

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS**



**AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS  
BIORREMEDIADORES DE SUELO CONTAMINADO POR DIESEL**

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES**

**P R E S E N T A :**

**Nidelvia Cauich Cauich**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS**



**AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS  
BIORREMIEDIADORES DE SUELO CONTAMINADO POR DIESEL**

**POR:  
NIDELVIA CAUICH CAUICH**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES**

**AISLAMIENTO Y CULTIVO DE MICROORGANISMOS  
BIORREMIEDIADORES DE SUELO CONTAMINADO POR DIESEL**

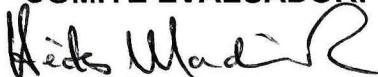
**TESIS  
PRESENTADA POR:**

**NIDELVIA CAUICH CAUICH**

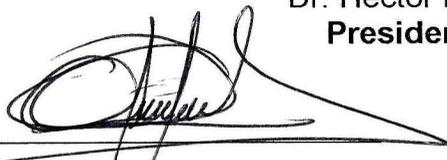
**TESIS QUE SE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO  
EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO  
DE:**

**INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES**

**COMITÉ EVALUADOR:**



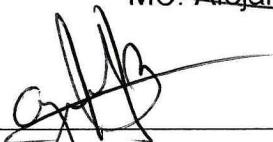
**Dr. Héctor Madinaveitia Ríos  
Presidente del Jurado**



**Dr. Rafael Castro Franco  
Vocal**

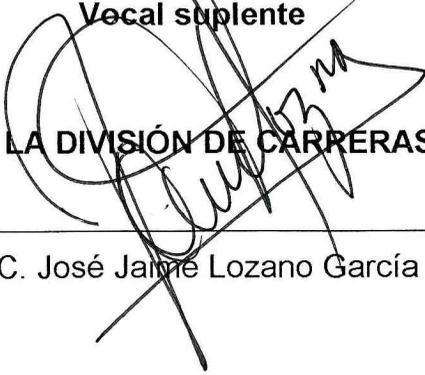


**MC. Alejandro Moreno Reséndez  
Vocal**



**MC. Hugo Aguilar Márquez  
Vocal suplente**

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS**



**MC. José Jaime Lozano García**



**Coordinación de la División  
de Carreras Agronómicas**

Tesis elaborada por la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito parcial, para obtener el grado de:

## INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES

### Comité asesor:

Asesor principal:



Dr. Héctor Madinaveitia Ríos

Asesor:



Dr. Rafael Castro Franco

Asesor:



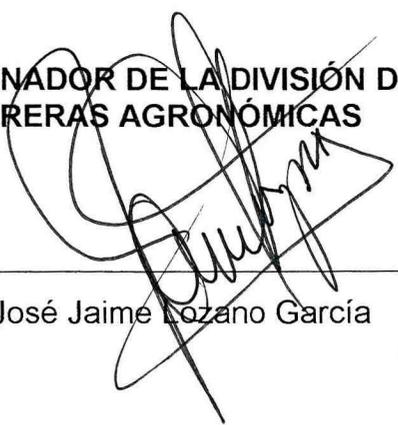
MC. Alejandro Moreno Reséndez

Asesor:



MC. José Luis Reyes Carrillo

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE  
CARRERAS AGRONÓMICAS



MC. José Jaime Lozano García



Coordinación de la División  
de Carreras Agronómicas

*Esta tesis, esta dedicado con cariño, amor y respeto a mis padres, que me dieron la vida y me enseñaron valores y principios por lo cual ahora he llegado a una etapa más de mi vida .*

*A mis hermanos: Martha Elena, Eugenia del Carmen, Irma, Rebeca, Luís Alfonso, Marco Antonio y José Feliciano .*

*A mis abuelos: En especial a Francisca que en paz descansa.*

*A mi novio: Eloy Contreras Gómez por su amor y comprensión.*

*A mi amiga y compañera: Siomara Lizardo Garay, por brindarme su amistad y por haber sido una compañera incondicional.*

*A Nelly Cahuich Cel: Por su amistad, cariño, confianza y apoyó.*

*A la maestra: Clara Mayela por haber brindado su apoyó moral y económico, cuando más lo necesitaba.*

*A todas las personas que me brindaron su amistad y confianza.*

## *Agradecimientos:*

*A Dios por ser tan bondadoso y misericordioso conmigo, por tener una hermosa familia, por llenarme de dicha y amor hacia la vida y por permitirme llegar a esta etapa de mi vida.*

*A mis padres por todo el apoyo, cariño, comprensión y amor que me han brindado.*

*A mi "ALMA TERRA MATER" por ser una universidad económica que me brindó la oportunidad de continuar con mis estudios y de haberme preparado como profesionista en la carrera de ingeniero en procesos ambientales.*

*A Daniel: Por ser como es y por transmitirme mucha paz espiritual.*

*Al Dr. Vicente de Paúl por su enseñanza y amistad.*

*Al Ing. Fernando Vega Sotelo por su amistad.*

*A todos los maestros y profesores que me impartieron los cursos en todo lo largo de la carrera.*

*A la Universidad Autónoma de Chapingo por permitir llevar a cabo el trabajo de laboratorio en sus instalaciones.*

*A los laboratoristas de la URUZA-Uachi*

*A Coecyt por la beca otorgada.*

*De la misma manera a todo el personal que elabora en la UAAAN-UL.*

*A mis asesores el Dr. Héctor Madinaveitia Ríos, Dr. Rafael Castro, MC. Alejandro Moreno Reséndez y MC. José Luis Reyes Carrillo por el apoyo económico y colaboración incondicional que me brindaron para la realización de esta tesis.*

	<b>Página</b>
ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	ii
INDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE.....	iii
RESUMEN.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	2
Objetivo General.....	2
Objetivos específicos.....	2
Hipótesis.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Política Ambiental.....	3
Marco Jurídico y Normatividad Vigente.....	4
Alternativas de remediación de suelos contaminados.....	5
Estrategias de remediación.....	6
Lugar de realización del proceso de remediación.....	7
Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación.....	7
Tipos de tratamientos.....	8
Ventajas y desventajas de los tipos de tratamientos.....	8
Criterios que deben ser considerados para elegir la(s) tecnología(s) de remediación.....	10
Exploración inicial de alternativas.....	10
Análisis detallado de las alternativas.....	10
Comparación entre tecnologías.....	10
Biorremediación.....	10
Bacterias utilizadas en la degradación de hidrocarburos en el suelo.....	13
Factores que afectan el crecimiento bacteriano para la biorremediación de suelos.....	14
Factores Intrínsecos.....	14
Factores Extrínsecos.....	17
Factor implícito.....	18
Importancia de la biorremediación ambiental.....	18
Situación actual de la biorremediación a nivel Mundial.....	19
Situación actual de la biorremediación en México.....	19
Características de los Hidrocarburos.....	21
Características fisicoquímicas de algunos derivados del petróleo.....	22
Hidrocarburos en el suelo.....	23
Propiedades del suelo afectadas por hidrocarburos.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
Ubicación del área de estudio.....	25
Trabajo de campo.....	25
Trabajo de laboratorio.....	25
Aislamiento de microorganismos de suelos contaminados.....	26
Siembra en medio selectivo.....	29
Prueba de confirmación.....	29

Parámetros de la degradación de los hidrocarburos.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
Aislamiento de los microorganismos biorremediadores.....	31
CONCLUSIONES.....	36
SUGERENCIAS.....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38
APÉNDICE.....	41

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO</b>		<b>Página</b>
1	RELACIÓN C:N ANTES DE LA INOCULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN SUELO CONTAMINADO CON DIESEL.....	33
2	RELACIÓN C:N DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS, EN MEDIOS LÍQUIDOS CONTAMINADOS CON DIESEL, HEXANO Y XILENO.....	34
3	DEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS INOCULADOS EN MEDIOS LÍQUIDOS CONTAMINADOS CON DIESEL, HEXANO Y XILENO.....	35

## ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE

<b>CUADRO</b>		<b>Página</b>
1	RELACIÓN C:N ANTES DE LA INOCULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN SUELO CONTAMINADO CON DIESEL.....	45
2	RELACIÓN C:N DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS, EN MEDIOS LÍQUIDOS CONTAMINADOS CON DIESEL, HEXANO Y XILENO.....	46

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue aislar y seleccionar microorganismos *in vitro* con capacidad de biorremediación de suelo contaminado por hidrocarburos. La metodología efectuada contempló la realización de un muestreo del suelo contaminado con diesel, mediante el uso de cuadrantes de 5 X 5 m (25m<sup>2</sup>), de donde se obtuvieron 10 muestras representativas de 1 kg . A cada muestra se le determinó el porcentaje de Carbono total por el método (Walkley Black, 1964) y Nitrógeno total (Kjeldalh,1964). Posteriormente a cada muestra de suelo se les realizó la extracción de los microorganismos mediante la técnica de extracción acuosa, la extracción fue utilizada para la siembra en placa de los microorganismos, el crecimiento microbiano fue utilizado para el aislamiento de dichas cepas, para posteriormente inocularse en un medio selectivo. En base a esto se realizó la prueba de confirmación mediante la técnica de tinción de Gram donde se observaron las colonias de los microorganismos, los géneros aislados fueron *Pseudomonas* y *Streptomyces*. Posteriormente se realizó la determinación del porcentaje de Carbono y Nitrógeno (C:N) después de la inoculación de los microorganismos en medio de cultivo selectivo líquido, la comparación correspondiente de los porcentajes antes y después de las determinaciones, las relaciones de C:N menores de 150 indican que *Pseudomonas* y *Streptomyces* son microorganismos con capacidad de degradar hidrocarburos y que estos pueden ser aislados fácilmente de los mismos suelos contaminados con diesel.

