



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



MAESTRÍA EN INGENIERÍA AMBIENTAL Y TECNOLOGÍAS SUSTENTABLES

DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO EN FASE ACUOSA MEDIANTE EL
USO DE CULTIVOS SECUENCIALES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN INGENIERÍA AMBIENTAL Y TECNOLOGÍAS SUSTENTABLES

PRESENTA

ING. QUÍMICA SILVIA JANNET LUGO GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL : DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ

CO-ASESOR : DR. DANIEL MORALES GUZMÁN

COMITÉ TUTORAL: DRA. LOYDA ALBAÑIL SÁNCHEZ
DRA. FERNANDA MORALES GUZMÁN
DRA. AVE MARÍA COTERO VILLEGAS

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE, 2023.

AGRADECIMIENTOS

A la facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería por permitirme realizar el posgrado en sus instalaciones. Al igual al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su financiamiento a lo largo de este proyecto .

A la Dra. Constanza Machín Ramírez por brindarme la oportunidad desde un inicio del posgrado a formar parte de su línea de investigación , que siempre mostró su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida , por su rectitud en su profesión fomentado la investigación, en el tiempo que estuvo a cargo de mi proyecto , sus consejos y conocimientos fueron gratos para continuar hasta el fin a pesar de las adversidades me motivo a seguir adelante siempre.

A la Dra. María del Refugio Trejo Hernández porque en el momento mas crítico de mi proyecto me abrió las puertas de su laboratorio de investigación y asumió la responsabilidad de apoyarme a continuar en la parte de desarrollo experimental , que a pesar del poco tiempo que tuve de estar trabajando con ella , reconozco su enorme dedicación y responsabilidad a su trabajo.

Al Dr. Daniel Morales Guzmán por todo su apoyo, paciencia y acompañamiento durante el proyecto , así como su conocimiento en todo lo que compete al laboratorio .

A mi comité tutorial por su apoyo en cuanto a las mejoras del proyecto de investigación a través de sus conocimientos rigurosos y precisos , así como sus correcciones en el escrito para una mejor redacción del documento .

DEDICATORIAS

A Dios y la Virgen.

Por brindarme el privilegio de vivir , por darme sabiduría , capacidad, tolerancia y haberme acompañado durante estos dos años de posgrado , por ser mi fortaleza y mi Fe en los momentos de debilidad para realizar y alcanzar un triunfo profesional lleno de aprendizajes y experiencias.

A mis padres.

Por apoyarme en todo momento a pesar de sus condiciones de salud, por creer en mi y haber fomentado en mi persona , una educación llena de amor , principios y valores , por la motivación que recibí a continuar con mi crecimiento profesional , gracias por existir y ser mi ejemplo a seguir mis grandes guerreros , que Dios los bendiga y guarde para siempre .

A mis hermanos.

Por el apoyo , cariño , confianza y comprensión que me brindaron de manera incondicional , porque gracias a sus consejos me motivaron a lograr superarme.

A mi abuelo y Tia.

Porque a pesar de que ya no se encuentran físicamente conmigo , me protegen y bendicen desde el cielo , y es por ello que siempre están presentes en mi corazón , gracias por haber creído en mi hasta su ultimo momento.

A mis amigos .

Por sus alegrías, cariño , apoyo moral a nunca desistir y por estar pendiente de mi , los quiero mucho .

A la Dra. Constanza

Porque mas que una tutora , fue una amiga que estuvo pendiente de mi , hasta el ultimo momento de su vida ,seguramente donde ella se encuentra esta feliz porque hoy se cumple uno de sus proyectos.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. ANTECEDENTES.....	9
2.1. Biorremediación.....	9
2.1.2. Potencial de la Biorremediación.....	10
2.2. Microorganismos biorremediadores:.....	13
2.3. Cultivos secuenciales.....	17
2.3.1. Ventajas de emplear cultivos secuenciales en la degradación Hidrocarburos de Petróleo.....	18
Cultivos secuenciales v/s Hongos.....	19
3. MARCO TEÓRICO.....	21
3.1. Contaminación por HPs en México.....	21
3.2. Contaminación de acuíferos por hidrocarburos de petróleo.....	23
3.3. Contaminación del suelo por hidrocarburos de petróleo.....	24
3.4. Hidrocarburos de petróleo (HPs).....	27
3.4.1. Queroseno.....	29
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	35
5. JUSTIFICACIÓN.....	37
6. HIPÓTESIS:.....	39
7. OBJETIVO GENERAL:.....	39
7.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
8. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	40
9. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	41
10. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
10.1. Caracterización fisicoquímica del suelo.....	43
10.1.2. Tamizado.....	43
10.2. Caracterización microbiológica.....	44
10.2.1. Cuenta viable. (Unidades Formadoras de Colonias).....	46
10.2.2 Bacterias totales por dilución en placa.....	48
10.2.3. Aislamiento de Bacterias.....	49
10.2.4. Hongos totales por dilución en placa.....	50
10.2.5. Aislamiento de hongos.....	50
10.2.6. Morfología de bacterias.....	51
10.2.7. Identificación de bacterias.....	54
10.2.8. Morfología de hongos.....	55
10.2.9. Identificación de hongos.....	56
10.3. Preparación del inóculo.....	57
10.4. Aclimatación.....	60
10.4.1. Bacterias.....	60

10.4.2. Hongos	61
10.5. Técnicas analíticas para la cuantificación de la biorremediación de hidrocarburos de petróleo	63
10.5.1. Degradación del hidrocarburo queroseno por las cepas de bacterias y hongos	63
10.5.2. Extracción orgánica y cuantificación de HAP's	64
10.5.3. Análisis por cromatografía de gases	64
11. RESULTADOS	66
11.1. Caracterización microbiológica	66
11.1.1. Bacterias totales por dilución en placa	66
11.1.2. Hongos totales por dilución en placa	67
11.2. Morfología y Tinción Gram	67
11.2.1. Bacterias	68
11.2.3. Hongos	71
11.3. Cuantificación y Extracción de las Cepas de Bacterias y Hongos	75
11.4. Perfiles cromatográficos obtenidos de la biodegradación de los HPs por hongos y bacterias	76
11.5. Cuantificación y Extracción del Cultivo Secuencial	82
11.6. Análisis cromatográfico de cultivo secuencial	82
11.7. Prueba t de Student: muestras relacionadas	83
11.7.1. Estadístico de prueba:	83
11.7.2. Comparaciones múltiples	84
11.8. Prueba de Tukey	84
12. DISCUSIÓN	87
13. CONCLUSIONES	89
13. BIBLIOGRAFIA Y FUENTES CONSULTADAS	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 . Imagen de derrame de petróleo Achaca Pemex, Tabasco 2019.....	22
Figura 2 . Imagen de la muerte de fauna (Delfines) a causa de derrames de Hidrocarburos de Petróleo en las aguas marinas.	24
Figura 3 . Composición de un perfil típico del suelo	26
Figura 4 . Hidrocarburo de petróleo (queroseno).....	30
Figura 5 . Estructuras químicas de diferentes compuestos mayoritarios del petróleo (Speight,1991).....	33
Figura 6 . Estrategia experimental propuesta para el proyecto.	41
Figura 7 . Suelo tamizado.	43
Figura 8 . Realización del conteo en placa	47
Figura 9 . Proceso de las diluciones seriadas hasta el volumen transferido a las cajas petri	48
Figura 10 .Esquema de la tinción de gram es un tipo de tinción diferencial	55
Figura 11 Tinción de hongos	57
Figura 12. Inóculo de las bacterias	58
Figura 13 .Conservación de las bacterias	58
Figura 14 . Preparación de inóculos fúngicos	59
Figura 15 . Preparación de muestras de biomasa bacteriana para su conservación	59
Figura 16 . Aclimatación de las bacterias	61
Figura 17 . Aclimatación de los hongos	62
Figura 18 . Bacterias y hongos que presentaron mayor crecimiento en la aclimatación	63
Figura 19 . Perfil cromatográfico de la fracción aromática de la bacteria 1	76
Figura 20 . Perfil cromatográfico de la fracción aromática de la bacteria 2	77
Figura 21 . Perfil cromatográfico de la fracción aromática de la bacteria 6	78
Figura 22 .Perfil cromatográfico de la fracción aromática del hongo 1	79
Figura 23 . Perfil cromatográfico de la fracción aromática del hongo 2	80
Figura 24 . Perfil cromatográfico de la fracción aromática del hongo 5	81
Figura 25 . Perfil cromatográfico de la fracción aromática del cultivo secuencial(bacteria 2 y hongo 5).....	83

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 . Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación, clasificadas de acuerdo con el tipo de tratamiento. (Volke y Tania 2002)	13
Tabla 2 . Bacterias que degradan los hidrocarburos de petróleo.	15
Tabla 3 . Hongos reportados que degradan los hidrocarburos de petróleo	16
Tabla 4 . Consorcios microbianos secuenciales que degradan los hidrocarburos de petróleo.	19
Tabla 5 . Clasificación general de los componentes del petróleo Speight, 1991.	28
Tabla 6 . Principales derrames de petróleo en el mundo. La Jornada Ecológica (2010)	30
Tabla 7 . Principales fracciones del petróleo (rango de ebullición).	34
Tabla 8 . Características Macroscópicas	68
Tabla 9 . Características macroscópicas y microscópicas de bacterias.	69
Tabla 10 .Tabla de morfología macroscópica de cepas de hongos	71
Tabla 11 .Tabla de morfología microscópica de cepas de hongos	72
Tabla 12 .Resultados de la biodegradación de cepas de las bacterias aisladas a los 7 y 15 días de incubación.	75
Tabla 13 .Resultados de la biodegradación de cepas de los hongos aislados a los 7 y 15 días de incubación	75
Tabla 14 .Resultados de la biodegradación de cepas del cultivo secuencial.	82
Tabla 15 Prueba t para medias de dos muestras emparejadas	83
Tabla 16 .Análisis de varianza de un factor	84

1. INTRODUCCIÓN.

Uno de los problemas más serios a nivel mundial, es la contaminación de suelos y acuíferos con petróleo y sus derivados. Aunado a los efectos tóxicos que produce sobre la flora y fauna de un hábitat determinado, este contaminante puede ser transportado en el ambiente por diversos mecanismos naturales (precipitaciones pluviales, lixiviación, etc.), incrementando el riesgo a la exposición y a la salud.

El agua es imprescindible para la conservación de la vida en el planeta. Actualmente la contaminación creciente de los cuerpos de agua, así como la escasez de fuentes de agua potable , son problemas que demandan urgente atención desde varias aristas del conocimiento. La aplicación de la Biotecnología, como herramienta que permite el uso sostenible de organismos o sus bioproductos, constituye una alternativa para atender la contaminación de acuíferos. La restauración de aguas residuales o contaminadas permitiría su reutilización para diferentes sectores que consumen grandes volúmenes, tales como el uso doméstico, industrial y agrícola.

Se considera que la liberación de hidrocarburos en el medio ambiente ya sea accidental o debido a actividades humanas es la causa principal de la contaminación del agua y el suelo.

La contaminación del agua con hidrocarburos es un problema medioambiental que ocasiona daños ecológicos de un gran impacto en diferentes ámbitos. Una de las principales fuentes de contaminación por estos contaminantes se genera por los derrames o vertidos, los cuales pueden ser accidentales o provocados.

Las regiones con operación petrolera son vulnerables a contaminación por petróleo por actividades de exploración, transporte, y refinación del crudo, y es por ello por lo que es de vital importancia realizar investigaciones científicas que busquen la solución o mitigación de la contaminación por petróleo en los ecosistemas

La contaminación del suelo ha venido en gran parte como resultado de la exploración, explotación, refinación, almacenamiento y distribución de petróleo crudo y sus derivados. De acuerdo con lo anterior es necesario encontrar opciones factibles para tratamiento de suelos contaminados.

Los hidrocarburos pueden generar daños de sistema local, ya que la acumulación de contaminantes en animales y tejidos vegetales puede causar la muerte o posibles mutaciones.

Los compuestos en las diferentes fracciones de los hidrocarburos de petróleo afectan a la salud de manera diferente. Algunos de ellos como el benceno, tolueno y xileno (que se encuentran en la gasolina), pueden afectar el sistema nervioso de los seres humanos. La inhalación de concentraciones altas de benceno (100 ppm) durante varias horas puede producir fatiga, dolor de cabeza náusea. La ingestión de algunos derivados de petróleo tales como la gasolina y keroseno, producen irritación en la garganta y el estómago, depresión en el sistema nervioso, dificultad para respirar y neumonía debido al paso de líquido hacia los pulmones.

Los vertidos de hidrocarburos originan diferentes problemas fisiológicos y/o bioquímicos en los organismos afectados. Estos impactos van a tener consecuencias sobre su viabilidad y éxito reproductivo, pueden provocar alteraciones genéticas. Todos estos impactos determinan cambios en la eficacia biológica de los organismos afectados, y por lo tanto generan respuestas demográficas (cambios en el tamaño y crecimiento de las poblaciones de cada especie). Estos cambios en las poblaciones, junto con las modificaciones en hábitat en que se encuentran, generaran cambios en las relaciones entre los diferentes componentes de los ecosistemas.

Los hidrocarburos aromáticos (tolueno, naftaleno, benzopireno, fenantreno) son los más tóxicos: tienden a acumularse en las grasas y por ello son difícilmente eliminables por el organismo.

Se considera que el petróleo es la fuente principal de energía para la sociedad, este compuesto y sus productos de refinación no son sustancias específicas y únicas, ya que contiene una mezcla de hidrocarburos y otros compuestos cuyas propiedades físicas y químicas son tan variadas, las cuales tienen un impacto ambiental en el cual se debe realizar una investigación y caracterización de la contaminación para evaluar los daños e implementar una correlación ambiental efectiva.

En México, la industria petrolera ha realizado diversas investigaciones en esta área en los últimos años. Petróleos Mexicanos (PEMEX), con ayuda del Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), ha sostenido una búsqueda de medidas efectivas en términos de costo-beneficio para recuperar algunos de los sitios contaminados más problemáticos en el sureste mexicano, especialmente en los estados de Veracruz, Tabasco, Chiapas y Campeche, en los cuales se ubica un gran número de pasivos ambientales. Algunas de estas medidas contemplan el uso de procesos que sean amigables con el ambiente, de bajo costo y efectivos, como lo son los procesos de biorremediación de suelos y acuíferos (Ledesma y col, 1994).

El proceso más importante para eliminar los hidrocarburos no volátiles presentes en el medio acuático es la biodegradación, en el cual, mediante la acción de algunos microorganismos, se degradan los compuestos hasta la mineralización, obteniéndose oxígeno, dióxido de carbono y agua (Paniagua y Rosales, 2015).

Es por esa razón que el estudio de microorganismos con potencialidades de degradar el petróleo y sus derivados ha aumentado notablemente, más si se trata de la búsqueda de cepas capaces de degradar compuestos recalcitrantes.

En términos generales se considera que la biorremediación ha demostrado ser una tecnología de bajo costo, además de que no requiere técnicas sofisticadas para su funcionamiento y ha demostrado su eficiencia en el tratamiento de contaminación por hidrocarburos, ya que esta técnica utiliza diferentes tipos de bacterias y hongos que son capaces de sobrevivir y degradar a estos compuestos tóxicos .

Dada la problemática que existe en México por la contaminación de suelos y acuíferos con hidrocarburos de petróleo, el presente trabajo de investigación se centra en la implementación de un proceso de biodegradación de estos contaminantes en un sistema acuoso, utilizando cultivos secuenciales de hongos y bacterias. Se pretende obtener una alternativa de solución a la problemática ambiental en nuestro entorno, así como profundizar en el conocimiento de la diversidad microbiana y de la dinámica de sus poblaciones en consorcios biodegradables.

2. ANTECEDENTES.

Desde la década de 1980, surgió el término de biorremediación. Los científicos observaron que era posible aplicar estrategias de remediación que fuesen biológicas, basadas en la capacidad de los microorganismos de realizar procesos degradativos. Las primeras experiencias que se tuvieron sobre biorremediación fueron con el petróleo, seguidas en su aplicación a algunos compuestos organoclorados y otras observaciones de los compuestos organofosforados. Posteriormente su aplicación fue extendiéndose a su uso para el tratamiento de suelos y acuíferos contaminados con un amplio espectro de contaminantes.

Muchos autores han demostrado que los microorganismos, sobre todo algunas bacterias, podían utilizar a los contaminantes como fuente de carbono y energía. Asimismo, el uso de plantas es una alternativa debido a su asociación con la rizosfera lo que permite realizar procesos de remoción de diversos contaminantes y metales.

2.1. Biorremediación.

La biorremediación consiste en el uso de microorganismos o sus bioproductos para la restauración de ecosistemas impactados con xenobióticos y/o contaminantes emergentes. Esta tecnología permite degradar parcial o totalmente los contaminantes orgánicos presentes en matrices de suelo, agua o aire; o movilizar contaminantes inorgánicos, como los metales pesados, para garantizar procesos de mitigación y restauración ambientales. La biorremediación es una biotecnología poderosa que permite frecuentemente la transformación biológica de moléculas orgánicas complejas con elevada o potencial toxicidad, en moléculas orgánicas más simples y menos tóxicas (Alarcón y Ferrera, 2013).

La Biorremediación es una herramienta que consiste en la explotación de actividades biológicas para la mitigación, y si es posible, la eliminación completa de los efectos nocivos causados por los contaminantes ambientales en un sitio determinado y puede llevarse a cabo mediante el uso de diferentes organismos desde bacterias. (De Lorenzo y Wood, 2008).

Otra definición específica de la biorremediación consiste en un conjunto de metodologías que utilizan microorganismos o parte de ellos seleccionados naturalmente o por modificaciones de la ingeniería genética para degradar sustancias que se han trasladado a un lugar que no corresponde o están en cantidades no recomendables como resultante de un proceso productivo mal manejado o de un incidente natural.

2.1.2. Potencial de la Biorremediación.

La biorremediación es un método especialmente atractivo de restauración por varias razones: 1) el costo es menos elevado en comparación con otras tecnologías alternativas; 2) es natural y normalmente no requiere el uso de agentes químicos (como solventes) y 3) tiene el potencial de transformar los contaminantes a productos no peligrosos o los biodegrada completamente.

Para que la biorremediación sea factible se debe considerar como de primordial importancia a los microorganismos que son capaces de producir enzimas que degradan al compuesto deseado.

También es importante considerar una fuente de energía, un aceptor de electrones (ya que los microorganismos ganan su energía a través de reacciones redox), humedad apropiada, el pH, la temperatura y los nutrientes necesarios para el crecimiento celular (Cookson, 1995).

El uso de tecnologías de biorremediación presenta varias ventajas respecto a otras técnicas alternativas para eliminar los compuestos contaminantes como son los tratamientos físicos o químicos tradicionales (Blasco y Castillo, 2014).

Dentro de las ventajas que podemos destacar en esta tecnología de la Biorremediación son las siguientes:

- Los productos formados son generalmente inocuos o menos tóxicos.
- Bajos costos de instalación y operación.

- Tratamiento seguro con un mínimo riesgo a la salud y al ambiente.
- Tecnología aplicable y efectiva.

Las tecnologías de remediación pueden clasificarse de diferentes maneras, con base en los siguientes principios:

1. Estrategia de remediación.
2. Lugar en que se realiza el proceso de remediación.
3. Tipo de tratamiento.

Es importante mencionar que cada una de estas clasificaciones proporciona diferente información acerca de las tecnologías de remediación. (Van Deuren et al., 1997).

1. Estrategia de remediación. Incluye tres estrategias básicas que pueden usarse separadas o en conjunto, para remediar la mayoría de los sitios contaminados:

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

2. Tipos de remediación. En general, se distinguen dos tipos de tecnología.

- a) *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.

- b) *Ex situ*. La realización de este tipo de tecnologías requiere de excavación, dragado 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*).

3. Tipo de tratamiento. Esta clasificación se basa en el principio de la tecnología de remediación y se divide en tres tipos de tratamiento:

- a) 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.
- b) 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.
- c) Tratamientos térmicos. Utilizan calor para incrementar la volatilización (separación), quemar, descomponer o fundir (inmovilización) los contaminantes en un suelo.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación, clasificadas de acuerdo con el tipo de tratamiento. (Volke y Tania 2002)

	Ventajas	Desventajas
Tratamiento biológico	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Son económicos en cuanto a costo. ▪ Son tecnologías más benéficas para el medio ambiente. ▪ Los contaminantes son totalmente destruidos. ▪ Se requiere un mínimo o ningún tratamiento posterior. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Requieren mayores tiempos de tratamientos. ▪ Es necesario revisar la toxicidad del intermediario y/o productos. ▪ No pueden usarse si el tipo de suelo no favorece al crecimiento microbiano.
Tratamiento fisicoquímico	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Son efectivos en cuanto a costo. ▪ Pueden realizarse en periodos cortos. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Los residuos generados por técnicas de separación deben, tratarse o disponerse: aumento en costos y necesidad de permisos. ▪ Los fluidos de extracción pueden aumentar la movilización de los
Tratamiento térmico	Tiempos rápidos de limpieza.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Es el grupo de tratamiento mas costoso. ▪ Intensivos en mano de obra y capital.

2.2. Microorganismos biorremediadores:

Estos microorganismos, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, poseen la capacidad de utilizar diferentes compuestos tóxicos (xenobióticos) como fuente de carbono, sin embargo, su densidad poblacional es limitada en sitios no contaminados y se incrementa en ambientes impactados por un contaminante (Núñez, 2003).

Entre los organismos vivos que se utilizan en las tecnologías de biorremediación, las bacterias representan el grupo microbiano más activo por su variedad de géneros y especies y por la versatilidad metabólica que poseen. Las poblaciones mixtas, denominadas consorcios o cohortes microbianas, demuestran mayor acción biodegradativa por sus actividades especializadas y por la acción cooperativa de la población mixta. Los géneros bacterianos degradadores de xenobióticos más comunes tanto en suelos como en aguas son: *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Nocardia* y *Pseudomonas* spp. (Leahy y Colwell, 1990).

Los microorganismos pueden degradar los contaminantes en forma de cultivos puros, mixtos o consorcios que generalmente resultan más eficientes que un cultivo puro. En los consorcios se establecen interacciones complejas entre las especies microbianas, por ejemplo, en una mezcla de poblaciones microbianas, los consumidores primarios inician el proceso de degradación y los consumidores secundarios utilizan los productos metabólicos de los primeros para degradarlos, además pueden facilitar el crecimiento de los primarios, suministrándoles productos metabólicos (como factores de crecimiento), eliminando tóxicos mediante cometabolismo. La adaptación o aclimatación de una comunidad microbiana a un contaminante dado, determina la rapidez con la que el compuesto puede ser transformado y mineralizado (Alexander, 1999).

Estos grupos, particularmente las bacterias y hongos, poseen la mayor diversidad genética y metabólica de los seres vivos (Su et al., 2008) y son capaces de habitar prácticamente cualquier ecosistema y adaptarse rápidamente a condiciones ambientales anómalas y dinámicas, debido a su rápido crecimiento y estrategias adaptativas, como el intercambio de elementos genómicos. La habilidad para degradar HPs no está restringida a pocos géneros microbianos ni a ambientes específicos. Se ha demostrado que un grupo diverso de bacterias, hongos y algas, poseen esta capacidad degradadora. Ya en la década de los 70's Bartha y Atlas (1977) encontraron 22 géneros de bacterias, 1 de algas y 14 de hongos, capaces de utilizarlos, todos ellos aislados de ambientes acuáticos.

