la composición atmosférica y un medio para el crecimiento de las plantas, lo que lo convierte en un proveedor de servicios ecosistémicos de importancia crítica (Dominati et al., 2010).

Dado que el suelo tiene una enorme variedad de nichos y hábitats disponibles, contiene la mayor parte de la diversidad genética de la Tierra. Un gramo de suelo puede contener miles de millones de organismos, pertenecientes a miles de especies, en su mayoría microbianas y en gran parte aún inexploradas (Torsvik & Øvreås, 2002).

### 2.2.2 Composición

El suelo es un cuerpo complejo, la composición del suelo varía dependiendo de varios factores, como el tipo de suelo, la ubicación geográfica y los procesos naturales y humanos que hayan ocurrido en el área (Poveda, 2020). Sus componentes se muestran en la **tabla 1**, donde se aprecia que por lo general solo la mitad del suelo se encuentra compuesto por partículas sólidas.

Es importante destacar que los suelos son dinámicos y pueden experimentar cambios en su composición y estructura con el tiempo. Esta constante transformación puede ser influenciada por una variedad de factores, como las condiciones climáticas, la vegetación circundante, especialmente en respuesta a prácticas agrícolas y de manejo del suelo (Blum et al., 2006).

**Tabla 1.** Composición del suelo, tomado de McClellan, (2007)

<b>Componente del suelo</b>	<b>Proceso por el cual forma parte del suelo</b>	<b>Porcentaje que representa</b>
Materia mineral	Obtenido por diferenciación y descomposición de rocas	45 %
Materia orgánica	Proveniente de la descomposición de residuos vegetales, restos animales y tejidos microbianos	5 %
Agua	Proveniente de la atmósfera y las reacciones en el suelo	50 % del suelo está hueco o es poroso, la mitad de este espacio está ocupada por agua y la otra mitad por gas.
Aire o gases	Proveniente de la atmósfera, reacciones de raíces, microbios y productos químicos en el suelo	

### 2.2.3 Horizontes del suelo

Por lo general, se pueden distinguir diferentes capas dentro de los suelos, llamadas horizontes. Estos horizontes interactúan entre sí, por lo que no pueden considerarse independientes, aunque pueden ser muy diferentes. Existe una gran complejidad y diversidad en los horizontes del suelo, pero en general los horizontes superficiales son dinámicos y ricos en vida y materia orgánica. (Needelman, 2013).

Los horizontes del suelo se forman debido a procesos influenciados por diversos factores, como el clima, los organismos vivos, la topografía, la composición de las rocas madre y el tiempo geológico. Los horizontes se definen en muchos casos por características físicas obvias, principalmente color y textura, Estas capas u horizontes están representados por las letras H, O, A, E, C, B y R. y las características de cada uno se describen en la **tabla 2** (FAO, 2006).

**Tabla 2.** Horizontes del suelo y sus características.

<b>Horizonte</b>	<b>Características</b>
<b>H</b>	Horizonte orgánico formado (o en formación) por una acumulación de materia orgánica depositada en la superficie del suelo. Contiene por lo menos de 20 a 30% de materia orgánica, y su composición depende del tipo de vegetación de que provenga la materia orgánica.
<b>O</b>	Horizonte orgánico como el anterior, salvo que no está saturado de agua más de unos cuantos días por año. Contiene por lo menos un 35% de materia orgánica que, por lo general, consiste en materia orgánica parcialmente descompuesta.
<b>A</b>	Horizonte mineral formado (o en formación) en la superficie o adyacente a ésta. Este horizonte muestra una acumulación de materia orgánica humificada (humus) íntimamente asociada con partículas minerales o posee una morfología adquirida por la formación del suelo.
<b>E</b>	Horizonte eluvial, yace bajo un horizonte H, O o A. Contiene menos materia orgánica, presenta una acumulación de minerales resistentes y es de color más claro. Se forma por la pérdida de hierro, arcilla fina, etc., que han sido trasladados al horizonte B subyacente y se acumulan allí.

<b>B</b>	Horizonte mineral en que las partículas minerales (solas o combinadas con humus) se han concentrado con el de cursar del tiempo
<b>C</b>	Horizonte mineral de material no consolidado a partir del cual se ha desarrollado el suelo. También se incluyen aquí los materiales gravosos y pedregosos de fondo que permiten el desarrollo de las raíces.
<b>R</b>	Capa de roca continua, endurecida suficientemente coherente en húmedo para hacer impracticable la excavación con una pala. Esta roca puede tener fisuras, pero éstas son muy escasas y demasiado pequeñas para un desarrollo radical significativo. De hecho, éste no es un verdadero horizonte del suelo.

#### 2.2.4 Servicios ecosistémicos del suelo

Los suelos como recurso natural desempeñan una serie de funciones ambientales, sociales y económicas clave (Blum, 2005). Ejemplos de estas funciones son:

- A. *Producción de biomasa:* El suelo sirve como ancla para las raíces de las plantas, al mismo tiempo la porosidad de este le concede la capacidad de retener el agua que la vegetación necesita, además, un suelo fértil también proporcionará nutrientes minerales disueltos para un crecimiento óptimo (Weil & Brady, 2017). Esto hace que el suelo sea un lugar apto para las plantas. Esta función asegura alimentos, forrajes, energías renovables y materias primas (Blum & Swaran, 2006).
- B. *Interacción ambiental:* Las interacciones ambientales se dan gracias a la capacidad de filtrado, amortiguación y transformación del agua; estos procesos en conjunto a la cubierta vegetal influyen fuertemente en el ciclo del agua (Blum, 2005). Además, este puede acumular grandes cantidades de

carbono como materia orgánica del suelo, reduciendo así la concentración total de dióxido de carbono, pudiendo de esta manera mitigar el cambio climático global (Weil & Brady, 2017).

C. *Hábitat biológico y acervo genético*: Los suelos representan un hábitat físico, químicamente complejo y heterogéneo que sustenta una gran diversidad de taxones microbianos y faunísticos. Por ejemplo, 10 g de suelo contienen alrededor de  $10^{10}$  células bacterianas de más de  $10^6$  especies y se estima que 360,000 especies de animales habitan en el suelo (FAO, 2015).

D. *Fuente de materias primas*: Los suelos son una fuente de materias primas como lo pueden ser la arcilla, arena, grava y minerales en general, además de fuente de energía y agua. Las materias primas son la base del desarrollo técnico, industrial y socioeconómico (Blum, 2005).

#### 2.2.4 Propiedades fisicoquímicas del suelo

Cada una de estas propiedades influyen en la capacidad del suelo para sustentar la vida vegetal y animal, por lo tanto, son críticas para la producción agrícola y la conservación de los ecosistemas naturales (Weil & Brady, 2017).

Las propiedades físicas del suelo se muestran en la **tabla 3** y las propiedades químicas en la **tabla 4**. Conocer las propiedades físicas del suelo ayuda a evaluar la erosión, la infiltración del agua y la susceptibilidad a la compactación. Por su parte, determinar las propiedades químicas del suelo es de gran importancia debido a su influencia en la fertilidad y productividad del suelo.

Cada característica del suelo, desde su textura y densidad hasta su nivel de acidez y contenido de materia orgánica, desvela información esencial sobre su calidad y capacidad de soportar vida (FAO, 2021).

**Tabla 3.** Propiedades físicas del suelo obtenida de FAO, (2021).

<b>Propiedad</b>	<b>Características</b>
Textura	Se refiere a la proporción de tamaño y forma de partículas, entre estas encontramos la arena (0.05 y 2.0 mm), limo (0.002 y 0.05 mm) y arcilla (>0.002 mm) (USDA, 2017). Esta propiedad influye como factor de fertilidad y en la capacidad de retener agua, así como en la aireación, drenaje, contenido de materia orgánica y otras propiedades.
Capacidad de Campo (CC)	Es la cantidad de agua que el suelo es capaz de retener luego de ser saturado y dejado drenar libremente evitando su evapotranspiración y hasta que el potencial hídrico se estabilice (tras 24 a 48 horas de la lluvia o riego).
Densidad	<p>Se refiere al peso por volumen del suelo. Existen dos tipos de densidad, real y aparente.</p> <p>La densidad real es una medida de la cantidad de material sólido presente en un volumen determinado de suelo, excluyendo los espacios porosos.</p> <p>La densidad aparente se refiere a la masa total del suelo dividida por el volumen total, incluyendo los espacios porosos.</p>
Color del Suelo	Depende de sus componentes y varía con el contenido de humedad, materia orgánica y grado de oxidación de minerales presentes. Esta se usa para distinguir las secuencias en un perfil del suelo, determinar el origen de materia parental, presencia de materia orgánica, estado de drenaje y la presencia de sales y carbonato.



**Tabla 4.** Propiedades químicas del suelo

<b>Propiedad</b>	<b>Características</b>
Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	Se define como el número de cargas negativas del suelo. Se debe casi en su totalidad a la fracción arcilla y a la materia orgánica.
pH	Es una medida de acidez o alcalinidad de una solución, indicando la concentración de iones de hidrógeno (H <sup>+</sup> ) presentes.  De este parámetro depende la disponibilidad de nutrientes para las plantas, determinando su solubilidad y la actividad de los microorganismos, los cuales mineralizan la materia orgánica.
Nutrientes para las Plantas	Se clasifican entre macro y micro nutrientes.  Los macronutrientes se requieren en grandes cantidades e incluyen Carbono(C), Hidrógeno (H), Nitrógeno(N), Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Azufre(S).  Los micronutrientes por otro lado se requieren en pequeñas, su insuficiencia puede dar lugar a carencia y su exceso a toxicidad, se refieren a Hierro (Fe), Zinc (Zn), Manganeseo (Mn), Boro (B), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo), Cloro (Cl).
Carbono Orgánico del Suelo	Es la fracción de carbono contenida en la materia orgánica del suelo (como residuos vegetales, raíces, microorganismos y otros residuos orgánicos).
Conductividad eléctrica	Se refiere a la acumulación de sales solubles en agua en el suelo.

### 2.3 Microbiota del suelo

El suelo es un ambiente megadiverso, hábitat para la microbiota edáfica compuesta por bacterias, actinomicetos, hongos, algas, protozoos y nematodos (Hooman, 2010). Todas estas poblaciones interactúan de manera sinérgica y/o antagónica, influyendo en la fertilidad del suelo ya que los microorganismos median entre el 80 y el 90% de todos los procesos que ocurren en el suelo (Furtak & Gajda, 2018).

En él se llevan a cabo los ciclos biogeoquímicos (C, N, P, S), encargados de realizar la degradación de la materia orgánica, fijar nitrógeno y liberar nutrientes para las plantas, también ayuda a prevenir la erosión y mantener la estructura del suelo. La actividad biológica del suelo depende del número y la composición de especies de microorganismos y su actividad enzimática (Torsvik & Øvreås, 2002).

Los valores típicos de densidad poblacional de la microbiota de un suelo no impactado por la presencia de contaminación, se muestran en la **tabla 5**, en donde se observa que las bacterias son el grupo con mayor densidad poblacional siendo además los microorganismos más diversos. Se estima que un solo gramo de suelo puede albergar miles de especies bacterianas diferentes (Hooman, 2010).

**Tabla 5.** Densidad poblacional y biomasa de grupos microbianos a una profundidad de suelo de 0 a 15 cm. Tomado de Hooman, (2010)

<b>Grupos de Microorganismos</b>	<b>Número de células / g de suelo</b>	<b>Biomasa (g / m<sup>2</sup>)</b>
<b>Bacterias</b>	$10^8 - 10^9$	40–500
<b>Actinomicetos</b>	$10^7 - 10^8$	40–500
<b>Hongos</b>	$10^5 - 10^6$	100-1500
<b>Algas</b>	$10^4 - 10^5$	1-50
<b>Protozoos</b>	$10^3 - 10^4$	Varia
<b>Nematodos</b>	$10^2 - 10^3$	Varia

### 2.3.1 Bacterias productoras de biosurfactantes

Los microorganismos utilizan una amplia variedad de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía para su crecimiento. Cuando estos sustratos son inaccesibles por su baja solubilidad, competencia con otros microorganismos u otro tipo de factor ambiental, utilizan a los biosurfactantes para disponer de la fuente de carbono (Al-Hawash et al., 2018).

Los biosurfactantes son producidos por una variedad de microorganismos, ya sea secretada extracelularmente o unidos a componentes celulares, principalmente durante su crecimiento en sustratos inmiscibles en agua (Becerra & Horna, 2016). Las principales funciones de los biosurfactantes a nivel fisiológico son:

- Capacidad para emulsificar y solubilizar compuestos insolubles en fases acuosas, como son los hidrocarburos, facilitando la disponibilidad de estos sustratos para el crecimiento y mantenimiento de los microorganismos (Priya & Usharani, 2009).
- Adherencia y liberación de células en superficies. Ésta es una de las más importantes estrategias de supervivencia de los microorganismos debido a la presencia de biotensoactivos en la parte externa de la membrana o pared celular. Estos biotensoactivos son responsables de regular las propiedades de la superficie celular, promoviendo la adherencia o liberación de las células de sitios específicos de acuerdo a sus necesidades nutricionales o para evadir ambientes desfavorables (Das & Chandran, 2011).
- Facilitar el transporte de hidrocarburos a nivel de membrana, función atribuida a los biotensoactivos del tipo glicolipídico ligados a membrana celular (Becerra & Horna, 2016).

- Actividad antibiótica, la que ha sido demostrada por varios biotensoactivos, principalmente los lipopéptidos y glicopéptidos (Ceresa et al., 2023).

La principal función biológica de los biosurfactantes es su capacidad para solubilizar sustratos hidrofóbicos tales como hidrocarburos, lípidos, aceites, fármacos y otros (Islas, 2010). Esto porque la interacción de los biosurfactantes con la membrana celular incrementa la hidrofobicidad en esta, lo que reduce el índice de lipopolisacáridos de la pared celular sin causar daño alguno a la membrana. Esta acción de los biosurfactantes bloquea la formación de puentes de hidrógeno, permitiendo así interacciones más efectivas entre lo hidrofóbico y lo hidrofílico en el ambiente circundante (Santos et al., 2016).

### 2.3.2 Biosurfactantes

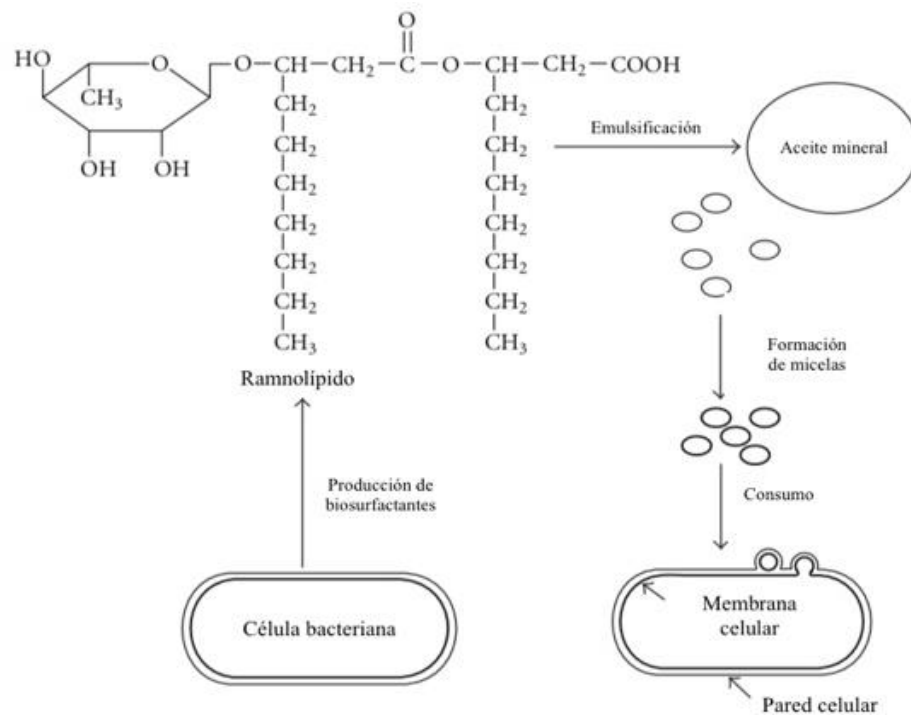
Un biosurfactante es un compuesto biológico, cuya molécula es de carácter anfifílico. Es decir, presenta una doble afinidad, que desde el punto de vista fisicoquímico puede definirse como una dualidad polar-apolar, ya que estas moléculas tienen restos hidrofílicos e hidrofóbicos (Saleger, 2002).

El resto apolar es a menudo una cadena de hidrocarburo, mientras que el resto polar puede ser iónico (catiónico o aniónico), no iónico o anfótero (Santos et al., 2016). El uso de los biosurfactantes para la degradación de hidrocarburos se presenta gráficamente en la **figura 3**. La biodegradación de los hidrocarburos derivados del petróleo por los biosurfactantes se produce a través de dos mecanismos.

El primero implica un aumento de la biodisponibilidad del sustrato hidrofóbico para los microorganismos, con la consiguiente reducción de la tensión superficial del medio alrededor de la bacteria, así como una reducción de la tensión interfacial entre la pared celular y las moléculas de hidrocarburo (Sah et al., 2022).

El segundo mecanismo implica la interacción entre el biosurfactante y la superficie celular, provocando cambios en la membrana, facilitando la adherencia de los hidrocarburos (aumento de la hidrofobicidad) y reduciendo el índice de lipopolisacáridos de la pared celular sin dañar la membrana. Así, los biosurfactantes bloquean la formación de puentes de hidrógeno y permiten interacciones hidrofóbicas-hidrofilicas (Santos et al., 2016)

Por ejemplo, en el Complejo Petroquímico en Poza Rica, Veracruz, México, se llevó a cabo la bioaumentación de *Pseudomona putida* CB-100 (productora de biosurfactantes del tipo ramnolípidos) como parte de un proceso de biorremediación a un suelo contaminado por hidrocarburos. Durante el tratamiento, se logró una remoción del 40,6% de los hidrocarburos totales de petróleo (TPH), también se detectó una producción de ramnolípidos de 1,54 mg/kg y se observó una reducción de la tensión superficial a 64 mN/m. Además, se identificó una correlación negativa significativa ( $R = -0,54$ ;  $p < 0,019$ ) entre la concentración de TPH (mg/kg) y la tensión superficial (mN/m) (Ángeles & Refugio, 2013).