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la industria petrolera en México, se convirtió en una de las principales productoras mundiales de hidrocarburos y sus derivados, si bien ha sido el sustento de la economía nacional, también hay que señalar que ha provocado la alteración de los ecosistemas mediante la contaminación del aire, agua y suelo, principalmente debida a la insuficiente información y la poca investigación que existe sobre la contaminación del suelo por hidrocarburos y sus derivados (diesel).

Durante mucho tiempo y hasta hace poco, nadie se preocupaba por los derrames de hidrocarburos en el suelo dando por hecho que a través de la biota del suelo la naturaleza limpiaba el ambiente, pero según fue cambiando la composición de los hidrocarburos y al aumentar la cantidad de derrames accidentales y complejidad de estos, ha ocasionado que la capacidad degradativa y amortiguadora de los microorganismos sea lenta y difícil para su degradación. En la actualidad existen un gran número de técnicas para disminuir la contaminación por hidrocarburos en el suelo, sin embargo, la biorremediación es una de las mejores opciones para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos, debido a su bajo costo y el uso de microorganismos para la degradación de las sustancias tóxicas convirtiéndolas, en dióxido de carbono, agua y sales inocuas.

La biorremediación se logra mediante el aislamiento y cultivo de bacterias endémicas con capacidad de adaptación a las condiciones ambientales y a las características del suelo en el sitio del tratamiento.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Aislar y seleccionar microorganismos *in vitro* con capacidad de biorremediación de suelo contaminado por hidrocarburos.

### Objetivos Específicos

1. Aislar microorganismos nativos de suelos contaminados, con posibilidades para biorremediación
2. Determinar la relación C:N de las muestras de suelo contaminado con diesel antes de la inoculación de los microorganismos.
3. Determinar la relación C:N de las muestras *in vitro* de diferentes hidrocarburos, después de la inoculación de microorganismos aislados.

### Hipótesis

Los suelos contaminados por hidrocarburos favorecen la proliferación de microorganismos factibles para usar como agentes biorremediadores.

## REVISIÓN DE LITERATURA

Uno de los mayores problemas a que se enfrenta el mundo industrializado es la contaminación del aire, agua y suelo. Solamente en Europa del oeste se encuentran contaminados más de 350,000 sitios. Muchos de los suelos contaminados en México han sido resultado de un manejo inapropiado del transporte y almacenaje del petróleo y sus derivados (Bojórquez *et al.*, 1995).

Por la importancia económica que representa el petróleo para México y, ante la demanda en el mercado exterior, a pesar de las fluctuaciones de su precio, se ha intensificado su explotación lo cual representa el renglón más fuerte en la captación de divisas (Pemex, 2000). México es el cuarto productor de petróleo en el mundo, con una producción diaria de 3 millones de barriles, exportando 1.4 millones de barriles diarios. Este producto se exporta a Canadá, Estados Unidos, Centroamérica, España, Francia, Yugoslavia, Japón e Israel (Ayllon *et al.*, 1994).

De acuerdo con estadísticas de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente cada año se presentan en México un promedio de 550 sitios contaminados con materiales y residuos peligrosos. Dentro de los compuestos peligrosos más comúnmente involucrados se encuentran el petróleo y sus derivados (gasolinas, combustóleo, diesel), agroquímicos, gas LP y natural, entre otros (PROFEPA, 1999).

### **Política Ambiental**

La integración de una Política Ambiental para la protección de los suelos y su remediación es un elemento fundamental de enlace entre la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA) que es el instrumento fundamental que introdujo la modificación en el régimen de las autorizaciones de obras o actividades "que pueden causar desequilibrios ecológicos o rebasar los límites y condiciones establecidos en las disposiciones

aplicables para proteger el ambiente, preservar y restaurar los ecosistemas, a fin de evitar o de reducir al mínimo sus efectos negativos sobre el ambiente. Y las diferentes partes que intervienen en el marco de la problemática ambiental. Esta política busca establecer el marco institucional que permita proteger a los suelos entendiendo la problemática relacionada con su contaminación, con el fin de plantear las medidas preventivas y las relativas a su remediación. Para ello, es necesario que los diferentes actores consideren la naturaleza de los contaminantes, la actividad que les dió origen, su toxicidad, las concentraciones observadas, el ordenamiento ecológico o programas de desarrollo urbano que resulten aplicables, como también el riesgo toxicológico y ecotoxicológico derivado de la presencia de sustancias nocivas (Diario Oficial de la Federación, 1996).

### **Marco Jurídico y Normatividad Vigente**

La protección de los elementos naturales del suelo queda alineada en el ámbito general de la LGEEPA, por lo mismo, son aplicables sus instrumentos de control, la ordenación ecológica del territorio, la manifestación del impacto ambiental para obras y actividades petroleras, la adopción de medidas de protección en áreas naturales, a través del Instituto Nacional de Ecología (INE) y la PROFEPA, órganos desconcentrados de la Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, en la inspección, vigilancia y aplicación de medidas para la conservación y preservación del ambiente (Díaz, 1995).

La LGEEPA en 1996 establece en cuatro artículos los aspectos para atender la contaminación del suelo:

- 134. Menciona los criterios de la prevención y control de la contaminación; párrafo I. Corresponde al estado y la sociedad prevenir la contaminación del suelo. II. Deben controlarse los residuos en tanto que

constituyen la principal fuente de contaminación del suelo; IV. Se establece que en los suelos contaminados por la presencia de materiales o residuos peligrosos, deberán llevarse a cabo acciones necesarias para recuperar o restablecer sus condiciones, de tal manera que puedan ser utilizados en cualquier tipo de actividad prevista por el programa o de ordenamiento ecológico que resulte aplicable.

- Art. 136. Los residuos que se acumulen o puedan acumularse y se depositen o infiltren en los suelos deberán reunir las condiciones necesarias para prevenir o evitar: I. Contaminación del suelo; II. Las alteraciones nocivas en el proceso biológico de los suelos; III. Las alteraciones en el suelo que perjudiquen su aprovechamiento, uso o explotación y; IV. Riesgos y problemas de salud.
- Art. 139. Toda descarga, depósito o infiltración de sustancias o materiales contaminantes en los suelos se sujetará a lo que disponga esta ley, la ley de Aguas Nacionales, sus disposiciones reglamentarias y las Normas Oficiales Mexicanas.
- Art. 140. La generación, manejo y disposición final de los residuos de lenta degradación deberá sujetarse a la que establezca en las Normas Oficiales Mexicanas que al respecto expida la Secretaría, en coordinación con la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

### **Alternativas de remediación de suelos contaminados**

El término “tecnología de tratamiento” implica cualquier operación unitaria o serie de operaciones unitarias que altera la composición de una sustancia peligrosa o contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas de manera que reduzcan la toxicidad, movilidad o volumen del material contaminado (Sellers, 1993).

El uso de una tecnología de remediación en particular depende, además de los factores específicos del sitio y de las propiedades fisicoquímicas del contaminante, de su disponibilidad, de la fiabilidad demostrada o proyectada, de su estado de desarrollo (laboratorio, escala piloto o gran escala) y de su costo.

Las tecnologías de remediación pueden clasificarse de diferentes maneras, en base a los siguientes principios (Sellers, 1993):

- Estrategias de remediación.
- Lugar en que se realiza el proceso de remediación.
- Tipo de tratamiento.

Es importante mencionar que cada una de estas agrupaciones proporciona diferente información acerca de las tecnologías de remediación. A continuación se describen con más detalle las clasificaciones anteriores.

### **Estrategias de remediación**

Son tres estrategias básicas que pueden usarse separadas o en conjunto, para remediar la mayoría de los sitios contaminados (Sellers, 1993):

- **Destrucción o modificación de los contaminantes:** Este tipo de tecnologías busca alterar la estructura química del contaminante.
- **Extracción o separación:** Los contaminantes se extraen y/o separan del medio contaminado, aprovechando sus propiedades físicas o químicas (volatilización, solubilidad, carga eléctrica).
- **Aislamiento o inmovilización del contaminante:** Los contaminantes son estabilizados, solidificados o contenidos con el uso de métodos físicos o químicos.

## Lugar de realización del proceso de remediación

En general, se distinguen dos tipos de tecnologías (Eweis *et al*, 1998):

- **In situ:** Son las aplicaciones en las que el suelo contaminado es tratado, o bien, los contaminantes son removidos del suelo contaminado, sin necesidad de excavar el sitio. Es decir, se realizan en el mismo sitio en donde se encuentra la contaminación.
- **Ex situ:** La realización de este tipo de tecnologías, requiere de excavación, dragado o cualquier otro proceso para remover el suelo contaminado antes de su tratamiento que puede realizarse en el mismo sitio (on site) o fuera de él (off site).

## Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación

Las ventajas, desventajas de las tecnologías *in situ* y *ex situ* son las siguientes(Eweis *et al.*, 1998):

- **Ventajas In situ:** Permiten tratar el suelo sin necesidad de excavar ni transportar y es muy económica.
- **Ventajas Ex situ:** Menor tiempo de tratamiento, son más seguros en cuanto a uniformidad, es posible homogeneizar y muestrear periódicamente.
- **Desventajas In situ:** Mayores tiempos de tratamiento, pueden ser inseguros en cuanto a uniformidad: heterogeneidad en las características del suelo y dificultad para verificar la eficacia del proceso.
- **Desventajas Ex situ:** Necesidad de excavar el suelo, aumento en costos e ingeniería para equipos, debe considerarse la manipulación del material y la posible exposición al contaminante.