Los géneros más importantes que encontraron (de acuerdo con la frecuencia de aislamiento), fueron *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Candida*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*.

Tabla 2. Bacterias que degradan los hidrocarburos de petróleo.

Nombre de la bacteria	Fracción que degradan	Autor
<i>Aeromonas</i> <i>Beijerinckia</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Pseudomonas</i>	Compuestos aromáticos policíclicos	Cookson (1995)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Hidrocarburos aromáticos	Rockne y Sanford (2000)
<i>Pseudomona fluorescens</i>	Naftaleno Asfaltenos	Rockne y Sanford (2000)
<i>Micrococcus</i>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Altamirano y Pozzo (2000)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	Isooctano	Floriane et al., (2000)
<i>Sphingomona wittichi</i>	2,7 diclobenceno	Nannipiery et al., (2001)
<i>Pseudomonas putidas</i>	Tolueno Xileno	Nelson et al., (2002)
<i>Acinetobacter</i>	Alcanos	Diaz y Grigson (2002)
<i>Pseudomonas sp</i> <i>Mycobacterium</i>	Alcanos Mono-aromaticos Poli- aromáticos	Salleh et al., (2003)
<i>Gordona</i>	Pireno	De Boer (2003)
<i>Pseudomonas sp</i>	Compuestos halogenados	Stabili y Cavallo (2004)
<i>Acinetobacter baumannii</i> M1	Alcanos	Tyagi et al., (2011)
<i>Desulfosporisinus sp</i>	Tolueno	Sun et al., (2014)

<i>Bacillus sp</i>	Alcanos	Garcia y Aguirre (2014)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Fenantreno	Zhao et al., (2017)
<i>Rhizobium tropici</i>	Benzo (a) pireno	Wong et al., (2017)
<i>Escherichia coli</i>	Alcanos	Meng et al., (2018)
<i>Streptomyces sp</i>	Polietileno	Amobonye et al., (2021)
<i>Enterobacter cloacae</i> AKS7	Polietileno	Sarker et al., (2021)

Tabla 3. Hongos reportados que degradan los hidrocarburos de petróleo

Nombre del hongo	Fracción que degradan	Autor
<i>Penicillium glaucum</i>	Parafina	Zobell (1946)
<i>Saccharomyces sp</i>	Petróleo	Valderrama (2000)
<i>P. chrysosporium</i>	Compuestos orgánicos	Jagjit y Khajamohiddin (2002)
<i>P. cinnabarinus</i>	Compuestos xenobióticos	Mougin et al., (2002)
<i>Fusarium</i>	Fenol	Caí et al., (2007)
<i>Pleurotus sp</i>	Hidrocarburos policíclicos aromáticos	Gómez et al., (2009)
<i>Aspergillus fischeri</i>	Asfaltenos	Uribe et al., (2011)
<i>Trichoderma</i>	Gasolina	Cázares (2013)
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	Pireno Antraceno	Zhang et al., (2015)

<i>Aspergillus niger</i>	Polietileno	Acuña (2017)
<i>Penicillium oxalicum</i> NS4	Polietileno	Ojha et al., (2017)
<i>Talaromyces sp</i>	Compuestos hidrocarbonados	Varjani (2017)

2.3. Cultivos secuenciales.

Los reportes de la mineralización total de HAP's de 5 anillos o más, frecuentes componentes de las mezclas complejas de HP's, utilizando cultivos puros, son pocos, no obstante, la capacidad que algunos poseen para degradarlos.

Este hecho sugiere que la mineralización de estos compuestos en la naturaleza depende de una degradación metabólica concertada entre las diversas poblaciones microbianas. Existen algunos reportes que corroboran este hecho (Viñas et al., 2008).

La alternativa al uso de cultivos axénicos o cultivos puros es la obtención y utilización de cultivos mixtos, es decir, cultivos microbianos en los que se encuentran presentes dos o más géneros diferentes de microorganismos. Los cultivos mixtos pueden ser de dos tipos: definidos y no definidos. Los primeros se caracterizan por ser una combinación de cepas aisladas con capacidades degradativas conocidas que son complementarias entre sí (Foght et al., 2011). Están bien caracterizados y por lo tanto siempre presentan la misma composición microbiana. Los cultivos no definidos presentan características contrarias.

Los cultivos mixtos pueden adicionarse como tal desde el inicio de un proceso de biodegradación o pueden adicionarse al proceso en diferentes etapas como cultivos puros que conformarán finalmente el cultivo mixto. A este tipo de cultivos se les conoce comúnmente como co-cultivos o como cultivos secuenciales. Pueden conformarse por cultivos de bacterias, hongos, levaduras, etc. o por microorganismos del mismo género.

Šašček (2003), propuso que los hongos pueden jugar un rol importante en los procesos de degradación, al realizar un primer ataque sobre las moléculas de un contaminante que

es poco biodisponible, detoxificándolas o convirtiéndolas en productos que son más susceptibles a la degradación microbiana. Es decir, ciertas especies fúngicas poseen el potencial de transformar al contaminante en compuestos más polares, que son más asequibles para la posterior acción bacteriana.

Con los cultivos secuenciales, se pretende concertar las actividades catabólicas individuales de estos microorganismos para lograr una mayor remoción del hidrocarburo e incluso favorecer los procesos de mineralización. Estudios previos realizados en el grupo de investigación del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Ambiental de esta Universidad, han demostrado que efectivamente puede presentarse un efecto sinérgico en la degradación de HAP's, particularmente Benzo(a)pireno, cuando se utilizan cultivos secuenciales en fase acuosa y en fase semisólida (Machin et al., 2010).

En los procesos de degradación un microorganismo puede descomponer sólo un número limitado de componentes del petróleo y es difícil encontrar microorganismos que puedan degradar completamente una mezcla HAP's de contaminantes (Alexander 1999). Por lo tanto, la construcción de consorcios microbianos es una alternativa innovadora para la eliminación de sustancias complejas y mezclas de contaminantes.

2.3.1. Ventajas de emplear cultivos secuenciales en la degradación Hidrocarburos de Petróleo.

Cultivos secuenciales v/s Bacterias.

- 1.- Robustez: Vivir en comunidad hace que estos microorganismos sean mucho más resistentes a cualquier cambio que se produzca en el ambiente, promoviendo así cierta estabilidad para los miembros del consorcio.
- 2.- Pueden llevar a cabo tareas más complejas: Las poblaciones mixtas tienen la capacidad y los recursos necesarios para llevar cabo funciones muy complicadas o incluso imposibles de realizar para una única especie. Un consorcio se reparte el trabajo de modo que cada población del consorcio se dedica a sintetizar una de las enzimas necesarias para obtener el producto final que se desea llegar.
- 3.- Cinéticas de degradación más eficientes y que toleran concentraciones más altas que el contaminante.

4.- Habilidad para biodegradar contaminantes orgánicos, radica en la diversidad e interacciones de las diferentes especies que conforman al consorcio.

Cultivos secuenciales v/s Hongos.

1.- Una alternativa innovadora para la eliminación de sustancias complejas y mezclas de contaminantes.

2.- Los consorcios degradadores de HAP's (hidrocarburos aromáticos de petróleo) son adaptados en un medio enriquecido con altas concentraciones del contaminante.

3.- La importancia del uso de consorcios estriba en que en ocasiones un solo microorganismo no es capaz de degradar completamente el contaminante, generando metabolitos secundarios, que otra especie es capaz de transformar en metabolitos más simples o lograr la degradación completa.

Tabla 4. Consorcios microbianos secuenciales que degradan los hidrocarburos de petróleo.

Nombre de los consorcios microbianos	Fracción que degradan	Autor
Cepa 1: <i>Sphingomonas paucimobilis</i> Cepa 2: <i>Sphingomonas sp</i>	HAP's alquilados	Sabaté et al., (2003)
Cepa 1: <i>Pseudomonas pertucinogena</i> Cepa 2: <i>Pseudomonas syringae</i> Cepa 3: <i>Sphingomonas paucimobilis</i> Cepa 4: Cultivo unialgal <i>Chiorella sp</i>	Diésel	Hernández (2005)
Cepas de bacterias Cepa 1: <i>Pseudomonas sp</i> Cepa 2: <i>Serratia marcescens</i> Cepas de hongos Cepa 3: <i>Aspergillus sp</i> Cepa 4: <i>Trichoderma sp</i>	Petróleo en el suelo	Córdova (2005)
Cepas de bacterias Cepa 1: <i>Pandoraea sp</i> Cepa 2: <i>Hyphomicrobium facile</i> Cepa 3: <i>Burkholderia multivorans</i>	Compuestos aromáticos	Ozaki et al., (2007)
Cepas de bacterias Cepa 1: <i>Acinetobacter baumannii</i> Cepa 2: <i>Klebsiella oxytoca</i> Cepa 3: <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Fenantreno	Kim et al., (2009)
Cepas de hongos Cepa 1: <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Hidrocarburos	

Cepa 2: <i>Cuunninghamella sp</i> Cepa 3: <i>Alternaria alternata</i> Cepa 4: <i>Penicillium chrysogenum</i> Cepa 5: <i>Aspergillus niger</i> Cepas de bacterias Cepa 6: <i>Bacillus sp</i> Cepa 7: <i>Zoogloea sp</i> Cepa 8: <i>Flavobacterium sp</i>	de petróleo en suelos contaminados	Li et al., (2009)
Cepas de hongos Cepa 1: <i>P. chrysosporium</i> Cepa 2: <i>T. versicolor</i>	Hidrocarburos de petróleo	Qian y Chen (2012)
Cepas de bacterias Cepa 1: <i>Achromobacter sp</i> BAB239 Cepa 2: <i>Pseudomonas sp</i> DV-AL2 Cepa 3: <i>Enterobacter sp</i> BAB240 Cepa 4: <i>Pseudomonas sp</i> BAB241	Naftaleno	Patel et al., (2012)
Cepas de hongos Cepa 1: <i>Cladosporium</i> Cepas de bacterias Cepa 2: <i>Pseudomonas</i> Cepa 3: <i>Diplococcus</i> Cepa 4: <i>Enterobacter</i>	Diésel	Lizardi et al., (2013)

3. MARCO TEÓRICO.

3.1. Contaminación por HPs en México.

Uno de los problemas más serios a nivel mundial, es la contaminación de suelos y acuíferos con HP's (hidrocarburos de petróleo) y sus derivados. Aunado a los efectos tóxicos que produce sobre la flora y fauna de un hábitat determinado, los HP's pueden ser transportados en el ambiente por diversos mecanismos naturales (precipitaciones pluviales, lixiviación, etc.), incrementando el riesgo a la explosión y generando graves problemas de salud, además del deterioro en las características fisicoquímicas del suelo y acuíferos.

Se tiene un número considerable de sitios contaminados con hidrocarburos como resultado de fugas o descargas accidentales de petróleo crudo, combustóleo, gasóleo, gasolina, diésel, así como la disposición de paños contaminados, lodos aceitosos y aceites lubricantes gastados, que se han producido dentro y fuera de las instalaciones productoras y almacenándolas. En muchos casos estos derrames han dañado el subsuelo y el agua subterránea y su saneamiento es complejo debido a que los contaminantes se presentan en forma de mezclas.

En México, como en otros países, el petróleo es la principal fuente de energía y materia prima para la elaboración de una gran cantidad de productos terminados. Debido a esto, se ha incrementado considerablemente su extracción y la producción de sus derivados. Sin embargo, las malas prácticas de su manejo, los accidentes durante el transporte de combustible y otros productos procesados, la toma clandestina de combustibles en gaseoductos, los derrames accidentales y la acumulación de subproductos generados en los procesos de refinación del petróleo, han generado problemas ambientales en los que se ha hecho evidente la contaminación de grandes extensiones de suelo y cuerpos de agua superficiales y subterráneos (Saval, 1997).

México posee extensas áreas contaminadas con HP's , las cuales se encuentran principalmente en sitios cercanos a las instalaciones de extracción y procesamiento del crudo, así como en las zonas marítimas de exportación.

En México, Petróleos Mexicanos (PEMEX) es la empresa paraestatal responsable del proceso petrolero. Sus actividades abarcan la exploración y explotación de HPs, así como la producción, almacenamiento, distribución y comercialización de productos petrolíferos y petroquímicos. Esta problemática ambiental en México ha motivado el que la paraestatal lleve a cabo tareas de restauración desde hace varios años. Sin embargo, no existen estadísticas que permitan identificar claramente los trabajos realizados, las tecnologías empleadas, las empresas contratadas ni los recursos asignados a estas tareas. Se desconoce la magnitud del problema de la contaminación por petróleo en México debido a la escasez de información. Sin embargo, se ha estimado que las áreas más afectadas están ubicadas al sureste del país, principalmente en los estados de Tabasco, Veracruz y Quintana Roo y en la región del Pacífico, en el estado de Oaxaca (Saval, 1997).



Figura 1. Imagen de derrame de petróleo Achaca Pemex, Tabasco 2019.

Los efectos de la contaminación por hidrocarburos sobre los seres vivos pueden clasificarse en tres categorías: Efectos directos letales (impiden la respiración o modifican la resistencia térmica como el caso de las aves provocando la muerte), efectos subletales (se producen tras la ingestión de los hidrocarburos provocando alteraciones genéticas, bioquímicas o fisiológicas que reducen la supervivencia y eficacia biológica) o indirectos (provocando cambios en los ecosistemas que derivan en modificaciones de las estructuras de las comunidades biológicas y de la red de interacciones existentes) (MAPAMA, 2017).

Los hidrocarburos pueden entrar dentro de la cadena alimentaria, lo que supone un riesgo de intoxicación para todos los miembros de esta, incluida la población humana, como se ha mencionado (Dellagnezze et al., 2014).

En lo que respecta a acuicultura y pesca, la presencia de hidrocarburos en el mar puede provocar la disminución y hasta la pérdida de ciertas especies de peces, mariscos y otros organismos que no tienen la capacidad de degradarlos, utilizarlos o reciclarlos (Rodríguez et al., 2014). En el ámbito del turismo, obviamente el hecho de que un derrame se produzca próximo a una zona de gran afluencia turística supone un perjuicio económico ante el descenso de la afluencia de visitantes. (Rekadwad y Khobragade , 2015).

3.2. Contaminación de acuíferos por hidrocarburos de petróleo

El principal problema que se considera en el uso del agua no consiste en su escasez, como comúnmente se cree, sino en la contaminación que padece, las inadecuadas estrategias gubernamentales para el manejo de los ecosistemas.

Una de las principales fuentes de contaminación por HP's son los derrames, accidentales o intencionados, cuyo número se está incrementando en los últimos años debido al aumento de los transportes y prospecciones petrolíferas en aguas oceánicas (Bao et al., 2014).

La persistencia de los hidrocarburos en el medioambiente depende de sus propiedades fisicoquímicas. Cuanto más compleja es su estructura, más halogenados e hidrófobos son, mayor tendencia tienen a acumularse en sedimentos y asociarse a partículas (Perelo, 2010). Cuando un derrame llega a una masa de agua, deja de existir como una mezcla de componentes y sufre una serie de procesos fisicoquímicos y microbiológicos. Si embargo, el impacto ambiental que genera es enorme.



Figura 2. Imagen de la muerte de fauna (Delfines) a causa de derrames de Hidrocarburos de Petróleo en las aguas marinas.

3.3. Contaminación del suelo por hidrocarburos de petróleo

El suelo es un recurso natural definido generalmente como la capa superior de la corteza terrestre, está formado por partículas de minerales, materia orgánica, agua, aire y allí nacen y se desarrollan miles de seres vivos, desde microorganismos hasta plantas y animales superiores. Los suelos se clasifican en distintos tipos de acuerdo con el porcentaje de cada uno de los componentes mencionados (Strawn et al., 2019).

Los suelos tienen una importancia crucial para la sociedad y el funcionamiento de los ecosistemas por los beneficios que brindan a partir de sus funciones. Entre las funciones que desempeñan los suelos están (Brady et al., 2008).

- **Ser un medio para el crecimiento de las plantas.** Una planta obtiene del suelo soporte físico, aire, agua, nutrientes, regulación de la temperatura y protección ante sustancias tóxicas. De esta manera, los suelos son la base para la provisión de biomasa.
- **Ser un regulador del suministro de agua a partir de la infiltración, retención y depuración del agua,** mejorando su calidad y cantidad, así como la resistencia a inundaciones.
- **Servir como un sistema de reciclaje natural y de almacenamiento de carbono.** Los suelos tienen la capacidad de asimilar grandes cantidades de residuos orgánicos y transformarlos en suelo fértil (humus). De esta manera se hacen disponibles los nutrientes minerales para que puedan ser utilizados por las plantas, los animales y los microorganismos del suelo.
- **Ser un modificador de la atmósfera.** Los suelos también respiran, es decir, absorben y liberan oxígeno, dióxido de carbono y otros gases. Tales gases, intercambiados entre el suelo y la atmósfera, tienen una influencia significativa en la composición de la atmósfera. Por ejemplo, los suelos pueden absorber y contener grandes cantidades de carbono, lo cual ayuda a mitigar, de manera importante, la concentración de gases de efecto invernadero.
- **Ser hábitat para organismos.** Un puño de suelo puede ser el hábitat de millones de organismos, pertenecientes a miles de especies; incluso, es probable encontrar predadores, presas, productores, consumidores y parásitos integrando la cadena trófica o alimenticia.
- **Ser medio para la ingeniería y la construcción.** Los suelos son uno de los materiales más utilizados para la construcción.

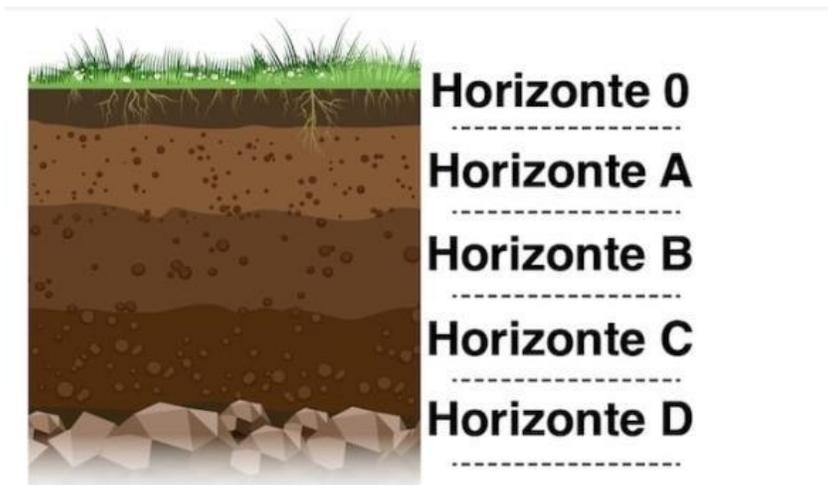


Figura 3. Composición de un perfil típico del suelo

Horizonte 0: Es la capa superior del suelo. Se compone de materia orgánica desprendida de las plantas, como hojas y ramas. Allí viven insectos y animales.

Horizonte A: Es llamado zona de lado vertical (ya que arrastra agua con fragmentos de tamaño fino y compuestos solubles hacia el siguiente horizonte) es en el que enraíza la vegetación. Generalmente su color es oscuro por la abundancia de materia orgánica descompuesta o humus elaborado.

Horizonte B: o zona de precipitado, posee un color (pardo o rojo). En él se depositan los materiales como arcillas, óxidos e hidróxidos metálicos, entre otros, que provienen del horizonte A; también puede contener materiales calcáreos.

Horizonte C: Aquí no existen depósitos de materiales ni hay remoción, tampoco se acumula materia orgánica.

Horizonte D: Es la capa más profunda del suelo y la que le da origen. Está compuesta por rocas que no sufrieron alteraciones.

La matriz del suelo está constituida por cinco componentes principales: agua, aire, materia orgánica, minerales y organismos vivos. Aproximadamente un 50% del volumen total del suelo lo constituyen los materiales minerales como aluminosilicatos hidratados,

carbonatos, fosfatos, nitratos y iones metálicos, los cuales participan en los procesos de adsorción/desorción e intercambio de iones en el suelo (Machín, 2000); un 25 a 50% lo ocupan los gases (principalmente aire y dióxido de carbono) y agua en los espacios intersticiales. De un 3 a 6% se conforma de material orgánico, y menos del 1% de microorganismos.

Muchos de los contaminantes que se encuentran incorporados en el ambiente han sido descargados deliberadamente, en forma accidental o inadvertidamente, en el agua, en el aire o en el suelo después de que fueron generados o utilizados. Sin embargo, cualquiera que sea su origen, biogénico o antropogénico, estos compuestos provocan la contaminación del ambiente y ocasionan un gran impacto en el ecosistema. Los contaminantes se pueden encontrar, por lo general, formando mezclas simples o complejas asociadas al tipo de procedencia y a su origen. Las concentraciones de los compuestos individuales varían apreciablemente, y pueden ser tan elevadas como 1 gL^{-1} de agua o kg de suelo, o tan bajas como un μgL^{-1} de agua o por kg de suelo (Alexander, 1999).

El efecto de estos compuestos sobre el ambiente depende de varios factores: si son o no biooxidados rápidamente; si son recalcitrantes (permanecen en la Naturaleza); si persisten en los cauces de agua; si son adsorbidos hacia los sedimentos y partículas de lodo y si son bioacumulados a través de diversos procesos biológicos. Algunos de ellos son tóxicos para animales y humanos, son fisiológicamente activos, así como potencialmente carcinogénicos, pudiendo ocasionar severos daños a la salud (Tabak et al., 2003).

3.4. Hidrocarburos de petróleo (HP's).

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos que contiene en su composición química principalmente C e H, en cantidades que varían entre un 83-86% y un 11-13%, respectivamente. Su nombre proviene del latín *petra* que significa roca y *óleo*, aceite. Su color varía entre el negro y el ámbar.

La composición de los hidrocarburos del petróleo varía ampliamente, y cada componente tiene sus propiedades específicas fisicoquímicas (viscosidad, solubilidad y capacidad de absorción, biodisponibilidad o toxicidad elevados y suelen clasificarse en base a sus características químicas (McGenity et al., 2009). El petróleo varía mucho en su composición, lo cual depende principalmente del tipo de yacimiento de donde provenga.

La Naturaleza produce una gran variedad de HP's como resultado de la actividad biosintética de animales, plantas y microorganismos, y por la acción fisicoquímica en la descomposición de la materia orgánica, durante el transcurso de largos períodos de tiempo. Normalmente, estos HP's permanecen en depósitos naturales de petróleo crudo y gas. Mediante procesos de filtración natural o como consecuencia de los procesos de extracción y purificación realizados por el hombre, pueden quedar en contacto con un amplio rango de ambientes y no sólo con aquellos en los cuales se formaron, pudiendo generar un gran impacto ambiental.

Tabla 5. Clasificación general de los componentes del petróleo Speight, 1991.

Nombre	Fórmula Gral.	Algunos compuestos representativos.
Hidrocarburos saturados.	C_nH_{2n+2}	Metano, etano, butano, hexano.
Hidrocarburos nafténicos.	C_nH_{2n}	Ciclopentano, ciclohexano
Hidrocarburos aromáticos.	Variable	Benceno, tolueno, xileno, etilbenceno, naftaleno. fenantreno.
Resinas.	Variable	Piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos,
Asfaltenos.	Variable	Agregados de poliaromáticos, como ácido nafténico, metaloporfirinas.