**Figura 3.** Diagramas del funcionamiento de los biosurfactantes: A) Modificado de Krishna & Mishra, 2012; B) Obtenido de Santos et al., (2016).

### 2.3.2.1 Propiedades de los biosurfactantes

La actividad de los biosurfactantes se relaciona con cambios de la tensión superficial de los líquidos, por lo cual sus propiedades están relacionadas a esta actividad. La concentración de biosurfactantes en la que se alcanza la mínima tensión superficial es denominada concentración micelar crítica (CMC); se refiere también a la concentración de biosurfactantes por debajo de la cual las micelas se forman espontáneamente. La CMC es un parámetro característico para cada surfactante. Para valores inferiores a esta concentración, todo el surfactante presente en solución se encuentra en forma de monómeros ubicados en la interfase agua-aire, mientras que, a valores más altos, algunas moléculas de tensioactivo se encuentran en forma micelar (Novelo & Gracia, 2005).

En la **figura 4** se observa que antes de alcanzar la CMC, la tensión superficial cambia fuertemente con la concentración del biosurfactante. Después de alcanzar el CMC, la tensión superficial permanece relativamente constante aunque mientras siga aumentando la CMC lo sigue haciendo también la solubilidad (Ramesh & Sakthishobana, 2021)

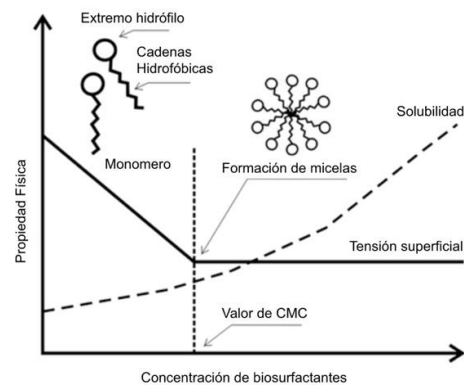
Además de la CMC, tres propiedades más caracterizan a los biosurfactantes y surfactantes en general son: el número de agregación ( $n_a$ ), el balance hidrofílico-lipofílico (HLB) y el punto de nube (PN). El  $n_a$  indica el promedio de moléculas de surfactante que se encuentran formando las micelas. Los agregados micelares están conformados generalmente de 20-100 monómeros, con un radio aproximado de 1.5-30 Å (Islas, 2010).

Dado que una molécula biosurfactante tiene porciones tanto hidrófilas como hidrófobas, el equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) clasifica la tendencia de un tensioactivo a ser hidrófilo o hidrófobo (Yamashita & Sakamoto, 2016). Los tensioactivos con mayor valor de escala HLB son más hidrófilos y, por lo tanto, son más solubles en agua. De manera similar, los tensioactivos con menor valor de

escala HLB son más lipofílicos y, por lo tanto, más solubles en aceite. Por lo tanto, los tensioactivos de HLB más altos crearán emulsiones de aceite en agua y los tensioactivos de HLB más bajos crearán emulsiones de agua en aceite (Azhar et al., 2006).

La temperatura también es un factor clave que incide directamente en la solubilidad de los biosurfactantes en soluciones acuosas. Al incrementarse la temperatura, la solubilidad de los surfactantes decrece gradualmente y las moléculas no solubles rompen el equilibrio existente entre las del tensioactivo y las del agua, formando super-agregados de tensioactivo, lo cual provoca un cambio de fase y genera una apariencia turbia. Este efecto se ha denominado punto de nube (PN) y se define como la temperatura a la cual el tensioactivo (generalmente no iónico) pierde su solubilidad en una solución acuosa (Islas, 2010).

Estos cuatro parámetros CMC,  $N_a$ , HLB y PN caracterizan a los tensioactivos que se utilizan en la industria y el ambiente por sus capacidades para solubilizar compuestos poco solubles, formar emulsiones entre fases inmiscibles, humectar superficies hidrófobas y determinar la temperatura a la cual se da un cambio en las propiedades del tensioactivo. De esta manera, las características y capacidades para cada grupo de tensioactivos están directamente relacionadas con su estructura química, la cual le provee ventajas en un nicho industrial o ecológico particular (Ron & Rosenberg, 2001).



**Figura 4.** Valor de tensión superficial en función de la concentración de biosurfactante, traducido de Kumar et al., (2018).

### 2.3.2.2 Clasificación de los biosurfactantes

Los biosurfactantes se clasifican principalmente según su estructura química y su origen microbiano. En general, la estructura química de los biosurfactantes incluye un grupo hidrofílico consistente de aminoácidos, péptidos aniónicos o catiónicos; mono-, di-, o polisacáridos; y un grupo hidrofóbico constituido por ácidos grasos saturados o insaturados (Fakruddin, 2012); estos incluyen:

- **Glucolípidos:** Es uno de los grupos más conocidos entre los biosurfactantes. Son carbohidratos en combinación con una larga cadena alifática de ácidos y ácidos hidroxílicos. Generalmente son compuestos de carga aniónica, excelentes agentes tensioactivos y tienen la capacidad de generar cambios en la hidrofobicidad de la membrana bacteriana. Entre los glucolípidos conocidos, los más estudiados son los ramnolípidos, trehalolípidos, soforolípidos (Mnif et al., 2018).
- **Lipopéptidos y lipoproteínas:** Es el segundo grupo de biosurfactantes microbiano más estudiado, representado por gran número de lipopeptidos, que son simples moléculas organizadas en un compuesto cuyo esqueleto está conformado por un péptido cíclico unido a una cola de ácido graso, sin embargo, existen numerosas variantes en su estructura que generan cambios en su comportamiento como agente tensioactivo. Siendo la surfactina el biosurfactante más conocido de este grupo (Antonioli et al., 2022).
- **Ácidos grasos, fosfolípidos y ácidos neutros:** Este tipo de biosurfactante es producido por una gran variedad de especies bacterianas y levaduras durante su crecimiento sobre n-alcenos. El balance hidrofílico o lipofílico de los ácidos grasos está relacionado con la longitud de la cadena de hidrocarburo. Los ácidos grasos que disminuyen considerablemente la



tensión superficial e interfacial, son aquellos que en su molécula presentan entre 12 y 14 átomos de carbono (Santos, 2017).

Actualmente se sabe que el tipo de biosurfactante producido depende del tipo de microorganismo que lo produce. Los ramnolípidos son producidos por *P. aeruginosa*; los lípidos de la trehalosa son producidos por un número de géneros estrechamente relacionados, incluyendo *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Tsukamurella*, *Gordonia*, *Mycobacterium* y *Arthrobacter*; todos pertenecientes a la división Firmicutes; y los soforolípidos son producidos por varias especies de *Candida*. Un grupo recientemente identificado de glicolípidos llamados lípidos de manosileritriol son producidos por *Candida antartica* y *Ustilago maydis* (Eras et al., 2022).

Una segunda clase importante de biosurfactante son las lipoproteínas como la surfactina, iturina, fengicina y lichenisina, las cuales son producidas por *Bacillus sp.* Otros géneros que producen lipoproteínas incluyen *Actinoplanes*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia*. Organismos productores de biosurfactantes poliméricos incluyen los siguientes géneros: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Candida*, *Halomonas*, *Methanobacterium*, *Phormidium*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces* y *Sulfolobus* (Becerra & Horna, 2016).

### 2.3.3 Aislamiento de bacterias productoras de biosurfactantes.

Los suelos contaminados son, por lo general, colonizados por diferentes especies que se adaptan a las fuentes de energía presentes en el sitio. Se estima que en un gramo de suelo en condiciones naturales (no afectadas por acciones antropogénicas) se pueden encontrar hasta 600 millones de bacterias, entre las cuales pueden existir entre 15 mil y 20 mil especies distintas. En los suelos contaminados con hidrocarburos, las bacterias y hongos capaces de utilizar hidrocarburos representan el 1% de la población total siendo aproximadamente  $10^4$  a  $10^6$  células por gramo de suelo (González et al., 2010).

Se conoce que las bacterias son el grupo microbiano más versátil en la biodegradación de hidrocarburos. Los microorganismos degradadores de hidrocarburos están ampliamente distribuidos en el medio ambiente, el 96% de las bacterias aisladas en medios líquidos (lagos, ríos y lagunas) presentan capacidad de crecer y emulsificar hidrocarburos, de manera que buscar microorganismos en medios líquidos supone una opción viable para el aislamiento de este tipo de bacterias (Dejonghe et al., 2003).

Para comprobar si producen biosurfactantes se siembran en Agar Siegmund y Wagner o un similar como lo es en este caso el Agar Azul de Metileno (su composición se detalla en el método). En estos medios, la presencia de biosurfactantes se constata por el surgimiento de un halo azul alrededor de las colonias después de 48 horas de incubación a 30 °C (Becerra & Horna, 2016).

#### 2.3.4 Identificación de bacterias productoras de biosurfactantes degradadoras de hidrocarburos

Si se quiere saber si la bacteria es capaz de metabolizar hidrocarburos se utiliza el agar Bushnell-Haas, el cual es recomendado para el examen microbiológico de combustibles por el Comité SIM sobre deterioros microbiológicos de combustibles. Este medio contiene todos los nutrientes con excepción de que la única fuente de carbono es un hidrocarburo. Solo las bacterias que pueden descomponer los hidrocarburos crecerán en estos medios (Gimba et al., 2023).

Para los hidrocarburos líquidos, el hidrocarburo se coloca en capas sobre la superficie del agar inoculado. Para probar hidrocarburos volátiles como la gasolina, las placas de Petri que contienen el medio se invierten y el hidrocarburo se vierte en la tapa. El sulfato de magnesio, el cloruro de calcio y el cloruro férrico proporcionan oligoelementos. El nitrato de amonio es una fuente de nitrógeno, dihidrogenofosfato de potasio e hidrogenofosfato dipotásico amortiguan el medio (HiMedia Laboratories, 2020).

Se estima que se necesitan de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/g suelo de microorganismos para una biodegradación y  $10^5$  a  $10^6$  UFC/g de heterótrofos totales en el suelo capaces de metabolizar y mineralizar el contaminante hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (González et al., 2010).

### 2.3.5 Mecanismo de biodegradación de los hidrocarburos

Los microorganismos degradan hidrocarburos mediante procesos aeróbicos y anaeróbicos (Meckenstock et al., 2016). En condiciones aeróbicas, se produce una degradación más eficiente, ya que el oxígeno actúa como aceptor de electrones (Cao et al., 2009). Un resumen de la vía de degradación aerobia de los hidrocarburos se muestra en la **figura 5**.

Los procesos que facilitan la descomposición suelen implicar reacciones como la oxidación, reducción, hidroxilación y deshidrogenación, las cuales pueden ocurrir tanto en entornos aeróbicos como anaeróbicos. Enzimas como las monooxigenasas, dióxigenas, citocromo P450, peroxidasas, hidroxilasas y deshidrogenasas desempeñan un papel crucial en la eliminación de hidrocarburos (Rojo, 2009).

Enzimas como las monooxigenasas, dióxigenas y citocromo P450 son típicamente utilizadas en procesos aerobios, ya que requieren oxígeno para llevar a cabo sus funciones metabólicas. Por otro lado, enzimas como las deshidrogenasas y algunas hidroxilasas pueden estar implicadas tanto en procesos aerobios como anaerobios, ya que pueden funcionar en ausencia de oxígeno pero también pueden utilizarlo si está presente. Estas enzimas tienen una flexibilidad metabólica que les permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Das et al., 2023).

En un proceso aerobio, la primera reacción intracelular es un ataque a los contaminantes orgánicos que consiste en reacciones oxidativas mediadas por enzimas oxigenasas y peroxidasas, de manera que se realiza la incorporación y

activación de oxígeno, esto ocurre a través de la oxidación terminal, subterminal, u-oxidación y b-oxidación (Cao et al., 2009).

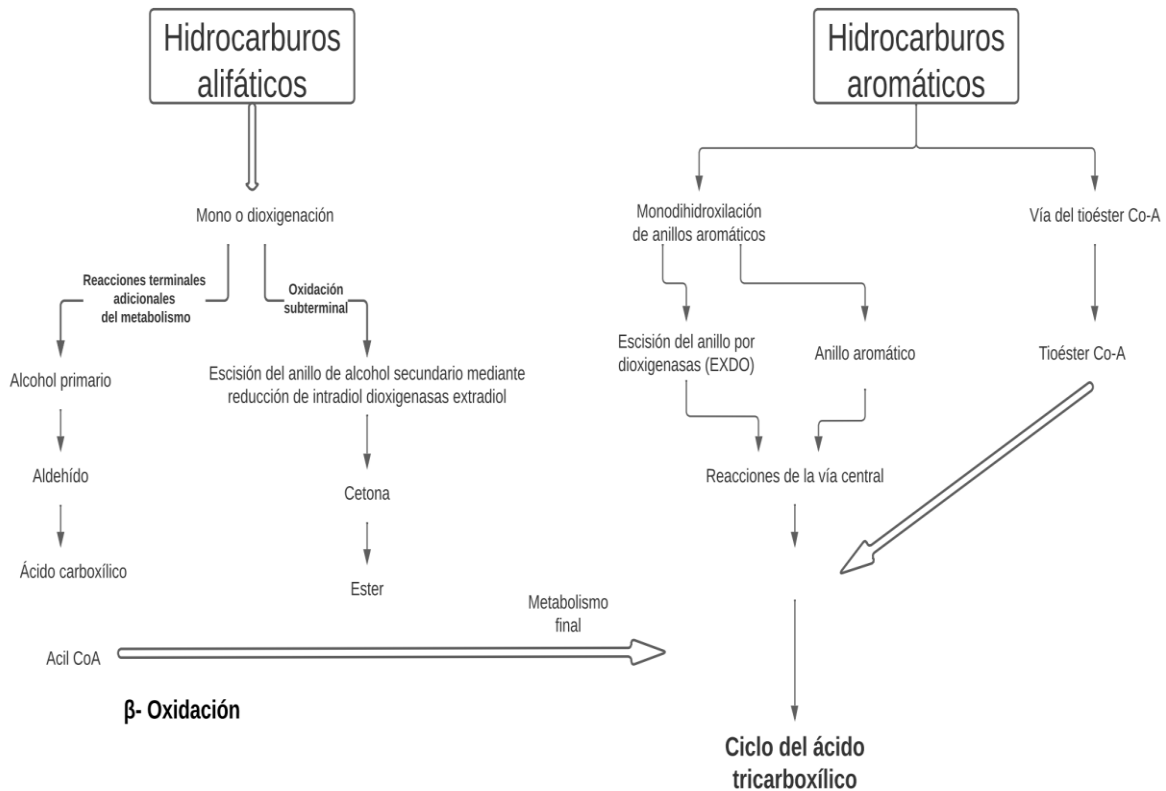
El segundo proceso se ve mediado por una vía de degradación periférica, la cual es una serie de pasos en los que se convierte gradualmente los contaminantes orgánicos en intermediarios del metabolismo central, por ejemplo, el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA). Los metabolitos precursores centrales pueden funcionar en diferentes procesos, por ejemplo, acetil-CoA, succinato y piruvato son componentes principales para la biosíntesis de la biomasa celular. Mientras que los azúcares son esenciales para varios procesos de biosíntesis y gluconeogénesis responsables del crecimiento (Wang et al., 2021).

Por lo general, los alcanos son oxidados por un sistema de monooxigenasa dependiente de un transportador de electrones (hidroxilasas de alcanos) para formar sus alcoholes correspondientes. Esto conlleva a la oxidación del grupo metilo para formar un alcohol primario que luego se somete a deshidrogenación para producir aldehído y ácido carboxílico. Estos siguen la vía de la beta-oxidación y finalmente entran en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) con CO<sub>2</sub> y agua como productos finales (Xia et al., 2005)

En contraste, los compuestos aromáticos muestran una alta resistencia a la biodegradación debido a su mayor estabilidad estructural. El metabolismo de estos ocurre a través del sistema de oxidasa de función mixta mediada por citocromo P450, con oxidación o hidroxilación como primer paso, formando dioles como intermediarios. Estos intermediarios siguen ya sea la vía de ortoescisión o metaescisión para formar intermediarios de catecol, que finalmente se integran en el TCA (Imam et al., 2019).

Otros mecanismos involucrados son (1) la unión de células microbianas a los sustratos y (2) la producción de biosurfactantes. El orden de susceptibilidad de los hidrocarburos a la degradación microbiana es el siguiente: los alcanos de cadena

lineal son los más susceptibles, seguidos de los alcanos ramificados, los aromáticos de bajo peso molecular le siguen y, por último, los aromáticos de alto peso molecular (Cerqueira et al., 2011).



