

# BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON ACEITE AUTOMOTRIZ USADOS MEDIANTE SISTEMA DE BIOPILAS

Héctor Guillermo Anza Cruz<sup>1</sup>, Paula Deyanira Orantes Calleja<sup>1</sup>,  
Raúl González Herrera<sup>1\*</sup>, Alejandro Ruíz Marín<sup>2</sup>,  
Eduardo Espinoza Medinilla<sup>3</sup>, Rebeca Isabel Martínez Salinas<sup>3</sup>,  
Carlos Manuel García Lara<sup>1</sup>, Pedro Vera Toledo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ingeniería, Ingeniería Ambiental, UNICACH,

<sup>2</sup> Laboratorio de biotecnología de la Universidad Autónoma del Carmen, Campeche,

<sup>3</sup> Facultad de Ingeniería. Posgrado, UNICACH,

\* Autor corresponsal [raul.gonzalez@unicach.mx](mailto:raul.gonzalez@unicach.mx).



Para citar este artículo:

Anza, H., Espinoza, E., García, C., González, R., Martínez, R., Orantes, P., Ruíz, A. y Vera, P. (2016) Biorremediación de suelos contaminados con aceites automotriz usados mediante sistema de biopilas. *Espacio I+D Innovación más Desarrollo* 5 (12) 49-77. doi: 10.31644/IMASD.12.2016.a04

## RESUMEN

En la investigación se realizó la biorremediación de suelo contaminado con aceites usados de talleres de servicio automotriz mediante biopi-las. Se emplearon cuatro muestras de suelo proveniente de la Unidad de Manejo Ambiental (UMA) «La Huella» ejido Pedro Méndez, Chiapa de Corzo, Chiapas, México; las cuales se caracterizaron en laboratorios de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas y El Colegio de la Frontera Sur, analizando humedad, materia orgánica, textura, pH, temperatura, nitrógeno total y fósforo disponible. Se construyeron cuatro biopilas, desarrollando tres tratamientos con tres repeticiones y un testigo, las cuales fueron con-taminadas en concentraciones para el testigo de 30,000 ppm, para primer tratamiento 10,000 ppm, para segundo 30,000 ppm y para tercero de 50,000 ppm de hidrocarburos totales del petróleo (HTP). Las cepas utilizadas fueron *Acinetobacter Sp*, *Sphingobacterium Sp* y *Stenotrophomona Sp*; con concen-tración de  $2.25 \times 10^8$  UFC para cada tratamiento. Se realizó el recuento de microorganismos el día quince del experimento. Los tratamientos fueron monitoreados tres meses los días 1, 15, 30, 60 y 90 en el laboratorio de bio-tecnología de la Universidad Autónoma del Carmen, Campeche. Se lograron porcentajes de remoción de las fracciones alifática de 93.7 a 87.1% y en la fracción aromática de 0 a 94.8 en 90 días de tratamiento, con aplicación de bacterias biorremediadoras e identificación de cepas bacterianas nativas del suelo que lograron resistir el cambio en su ambiente.

### Palabras clave

*Biorremediación, Biopilas, Aceites automotrices usados, Acinetobacter Sp, Sphingobacterium Sp y Stenotrophomona Sp.*

## BIOREMEDIATION OF SOILS CONTAMINATED WITH OIL AUTOMOTIVE USED THROUGH SYSTEM BIOCELLS

— Abstract—

In the investigation was made the bioremediation of contaminated soil with waste oils from automobile service by biopiles technique. The study was made taking four samples of soil, from the UMA "La Huella" of Pedro Méndez town in the municipality of Chiapa de Corzo, Chiapas, Mexico; being characterized in laboratories at the Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas and El Colegio de la Frontera Sur, analyzing parameters such as moisture, organic matter, texture, pH, temperature, total nitrogen and available phosphorus. Four biopiles were built, developing three treatments with three replicates and a control, which were contaminated with oils used in different concentrations, 30,000 ppm to biopile witness, for the first treatment, 10,000 ppm, for second 30,000 ppm and 50,000 ppm third of HTP. The strains used were *Acinetobacter Sp*, *Stenotrophomona Sp* and *Sphingobacterium Sp*; each bacterium was inoculated at a concentration of  $2.25 \times 10^8$  CFU for each of the treatments. Counts of viable microorganisms was performed the fifteenth day during the experiment. Treatments were monitored for three months on days 1, 15, 30, 60 and 90 in the biotechnology laboratory of the Universidad Autónoma del Carmen, Campeche. With this work considerable removal percentages of the fractions were achieved, in the aliphatic removal 93.7 to 87.1% was achieved and the aromatic hydrocarbon fraction, removals from 0 to 94.8 in 90 days of treatment with the application of bioremediation bacteria and identification of bacterial strains native soil, who managed to resist change in their environment.