Durante los procesos de refinación, se genera una gran cantidad de desechos y se liberan elevadas concentraciones de contaminantes en forma de emisiones atmosféricas. La separación principal de los componentes del petróleo consiste básicamente en una

destilación, la cual se basa en la diferencia en el punto de ebullición de los componentes que lo conforman. Estas fracciones, de acuerdo con el rango de ebullición, permiten obtener una nueva clasificación de los componentes del petróleo (tabla 5).

Algunos de los componentes del petróleo son muy volátiles, por lo que se evaporan aún a temperatura ambiente. Ejemplo de ello son los hidrocarburos de bajo peso molecular, que pueden volatilizarse hacia la atmósfera y ser descompuestos por procesos de fotooxidación (Jarsjö et al., 1994). Sin embargo, otros componentes del petróleo son fuertemente adsorbidos al suelo, lo que dificulta su remoción y ocasiona que persistan en el ambiente.

Existe una diferencia entre las tasas de degradación de los contaminantes en estado puro y aquellos que forman parte de una mezcla de hidrocarburos, como en el caso del diesel y la gasolina (Greene et al., 2000). Algunas pruebas han permitido verificar que mezclados, el tolueno es degradado antes que el benceno (fenómeno llamado *preferential biodegradation*) (Franzmann et al., 2002). Para una degradación más rápida y completa es preferible degradarlos a partir de su forma pura antes que en presencia de otros hidrocarburos (Greene et al., 2000).

3.4.1. Queroseno

Es un derivado del petróleo, una mezcla insoluble de hidrocarburos alifáticos y aromáticos tóxicos ambientales, como el benceno, n-hexano, tolueno, xileno, al igual que otros aromáticos policíclicos como el naftaleno y n-propilbenceno, susceptibles al ataque microbiano de acuerdo con el metabolismo que poseen, así como de las condiciones ambientales que existen en la naturaleza o laboratorio.

Cuando el queroseno impacta ambientes naturales como el suelo, induce la selección de una amplia diversidad de microorganismos que pueden ser procariontes con géneros y especies de bacteria comunes en este ambiente. Además de los eucariotes heterotróficos, aerobios como los hongos filamentosos y algunos géneros de levaduras

que tienen la capacidad de biodegradar el queroseno al utilizarlo como única fuente de carbono y energía.

Desde el comienzo de la industria petrolífera, el keroseno se llamó «petróleo para alumbrado» o, simplemente, «petróleo», ya que era el producto principal de la destilación del crudo y se empleaba casi exclusivamente para alumbrado privado y público.



Figura 4. . Hidrocarburo de petróleo (queroseno)

Tabla 6. Principales derrames de petróleo en el mundo. La Jornada Ecológica (2010)

Año	país	Fuente	Cantidad de petróleo derramado	Ecosistema afectado
1910	Estados unidos (Macondo)	Taponamiento de la plataforma Macondo	210 millones de galones de petróleo	Mar y costas del Golfo de México
1971	Estados Unidos (cien millas de	Nafragio del barco petrolero	32900 toneladas de crudo	Mar

	cabo Hatteras)	Texaco Oklahoma		
1976	Estados Unidos (Isla de Nantucket, Massachusetts)	Encallamiento del barco petrolero Argo Merchant	7.7 millones de galones de petróleo	29 millas náuticas de mar
1978	Bretaña	Encallamiento del Barco petrolero Amoco Cádiz	68.7 millones de galones de petróleo	Mar, 340 km de costa de Bretaña
1979	México (Bahía de Campeche)	Explosión del Pozo petrolero Ixtoc I	140 millones de galones de petróleo	Mar
1979	Estados Unidos (Galveston, Texas)	El choque del barco petrolero Burmah Agate contra el carguero Mimos	10.4 millones de galones de petróleo	Mar
1989	Alaska (Prince William Sound)	Encallamiento del barco petrolero Exxon Valdez	10.8 millones de galones de petróleo	El arrecife bligh y costa no continua de Alaska
1990	Estados Unidos (Linden, Nueva Jersey)	Explosión del Barco Petrolero Cibro Savannah	127 mil galones de petróleo	Mar
1990	Estados Unidos (Bay City, Michigan)	Explosión del Buque tanque júpiter	No calculado	Rio Saginaw
1991	Kuwait	Destrucción de barcos petroleros, terminales petroleras y pozos de petróleo	900 millones de barriles de petróleo	Costas y suelo
1993	Estados Unidos	Choque entre	336 mil galones de	Bahía de

	(Tampa, Florida)	la barcaza Bouchard 155, el carguero Balsa 37, y el barco Ocean 255	fuentes de petróleo	Tampa
1994	Rusia (Komi)	Rompimiento de oleoducto	Entre 200000 y 300000 toneladas de petróleo	Suelo
2009	Australia-Asia (Mar de Timor)	Rompimiento de Oleoducto	450 toneladas de crudo	Mar
2010	Estados Unidos (Luisiana)	BP Deepwater Horizon	779 mil toneladas de crudo	Mar y costas del Golfo de México
2015	Estados Unidos (Santa Bárbara, California)	Rompimiento de oleoducto	400000 litros de petróleo	Costas y mar de la bahía

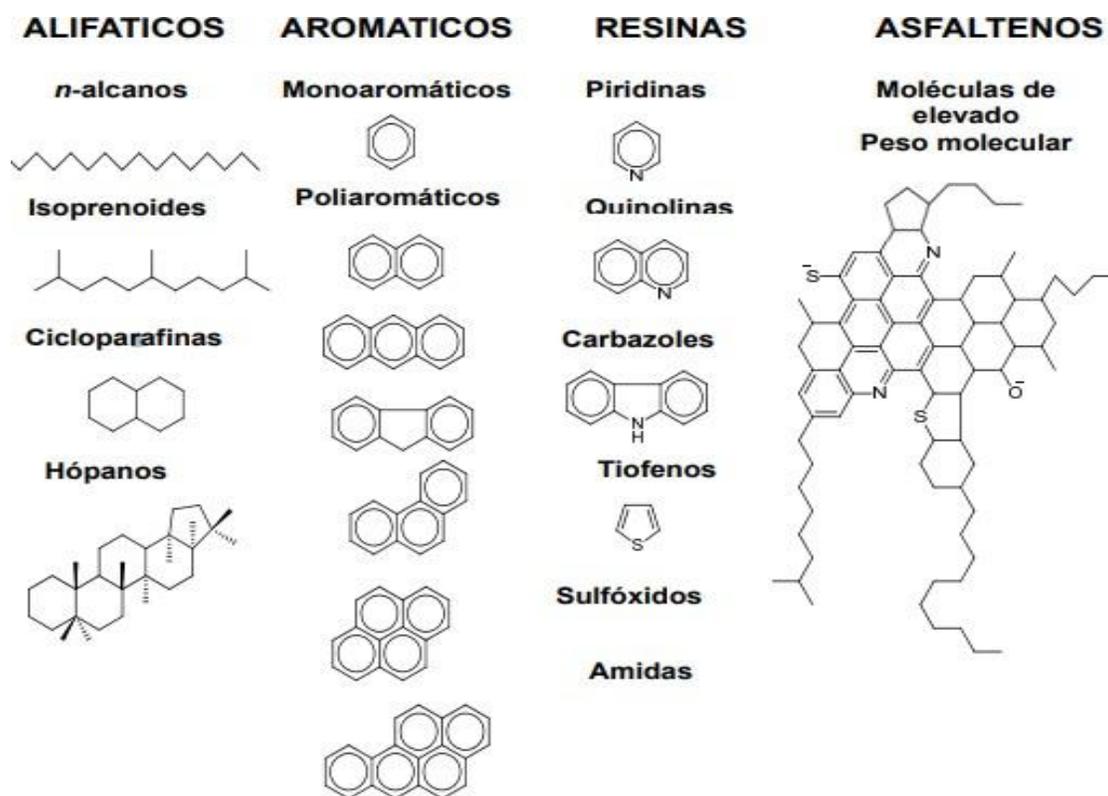
Tanto los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) como los HAP's (hidrocarburos poliaromáticos), componentes del petróleo, son considerados por la EPA como contaminantes peligrosos. Los HAP's más comunes e identificados como prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de EUA son los siguientes: naftaleno (10 8), acenafteno (12 10), fluoreno (13 10), fenantreno (14 10), antraceno (14 10), fluoranteno (16 10), pireno (16 10), benz(a)antraceno (16 10), criseno (16 10), benzo(b)fluoranteno (20 12), benzo(k)fluoranteno (20 12), benzo(a)pireno (20 12), dibenzo(ah)antraceno (22 14). El criterio establecido para la remoción o tratamiento de estos HAPs varía ampliamente entre las distintas naciones (Wilson y Jones, 1993).

La Organización Mundial de la Salud (1983) ha definido a los HAP's como cancerígenos y mutagénicos. Estos son muy estables, recalcitrantes, y relativamente difíciles de degradar en suelos y aguas contaminadas, y más difíciles aun los que poseen mayor

peso molecular y número de anillos bencénicos en su estructura.

Se ha comprobado que son compuestos muy tóxicos con alto potencial de mutagenicidad y carcinogenicidad. Además, se ha demostrado que la exposición continua a hidrocarburos alifáticos puede ocasionar diversos trastornos a nivel cardiovascular, renal, ocular, gastrointestinal, así como efectos sistémicos en humanos (Gogate et al., 2004). También son considerados como contaminantes persistentes debido a su naturaleza recalcitrante a la biodegradación, su bioacumulación en el medio ambiente y sus efectos nocivos para la salud cuando existe una exposición a los mismos.

Figura 5. Estructuras químicas de diferentes compuestos mayoritarios del petróleo (Speight, 1991).



En la mezcla que constituyen, los HP's coexisten en fases sólida, líquida y gaseosa y pueden presentar, además, en su composición, pequeñas proporciones de heterocompuestos con presencia de N, S, O y algunos metales. Entre los compuestos

que lo constituyen se pueden encontrar desde el metano, hidrocarburo de bajo peso molecular, hasta aquellos con pesos moleculares muy elevados.

La baja solubilidad de los hidrocarburos en medio acuoso necesita la acción de surfactantes para incrementar su biodisponibilidad y su metabolización por los microorganismos (Harris,1917).

Tabla 7. Principales fracciones del petróleo (rango de ebullición).

PRODUCTO	RANGO DE EBULLICIÓN (°C)	No. DE CARBONOS
Gas licuado (LP).	—	3 – 4
Gasolinas.	25 – 150	5 – 12
Kerosenos.	150 – 200	10 – 16
Gasóleo.	160 – 250	11 – 20
Diesel.	182 – 350	12 – 20
Lubricantes, parafinas.	315 – 600	20 – 35
Gasóleo pesado.	600	25 – 35
Asfaltenos.	—	39

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La contaminación de suelos y agua con derivados de petróleo es un problema ambiental a nivel mundial, especialmente en los países productores y exportadores del crudo, teniendo consecuencias muy perjudiciales para el medio ambiente y la salud humana.

En las últimas décadas, se ha demostrado que una de las mejores alternativas de remediación de suelos y acuíferos contaminados con un amplio espectro de contaminantes es la aplicación de métodos biológicos, como la biorremediación, por tratarse de una tecnología amigable con el medio ambiente y por sus costos más accesibles en comparación con técnicas físicas y químicas.

Los HP's y otros componentes del petróleo pueden entrar a las aguas de superficie a través de las descargas de plantas industriales y de tratamiento de aguas residuales y pueden ser liberados a los suelos a partir de desechos peligrosos si éstos se escapan de los contenedores de almacenamiento. En el suelo los HP's se unen a otras partículas y algunos pueden contaminar los acuíferos. La degradación de los HP's en el suelo y en el agua puede llevar semanas y meses y es causada principalmente por la acción de microorganismos.

Es por ello por lo que se requiere establecer estrategias que permitan explotar los recursos cuidando el impacto ambiental que ocasionan, tratando de prevenir o mitigar la contaminación en el medio ambiente que nos rodea. No obstante, la generación de contaminantes ha generado un gran pasivo ambiental y México no es la excepción.

Considerando la magnitud del problema que existe en México asociado a la contaminación con HP's , principalmente en el sur del país, surge el interés por realizar estudios para desarrollar tratamientos y estrategias de remediación *ad hoc*, que sean rápidos, efectivos, de bajo impacto ambiental y que permitan restaurar los sitios contaminados en nuestro país.

En ese contexto, el presente proyecto pretende contribuir a proponer una solución a tal problemática, mediante la evaluación e implementación a nivel laboratorio de un proceso de biodegradación de HP's , en fase acuosa, utilizando el potencial efecto sinérgico de diferentes cepas de bacterias y hongos mediante el uso de cultivos secuenciales.

En el sureste mexicano no se están realizando tipos de estudios de factibilidad. Las empresas que están saneando sitios típicamente usan su experiencia empírica ganada en otros sitios cuyas características parecen similares. En la actualidad se ha observado que frecuentemente se encuentran problemas con el manejo de la biorremediación, los cuales generalmente tienen fundamento en la falta de experiencia en el manejo de materiales con tan altas concentraciones de materia orgánica o arcilla, concentraciones de hidrocarburos muy altas, y condiciones climáticas tropicales (sobre todo la alta precipitación). Debido a estos problemas es común que no se logren disminuir las concentraciones de hidrocarburos hasta el nivel especificado por contrato, y/o que se atrasen los proyectos hasta 50 % o más).

5. JUSTIFICACIÓN.

Los ambientes contaminados por derrames o volcado de efluentes con hidrocarburos y el tratamiento de residuos de la actividad industrial en general y de la petrolera en particular reportan presencia de concentraciones variables de grasas y aceites, gasolinas, kerosene, diesel y fueloil, residuos de fondos de tanques y de piletas API, derrames de crudo (lixiviados y pesados), mezclas de hidrocarburos aromáticos (HAP's), BTEX y compuestos inorgánicos con aptitud para la biodegradabilidad.

Durante décadas no se había considerado que la industrialización, además de propiciar beneficios para el bienestar de la población, producía también una degradación de los sistemas naturales, en México se estima una generación de ocho millones de toneladas por año de residuos peligrosos. No se sabe cuántas toneladas acumuladas existen. La infraestructura existente para su manejo es muy limitada; se estima que sólo se controla adecuadamente el 12% del total de los residuos peligrosos generados. Tradicionalmente, desde el inicio de la industrialización en México, la industria minera, la química básica, la petroquímica y de extracción y refinación del petróleo, han producido cantidades muy grandes y difíciles de cuantificar, de residuos peligrosos. En muchos casos éstos han sido depositados abiertamente en el suelo sin ningún tipo de control. Esto implica importantes riesgos sanitarios para la población y un gran riesgo de contaminación de suelos y acuíferos a consecuencia de la lixiviación o escorrentía de los contaminantes.

El problema de los suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos radicaba en que no existía conciencia de las técnicas y costos de la biorremediación, pero gracias al desarrollo tecnológico ahora se cuenta con diversos estudios que han definido metodologías y sus diferentes aplicaciones.

En cuanto a la presencia de los contaminantes en los suelos, ha ocasionado que muchas bacterias ahí presentes hayan desarrollado la capacidad bioquímica para degradarlos.

Ante esta problemática y considerando que los procesos fisicoquímicos para su tratamiento son muy costosos y de gran impacto ambiental, la biorremediación se perfila como la opción ambiental más ecoamigable para fines de tratamiento. La estrategia de

restauración ecológica mediante el uso de microorganismos ofrece respuestas efectivas y de menor costo a la remoción de xenobióticos de muchos sitios contaminados.

En general, la justificación de utilizar la biorremediación como una potencial alternativa en México, es patente debido a que:

- Los contaminantes son realmente transformados y algunos completamente biodegradados.
- Es una tecnología segura y económica.
- Las bacterias y hongos perecen cuando los nutrientes y los contaminantes orgánicos se agotan.

El estudio de la diversidad microbiana y de la dinámica de sus poblaciones en consorcios biodegradados, está creciendo notablemente en el área de la ecología microbiana, lo cual ha permitido profundizar en el conocimiento acerca de la composición de las comunidades presentes en suelos contaminados, así como su evolución durante los procesos de biodegradación, para determinar cuáles son los microorganismos capaces de adaptarse y de explorar los hábitats contaminados.

Este proyecto se enfoca en atender una de las necesidades mundiales más apremiantes de nuestros tiempos, el manejo y gestión eficiente de las aguas con residuos de hidrocarburos provenientes de diferentes ámbitos.

En general, los estudios realizados muestran que las bacterias y los hongos poseen mecanismos diferentes para metabolizar los compuestos xenobióticos, particularmente , por lo que la acción combinada de sus actividades catabólicas en la remoción de HP's puede ser una alternativa para incrementar su biodegradabilidad. . El uso de cultivos secuenciales con tal propósito no ha sido explorado ampliamente y existen muy pocos reportes sobre su uso reportados en la literatura.

Por todo ello, con el objeto de evaluar el potencial del uso de diferentes cultivos secuenciales conformados por cepas de bacterias y hongos (aislados de un suelo

contaminado del sur de nuestro país) en la biodegradación de HP's , se decidió proponer la realización del presente estudio.

6. HIPÓTESIS:

El uso de cultivos secuenciales conformados a partir de cepas aisladas de suelo contaminado favorecerá la degradación de hidrocarburos de petróleo en fase acuosa, en comparación al uso de cultivos de cepas puras.

7. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la eficiencia, a nivel laboratorio el proceso de biodegradación en fase acuosa, mediante el uso de cultivos secuenciales, para la degradación de hidrocarburos de petróleo.

7.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Realizar el aislamiento, caracterización y conservación de las cepas fúngicas y bacterianas cultivables en laboratorio, a partir de un suelo contaminado con HP's, para producir los inóculos a emplear en los ensayos de biodegradabilidad.
- Realizar ensayos de biodegradabilidad de HP's utilizando cepas puras de hongos y bacterias aisladas del suelo contaminado, para evaluar su eficiencia.
- Seleccionar los cultivos microbianos que presenten una mayor eficiencia en la degradación de HPs para conformar los cultivos secuenciales.
- Evaluar la eficiencia en la degradación de HP's mediante el uso de los cultivos secuenciales definidos y compararla con la eficiencia alcanzada por el uso de los cultivos puros.

8. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizará una prueba de t de student en donde se evalúan las medias de uno o dos grupos mediante pruebas de hipótesis. La prueba t pareada es útil para analizar el mismo conjunto de elementos que se midieron bajo dos condiciones diferentes.

Se realiza el análisis de varianza de un factor para realizar una prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$) permitirá establecer y determinar las diferencias significativas en cada uno de los ensayos para los diferentes tratamientos. De esta forma, se seleccionarán aquellos cultivos puros que presenten una mejor eficiencia en la degradación del contaminante. Posteriormente se construirá un cultivo secuencial para evaluar su eficiencia en la remoción de los hidrocarburos de petróleo, para finalmente seleccionar el mejor proceso.

9. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El presente proyecto de investigación consta de varias etapas:

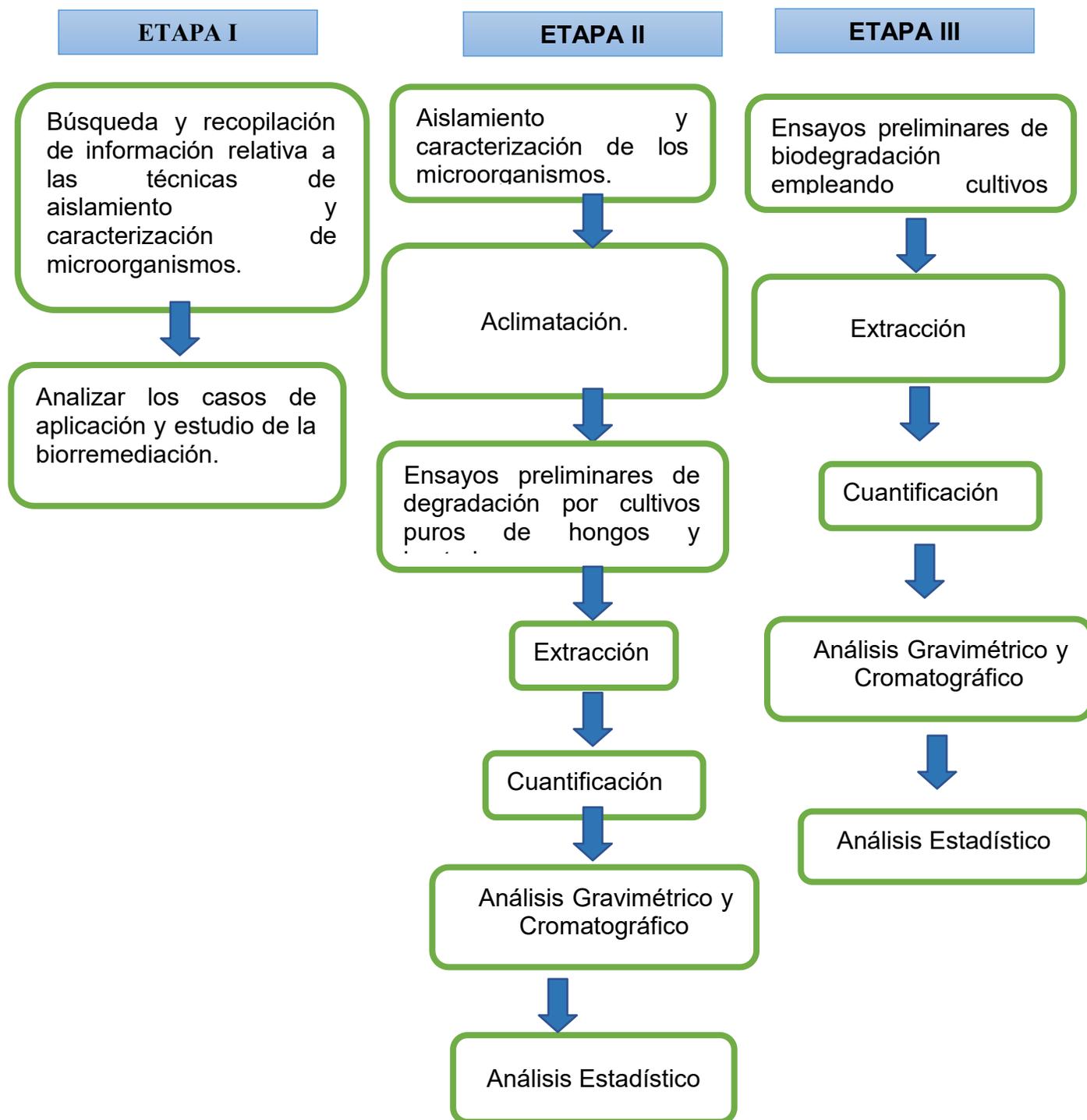


Figura 6. Estrategia experimental propuesta para el proyecto.

1.- Localización de la Investigación:

Los ensayos de biodegradación se realizarán en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería.

2.- Población de Estudio:

Se evaluará la actividad biológica de hongos y bacterias cultivables obtenidas de muestras de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, a nivel laboratorio.

3.- Puntos de muestreo del sitio contaminando:

La muestra fue extraída de un suelo contaminado con hidrocarburos de Poza Rica, Veracruz.

10. MATERIAL Y MÉTODOS

El suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo intemperizado se obtuvo de una muestra recolectada de una zona que es usada como vertedero de residuos provenientes de las actividades de extracción de petróleo, conocido como Campo X en Poza Rica, Veracruz, México. Dicho muestreo se llevó a cabo por personal del Laboratorio de Biotecnología Ambiental del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) a través de un proyecto realizado en forma conjunta con el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) y otras universidades.