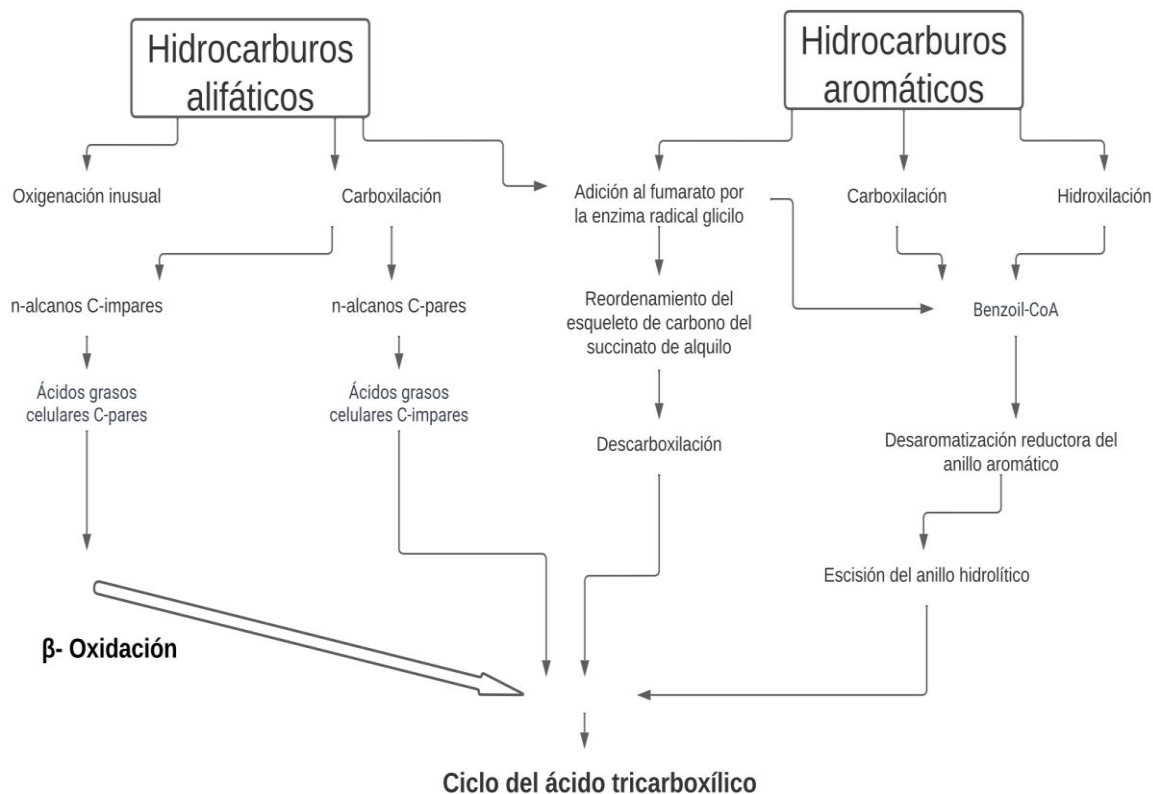
**Figura 5.** Vías para la degradación bacteriana aeróbica de hidrocarburos. Dos flechas representan más de una reacción; modificado de Kumar et al., (2018).

La degradación de hidrocarburos bajo condiciones anaeróbicas tiene una menor eficiencia energética al utilizar aceptores de electrones alternativos al oxígeno, los cuales incluyen compuestos como nitrato, sulfato, dióxido de carbono, metales oxidados o incluso ciertos compuestos orgánicos (B. Zhu et al., 2020).

La **figura 6** proporciona una representación gráfica de la ruta de degradación anaeróbica de los hidrocarburos. Los microorganismos anaerobios utilizan diferentes estrategias para activar los hidrocarburos sin requerir oxígeno molecular. Se describen tres estrategias principales en bacterias:

1. Adición de fumarato: Las bacterias utilizan el fumarato para activar alcanos y aromáticos sustituidos. El fumarato, un metabolito celular común, se une al grupo metilo de los hidrocarburos a través de un doble enlace. Esto produce compuestos intermedios que se degradan aún más mediante reordenamiento de carbono, descarboxilación y oxidación  $\beta$  (Bian et al., 2015).
2. Hidroxilación independiente del oxígeno: En este proceso, se añade un grupo hidroxilo a la cadena lateral del etilbenceno, transformándolo hasta benzoil-CoA y acetil-CoA mediante de reacciones oxidativas (Heider, 2007).
3. Carboxilación: Esta estrategia se aplica a hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Involucra la adición directa de  $\text{CO}_2$  a los hidrocarburos y se cree que es análoga a otros mecanismos de degradación. La carboxilación del benceno se cree que ocurre en condiciones reductoras de hierro y nitrato (Meckenstock et al., 2016).

Las bacterias anaerobias se dividen en dos clases: anaerobios estrictos y anaerobios facultativos. Las bacterias anaerobias facultativas tienen la opción de degradar hidrocarburos con o sin oxígeno mientras que las estrictas lo hacen de manera únicamente anaerobia. En el proceso de biodegradación anaeróbica, al igual que en la fermentación, los contaminantes orgánicos pueden ser mineralizados y convertidos en metano, dióxido de carbono e hidrógeno (Widdel et al., 2010).



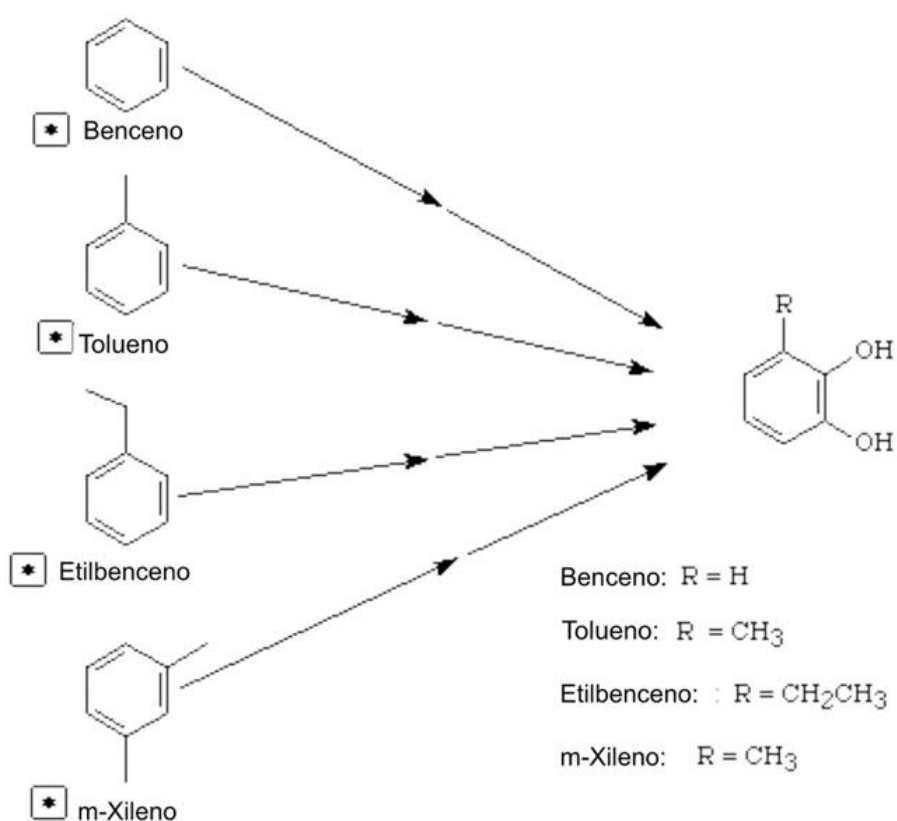
**Figura 6.** Vías para la degradación bacteriana anaeróbica de hidrocarburos. Dos flechas representan más de una reacción; modificado de Kumar et al., (2018).

#### 2.3.4.1 Mecanismo de biodegradación de los hidrocarburos BTEX

Los productos químicos BTEX (Benceno, Tolueno, Etilbenceno, y Xileno) son hidrocarburos monoaromáticos volátiles que se encuentran comúnmente juntos en el petróleo crudo y productos derivados del petróleo como la gasolina (Bolden et al., 2015). Según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), la principal fuente de contaminación por BTEX en el medio ambiente es debido a fugas de tanques de almacenamiento, lixiviación de vertederos, vertidos de fábricas, refinerías y terminales de distribución (Su et al., 2010).

Cada uno de los compuestos BTEX posee al menos una ruta aeróbica que implica la descomposición en un catecol modificado (El et al., 2014). Un esquema de la degradación aerobia de estos compuestos se muestra en la **figura 7**.

Por ejemplo, el benceno se descompone en catecol, mientras que el tolueno tiene diversas vías de biodegradación, algunas de las cuales incluyen el 3-metilcatecol como producto intermedio. De manera similar, el etilbenceno puede seguir múltiples rutas de degradación, resultando en 3-etilcatecol. Todos los isómeros de xileno son metabolizados en catecoles con un solo grupo metilo; por ejemplo, el m-xileno se convierte en 3-metilcatecol. En todos estos casos, posteriormente, el anillo aromático del catecol modificado se fragmenta mediante una dioxigenasa (Stephens, 2023).

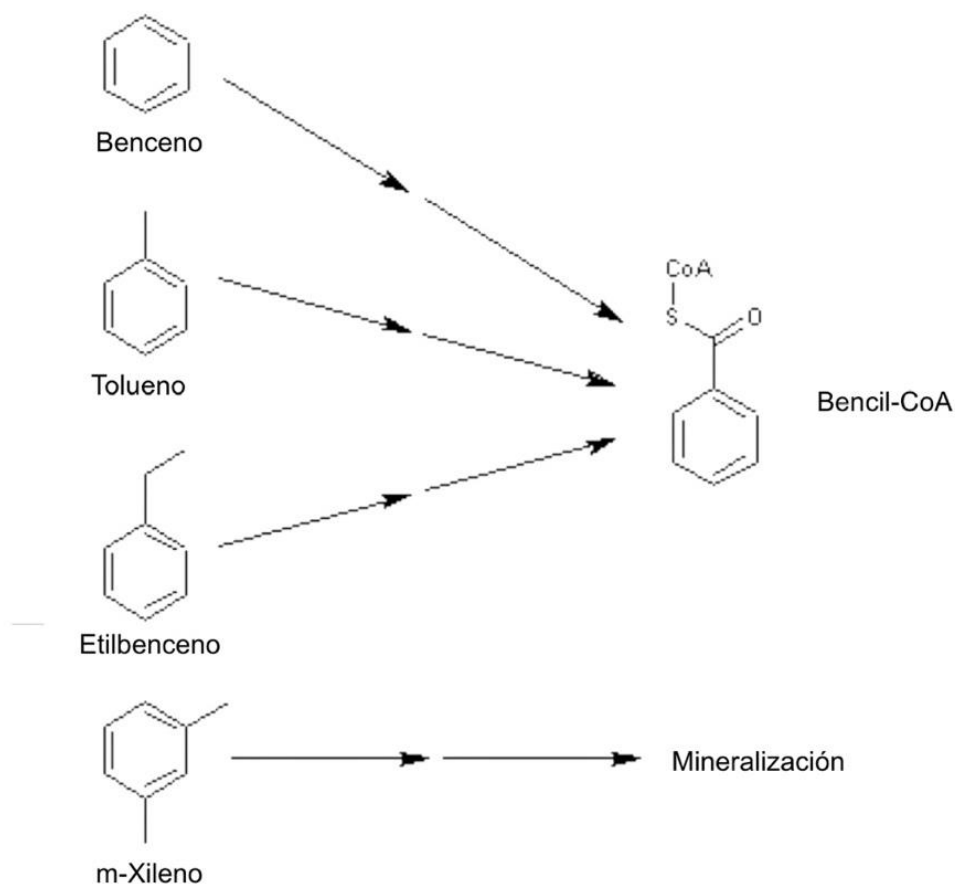


**Figura 7.** Degradación aeróbica de químicos BTEX, traducido de Stephens, (2023).

Las vías anaeróbicas de la biodegradación BTEX son importantes porque la biorremediación de estos compuestos se encuentran con frecuencia en situaciones donde la demanda de oxígeno excede el suministro (Weelink, 2008). La representación gráfica de la degradación anaeróbica de estos compuestos se muestra en la **figura 8**.



El benceno, el tolueno y el etilbenceno tienen un intermedio de biodegradación común: benzoil-CoA. Este compuesto es el intermedio central más común del metabolismo aromático anaeróbico. El anillo aromático de benzoil-CoA se reduce y finalmente se transforma en acetil-CoA. Pocos organismos son capaces de metabolizar anaeróbicamente el xileno. Incluyen cepas de bacterias desnitrificantes capaces de usar m-xileno como sustrato de crecimiento. *Dechloromonas* RCB puede degradar anaeróbicamente los tres isómeros de xileno. La vía(s) de biodegradación anaeróbica de xileno no es bien conocida (Stephens, 2023).



**Figura 8.** Degradación anaeróbica de químicos BTEX, traducido de Stephens, (2023).

## *2.4 Bioaumentación: técnica de restauración de suelos contaminados*

### 2.4.1 Definición y etapas de la bioaumentación

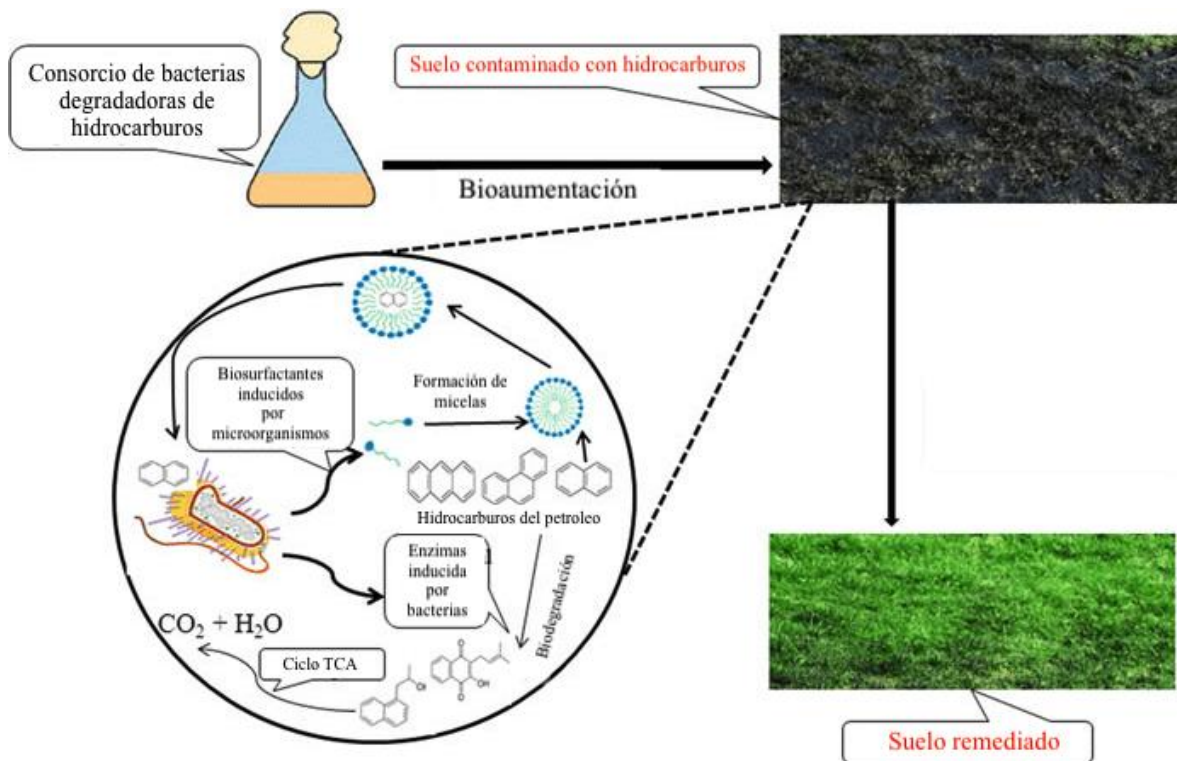
La bioaumentación es una técnica de la biorremediación que se usa para mejorar la capacidad de biodegradación dentro de un sitio contaminado mediante la introducción de cepas o consorcios de microorganismos competentes (autóctonos, no autóctonos o genéticamente modificados) específicos (Xu et al., 2018). Estos deben tener la capacidad de metabolizar y crecer sobre los contaminantes orgánicos de interés (Rodríguez et al., 2019).

El proceso para llevar a cabo la bioaumentación se encuentra conformado por diferentes fases donde: La primer fase se basa en realizar una evaluación de microorganismos degradadores, este proceso consiste en: (a) la recolección de la muestra de sitios contaminados (p.e. suelo, lodo, agua, sedimento, etc.), (b) realizar un cultivo de enriquecimiento selectivo donde el contaminante es la única fuente de carbono y energía usando un medio mínimo de sales, después se debe realizar (c) aislamiento y selección de los organismos usando medios de cultivo selectivos donde el contaminante sea empleado como única fuente de carbono y energía, (d) identificación taxonómica de los aislamientos por análisis genéticos, pruebas bioquímicas, entre otros (Cycoñ et al., 2017).

La segunda fase consiste en determinar las características del potencial de degradación de los aislamientos realizando ensayos en suelo, bajo condiciones de laboratorio, en micro o mesocosmos o escala piloto para determinar los factores que influyen en la tasa de degradación (p.e. degradación por co-metabolismo, tamaño del inóculo, temperatura, pH, concentración del contaminante, entre otros). Y por último se procede a la tercera fase que consiste en un estudio de escalamiento en el cual se introducen los organismos previamente aislados y seleccionados a los sitios contaminados; para dicho proceso se debe determinar (a) la concentración

del contaminante, (b) metabolitos y (c) las consecuencias físico-químicas y biológicas producidas en la degradación del contaminante (Rengifo, 2018).

En la **figura 9** se observa un panorama general de como un cultivo bacteriano competente para la remediación de suelos contaminados por hidrocarburos degrada los contaminantes, y ejemplifica el antes y después de un suelo bioaumentado.



**Figura 9.** Diagrama de un enfoque integrado de bioaumentación, modificado de Kumari et al., (2020).

#### 2.4.2 Ventajas y desventajas de la bioaumentación

En el proceso de bioaumentación existen factores que promueven o desfavorecen el uso de esta técnica, estos se muestran en la **tabla 6**. En donde se resalta que el uso de esta técnica representa un menor impacto ambiental y un ahorro, pero supone mayor tiempo en el proceso de degradación (Alin et al., 2016).

**Tabla 6.** Ventajas y desventajas de la bioaumentación

Ventajas	Desventajas
Las bacterias productoras de biosurfactantes pueden ser eficaces en la degradación de una amplia gama de hidrocarburos (Eras-Muñoz et al., 2022)	Algunas bacterias pueden tener una mayor afinidad por ciertos compuestos, lo que puede limitar su efectividad en la degradación de otros (Bouchez et al., 2000).
Estas bacterias pueden estimular la actividad microbiológica y promover la formación de agregados en el suelo, lo que favorece la retención de nutrientes y mejora su estructura (Lynch, 1981).	Las bacterias son sensibles a las condiciones ambientales, como la temperatura, salinidad o pH. Esto puede limitar su eficacia en algunos suelos contaminados, especialmente si las condiciones no son óptimas para su crecimiento y actividad (Amruta, 2023).
En comparación con los métodos de remediación química, el bioaumento de bacterias productoras de biosurfactantes presenta un menor riesgo para la salud humana y el medio ambiente (Guo et al., 2022).	La restauración completa de un suelo contaminado por hidrocarburos mediante la acción de bacterias productoras de biosurfactantes puede llevar tiempo. Es proceso que puede extenderse durante varios meses o incluso años (United States Environmental Protection Agency, 2000).
Al aprovechar los propios procesos naturales de biodegradación, se reducen los costos asociados con la adquisición de productos químicos o la implementación de tecnologías más complejas (United States Environmental Protection Agency, 2000).	Al introducir bacterias exógenas al suelo, existe el riesgo de que compitan con las especies nativas presentes en el ecosistema, afectando al equilibrio natural del suelo. Aunque la selección adecuada de bacterias autóctonas puede minimizar este riesgo (Mrozik & Piotrowska, 2010).