## Tipos de tratamientos

Esta clasificación se basa en el principio de la tecnología de remediación y se divide en tres tipos de tratamiento (EPA, 1994):

- **Tratamientos biológicos (biorremediación):** Utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar (destrucción), transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos.
- **Tratamientos fisicoquímicos:** Este tipo de tratamientos, utiliza las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación.
- **Tratamientos térmicos:** Utilizan calor para incrementar la volatilización (separación), quemar, descomponer o fundir (inmovilización) los contaminantes en un suelo.

## Ventajas y desventajas de los tipos de tratamientos

Las ventajas y desventajas de los tipos de tratamientos son los siguientes (EPA, 1994):

- **Ventajas de los tratamientos biológicos:** Son efectivos en cuanto a costos, son tecnologías más benéficas para el ambiente, los contaminantes generalmente son destruidos y se requiere un mínimo o ningún tratamiento.
- **Desventajas de los tratamientos biológicos:** Requieren mayores tiempos de tratamiento, es necesario verificar la toxicidad de intermediarios y/o productos, no pueden emplearse si el tipo de suelo no favorece el crecimiento microbiano.

- **Ventajas de los tratamientos fisicoquímicos:** Son efectivos en cuanto a costos, pueden realizarse en periodos cortos, el equipo es accesible y no se necesita de mucha energía ni ingeniería.
- **Desventajas de los tratamientos fisicoquímicos:** Los residuos generados por las técnicas de separación, deben tratarse o disponerse: aumento en costos y necesidad de permisos, los fluidos de extracción pueden aumentar la movilidad de los contaminantes: son necesarios los sistemas de recuperación.
- **Ventajas de los tratamientos térmicos:** Permite tiempos rápidos de limpieza.
- **Desventajas de los tratamientos térmicos:** Es el grupo de tratamientos más costoso, los costos aumentan en función del empleo de energía y equipo, son intensivos en mano de obra y capital.

Además de las clasificaciones anteriores, las tecnologías de remediación pueden clasificarse en base al tiempo que llevan en el mercado y al grado de desarrollo en el que se encuentran, en tecnologías tradicionales y en tecnologías innovadoras (EPA, 1994):

- **Tecnologías tradicionales:** Son tecnologías utilizadas comúnmente a gran escala, cuya efectividad ha sido probada. La información disponible acerca de costos y eficiencia es de fácil acceso. Entre las tres tecnologías tradicionales usadas con mayor frecuencia, se encuentran: la incineración *in situ* y *ex situ*, la solidificación/estabilización, la extracción de vapores y la desorción térmica.
- **Tecnologías innovadoras:** Son tecnologías propuestas más recientemente, que pueden encontrarse en diferentes etapas de desarrollo (investigación, escala piloto o gran escala). Su limitado número de aplicaciones genera la falta de datos acerca de sus costos y

eficiencias. En general, una tecnología de tratamiento se considera novedosa si su aplicación a gran escala ha sido limitada.

### **Criterios que deben ser considerados para elegir la(s) tecnología(s) de remediación**

Los criterios para elegir las tecnologías de remediación son los siguientes (EPA, 1994):

#### **Exploración inicial de alternativas**

- Costo.
- Efectos de las alternativas.
- Prácticas de ingeniería aceptables.

#### **Análisis detallado de las alternativas**

- Especificación a detalle.
- Uso de alternativas.
- Costos detallados.
- Posibilidades de construcción.
- Efectividad de una tecnología en comparación con otras tecnologías.
- Análisis de impactos adversos.

#### **Comparación entre tecnologías**

- Menor costo.
- Viabilidad y confiabilidad.
- Disminución (mitigación) de la contaminación con un daño mínimo.

### **Biorremediación**

El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, entre otros) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos. Esta estrategia biológica depende de las

actividades catabólicas de los organismos, y por consiguiente de su capacidad para utilizar los contaminantes como fuente de alimento y energía (Van Deuren *et al.*, 1997).

La biorremediación puede emplear organismos propios del sitio contaminado (autóctonos) o de otros sitios (exógenos), puede realizarse *in situ* o *ex situ*, en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno) (Eweis *et al.*, 1998). Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con hidrocarburos del petróleo (HTPs), solventes (benceno y tolueno), explosivos (TNT), clorofenoles (PCP), pesticidas (2,4-D), conservadores de madera (creosota) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Van Deuren *et al.*, 1997).

Para el caso del tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos se requiere una concentración mínima de microorganismos degradadores específicos de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/g<sup>-1</sup> suelo (UFC: unidades formadoras de colonias) y de microorganismos heterótrofos totales de  $10^5$  a  $10^6$  UFC/g<sup>-1</sup> de suelo. En estos casos generalmente no se necesita inoculación de los microorganismos. Si esta masa crítica no es suficiente se puede lograr un incremento importante de los microorganismos estimulando la población microbiana existente en el suelo contaminado mediante la inoculación, cometabolismo y biomagnificación (Semple *et al.*, 2001):

- **Inoculación:** Este proceso incorpora microorganismos al suelo para realizar una función específica, como es la degradación de contaminantes. Los microorganismos pueden ser comerciales o preparados para un fin específico. La inoculación se usa cuando los microorganismos del suelo no pueden degradar el contaminante

presente, o cuando se produce inhibición por presencia de sales o metales pesados o cuando no alcanzan la masa crítica necesaria. Como desventaja, los microorganismos inoculados pueden desplazar a los existentes en el suelo por competencia y lograr poco efecto degradativo (detener el proceso) o bien pueden no adaptarse a las condiciones ambientales del lugar. También puede ocurrir que no puedan competir con los microorganismos locales y el efecto será nulo.

- **Biomagnificación:** Este proceso implica incrementar drásticamente la masa microbiana del suelo mediante la adición de microorganismos similares a los presentes en el suelo obtenidos mediante cultivo en reactores biológicos. Los microorganismos se obtienen del suelo contaminado del lugar. En laboratorio se definen los consorcios microbianos más adecuados en base a tolerancia a sales y sustancias inhibitoras y también a la capacidad de degradación de hidrocarburos. De esta forma se pueden tener consorcios que actúan en forma simbiótica y que resisten concentraciones de 10 % del hidrocarburo en medio líquido (sin restricciones de transferencia de masa) y hasta 13 % de NaCl en el medio líquido. Una vez obtenido el consorcio más adecuado se produce una masa importante de microorganismos y se llevan a campo para reforzar la actividad de los que ya existen en el mismo. En algunos casos, dependiendo del tipo de contaminante presente, puede ser necesario inocular varias veces.
- **Co-metabolismo:** Se da en casos de sustratos complejos donde los microorganismos consumen un compuesto y producen enzimas para transformar cierto compuesto, sobre el que no pueden crecer, en uno asimilable por su metabolismo.

## Bacterias utilizadas en la degradación de hidrocarburos en el suelo

Por definición, una bacteria, pertenece al grupo de organismos procarióticos, unicelulares, pertenecientes al reino *Monera*, por lo general se multiplican por fisión binaria, cada célula en la colonia es fisiológicamente independiente, aún cuando esté influida por los cambios del medio, producidos por las células vecinas (Alexander, 1971).

- ***Streptomyces sp.*** Las bacterias del género *Streptomyces* son Gram-positivas, aerobias estrictas, catalasa-positivas y quimioorganotrófica, son microorganismos filamentosos saprofitos, se encuentran principalmente en los suelos de pH mayor de 7, aunque también existen especies acuáticas. Existen cerca de 500 especies reconocidas. Los filamentos suelen tener un Diámetro de 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$  y de Longitud variable, pueden formar filamentos aéreos abundantes llamados esporóforos, las esporas son llamadas conidios que se producen por la formación de septos transversales. Los conidios y esporóforos generalmente son pigmentados y con colores característicos. Algunos de estos microorganismos son productores de antibióticos (*Estreptomicina*, *Neomicina*, *Nistatina*, *Cloramfenicol* y otros), otras son productoras de vitaminas (*Streptomyces olivaceus*). Se les considera agentes patógenos productores de infecciones sistémicas, sin embargo aún no está bien definido su papel de agente patógeno. La identificación de estas bacterias sigue siendo difícil, y aún hoy en día su diagnóstico y clasificación principal mente se basa en el estudio de las características morfológicas (macro y microscópicas), en las quimiotaxonómicas y en las bioquímicas. Sus características de la composición química son las siguientes : **GC%:** 69 a 78 % (guanina-citosina). **Tipo de pared y perfil de composición química de la pared celular:** Pared tipo I; contiene ácido diaminopimélico (L-DAP), glicina, ausencia de polisacáridos o

ácidos micólicos. La composición en L-DAP es específica en los géneros *Streptomyces*, *Nocardioides* e *Intrasporangium*. **Menaquinona predominante:** Tipo MK-9 (4) (Williams, *et al.*, 1989).