10.1. Caracterización fisicoquímica del suelo

10.1.2. Tamizado

Debido a que el suelo no era homogéneo en cuanto a la estructura granular, se procedió a tamizarlo para retirar las partículas voluminosas, rocas y hojarasca. El tamaño de partícula que se utilizó en el estudio fue de 0.5 mm, debido a que un suelo así de fino permite un mayor contacto para la fricción y la desorción del contaminante.



Figura 7. Suelo tamizado.

La caracterización de las propiedades físicas del suelo contaminado por hidrocarburos de petróleo fue previamente realizado y cuantificado por un estudiante de la facultad.

Estas propiedades fueron: textura y tipo de suelo, humedad, densidad aparente, densidad real y las propiedades químicas como son: determinación de pH, nitrógeno orgánico, nitrógeno total, fósforo total y materia orgánica.

10.2. Caracterización microbiológica

Los microorganismos dependen de los nutrientes disponibles y de condiciones ambientales favorables para su sobrevivencia y crecimiento.

En el laboratorio, las preparaciones de nutrientes que se usan para cultivar a los microorganismos se denominan medios de cultivo. Los microorganismos pueden cultivarse utilizando medios químicamente definidos, para los cuales se conocen las cantidades exactas de los compuestos que los integran, o bien medios complejos, los cuales incluyen materiales, como extracto de levadura, de carne, peptonas, etc.

a) Agar nutritivo

Es un medio de uso general para el cultivo de una amplia variedad de organismos bacterianos. El agar nutritivo utilizado tiene la siguiente formulación:

Peptona.	5.0g
Extracto de	3.0g
Carne. Agar	15.0g
bacteriológico.	

Para su preparación, se disuelven 23 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, remojando unos 15 minutos, mezclar y calentar a ebullición de 1 a 2 minutos hasta disolver el producto. Distribuir y esterilizar en autoclave por 15 min, a 121°C.

b) Caldo nutritivo

Medio usado para el cultivo de varias especies de microorganismo no fastidiosos y para análisis microbiológico de agua.

Para su preparación, se disuelven 8 g del medio en 1 Litro de agua destilada, remojando unos 15 minutos, mezclar y calentar a ebullición de 1 a 2 minutos hasta disolver el producto. Distribuir y esterilizar en autoclave por 15 min, a 121°C.

c) Agar dextrosa sabouraud

Es una modificación a la fórmula original del agar de dextrosa desarrollado por Raymond Sabouraud. Este medio es utilizado para el cultivo de hongos patógenos y no patógenos que se logra mediante la adición de cloranfenicol, particularmente de aquellos asociados con infecciones de piel. La alta concentración de dextrosa y la acidez del pH hacen a éste un medio selectivo para hongos.

Dextrosa.	40.0g
Peptona de	5.0g
Carne.	5.0g
Peptona de	15.0g
Caseína. Agar	

Para su preparación disolver 65 g del medio deshidratado en 1 litro de agua destilada, remojar de 10 a 15 minutos, mezclar bien hasta que se obtenga una suspensión uniforme. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave por 15 minutos, a 121°C.

d) PDA (Agar dextrosa y papa)

Es un medio utilizado para el cultivo de hongos y levaduras. La base del medio es altamente nutritiva y permite el crecimiento y esporulación de los hongos.

Agar.	15.0g
Dextrosa.	20.0g
Infusión de papa	4.0g

Para su preparación rehidratar 39 g del medio en 1 Litro de agua destilada. Reposar 10 a 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Distribuir y esterilizar en autoclave por 15 minutos, a 121°C.

e) Caldo papa dextrosa

Es un medio de cultivo líquido que es utilizado para promover el crecimiento de hongos y levaduras.

Se preparo a partir de 200 g de papa natural y 2 g de dextrosa, el cual se hierve durante 30 minutos y el caldo posteriormente se esteriliza en la autoclave hasta alcanzar una temperatura de 121°C

10.2.1. Cuenta viable. (Unidades Formadoras de Colonias).

La cuenta viable de una población microbiana es la concentración absoluta de los organismos viables presentes en una muestra, se utiliza para el análisis de muestras de suelo y está es la técnica que se empleara en este proyecto. (Lorch et al.,1995).

Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones seriales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo.

El procedimiento se realiza en una campana estéril de flujo laminar. Con la ayuda de una espátula se tomó 1g de la muestra tanto de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, como un suelo sin contaminar esto para hacer una comparación en cuanto al microbiota presente en cada uno de ellos y se adiciono a tubo de ensayo conteniendo 9 ml de solución fisiológica (NaCl). Este tubo constituyó la dilución 10^{-0} .

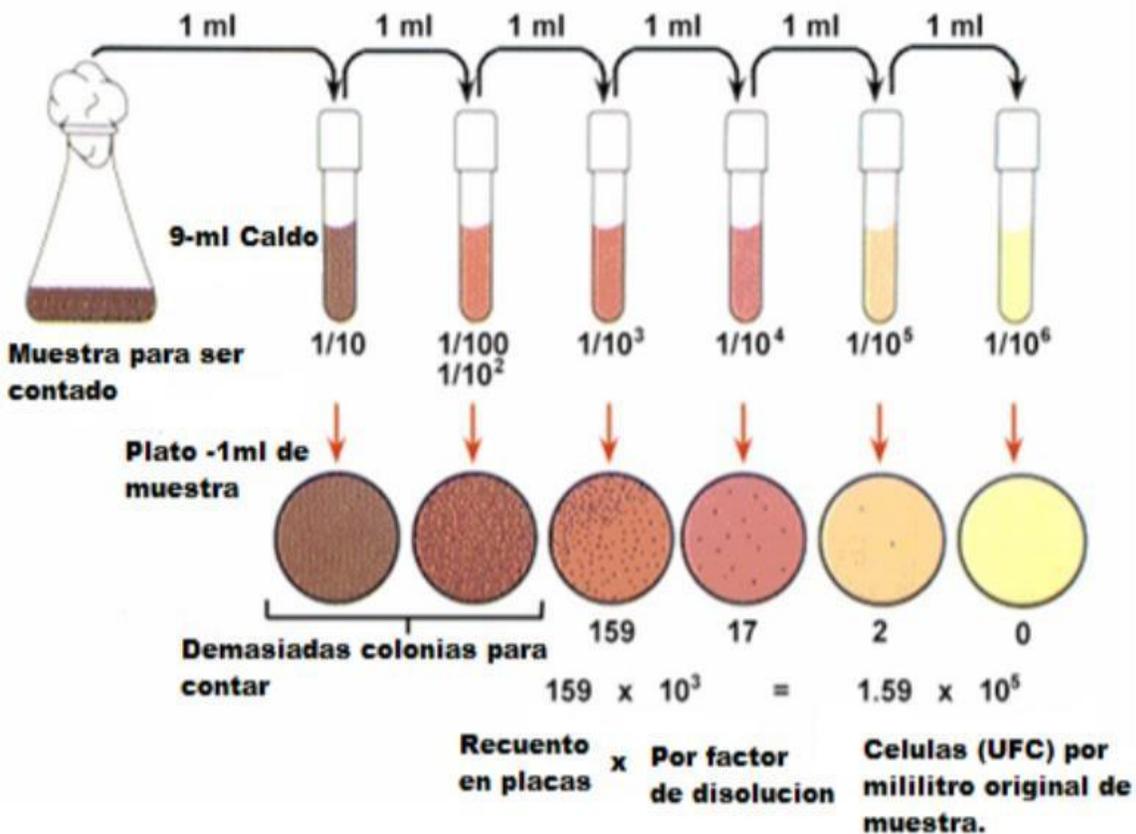


Figura 8. Realización del conteo en placa

Utilizando un vortex y agitando por 20 s se transfirió del tubo 10^0 , un volumen de $100 \mu\text{l}$ al tubo rotulado como 10^{-1} . Se cambio la punta de la micropipeta por una limpia, se agito el tubo de dilución y se transfirió $100 \mu\text{l}$ del contenido al tubo rotulado 10^{-2} . Se repitió el mismo procedimiento hasta concluir con todas las disoluciones seriales hasta (10^{-8}).

Posteriormente se transfieren $100 \mu\text{l}$ de cada una de las diluciones a cajas Petri conteniendo agar nutritivo(estériles).



Figura 9. Proceso de las diluciones seriadas hasta el volumen transferido a las cajas petri se esparció por estriado en la superficie del agar.

10.2.2 Bacterias totales por dilución en placa.

La cuenta de bacterias totales de un sistema se refiere a las bacterias heterótrofas presentes en el suelo, es decir, aquellas que obtienen su fuente de carbono a partir de compuestos orgánicos. En este grupo de bacterias se puede encontrar la gran mayoría de la población microbiana del ambiente. Los medios de cultivo usados y recomendados para su desarrollo son el agar nutritivo que es un medio relativamente simple, rico en fuentes de carbono y/o proteínas (peptona).

El método usado fue el de la cuenta viable por dilución en placa petri con agar nutritivo como el medio de crecimiento.

Inicialmente se preparó 450 ml de medio con agar (10.35 g) y se diluyó con agua destilada, se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Una vez estéril, el agar se vertió en cajas petri previamente esterilizadas y se dejó enfriar en condiciones estériles.

En cuanto a la preparación de la solución fisiológica al 0.9% lo cual se utilizó para

realizar las disoluciones debido a que evita el choque osmótico (ruptura de la membrana plasmática y pérdida del contenido celular) de las células de las bacterias.

En 1 L de agua destilada se diluyeron 9 g de NaCl de esta solución se transfirieron 900 μL a tubos de ensayos con tapón para esterilizarlos de igual manera que el agar nutritivo. Una vez teniendo el material listo, las cajas petri con agar gelificado y los tubos con solución fisiológica estéril, se procedió con lo siguiente:

En condiciones estériles, en campana de flujo laminar, se pesó 1 g de suelo contaminado de hidrocarburos de petróleo y 1g de suelo sin contaminar y se adicionó a un tubo de ensayo conteniendo 9 ml (disolución de solución fisiológica estéril). Utilizando el vórtex se agitó el tubo con la muestra durante 20 segundos, y se transfirieron con micropipeta y puntas estériles 100 μL de su contenido en un tubo con 900 μL de solución fisiológica, rotulando -1, el cual se agitó en el vórtex el mismo tiempo que el primer tubo, para transferir 100 μL de la disolución -1 a un tubo rotulado con la disolución -2 y así sucesivamente.

Una vez hecho esto, se transfirieron 100 μL de cada una de las disoluciones a cajas petri que contenían agar nutritivo, esparciendo por estriado con un asa de vidrio estéril sobre la superficie del agar. Finalmente, las cajas petri se incubaron a 37 °C por 48 horas, . Seleccionando aquellas que permitían tener una cuenta mayor a 30 y menor a 300 colonias.

Los resultados obtenidos se reportan como UFC/g/suelo (Unidades Formadoras de Colonias/gramo de suelo) utilizando el factor de disolución correctamente.

10.2.3. Aislamiento de Bacterias

Inicialmente se preparó 300 ml de medio con agar nutritivo (9.2 g) y se diluyo con agua destilada, se esterilizo a 121°C durante 15 minutos. Una vez estéril, el agar se vertió en cajas petri previamente esterilizadas y se dejó enfriar en condiciones estériles.

Se realiza una primera y segunda resiembra de bacterias que tengan características

visibles diferentes con el fin de poder identificar cada una de ellas este procedimiento se realiza esterilizando un asa bacteriológica en el mechero, y ya que seleccionamos la colonia se procede a extenderla en la caja petri, se procede a colocar el agar cerrado en la incubadora, durante 24 horas a una temperatura ambiente de 37°C.

Por último, realizamos una siembra por agotamiento con la finalidad de obtener las colonias de bacterias puras, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, solo que ahora se divide el área del agar en cuatro cuadrantes y dibujando con el asa impregnada, estrías en distintas direcciones en cada cuadrante, siguiendo la secuencia de las manecillas de reloj, sin recargar el asa para cada recorrido.

10.2.4. Hongos totales por dilución en placa.

Los hongos tienen hábitats muy diversos; sin embargo, la mayoría son terrestres y habitan en el suelo, desempeñando una actividad importante en la mineralización del carbono orgánico. Tienen requerimientos nutricionales muy simples, pero su desarrollo es más lento, por lo que requieren mayor tiempo de incubación para su cultivo.

Para determinar este parámetro, el método utilizado fue el de cuenta viable por dilución en placa, utilizando agar dextrosa Sabouraud. En cuanto a su preparación se diluyeron 29.25 g de Agar dextrosa Sabouraud en 450 ml de agua destilada y se esterilizo a 121°C durante 15 minutos. Una vez estériles se vertió en las cajas petri estériles y se esperó a que gelificara. El procedimiento de dilución y estriado fue el mismo que con el de las bacterias. El conteo de los hongos totales se llevó al acabo de 7 días.

10.2.5. Aislamiento de hongos

Inicialmente se preparó 300 ml de medio con agar de dextrosa y papa (11.7g) y se diluyo con agua destilada, se esterilizo a 121°C durante 15 minutos. Una vez estéril, el agar se vertió en cajas petri previamente esterilizadas y se dejó enfriar en condiciones estériles.

Se realiza resiembra de hongos que tengan características visibles diferentes con el fin de poder identificar cada una de ellas, este procedimiento se realiza esterilizando un asa

bacteriológica en el mechero, y ya que seleccionamos la colonia se procede a colocarla en el centro en la caja petri, y se procede a colocar el agar cerrado, la incubación se llevó durante 7 días a una temperatura de 30°C.

10.2.6. Morfología de bacterias

Las bacterias son microorganismos que se reproducen mediante fisión binaria, y que presentan tres formas básicas: las bacterias esféricas o cocos, las alargadas o bacilos y las bacterias curvadas o espirilos que pueden ser también comas, espiroquetas y vibrias (Vargas et al.,2014).

a) Cocos:

Estas bacterias presentan formas casi esféricas y sus agrupaciones son homogéneas. El tamaño de los cocos oscila entre los 0,8 a 1,0 mm. Y pueden presentar y tomar diversas formas, producto de dos factores importantes como son la tendencia de las células a mantenerse unidas, una vez sucedida la división y el o los planos de división celular.

- Diplococos:

Estos, después de su división, permanecen en pares, por ejemplo, la Neisseria (Meningococo)

-Tétradas:

Estos cocos se dividen en dos direcciones perpendiculares, formando una agrupación de cocos en una disposición cuadrada.

- Sarcinas:

Producto de la división de los cocos en tres direcciones perpendiculares, formando una agrupación de cocos con una disposición cúbica.

- Streptococos:

Estos cocos se dividen en un solo plano, formando una secuencia de cuatro o más células como si se tratase de una cadena.

-Estafilococos:

Formados por la agrupación irregular de cuatro o más cocos, en ocasiones se asemejan a las uvas.

b) Bacilos

Estas bacterias forman agrupaciones bastante heterogéneas por su variedad de subtipos morfológicos, que pueden ser cilíndricos, en forma de bastón, largos y delgados, pequeños y gruesos, también pueden presentar variaciones en sus extremos pudiendo ser rectos, afilados o redondeados.

-Diplobacilos:

Formados por bacilos agrupados en pares.

-Streptobacilos:

Agrupación semejante a una cadena formada por cuatro o más bacilos.

-Empalizado:

Son bacilos agrupados lado a lado como palitos de fósforo.

-Formas filamentosas:

Son bacilos que crecen en forma de fibras y toman distintas disposiciones por lo que esta formación se denomina también letras chinas.

c) Espirilos

Dentro de este tipo de bacterias se encuentran aquellas que en su forma presentan una o más curvaturas, algunas pueden presentar forma de hélices.

-Vibriones:

Son espirilos bastante cortos, por lo general presenta la forma de una coma.

-Espirilos:

Estas bacterias, relativamente rígidas, presentan una forma helicoidal; se mueven a través de flagelos externos dando una o más vueltas alrededor de su propio eje.

-Espiroquetas:

Presentan una forma helicoidal, pero a diferencia de los espirilos, poseen un cuerpo flexible, se mueven con la ayuda de filamentos axiales que son flagelos periplasmáticos, lo que les permite dar varias vueltas completas alrededor de su propio eje.

Las colonias son la manera macroscópica de observar la morfología que constituye una

agrupación de bacterias, que se constituyen en agrupaciones formadas por la reproducción de las bacterias en un medio en el cual son incubadas por espacio de 24 horas aproximadamente.

La morfología de una colonia dependerá del borde y la forma en que se eleva sobre el medio de cultivo. Así, se menciona que la forma de una colonia puede ser:

Circular: Pueden medir hasta 4,0 mm.

Puntiforme: Denominados también en “cabeza de alfiler”.

Irregular: No representan una forma geométrica.

Rizoide: Presentan una forma helicoidal.

Fusiforme: En forma de husos

En cuanto a los bordes estos pueden ser:

Enteros: Son homogéneos en todo su recorrido.

Ondulados: Presentan pequeñas fenestraciones.

Lobulados: Sus bordes son curvados de manera irregular.

Filamentosos: Presentan finos filamentos alrededor de toda la colonia.

La elevación de la colonia puede ser:

Plana

Convexa

Elevada

Las colonias pueden presentar diferentes texturas, estas pueden ser:

Lisas: Presentan una superficie homogénea.

Concéntricas: Su textura se extiende de manera circular, por lo general de afuera hacia adentro.

Arrugadas: Su superficie presenta pequeñas áreas sobresalientes y leves depresiones.

Con curvas: Llamadas también sinuosas, presenta una textura similar a la concéntrica, la diferencia radica en que este presenta un contorno más irregular.

Las bacterias en conjunto presentan también otras características como:

Pigmentación: Que puede ser verde, amarillo o grisáceo.

Olor: frutal o putrefacto.

Consistencia: mucoide, liso o rugoso.

Comportamiento óptico: frente a luz transmitida estos pueden ser opacos, translúcidos o transparentes;

10.2.7. Identificación de bacterias

Para la identificación de las bacterias en el laboratorio es importante conocer sus características morfológicas, la reacción a la tinción de gram, agrupación, propiedades, morfología colonial.

La tinción de Gram es el método más utilizado de carácter diferencial para el examen microscópico de las bacterias. Agrupa a las bacterias en Gram positivas y en Gram negativas. Las primeras poseen una capa gruesa de peptidoglicano y carecen de membrana externa, mientras que las Gram negativas tienen una capa más delgada de peptidoglicano y poseen una membrana externa (Rodríguez et.al.,2005).

Procedimiento para realizar la tinción

- 1.-Se fija la muestra mediante calor
- 2.-Cristal violeta (tiñe todas las bacterias, gram +, gram -) durante
1minuto
- 3.- Se fija con lugol durante 1 minuto.
- 4.-Se decolora con una mezcla de alcohol y cetona (Los gram – se decoloran)
- 5.-Safranina (colorante de contraste, que tiñe a los gram -) 1minuto.

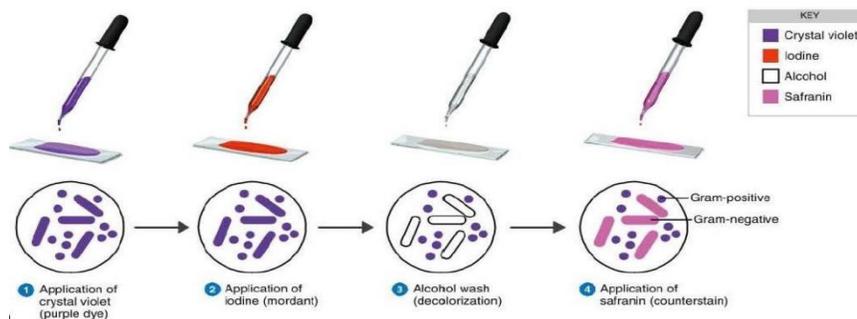


Figura 10.Esquema de la tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial

10.2.8. Morfología de hongos

Microorganismos eucarióticos no fotosintéticos, la mayoría son aerobios, utilizan materia orgánica para alimentarse (puede ser materia que descomponen o seres vivos), inmóviles, pueden ser unicelulares o pluricelulares. A pesar de que como grupo pueden alimentarse de una gran cantidad de compuestos, tienen requerimientos nutricionales sencillos.

Las características macroscópicas que se pueden considerar son:

Velocidad de crecimiento: Rápida, Lenta, Moderada

Tamaño (mm)

Forma: Circular, irregular

Elevación: Plana, Convexa y Elevada

Borde: Ondulado, lobulado, entero, filamentoso, rizoide

Superficie: Con surcos radiales, cerebriformes, sectorizada

Textura: Lisa, rugosa, cremosa, aterciopelado

Color

La microscopía confirma la especie por tipo de hifas, el cuerpo fructífero y las conidias, que son propias de cada especie. Muchas veces una observación microscópica permite

la identificación del hongo, por ejemplo, cuando se hace un frotis de epitelio del pie se puede determinar la especie del hongo que causa el pie de atleta (micosis superficial).

Tipos de hifa:

Cenocítica, Septada o tabicada, Septada multicluneada, Crenada (hay divisiones y canales de comunicación).

-Conidióforo:

Especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios. Se localizan en el extremo de hifas las cuales levantan la conidiofora en el aire con el fin de esparcir las esporas con más eficiencia.

- Septos:

A través de sus aberturas proporcionan nutrientes para células, que se almacenan en las paredes de las hifas en forma de glucógeno.

- Fialide:

Célula conidiógena (cualquier célula, en la cual o dentro de la cual se producen directamente los conidios) que originan las fialosporas.

- Esporas:

Formas de propagación producidas por reproducción sexual.

10.2.9. Identificación de hongos

La tinción de azul de lactofenol se emplea para observar hongos. Es una tinción simple (un solo colorante) y como tal esta basada en la afinidad del colorante por componentes de las células, en este caso por las estructuras fúngicas.

El azul de lactofenol tiene tres características que lo hacen especial para observar dichas estructuras en los hongos del tipo moho obtenidos en los cultivos por aislamiento.

El fenol destruye la flora acompañante (algunas veces en los cultivos, juntos a los hongos pueden crecer colonias de bacterias).

El ácido láctico conserva las estructuras fúngicas al crear, por decirlo de algún modo, una película que las protege provocado por un cambio de gradiente osmótico entre el interior y el exterior de dicha estructura.

El azul de algodón tiene la capacidad de adherirse a las hifas y conidios de los hongos microscópicos.

Procedimiento para realizar la tinción

1. Sobre un porta limpio y seco depositaremos 2 gotas de azul de lactofenol.
2. Cortaremos un trozo de cinta celo y la pegaremos en el extremo del asa estéril.
3. Con cuidado pasaremos el extremo del celo por el borde exterior de la colonia.
4. Pegaremos la cinta celo en el portaobjetos que tiene el colorante retirando con cuidado el asa.
5. Añadiremos una gota de colorante sobre el celo.
6. Cubriremos la preparación con un cubreobjetos.
7. Observaremos al microscopio



Figura 11.Tinción de hongos

10.3. Preparación del inóculo

Para mantener la bacteria viable se prepararon inóculos en un medio líquido con caldo nutritivo un día antes de iniciar el experimento el cual se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, para este proyecto seleccionamos las Bacteria 1(B1), Bacteria 2 (B2) y Bacteria

6 (B6) que fueron aisladas y caracterizadas a partir de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo identificadas en la morfología y tinción gram, Se tomó un asa de la caja Petri donde se encontraba las bacterias, y cada una se introdujo cuidadosamente al matraz conteniendo el caldo nutritivo estéril, se tapó, se rotuló. y posteriormente, el cultivo se puso en agitación orbital durante 24 h.