### 2.4.3 Aplicaciones de la bioaumentación

La bioaumentación con bacterias productoras de biosurfactantes se ha usado para tratar suelos contaminados con:

Herbicidas (2,4-D, clorofam) insecticidas (lindano, clordano, paratión), clorofenoles (PCP) y nitrofenoles, bifenilos policlorados (BPCs), hidrocarburos totales del petróleo (HTPs), hidrocarburos poli aromáticos (HAPs) y también se ha aplicado efectivamente para tratar desechos con concentraciones relativamente altas de metales (Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, 2007).

### 2.4.4 Factores que afectan la biorremediación del suelo

Existen diversas variables que influyen en el proceso de biodegradación de hidrocarburos en el suelo. Estas incluyen la presencia de componentes fundamentales como nutrientes, pH del suelo, contenido de humedad, temperatura y disponibilidad biológica de los hidrocarburos (Kanwal et al., 2022). La **tabla 7** muestra varios factores que influyen en la velocidad de biodegradación en el entorno ambiental.

**Tabla 7.** Resumen de varios factores físicos que afectan la tasa de biodegradación, modificado de Kumar et al., (2018)

PARÁMETRO	CONDICIÓN
<b>ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE HIDROCARBUROS.</b>	La facilidad con la que los microorganismos realizan la degradación de hidrocarburos ocurren en orden descendente de la siguiente manera: n-alcános > alcános ramificados > aromáticos de bajo peso molecular > alcános cíclicos.
<b>TEMPERATURA</b>	Temperaturas elevadas, disminuyen la tasa de biodegradación debido a la disminución de la actividad enzimática.

	<p>La tasa de degradación más alta en suelo se produce en el rango de 30-40 °C.</p>
<b>OXIGENO</b>	<p>La disponibilidad de oxígeno es uno de los factores críticos para la degradación aeróbica, la cual es la más eficiente en procesos de biodegradación de hidrocarburos. La disponibilidad de oxígeno en el suelo depende de las tasas de consumo de O<sub>2</sub> por parte de los microorganismos y del tipo de suelo.</p>
<b>NUTRIENTES</b>	<p>El Nitrógeno y Fósforo son importantes para el crecimiento microbiano y la actividad enzimática en el suelo. Su ausencia o exceso pueden reducir el porcentaje de degradación de los hidrocarburos.</p>
<b>ACIDEZ Y ALCALINIDAD</b>	<p>El pH afecta el crecimiento de bacterias y especies microbianas, la mayoría de las bacterias crecen en un rango de pH entre 6 y 8, fuera de estos parámetros el crecimiento de las células y su capacidad de degradación se ve reducido</p>
<b>HUMEDAD DEL SUELO</b>	<p>Es la cantidad de agua contenida en el material del suelo. Como el agua es el componente principal del proceso biológico y ecológico, la cantidad de agua presente en el suelo es muy importante para el estudio de remediación. Un microorganismo requiere suficiente agua para su crecimiento y difusión de nutrientes a lo largo del proceso de biodegradación.</p> <p>Las tasas óptimas de biodegradación en lodos de petróleo en el suelo ocurren con una saturación de agua del 30 al 90%</p>

## *2.5 Respiración del suelo y su relación con los procesos de biorremediación.*

Para evaluar los resultados de la descontaminación biológica no solo es suficiente medir el contenido remanente de hidrocarburos en el suelo, es necesario observar también los procesos microbianos (Margesin et al., 2000). La respiración del suelo se define como la liberación de CO<sub>2</sub> del suelo a la atmósfera e incluye la respiración microbiana del suelo, respiración de la fauna del suelo y respiración de las raíces de plantas (Frank et al., 2006).

La respiración de microorganismos en el suelo fue una de las primeras y todavía es uno de los índices de actividad microbiana del suelo más utilizados (Stotzky, 2016). La respiración microbiana es un índice biológico de los ecosistemas del suelo ampliamente utilizada, ya que refleja la utilización de hidrocarburos totales utilizados por microorganismos. Estudios anteriores han informado que la producción de CO<sub>2</sub> es un parámetro importante para el crecimiento, metabolismo y reproducción de microorganismos en suelos contaminados (Zhang et al., 2019).

Se ha demostrado que la respiración se correlaciona con el nivel de contaminación, lo que apunta a una relación entre la degradación de los hidrocarburos y la producción de CO<sub>2</sub>. Estudios previos mostraron que el contenido de materia orgánica del suelo y la tasa de respiración del suelo estaban positivamente correlacionados (Zhu et al., 2015).

La actividad respiratoria es ventajosa para monitorear la biodegradación que de otro modo sería difícil de cuantificar. Este método permite un fácil control de los parámetros importantes para la biodegradación (p. ej., contenido de N) y la determinación de la cinética a partir de la tasa de liberación de CO<sub>2</sub> del suelo. También puede ayudar a determinar las fases de biodegradación, como la adaptación y la biodegradación activa (Fallgren, 2009).

### 3. Antecedentes

Algunos de los trabajos en bioaumentación con bacterias productoras de biosurfactantes de los últimos 8 años y sus características comunes más importantes se presentan en la **tabla 8**. En esta puede observarse que la mínima densidad poblacional de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en el proceso de bioaumentación es de  $10^6$ . Tres de los reportes citados en la tabla, establecen un tiempo de tratamiento de 90 días o superior para realizar la cuantificación de la remoción de los hidrocarburos totales presentes en el suelo.

**Tabla 8.** Antecedentes en bioaumentación con bacterias productoras de biosurfactantes.

Referencia	Microorganismos	Detalles de la bioaumentación	Cantidad bioaumentada	% Degradación
Rodríguez-Uribe et al., 2021	<i>Pseudomonas cloritidis mutans</i> y <i>Rhodococcus qingshengii</i>	Degradación de hidrocarburos de petróleo en microcosmos de suelos salinos. En la Venta, Tabasco, México.	$1 \times 10^6$ UFC/g de suelo seco.	86% en 90 días de tratamiento.
Andreolli et al., 2021	<i>Bacillus subtilis</i> DSM 3256	Simulaciones en mesocosmos para la restauración de suelos impactados por hidrocarburos de alto peso molecular.	$10^9$ UFC/g de suelo.	75.2-75.9% en 90 días
Jimenez, 2018	<i>Flavobacterium sp.</i> y <i>Pseudomonas sp.</i>	Bioaumentación, bioestimulación y bioventeo para la remediación de suelo costero contaminado con hidrocarburos intemperizados en la localidad de Agua Dulce, Veracruz, México.		32.2% en 14 días.



Wu et al., 2016	<i>Acinetobacter</i> SZ-1 cepa KF453955	Degradación de hidrocarburos totales de petróleo mediante bioaumentación y bioestimulación.	10 <sup>8</sup> UFC/g de suelo.	34% con bioaumentación y 60% con bioestimulación en 70 días
Pérez-Vargas et al., 2015	Cultivos de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre	Los cultivos fueron inoculados en biopilas con 1.5 g de hidrocarburo/kg de suelo las cuales se contaminaron con fenantreno y antraceno respectivamente.		90% en 180 días

## 4. Hipótesis

La bioaumentación con consorcios de bacterias productoras de biosurfactantes en el suelo contaminado por hidrocarburos resultará en un aumento de la densidad poblacional microbiana y una mayor actividad respiratoria en un plazo de 90 días. Se espera que los experimentos a escala de microcosmos permitan un entorno controlado que contribuya en la estandarización de la degradación de hidrocarburos mediante bioaumentación.

## 5. Justificación

La problemática de la contaminación por hidrocarburos es un desafío ambiental de relevancia global que demanda soluciones eficaces y sostenibles. La situación específica del sitio contaminado en San Antonio Detiña, Acambay, Estado de México, derivada de una toma clandestina de combustible en enero de 2019, este es un ejemplo alarmante de los riesgos asociados a la actividad ilegal del huachicoleo. La necesidad de la investigación en este ecosistema degradado y su remediación aportan valor para la salud pública y la biodiversidad nativa, subrayando la importancia de este proyecto.

En este contexto, la bioaumentación con bacterias productoras de biosurfactantes han demostrado eficacia en la degradación de hidrocarburos. Su habilidad para descomponer estos contaminantes es fundamental en la restauración de suelos impactados, contribuyendo significativamente a la rehabilitación de su calidad y funcionalidad. La naturaleza biodegradable de las bacterias y los biosurfactantes en conjunto a su adaptabilidad a las condiciones del sitio contaminado, ofrecen una alternativa sostenible y respetuosa con el entorno edáfico, preservando así la rica biodiversidad microbiana característica de un país megadiverso como México.

De igual manera, es crucial llevar a cabo experimentos a escala de microcosmos antes de la implementación de la bioaumentación en el terreno, ya que esta aproximación se desarrolla en un entorno controlado. Esta etapa ofrece una valiosa oportunidad para adaptar y optimizar los protocolos de bioaumentación en función de las características y demandas específicas de los suelos contaminados en cuestión. Asimismo, el trabajo en una escala reducida permite alcanzar resultados precisos y controlados, lo que a su vez simplifica la toma de decisiones basadas en datos con respecto a la viabilidad y efectividad de la técnica en diversos contextos.

## 6. Objetivos

### 6.1 Objetivo general

Evaluar la bioaumentación con consorcios de bacterias productoras de biosurfactantes en la restauración de suelo contaminados por hidrocarburos mediante ensayos a escala de microcosmos, para determinar su efectividad y viabilidad en la mejora de la calidad del suelo y la reducción de la contaminación.

### 6.2 Objetivos específicos

- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del suelo contaminado con gasolina.
- Comparar el efecto de la bioaumentación de dos consorcios de bacterias productoras de biosurfactantes en la restauración del suelo contaminado con gasolina.
- Analizar la tasa de respiración microbiana del suelo contaminado con gasolina, bioaumentado con dos consorcios de bacterias productoras de biosurfactantes.
- Comparar la eficiencia de la restauración del suelo por bioaumentación, mediante el porcentaje de biodegradación de hidrocarburos.

## 7. Método

### 7.1 Muestreo del suelo contaminado por hidrocarburos

El suelo contaminado con hidrocarburos se recolectó de un sitio identificado previamente, que en enero de 2019 sufrió el derrame de gasolina producto de una toma clandestina (huachicoleo) de combustible en la localidad de San Antonio Detiña, municipio de Acambay, Estado de México. La toma fue localizada en el kilómetro 5 de la carretera a Temascalcingo, donde se originó un derrame de hidrocarburo hasta el kilómetro 4 ( $19^{\circ}57'24.8''N$ ,  $99^{\circ}52'57.0''W$ ) (González, 2019). En la **figura 10** se muestran fotos de como lucia el sitio durante el derrame en comparación con su apariencia actual.

Se realizaron recolecciones de suelo contaminado en diferentes puntos del sitio antes mencionado con excavaciones de hasta 30 cm de profundidad y 19 Kg se transportaron al laboratorio en botes de plástico de 20 L.



**Figura 10.** Fotografías del sitio contaminado siendo: **A)** Durante el derrame de gasolina en Acambay (El Sol de México, 2019) y **B)** Después del derrame con fecha del 6 de julio de 2022.

## *7.2 Preparación del suelo*

El suelo recolectado se secó a temperatura ambiente durante 7 días, posteriormente se tamizó a través de una malla de 2 mm. En este proceso se observó la presencia de diferentes tipos de insectos, esto es un posible indicio de que la cantidad de hidrocarburos presentes en el suelo ha disminuido hasta niveles tolerables para la vida del suelo, cabe resaltar que al momento de la preparación el suelo no presentaba olor a gasolina.

Con el fin de recrear condiciones similares a las del derrame original, se aumentó la cantidad de hidrocarburos totales. Para esto, se añadió 2 % del peso del suelo en gasolina, luego se homogenizó cuidadosamente y se usó tanto para el análisis químico microbiológico; esto basado en una modificación al procedimiento de la literatura (Andreolli et al., 2021).

## *7.3 Caracterización de las propiedades fisicoquímicas del suelo.*

### *7.3.1 Determinación del pH del suelo*

Se colocaron 10 g de suelo en un vaso de precipitado de 100 mL, se añadieron 20 mL de agua, lo cual dio una relación suelo/solución 1:2. Se agitó manualmente durante 1 minuto y se dejó reposar por 10 minutos. La operación se repitió dos veces.

Un potenciómetro se calibró con las soluciones amortiguadoras con pH de 4.0, 7.0 y 9.0 o 10.0. Una vez calibrado se agitó la suspensión del suelo antes de efectuar la lectura correspondiente de pH y se tomó la medición de la disolución de agua con suelo contaminado (Jackson, 1964).

### 7.3.2 Conductividad eléctrica

De acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000, se colocaron 10 g de suelo en un vaso de precipitado de polipropileno de 100 mL. Se añadieron 50 mL de agua. Se agitó la suspensión y se dejó reposar por 24 h. Se midió la conductividad eléctrica del sobrenadante y posteriormente se enjuagó el electrodo tres veces con agua destilada. La medición de la conductividad eléctrica se hizo un total de tres veces. Al final se tomó la temperatura de la solución y las lecturas se corrigieron por un factor de temperatura, en el cual por cada grado de aumento de la temperatura encima de 25 °C, el valor de la conductividad aumenta un 2 %.

### 7.3.3 Determinación de la textura del suelo

De acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000 Se pesaron 60 g de suelo en un vaso de precipitado de 500 mL y se agregaron 40 mL de agua oxigenada al 30%, después de la reacción la mezcla se puso a secar en una parrilla eléctrica. Se agregaron otros 40 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% y se observó la reacción. La muestra se puso a secar nuevamente y se repitió el proceso hasta que no hubo efervescencia por el agua oxigenada.

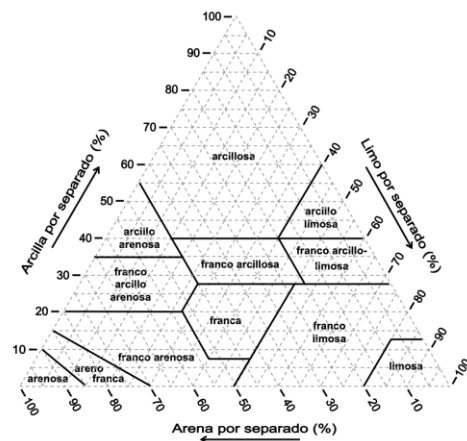
Después de eliminar la materia orgánica y llevar a sequedad el suelo, se pesaron 50 g de suelo en un vaso de precipitado de 250 mL para después agregar agua hasta que el líquido sobresalga 2 cm por encima del sedimento. A esta solución se añadieron 5 mL de oxalato de sodio y 5 mL de metasilicato de sodio y se dejó reposar durante 15 minutos.

Posteriormente se pasaron las muestras de los vasos de precipitado a copas de agitadores mecánicos, enjuagando con ayuda de una piseta. Se activaron los agitadores y se procedió a dispersar por cinco minutos. Al finalizar el tiempo de agitación, se bajó la copa del dispersor y se pasó el contenido a una probeta de 1000 mL, enjuagando la copa con ayuda de una piseta.

Se agregó agua destilada hasta completar un litro con el hidrómetro dentro de la suspensión. Se sacó el hidrómetro y se suspendió la solución, para ello se tapó la probeta con plástico para cocina y se agitó vigorosamente a mano durante un minuto. Se tomaron las lecturas del hidrómetro a los 40 segundos y después de 2 horas de terminada la dispersión con el agitador de mano.

Para hacer una lectura, se colocó el hidrómetro dentro de la probeta cuidando de alterar lo menos posible la suspensión y a los 20 segundos se hizo la determinación. Después de hacer la lectura el hidrómetro se secó, lavo, seco y se tomó la temperatura. Si por alguna razón al hacer la lectura se acumulaba espuma alrededor del hidrómetro, se agregaban unas gotas de alcohol etílico. Se corrigieron las lecturas del hidrómetro agregando 0.36 por cada grado centígrado arriba de 19.5°C restando la misma cantidad por cada grado abajo de dicha temperatura.

La lectura a los 40 segundos multiplicada por 2 es igual al porcentaje de arcilla más limo. Restando de 100 se obtiene el porcentaje de arena. La lectura obtenida a 2 horas multiplicadas por 2 es igual al porcentaje de arcilla. El porcentaje de limo se obtiene por diferencia. Cuando se usan 100 g no debe multiplicarse por 2 ya que el hidrómetro está calibrado en porcentajes considerando 100 g de suelo. Con los porcentajes de limo, arena y arcilla se determinó la textura correspondiente con el triángulo de texturas que se muestra en la **figura 11**.



**Figura 11.** Triángulo de clases texturales (Pellegrini, 2019).



#### 7.3.4 Análisis de la materia orgánica en el suelo

La determinación de materia orgánica del suelo (MOS) se evaluó a través del contenido de carbono orgánico con el método de Walkley y Black presente en la NOM-021-RECNAT-2000. Con este procedimiento se detecta entre un 70 y 84 % del carbón orgánico total por lo que es necesario introducir un factor de corrección, el cual puede variar entre suelo y suelo. En los suelos de México se recomienda utilizar el factor 1.298 (1/0.77).

Se disolvieron 48.82 g de  $K_2Cr_2O_7$  en agua destilada y se aforaron a 1000 mL en un matraz volumétrico. Para preparar el indicador de difenilamina se disolvió 0.5 g de difenilamina en 20 mL de agua y se añadieron 100 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Para realizar la determinación de la MOS se pesaron 0.5 g de suelo seco y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Se proceso un blanco con reactivos por triplicado. Se adicionaron exactamente 10 mL de dicromato de potasio 1 N girando el matraz cuidadosamente para que entrara en contacto con todo el suelo. Se agregaron cuidadosamente con una bureta 20 mL de  $H_2SO_4$  concentrado a la suspensión, se giró nuevamente el matraz y agitó de esa forma durante un minuto.