### Keywords

*Bioremediation, automobile waste oils, biopiles technique, Acinetobacter Sp, Stenotrophomona Sp and Sphingobacterium Sp.*

El manejo inadecuado de los residuos peligrosos ha generado, a escala mundial, un problema de contaminación de suelos, aire y agua. Entre las más severas contaminaciones destacan las que se producen por la extracción y el manejo del petróleo y sus derivados. En México, uno de los países con mayor producción de petróleo a nivel mundial, tiene un número considerable de sitios impactados por estos contaminantes; en el sureste mexicano hay sitios con diferentes niveles de impacto ambiental por la actividad petrolera de aproximadamente cincuenta años (Randy *et al.*, 1999; Roldán e Iturbe, 2005).

Los métodos físico-químicos tradicionales para la remediación de sitios contaminados han sido: la incineración, vertederos, lavado del suelo o algún tratamiento químico. Resultan costosos y pueden producir diferentes tóxicos que son capaces de permanecer en el suelo, migrar hacia las aguas superficiales o subterráneas, o son emitidos a la atmósfera (Eweis *et al.*, 1998; citado por Volke y Velasco, 2002; Ifeanyichukwu, 2011).

De acuerdo con estudios realizados en Estados Unidos y Reino Unido, el mercado de la biorremediación para tratamiento de suelos contaminados se ha incrementado debido a que los costos pueden reducirse entre 65 y 80%, con respecto a los métodos fisicoquímicos (Zechendorf, 1999; citado por Volke y Velasco, 2002). La aceptación de la biorremediación como una estrategia viable depende de sus costos y eficiencia sobre una matriz contaminada (Semple *et al.*, 2001; citado por Volke y Velasco, 2002).

En Estados Unidos alrededor de 3,200 millones de litros de aceite de motor usado se recicla anualmente. En México, el uso y manejo son menos adecuados y se ha convertido en un factor de contaminación (Ifeanyichukwu, 2011).

El presente estudio tiene por objetivo biorremediar suelo contaminado con aceite automotriz mediante *Acinetobacter Sp*, *Sphingobacterium Sp* y *Stenotrophomonas Sp* a través de un sistema de biopilas, analizando las características físico-químicas del suelo e identificando la contribución de las bacterias biorremediadoras durante el proceso.

### *Antecedentes*

El concepto de biorremediación describe una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos para remover, degradar o transformar compuestos orgánicos tóxicos en productos metabólicos menos tóxicos o inocuos (Van Deuren *et al.*, 1997). Los procesos biológicos que involucran enzimas como catalizadores pueden modificar moléculas orgánicas produciendo cambios en su estructura y propiedades toxicológicas, dando como resultado la conversión de dichos compuestos en productos inorgánicos como agua, CO<sub>2</sub> o

formas inorgánicas de N, P y S, componentes celulares y productos de las rutas metabólicas (Alexander, 1994; citado por Volke y Velasco, 2002).

Los aceites usados están compuestos por hidrocarburos totales de petróleo (HTP), bifenilos policlorados (PCB), aromáticos policíclicos (HAP), metales y otros contaminantes que ocasionan deterioro en el medio ambiente y salud humana, tóxicos y venenosos, siendo sustancia de difícil degradación (Vásquez *et al.*, 2010) y residuos peligrosos NOM-052-SEMARNAT-2005. El aceite de motor es agente lubricante y combustible auxiliar, refinado e incorporado en asfalto. Muchos componentes del aceite son tóxicos pudiendo ser cancerígenos y disruptores endocrinos. Los componentes alifáticos son eliminados del ambiente a través atenuación natural, sin embargo, las fracciones recalcitrantes siguen persistentes. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son componentes peligrosos del aceite de motor usado (Ifeanyichukwu, 2011).

En California, se aplicó biorremediación *in situ* en suelos contaminados con aceite diésel mediante microorganismos autóctonos, nutrientes y oxígeno e inoculación de una mezcla enriquecida de consorcios bacterianos extraída del mismo suelo. Permitió encontrar consorcios bacterianos degradadores de hidrocarburos identificados por secuenciación de genes 16S-RNA, con presencia de *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilus*, *Acinetobacter junii*, y *Pseudomonas Sp* (Volke y Velasco, 2002).

Pérez *et al.* (2007) en Cuba estudiaron la biodegradación por cepas aisladas de suelos contaminados con petróleo, por enriquecimiento secuencial utilizando petróleo como fuente de carbono y energía. Aislaron cepas bacterianas, cinco Gram negativas y cuatro Gram positivas, del Manual Bergey's (1994). Seleccionaron *Pseudomonas aeruginosa*, por su mayor crecimiento con petróleo como fuente de carbono y energía, degradando un 57%.