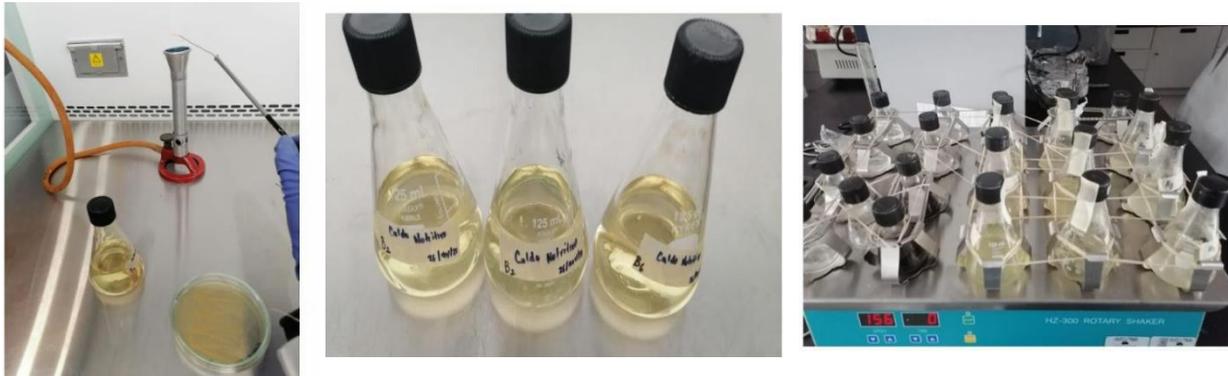


Figura 12. Inóculo de las bacterias

Las cepas de bacterias B1, B2 y B6 fueron conservadas con glicerol al 80% para tener la conservación en congelación, se realizó por duplicado.



Figura 13. Conservación de las bacterias

Para el hongo se prepararon inóculos en medio líquido con PDA (papa dextrosa agar). Unos 4 días antes de iniciar el experimento el cual se esterilizo a 121°C durante 15 minutos para este proyecto seleccionamos los hongos H1, H2, H4, H5, H6, H7, que fueron aislados y caracterizados a partir de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo e identificados en la morfología y tinción de hongos, se tomó un corte de cada hongo de

cada caja Petri y se introdujo cuidadosamente al matraz conteniendo el caldo dextrosa papa (PDA) previamente estéril, se tapó, se rotuló, el cultivo se puso en agitación orbital durante 5 días.

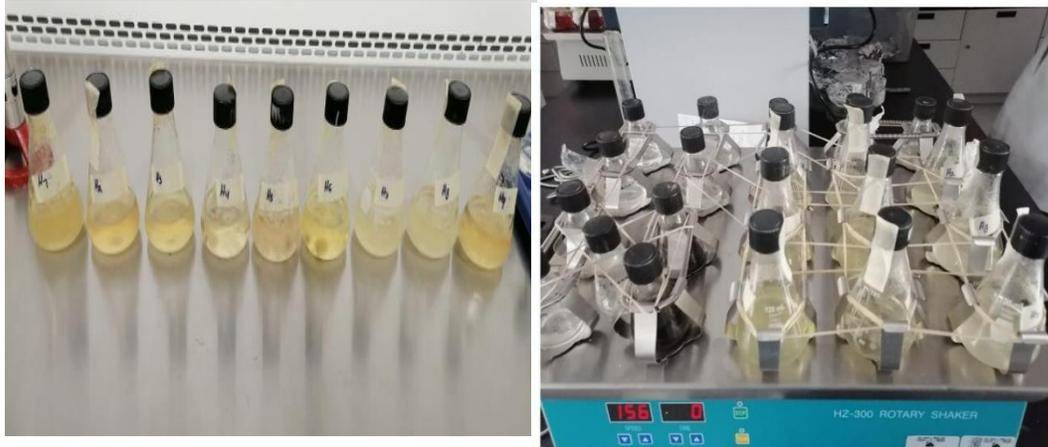


Figura 14. Preparación de inóculos fúngicos

Cada una de las cepas de hongos fueron conservadas con aceite mineral para preservar sus características por congelación. Se realizó por duplicado



Figura 15. Preparación de muestras de biomasa bacteriana para su conservación

10.4. Aclimatación

10.4.1. Bacterias

Para la aclimatación se adiciono 2 ml del caldo enriquecido de cada bacteria al medio mineral que se empleó en este experimento el cual está constituido (g/L): por 2.13 de fosfato disódico anhidro ($\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$), 1.3 de fosfato de potasio monobásico (K_2HPO_4), 0.5 cloruro de amonio (NH_4Cl) y 0.2 de sulfato de magnesio (MgSO_4), y como fuente de carbono la fracción aromática del petróleo que en este caso se empleó el queroseno a una concentración de 100 ppm.

Bacteria 1 (B1)	2 ml del inoculo (Bacteria)+20 ml de medio mineral +100 ppm queroseno
Control abiótico	2ml del inoculo (Bacteria 1) +20ml de medio mineral
Bacteria 2 (B2)	2 ml del inoculo (Bacteria 2) +20 ml de medio mineral +100ppm queroseno
Control abiótico	2 ml del inoculo (Bacteria 2) +20 ml de medio mineral
Bacteria 6 (B6)	2 ml del inoculo (Bacteria 6) +20 ml de medio mineral +100 ppm queroseno
Control abiótico	2 ml del inoculo (Bacteria 6) +20 ml de medio mineral

Una vez que se adicionan el inoculo y la fracción de hidrocarburo (queroseno) se puso en agitación orbital durante 30 días. Para poder seleccionar las mejores bacterias que se aclimatan en este medio y así iniciar los ensayos de tolerancia del contaminante.



Figura 16. Acclimatación de las bacterias

10.4.2. Hongos

Para la acclimatación se adiciono 2 ml del caldo enriquecido de cada hongo al medio mineral que se empleó en este experimento el cual está constituido (g/L): por 2.13 de fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4), 1.3 de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), 0.5 cloruro de amonio (NH_4Cl) y 0.2 de sulfato de magnesio (MgSO_4), y como fuente de carbono la fracción aromática del petróleo que en este caso se empleó el queroseno a una concentración de 100 ppm.

Hongo 1 (H1)	2 ml del inoculo (Hongo 1) +20 ml de medio mineral +100 ppm queroseno
Control abiótico	2 ml del inoculo (Hongo 1) +20 ml de medio mineral
Hongo 2 (H2)	2 ml del inoculo (Hongo 2) +20 ml de medio mineral +100 ppm queroseno
Control abiótico	2 ml del inoculo (Hongo 2) +20 ml de medio mineral
Hongo 4 (H4)	2 ml del inoculo (Hongo 4) +20 ml de medio mineral +100 ppm queroseno
Control abiótico	2 ml del inoculo (Hongo 4) +20 ml de medio mineral
Hongo 5 (H5)	2 ml del inoculo (Hongo 5) +20 ml de medio mineral +100 ppm queroseno

Control abiótico	2ml del inoculo (Hongo 5) +20ml de medio mineral
Hongo 6 (H6)	2 ml del inoculo (Hongo 6) +20 ml de medio mineral +100 ppm queroseno
Control abiótico	2 ml del inoculo (Hongo 6) +20 ml de medio mineral
Hongo 7 (H7)	2 ml del inoculo (Hongo 7) +20 ml de medio mineral +100 ppm queroseno
Control abiótico	2 ml del inoculo (Hongo 7) +20 ml de medio mineral

Una vez que se adicionan el inoculo y la fracción de hidrocarburo (queroseno) se puso en agitación orbital durante 30 días. Para poder seleccionar las mejores cepas de hongos que se aclimatan en este medio y así iniciar los ensayos de tolerancia del contaminante.

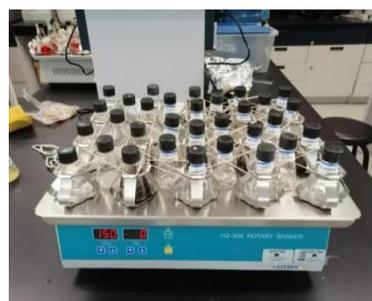


Figura 17. Aclimatación de los hongos

Después de la aclimatación se observó el crecimiento en la Bacteria 1, Bacteria 2 y Bacteria 6 así como en el Hongo 1, Hongo 2 y Hongo 5 en comparación con los demás, para poder seleccionar la mejor cepa de bacteria y hongo se realizó la extracción y cuantificación gravimétrica y cromatografía de gases.



Figura 18. Bacterias y hongos que presentaron mayor crecimiento en la aclimatación

10.5. Técnicas analíticas para la cuantificación de la biorremediación de hidrocarburos de petróleo

Los hidrocarburos de petróleo constituyen un número muy grande de compuestos químicos, los mismos se pueden agrupar según su funcionalidad de compuestos o bien productos industriales. Para determinar esta diversidad de compuestos se pueden utilizar varias técnicas analíticas. Tanto en suelo como en agua los hidrocarburos deben ser extraídos con un solvente adecuado y posteriormente los compuestos que han sido solubilizados son analizados por varios métodos.

10.5.1. Degradación del hidrocarburo queroseno por las cepas de bacterias y hongos

Para evaluar la biodegradación del queroseno, por cada una de las cepas de bacterias y hongos se utilizaron como fuente de carbono 100 ppm del hidrocarburo, así como 20 ml del inóculo de bacterias y hongos una vez ya aclimatadas.

Los experimentos fueron realizados en matraces de 50ml, los cuales se dejaron en agitación durante 9 días. Una vez transcurridos los días de degradación se extrajo el queroseno con diclorometano una vez evaporado, se analizó por cromatografía de gases.

10.5.2. Extracción orgánica y cuantificación de HAP's

Una vez concluidos los tiempos de biodegradación de los experimentos se realizó una extracción orgánica con diclorometano (DCM). Para ello se utilizaron 3 volúmenes del disolvente, el primer volumen fue de 10 ml, mientras que los 2 restantes fueron de 5 ml cada uno. La emulsión formada entre cada adición del disolvente se separó por centrifugación a 10,000 rpm durante 20 minutos. Las fases orgánicas fueron reunidas y secadas por filtración con sulfato de sodio anhidro. El filtrado se recuperó en un matraz, para que se eliminara el disolvente con ayuda de un evaporador rotatorio Buchi. El extracto orgánico residual se transfirió a un vial previamente etiquetado y tarado. El extracto de hidrocarburos obtenido se mantuvo en un desecador hasta la obtención del peso constante del vial.

La extracción de queroseno para los cultivos hongos se realizó utilizando un ultrasonic-procesador en cual nos permite triturar el hongo por si contiene hidrocarburo concentrado en él y así poder tenerlo en una solución y facilitar su extracción una vez así se procede el mismo procedimiento antes mencionado.

La cuantificación del porcentaje de biodegradación por gravimetría se realizó utilizando
Fórmula:

$$\% \text{ degradación} = \frac{[(\text{HC's I (ps)}) - (\text{HC's F (ps)})]}{[\text{HC's I (ps)}]}$$

10.5.3. Análisis por cromatografía de gases

GC-FID se prefiere principalmente para aplicaciones de laboratorio porque proporciona selectividad y sensibilidad relativas (Aparicio-Ruiz et al., 2018) y está reconocido por la EPA, la British Standard Institution (BSI) e ISO. El método EPA 8015 (EPA, 1996b) se usa para determinar TPH, BS ISO 15009: 2002 (ISO/TC 190/SC 3, 2007a) es para

hidrocarburos volátiles aromáticos y halogenados, y BS ISO 16703: 2004 (ISO/TC 190/SC 3, 2007b) se usa para determinar el contenido de hidrocarburos en el rango de C10 a C40 (n-alcanos) en sólidos, incluidos suelos y desechos. GC-FID se utiliza para aplicaciones cuantitativas y cualitativas, incluido el cribado de muestras ambientales (Saari et al., 2007; Snape et al., 2005; Vallejo et al., 2001), el tipo y la identidad del aceite fresco a ligeramente degradado en muestras ambientales para el reconocimiento de patrones de hidrocarburos de petróleo (Risdon et al., 2008; Wang & Fingas, 2003) y caracterizar y resolver el perfil de mezclas complejas no resueltas en sedimentos contaminados con petróleo (Frysinger et al., 2003).

La constante de velocidad de biodegradación de los hidrocarburos de petróleo en un sitio contaminado es muy variable y difícil de evaluar debido a las condiciones variables del sitio. Sin embargo, GC-FID se ha utilizado para desarrollar un modelo de correlación simple para estimar la constante de velocidad de degradación de bioventilación de la gasolina en varios suelos sin tener que realizar experimentos largos y costosos. Los límites de detección para GC-FID dependen del método y la matriz de la muestra con valores típicos de 10 mg/kg en el suelo (Weisman, 1998).

Sin embargo, los altos costos analíticos y el tiempo operativo, los problemas de calibración del instrumento los efectos de la matriz de muestra y el impacto de las condiciones operativas del GC son algunos de los desafíos del método (Aparicio-Ruiz et al., 2018). Aun así, GC-FID ha sido utilizado desde hace tiempo para ayudar a cuantificar la tasa de biodegradación de TPH, como se evidencia en los trabajos de Yeung y colaboradores (P. Y. Yeung et al., 1997; P. Y. P. Yeung et al., 1994).

Una vez seleccionado la mejor cepa de bacterias y de hongos, se procede a formar el cultivo secuencial, en donde se coloca en un matraz de 50ml primero adicionando la bacteria y a los 7 días el hongo, y se realiza viceversa, en otro matraz se coloca la mezcla de ambos para comparar y ver en cual se efectúa una mayor degradación del hidrocarburo.

Una vez transcurrido el tiempo de degradación, se realiza el mismo procedimiento de extracción, cuantificación y análisis cromatográfico para comparar con cual se obtiene mejores resultados.

11. RESULTADOS

11.1 Caracterización microbiológica

11.1.1 Bacterias totales por dilución en placa

De acuerdo con la fórmula, UFC/ml o UFC/g= [(No. de colonias por placa X el factor de dilución) / volumen de la muestra sembrada], se determinaron las unidades formadoras de colonias para los microorganismos.

Parámetro

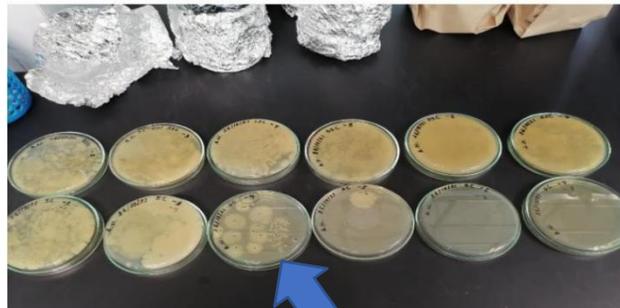
Resultado (UFC's/g suelo)

Bacterias (UFC/g suelo)

6.7×10^6

Suelo sin contaminar

Suelo contaminado

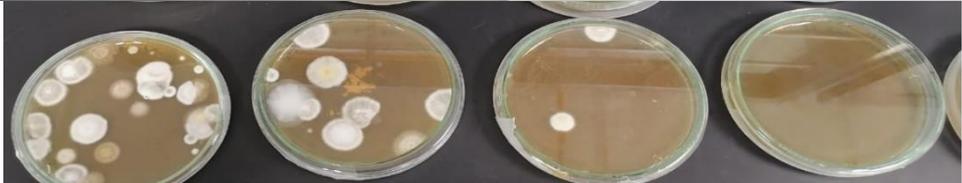


67 colonias contables a partir de la dilución -5

11.1.2 Hongos totales por dilución en placa

Conteo de colonias de hongos

Parámetro	Resultado (UFC's/g suelo)
Hongos (UFC/g suelo)	4.5×10^3

Suelo sin contaminar	
Suelo contaminado	

45 colonias contables a partir de la dilución -2
--

11.2 Morfología y Tinción Gram

Las comunidades microbianas de ambientes contaminados tienden a seleccionar a los microorganismos que son capaces de utilizar y/o sobrevivir a los compuestos tóxicos. Como resultado de esto, dichos microorganismos tienden a ser menos abundantes y su diversidad puede ser influenciada por la complejidad de las mezclas químicas en las que se encuentran inmersas y por el cual han sido expuestas.

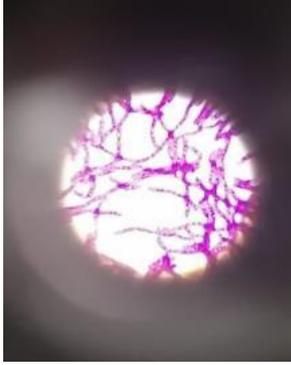
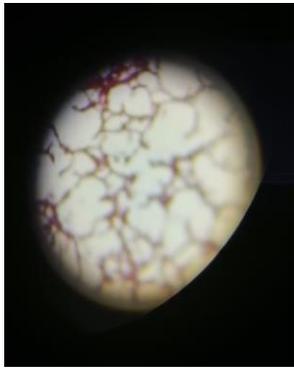
Los resultados de la morfología colonial y de la tinción de Gram, se muestra en la tabla 8. En ella, puede observarse notablemente el predominio de las bacterias Gram negativas.

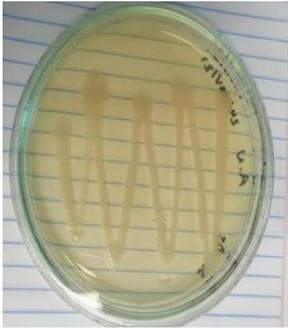
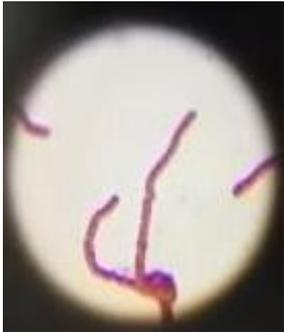
11.2.1 Bacterias

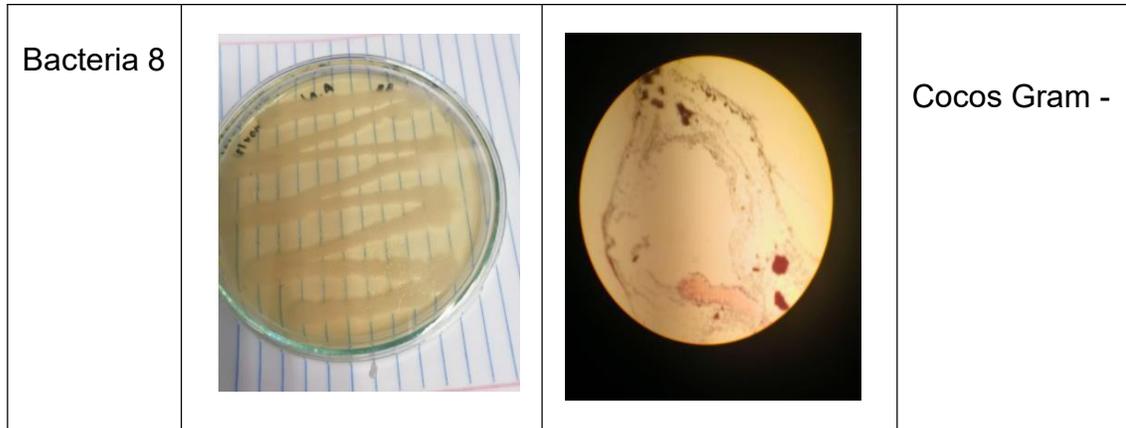
Tabla 8. Características macroscópicas

Colonia	Forma	Elevación	Borde	Color	Aspecto	Gram
1	Irregular	Plana	Ondulado	Beige	Seco	+
2	Circular	Convexa	Ondulado	Beige	Creimoso	-
3	Irregular	Plana	Ondulado	Amarillo	Viscoso	-
4	Circular	Plana	Ondulado	Beige	Seco	-
5	Circular	Convexa	Entero	Beige	Húmedo	-
6	Circular	Elevada	Ondulado	Amarillo	Brillante húmedo	-
7	Irregular	Plana	Ondulado	Beige	Seco	-
8	Circular	Plana	Ondulado	Beige	Seco	-

Tabla 9. Características macroscópicas y microscópicas de bacterias.