Se dejó reposar durante 30 minutos sobre una lámina de asbesto o sobre una mesa de madera. Se añadieron 200 mL de agua destilada y posterior a ello 5 mL de  $H_3PO_4$  concentrado. Se adicionaron de 5 gotas del indicador de difenilamina. Y finalmente se tituló con una disolución de sulfato ferroso 0.1N gota a gota hasta un punto final verde claro.

El cálculo para determinar la MOS fue el siguiente:

$$\% C \text{ orgánico} = \left( \frac{B - T}{g} \right) (N)(0.39)(m c f)$$

Donde:

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

T= Volumen de sulfato ferroso para valorar la muestra (mL)

N= Normalidad exacta del sulfato ferroso.

g= Peso de la muestra empleada (g)

mcf= Factor de corrección de humedad

$$\% \text{ Materia orgánica} = (\% \text{ C orgánico}) (1.724)$$

#### *7.4 Caracterización microbiológica del suelo*

Se cuantificó la densidad poblacional de Bacterias Heterótrofas Totales (BHT) por el método de cuenta viable, mediante diluciones seriadas. Se tomó 1 gramo de suelo, se mezcló con 9 mL de solución salina (0.85%) estéril, se agitó manualmente y se dejó reposar durante un minuto. De esta mezcla se recolectó 1 mL y se agregó a otros 9 mL de solución salina (0.85 %) estéril. Esta dilución es de  $10 E^{-1}$ .

De la dilución  $10 E^{-1}$  se tomó 1 mL y se incorporó a otros 9 mL de agua destilada estéril. La nueva dilución es de  $10 E^{-2}$ . Este proceso se repitió de manera consecutiva hasta llegar a la dilución  $10 E^{-5}$ . De las diluciones se tomaron 100 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) que fueron colocados en placas de Agar Nutritivo. Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, posterior a este tiempo se procedió a contar las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/g) (Espinoza & León, 2014).

#### *7.5 Construcción de consorcios bacterianos para bioaumentar*

##### *7.5.1 Reactivación de cepario de bacterias productoras de biosurfactantes*

Se reactivó un cepario constituido por siete tipos diferentes de bacterias que producen biosurfactantes que fueron aisladas de sitios contaminados en Chiapas,

sembrándolo en placas de Agar Nutritivo (AN) a 28°C por 24 horas. Las cepas no están identificadas, pero cuentan con las siguientes denominaciones: 2, 3, 4, 697, 2214, 27853 y G101. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 anteriormente se había informado que produce ramnolípidos. (Somoza et al., 2020).

### 7.5.2 Confirmación de producción de biosurfactantes y crecimiento con hidrocarburos como fuente principal de carbono

Para confirmar la producción de biosurfactantes, el cepario se sembró en placas con un Medio de Sales Minerales más Azul de Metileno (MSM+AM) con glicerol al 2 %. El MSM+AM consta, por litro, de: 0.7 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g de  $\text{NaNO}_3$ , 0.9 g de  $\text{NaHPO}_4$ , 0.2 g de  $\text{CaCl}_2$ , 0.4 g de  $\text{MgSO}_4$ , 15 g de agar bacteriológico, 0.03 g de azul de metileno y glicerol al 2% (v/v). Las bacterias se incubaron a 28°C por 5 días. La presencia de halos blanquecinos alrededor de las colonias confirma la producción de biosurfactantes (Yañez et al., 2017).

También se comprobó si las bacterias son capaces de crecer con hidrocarburos. Para ello el cepario se sembró en placas de Agar Bushnell-Haas (BH), en este medio la única fuente de carbono son hidrocarburos, de manera que la capacidad degradadora se demuestra si son capaces de crecer en el medio. El medio BH consta, por 1 L de: 15 de agar, 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 g de  $\text{FeCl}_3$ , 0.02 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 2 % de gasolina (Atlas, 2010). La bacterias se incubaron a 37°C de 2 a 4 días (Bagga et al., 2015).

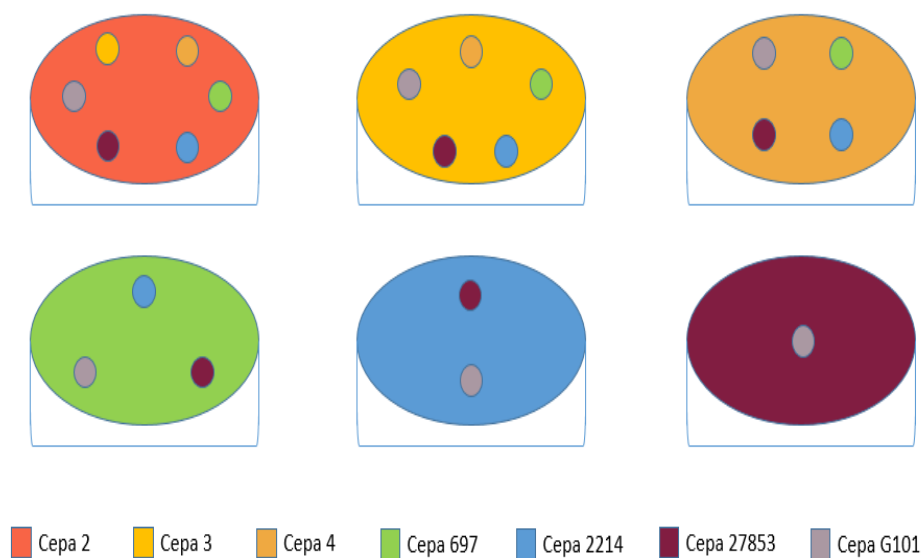
### 7.5.3 Prueba de biocompatibilidad del consorcio bacteriano

El suelo contaminado con hidrocarburos es un ambiente que estresa a las bacterias y limita su crecimiento. Por esta razón el diseño de los consorcios bacterianos toma en cuenta que no exista antagonismo entre las cepas seleccionadas para evitar más factores que limiten el crecimiento de las bacterias y por ende la restauración del suelo.

Para comprobar qué cepas tienen compatibilidad entre sí, se realizó prueba de biocompatibilidad. Para lo cual, se sembró de manera individual cada una de las cepas en AN, inoculando 0.1 mL a una densidad poblacional de  $1 \times 10^8$  UFC/mL; extendiéndola masivamente sobre la superficie del medio.

A cada cepa sembrada masivamente se le añadieron discos de 5 mm de papel filtro inoculados a densidades poblacionales de  $1 \times 10^8$  UFC/mL de cada una de las demás cepas a evaluar. Estos se dispusieron de manera que se evalúan todas las posibles combinaciones de cepas, tal como se observa en la **figura 12**. Es importante mencionar que si una combinación de cepas ya fue evaluada anteriormente en una caja de Petri (por ejemplo, la cepa 2 sembrada masivamente con la cepa 3 en el disco), cuando se evalúe la cepa 3 sembrada masivamente, la cepa 2 no se colocará en el disco porque esta combinación ya fue evaluada previamente.

Los medios se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  durante 48 horas hasta observar crecimiento o halos de inhibición. La actividad inhibitoria se obtuvo observando la presencia de halos de inhibición (Moreno, 2017). Con los resultados de esta prueba se seleccionaron consorcios bacterianos altamente compatibles entre sí los cuales forman al Consorcio 1 y Consorcio 2.



**Figura 12.** Representación del modelo seguido en la prueba de biocompatibilidad.

#### 7.5.4 Producción de inóculo para la bioaumentación

La producción del inóculo con las bacterias degradadoras de hidrocarburos seleccionadas se realizó sembrando las cepas seleccionadas para los consorcios en Caldo Nutritivo (CN) a una temperatura de 28°C durante 48 horas.

Posterior a ello se centrifugó el medio a 2500 rpm por 25 minutos. El medio se retiró y el inóculo bacteriano único se preparó suspendiendo los sedimentos celulares en solución salina (NaCl 0.85%) hasta que alcanzo una densidad óptica de 0,5 ( $A_{600}$ ), equivalente a  $1 \times 10^8$  bacterias por mL. (Morales et al., 2017).

Los microcosmos fueron inoculados con  $1 \times 10^8$  UFC por gramo de suelo seco, esto de cada componente bacteriano (Rodríguez et al., 2021). Y se monitoreo durante 90 días.

#### 7.6 *Ensayo de bioaumentación en microcosmos*

Un microcosmos es un ecosistema miniaturizado, estos ofrecen la ventaja de permitir investigar en condiciones controladas los efectos de las presiones selectivas, como la aparición de agentes xenobióticos, en las comunidades microbianas naturales (Grenni et al., 2012).

Para este proyecto, se realizaron ensayos experimentales a nivel de microcosmos utilizando frascos herméticos de 3 L, a los cuales se les depositaron 1.5 kg de suelo adicionado con 2 % del peso del suelo en gasolina y se almacenaron en condiciones ambientales. Los ensayos consistieron en tres tratamientos por triplicado como se describen a continuación:

- **Control (C):** Suelo contaminado (sin bioaumentación).

- **Tratamiento 1 (SCB1):** Suelo contaminado + bioaumentación del consorcio 1.
  
- **Tratamiento 2 (SCB2):** Suelo contaminado + bioaumentación del consorcio 2.

#### 7.6.1 Monitoreo de la densidad poblacional de Bacterias Heterótrofas

##### Totales durante la bioaumentación

Para cada tratamiento se tomaron 0.33 g de suelo de cada repetición para hacer una muestra compuesta de aproximadamente 1 gramo, estos se homogenizaron y la mezcla resultante se mezcló con 9 ml de solución salina (NaCl 0.85%) estéril, se agito vigorosamente y dejó reposar durante un minuto. A partir de aquí se realizó el proceso de cuenta viable tal como se menciona en el apartado 6.3.

Para cuantificar las Bacterias Heterótrofas Totales (BHT) las alícuotas fueron inoculadas en AN y se incubaron a 37 °C de 24 a 48 horas (Giles et al., 2009). Transcurrido este tiempo desde el momento del cultivo, se procedió a contar cada célula viva en los medios seleccionados y esto se realizó a los 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 54, 70 y 90 días.

#### 7.6.2 Respiración del suelo

La tasa de respiración del suelo se determinó los días de incubación 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 21, 25, 30, 47, 59 y 90 (Zhu et al., 2015). Debido a la cantidad de suelo contenida en cada microcosmos, la tasa de CO<sub>2</sub> emitida carbonataba la solución de NaOH (0.1N) de la técnica tradicional, por lo que no podía ser valorada en la titulación de este proceso. Por este motivo se ha realizado un procedimiento modificado.

Los días que se realizó la prueba, se instaló un sistema de captura de CO<sub>2</sub> para cada microcosmos, el cual consta de un vaso de plástico con 10 mL de NaOH 0.5 N, los cuales se depositaban en los microcosmos cerrados durante 30 minutos (Silva et al., 2009). También se prepararon 2 blancos, es decir 2 recipientes de cristal con cierre hermético que contienen en su fondo 25 mL de agua destilada y un vial con 10 mL de NaOH 0.5 N.

Para determinar el CO<sub>2</sub> desprendido, se valoró por duplicado el NaOH de cada repetición con HCl 0.5N. Para esto se colocan en otros vasos de plástico 20 mL de agua a los cuales se les agregaron alícuotas de 2 mL de los viales de NaOH procedentes de la incubación de cada una de las muestras y de los blancos.

Se añadió 1 mL de BaCl<sub>2</sub> al 20%, el cual facilita la precipitación de los carbonatos y se tiñeron con dos gotas de fenolftaleína. La solución resultante es valorada con HCl, que debe ser añadido lentamente para evitar una posible dilución de BaCO<sub>3</sub> precipitado (Alef & Nannipieri, 1995). Para este experimento en específico el cálculo de la respiración del suelo viene dado por:

$$\text{Mg CO}_2 / 1000 \text{ g ss} = (B-M) \cdot N \cdot 22 (10/2) \cdot (1000/1500(ss/sh))$$

Donde:

B = valor medio del volumen de la solución de HCl gastado por los blancos.

M = valor medio del volumen de la solución de HCl gastadas por las muestras.

N = normalidad del HCl utilizado para valorar.

ss = suelo seco

sh = suelo húmedo

### *7.7 Análisis estadístico*

Se obtuvo la correlación y el modelo de regresión lineal simple para la concentración acumulada del CO<sub>2</sub> emitido durante la bioaumentación y mediante una prueba de comparación de pendientes se contrastó si existen diferencias significativas en el gráfico del flujo de CO<sub>2</sub> entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ). El análisis estadístico se realizó con STATGRAPHICS Centurion XVI.



## 8. Resultados y discusión

### 8.1 Caracterización fisicoquímica del suelo

De acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000 la muestra de suelo obtenida debe ser moderadamente ácida, moderadamente salina, con un contenido alto de materia orgánica y de textura franco, los valores exactos de cada propiedad se encuentran en la **Tabla 9**.

El suelo con un pH de 6.5 está considerado como moderadamente ácido. Se ha observado que la presencia de hidrocarburos en el suelo genera acidez (Obire & Nwaubeta, 2002). Cabe destacar que este valor de pH del suelo se encuentra dentro del rango considerado óptimo para la biodegradación de hidrocarburos en el suelo, ya que el rango es de 5 a 7.8 (Kumar et al., 2018).

Cuando el pH está fuera del umbral óptimo para el crecimiento bacteriano, se observa una inhibición en la proliferación celular, acompañada de una disminución en su capacidad metabólica. Que el pH este dentro del umbral óptimo es importante para la biorremediación, dado que el pH ejerce influencia sobre factores críticos como la disponibilidad de carbono y nutrientes, así como la solubilidad de metales pesados (Mousavi et al., 2018).

A su vez, el utilizado en el estudio se clasifica como moderadamente salino, lo cual se considera como beneficioso para la biorremediación. Esto porque las sales aumentan el potencial osmótico del agua en el suelo. Sin embargo, si la salinidad es excesiva, puede resultar en la extracción de agua de las células, lo que lleva a la muerte de los microorganismos debido a la plasmólisis (Yan et al., 2015). Por otro lado, un bajo potencial osmótico dificulta que los microorganismos extraigan agua del suelo, y se ha observado que una salinidad extremadamente baja también reduce significativamente la biodegradación (Qin et al., 2012).

La contaminación por hidrocarburos también puede contribuir a la salinidad del suelo, ya que algunos productos químicos presentes en los hidrocarburos pueden afectar la composición iónica del suelo y aumentar la salinidad, lo que puede resultar en cambios a la eficiencia de biodegradación (Qin et al., 2012)

Por su parte, un alto contenido de materia orgánica es beneficioso para la fertilidad del suelo, ya que contribuye a la retención de humedad, mejora la estructura del suelo y suministra nutrientes a las plantas. Se ha reportado que mientras más elevado sea el contenidos de materia orgánica en el suelo, mayor es la eficiencia en la biodegradación (Chen et al., 2020).

La textura franco indica una mezcla equilibrada de arena, limo y arcilla en el suelo, los porcentajes de cada tamaño de partícula se muestran en la **Tabla 10**. Esta textura es considerada ideal en muchos casos, ya que ofrece una serie de ventajas en términos de retención de agua, permeabilidad, capacidad de aireación y facilidad para el crecimiento de las raíces. Sin embargo, la contaminación por hidrocarburos puede alterar la estructura del suelo, causando la formación de aglomerados, reduciendo la permeabilidad y aireación del suelo, reduciendo la capacidad de la respiración de los microorganismos (Abdel et al., 2012).

**Tabla 9.** Características fisicoquímicas del suelo.

<b>Parámetro</b>	<b>Valor obtenido</b>	<b>Clasificación de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000</b>
pH	6.5	Moderadamente ácido
Conductividad eléctrica (dS/cm)	307	Moderadamente salino
Materia Orgánica (%)	4.2	Porcentaje alto
Textura	Franco	Franco

**Tabla 10.** Granulometría para la textura del suelo.

Tipo de partícula	Porcentaje (%)
Arena	40
Limo	35
Arcilla	25

Por su parte, la densidad poblacional de UFC por gramo de suelo es igual a  $3.4 \times 10^5$  o  $5.5 \text{ Log}_{10}$ . Esto puede considerarse una concentración relativamente baja ya que aunque el número de microorganismos varía entre diferentes tipos y condiciones de suelos. Un número menor a  $10^6$  por gramo indica una salud del suelo deficiente (Ratnakar, 2018).

Las poblaciones bacterianas presentes en el suelo antes de bioaumentar se pueden atribuir a la capacidad de ciertas bacterias para resistir y adaptarse a altos niveles de contaminación. Estudios han demostrado que los contaminantes inducen la selectividad de algunos organismos capaces de utilizar nuevos sustratos, aunque algunos componentes tóxicos, como los hidrocarburos del petróleo, pueden inhibir el crecimiento de ciertos grupos microbianos, lo que explicaría la disminución en la cantidad de microorganismos presentes en el suelo (Morales et al., 2017).

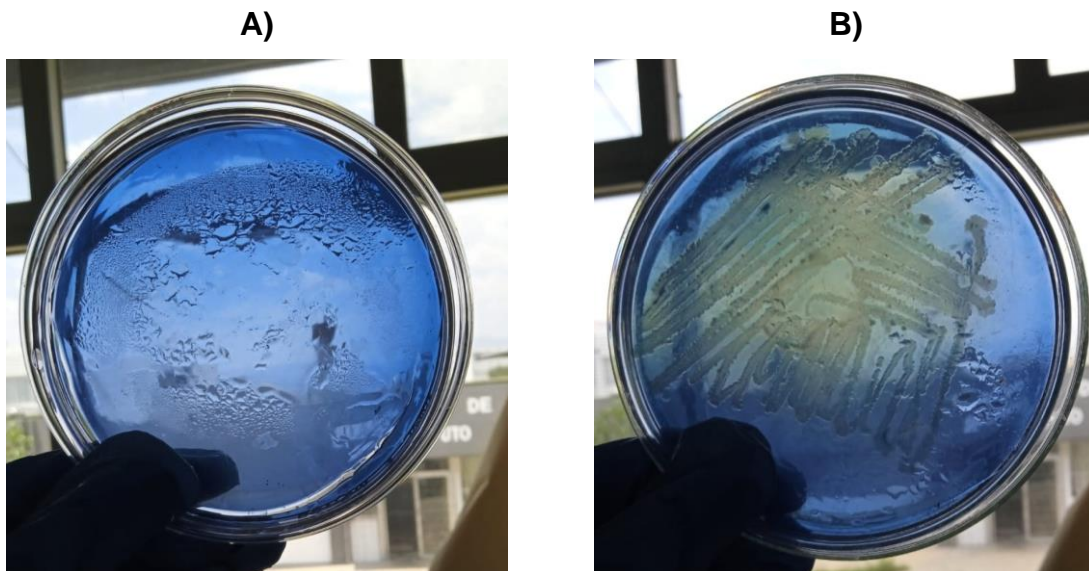
### *8.2 Establecimiento de los consorcios bacterianos*

Un consorcio se puede definir como una mezcla de diversos microorganismos capaces de utilizar hidrocarburos. Ningún microorganismo por sí solo puede degradar varios tipos de hidrocarburos. Por lo tanto, diferentes especies de microorganismos son esenciales en los procesos de biorremediación, pues cada especie cuenta con sus enzimas proteicas y rutas metabólicas específicas para la degradación de ciertos tipos de hidrocarburos (Sihag et al., 2014).