En un estudio en Colombia, evaluando consorcios microbianos nativos, adicionados a biopilas de lodos deshidratados del tratamiento primario de aguas residuales domésticas, lodos provenientes de lavaderos de carros y lodos de alcantarillado de la zona industrial de Bucaramanga. En dichos ensayos se aislaron, identificaron y conservaron cepas microbianas con capacidad degradadora de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) como *Pseudomonas spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter spp.*, *Bacillus brevis*, *Micrococcus spp.* y *Nocardia spp.* Se inoculó con una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/ml de bacterias y microorganismos fúngicos como *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichoderma spp.*, a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/ml. Se obtuvieron porcentajes de remoción hasta 94% de HTP en 120 días y 84% en 40 días (Vásquez *et al.*, 2010).

García *et al.* (2012) en Venezuela, estudiaron la biodegradación de un crudo mediano en dos suelos de diferentes texturas, con y sin la adición de

un agente estructurante (hojarasca). Los suelos ensayados fueron de textura arenosa (cuarzo e ilita), y franco- arcillo- arenoso (cuarzo y caolinita). Se evaluaron cuatro tratamientos por triplicado en microcosmos con un contenido de crudo inicial de 5% (m/m) y se añadieron fertilizantes para obtener las relaciones C/N=60 y C/P= 800, se airearon las pilas y se mantuvo la humedad entre 40 y 60%. La concentración de hidrocarburos totales se determinó a 1, 15, 30, 45 y 90 días. La textura franco- arcillo- arenosa favoreció el proceso de biodegradación de los hidrocarburos totales en los componentes saturados. El agente estructurante influyó en la biodegradación.

Acuña *et al.* (2012), trabajaron con humedades de 3, 10, 15 y 20% y temperaturas de 5, 15, 28 y 37°C, dieron seguimiento de mineralización de hidrocarburos. Para optimizar la relación de nutrientes se diseñaron microcosmos monitoreados por consumo de oxígeno y cromatografía gaseosa. Los resultados indican que la mineralización de hidrocarburos fue óptima para humedades de 10 a 20% y temperaturas de 25 a 37°C con valores de producción de CO<sub>2</sub> de 3,000 a 4,500 mgCO<sub>2</sub>kg<sup>-1</sup>. La relación óptima C:N:P fue de 100:1:0,1 en la que se observó el mayor consumo de oxígeno y la remoción de 83% de los hidrocarburos totales, con 78 y 89% de eliminación de los hidrocarburos n-alcanos y poliaromáticos.

### *Fundamento bioquímico de la biorremediación*

Se basa en reacciones óxido-reducción que se producen en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células. La cadena la inicia un sustrato orgánico externo a la célula que actúa como dador de electrones, donde la actividad metabólica de la célula degrada y consume la sustancia. Los aceptores utilizados por microorganismos son oxígeno, nitratos, hierro (III), sulfatos y dióxido de carbono (Maroto y Rogel, 2013).

*La biodegradabilidad depende de los factores:*

*Humedad (depende de la textura y porosidad del suelo).*

*El nitrógeno es necesario para la síntesis de proteínas y la pared celular y puede perderse por lixiviación de amonio y nitratos y por desnitrificación del suelo. El fósforo es útil para formar ácidos nucleicos y el ATP y está limitado por baja solubilidad y disponibilidad. La presencia de cantidades mínimas de nitrógeno y fósforo permite la biodegradación a velocidades bajas (Roldán e Iturbe, 2005).*

*Actividad de microorganismos y suministro de oxígeno.*

*Cuando los poros del suelo se encuentran ocupados por agua, el oxígeno es menor y se presentan condiciones anóxicas. Para degradación aerobia es necesario 10% de poros libres (Roldán e Iturbe, 2005).*

El pH afecta la actividad microbiana, cuanto mayor sea la diversidad de microorganismos, mayor tolerancia. El crecimiento de la mayor parte de microorganismos es máximo en pH entre 6 y 8 (Dibble y Bartha, 1979; citado por Torres y Zuluaga, 2009).

La temperatura en condiciones mesófilas entre 20 y 30°C permite crecimiento de bacterias, decreciendo a temperaturas superiores a 40°C e inhibiéndose a inferiores a 0°C (Torres y Zuluaga, 2009).

Los contaminantes orgánicos son fuente de carbono que los microorganismos requieren para biodegradación. Cuando las condiciones ambientales y las unidades formadoras de colonias (UFC) no estén en cantidades adecuadas, se establecen mediante procesos ingenieriles. En altas concentraciones de contaminante, existe toxicidad sobre población microbiana e insuficiencia de nutrientes (Roldán e Iturbe, 2005).