Colonias	Macroscópica	Microscópica lente 100x	Características
Bacteria 1			Bacilos Gram + en forma de cadena
Bacteria 2			Bacilos Gram –
Bacteria 3			Bacilo Gram – muy dispersos

<p>Bacteria 4</p>			<p>Bacilos Gram- muy pequeños</p>
<p>Bacteria 5</p>			<p>Bacilos Gram -</p>
<p>Bacteria 6</p>			<p>Son Gram - negativas Presenta bacilos encapsulados</p>
<p>Bacteria 7</p>			<p>Bacilos Gram -</p>



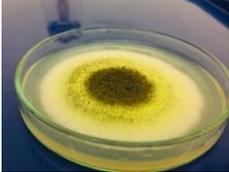
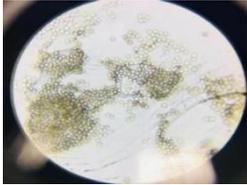
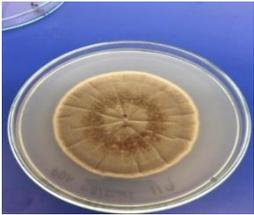
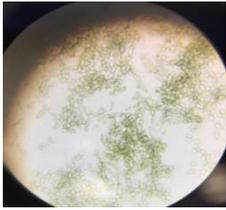
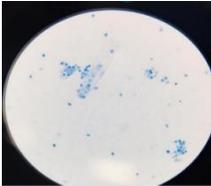
11.2.3 Hongos

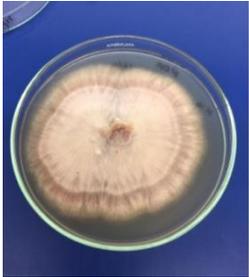
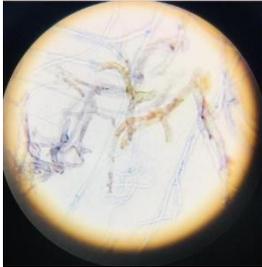
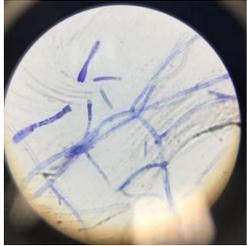
Tabla 10. Tabla de morfología macroscópica de cepas de hongos

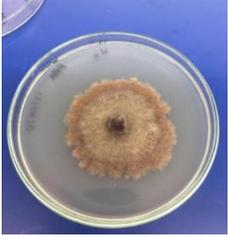
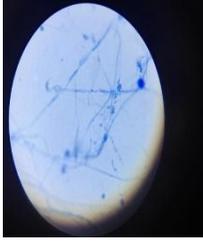
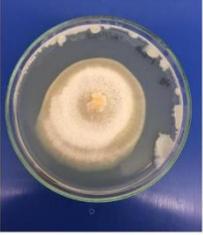
Cepas Aisladas	Tiempo de Crecimiento	Forma	Elevación	Borde o Margen	Superficie	Pigmento adverso	Textura	Tamaño (mm)
H1	Rápido	Circular	Elevado en el Centro	Filamentoso	Sectorizada	Verde con Blanco	Polvorienta	45
H2	Rápido	Irregular	Elevado en el centro	Filamentoso	Surcos radiales	Verde con blanco	Aterciopelado	14
H3	Moderado	Irregular	Elevado en el centro	Filamentoso	Sectorizada	Blanco con amarillo	Aterciopelado	20
H4	Rápido	Irregular	Elevado en el Centro	Rizoide	Surcos radiales	Rojo con blanco	Aterciopelado	9
H5	Rápido	Circular	Plana y extendida	Filamentoso	Lisa	Beige con café	Aterciopelado	60
H6	Rápido	Irregular	Elevada en el centro	Filamentoso	Sectorizada	Marrón con blanco	Aterciopelado	31
H7	Rápido	Irregular	Elevada en el centro	Filamentoso	Sectorizada	Café con amarillo	Aterciopelado	35
H8	Lento	Irregular	Convexa	Encorvado	Plegada	Blanco con amarillo	Algodonosa	17

H9	Moderado	Irregular	Elevada	Filamentoso	Invasiva	Blanco con amarillo	Beloso	18
----	----------	-----------	---------	-------------	----------	---------------------	--------	----

Tabla 11. Tabla de morfología microscópica de cepas de hongos

Cepa de Hongo	Macroscópicamente	Microscópicamente 100x	Nombre
H1	 <p>Crecimiento rápido de forma circular con elevación en el centro, borde filamentoso, superficie sectorizada de color verde con blanco y de textura polvorienta.</p>	 <p>Presenta clamidosporas y conidióforos son ramificados.</p>	Trichoderma
H2	 <p>Crecimiento rápido de forma irregular con elevación en el centro, borde filamentoso, superficie surcos radiales de color verde con blanco y de textura aterciopelada.</p>	 <p>Los conidios en cadenas forman una compacta columna sobre la vesícula, son de color verde, finamente rugosos, globosos o subglobosos y de 2 a 3 μm de diámetro.</p>	Cladosporium Sphaerospermum
H3	 <p>Crecimiento moderado de forma irregular con elevación en el centro, borde filamentoso,</p>	 <p>Las endosporas libres crecen y producen endoesporulantes.</p>	Aspergillus Flavus

	superficie sectorizada de color amarillo con blanco y de textura aterciopelada.		
H4	 <p>Crecimiento rápido de forma irregular con elevación al centro, borde rizoide, superficie surcos radiales de color rojo con blanco y de textura aterciopelada.</p>	 <p>Conidios formando cadenas acropetal, hifas aseptadas, ausencia de clamidosporas.</p>	Aureobasidium pullulans
H5	 <p>Crecimiento rápido de forma circular con elevación plana y extendida, borde filamentosos, superficie lisa de color beige con café y de textura aterciopelada.</p>	 <p>Micelio septado, hialino, microsifonado, presenta hifas en raquetas, con numerosos macroconidios largos (hasta 100 μm), ahusados, de pared gruesa, equinulados con extremos puntiagudos.</p>	Aspergillus terreus

<p>H6</p>	 <p>Crecimiento rápido de forma irregular con elevación en el centro, borde filamentoso, superficie sectorizada de color marrón con blanco y de textura aterciopelado.</p>	 <p>La presencia de esporangióforos ramificados. Terminando cada rama en una vesícula que produce merosporangios en toda su superficie. Presenta hifas seccionadas.</p>	<p><i>Syncephalastrum racemosum</i></p>
<p>H7</p>	 <p>Crecimiento rápido de forma irregular con elevación en el centro, borde filamentoso, superficie sectorizada de color café con amarillo y de textura aterciopelada.</p>	 <p>Micelio septado, hialino, microsifonado, ramificado, con presencia de clamidoconidios intercalares y terminales, y algunas hifas en raquetas.</p>	<p><i>Aspergillus sp</i></p>
<p>H8</p>	 <p>Crecimiento lento de forma irregular con elevación en el centro, borde encorvado, superficie plegada de color amarillo .</p>	 <p>Conidióforos regulares y rugosos, conidios piriformes o globulosos, vesículas ovaladas, conidiósporas múltiples, hifas hialinas.</p>	<p><i>Aspergillus flavus</i></p>

11.3 Cuantificación y Extracción de las Cepas de Bacterias y Hongos

Tabla 12. Resultados de la biodegradación de cepas de las bacterias aisladas a los 7 y 15 días de incubación.

		7 días	
	Promedio (dos repeticiones)	Degradación	%Degradación
Bacteria 1	0.018515	0.254029	25.40
Bacteria 2	0.014813	0.403183	40.31
Bacteria 6	0.021235	0.14440	14.44

		15 días	
	Promedio (dos repeticiones)	Degradación	%Degradación
Bacteria 1	0.015435	0.378122	37.81
Bacteria 2	0.012155	0.510274	51.02
Bacteria 6	0.017815	0.282232	28.22

Tabla 13. Resultados de la biodegradación de cepas de los hongos aislados a los 7 y 15 días de incubación

		7 días	
	Promedio (de duplicados)	Degradación	%Degradación
Hongo 1	0.0123615	0.501954069	50.19
Hongo 2	0.0183000	0.269540693	26.95
Hongo 5	0.0103500	0.582796132	58.27

		15 días	
	Promedio (de duplicados)	Degradación	%Degradación
Hongo 1	0.010675	0.569903304	56.99
Hongo 2	0.011800	0.524576954	52.45
Hongo 5	0.008285	0.661966160	66.61

11.4 Perfiles cromatográficos obtenidos de la biodegradación de los HPs por hongos y bacterias

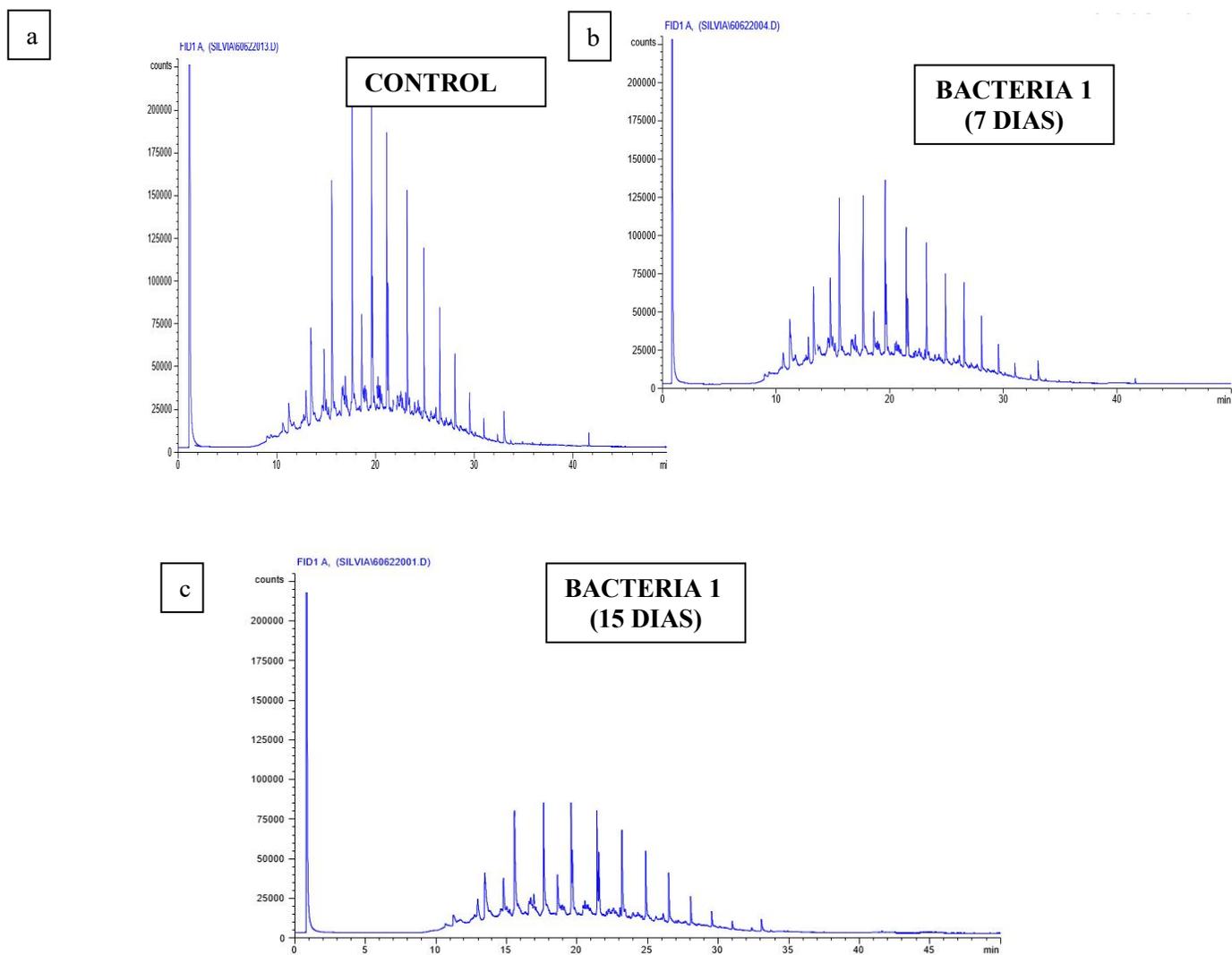
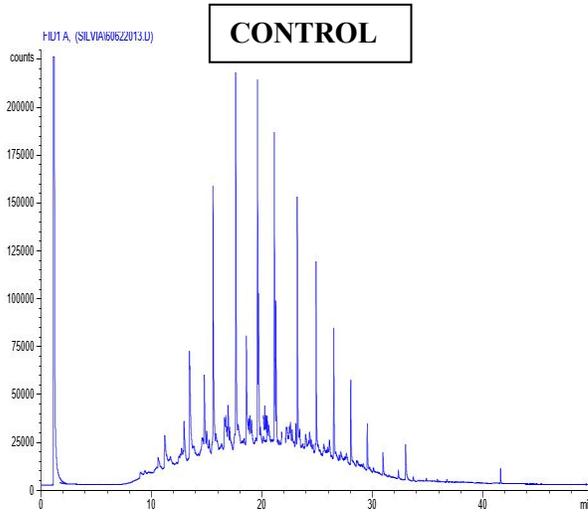
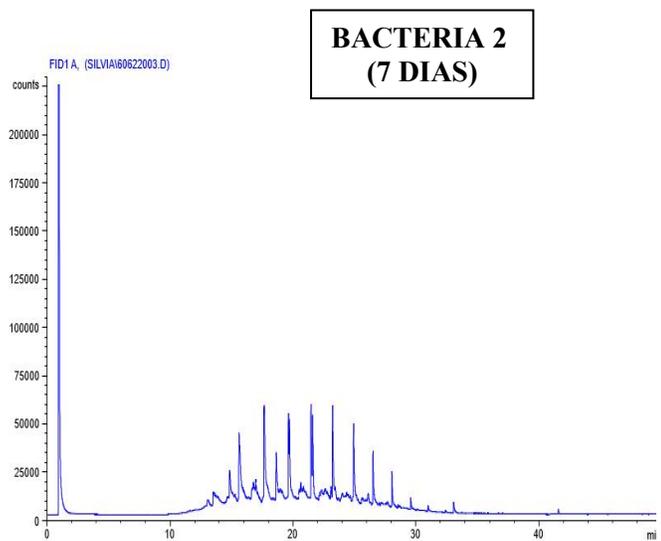


Figura 19. Perfil cromatográfico de la fracción aromática a) control abiótico, b) perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por la cepa de la bacteria 1 (7 días) y c) perfil cromatográfico de la fracción aromática por la cepa de la bacteria 1 (15 días).

a



b



c

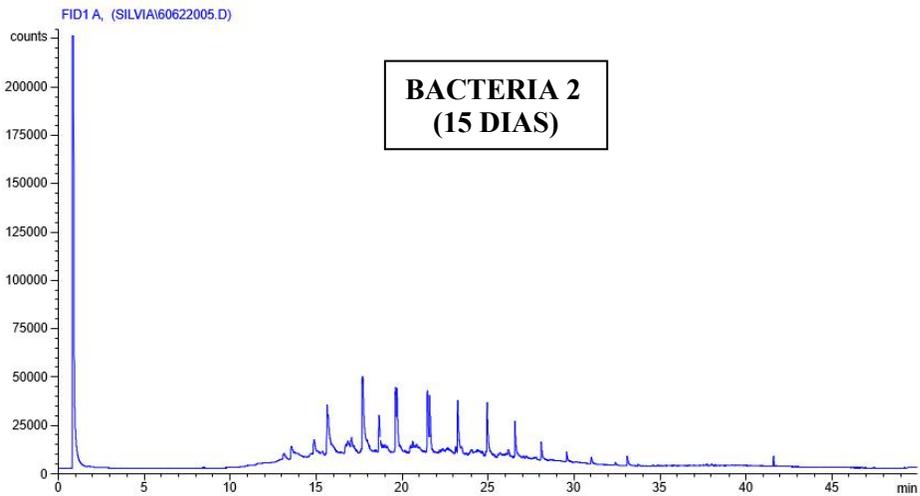


Figura 20. Perfil cromatográfico de la fracción aromática a) control abiótico, b) perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por la cepa de la bacteria 2 (7 días) y c) perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por la cepa de la bacteria 2 (15 días).

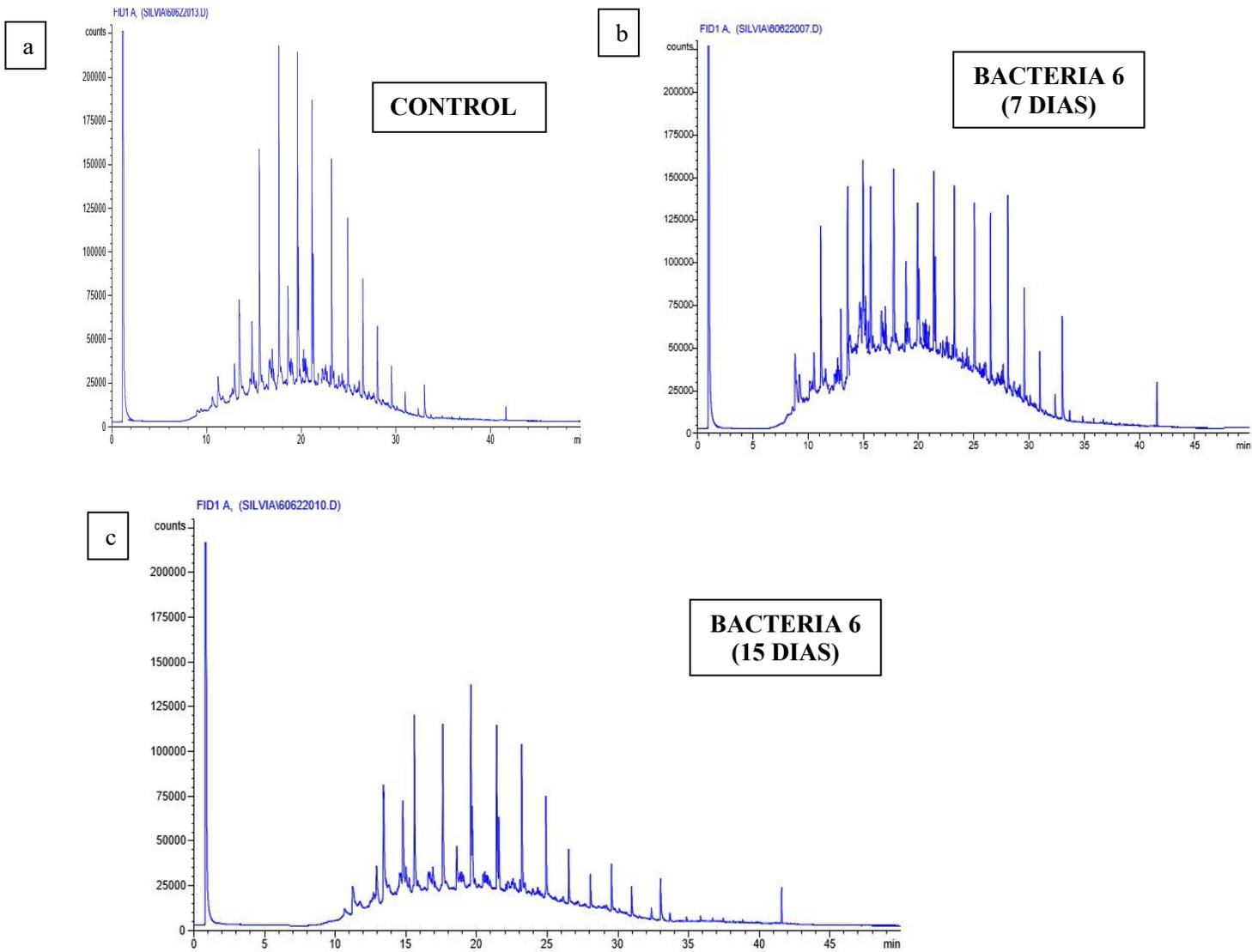


Figura 21. Perfil cromatográfico de la fracción aromática a) control abiótico, b) perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por la cepa de la bacteria 6 (7 días) y c) perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por la cepa de la bacteria 6 (15 días).

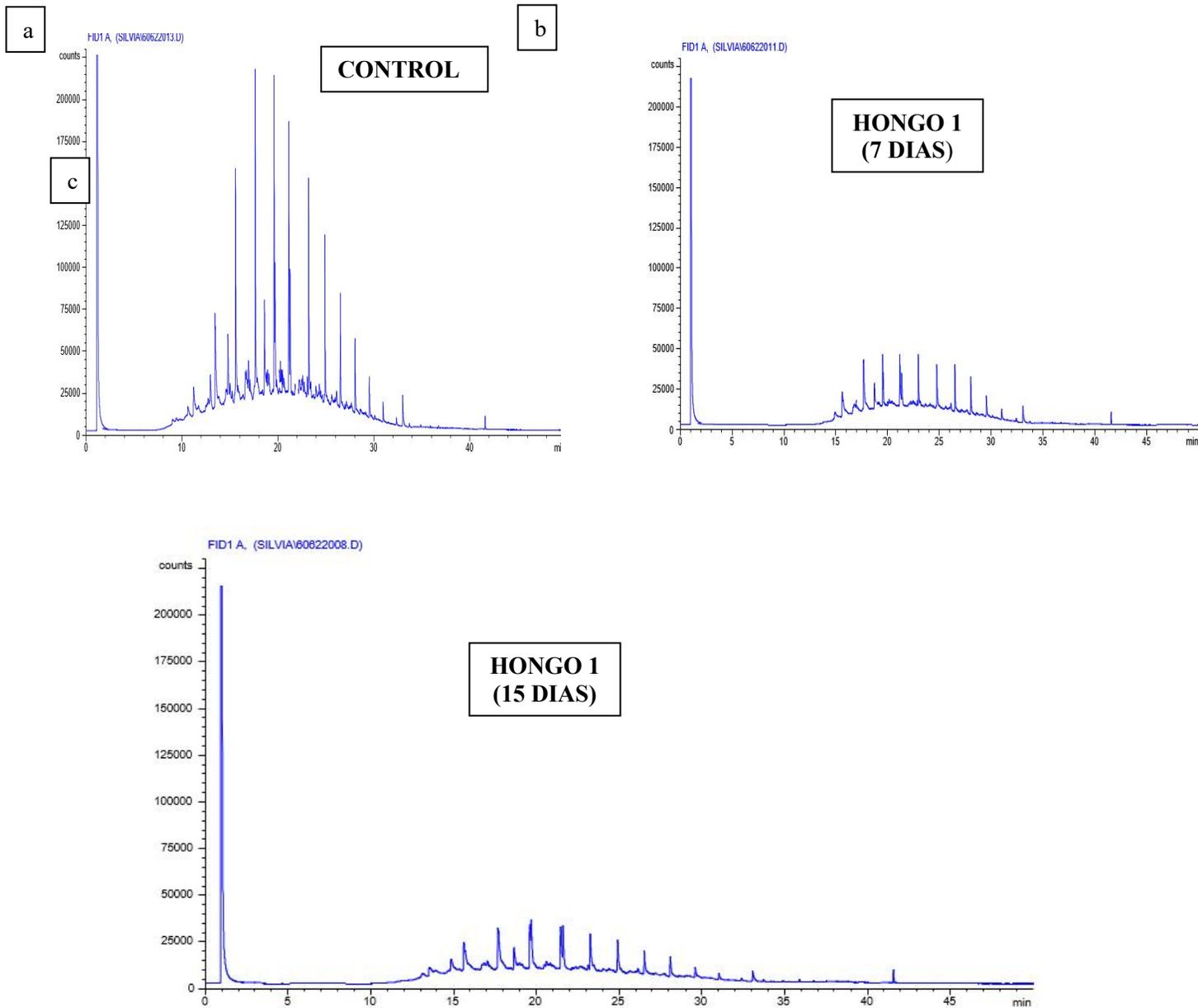


Figura 22. Perfil cromatográfico de la fracción aromática a) control abiótico, b) perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por la cepa del hongo 1 (7 días) y c) perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por la cepa del hongo 1 (15 días).

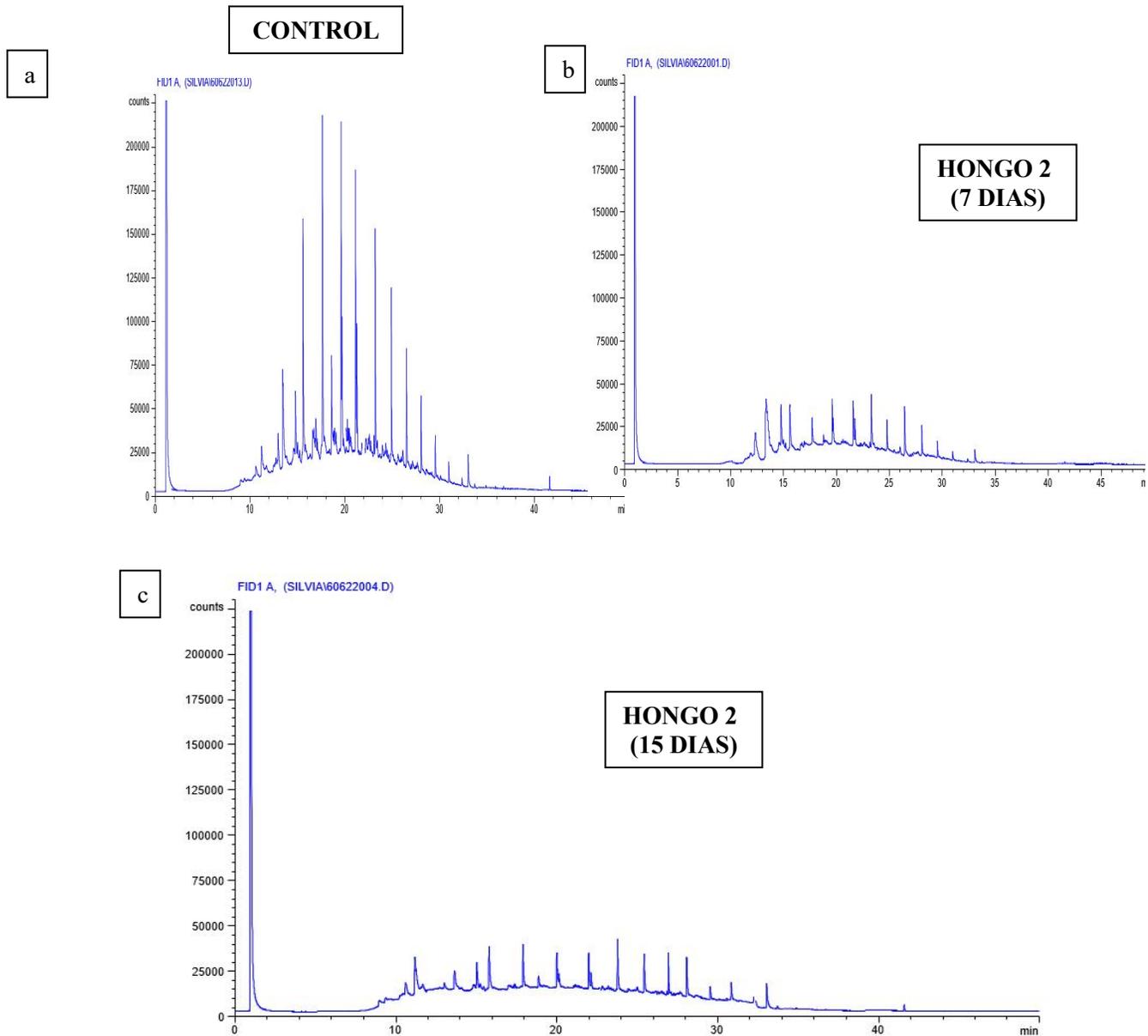


Figura 23. Perfil cromatográfico de la fracción aromática a) control abiótico, b) perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por la cepa del hongo 2 (7 días) y c) perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por la cepa del hongo 2 (15 días).