Un factor clave para un proceso de biorremediación por bioaumentación efectivo es la selección adecuada de microorganismos, para ello se realizan pruebas a las cepas bacterianas evaluando la capacidad que tienen para degradar hidrocarburos de manera aislada y en conjunto con otras especies bacterianas (Rodríguez et al., 2019).

La primer prueba realizada al cepario original fue la confirmación de la producción de biosurfactantes. El experimento resultó positivo para las 7 cepas, presentando una apariencia similar a lo mostrado en la **figura 13** donde la caja Petri inoculada muestra halos blanquecinos alrededor de las colonias como muestra de la producción de biosurfactantes.

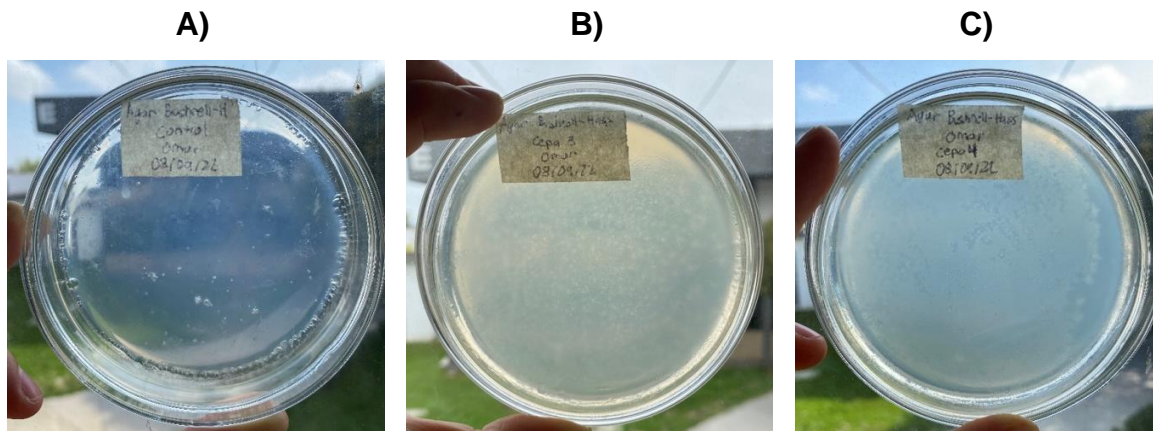
Esto es importante ya que el derrame de hidrocarburos causa una contaminación ambiental alarmante, que exige un rendimiento elevado de degradación de los microorganismos para la remediación microbiana exitosa de estos contaminantes tóxicos. El empleo de bacterias productores de biosurfactantes mejora la efectividad de la biorremediación, ya que el biosurfactante juega un papel clave al hacer que los hidrocarburos sean biodisponibles para la degradación (Patowary et al., 2017).



**Figura 13.** Comparacion de MSM + AM entre: A) Control; B) Inoculado con bacterias productoras de biosurfactantes.

Dado que todas las cepas produjeron biosurfactantes, el cepario entero se sembró en medio BH. De igual manera todas las bacterias que fueron sembradas en este medio selectivo crecieron, lo que significa que tienen la capacidad de sobrevivir con hidrocarburos como única fuente de carbono y por ende tienen la capacidad de degradarlos.

En la **figura 14** se evidencia de la capacidad de degradación de hidrocarburos por parte de las bacterias, en esta también se resalta que no todas las cepas crecieron con la misma densidad poblacional.



**Figura 14.** Comparación del medio BH entre: A) Control; B) Inoculado con la cepa 3; C) Inoculado con la cepa 4.

Es bien conocido que una sola cepa bacteriana no es capaz de degradar toda la fracción de hidrocarburos del petróleo. De hecho, la mayoría de las bacterias solo pueden degradar o utilizar de manera efectiva ciertos componentes de hidrocarburos de petróleo, mientras que otros no están disponibles en absoluto.

Esto se puede atribuir al hecho de que diferentes bacterias autóctonas tienen diferentes enzimas catalíticas; por lo tanto, sus roles en sitios contaminados con petróleo también varían ampliamente. Esto también implica que la remediación de

la contaminación por hidrocarburos de petróleo requiere la acción conjunta de múltiples bacterias funcionales para lograr el mejor efecto de restauración ambiental (Xu et al., 2018).

El suelo contaminado con hidrocarburos es un ambiente estresante incluso para las bacterias que son capaces de degradar estos compuestos. Por ello, para el establecimiento de los consorcios es importante considerar que las bacterias no presenten bio-incompatibilidad (actividad antagónica) (Rodriguez et al., 2019).

Los resultados de la prueba de compatibilidad se muestran en la **tabla 10**. En esta tabla las “√” representan compatibilidad entre ambas cepas, ya que se observa el crecimiento de la cepa del disco sobre la sembrada masivamente sin inhibirla. Mientras que las “X” representan antagonismo representado por halos de inhibición. En ambos casos un doble símbolo representa una interacción clara (fuerte), mientras que solo uno representa una actividad no tan marcada (débil).

Por su parte los “?” indican que la cepa inoculada en los discos de papel filtro no creció y por ende parece que no existe actividad. Se infiere que este efecto puede ser el resultado de inhibición por parte de la cepa inoculada masivamente hacia la que se encontraba en el disco.

**Tabla 10.** Resultados de la prueba de compatibilidad.

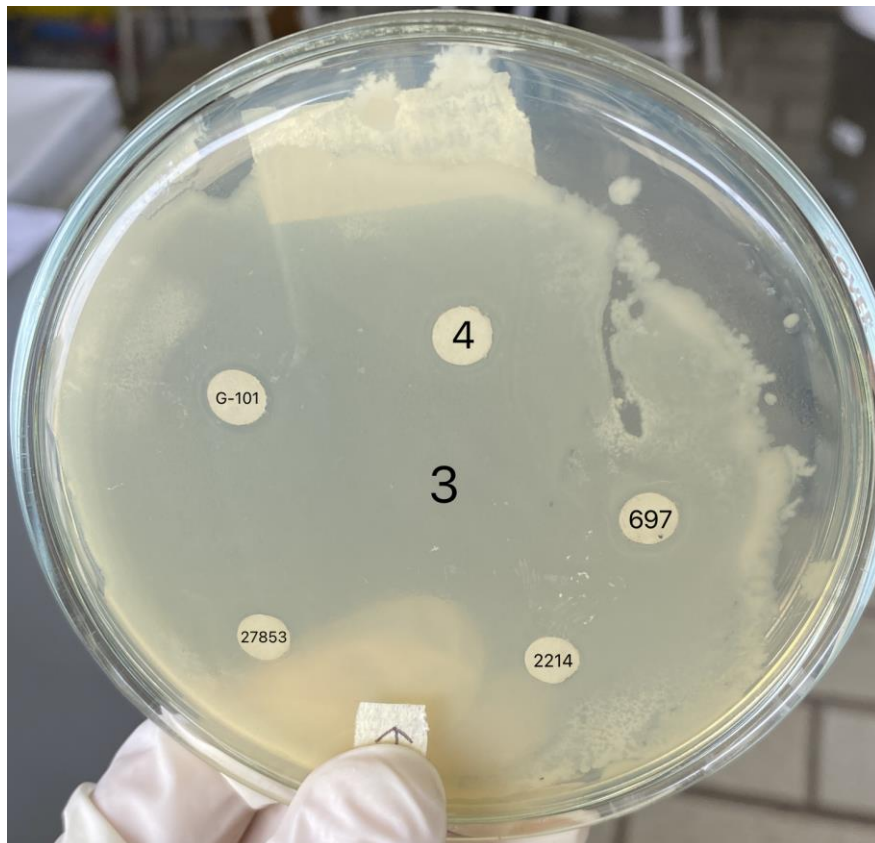
		Cepas inoculadas masivamente						
		2	3	4	697	2214	27853	G101
Cepas inoculadas en discos	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	XX	-	-	-	-	-	-
	4	√√	√√	-	-	-	-	-
	697	X	XX	X	-	-	-	-
	2214	?	?	XX	XX	-	-	-
	27853	√	X	√	?	?	-	-
	G101	X	XX	X	XX	√√	XX	-

Los resultados de la tabla 10 pueden entenderse mejor si se comparan con la **figura 15**. En esta se puede observar las relaciones de antagonismo con presencia de halos de inhibición (como en el caso de la pareja 3: G-101) y compatibilidad con el crecimiento de la cepa del disco sin inhibir a la cepa inoculada masivamente (como en el caso de la pareja 2214: G-101), lo que sugiere un efecto sinérgico entre estas (Pérez et al., 2014).

Con los resultados obtenidos se propone que dada la compatibilidad de las cepas y la cantidad de biomasa generada al momento de sembrar en agar BH, los consorcios bacterianos a bioaumentar fueron:

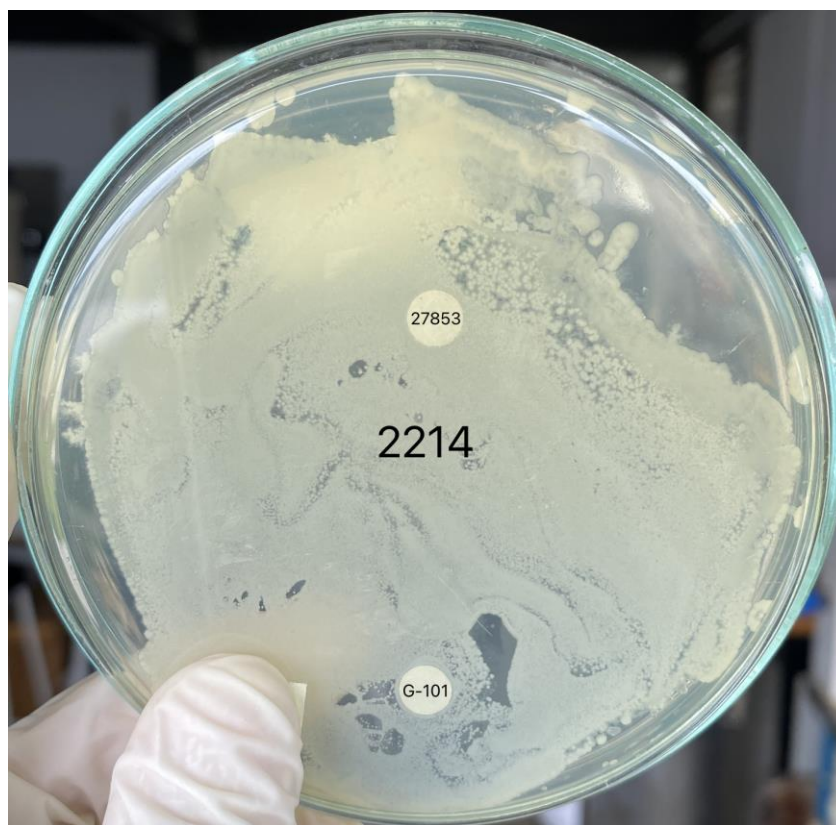
- **Consortio 1 (SCB1):** Cepa 3 y Cepa 4.
- **Consortio 2 (SCB2):** Cepa G101 y Cepa 2214.

A)





B)



**Figura 15.** Resultados de la prueba de biocompatibilidad que presentan los grupos de las cepas escogidas (cada número identifica a la cepa inoculada). **A)** Muestra la interacción entre la Cepa 3 y la Cepa 4, y **B)** Ilustra la interacción entre la Cepa G101 y la Cepa 2214.

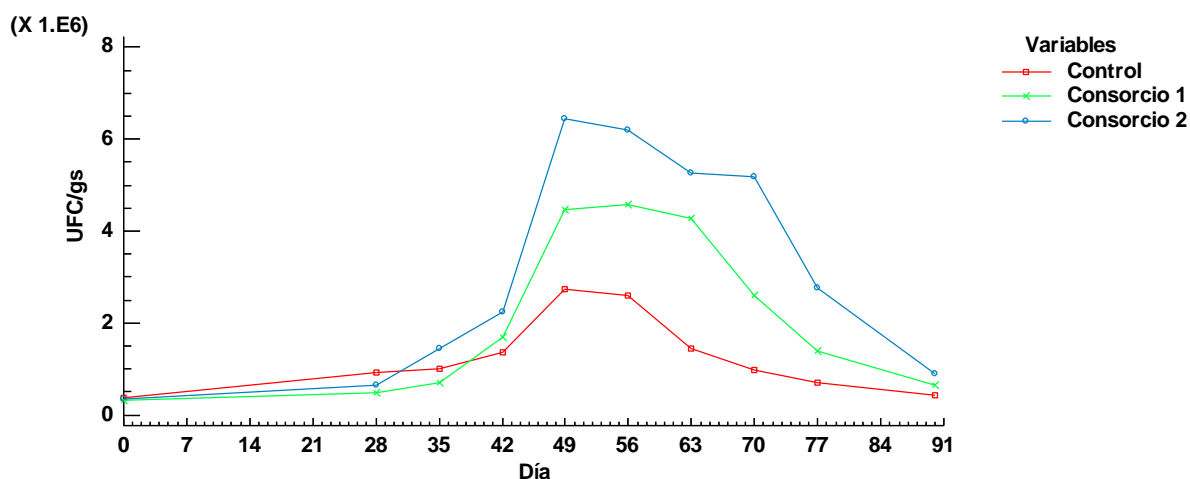
### *8.3 Desarrollo de la bioaumentación*

#### *8.3.1 Comportamiento de la densidad poblacional de bacterias*

La cuenta viable proporciona una referencia aproximada de la densidad poblacional microbiana presente en el suelo tratado, lo que permite monitorear y comprender la respuesta de los microorganismos al tratamiento con bioaumentación. Los datos ofrecen información valiosa sobre la capacidad de los microorganismos para crecer y degradar los contaminantes. Una alta densidad poblacional ( $10^9$  UFC/g) se traduciría en una mayor actividad microbiana y un aumento en su biomasa, factores cruciales para la efectiva degradación de los hidrocarburos (Ławniczak et al., 2020).



En la **figura 16** se puede observar que las UFC por gramo de suelo (UFC/g) en el tiempo inicial tuvieron valores similares en los tres tratamientos, con un promedio igual a  $3.4 \times 10^5$  UFC/g o  $5.5 \text{ Log}_{10}$  UFC/g. Este resultado puede considerarse una concentración relativamente baja de acuerdo con Ratnakar (2018).



**Figura 16.** Comportamiento de la densidad poblacional microbiana durante el tratamiento de suelos contaminados por bioaumentación en microcosmos.

En la primera medición de las UFC (día 28), los microcosmos sin bioaumentación (tratamiento control), incrementaron su densidad poblacional de bacterias 2.5 veces, mientras que las UFC de los microcosmos inoculados con el consorcio 1 (SCB1) aumentaron 1.45 veces y con el consorcio 2 (SCB2), 1.87 veces.

El valor máximo de la densidad poblacional de bacterias se observó en el día 49 para los microcosmos control (C) y aquellos bioaumentados con el consorcio 2 (SCB2). Mientras que los microcosmos inoculados con el consorcio 1 (SCB1) obtuvieron este valor máximo en el día 56.

Los microcosmos control presentaron un incremento de 7 veces las UFC/gs iniciales; los bioaumentados con el consorcio 1, presentaron un aumento de 14.1 veces las UFC/gs; mientras que los inoculados con el consorcio 2, tuvieron un aumento en la de la densidad poblacional de 19.1 veces las UFC/gs iniciales.

Después de haberse registrado la mayor densidad poblacional de bacterias de cada tratamiento, en las semanas posteriores comenzó un descenso en la densidad poblacional de bacterias. Esto corresponde a una aparente fase de muerte celular que duró hasta el final del monitoreo.

Se ha comprobado que los microorganismos que pueden sobrevivir y prosperar utilizando hidrocarburos como su única fuente de carbono y energía, han evolucionado como respuesta a la introducción de dichos contaminantes en el medio ambiente (Shahi et al., 2016). Las bacterias nativas de la muestra de suelo cumplen con estas características pues sobrevivieron y prosperaron usando hidrocarburos como fuente de energía debido al derrame sucedido en 2019.

En los microcosmos control las bacterias nativas no presentan competencia con las bacterias bioaumentadas. Esto sumado a su previa adaptación a las condiciones de contaminación, pudo dar como resultado una mayor facilidad al utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono para las bacterias nativas. De manera que las UFC/gs de los microcosmos control aumentaron en mayor medida durante los primeros 28 días (Kebede et al., 2021).

No obstante, el efecto de la bioaumentación es notable en los días posteriores. Debido a que el valor máximo de las UFC en microcosmos bioaumentados (SCB1 y SCB2), superaron por al menos el doble la densidad poblacional máxima de los los microcosmos control. Esto porque la bioaumentación es una estrategia de biorremediación que suministra una microbiota exogena, la cual incrementa la abundancia de microorganismos que pueden eliminar el contaminante (Pérez et al., 2017).

Por su parte, la disminución de la densidad poblacional al paso del tiempo en un proceso de bioaumentación se ha reportado con anterioridad (Pepper et al., 2002). Se ha observado que mientras más contaminado esté un suelo con hidrocarburos tiende a haber un mayor descenso en el recuento de bacterias (Mrozik et al., 2011).