- ***Pseudomonas sp:*** Las bacterias del género *Pseudomonas* son Gram – negativos estrictamente aerobios, se mueven mediante un flagelo polar, poseen un citocromo inusual en su cadena de electrones detectable en la colonias por un método colorimétrico: el test de la oxidasa, son oxidasa positivas, producen ácidos orgánicos e inorgánicos como principal mecanismo microbiológico para solubilizar el fósforo en el suelo, tornando los fosfatos insolubles a formas solubles. Son un componente importante de la comunidad bacteriana de la rizósfera, por poseer un periodo de latencia reducido y una rápida velocidad de crecimiento. Tienen a disminuir el pH del medio que los circunda metabolizando azúcares de los exudados de las raíces, produciendo pigmentos fluorescentes con capacidad inhibidora de bacterias y hongos fitopatógenos al sintetizar antibióticos como la pirrolnitrina. Una especie de *Pseudomonas* es un importante patógeno humano: *Pseudomonas aeruginosa*, "el" patógeno oportunista por excelencia causa principal de las infecciones intrahospitalarias.

## **Factores que afectan el crecimiento bacteriano para la biorremediación de suelos**

Estos factores son los siguientes:

### **Factores Intrínsecos**

Los factores intrínsecos son aquellos que tienen que ver con la alimentación de los microorganismos. Dentro de este grupo está el pH, actividad de agua,

potencial de oxido reducción, cantidad de elementos nutritivos y degradación biológica (EPA, 1994).

- **pH:** El pH del suelo es importante para el desarrollo de los microorganismos degradadores, siendo los más adecuados los comprendidos entre 6 y 8. Cuando el pH excede de 8 se debe disminuir el mismo mediante adición de azufre al suelo. Si es menor de 6 se puede incrementar mediante la incorporación de carbonato de calcio o hidróxido de calcio al suelo.
- **Actividad del agua (aw):** Como actividad de agua se conoce la cantidad de agua libre disponible para el crecimiento microbiano y para los procesos químicos y enzimáticos, la actividad de agua a la cual crecen las bacterias Gram negativas es de 0.97 y las Gram positivas de 0.90.
- **Oxidación:** La oxidación se presenta en el suelo afectando a muchos compuestos químicos aromáticos experimentando una oxidación de radical libre, por ejemplo, benceno, bencidina, etilbenceno, naftaleno y fenol. Otro segundo grupo, incluye, tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), hexaclorobenceno, hexaclorociclopentadieno, bifenilos polibromados (PBB's) y policlorados (PCB's) y no aromáticos.
- **Reducción:** La reducción es definida en términos de transferencia de electrones, involucra a compuestos orgánicos en sistemas de agua-arcilla. El efecto se acelera al aumento de agua sugiriendo la existencia del mecanismo de transferencia de un electrón donde la arcilla actúa como un aceptor. En general, uno puede esperar que un químico orgánico puede experimentar una reducción química si el potencial del suelo es menor que el compuesto orgánico en cuestión.
- **Elementos nutritivos:** Los elementos nutritivos son sustancias químicas necesarias para el desarrollo de los microorganismos y se pueden dividir en cuatro grupos: fuentes de Carbono, Fósforo, Nitrógeno y oligoelementos o elementos minoritarios (micro elementos). La fuente

de carbono en este caso es el contaminante, y proporciona el carbono necesario para producir compuestos celulares, productos metabólicos ( $\text{CO}_2$ , agua, enzimas) y microorganismos (debido a la reproducción de los mismos). La fuente de Nitrógeno proporciona el elemento necesario para la producción de aminoácidos y enzimas. Dado que la utilización de estos compuestos es muy rápida los suelos no alcanzan a cubrir todas las necesidades del proceso y deben ser incorporados bajo la forma de fertilizantes de uso agrícola como urea o sulfato de amonio. La fuente de fósforo interviene en la formación de compuestos energéticos dentro de la célula que se utilizan en los procesos de reproducción y degradación. Dado que la utilización de este compuesto es muy rápida, los suelos no alcanzan a cubrir todas las necesidades del proceso y deben ser incorporados bajo la forma de fertilizantes de uso agrícola como fosfato diamónico o fosfato tricálcico. La fuente de oligoelementos constituye un conjunto variado de elementos como hierro, cobre, zinc, azufre, cobalto, manganeso, magnesio, calcio y otros compuestos que dependen del tipo de microorganismo y del proceso que se realiza. Las concentraciones de los mismos son muy pequeñas (menos de 1 ppm en total). Normalmente no se incorporan en los procesos de campo ya que el suelo provee estos elementos en cantidades suficientes aunque en algunos casos es necesario incorporar algunos gramos por hectárea para tratar algún contaminante muy específico. También es necesario disponer de potasio en concentraciones bajas. Normalmente los suelos poseen potasio en cantidades suficientes. La dosificación de Nitrógeno y Fósforo se realiza en función de la concentración de contaminante de acuerdo a una relación que vincula C:N:P 100:10:1 a 100:2:0,2 según la técnica con que se mida la concentración de hidrocarburo que se toma como referencia y que aporta un 80 % de su masa como carbono al proceso.

- **Degradación Biológica:** Es importante notar la presencia de microorganismos nativos del suelo que tienen un papel fundamental en la

ausencia y/o permanencia de compuestos orgánicos, siendo considerado como una vía de pérdida de los compuestos orgánicos volátiles, llamada biodegradación; los compuestos químicos que poseen otras estructuras que los azúcares, aminoácidos y ácidos grasos, no pueden entrar inmediatamente dentro del metabolismo microbiano; esos compuestos requieren de una aclimatación definida en horas o meses, durante el cual poco o nada se degrada. El periodo de retraso generalmente es causado por: a) la transferencia de la información genética responsable de la degradación para una población, y b) la fase inicial de crecimiento exponencial de organismos capaces de degradar el compuesto, la alta solubilidad al agua que puede favorecer una rápida degradación, pero puede existir una acumulación a largo plazo de los productos de descomposición recalcitrante.

### **Factores Extrínsecos**

Los factores extrínsecos son los que tienen que ver con el ambiente donde se almacenan los alimentos. Entre ellos están la temperatura y la humedad (EPA, 1983).

- **Temperatura:** La temperatura influye en la velocidad de degradación marcadamente, dependiendo del tipo de microorganismos disponibles. Normalmente las temperaturas más adecuadas se encuentran entre 20 ° C y 40 ° C, (los microorganismos que trabajan a estas temperaturas se denominan mesófilos). La velocidad de degradación aumenta con la temperatura, por lo que un incremento de la misma es útil. Cuando supera los 40 ° C se produce una disminución de la actividad microbiana, o bien se produce una rotación poblacional hacia especies más resistentes a las altas temperaturas, como ocurre en los procesos de compostaje en donde se alcanzan temperaturas de 65 ° C.

- **Humedad:** El agua es importante para el desarrollo de los microorganismos ya que actúa como medio de transporte de elementos nutritivos y oxígeno a la célula. Es conveniente mantener una humedad del orden del 70 % de la capacidad de campo, la cual se define como la masa de agua que admite el suelo hasta la saturación, que depende de cada tipo de suelo. Un exceso de humedad produce inhibición del proceso por anaerobiosis. Un déficit impide el desarrollo de los microorganismos.

### **Factor implícito**

Dentro del factor implícito se encuentra lo siguiente (Tölgyessy, 1993).

- **Metabolismo:** No todas las bacterias tienen la capacidad de crecer en suelos contaminados por hidrocarburos, aún cuando encuentren condiciones óptimas. Esto es debido al estado como se encuentran los diferentes componentes.

### **Importancia de la biorremediación ambiental**

Un suelo contaminado constituye un riesgo potencial, aunque en lo inmediato no se perciban las consecuencias de dicha contaminación. Actividades mal planeadas, como cambio en el uso del suelo, trabajos de drenajes o de excavación realizados sobre un sitio contaminado, pueden hacer que este riesgo se vuelva significativo. Sitios contaminados por modos de producción y de consumo inadecuados que no son orientados hacia un desarrollo sustentable, no deben ser abandonados u olvidados, hipotecando su posible aprovechamiento. La remediación de un suelo contaminado no sólo corrige la situación, sino también busca su revalorización, ecológica y económicamente viable. Es decir, volver a dar al suelo un uso máximo y reintegrarlo al ciclo del desarrollo sustentable. La biodegradación de Hidrocarburos del Petróleo (HP)

por las poblaciones microbianas nativas representa uno de los principales mecanismos por el cual el petróleo y sus derivados (diesel) pueden disminuir considerablemente su presencia en el suelo (Gutiérrez, 1990).

### **Situación actual de la biorremediación a nivel Mundial**

De acuerdo con estudios realizados en los Estados Unidos de América y el Reino Unido, el mercado de la biorremediación para el tratamiento de suelos contaminados se ha incrementado debido a que los costos pueden reducirse entre 65% y 80%, respecto de los métodos físico-químicos (Zechendorf, 199).

La aceptación de la biorremediación como una estrategia de limpieza viable, en muchos casos, depende de sus costos. Es decir, cuando el método biológico propuesto es menos costoso que los tratamientos físicos y químicos viables para el tratamiento de un sitio y de un contaminante en particular. Asimismo, muchas de las estrategias de biorremediación son competitivas en términos de costos y eficiencia sobre una matriz contaminada (Semple *et al.*, 2001).

### **Situación actual de la biorremediación en México**

En el mercado ambiental de México, actualmente existe una cantidad considerable de empresas nacionales e internacionales que ofrecen diferentes tipos de tecnologías para la remediación de sitios contaminados. Asimismo, con el propósito de establecer un control acerca de las tecnologías que se ofrecen y conocer sus posibilidades reales de éxito, se inició en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México el 18 de agosto de 1997, la aplicación obligatoria de la Licencia Ambiental Única (LAU), para todas aquellas empresas que realizan trabajos de remediación de suelos. De conformidad con el acuerdo sectorial publicado en el Diario Oficial de la Federación (DOF) del 11 de abril de 1997.