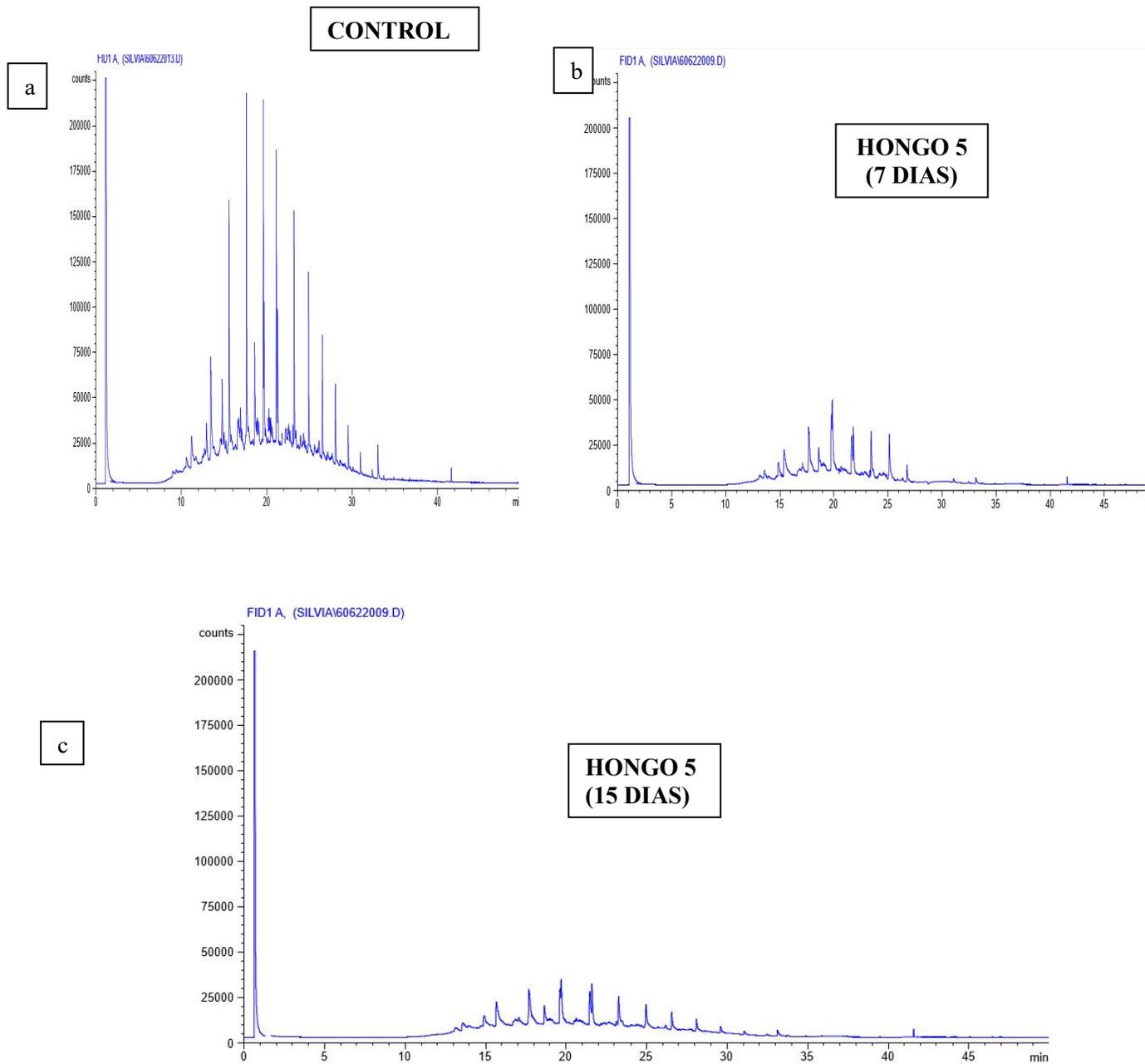


Figura 24. Perfil cromatográfico de la fracción aromática a) control abiótico, b) Perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por la cepa del hongo 5 (7 días) y c) Perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por la cepa del hongo (15 días).

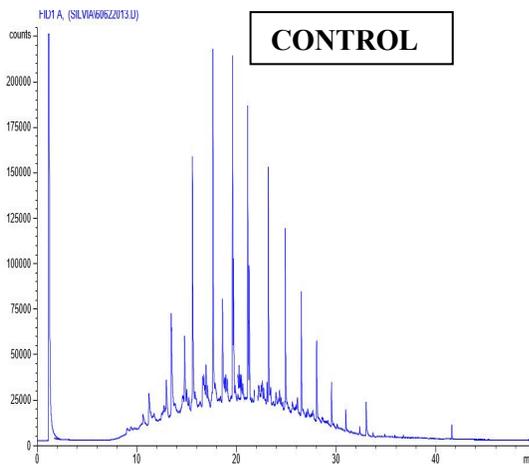
11.5 Cuantificación y Extracción del Cultivo Secuencial

Tabla 14. Resultados de la biodegradación de cepas del cultivo secuencial.

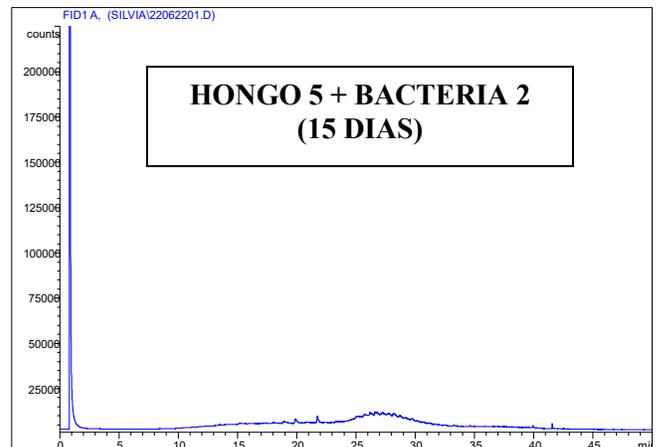
		15 días	
	Promedio	Degradación	%Degradación
Hongo 5 + Bacteria 2	0.00644670	0.740263229	74.02
Bacteria 2 + Hongo 5	0.00649667	0.738248724	73.82
Bacteria 2 Hongo 5	0.0073967	0.701987644	70.19

11.6 Análisis cromatográfico de cultivo secuencial

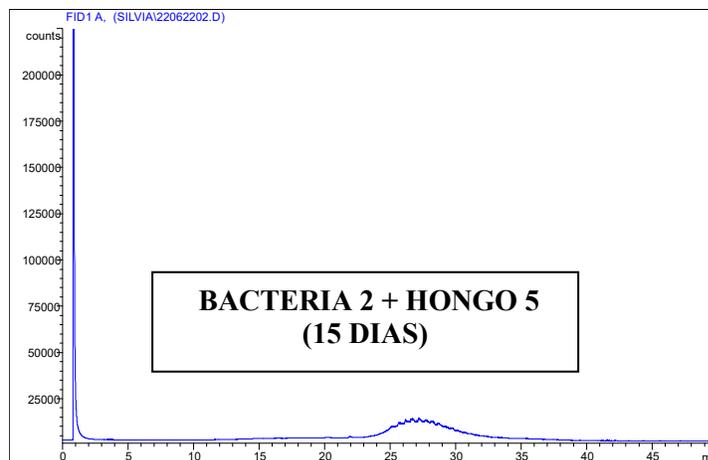
a



b



c



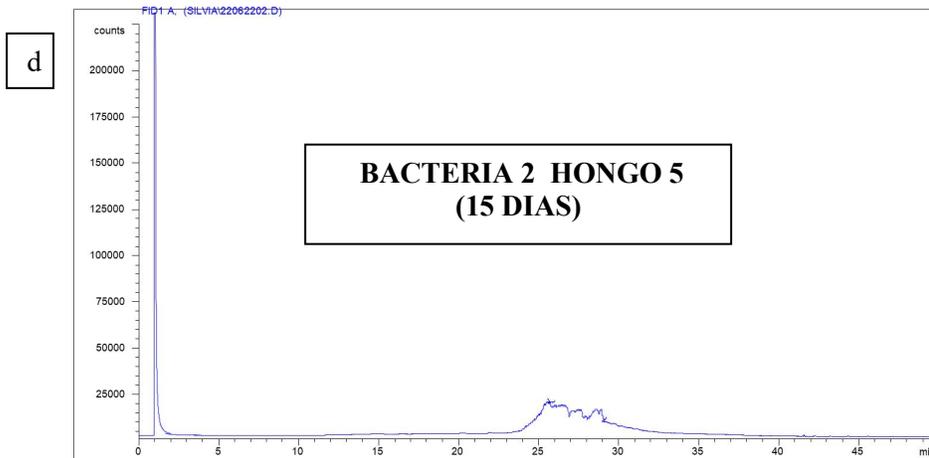


Figura 25. Perfil cromatográfico de la fracción aromática a) control abiótico, b) perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por el cultivo secuencial (hongo 5 + bacteria 2) 15 días y c) perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por el cultivo secuencial (bacteria 2 + hongo 5) 15 días y d) perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática de (bacteria 2+ hongo 5) 15 días.

11.7 Prueba t de Student: muestras relacionadas

$$H_0 = \mu_d \geq 0$$

$$H_1 = \mu_d < 0$$

11.7.1 Estadístico de prueba:

$$t = \frac{\bar{d}}{S_d \sqrt{n}}$$

Tabla 15. Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	Variable 1	Variable 2
Media	0.359250333	0.4878455
Varianza	0.027543852	0.01864394
Observaciones	6	6
Coefficiente de correlación de Pearson	0.918998669	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	

Estadístico t	4.676584057
P(T<=t) una cola	0.002725132
Valor crítico de t (una cola)	2.015048373
P(T<=t) dos colas	0.005450264
Valor crítico de t (dos colas)	2.570581836

Resultado: Hay un cambio significativo y se concluye con un nivel de significancia (0.05) que se obtienen mejores resultados de degradación en un intervalo de mayor tiempo.

11.7.2 Comparaciones múltiples

Tabla 16. Análisis de varianza de un factor

ANÁLISIS DE
VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma C.</i>	<i>G. L</i>	<i>Promedio C.</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.219597138	5	0.043919428	4.32334719	0.05158765	4.38737419
Dentro de los grupos	0.060951979	6	0.010158663			
Total	0.280549117	11				

11.8 Prueba de Tukey

La prueba de Tukey declara que dos medias son significativamente diferentes si el valor absoluto de sus diferencias muestrales exceden.

$$T_{\alpha} = \frac{q_{\alpha}(a, v)}{\sqrt{2}} \sqrt{MS_E \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

a = total de tratamientos
v = grados de libertad asociados MS_E

De tablas se obtiene este valor $q_{\alpha}(a, v) = 5.63$

$$MS_E = 0.010158663$$

	7 días	15 días	Yi	\bar{y}_1	
Bacteria 1	0.25403	0.37812	0.63215	0.31607	$n_1 = 2$
Bacteria 2	0.40318	0.51027	0.91346	0.45673	$n_2 = 2$
Bacteria 6	0.14400	0.28223	0.42623	0.21211	$n_3 = 2$
Hongo 1	0.50195	0.56990	1.07186	0.53593	$n_4 = 2$
Hongo 2	0.26954	0.52458	0.79412	0.39706	$n_5 = 2$
Hongo 5	0.58280	0.66197	1.24476	0.62238	$n_6 = 2$

$$\bar{y}_3 \quad \bar{y}_1 \quad \bar{y}_5 \quad \bar{y}_2 \quad \bar{y}_4 \quad \bar{y}_6$$

Comparación

\bar{y}_3 v/s \bar{y}_6

$$T_\alpha = \frac{q_\alpha(a, v)}{\sqrt{2}} \sqrt{MS_E \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

$$T_\alpha = \frac{5.63}{\sqrt{2}} \sqrt{0.010158663 \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{2} \right)} = 0.401246$$

$|\bar{y}_3 - \bar{y}_6| = \mathbf{0.41027} > T_{0.05, 3,6}$ son estadísticamente diferentes, donde la degradación del Hongo 5 es

mayor que la Bacteria 6.

$|\bar{y}_1 - \bar{y}_4| = \mathbf{0.21986} < T_{0.05, 1,4}$ son estadísticamente iguales, donde la degradación del Hongo 1 es mayor que la Bacteria 1.

$|\bar{y}_1 - \bar{y}_6| = \mathbf{0.30631} < T_{0.05, 1,6}$ son estadísticamente iguales, donde la degradación del Hongo 5 es mayor que la Bacteria 1.

$|\bar{y}_3 - \bar{y}_5| = \mathbf{0.18495} < T_{0.05, 3,5}$ son estadísticamente iguales, donde la degradación del Hongo 5 es mayor que la Bacteria 6.

$|\bar{y}_3 - \bar{y}_4| = \mathbf{0.32382} < T_{0.05, 3,4}$ son estadísticamente iguales, donde la degradación del Hongo 1 es mayor que la Bacteria 6.

$|\bar{y}_3 - \bar{y}_1| = \mathbf{0.10396} < T_{0.05, 3,1}$ son estadísticamente iguales, donde la degradación de la Bacteria 1 es mayor que la Bacteria 6.

$|\bar{y}_3 - \bar{y}_2| = \mathbf{0.24462} < T_{0.05, 3,2}$ son estadísticamente iguales, donde la degradación de la Bacteria 2 es mayor que la Bacteria 6.

$|\bar{y}_1 - \bar{y}_5| = \mathbf{0.08099} < T_{0.05, 1,5}$ son estadísticamente iguales, donde la degradación del Hongo 2 es mayor que la Bacteria 1.

$|\bar{y}_1 - \bar{y}_2| = \mathbf{0.14066} < T_{0.05, 1,2}$ son estadísticamente iguales, donde la degradación de la Bacteria 2 es mayor que la Bacteria 1.

- $|\bar{y}_5 - \bar{y}_2| = \mathbf{0.05967} < T_{0.05, 5, 2}$ son estadísticamente iguales, donde la degradación del Hongo 2 es mayor que la Bacteria 2.
- $|\bar{y}_2 - \bar{y}_4| = \mathbf{0.0792} < T_{0.05, 2, 5}$ son estadísticamente iguales, donde la degradación del Hongo 1 es mayor que la Bacteria 2.
- $|\bar{y}_4 - \bar{y}_6| = \mathbf{0.08645} < T_{0.05, 4, 6}$ son estadísticamente iguales, donde la degradación del Hongo 5 es mayor que el Hongo 1.
- $|\bar{y}_5 - \bar{y}_6| = \mathbf{0.22532} < T_{0.05, 5, 6}$ son estadísticamente iguales, donde la degradación del Hongo 5 es mayor que el Hongo 2

12.DISCUSIÓN

En los últimos años, el transporte del petróleo se ha realizado en grandes embarcaciones debido a la gran demanda que se requiere para distribuirlo hacia diferentes lugares. Si bien, como se sabe los accidentes de buques petroleros no son tan frecuentes, pero cuando ocurren causan derrames, que generan un gran impacto ambiental en el suelo y en el agua, por tal razón se ha desarrollado el estudio de microorganismos con capacidad de degradarlos.

El proceso de degradación de HAP's es lento por la flora nativa. Por ello el aislamiento e identificación de microorganismos nativos responsables de la biodegradación de contaminantes y su caracterización se han reportado como elementos necesarios para la evaluación, desarrollo y aplicación de estrategias de biorremediación in situ (Echeverri et al. 2010, Mrozik y Piotrowska 2010).

Los HAP's de bajo peso molecular son fácilmente degradados por varios tipos de microorganismos (bacterias -hongos), sin embargo, la velocidad de degradación se reduce al aumentar su peso molecular. Es por ello por lo que para los compuestos que son recalcitrantes se han planteado diferentes estrategias en cuanto a la aclimatación para preservar las cepas, ya que esto permite alcanzar mayores niveles de biodegradación que las cepas no aclimatadas.

En este proyecto se realizó la degradación del queroseno mediante el uso de bacterias y hongos las cuales fueron aclimatadas a partir de un suelo contaminado, previo a la parte experimental se revisó la bibliográfica en cuanto a la mejor selección de cepas de bacterias y hongos que han sido estudiadas por diferentes investigadores.

Los hongos que presentan como mejores degradadores de hidrocarburos de cadena larga de acuerdo con Martínez-Vázquez *et al.* 2011 quienes mencionan a *Aspergillus* y *Penicillium* como los géneros que se encuentran en mayor proporción

en suelos contaminados con hidrocarburos, utilizándolos para estudios de biorremediación de petróleo crudo y sus derivados, así como la mineralización de aromáticos policíclicos.

April *et al.* 2000 mencionan que en sus estudios el aislamiento de hongos de muestras de suelos contaminados en Canadá en donde aislaron una gran variedad de hongos de géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus* como degradadores utilizando preferentemente como fuente carbono las fracciones de petróleo de cadenas entre n-C₁₂ a n-C₂₆.

Pérez Silva, 2008 obtuvo un 57% de biodegradación de petróleo con la cepa de *Pseudomona* AT18, mostró un mayor crecimiento sobre petróleo como única fuente de carbono y energía al obtenerse 1,83 g/L de biomasa celular.

Salleh *et al.*, 2003 Observo las cepas de bacterias *Acinetobacter sp*, *Pseudomonas sp*. Y *Mycobacterium sp*. Las cuales degradan alcanos, monoaromaticos y poliaromáticos respectivamente.

El uso de co-cultivos fúngicos- bacterianos definidos ara degradar los HAP fue informado por primera vez por Boonchan *et al.* (2000).

Es por que este proyecto se estableció el aislamiento y caracterización de cepas de bacterias y hongos a partir de un suelo contaminado por HAPs , los cuales fueron aclimatados ya que permite una adaptación microbiana que esto incrementara la velocidad de de degradación del compuesto por los microorganismos por un tiempo de 30 días en donde logramos seleccionar trabajar con 3 bacterias y 3 hongos , los cuales fueron sometidos a una biodegradación, una vez concluidos los tiempos se realizó la extracción y cuantificación de HAPs para poder seleccionar la mejor bacteria (bacteria 2) donde se logró una degradación del 51% y el mejor hongo (hongo 5) 66% , y una vez así formar el cultivo secuencial para tener una mejor eficiencia de degradación del 74%, en donde al comparar con otros trabajos experimentales hay una similitud en el porcentaje de degradación.

13. CONCLUSIONES

El proceso de degradación de HAPs en los suelos es lento por la flora nativa, por ello el aislamiento de los microorganismos con capacidad de degradarlos se vuelve una tecnología muy eficiente ya que al bioaumentar un suelo se incrementa la velocidad de degradación del contaminante.

Diversos estudios muestran que un solo microorganismo no es capaz de degradar completamente los contaminantes de suelo contaminado, llegando a veces a la generación de metabolitos secundarios por lo que las cepas de bacterias y hongos aislados que han mostrado tolerancia a hidrocarburos se emplearan para potencializar la eficacia de un cultivo secuencial.

De los aislados bacterianos encontrados en el suelo contaminado, la gran mayoría corresponde a bacterias Gram – en donde la bacteria 2 presento un mejor potencial de degradación del 51 % y es por ello por lo que se seleccionó para formar el cultivo secuencial al igual que el hongo 5 (*Aspergillus terreus*) logro una degradación del 58 % en donde también se seleccionó para formar el cultivo secuencial en donde se pretende alcanzar una mejor degradación de los HAPs.

Perspectivas

- Deberán realizarse estudios adicionales que permitan identificar cuáles son las enzimas que participan en la biodegradación de los hidrocarburos.
- Evaluar la adición de un biosurfactante para poder observar los posibles efectos que este conlleva en el crecimiento y degradación de la fracción aromática.
- Se requerirá incrementar el tiempo del proceso de degradación.

- Evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo y la aeración sobre la biodegradación.
- Identificar los metabolitos producidos durante la biodegradación por las diferentes cepas

13. BIBLIOGRAFIA Y FUENTES CONSULTADAS.

Acuña Molina, N.R. (2017). *Revisión Bibliográfica sobre los microorganismos biodegradadores de Polietileno de Baja Densidad LDPE y sus Efectos en el Material*, Tesis)

Licenciado en Química), Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

Alarcón A y Ferrera-Cerrato R. (2013). Biorremediación de suelos y aguas contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos. Trillas, México, 333 pp.

Alexander, M. (1999). Biodegradation and Biorremediation. *Academic Press*. San Diego, California, U.S.A.

Altamirano M; Pozzo M. (2000). Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburoclíticas provenientes de un suelo sometido a biorremediación, ABES 27 ,1-6,2000.

Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S. and Pillai, S. (2021). 'Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes', *Science of The Total Environment*, 759, 143536 .

Aparicio-Ruiz, R., García-González, D. L., Morales, M. T., Lobo-Prieto, A., & Romero, I. (2018). Comparison of two analytical methods validated for the determination of volatile compounds in virgin olive oil: GC-FID vs GC-MS. *Talanta*, 187, 133-141.

April, T. M., J. M. Foght y R. S. Currah. (2000). Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Canadian Journal of Microbiology* 46(1):38-49.

Bao, M., Sun, P., Yang, X., Wang, L., Cao, L., and Li, F 2014b. Bates, J. H. y Benson, 40 Manual sobre la contaminación ocasionada por hidrocarburos. *Environ. Sci. Process. Impact* 16,1948-1956.

Blasco PLA, R.; Castillo Rodríguez, F. (2014). Acerca de la biotecnología

ambiental. *Arbor*, 190 (768): al 57. <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4011>.

Brady, NC y Weil, RR (2008). *La naturaleza y propiedades de los suelos*. Prentice- Hall Inc., Nueva Jersey.

Caí, W., Li, J., & Zhang, Z. (2007) The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium* sp. *Journal of Hazardous Materials*, 38-42.

Cookson, J. T., (1995), *Bioremediation Engineering, Design and Application*. Editorial McGraw-Hill, New York, N.T. U.S.A.

Córdova BG (2005). Estudio de adaptación y selección de bacterias en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo crudo. Tesis Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Zona Orizaba-Córdoba. Universidad Veracruzana. Córdoba, Veracruz. 90pp.

Covino, S., A. D'Annibale, S. R. Stazi, T. Cajthaml, M. Čvančarová, T. Stella and M Petruccioli. (2014). Assessment of degradation potential of aliphatic hydrocarbons by autochthonous filamentous fungi from a historically polluted clay soil. *Science of the total environmental* 505:545-554.