Otro factor que influye en la disminución de las UFC bioaumentadas es la falta de nutrientes (Zhang et al., 2019). Pues cuando se produce un derrame sustancial de hidrocarburos, hay un fuerte aumento en el suministro de carbono; sin embargo, la disponibilidad de fósforo y nitrógeno se convierte en un factor limitante para la degradación de los hidrocarburos y la proliferación de microorganismos (Sah et al., 2022).

Esta reducción observada en la densidad poblacional de bacterias por gramo de suelo a lo largo del tiempo enfatiza la influencia de factores ambientales en la dinámica de poblacional de las bacterias (Nedaa et al., 2022).

Es importante destacar que el número de microorganismos presentes en el suelo en todos los tratamientos estuvo de inicio a fin en el rango de  $10^4$  a  $10^7$  UFC por gramo de suelo. Estas cifras permiten lograr un proceso exitoso de biodegradación, pues para ello, la densidad poblacional de bacterias no debería ser inferior a  $10^3$  por gramo de suelo (Kumar et al., 2018).

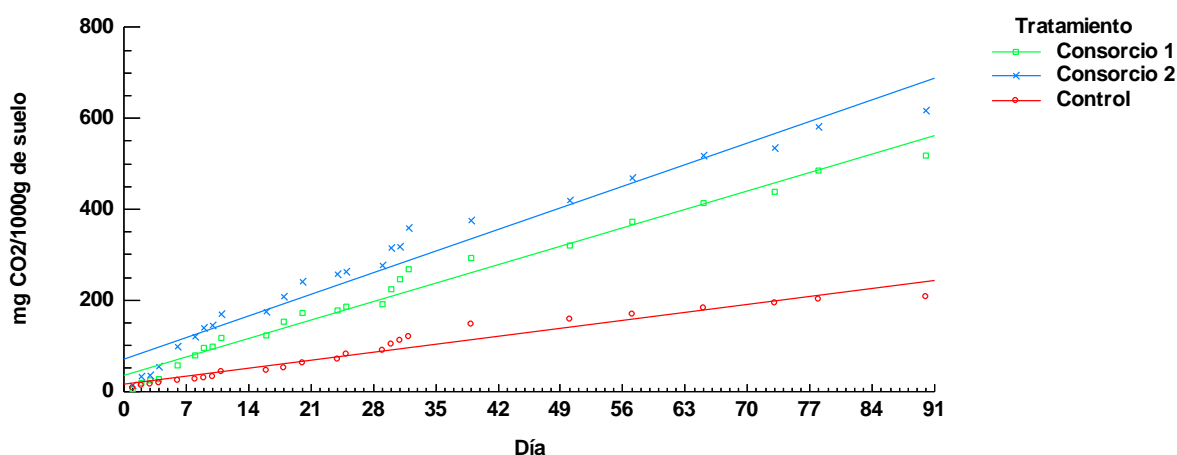
Para mantener la densidad bacteriana en niveles que favorezcan un proceso de biodegradación eficiente y sostenido, se puede realizar la combinación de bioaumentación con bioestimulación (Wu et al., 2016). La bioestimulación es la adición de nutrientes específicos que activan las poblaciones de bacterias autóctonas biodegradadoras; en conjunto a la bioaumentación se ha reportado que tiene una degradación más efectiva en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en comparación a la bioaumentación por si sola (Suja et al., 2014).

### 8.3.2 Comportamiento de la actividad respiratoria del suelo

La respiración del suelo implica la liberación de dióxido de carbono desde el suelo hacia la atmósfera e involucra procesos como la actividad microbiana, la respiración de la fauna subterránea y la de las raíces de las plantas (Hursh et al., 2017).

En consecuencia, este fenómeno se ha empleado de manera extendida para comprender la respuesta microbiana ante la contaminación del suelo y para vigilar la descomposición de contaminantes (Sutton et al., 2013). En este trabajo, la cantidad de CO<sub>2</sub> emitida a lo largo de la bioaumentación puede observarse en la **figura 17**.

Se encontró que el CO<sub>2</sub> emitido acumulado en el tiempo se ajusta a un modelo de regresión lineal en todos los tratamientos. La R para el modelo de regresión lineal del control fue de 0.9524, la del consorcio 1 de 0.9517 mientras que la del consorcio 2 fue de 0.9746. Debido a que existe una correlación de al menos 95%, en todos modelos de regresión lineal se pueden considerar estadísticamente significativos.



**Figura 17.** Gráfica del modelo ajustado del CO<sub>2</sub> acumulado, emitido en la bioaumentación.

Se comparó con análisis de varianza la pendiente de las líneas de regresión del CO<sub>2</sub> emitido acumulado durante la bioaumentación. Se observó que existen diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de las líneas de regresión de los distintos tratamientos ( $P < 0.01$ ). Esto indica que la actividad metabólica de las bacterias y por ende la producción de CO<sub>2</sub> es diferente entre los tratamientos.

La respiración microbiana es un índice que refleja la utilización de hidrocarburos por parte de los microorganismos (Zhang et al., 2019). Se ha demostrado que existe una relación proporcional entre la degradación de los hidrocarburos totales y la producción de CO<sub>2</sub>, esto debido al metabolismo aerobico de estos compuestos (Chen et al., 2020).

A su vez, se ha observado que una mayor tasa de respiración del suelo se asocia a mayores porcentajes de degradación de hidrocarburos (Zhu et al., 2015). Y debido a que existen diferencias estadísticamente significativamente en la cantidad de CO<sub>2</sub> emitido acumulado entre los tratamientos, se infiere que también existen diferencias significativas en el porcentaje de hidrocarburos degradados.

De acuerdo con lo anterior, el consorcio 2 (SCB2) parece ser el más eficaz en la degradación de hidrocarburos, seguido del consorcio 1 (SCB1) mientras que los microcosmos control presentarían los menores porcentajes de degradación de hidrocarburos.

Cabe resaltar que Diplock et al., (2009) en experimentos de microcosmos, reportaron que tasas de respiración superiores a 0,1 mg de CO<sub>2</sub>/g de suelo/día son necesarias para garantizar la biorremediación en el campo. Esta cifra fue superada en todos los tratamientos, de manera que la bioaumentación en campo podría ser viable.

## 9. Conclusión

La bioaumentación de bacterias productoras de biosurfactantes tuvo un efecto observable en el incremento de la densidad poblacional de bacterias en comparación a los microcosmos control.

La actividad microbiana del suelo tuvo un incremento estadísticamente significativo en los microcosmos bioaumentados. Esto se registró como mayores emisiones de CO<sub>2</sub> en la respiración del suelo.

Los experimentos a escala de microcosmos permitieron un entorno controlado que contribuyó en la estandarización de la degradación de hidrocarburos mediante bioaumentación.

## 10. Referencias

- Abdel, T., Mohamed, R. S. A., El-Sayed, E., Mohammed Aly, S., & Snousy, M. G. (2012). Effect of Soil Texture on Remediation of Hydrocarbons-Contaminated Soil at El-Minia District, Upper Egypt. *International Scholarly Research Notices*, 2012, e406598. <https://doi.org/10.5402/2012/406598>
- Alef, K., & Nannipieri, P. (1995). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* (1.<sup>a</sup> ed.).
- Al-Hawash, A. B., Dragh, M. A., Li, S., Alhujaily, A., Abbood, H. A., Zhang, X., & Ma, F. (2018). Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(2), 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>
- Alin, I., Prisecaru, M., Stoica, I., Calin, M., & Cristea, T. (2016). Biological remediation of soil polluted with oil products: An overview of available technologies. *STUDII SI CERCETARI STIINTIFICE UNIVERSITATEA BACAU SERIA BIOLOGIE*, 101.
- Amosu, M., Nation, N., & Smith, M. A. (2015). Aliphatic Hydrocarbons. En *Hamilton & Hardy's Industrial Toxicology* (pp. 401-418). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118834015.ch53>
- Amruta, P. (2023). *Bioaugmentation—In-situ Bioremediation Technique—Environment Notes*. Prepp. <https://prepp.in/news/e-492-bioaugmentation-in-situ-bioremediation-technique-environment-notes>
- Andreolli, M., Lampis, S., Brignoli, P., & Vallini, G. (2021). Mesocosm-based simulations to optimize a bioremediation strategy for the effective restoration of wildfire-impacted soils contaminated with high-molecular-weight hydrocarbons. *Journal of Applied Microbiology*, 131(3), 1249-1260. <https://doi.org/10.1111/jam.15018>
- Ángeles, M.-T., & Refugio, R.-V. (2013). In situ biosurfactant production and hydrocarbon removal by *Pseudomonas putida* CB-100 in bioaugmented and biostimulated oil-contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 595-605. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200040>

- Antonioli, R., Poloni, J. de F., Pinto, É. S. M., & Dorn, M. (2022). Interdisciplinary Overview of Lipopeptide and Protein-Containing Biosurfactants. *Genes*, 14(1), 76. <https://doi.org/10.3390/genes14010076>
- Atlas, R. M. (2010). *Handbook of Microbiological Media* (4.<sup>a</sup> ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/EBK1439804063>
- Azhar, Y. K., Sushama, T., Zeenat, I., Farhan, J. A., & Roop, K. K. (2006). Multiple Emulsions: An Overview. *Current Drug Delivery*, 3(4), 429-443.
- Bagga, J., Pandey, M., & Pandey, V. (2015). *Isolation, Characterization and Identification of Three Petroleum Tolerant and Degrading Bacteria (Micrococcus, Staphylococcus and Pseudomonas Spp.) From Petroleum Oil Contaminated Soil*. 4.
- Bautista, J. A. (2021). *Composteo bioaumentado con bacterias de la larva Tenebrio molitor para el tratamiento de un suelo contaminado con hidrocarburos*. <https://doi.org/10.24275/uama.6734.8739>
- Becerra, L., & Horna, M. (2016). Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*, 7(1), 23-31. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.01.03>
- Bian, X.-Y., Maurice Mbadinga, S., Liu, Y.-F., Yang, S.-Z., Liu, J.-F., Ye, R.-Q., Gu, J.-D., & Mu, B.-Z. (2015). Insights into the Anaerobic Biodegradation Pathway of n-Alkanes in Oil Reservoirs by Detection of Signature Metabolites. *Scientific Reports*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep09801>
- Blum, W. E. H. (2005). Functions of Soil for Society and the Environment. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 4(3), 75-79. <https://doi.org/10.1007/s11157-005-2236-x>
- Blum, W. E. H., & Swaran, H. (2006). *Soils for Sustaining Global Food Production*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.2004.tb15490.x>
- Blum, W. E. H., Warkentin, B. P., & Frossard, E. (2006). Soil, human society and the environment. *Geological Society, London, Special Publications*, 266(1), 1-8. <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.2006.266.01.01>
- Bolden, A. L., Kwiatkowski, C. F., & Colborn, T. (2015). New Look at BTEX: Are



Ambient Levels a Problem? *Environmental Science & Technology*, 49(9), 5261-5276. <https://doi.org/10.1021/es505316f>

Bouchez, Patureau, Dabert, Juretschko, Doré, Delgenès, Moletta, & Wagner. (2000). Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environmental Microbiology*, 2(2), 179-190. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00091.x>

Cao, B., Nagarajan, K., & Loh, K.-C. (2009). Biodegradation of aromatic compounds: Current status and opportunities for biomolecular approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(2), 207-228. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2192-4>

Carey, F. A. (2023). *Hydrocarbon | Definition, Types, & Facts | Britannica*. <https://www.britannica.com/science/hydrocarbon>

Ceresa, C., Fracchia, L., Sansotera, A. C., De Rienzo, M. A. D., & Banat, I. M. (2023). Harnessing the Potential of Biosurfactants for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Pharmaceutics*, 15(8), 2156. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15082156>

Cerqueira, V. S., Hollenbach, E. B., Maboni, F., Vainstein, M. H., Camargo, F. A. O., Peralba, M. D. C. R., & Bento, F. M. (2011). Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresource Technology*, 102(23), 11003-11010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.074>

Chen, Y.-A., Grace Liu, P.-W., Whang, L.-M., Wu, Y.-J., & Cheng, S.-S. (2020). Effect of soil organic matter on petroleum hydrocarbon degradation in diesel/fuel oil-contaminated soil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(5), 603-612. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.12.001>

Clayden, J., Greeves, N., & Warren, S. (2012). *Organic Chemistry*. OUP Oxford.

Cycoń, M., Mroziak, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2017). Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. *Chemosphere*, 172, 52-71. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.129>

Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 941810. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>

Das, N., Das, A., Das, S., Bhatawadekar, V., Pandey, P., Choure, K., Damare, S.,

& Pandey, P. (2023). Petroleum Hydrocarbon Catabolic Pathways as Targets for Metabolic Engineering Strategies for Enhanced Bioremediation of Crude-Oil-Contaminated Environments. *Fermentation*, 9(2), Article 2.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation9020196>

Dejonghe, W., Berteloot, E., Goris, J., Boon, N., Crul, K., Maertens, S., Höfte, M., De Vos, P., Verstraete, W., & Top, E. M. (2003). Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading variovorax strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1532-1541.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1532-1541.2003>

Devatha, C. P., Vishnu Vishal, A., & Purna Chandra Rao, J. (2019). Investigation of physical and chemical characteristics on soil due to crude oil contamination and its remediation. *Applied Water Science*, 9(4), 89. <https://doi.org/10.1007/s13201-019-0970-4>

Diplock, E. E., Mardlin, D. P., Killham, K. S., & Paton, G. I. (2009). Predicting bioremediation of hydrocarbons: Laboratory to field scale. *Environmental Pollution*, 157(6), 1831-1840. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.01.022>

Dominati, E., Patterson, M., & Mackay, A. (2010). A framework for classifying and quantifying the natural capital and ecosystem services of soils. *Ecological Economics*, 69, 1858-1868. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2010.05.002>

El, M. H., Acio, J. A., & El, A. E. (2014). Aerobic biodegradation of BTEX: Progresses and Prospects. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(2), 1104-1122. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.04.009>

El Sol de México. (2019). *Así rapiñaron hidrocarburo en Acambay sin miedo a morir calcinados*. El Sol de México | Noticias, Deportes, Gossip, Columnas. <https://www.elsoldemexico.com.mx/republica/sociedad/videos-asi-rapinaron-hidrocarburo-en-acambay-sin-miedo-a-morir-calcinados-2914750.html>

Eras, E., Farré, A., Sánchez, A., Font, X., & Gea, T. (2022). Microbial biosurfactants: A review of recent environmental applications. *Bioengineered*, 13(5), 12365-12391. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2074621>

Espinoza, F. A. B., & León, A. (2014). *Identificación por fenotipo, cuantificación y técnicas moleculares de bacterias a dos profundidades en el cultivo "Hypericum"*

antes y después del tratamiento de 1-3 Dicloropropeno y Cloropicrina. 54.

Fakruddin, M. (2012). Biosurfactant: Production and Application. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 03(04). <https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000124>

Fallgren, P. (2009). *Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated sites*. FAO. (2006). *Guidelines for soil description* (4th ed). Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FAO. (2015). *Status of the world's soil resources: Main report*. FAO : ITPS.

FAO. (2021). *Propiedades Físicas del suelo*. Portal de Suelos de la FAO. <http://www.fao.org/soils-portal/soil-survey/propiedades-del-suelo/propiedades-fisicas/es/>

Frank, A. B., Liebig, M. A., & Tanaka, D. L. (2006). Management effects on soil CO<sub>2</sub> efflux in northern semiarid grassland and cropland. *Soil and Tillage Research*, 89(1), 78-85. <https://doi.org/10.1016/j.still.2005.06.009>

Furtak, K., & Gajda, A. M. (2018). Activity and Variety of Soil Microorganisms Depending on the Diversity of the Soil Tillage System. En *Sustainability of Agroecosystems*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72966>

Giles, M., Ortegón, A., & Palao, M. (2009). *Cuenta en placa de bacterias*. 10.

Gimba, Y., Abdullahi, S., Muhammad, A., Babagana, K., Yakasai, H., Ya'u, M., Babandi, A., Ibrahim, S., & Shehu, D. (2023). *Isolation and Molecular Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Pahs) Degrading Bacteria from Petrochemical Contaminated Soil*. 06, 350-359. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8106168>

González, C. (2019). *Captan en video acto de rapiña en toma clandestina de Acambay*. El Universal. <https://www.eluniversal.com.mx/metropoli/edomex/captan-en-video-acto-de-rapina-en-toma-clandestina-de-acambay>

González, H. H. R., Bustillos, L. G. T., & Fernández, I. M. (2010). *Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos*. 27.

Grenni, P., Falconi, F., & Barra Caracciolo, A. (2012). Microcosm Experiments for Evaluating Natural Bioremediation of Contaminated Ecosystems. *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS*, 28. <https://doi.org/10.3303/CET1228002>

Guo, P., Xu, W.-W., Wei, D.-N., Zhang, M.-X., Zhang, J., Tang, S., Cao, B.-X., Lin, J.-G., & Li, W. (2022). Potential Application of Biosurfactant-Producing Bacteria for Bioremediation of Oil Polluted Marine Intertidal Sediments. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/jmse10060731>

Heider, J. (2007). Adding handles to unhandy substrates: Anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(2), 188-194. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.02.027>

Herndon, J. M. (2017). New concept on the origin of petroleum and natural gas deposits. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*, 7(2), 341-352. <https://doi.org/10.1007/s13202-016-0271-5>

HiMedia Laboratories. (2020). *Bushnell Haas Broth*.

Hooman, J. (2010). *Understanding Soil Microbes and Nutrient Recycling*. <https://ohioline.osu.edu/factsheet/SAG-16>

Hursh, A., Ballantyne, A., Cooper, L., Maneta, M., Kimball, J., & Watts, J. (2017). The sensitivity of soil respiration to soil temperature, moisture, and carbon supply at the global scale. *Global Change Biology*, 23(5), 2090-2103. <https://doi.org/10.1111/gcb.13489>

Imam, A., Suman, S. K., Ghosh, D., & Kanaujia, P. K. (2019). Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 50-64. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.023>

Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. (2007). *Tecnologías de remediación*. SERMANAT. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/372/tecnolog.html>

Islas, D. J. (2010). *Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos*. 20.