Entre las tecnologías de biorremediación se encuentran:

- Bioestimulación: adición de oxígeno y/o nutrientes para estimular la actividad de microorganismos autóctonos y biodegradación de contaminantes (Van Deuren *et al.*, 1997; Manacorda y Cuadros, 2005).
- Bioaumentación: adición de microorganismos para degradar el contaminante (Riser y Roberts, 1998; Manacorda y Cuadros, 2005).
- Biolabranza: mezcla con agentes volúmenes y nutrientes, se labra para favorecer aireación, mezclando suelo limpio con contaminado (Van Deuren *et al.*, 1997; citado por Volke y Velasco, 2002).
- Bioventeo: estimular la biodegradación de un contaminante por suministro de aire. La aireación favorece la degradación por: volatilización, migración de la fase volátil de contaminantes y biodegradación, estimula la actividad bacteriana (Maroto y Rogel, 2013; Manacorda y Cuadros, 2005).
- Fitorremediación: utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes en suelos (Van Deuren *et al.*, 1997; citado por Volke y Velasco, 2002; Manacorda y Cuadros, 2005).

### Las biopilas

Las biopilas son biorremediación *ex situ* en condiciones no saturadas, consiste en reducción de concentración de contaminantes derivados del petróleo de suelos (Benavides *et al.*, 2006). La elección de biopilas depende de condiciones climáticas y estructura de compuestos orgánicos volátiles del suelo. Las biopilas se diseñan como sistemas cerrados para mantener la temperatura, evitar la saturación de agua de lluvias y disminuir evaporación de agua y compuestos orgánicos volátiles (Eweis *et al.*, 1998; citado por Volke y Velasco, 2002).

Criterios para el diseño de biopilas:

- Extensión del suelo contaminado (volumen y datos del sitio) (Roldán e Iturbe, 2005).
- HTP en concentraciones menores a las 50,000 ppm y mayores a las 10,000 ppm (Vásquez *et al.*, 2010; Roldán e Iturbe, 2005; Benavides *et al.*, 2006).
- Bacterias heterótrofas en concentración mayor a 1 000 UFC/lg en suelo seco (Roldán e Iturbe, 2005).
- pH entre 6 y 9 (Roldán e Iturbe, 2005).
- Contenido de humedad entre 70 y 95% de capacidad de campo.
- Bajo contenido de arcilla y/o limo (Roldán e Iturbe, 2005).
- C, N, P y K aproximadamente de 100:15:1:1 (Roldán e Iturbe, 2005).
- Metales tóxicos menores a 2,500 mg/Kg (Roldán e Iturbe, 2005).

De acuerdo con las características del proceso de composteo, en etapa inicial es necesaria una aireación debido a una acelerada actividad microbiana. Este aumento en la actividad provoca un incremento de calor metabólico, produciéndose temperaturas en rango termofílico (50 a 60°C) (EPA, 1998; citado por Volke y Velasco, 2002).

Después disminuye la actividad microbiana debido a que los componentes biodegradables son consumidos. En esta etapa el requerimiento de oxígeno y temperatura disminuyen, por lo que la composta requiere menor aireación. Una vez que la pila se enfría y la temperatura se aproxima a la ambiente, el periodo de composteo se considera completo, lo que incluye cambio de textura y olor. Dependiendo de la cantidad de material orgánico mezclado con suelo la masa se reduce 40% (Eweis *et al.*, 1998; citado por Volke y Velasco, 2002).

Las condiciones óptimas de composteo dependen de parámetros en tres categorías: características del suelo, condiciones climáticas y características de los contaminantes. Un factor clave radica en la selección de aditivos, lo

cual conlleva un aumento en la velocidad de biodegradación de contaminantes (Eweis *et al.*, 1998; citado por Volke y Velasco, 2002).

Regiones con clima cálido entre 20 y 40°C son más eficientes para biorremediación. La temperatura de operación de una biopila es entre 30 y 40°C (etapa mesofílica) y depende principalmente del calor generado por la actividad metabólica de los microorganismos en la composta y por las condiciones climáticas del lugar (Volke y Velasco, 2002).

México es una región idónea para estas tecnologías ya que el 50.9% del territorio presenta climas con temperaturas entre los 18 a 26°C. En costas y regiones bajas (Chiapas, Oaxaca, Tampico, Hidalgo, etc.) las temperaturas medias oscilan entre 25 a 28°C (máxima 41°C), regiones donde se localiza la mayoría de los sitios contaminados por hidrocarburos (PEMEX, 2001; citado por Volke y Velasco, 2002).