Dellagnezze, B.M., de Sousa, G.V., Martins, L.L., Domingos, D.F., Limache, E.E.G., de Vasconcellos, S.P., da Cruz, G.F., and Oliveira, V.M (2014). Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. *Mar. Pollut. Bull.* 89,191-200.

De Lorenzo, V. (2008) Systems biology approaches to bioremediation, current opinion in biotechnology, 19:579–589.

Díaz M., Grigson S., (2002). Uso de un consorcio bacteriano extremo – halotolerante para la biodegradación de crudo en ambientes salinos. *Revista colombiana de Biotecnología*. 2, 522-532.

De Boer W. (2003). Microbial community composition affects soil Fungistasis. *Applied and environmental Microbiology*.

Eyvazi, M. J., & Zytner, R. G. (2009). A correlation to estimate the bioventing degradation rate constant. *Bioremediation Journal*, 13(3), 141-153.

Foght, J. M.; Semple, K.; Gauthier, C.; Westlake, D.W.S.; Blenkinsopp, S.; Sergy, G.; Wang, Fingas, M. (2011). Development of a standard bacterial consortium for laboratory efficacy testing of commercial freshwater oil spill

bioremediation agents. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **21**:322-330.

Floriane S, Marchal R, Serge C, Christelle V, Lebeault J, Vandecasteele J. A (2000). Mycobacterium strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons. *Microbiology*. 2000; 66(6): 2392-2399. 17. Hidalgo, J.C. 2009. Efectos de los derrames de Petróleo.

Franzmann, P.; Robertson, W.; Zappia, L.; Davis, G. (2002). The role of microbial populations in the containment of aromatic hydrocarbons in the subsurface. *Biodegradation*. Países Bajos. 13:65-78.

García Cruz, U., y Aguirre Macedo, M. (2014). Biodegradación de petróleo por bacterias : algunos casos de estudio en el Golfo de México. Mérida. *Microbiología*, 641-652.

Gogate, P.R.; Pandit, A.B. (2004). A review of imperative technologies for wastewater treatment I: oxidation technologies at ambient conditions. *Advances in Environmental Research*. 8:501-505

Gómez Wilmar, Gaviria Jair, and Cardona Santiago. (2009) .“Assessment of the Biostimulation against and Natural Attenuation on Contaminated Soil with Diesel-Gasoline Mixing.” *Universidad Nacional de Colombia* 76 (**160**): 83–93.

Greene, A.; Kay, J.; Jaber, K.; Stehmeier, L.; Voordouw, G. (2000). Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. Estados Unidos. 66(12):5282-5289.

Harris, S. (1997). *Hydrocarbon Bioremediation*. . Material proporcionado por Marc Gesnot en el lugar de realización de la práctica.

Hernández NLC (2005). Estudio de adaptación y selección de hongos en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo crudo Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Zona Orizaba–Córdoba. Universidad Veracruzana. Córdoba, Veracruz. 112 pp.

Jagjit, S.Y., Khajamohiddin, S. (2012). P450 monooxygenases (P450_{ome}) of the model white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Critical Reviews in Microbiology*. 38: 339- 363

Jarsjö, J.; Destouni G.; Yaron, B. (1994). Retention and volatilisation of

kerosene- laboratory experiments on glacial and post-glacial soils *J. Contamin. Hydrol.* **17**(2): 167- 185.

Kim, Y.M., Ahn, C.K., Woo, S.H., Jung, G.Y., & Park, J.M. (2009). Synergic degradation of phenanthrene by consortia of newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology*, 144(1),293-298.

La jornada ecológica, NÚMERO ESPECIAL, 2 DE AGOSTO DE 2010.
(Disponible: <http://www.jornada.unam.mx/2010/08/02/eco-f.html>).

Ledesma, J.L., L. Arroyo y J.L. Hernandez. (1994). Toxicología ambiental, análisis de la contaminación ambiental por derrames de hidrocarburos en el estado de Tabasco y su biorremediación por medio de tecnología de punta.

Li, X., Lin, X., Li, P., Liu, W., Wang, L., Ma, M., & Chukwuka, K. (2009). Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *Journal of Hazardous Materials*, 172(02), 601-605.

Lizardi-Jiménez M. A., Leal Bautista R., Ordaz A. y Reyna-Velarde R. (2013). Airlift bioreactor for hydrocarbon water pollution remediation in tourism development pole. *Desalin. Water. Treat.* 54, 44-49. DOI: 10.1080/19443994.2013.876670.

Lorch, H; Benckieser, G; Ottow, J. (1995). Basic methods for counting microorganisms in soil and water. In Alef, K; Nannipieri, P (eds.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press. p. 146-191.

Machín-Ramírez, C.; D. Morales, F. Martínez-Morales, A.I. Okoh, M.R. Trejo-Hernández. (2010). Benzo[a]pyrene removal by axenic- and co-cultures of some bacterial and fungal strains. *International Biodeterioration & Biodegradation* 64(7):538-544.

MAPAMA. (2017). Impacto Ambiental de los hidrocarburos y recuperación de los ecosistemas. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España, http://www.mapama.gob.es/es/costas/temas/proteccion-medio-marino/plan-ribera/contaminación-marina-accidental/impacto_ambiental.aspx.

Martínez-Vázquez, J. G., M. A. Hernández-Rivera, M. E. Ojeda-Morales, y M. J. García-Marín. (2011). Condiciones ambientales y de nutrientes óptimos para el

desarrollo del microorganismo hidrocarbonoclasta *Penicillium* sp. in vitro. *Academia* 9: 97-112.

McGenity, T.J., Folwell, B.D., McKew, B.A., and Sanni, G.O. (2012). Marine crude oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquat. Biosyst.* 8,10.

Meng, L., Bao, M. and Sun, P. (2018). 'Construction of long-chain alkane degrading bacteria and its application in bioremediation of crude oil pollution', *International Journal of -Biological Macromolecules*, 119, 524-532.

Mougin, C., Jolival, C., Malosse, C., Chaplain, V., Sigoillot, J.C., Asther, M. (2002). Interference of Soil Contaminants with Laccase Activity During the Transformation of Complex Mixtures of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Liquid Media. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 22: 673-688.

Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M, Landi L, Pietramellara M, Renella G. (2001). Microbial diversity, and soil functions. 2001. *European Journal Soil Science*. 2001;54(4): 655-670.

Nelson, K. E. et al. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 4, 799–808.

Núñez, R. (2003). Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos. Tesis Doctoral. Universidad de la Habana.

Ojha, N., Pradhan, N., Singh, S., Barla, A., Shrivastava, A., Khatua, P., Rai, V. and Bose, S. (2017). 'Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization', *Scientific Reports*, 7(1), 39515.

Paniagua- Michel, J.; Rosales, A. Marine bioremediation a sustainable biotechnology of petroleum hydrocarbons biodegradation in coastal and marine environments. *Bioremediation & Biodegradation*. 2015, 6, 2, doi:10.4172/2155-6199.1000273.

Patel, V., Jain, S., & Madamwar, D. (2012). Naphthalene degradation by bacterial consortium (DV-AL) developed from Alang-Sosiya ship breaking yard, Gujarat, India. *Bioresource Technology*, 107(1), 122-130.

Perelo, L.W. (2010) Review: In Situ Bioremediation of Organic Pollutants in

Aquatic Sediments. *Journal of Hazardous Materials*, 177, 81-89.

Pérez R.M., Camacho M.I., Gómez J.M., Ábalos A., Viñas M. y Cantero D. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Rev. CENIC. Cienc. Biol.* 39 (1), 44-51.

Qian, L., Chen, B. (2012). Enhanced oxidation of benzo[a]pyrene by crude enzyme extracts produced during interspecific fungal interaction of *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Environmental Sciences*. 24: 1639–1646.

Rekadwad, B.N., and Khobragade, C.N. (2015). A case study on effects of oil spills and tar-ball pollution on beaches of Goa (India). *Mar. Pollut. Bull.* 100,567-570.

Risdon, G.C., Pollard, S.J., Brassington, K. J., McEwan, J.N., Paton, G.I., Semple, K.T., & Coulon, F. (2008). Development of an analytical procedure for weathered hydrocarbon contaminated soils within a UK risk-based framework. *Analytical chemistry*, 80(18), 7090-7096.

Rivera Ortiz, P., Rivera Lárraga, J. E., Andrade E., Heyer L., De la Garza F. R. y Castro B. (2018). Bioestimulación y biorremediación de recortes de perforación contaminados con hidrocarburos.

Rockne K., Chee Sanford J., Sanford R., Brian P., (2000). Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate reducing condition. *Applied and environmental microbiology*.

Rodríguez Calvo, A. (2017). Biorremediación de aguas contaminadas con hidrocarburos mediante sistemas bioabsorbentes. Granada. Universidad de granada. <http://hdl.handle.net/>.

Rodríguez - Chaves, D., Saravia-Arguedas, A., Pacheco- Urpi, O., and Piedra – Marín, G. (2014). Evaluación de los niveles de hidrocarburos en sedimentos marinos, su posible origen y efectos sobre la actividad de agricultura entre punta morales y costa de pájaros en el golfo de Nicoya. *Rev. Geográfica América Cent.* 2, 113-134.

Saari, E., Perämäki, P., & Jalonen, J. (2007). Effect of sample matrix on the determination of total petroleum hydrocarbons (TPH) in soil by gas

chromatography–flame ionization detection. *Microchemical journal*, 87(2), 113-118.

Sabaté, J., M. Viñas, J. M. Bayona y A. M. Solanas. (2003). Isolation and taxonomic and catabolic characterization of a 3,6-dimethylphenanthrene-utilizing strain of *Sphingomonas* sp. *Can. J. Microbiol.* 49:120-129.

Salleh, A.B., F.M. Ghazali, R.N.A. Rahman, & M. Basri., (2003). Biorremediation of petroleum hydrocarbon pollution. *Indian Journal of Biotechnology*, 2:411-425.

Sarker, R.K., Paul, P., Das, S., Chatterjee, S., Chakraborty, P. and Tribedi, P. (2021). 'Exploration of Strategies for the Enhanced Biodegradation of Low-Density Polyethylene (LDPE) by A Soil Bacterium *Enterobacter Cloacae* AkS7', *JOURNAL OF PURE AND APPLIED MICROBIOLOGY* 15(3), 1266-1278 .

Saval, S. (1997). Biorremediación de un suelo contaminado con diesel. *Ing. Cienc. Amb* 33:24-30.

Šašeck, V. (2003). Why mycoremediations have not yet come into practice. En: V. Šašeck
Glaser, J. A., Baveye, P. (eds.) *The utilization of bioremediation to reduce soil contamination: problems and solution.* Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands. pp 247-266.

Sherma, J. (1972). Principles and techniques. *CRC Handbook of Chromatography: General Data and Principles*, 2, 1-101.

Skoog, Douglas; Holler, James; Nieman Timothy. (2008). *Principios de análisis instrumental.* Ed. 6. Madrid. Editorial McGraw-Hill.

Snape, I., Harvey, P. M., Ferguson, S. H., Rayner, J. L., & Revill, A. T. (2005). Investigation of evaporation and biodegradation of fuel spills in Antarctica I. A chemical approach using GC–FID. *Chemosphere*, 61(10), 1485-1494.

Solanas, A. 2009. La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelo. *Estudios en la zona no saturada del suelo*, vol. IX, O. Barcelone.

Speight J.G. (1991). *The chemistry and technology of petroleum.* John Wiley and Sons. New York. Pp. 29-45.

Srivastava, S. (2015). *Bioremediation Technology: a greener an sustainable approach for restoration of environmental pollution.* Applied Environmental Biotechnology: Present Scenario and Future Trends.

Stabili L. & R. Cavallo. (2004). Biodiversity of culturable heterotrophic bacteria in the Southern Adriatic Sea Italian coastal waters. *Scient Mar* 68:31-41.

Strawn, D. G., Bohn, H. L., & O'Connor, G. A. (2019). *Soil chemistry*. John Wiley & Sons.

Su, D.; Li, P.; Wang, X.; Stagnitti, F.; Xiong, X. (2008). Biodegradation of benzo[a]pyrene in soil by immobilized fungus. *Environ. Eng. Sci.* 25(8):1181-1187.

Sun, W; Sun X; Cupples M, (2014). Identification of *Desulfosporosinus* as toluene- assimilating microorganisms from a methanogenic consortium. *Int.Biodeterior. Bidegr.*88, 13-19.

Survery, S., S. Ahmad, S. Subhan, M. Ajaz y S. Ajaz-Rasool. (2004). Hydrocarbon degrading bacteria from Pakistani soil: Isolation, identification, screening and genetical studies. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 7 :1518-1522.

Tabak, H.H.; Lazorchak, J.M.; Lei, L.; Khodadoust, A.P.; Antia, J.E.; Bagchi, R.; Suidan, M.T. (2003). Studies on bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon- contaminated sediments: bioavailability, biodegradability, and toxicity issues. *Environ Toxicol chem.* 22(3): 473-482.

Tyagi, M.; da Fonseca, M. M.; & de Carvalho, C. C. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231- 241.

Tigini, V., Prigione, V., Di Toro, S., & Vaese, G. (2009). Isolation and characterization of polychlorinated biphenyl (PCB) degrading fungi from a historically contaminated soil. *Microbial Cell Factories*.

Uribe-Alvarez, C., Ayala, M., Perezgasga, L., Naranjo, L., Urbina, H., Vazquez-Duhalt, R., (2011). First evidence of mineralization of petroleum asphaltenes by a strain of *Neosartorya fischeri*. *Microbial Biotechnology* 4, 663-672.

Valderrama, B. (2000). *Microbiología del petróleo y sus derivados*. (E. Martínez, & J. Martínez, Edits.) México, D.F: Centro de Investigación sobre fijación de nitrógeno.

Van Deuren, J., Z. Wang, Z. y J. Ledbetter (1997). *Tecnologías de remediación Matriz de cribado y guía de referencia*. 3ª Ed. Innovación Tecnológica Oficina, EPA. <http://.epa.gov/tio/remed.html>.

Varjani, S. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 277-286.

Viñas, M., M. Grifoll, J. Sabate y A. M. Solanas. (2005). Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28: 252-260.

Volke Sepúlveda, Tania (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados . Mexico INE- Semarnat.

Wang, Z., & Fingas, M. (1995). Differentiation of the source of spilled oil and monitoring of the oil weathering process using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 712(2), 321-343.

Weisman, W. (1998). Analysis of petroleum hydrocarbons in environmental media (Vol. 1). Amherst Scientific Publishers.

Wilson, S.C.; Jones, K.C.(1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A Review. *Env. Poll.* 81: 229-249.

Wong-Villarreal A.; Santiago-Mendez E.; Hernández-Núñez E.; Yáñez-Ocampo G.; Giácoman-Vallejos G.; González-Sánchez A.; Ramírez-González, S.; Espinosa-Zaragoza, S.& López-Báez, O. (2017). Degradación de Fenantreno por bacterias del género *Burkholderia* y *Rhizobium* aisladas de nódulos de mimosas. *NOVA-Scientia*, 9(19), 291-305.

Yeung, P. Y., Johnson, R. L., & Xu, J. G. (1997). Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Soil as Affected by Heating and Forced Aeration. *Journal of Environmental Quality*, 26(6), 1511-1516.

Zhao, Q., Yue, S., Bilal, M., Hu, H., Wang, W., & Zhang, X. (2017). Comparative genomic analysis of 26 *Sphingomonas* and *Sphingobium* strains: Dissemination of bioremediation capabilities, biodegradation potential and horizontal gene transfer. *Sci Total Environ*, 609(1), 1238-1247.

Zhang, S., Ning, A., Zhang, X., Zhao, Y., Yang, X., Wu, K., Yang, S., La, G., Sun, X., Li, X. (2015) . Constrasting characteristics of anthracene and pyrene degradation by wood rot fungus *Pycnoporus sanguineus* H1. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 105: 228-232.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Facultad de Ciencias
Químicas e Ingeniería

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS e INGENIERÍA

Programas educativos de calidad reconocidos por CIEES, CACEI y CONACYT
SGI certificado en la norma ISO 9001:2015 e ISO 21001:2018

FORMATO T-2
NOMBRAMIENTO DE COMISIÓN REVISORA
Y DICTAMEN DE REVISIÓN

Cuernavaca, Mor., a 8 de noviembre de 2023.

DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ
DR. DANIEL MORALES GUZMÁN
DRA. AVE MARÍA COTERO VILLEGAS
DRA. LOYDA ALBAÑIL SÁNCHEZ
DRA. FERNANDA MORALES GUZMÁN
P R E S E N T E

Por este conducto, me permito informarle que ha sido asignado como integrante de la Comisión Revisora de la tesis que presenta SILVIA JANNET LUGO GARCÍA, titulada: DEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO EN FASE ACUOSA MEDIANTE EL USO DE CULTIVOS SECUENCIALES, realizada bajo la dirección de la DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ del Programa Educativo de Maestría en Ingeniería Ambiental y Tecnologías Sustentables. Agradezco su valiosa participación en esta Comisión y quedo a sus órdenes para cualquier aclaración o duda al respecto.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

MTRA. ANGÉLICA GALINDO FLORES
ENCARGADA DE DESPACHO DE LA DIRECCIÓN

D I C T A M E N

MTRA. ANGÉLICA GALINDO FLORES
ENCARGADA DE DESPACHO DE LA DIRECCIÓN
P R E S E N T E

En respuesta a su amable solicitud para formar parte de la Comisión Revisora de la tesis mencionada y una vez realizada la revisión correspondiente, me permito informarle que mi VOTO es:

D I C T A M E N

NOMBRE	VOTO	FIRMA
DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ	Aprobatorio	
DR. DANIEL MORALES GUZMÁN	Aprobatorio	
DRA. AVE MARÍA COTERO VILLEGAS	Aprobatorio	
DRA. LOYDA ALBAÑIL SÁNCHEZ	Aprobatorio	
DRA. FERNANDA MORALES GUZMÁN	Aprobatorio	

Se anexan firmas electrónicas

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ANGELICA GALINDO FLORES | Fecha:2023-11-08 14:21:10 | Firmante

F8LZ6s8FXt6w0hgKqiqamoGWTPUcMBzgieZgfi+tmistms8e34Se90ptQCbWi7NYI3rHMh9dVi1eFmJrQ8BgpKJow1VYUOWvUOcF1OK5iAHQD7H1d7bKFGFP20Lnsh6UVkBKM4TPolrrZdCP4jcObolysckfUJJsSZwbbRZQMVW9DoWV0yPV9VKKNbCe3fK3t/as5DsZ2v228HWKdyAHFSn17sxp4sW9ttex/cNo9fFMXGAQtYKWCAtFWyKmY+OgZ09xiGwfu2G6YDDaxvl9dKe9qiYuf4EGiAeN0znyFMNGNZKA5spB3lmdHIS2y2Re+usfFHNQJ8Ht6EjPCBq9A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[eqgrVoZT9](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9wxl3ifXAkGFLJg6Zdm1KQ9tuZ0cfIKF>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

AVE MARIA COTERO VILLEGAS | Fecha:2023-11-08 22:34:03 | Firmante

SyqyDbpCWruouOITpNbiALaZPhXbdfMib+iFeyKjdJSJthGxyPRUg2XFsxQJK5vDuqaf65owGOXWgyD+SQh7DuCgvYj6NRCwU0verA6XmqAcj7HcSBFCLTjMzmXha3SQKweYKvFDZJ6NI/9clzXzXa7pNH7Z6YKIBp9jqDucfShpyBo1EOSWYoirOHYbelKFMOrxcD7rJsSILqPu+g8zRgLEDRPhkLs8A6DiLsT7seYXbW2SFGg5YPEBTHea/6BeJHedPvL6b3X/GnkVSEf+12fBpz8SAIUZOWybNR7XdvikfXoZys6Re2EIUFHvJNYA5/ur0CylV7vWIThN/wg==

FERNANDA MORALES GUZMAN | Fecha:2023-11-09 09:48:11 | Firmante

FyUPazVoNd+wVvwaKhp2s8EsU+91nwOTNMchG40afgRdhV2tLJMKbHZ9YED8npXKcDyYoLgHHIH410HY5N9XvlRWC5+fYInj1e3ctuDUUpqIMUZe3T/VT5xbgDYaSvovlj2P7B9Xs4A+soq9ddUdbEKD7BKcm8Ue1vYXOUP/r+wOhcCAIQyuM/9Ifcjl9qgBulVq8IAqx9SVxBI/WdrUMmWbF/z36B1apAettgGmX+Y0G8J/TAP2Lo/A3XKkrzOIPxYxyGS69AuuGblzq2pLgzom+K6hBPHYmNUPDDjdCFMrTCuiGaDHIEO9w7Hi8nkMbBN44vg1Z9bzmz0JSF0nXngw==

LOYDA ALBAÑIL SANCHEZ | Fecha:2023-11-09 15:25:14 | Firmante

UKmOZ1PyLNKEXB40UntCdHMukKZx8hml4XYrz9dkTFlei+awb1y6mxXeZdA8o1PkJ6+53cNYX5VVGBc1khQka0iIRBRDgAtsxaJH7S2VfPhx/YOwSfwL7MbZPxBqvl/TgbGsHFz0pKCy3a7VH1oDvYnS9wxHhZcaAQKQrdsPpQEr8Jpn6lxhbqqKjtlAqMguDgNgilrYuZEaMhuPOPgHsG12fG+ERw58TL1Df/8u3nFP2kw9FrB6ixirV6o2/veGQmCE0GoWi3B0+iHrwfC8vKzY+axW315FXgGbvubh08oBlzzTCbV48PYSyVdzlsHRQOXUG9stpw9fOENQRi54ig==

DANIEL MORALES GUZMAN | Fecha:2023-11-09 17:34:45 | Firmante

o4fEvu8sW3GgqLO5rNnaaUtkCj+Pi+z/uNRyYe+B99n7gYYU/02gJGtCrJOb/oXuMRJgSSGgPuOuYYPYvrgmBsk45RihGRqeeOGWU2+bcYb9BVIbvvcAgUti8nuNGPe/U42gpvFNdBV/hnUhp0IMPx842KkmiZaQQ53IRZha9OqctoWiGgUvz3YhbcNGGknJfsYwMnnbawd7rqluthET7ff+UJjr7e1kQcqiyEiEkM7Cn977OMOSX4k7fuB/eJyxxOG5ePu139gATMTxetleg6ANDXSpnDq3hIHN/mQwdMvpVgV49iyPmMMbNq5YMeEINb2HURXon3RAF36SXA==

MARIA DEL REFUGIO TREJO HERNANDEZ | Fecha:2023-11-10 11:44:25 | Firmante

H/1oayV1bftx/1wuG5GgPkKxolHtzxyLgL3GYtzT8g7ik0Zi4V1cyE2eE+TPcC6nJ1TYwjoyKMq+pKXSPV8vFWtthQer67nHycM4cSVcyT+wcRhFNI2zz+wHADPZJ/Cpl3rAU1M9ciYjRzgSAEQbkM5OG5gelCulDP96ZWX9OZO3ANvD68wMo3v6ZndmNbfhJovxzWu+4+w1VRx0gUqnZFcZnNw97wJ8+kSgQn2V6++gaUX5CW0hivMyzK8RRrdtN5JQvMhFY6dv+PmW56wLp59n2GfbM7GSRiycP3jvOuLqHZSOXQXG3HjN9nE30pc0scsAh8Q1omifq19wOg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



IXfMSaRVk

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/AJYMPVrYvHfjknSJcmE8ulvJoXd0iNcB>