Jackson, M. L. (1964). *Análisis químico de suelos*. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?!sisScript=BIBLO.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mf=000015>

Jason, F. (2022). *Hydrocarbons: Definition, Companies, Types, and Uses*. Investopedia. <https://www.investopedia.com/terms/h/hydrocarbon.asp>

Jimenez, H. H. (2018). *Acoplamiento de bioaugmentación, bioestimulación y*

*bioventeo para la remediación de un suelo costero contaminado con hidrocarburos intemperizados*. 139.

Kanwal, M., Ullah, H., Gulzar, A., Sadiq, T., Gul, Z., Ullah, M., Sarfraz, M., Aslam, M. W., Khan, N. N., Batool, T., Maqsood, S., & Nawaz, A. (2022). Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons and The Factors Effecting Rate of Biodegradation. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 16(1), 6.

Kebede, G., Tafese, T., Abda, E. M., Kamaraj, M., & Assefa, F. (2021). Factors Influencing the Bacterial Bioremediation of Hydrocarbon Contaminants in the Soil: Mechanisms and Impacts. *Journal of Chemistry*, 2021, e9823362.

<https://doi.org/10.1155/2021/9823362>

Kennepohl, D., Farmer, S., & Clark, J. (2016). *Uses and Sources of Alkenes*. Chemistry LibreTexts.

[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Map%3A\\_Organic\\_Chemistry\\_\(Wade\)\\_Complete\\_and\\_Semesters\\_I\\_and\\_II/Map%3A\\_Organic\\_Chemistry\\_\(Wade\)/08%3A\\_Structure\\_and\\_Synthesis\\_of\\_Alkenes/8.09%3A\\_Uses\\_and\\_Sources\\_of\\_Alkenes](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Map%3A_Organic_Chemistry_(Wade)_Complete_and_Semesters_I_and_II/Map%3A_Organic_Chemistry_(Wade)/08%3A_Structure_and_Synthesis_of_Alkenes/8.09%3A_Uses_and_Sources_of_Alkenes)

King, G. (2023). 2.5: *Hydrocarbon Types*. <https://www.education.psu.edu/png301/node/833>

Krishna, V. G., & Mishra, S. (2012). *Biodegradation of petroleum hydrocarbons*.

Kumar, V., Kumar, M., & Prasad, R. (2018). *Microbial Action on Hydrocarbons*. Springer.

Kumari, B., Kriti, K., Singh, G., Sinam, G., & Singh, D. P. (2020). *Microbial Remediation of Crude Oil-Contaminated Sites* (pp. 333-351).

[https://doi.org/10.1007/978-981-13-5889-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-981-13-5889-0_17)

Lawal, A. T. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. *Cogent Environmental Science*, 3(1), 1339841.

<https://doi.org/10.1080/23311843.2017.1339841>

Ławniczak, Ł., Woźniak-Karczewska, M., Loibner, A. P., Heipieper, H. J., & Chrzanowski, Ł. (2020). Microbial Degradation of Hydrocarbons—Basic Principles for Bioremediation: A Review. *Molecules*, 25(4), 856.

<https://doi.org/10.3390/molecules25040856>

Lozano, H. (2017). *Hidrocarburos alifáticos: Alquinos*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Lynch, J. (1981). Promotion and Inhibition of Soil Aggregate Stabilization by Micro-Organisms. *Microbiology-*sgm**, 126, 371-375. <https://doi.org/10.1099/00221287-126-2-371>

Margesin, R., Zimmerbauer, A., & Schinner, F. (2000). Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, 40(4), 339-346. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00218-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00218-0)

McClellan, T. (2007). *Soil Composition*. University of Hawai'i – College of Tropical Agriculture and Human Resources. [https://www.ctahr.hawaii.edu/mauisoil/a\\_comp.aspx](https://www.ctahr.hawaii.edu/mauisoil/a_comp.aspx)

McMurry, J., Emeritus, P., & University, C. (2023). *Organic Chemistry* (10.<sup>a</sup> ed.).

Meckenstock, R. U., Boll, M., Mouttaki, H., Koelschbach, J. S., Cunha Tarouco, P., Weyrauch, P., Dong, X., & Himmelberg, A. M. (2016). Anaerobic Degradation of Benzene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Microbial Physiology*, 26(1-3), 92-118. <https://doi.org/10.1159/000441358>

Mnif, I., Ellouz, S., & Ghribi, D. (2018). Glycolipid Biosurfactants, Main Classes, Functional Properties and Related Potential Applications in Environmental Biotechnology. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(5), 2192-2206. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1076-4>

Morales, G., Ferrera, R., Rivera, M. del C., Torres, L. G., Arteaga, R. I., Mendoza-López, Ma. R., Esquivel-Cote, R., & Alarcón, A. (2017). Diesel degradation by emulsifying bacteria isolated from soils polluted with weathered petroleum hydrocarbons. *Applied Soil Ecology*, 121, 127-134. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.003>

Moreno, C. P. (2017). *Evaluaciòn del antagonismo y sinergismo en aislados microbianos obtenidos de plukenetia volúbilis I para la conformaciòn de un consorcio microbiano en condiciones in vitro*. <https://www.coursehero.com/file/85849950/Evaluaci%C3%B3n-del-antagonismo-y-sinergismo-en-aislados-microbianos-obtenidos-de-plukenetia-vol%C3%BAbilis-L/>

Mousavi, S. M., Motesharezadeh, B., Hosseini, H. M., Alikhani, H., & Zolfaghari, A.

- A. (2018). Root-induced changes of Zn and Pb dynamics in the rhizosphere of sunflower with different plant growth promoting treatments in a heavily contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147, 206-216.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.045>
- Mrozik, A., Miga, S., & Piotrowska-Seget, Z. (2011). Enhancement of phenol degradation by soil bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. JS150: Soil bioaugmentation. *Journal of Applied Microbiology*, 111(6), 1357-1370.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05140.x>
- Mrozik, A., & Piotrowska, Z. (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, 165(5), 363-375. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2009.08.001>
- Nedaa, A., Majida, K., & Husain, A.-A. (2022). Indigenous oil-degrading bacteria more efficient in soil bioremediation than microbial consortium and active even in super oil-saturated soils. *Frontiers in Microbiology*.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.950051>
- Needelman, B. A. (2013). *What Are Soils?* Nature Education.  
<https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/what-are-soils-67647639/>
- Novelo, M., & Gracia, J. (2005). *Concentración micelar crítica mediante la ecuación de adsorción de Gibbs*.
- Obire, O., & Nwaubeta, O. (2002). *Effects of Refined Petroleum Hydrocarbon on Soil Physicochemical and Bacteriological Characteristics*. 6(1), 39-44.
- Oluwaseun, O. (2022). *Assessment of Physicochemical Properties and Microbial Community of Diesel Contaminated Soil*.  
<https://www.proquest.com/openview/35d8e7a99d28112ac0d8c4fd47d9fea0/1?pq-origsite=gscholar&cbl=2026366&diss=y>
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2017). Characterization of Biosurfactant Produced during Degradation of Hydrocarbons Using Crude Oil As Sole Source of Carbon. *Frontiers in Microbiology*, 8, 279.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00279>
- Pellegrini, A. (2019). *TEXTURA Y COLOR DEL SUELO*.
- Pepper, I. L., Gentry, T. J., Newby, D. T., Roane, T. M., & Josephson, K. L. (2002).

The Role of Cell Bioaugmentation and Gene Bioaugmentation in the Remediation of Co-Contaminated Soils. *Environmental Health Perspectives*, 110, 943-946.

Pérez, J., Viguera, S. E., Gómez, O., & Calva, G. (2015). *Degradación microbiana con BFNA de hidrocarburos aromáticos por bioaumentación en Biopilas*. 46, 9.

Pérez, J., Viguera, S. E., Zamudio, E., Rivera, N. A., & Calva, G. (2017). Bioremediation of soils from oil spill impacted sites using bioaugmentation with biosurfactants producing, native, free-living nitrogen fixing bacteria. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33, 105-114.  
<https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.esp01.09>

Pérez, R., González, T., & Muñoz, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1, 53-60.

Pizaña, E. (2013). *Hidrocarburos alifáticos*.  
<https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/15211/7/NOMENCLATURA.pdf>

Poveda, A. G. (2020). *La dinámica del suelo y su relación con los ecosistemas como problema de conocimiento*.

Priya, T., & Usharani, G. (2009). *Comparative Study for Biosurfactant Production by Using Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa*.

PROFEPA. (2022). *Emergencias químicas en México*. gob.mx.  
<https://www.gob.mx/profepa/es/articulos/emergencias-quimicas-en-mexico?idiom=es>

Qin, X., Tang, J. C., Li, D. S., & Zhang, Q. M. (2012). Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline-alkaline soil. *Letters in Applied Microbiology*, 55(3), 210-217. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03280.x>

Raiger, L. J., & López, N. I. (2009). *Los biosurfactantes y la industria petrolera*.  
<http://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/84389>

Ramesh, M., & Sakthishobana, K. (2021). Chapter 11—Significance of biosurfactants in oil recovery and bioremediation of crude oil. En Inamuddin & C. O. Adetunji (Eds.), *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental*



*Engineering and Science* (pp. 211-226). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822696-4.00006-1>

Ratnakar, D., & Shikha. (2018). Assessment of Co-Contamination in Soil Samples from Agricultural Areas in and Around Lucknow City, Uttar Pradesh, India. *Current science*, 115, 2267-2274. <https://doi.org/10.18520/cs/v115/i12/2267-2274>

Rengifo, M. C. P. (2018). *Evaluación del efecto de la bioaumentación con hongos durante la degradación de borras aceitosas de la industria petrolera*. 53.

Roberts, J. D., & Caseiro, M. C. (2014). *Sources and Uses of Aromatic Hydrocarbons*. Chemistry LibreTexts.

[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Basic\\_Principles\\_of\\_Organic\\_Chemistry\\_\(Roberts\\_and\\_Caserio\)/22%3A\\_Arenes\\_Electrophilic\\_Aromatic\\_Substitution/22.11%3A\\_Sources\\_and\\_Uses\\_of\\_Aromatic\\_Hydrocarbons](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Basic_Principles_of_Organic_Chemistry_(Roberts_and_Caserio)/22%3A_Arenes_Electrophilic_Aromatic_Substitution/22.11%3A_Sources_and_Uses_of_Aromatic_Hydrocarbons)

Rodríguez, J., Perales, A., Carballo, J., Martínez, F., Hernández, B., Barois, I., & Contreras, S. M. (2019). Bioremediation of soil contaminated by hydrocarbons with the combination of three technologies: Bioaugmentation, phytoremediation, and vermiremediation. *Journal of Soils and Sediments*, 19(4), 1981-1994.

<https://doi.org/10.1007/s11368-018-2213-y>

Rodríguez, M. L., Peña, J. J., Rivera, M. del C., & Délano, J. P. (2021). Native bacteria isolated from weathered petroleum oil-contaminated soils in Tabasco, Mexico, accelerate the degradation petroleum hydrocarbons in saline soil microcosms. *Environmental Technology & Innovation*, 23, 101781.

<https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101781>

Rojo, F. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*, 11(10), 2477-2490. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x>

Ron, E., & Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants. Minireview. *Environmental Microbiology*, 3, 229-236. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00190.x>

Sah, D., Rai, J. P. N., Ghosh, A., & Chakraborty, M. (2022). A review on biosurfactant producing bacteria for remediation of petroleum contaminated soils. 3 *Biotech*, 12(9), 218. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03277-1>

Saleger, J.-L. (2002). *Surfactants—Types and Uses*. 50.

Santos, O. (2017). *Detección e Identificación de Biosurfactantes y/o Bioemulsificantes producidos por Aislados Bacterianos asociados a una Fosa Petrolera de la Faja Petrolífera del Orinoco*.

Santos, Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3). <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>

SEMARNAT. (2019). *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México 2018*.

Shahi, A., Aydin, S., Ince, B., & Ince, O. (2016). Evaluation of microbial population and functional genes during the bioremediation of petroleum-contaminated soil as an effective monitoring approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 125, 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.029>

Sihag, S., Pathak, H., & Jaroli, D. P. (2014). *Factors Affecting the Rate of Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons*.

Silva, Í. S., Santos, E. da C. dos, Menezes, C. R. de, Faria, A. F. de, Franciscon, E., Grossman, M., & Durrant, L. R. (2009). Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology*, 100(20), 4669-4675. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.079>

Somoza, G., Wong-Villarreal, A., Blanco-González, C., Pérez-Sariñana, B., Mora-Herrera, M., Mora-Herrera, S. I., Rivas-Caceres, R. R., de la Portilla-López, N., Lugo, J., Vaca-Paulín, R., del Águila, P., & Yañez-Ocampo, G. (2020). A bacterial strain of *Pseudomonas aeruginosa* B0406 pathogen opportunistic, produce a biosurfactant with tolerance to changes of pH, salinity and temperature. *Microbial Pathogenesis*, 139, 103869. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103869>

Stephens, S. (2023). *BTEX Metabolism Metapathway Map*. [http://eawag-bbd.ethz.ch/BTEX/BTEX\\_map.html](http://eawag-bbd.ethz.ch/BTEX/BTEX_map.html)

Stotzky, G. (2016). Microbial Respiration. En A. G. Norman (Ed.), *Agronomy Monographs* (pp. 1550-1572). American Society of Agronomy, Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.c62>

Su, F., Lu, C., Johnston, K. R., & Hu, S. (2010). Kinetics, Thermodynamics, and Regeneration of BTEX Adsorption in Aqueous Solutions via NaOCl-Oxidized

Carbon Nanotubes. En *Environanotechnology* (pp. 71-97). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-054820-3.00005-8>

Suja, F., Rahim, F., Taha, M. R., Hambali, N., Rizal Razali, M., Khalid, A., & Hamzah, A. (2014). Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90, 115-122.  
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.03.006>

Suman, S. (2021). *Cycloalkanes: Nomenclature, Properties, Uses, Structures and Examples*. Collegedunia. <https://collegedunia.com/exams/cycloalkanes-nomenclature-properties-uses-structures-and-examples-articleid-1038>

Sutton, N. B., van Gaans, P., Langenhoff, A. A. M., Maphosa, F., Smidt, H., Grotenhuis, T., & Rijnaarts, H. H. M. (2013). Biodegradation of aged diesel in diverse soil matrixes: Impact of environmental conditions and bioavailability on microbial remediation capacity. *Biodegradation*, 24(4), 487-498.  
<https://doi.org/10.1007/s10532-012-9605-2>

Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3), 240-245.  
[https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00324-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7)

Ugaz, J., Vega, H., Iglesias, S., & Carreño, C. (2020). *Biosurfactantes en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*.  
<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.642>

United States Environmental Protection Agency. (2000). *Engineered Approaches to In Situ Bioremediation of Chlorinated Solvents: Fundamentals and Field Applications*. 144.

USDA. (2017). *Soil Survey Manual*.

Voroney, R. P. (2007). The soil habitat. En *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (pp. 25-49). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047514-1.50006-8>

Wade. (2019). *Uses and Sources of Alkanes*. Chemistry LibreTexts.  
[https://chem.libretexts.org/Courses/Nassau\\_Community\\_College/Organic\\_Chemist](https://chem.libretexts.org/Courses/Nassau_Community_College/Organic_Chemist)

ry\_I\_and\_II/03%3A\_Structure\_and\_Stereochemistry\_of\_Alkanes/3.12%3A\_Uses\_and\_Sources\_of\_Alkanes

Wang, S., Wang, D., Yu, Z., Dong, X., Liu, S., Cui, H., & Sun, B. (2021). Advances in research on petroleum biodegradability in soil. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 23(1), 9-27. <https://doi.org/10.1039/D0EM00370K>

Weelink, S. A. B. (2008). *Degradation of benzene and other aromatic hydrocarbons by anaerobic bacteria*.

Weil, R. R., & Brady, N. C. (2017). *The Nature and Properties of Soils* (15th ed.).

Widdel, F., Knittel, K., & Galushko, A. (2010). Anaerobic Hydrocarbon-Degrading Microorganisms: An Overview. En K. N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1997-2021). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4\\_146](https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_146)

Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., Xu, L., Zhang, M., & Chen, L. (2016). Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 107, 158-164.

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.11.019>

Xia, Y., Min, H., Rao, G., Lv, Z., Liu, J., Ye, Y., & Duan, X. (2005). Isolation and characterization of phenanthrene-degrading *Sphingomonas paucimobilis* strain ZX4. *Biodegradation*, 16(5), 393-402. <https://doi.org/10.1007/s10532-004-2412-7>

Xu, X., Liu, W., Tian, S., Wang, W., Qi, Q., Jiang, P., Gao, X., Li, F., Li, H., & Yu, H. (2018). Petroleum Hydrocarbon-Degrading Bacteria for the Remediation of Oil Pollution Under Aerobic Conditions: A Perspective Analysis. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02885>

Yamashita, Y., & Sakamoto, K. (2016). Hydrophilic–Lipophilic Balance (HLB): Classical Indexation and Novel Indexation of Surfactant. En *Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science 2V Set* (pp. 570-574). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119075691.ch45>

Yan, N., Marschner, P., Cao, W., Zuo, C., & Qin, W. (2015). Influence of salinity and water content on soil microorganisms. *International Soil and Water Conservation Research*, 3(4), 316-323. <https://doi.org/10.1016/j.iswcr.2015.11.003>

- Yañez, G., Somoza, G., Blanco, C., & Wong, A. (2017). Utilization of agroindustrial waste for biosurfactant production by native bacteria from chiapas. *Open Agriculture*, 2(1), 341-349. <https://doi.org/10.1515/opag-2017-0038>
- Zhang, B., Zhang, L., & Zhang, X. (2019a). Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by petroleum-degrading bacteria immobilized on biochar. *RSC Advances*, 9(60), 35304-35311. <https://doi.org/10.1039/C9RA06726D>
- Zhang, B., Zhang, L., & Zhang, X. (2019b). Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by petroleum-degrading bacteria immobilized on biochar. *RSC Advances*, 9(60), 35304-35311. <https://doi.org/10.1039/C9RA06726D>
- Zhu, X., Yu, P., Han, N., Jia, H., Wang, X., & Kodirov, K. (2015). Monitoring soil respiration dynamics during the biodegradation of crude oil contaminated soil under different environmental conditions. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24, 4087-4094.