Posteriormente, se publicó el acuerdo delegatorio respectivo en el DOF del 3 de diciembre de 1998, y a partir del 4 de enero de 1999 la LAU es emitida por las delegaciones federales de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) en los estados de Aguascalientes, Baja California, Coahuila, Chihuahua, México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz. Para el resto de los estados, el trámite de la licencia está centralizado (SEMARNAT 2002).

De las tecnologías que ofrecen las empresas que cuentan con permisos para remediar suelos contaminados, todas están enfocadas exclusivamente a la remediación de sitios contaminados por compuestos orgánicos. Dentro de los contaminantes tratados con mayor frecuencia, se encuentran los Hidrocarburos Totales de Petróleo los (HTP) y los Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (HAP), lodos aceitosos, lodos de perforación y recortes de perforación. De un total de 57 empresas autorizadas, ninguna ofrece servicios para la restauración de suelos contaminados por metales. De acuerdo con datos proporcionados por 40 empresas autorizadas para remediar suelos contaminados por diferentes tipos de contaminantes, dentro de las tecnologías más comúnmente empleadas se encuentran las biológicas (biorremediación, con 48%), siendo las más utilizadas el composteo y la biolabranza. El lavado de suelos, la oxidación química y la separación física constituyen otra parte importante de las tecnologías más empleadas en México (SEMARNAT 2002). A pesar de que existe información acerca de las tecnologías de biorremediación que se emplean en México, se aprecian ciertas deficiencias en el manejo y conocimiento de estos procesos por algunas de las empresas dedicadas a esta actividad. Este hecho se debe, en parte, a que muchas de estas empresas no cuentan con profesionales en microbiología o biotecnología, debido a que su principal actividad para realizar los trabajos de biorremediación consiste en importar formulaciones (concentrados bacterianos o enzimáticos, agentes tenso

activos y mezclas de elementos nutritivos, entre otros) para venderlas en México. Muchos de estos productos, además, carecen de información acerca del contenido y su eficiencia no se ha demostrado para las condiciones climáticas que predominan en él. La remediación de estos suelos requieren de aproximadamente 100 millones de dólares, ya que se estima que el precio promedio de remediación por  $m^3$  es del orden de 60 dólares para el caso de los residuos metálicos y 40 dólares para otros tipos de contaminantes como ácidos e hidrocarburos, cifra a la que se le sumarán las erogaciones de los trabajos de remediación de las zonas petroleras de México, de las cuales, se tendrá precisión tan pronto se concluyan los trabajos de diagnóstico que PEMEX está realizando (Saval 1998).

### **Características de los Hidrocarburos**

Los hidrocarburos son compuestos formados por átomos de carbono e hidrógeno, de gran abundancia en la naturaleza, presentes principalmente en el petróleo (Chappin, 1988 ). Se considera a los hidrocarburos de petróleo como una mezcla líquida compleja de gases, líquidos y sólidos, existiendo pequeñas cantidades de mezclas de nitrógeno, oxígeno y azufre, además de contener compuestos de hierro, níquel, vanadio y otros metales, de manera general, el petróleo tiene una proporción de 76 a 86% de carbono, e hidrógeno de 10 a 14%. Son los compuestos orgánicos más simples y pueden ser considerados como las sustancias principales de las que se derivan todos los demás compuestos orgánicos. Los hidrocarburos se clasifican en dos grupos principales, de cadena abierta y cíclicos. En los compuestos de cadena abierta que contienen más de un átomo de carbono, los átomos de carbono están unidos entre sí formando una cadena lineal que puede tener una o más ramificaciones. En los compuestos cíclicos, los átomos de carbono forman uno

o más anillos cerrados. Los dos grupos principales se subdividen según su comportamiento químico en saturados e insaturados (PEMEX, 1988).

### **Características fisicoquímicas de algunos derivados del petróleo**

Las características fisicoquímicas de algunos derivados del petróleo son los siguientes (Gessner, 1975):

- **Hexano:** Hexano, n- (n-hexane).  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ , sus propiedades son las siguientes: Líquido volátil, incoloro; olor débil; punto de ebullición  $68.742^\circ\text{C}$ ; punto de fusión  $95^\circ\text{C}$ ; índice de refracción ( $n_{20/D}$ ), 1,37486; punto de inflamación  $23^\circ\text{C}$ . Temperatura autoignición  $260^\circ\text{C}$ ; soluble en alcohol, acetona y éter; insoluble en agua, su obtención es por medio de la destilación fraccionada del petróleo (proceso de tamiz molecular). Sus calidades son las siguientes; 85%, 95%, 99% para espectroscopia, para investigación nanogrado. Sus usos es la siguiente: Disolventes, especialmente para aceites vegetales; termómetros para baja temperatura; calibraciones; diluyente de pintura; desnaturalizante del alcohol.
- **Diesel:** Diesel, fueloil ( diesel oil) (Aceite combustible numero 2), es el combustible para los motores y es obtenido de la destilación del petróleo. Su eficiencia se mide mediante el llamado número de cetano. Esta compuesto principalmente por carburos alifáticos, su volatilidad es semejante a la del gas oil. Punto de inflamación es de  $44-88^\circ\text{C}$ ; Su punto de ebullición menor de 1. Es moderadamente tóxico, inflamable y presenta un moderado riesgo de incendio. Es usado como combustible para camiones, barcos y otros medios de locomoción pesados; lodo de perforación; control de mosquitos (revestimiento de aguas reproductoras).

- **Xileno:** Alfa, alfa-diol, para-(para-xylene-alpha, alpha diol),  $C_6H_4(CH_2OH)_2$ , es sólido, blanco y cristalino, su punto de fusión es de  $118^{\circ}C$ , punto de ebullición  $138-144^{\circ}C$  (0,8-1,0 mm). Ligeramente soluble en agua ( $25^{\circ}C$ ). Pureza aproximadamente al 98% y sus usos en resinas de poliéster.

## **Hidrocarburos en el suelo**

El suelo y subsuelo constituyen un recurso natural difícilmente renovable que desempeña funciones entre las que destaca su papel como medio filtrante durante la recarga del manto acuífero y la protección de los mismos, en él ocurren los ciclos biogeoquímicos, hidrológicos y las redes tróficas, además de ser el espacio donde se realizan las actividades agrícolas, ganaderas y soporte de la vegetación (Saval, 1995).

El comportamiento de los contaminantes orgánicos está en función de sus características físicas y químicas (densidad, solubilidad, polaridad, entre otras.), además de las características del medio como son la unidad de suelo, permeabilidad, estructura, tamaño de las partículas, contenido de humedad y de materia orgánica, así como la profundidad del manto freático. Factores climatológicos como la temperatura y la precipitación pluvial también tienen una gran influencia. Todas las variables en su conjunto definen el tamaño y la distribución tridimensional del frente de contaminación en una zona específica. Los compuestos orgánicos ligeros como las gasolinas, aceites y petróleo crudo tienden a formar una capa en forma de nata en el nivel freático y se mueven horizontalmente en dirección al flujo del agua subterránea. Los compuestos orgánicos densos, migran hacia la base del acuífero creando una columna a partir de la cual pueden moverse en dirección al flujo de agua subterránea, contaminando así el acuífero en toda su profundidad (Jury, 1989).

## Propiedades del suelo afectadas por hidrocarburos

Elías-Munguía y Martínez (1991) en Semarnat (1996), concluyeron que las propiedades físicas del suelo más afectadas por derrames de hidrocarburos son:

- La estructura del suelo debido a la ruptura de los agregados
- Aumento de la retención del agua en la capa superficial.
- El potencial hídrico.

Las propiedades químicas del suelo más afectadas por un derrame de hidrocarburos son (Semarnat, 1996):

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

Los hidrocarburos se pueden encontrar de la siguiente forma en el suelo (Luthy *et al.*, 1997).

- Líquida.
- Soluble en el agua del suelo.
- Adsorbidos por el suelo.
- En la atmósfera edáfica.

Los efectos tóxicos de los hidrocarburos en el suelo dependerán de (Luthy *et al.*, 1997).

- La cantidad y composición del petróleo.
- La frecuencia y tiempo de exposición.
- El estado físico del derrame.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del área de estudio

El suelo que se seleccionó para el estudio corresponde a un suelo contaminado de diesel a causa de un derrame ocurrido de este compuesto en 1999, cuando era transportado en tuberías subterráneas. El lugar afectado es una propiedad que pertenece a los ejidatarios del Ejido Nombre de Dios, municipio de Tlahualilo Durango a 10 Km de Bermejillo Durango. Las coordenadas geográficas son de 25 °, 58', 40" Lat N, 103 °, 39', 30" Long W. El laboratorio en el cual se trabajó fue en la Unidad Regional de Zonas Áridas – Universidad Autónoma Chapingo (URUZA – UACH) .

### Trabajo de campo

**Toma de muestras.** El método que se utilizó en el muestreo fue el cuadrante, lo cual consistió en seleccionar el sitio donde se tomaron las muestras del suelo contaminado con diesel , se trazó un cuadrante de 5X5 m (25 m<sup>2</sup>), donde se obtuvieron con un barreno sacabocado 10 muestras representativas de 1 kg cada una en diferentes puntos del cuadrante trazado a profundidades de 30 cm, fueron puestas en diferentes bolsas y etiquetadas respectivamente.