### *Bacterias biorremediadoras*

La biorremediación acelera procesos biodegradativos que de forma natural ocurren en ecosistemas contaminados, donde las comunidades microbianas suelen ser dominadas por microorganismos adaptados, capaces de utilizar compuestos tóxicos del espacio contaminado. En ambientes contaminados por hidrocarburos es frecuente que bacterias Gram negativas dominen el sistema (Pérez *et al.*, 2007; Manacorda y Cuadros, 2005).

Si los contaminantes son sintéticos y nuevos en el medio ambiente, los microorganismos no tienen la capacidad de degradarlos, ya que los genes biodegradativos no han evolucionado. Incluso si los genes están presentes, la expresión funcional de los genes es esencial para que las enzimas degradativas apropiadas puedan ser producidas (Daubaras y Chakrabarty, 1992).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Caracterización del suelo*

En el laboratorio de Ingeniería Ambiental de UNICACH se evaluaron los parámetros: textura empleando tamices 4, 8, 10, 20, 50, 100 y 200; para una muestra de 400 g de suelo seco. El pH considerando la NOM-021-SEMARNAT-2000, utilizando un potenciómetro. La capacidad de campo se realizó saturándolo y dejando escurrir durante doce horas, posteriormente pesado, secado al horno y pesado sin humedad. El porcentaje de materia orgánica se obtuvo mediante diferencia de pesos.

Nitrógeno total, se utilizó el método de Micro Kjeldahl y fósforo disponible, método de Olsen; realizados por el laboratorio de Análisis de Suelos

y Plantas en El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000. Temperatura, se realizó con un termómetro digital Taylor modelo 9842.

### *Preparación del inóculo*

Se emplearon cepas *Stenotrophomonas* sp, *Sphingobacterium* sp y *Acinetobacter* sp, que fueron aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas (16°45'43.92''N; 93°10'36.86''W), identificadas en Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (Cisneros, 2011). Las cepas se mantuvieron en tubos eppendorf de 1.6 ml con medio LB y glicerol al 30% a -20°C.

Las bacterias se transfirieron a tubos de ensayo con aproximadamente 3 ml de caldo Luria y fueron incubadas a temperatura de 37°C durante 72 horas. Se sembraron en nueve cajas Petri estériles, tres para cada bacteria, se les agregó medio de cultivo Agar Infusión Cerebro Corazón y se incubaron a 37°C durante 24 horas para identificación.

La cuenta de bacterias se realizó por medio de la escala nefelométrica de MacFarland preparada en Laboratorio Estatal de Salud Pública, para la cual se organizaron tubos de ensayos con tapón de rosca numerados del 0.5 y del 1 al 10. Cada tubo se llenó con cloruro de bario anhidro al 1% en solución acuosa y una solución fría de ácido sulfúrico P.A. al 1% (v/v) en diferentes concentraciones de acuerdo a la turbidez deseada.

Las bacterias se inocularon en cajas petri previamente sembradas en tubo de ensayo con 4 ml de solución salina al 0.9%. La transferencia se realizó con asa bacteriológica tomando porciones del inóculo y mezclando de manera homogénea en tubos de ensayo hasta lograr la turbidez deseada comparada con el tubo 0.5 de la escala, que representa una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml.

### *Análisis genético*

Se realizaron dos análisis genéticos, el primero para corroborar las bacterias empleadas y el segundo para conocer que bacterias lograron adaptarse. La extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) se realizó por método de lisis celular/ fenol- cloroformo- alcohol isoamílico (Espinoza y García, 2003). Se colocaron tres inóculos provenientes de un medio de cultivo sólido (agar infusión cerebro corazón), para el primer análisis y 10 para el segundo. Se agregó, a cada tubo 360 µl de EDTA 0.5 M (pH 8.0); 19 µl de SDS al 10%; 25 µl de Tris HCL 0.1 M (pH 8.0) y 25 µl de Proteinasa K (10 mg/ml). Se agitaron

en un vortex durante 20 s y se colocaron a baño maría de 12 a 18 hr a 55°C para disolver tejido.

Las muestras fueron sometidas a un tratamiento de RNAasa. Se retiraron de baño maría y se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos. A cada tubo se le agregaron 2.2 µl de RNAasa con concentración de 10 mg/ml y se dejaron a baño maría durante una hora a 37°C. Se retiraron los tubos y dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se agregó a cada tubo 400 µl de acetato de amonio y pasaron al vortex durante 20 s. Los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 14,000 rpm.

Se retiró el sobrenadante y colocó en tubos con 600 µl de alcohol a temperatura de -20°C. Las muestras se centrifugaron durante 6 minutos a 14,000 rpm. Se retiró el alcohol de los tubos y añadieron 125 µl de alcohol etílico al 80%. Se dejaron reposar de 1 a 2 minutos para rehidratar el ADN. Se centrifugaron las muestras durante cuatro minutos a 14,000 rpm y se retiró el sobrenadante. Los tubos se dejaron destapados durante 30 minutos y se les agregó 100 µl de agua estéril para hidratar el ADN hasta que desaparezca el botón.