### Trabajo de Laboratorio

Las muestras fueron transportadas al laboratorio, donde se procedió a su reducción de tamaño, golpeándolas con un mazo de madera, cada muestra se cribó en un tamiz de malla No. 20. El suelo tamizado fue puesto nuevamente en sus bolsas y etiquetas respectivas. Enseguida se realizó la determinación del

Carbono (C) por el método de (Walkley Black, 1964), Nitrógeno (N) método (Kjeldahl, 1964) antes de la inoculación.

### **Aislamiento de microorganismos de suelos contaminados**

La estrategia para el aislamiento y cultivo de microorganismos consistió en lo siguiente:

**Extracción de los microorganismos del suelo.** Este procedimiento consistió en aislar microorganismos del suelo, mediante una técnica de extracción acuosa de 10 muestras representativas del suelo contaminado con diesel, como sigue: Se utilizaron 10 vasos de precipitado de 250 ml, a cada uno se le agregó 100 g del suelo tamizado, agua destilada o desmineralizada hasta que se sobresaturó, se dejaron reposar durante una hora, se filtró cada muestra, el extracto de suelo de cada muestra se guardó en 10 tubos de ensaye, se tapó correctamente con papel parafilm y se dejó en refrigeración y el extracto que sobro de cada muestra se vació en un vaso de precipitado de 250 ml. Se mezcló correctamente y se utilizaron 100 ml en la primera preparación de medio de cultivo sólido.

**Siembra en placa.** El procedimiento para la siembra sólida en placa es la siguiente: Se preparó medio de cultivo sólido, consistente en 10 gramos de Agar Bacteriológico marca BD Bioxon, 21 g de medio de cultivo Mueller Hinton Broth, 50 ml de Solución Madre de Microelementos, 100 ml del extracto de suelo contaminado con diesel. En un matraz de 1000 ml se agregó 10 g de agar bacteriológico, 21 g de medio de cultivo Mueller Hinton Broth, 50 ml de Solución Madre de Microelementos, se agitó rápidamente por 10 segundos y se agregaron los 100 ml del extracto de suelo contaminado con diesel, durante un minuto se agitó, se puso a baño maría a una temperatura de 90° C , hasta que se disolvió perfectamente, con guantes de asbesto se vació en dos vasos de

precipitado de 500 ml, se taparon perfectamente los matraces con tapones de algodón y gasa y se esterilizó en una olla de presión con manómetro o autoclave a una temperatura de 110 °C, durante 20 minutos, se dejó enfriar los medios de cultivo hasta llegar a una temperatura ambiente (aproximadamente 20° C) y se procedió a vaciar los medios en 20 cajas de petri desechables sin separadores esterilizadas, se dejaron solidificar. A cada caja de petri se le agregó 1 ml de extracto de las muestras representativas del suelo contaminado con diesel, se etiquetó cada una y se dejó durante un mes a temperatura ambiente hasta la aparición de colonias bacterianas. Antes del vaciado de los medios de cultivo se desinfectó perfectamente el lugar con alcohol al 96 %, hipoclorito de sodio al 1 %, se prendieron dos mecheros bunsen durante 30 minutos . La siembra de los microorganismos se realizó con el debido cuidado, utilizando bata limpia, cubre-boca, las manos limpias con lactofenol, se evitó hablar a la hora de la siembra y se estuvo lo más cerca posible de los mecheros bunsen para evitar posible contaminación del medio de cultivo, esto se llevo a cabo en el cuarto de siembras del laboratorio el cual esta diseñado para llevar a cabo dicha actividad.

**Aislamiento de cepas.** Se preparó medio de cultivo sólido, el procedimiento para la preparación de este medio es el mismo que el anterior. Después de la solidificación de los medios se procedió a inocular los microorganismos, en cada una de las cajas de petri con una asa de platino debidamente esterilizada, se tomó una pequeña cantidad de una colonia bacteriana y se sembró en el medio sólido por la técnica del zig-zag, se dejó durante siete días a temperatura ambiente hasta la aparición de colonias microbianas.

Una vez inoculado por la técnica de zig-zag, se dejó durante siete días a temperatura ambiente hasta la aparición de colonias microbianas, dichos microorganismos fueron resembradas en el mismo medio, tomando una asa de platino esterilizada e inoculando por el método de estrías, consistente en dividir la caja de Petri en cuatro partes, en el primer tercio de uno de los cuadrantes se

inocula con una asa de platino, se esteriliza el asa, una vez hecho esto, se toma una pequeña sección del cuadrante anterior y se prolonga la inoculación en el siguiente cuadrante. Se repite la misma acción y se prolonga en forma sigmoideal en los dos restantes cuadrantes. Se dejó durante siete días a temperatura ambiente hasta la aparición de colonias microbianas aisladas. Posteriormente las colonias microbianas aisladas fueron inoculadas en 20 tubos de ensaye con medios de cultivos sólidos. Se dejó a temperatura ambiente durante un mes, enseguida se mezclaron en una bolsa de 4 kg, 200 g de todas las muestras representativas del suelo contaminado con diesel y se tomaron 2 ½ kgs de dicho suelo, se utilizaron 18 vasos de precipitado de 100 ml, a cada vaso se le puso 200 gr del suelo y se agregaron los hidrocarburos líquidos: Diesel al 100 %, Hexano al 99.95 % y Xileno al 100 % en diferentes concentraciones Diesel a 0 (D<sub>0</sub>), diesel a 1 ml (D<sub>1</sub>), diesel a 2 ml (D<sub>2</sub>), diesel a 5 ml (D<sub>5</sub>), diesel a 10 ml (D<sub>10</sub>) y diesel a 20 ml (D<sub>20</sub>), Hexano a 0 (H<sub>0</sub>), hexano a 1 ml (H<sub>1</sub>), hexano a 2 ml (H<sub>2</sub>), hexano a 5 ml (H<sub>5</sub>), hexano a 10 ml (H<sub>10</sub>) y Hexano a 20 ml (H<sub>20</sub>), Xileno a 0 (X<sub>0</sub>), xileno a 1 ml (X<sub>1</sub>), xileno a 2 ml (X<sub>2</sub>), xileno a 5 ml (X<sub>5</sub>), xileno a 10 ml (X<sub>10</sub>) y xileno a 20 ml (X<sub>20</sub>), se dejaron a temperatura ambiente, durante un mes. Trascurrido este tiempo se prepararon 18 medios de cultivos líquidos Mueller Hinton con 20 ml del extracto acuoso de las muestras de suelo contaminado con Diesel, Hexano y Xileno y se realizó la inoculación con una asa de platino, se tomó de cada tubo de ensaye una pequeña cantidad de microorganismos aislados en los 20 tubos de ensaye con medios de cultivos sólidos, se dejaron a temperatura ambiente durante tres semanas, hasta la aparición de las colonias bacterianas aisladas. Después de haber obtenido este crecimiento bacteriano, se realizó la inoculación a medios de cultivos líquidos con los hidrocarburos diesel, hexano y xileno con las concentraciones mencionadas.

### **Siembra en medio selectivo**

Además para complementar el trabajo con una asa debidamente esterilizada se agarró pequeñas colonias bacterianas de cada una de los 18 medios de cultivos líquidos contaminados con hidrocarburos y se procedió a la inoculación en 20 cajas de petri desechables esterilizadas con medios de cultivos sólidos, esto con la finalidad de una mejor observación de las colonias microbianas existentes.

### **Prueba de confirmación**

- **Tinción de Gram.** En las cajas de petri con crecimiento bacteriano se observaron colonias de bacterias.

Con el propósito de ver la variación en la relación C:N se hicieron la determinación de Carbono Orgánico Total y la del Nitrógeno Total antes y después de la inoculación.

- **Determinación de Carbono Orgánico Total.** Se realizó la determinación de Carbono Orgánico Total por el método Walkley Black (1964) a las 18 muestras de medios de cultivos líquidos.
- **Determinación de Nitrógeno Total.** De la misma manera se realizó la determinación de nitrógeno total por el método de Kjeldahl (1964), a las 18 muestras de los medios de cultivos líquidos.

### **Parámetros de la degradación de los hidrocarburos**

Los datos obtenidos de la relación C:N se tomó en cuenta para la determinación del grado de destrucción de hidrocarburos por parte de los microorganismos. Para ello se restó el valor obtenido del testigo con los valores de los tratamientos. El criterio seguido es que valores menores a 150 que presente cada tratamiento indicará que hubo degradación, entre menor sea el valor obtenido mas degradación de hidrocarburos se detectarán (Burmeier, 1998).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento de los microorganismos biorremediadores

Los microorganismos aislados de los medios de cultivo fueron básicamente: *Pseudomonas* y *Streptomyces*.

En el Cuadro 1 se observa la relación C:N antes de la inoculación de los microorganismos en las muestras de suelo contaminado con diesel, en la cual se puede ver que en general la relación es baja, lo que indica que la concentración de diesel es menor por lo tanto hubo degradación de este hidrocarburo. Las razones por las cuales se dieron probablemente estos resultados son las siguientes: El tiempo en que ocurrió dicho derrame ha sido el suficiente para que de una manera natural por medio de la acción de los microorganismos nativos, como por mecanismos físicos y químicos poco a poco haya disminuido la cantidad de diesel en el suelo .

En el cuadro 2 se puede ver la relación C:N después de la inoculación de los microorganismos en medios líquidos contaminados con diesel, hexano y xileno, los resultados obtenidos indicaron que las cepas aisladas de los medios líquidos contaminados con diesel , fueron las que tuvieron menor porcentaje de degradación de este compuesto y solamente D<sub>20</sub> ml fue la que mostró una mayor actividad de biodegradación del hidrocarburo con una relación de C:N de 189.73.

En el Cuadro 3 los resultados obtenidos de los medios de cultivos líquidos contaminados con diesel, hexano y xileno indicaron que hubo una mayor degradación del hexano en las concentraciones de 5, 10 y 20 ml de este compuesto con valores de -83, -17 y -84, lo cual indica que estas cifras

negativas representaron una alta eficiencia de degradación del hexano a diferencia del diesel, esto es por que el hexano está compuesto por una molécula alifática de 6 carbonos, que en contraposición con el diesel, lo hace mas fácil de degradar. En cuanto al xileno la degradación de este compuesto también fue clara ya que todos los resultados de este compuesto fueron menores a 150, esto indica que los microorganismos *Pseudomonas* y *Streptomyces*, son altamente efectivos en la degradación del xileno.

En torno general el nivel de degradación de estos hidrocarburos fue mayor en el Hexano, luego el Xileno y Diesel.

**CUADRO 1. RELACIÓN C:N ANTES DE LA INOCULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN SUELO CONTAMINADO CON DIESEL**

<b>Muestras</b>	<b>Carbono %</b>	<b>Nitrógeno %</b>	<b>Relación C:N %</b>
M <sub>1</sub>	16.54	0.3976	41.60
M <sub>2</sub>	22.05	0.2772	79.54
M <sub>3</sub>	21.13	0.3612	58.50
M <sub>4</sub>	17.46	0.2184	79.94
M <sub>5</sub>	22.05	0.1778	124.01
M <sub>6</sub>	17.46	0.4872	35.83
M <sub>7</sub>	16.54	0.238	69.49
M <sub>8</sub>	17.46	0.4592	38.02
M <sub>9</sub>	34	0.6468	52.57
M <sub>10</sub>	36.76	0.7728	47.57

**CUADRO 2. RELACIÓN C:N DESPUES DE LA INOCULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS, EN MEDIOS LÍQUIDOS CONTAMINADOS CON DIESEL, HEXANO Y XILENO**

Muestras	Carbono %	Nitrógeno %	Relación C:N %
D <sub>0</sub>	3.67	0.0616	59.58
D <sub>1</sub>	22.05	0.098	225.0
D <sub>2</sub>	22.97	0.1092	210.35
D <sub>5</sub>	43.19	0.1176	367.26
D <sub>10</sub>	34.4.5	0.1008	341.85
D <sub>20</sub>	17	0.0896	189.73
H <sub>0</sub>	8.27	0.0672	123.06
H <sub>1</sub>	10.11	0.07	144.43
H <sub>2</sub>	13.78	0.0756	182.27
H <sub>5</sub>	3.67	0.0896	40.96
H <sub>10</sub>	11.03	0.1036	106.47
H <sub>20</sub>	2.76	0.07	39.43
X <sub>0</sub>	8.73	0.0924	94.48
X <sub>1</sub>	8.73	0.056	155.89
X <sub>2</sub>	12.4	0.1064	116.54
X <sub>5</sub>	12.86	0.0938	137.10
X <sub>10</sub>	13.32	0.1232	108.12
X <sub>20</sub>	13.78	0.1036	133.01

**CUADRO 3. DEGRADACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS INOCULADOS EN MEDIOS LÍQUIDOS CONTAMINADOS CON DIESEL, HEXANO Y XILENO**

<b>Diferencia</b>	<b>C:N</b>
$D_0 - D_0$	0
$D_1 - D_0$	168
$D_2 - D_0$	151
$D_5 - D_0$	308
$D_{10} - D_0$	282
$D_{20} - D_0$	130
$H_0 - D_0$	0
$H_1 - D_0$	21
$H_2 - D_0$	59
$H_5 - D_0$	-83
$H_{10} - D_0$	-17
$H_{20} - D_0$	-84
$X_0 - D_0$	0
$X_1 - D_0$	61
$X_2 - D_0$	22
$X_5 - D_0$	43
$X_{10} - D_0$	14
$X_{20} - D_0$	39

## CONCLUSIONES

1. En el presente estudio se logró aislar y seleccionar microorganismos biorremediadores un suelo contaminado con hidrocarburos.
2. Los microorganismos aislados del suelo contaminado con hidrocarburos corresponden a los géneros *Pseudomonas sp.* y *Streptomyces sp.*
3. Se pudo constatar que en el presente estudio, las cepas autóctonas aisladas fueron capaces de degradar hidrocarburos, siendo mayor su actividad con Hexano, seguido de Xileno y en menor proporción el Diesel, de acuerdo a la relación C:N registrada al final del período de crecimiento microbiano.

## SUGERENCIAS

- Se requiere hacer un estudio de cinética microbiana con variables de P:C:N, en diferentes niveles y fuentes.
- Se requiere hacer un estudio detallado de las condiciones de pH y temperatura de crecimiento óptimo de los microorganismos.
- Se requiere hacer estudios comparativos de cepas autóctonas contra cepas comerciales, así como estudios de consorcios de microorganismos en actividades de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, m. 1971. microbial ecology. j. Wiley y sons. USA.
- Ayllón t. t. y j. f. Chávez. 1994. México: sus recursos naturales y su población. Segunda edición. Limusa, México.
- Bojorquez, t. l. a. y García. 1995. Aspectos metodológicos de la auditoria ambiental. PEMEX: ambiente y energía los retos del futuro. Instituto de Investigaciones Jurídicas UNAM-PEMEX. pp 59-72.
- Burmeier H. 1998. Biorremediación of soil. In Kassem A. and P. naminperi. Methods in soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press. London Inglaterra.
- Chappin, R. G. y L. R. Summerlin. 1988. Química. Publicaciones Cultural. México.
- Díaz, D. M. 1995. El Régimen Jurídico Ambiental del Subsuelo en México.
- Diario Oficial de la Federación. 1996. Decreto que reforma, adiciona y deroga diversas disposiciones de la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente. Viernes 13 de diciembre: 5-36.
- Díaz, D. M. 1995. El Régimen Jurídico Ambiental del Subsuelo en México.
- EPA. 1983. Hazardous Waste land Treatment. Municipal Environmental Research Laboratory. Office of Research and Development. U.S.A. Cincinnati, Ohio.
- EPA. 1994. remediation technologies screening matrix and reference guide. prepared by the dod environmental technology transfer committe. segunda edición, octubre de 1994.
- Eweis, J.B, y Schroeder, E.D. 1998. bioremediation principles. McGraw-Hill International Editions. 296 pp.
- Gessner. G. Hawley. 1975. Diccionario de Química y de productos químicos. Ediciones OMEGA, Barcelona.
- Gutiérrez, E. M. 1990. Los residuos sólidos peligrosos: ¿ un riesgo sin solución?. ciencias. no. 20 UNAM.

- Jackson, M.L. 1964. Análisis químico de suelos. Traducción al español de J. Beltrán. Omega, Barcelona, España.
- Jury, W. A. 1989. Chemical Movement through Soil. Vadose Zone Modeling of Organic Pollutants. Stephen C. Hern, Susan M. Melancon. Lewis Publishers Inc. USA.
- Lee. 1989. Manual de Microbiología Agrícola. Texto Universitaria. Universidad Veracruzana, Xalapa Veracruz. México. 51p.
- PEMEX. 1988. El Petróleo. Gerencia de Información y Relaciones Públicas. México.
- PEMEX. 2000. Boletines de Prensa. Pemex. Boletín no. 75/2000. México.
- PROFEPA. 1999. Restauración de Suelos Contaminados. Grupo de trabajo sobre Restauración de Suelos Contaminados. Pagina web. México.
- Saval, b. s. 1995. Acciones para le remediación de suelos en México. Segundo minisimposio internacional sobre contaminantes del agua y suelo. instituto de ingeniería. UNAM.
- Saval, s. 1998. Biorremediación de suelos y acuíferos. Situación actual y perspectivas en México. sociedad mexicana de biotecnología y bioingeniería, a.c. vol.3, pp. 71-76.
- SEMARNAT 1996. Los Suelos de Tabasco Restauración, Conservación y Uso. Gobierno Constitucional del Estado de Tabasco.
- SEMARNAT, 2002. Comunicación Personal con Personal de la Dirección General de Manejo Integral de Contaminantes.
- Sellers, k., t.a pedersen, y fan, c. 1993. Review of Soil Mound Technologies for the Bioremediation of Hydrocarbon Contaminate Soil. en: Hydrocarbon Contaminate Soil, Vol. iii. Lewis publishers.
- Tölgyessy, j. 1993. Chemistry and Biology of Water, Air and Soil Environmental aspects. Elsevier. Czechoslovakia.
- Van deuren, j., wang, z. y ledbetter, j. 1997. Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3ª ed. Technology Innovation Office, EPA. <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.
- Williams, S. T. Goodfellow, m. and alderson, g.: genus streptomyces waksman

and henrici 1943, 339 al, 2452-2492. in: s. t. williams, m. e. sharpe. j. g. holt (ed.), bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 4. williams y wilkins, baltimore, 1989.

Yu WI, CW, wang dy. *Serratia marcescens* bacteremia: clinical features and antimicrobial susceptibilities of the isolates. j microbiol inmunol infect 1998; 31(3):171-9 rev. chil. infectol. v.19 n.4 santiago 2002.

Zechendorf, B. 1999. Sustainable Development : How Can Biotechnology Contribute?. tibtech. 17, pp. 219-225.

**APÉNDICE**

## DETERMINACIÓN DE CARBONO ORGÁNICO TOTAL ANTES DE LA INOCULACIÓN

El carbón orgánico total tiene a través de la materia orgánica una acción en la estabilidad estructural y la capacidad de intercambio, el desarrollo de los microorganismos.