#### *Visualización de ADN*

La visualización del ADN extraído se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). Para preparar el gel se disolvieron 0.3 g de agarosa en 38 ml de amortiguador TAE 1X. En un parafilm se colocaron 3 µl de azul 6X por cada muestra, y 5 µl de ADN, resuspendiendo con micropipeta. Posteriormente se colocaron las muestras en los pozos del gel, se conectó la cámara a un voltaje de 120 volts, durante una hora.

Cuando el gel terminó de correr, se retiró de la charola, posteriormente fue teñido con bromuro de etidio (bromuro de 3.8 diamino-6-etil-5-fenilfenantridio, 10 mg/ml por 15 minutos, colorante fluorescente (Valadez y Kahl, 2000) que al intercalarse con las moléculas de ADN emite radiación, al emplear un transiluminador de luz ultravioleta, donde se evidencian las bandas del ADN total. La amplificación del ADN se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), proceso que consiste en sintetizar un fragmento de ADN con polimerasa a temperaturas elevadas (Espinoza, 2007).

Para preparar las muestras de la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) se utilizó el kit Green Master Mix, colocando en tubos para microcentrífuga 12 µl de master mix, 10 µl de agua para master mix, 1 de cada primer y 1.5 µl de ADN, con un volumen de 25.5 µl, se colocaron en termociclador TECHNE TC-3000, de acuerdo a las siguientes condiciones de temperatura: un ciclo de cuatro minutos a 94°C, seguido de 32 ciclos de 1 minuto a 94°C, un minuto a 53.5°C, un minuto 30 segundos a 72°C y 7 minutos a 72°C.

La visualización de ADN amplificado se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v). Para esto se disolvieron 0.6 g de agarosa en 38 ml de TAE 1X en matraz Erlenmeyer. El tapón de carga fue 2 µl del ADN amplificado y 1 µl de azul de bromofenol y 1 µl de ladder (escalera) de 100 pares de bases (pb) de ADN el cual consiste en 11 fragmentos con incrementos exactos de 100 pares de bases que van de 100 a 1500 en donde la banda de 500 pb presenta una triple intensidad comparado con los demás fragmentos. El programa de corrimiento del gel fue de 60 a 120 minutos a 120 volts, para la visualización de la amplificación el gel es teñido con bromuro de etidio y la imagen captada mediante cámara directamente del transluminador de luz ultravioleta, las fotografías se editaron con Picture Manager. La purificación y secuenciación de muestras estuvo a cargo de la compañía MACROGEN en Seúl, Corea con un secuenciador ABIPRISM marca Perkin Elmer.

### *Preparación de biopilas*

Para la construcción de las biopilas se tomaron cuatro muestras de suelo de 0.013 m<sup>3</sup> proveniente de la Unidad de Manejo y Conservación de la Vida Silvestre «La Huella» ubicada en el ejido Pedro Méndez en el municipio de Chiapa de Corzo, Chiapas, México, a una latitud N de 495757 y longitud O de 1840501, con una altura sobre el nivel medio del mar de 420 m, que presenta clima cálido subhúmedo con lluvias en verano (Awo) y temperatura media anual de 26.3°C. Los resultados de la caracterización del suelo indicaron que cuenta con propiedades fisicoquímicas para la biorremediación: pH entre 6 a 8 unidades, bajo contenido de arcilla y/o limo y alto contenido de nutrientes, se espera una temperatura entre 25 a 35°C durante el tratamiento (Roldán e Iturbe, 2005).

Se construyeron cuatro cajas de madera de 35 cm de largo por 25 cm de ancho y 15 cm de alto, diseñadas calculando que la cantidad de suelo sería la adecuada para realizar los análisis durante el proceso. Las cajas fueron diseñadas con pendiente del 2 al 3% para permitir escurrimiento de lixiviados (Roldan e Iturbe, 2005). Se forraron con una capa plástica para evitar absorción de lixiviados y permitir su escurrimiento.

En caso de que se generen lixiviados, estos se recolectarían en una base impermeable colocada en la parte baja.

### *Contaminación y acondicionamiento*

Se pesaron 5 kg de suelo seco, posteriormente fue contaminado por aceite automotriz en tres diferentes concentraciones de 10,000 a 50,000 ppm de HTP (Vásquez *et al.*, 2010; Roldán e Iturbe, 2005; Benavides *et al.*, 2006). El primer tratamiento se contaminó con 10,000 ppm de HTP, el segundo con

30,000 ppm, el tercero con 50,000 ppm y la biopila testigo con 30,000 ppm. Las cantidades de aceite se midieron en una probeta graduada. Finalmente se revolvió de manera manual el suelo con el aceite.