El objetivo de la determinación del carbón orgánico total es obtener la concentración en carbón orgánico, para sacar la relación C:N a fin de determinar el grado de formación, la evolución de un suelo y la disponibilidad del nitrógeno para las plantas y los microorganismos según método (Walkley Black, 1964).

En una balanza analítica se pesó 0.500 g de las 10 muestras de suelo tamizado, se utilizaron 11 matraces erlenmeyer de 500 ml, a cada una se le agregó 0.500 g de suelo, a excepción del blanco que se determina para ponderar los valores de posibles contaminantes de carbono de los reactivos utilizados en el análisis químico, 10 ml de Dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) 1N con una pipeta volumétrica, se agitó durante diez segundos. Con una probeta de 50 ml se le añade a cada matraz erlenmeyer 20 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado, se agitó cuidadosamente durante un minuto. Se dejaron reposar hasta que se enfriaron. A cada una se le añadió 200 ml de agua destilada, se agitó y se dejó enfriar. Se les agregó 10 ml de ácido fosforico ( $H_3PO_4$ ), 0.1gr de NaF y 20 gotas de indicador de difenilamina. Se tituló con sulfato ferroso ( $FeSO_4$ )<sub>2</sub> al 0.5 N. Al mismo tiempo se determino un blanco para ponderar los valores de posibles contaminantes de carbono de los reactivos utilizados en el análisis químico, el procedimiento es el mismo, la única diferencia es que no se le agregó suelo.

## DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL

El objetivo de la determinación del nitrógeno total es dar una idea de las reservas del suelo en nitrógeno y obtener la relación C:N, que tiene importancia para conocer el grado de evolución de la materia orgánica y la disponibilidad del nitrógeno para los microorganismos y las plantas según método (Kjeldahl, 1964).

En una balanza analítica se peso 5 g de suelo tamizado de cada una de las 10 muestras representativas, se envolvió correctamente con papel filtro Whatman No. 41, para evitar que la tierra se tirara, después se introdujo cada una en un matraz Kjeldahl de 800 ml, posteriormente se le agregó 1 g de mezcla digestora y 25 mL de  $H_2SO_4$ , se mezcló por medio de rotación y procedió a la digestión. Cuando toda la materia orgánica se oxidó y apareció un color amarillento, verdoso o café paja se dejó enfriar, esto indicó que la digestión finalizó, posteriormente se le agregó a cada una 8 perlas de vidrio, 5 granadas de zinc, 200 ml de agua destilada y 100 ml de NaOH al 40% agregándolo poco a poco debido a la reacción que ocurre (se calienta) y se procedió a la destilación. Esto se llevo a cabo en matraz Erlenmeyer de 300 ml, a las cuales se les agregó a cada una 50 mL de  $H_3BO_3$  al 4% y 10 gotas de indicador de rojo de metilo y verde de bromocresol, la destilación finalizó cuando se logro un volumen aproximado de 200 ml, posteriormente se tituló con  $H_2SO_4$  0.05 N. "El vaso de precipitado debe recibir tanto el gas como el líquido destilado para evitar que escape el amoniacó. "

Al mismo tiempo se determino un blanco para ponderar los valores de posibles contaminantes de nitrógeno de los reactivos utilizados en el análisis químico, el procedimiento es el mismo, la única diferencia es que no se le agregó suelo.

## TINCIÓN DE GRAM

La realización de la tinción de Gram consistió en lo siguiente (Lee, 1989):

1. Se realizó el frotis de cada una de las sepas y se dejó secar al aire.
2. Se fijó el frotis al calor.
3. Se cubrió el frotis con cristal violeta y se dejó actuar por 1 minuto, se escurrió el colorante y se lavó con un chorro de agua corriente.
4. Se cubrió el frotis con lugol, dejándolo actuar por 1 minuto, se escurrió y se lavó con agua corriente.
5. Se decoloró con alcohol – acetona (de 5 a 15 Segundos) y se lavó con agua.
6. Se cubrió el frotis con safranina, se dejó actuar por 1 minuto, se escurrió y se lavó con agua corriente.
7. se secó al aire.
8. Se observó las preparaciones al microscopio con el objetivo de inmersión.

Cantidad de mL utilizados para la titulación en la determinación del porcentaje y la relación del C/N antes de la inoculación de los microorganismos.

**CUADRO 1. RELACIÓN C:N ANTES DE LA INOCULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN SUELO CONTAMINADO CON DIESEL**

Muestras	mm de FeNH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> gastados (Titulación)	Carbono %	mm de FeNH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> gastados (Titulación)	Nitrógeno %	Relación C:N
Blanco	19.9	0	4.6	0	0.0
M <sub>1</sub>	18.1	16.54	18.8	0.3976	41.60
M <sub>2</sub>	17.5	22.05	14.5	0.2772	79.54
M <sub>3</sub>	17.6	21.13	17.5	0.3612	58.50
M <sub>4</sub>	18	17.46	12.4	0.2184	79.94
M <sub>5</sub>	17.5	22.05	10.95	0.1778	124.01
M <sub>6</sub>	18	17.46	22	0.4872	35.83
M <sub>7</sub>	18.1	16.54	13.1	0.238	69.49
M <sub>8</sub>	18	17.46	21	0.4592	38.02
M <sub>9</sub>	16.2	34	27.7	0.6468	52.57
M <sub>10</sub>	15.9	36.76	32.2	0.7728	47.57

#### Formula para determinar el porcentaje del Carbono Total

$$\% C = \frac{(T_s - T_o)}{W} \quad (3.4)$$

Donde:

T<sub>s</sub>= Volumen gastado

W= Peso de la muestra

T<sub>o</sub>= Blanco

#### Formula para determinar el porcentaje de N<sub>2</sub> total

$$\% N = \frac{(A - B)}{P} \times 10 \quad 1.4$$

Donde:

A= es el volumen gastado en la titulación    B= Blanco    P= Peso de la muestra.

**CUADRO 2. RELACIÓN C:N DESPUES DE LA INOCULACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS, EN MEDIOS LÍQUIDOS CONTAMINADOS CON DIESEL, HEXANO Y XILENO**

Muestras	mm de FeNH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> gastados (Titulación)	Carbono %	mm de FeNH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> gastados (Titulación)	Nitrógeno %	Relación C:N
D <sub>0</sub>	19.3	3.67	2.6	0.0616	59.58
D <sub>1</sub>	17.3	22.05	3.9	0.098	225.0
D <sub>2</sub>	17.2	22.97	4.3	0.1092	210.35
D <sub>5</sub>	15	43.19	4.6	0.1176	367.26
D <sub>10</sub>	12.2	34.4.5	4	0.1008	341.85
D <sub>20</sub>	16	17	3.6	0.0896	189.73
H <sub>0</sub>	18.8	8.27	2.8	0.0672	123.06
H <sub>1</sub>	18.6	10.11	2.9	0.07	144.43
H <sub>2</sub>	18.2	13.78	3.1	0.0756	182.27
H <sub>5</sub>	19.3	3.67	3.6	0.0896	40.96
H <sub>10</sub>	18.5	11.03	4.1	0.1036	106.47
H <sub>20</sub>	19.4	2.76	2.9	0.07	39.43
X <sub>0</sub>	17.8	8.73	3.7	0.0924	94.48
X <sub>1</sub>	17.8	8.73	2.4	0.056	155.89
X <sub>2</sub>	17	12.4	4.2	0.1064	116.54
X <sub>5</sub>	16.9	12.86	3.75	0.0938	137.10
X <sub>10</sub>	16.8	13.32	4.8	0.1232	108.12
X <sub>20</sub>	16.7	13.78	4.1	0.1036	133.01

**Nota:** En algunos medios de cultivos inoculados (D<sub>10</sub>, D<sub>20</sub>, X<sub>0</sub>, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>20</sub>) se utilizó 1 mL de estos para la determinación del % de carbono y la diferencia se aplicó en la formula.

#### Formula para determinar la relación C:N

$$\frac{\% \text{ C}}{\% \text{ N}}$$

donde:

% C= Porciento de carbono

% N= Porciento de nitrógeno

## Formula para determinar la degradación de los hidrocarburos inoculados

$$D_1 - D_0$$

Donde:

$D_1$ = Muestra inoculada

$D_0$ = Testigo

La muestra inoculada menos el blanco indicaran el grado de degradación de los hidrocarburos.

### DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

**Agar Bacteriológico marca BD Bioxon:** Se usa en la preparación de medios de cultivo microbiológicos sólidos y semisólidos. También puede usarse en concentraciones menores como retardante de la penetración del oxígeno en medios líquidos.

**Esterilización:** Se conoce como esterilización al proceso de destruir a todos los microorganismos viables de un medio de cultivo, aunque técnicamente esto solo es posible para volúmenes pequeños, ya que cuando se trata de volumen grandes (como fermentadores industriales) existe la posibilidad de encontrar un microorganismo viable. El objetivo de esta práctica es el de preparar adecuadamente los diversos materiales de vidrio e instrumental para su uso en el laboratorio de Microbiología.

**Medio de cultivo:** Se conoce como medio de cultivo a una mezcla de nutrientes hecha especialmente para favorecer el crecimiento de los microorganismos y para que produzcan nuevas células, el medio de cultivo es una fuente de energía que puede ser un compuesto orgánico o inorgánico. Los medios de cultivo que se usan en los laboratorios de microbiología, usualmente se preparan a partir de medios deshidratados, sin embargo otros medios que