Los tratamientos fueron etiquetados: biopila testigo  $c_1$ ; biopila con concentración de 10,000 ppm,  $c_2$ ; concentración de 30,000 ppm,  $c_3$  y concentración de 50,000 ppm  $c_4$ . El acondicionamiento de la biopila se realizó adicionando agua hasta alcanzar una humedad del 60 al 70% de la capacidad de campo (Vásquez *et al.*, 2010), se verificó que el pH se encontrara entre 6 y 8. Se inocularon las bacterias a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml comparada con la escala de MacFarland, se agregaron 1.5 ml de solución salina inoculada por cada bacteria (Roldán e Iturbe, 2005) inoculando una concentración mayor de 1000 UFC/g de suelo seco, se aireó por medio de volteos manuales, se tomó la temperatura y se controló la humedad con método del puño cada dos días y humedad en el horno y pH cada 15 días. Se cubrió con una capa plástica para evitar erosión y escurrimiento por lluvias.

#### *Identificación de niveles de remoción*

Se tomaron tres muestras de suelo del fondo de cada biopila, seccionando la caja en tres a lo largo, por caja para cada tratamiento y el testigo. Las muestras se colocaron en tubos de plástico de 120 ml con tapa de rosca y boca ancha llenándolos por completo y finalmente se congelaron para preservarlas para su análisis. Las muestras tomadas fueron secadas al horno a 60°C, durante 72 horas, se homogenizó el sedimento revolviendo las tres muestras simples de los muestreos de cada tratamiento y el testigo, teniendo así cuatro muestras que analizar por cada muestreo, se pasaron por un tamiz de 0.5  $\mu\text{m}$ .

Para extraer el hidrocarburo se pesó una submuestra de 20 g de sedimento y el blanco, para el cual se usa arena, en un dedal de extracción. Se agregaron 200 ml de cloruro de metileno a un matraz de fondo redondo de 250 ml y se adicionaron cuerpos de ebullición. Posteriormente se ensambló el soxhlet y se llevó a reflujo durante 8 a 12 horas. Se evaporó la fracción de cloruro de metileno en baño maría, utilizando un rotavapor, se agregó hexano tres veces hasta ir sustituyendo el solvente sin permitir que la muestra se seque. La muestra se almacenó en los matraces para pasar por cromatografía en columna.

#### *Cromatografía en columna*

Para la preparación de la muestra se empacaron columnas cromatográficas de vidrio con llave de teflón con tapón de lana de vidrio. Se pesaron 10 g de alúmina y 20 g de gel de sílice parcialmente desactivados en vasos de

precipitados de 50 ml. Se agregó 1 cm de sulfato de sodio parcialmente desactivado y alúmina vía seca, usando embudo. Se agregaron 20 g de gel de sílice y sulfato de sodio (1 cm). Después fueron vertidos 30 ml de cloruro de metileno mediante embudo y manteniendo la llave abierta, se dejó que escurriera hasta que quedara el nivel por encima del sulfato de sodio con el fin de agregar 1 cm de polvo de cobre para que tuviera contacto con el cloruro de metileno.

Cuando el nivel del solvente se encontró en la superficie del polvo de cobre, se agregó la muestra junto con tres enjuagues del matraz con 0.5 ml de hexano. Se abrió la llave para que penetrara la muestra y se inició la elución, para la fracción 1 hidrocarburos alifáticos, con 100 ml de hexano y para la fracción 2 hidrocarburos aromáticos, con 100 ml de hexano y 100 de cloruro de metileno mezclados. Se evaporaron las fracciones, utilizando rotavapor hasta un volumen de 1 ml. La muestra se trasvasó a un tubo graduado, junto con dos enjuagues de 2 ml de hexano, y se concentró mediante flujo de nitrógeno hasta 2 ml. Se trasvasaron cuantitativamente a viales de 2 ml.

La fracción 1 de hidrocarburos alifáticos saturados, se analizó por cromatografía de gases utilizando detector de ionización de flama. La fracción 2 de hidrocarburos aromáticos y plaguicidas policlorobifenilos agregados antes de inyectarse estándares de TCMX (100  $\mu$ l a cada muestra) y O-terfenil (5  $\mu$ l a cada muestra), se analizó por cromatografía de gases utilizando detector de ionización de flama y de captura de electrones para cada grupo.

Las biopilas fueron monitoreadas según Benavides *et al.* (2006) y Roldan e Iturbe (2005), mediante cinco parámetros: aireación, temperatura, contenido de humedad, relación carbono/nitrógeno (C/N) y pH. El recuento de células viables se realizó para conocer la actividad microbiana y asegurarse que las condiciones fueron las adecuadas.

#### *Recuento de células viables*

El recuento de células viables se llevó a cabo, el día 15 del tratamiento (Vásquez *et al.*, 2010), se preparó de acuerdo a Ruíz *et al.* (2013) a un medio mineral se agregaron compuestos con cantidades en agua destilada: 0.15 g/L de fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); 1.156 g/L de cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ); 0.02 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ); 0.04 g/L de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ); 0.07 g/L de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ); 1 ml/L de solución con metales traza; 2 g/L de peptona y 2 g/L de dextrosa. Los compuestos fueron agregados en 1 L de agua destilada, esta mezcla se repartió en ocho matraces de 125 ml cada uno, mismos que fueron esterilizados en la autoclave. Cada mezcla fue etiquetada por duplicado como C1, C2, C3 y C4, de acuerdo a las etiquetas de cada tratamiento, y se le agregó

a las primeras cuatro bajo condiciones estériles, aproximadamente 2 g de suelo extraídos previamente de los tratamientos al medio correspondiente.

El medio mineral inoculado se dejó reposando 24 h, con el fin de que las bacterias se desarrollaran. Pasadas las 24 h las bacterias que crecieron en el medio se pasaron mediante el uso de un asa bacteriológica a los cuatro matraces restantes, dejando reposar para su crecimiento 24 h más. Pasado el tiempo se realizó la cuenta bacteriana colocando 1  $\mu$ l de medio inoculado en un portaobjetos mediante el uso de una micropipeta. El portaobjetos se colocó en un contador de células automático marca BIO-RAD (TC20).

La temperatura fue monitoreada cada dos días durante los tres meses de tratamiento (García *et al.*, 2012). El horario de toma de temperatura no fue definido, se procuró que se realizara en las tardes. La humedad fue monitoreada con método del puño cada dos días y en laboratorio cada quince días para mantener nivel de humedad de 60 a 70% (Vásquez *et al.*, 2010). Se realizaron análisis de pH en el laboratorio cada quince días. Cada dos días se aireó manualmente cada tratamiento para facilitar transferencia de oxígeno (García *et al.*, 2012).

#### *Aislamiento de bacterias del suelo al final del tratamiento*

El aislamiento de las bacterias se realizó el día 80 del tratamiento para identificar los organismos existentes al finalizar el proceso. Para esto se agregó un gramo de suelo de cada tratamiento a 5 ml de agua destilada en tubos de ensaye etiquetados de acuerdo al tratamiento y previamente esterilizados. Posteriormente los tubos se agitaron en un vortex durante 10 s y se dejaron reposar durante 30 minutos. Se realizaron diluciones, tomando una alícuota de 5 ml de la mezcla original para verterla después en un tubo de ensaye con 4.5 ml de agua destilada, obteniendo así una dilución 1/10, este paso se repitió hasta lograr diluciones 1/10,000,000. Se tomaron las diluciones 1/1,000; 1/100,000; 1/10,000,000 para agregar 5 ml del sobrenadante de agua destilada de cada uno de los tubos y colocarlos en cajas Petri con medio de cultivo agar infusión cerebro corazón. Los medios inoculados se incubaron a 27°C durante 24 hrs. Las colonias de bacterias que se identificaron se colocaron en tubos de Eppendorf de 1.5 ml para su posterior análisis genético. Las muestras de los tratamientos fueron etiquetadas con un total de 10 muestras para su análisis C1 (C101), C2 (C201, C202, C203), C3 (C301, C302, C303) y C4 (C401, C402, C403).

#### *Resultados*

De acuerdo al Sistema Unificado de Clasificación de Suelos (sucs), el suelo pertenece a suelos de partículas gruesas, ubicado dentro de las arenas lim-

pías, con amplia gama en tamaños intermedios, ubicándose en el grupo sw denominado arenas bien graduadas, arenas con grava con pocos finos, permeables en estado compactado, excelente resistencia al corte y despreciable compresibilidad.

El pH del suelo es de 7.6 unidades, al encontrarse en el rango de 7.4 a 8.5, se considera un suelo con pH medianamente alcalino. La humedad que presenta el suelo semisaturado es de 30.67%. Por cada 3.5321 g sería necesario agregar 1.5629 g de agua para lograr su saturación. El 75% de la capacidad de campo necesario para lograr una buena biorremediación equivaldría a agregar por cada 3.5321 g de suelo, 1.1721 g de agua.

La materia orgánica fue de 7.45%, según Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, se considera muy alta (mayor de 6.0). El nitrógeno total fue de 0.46%, según Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000 se considera con muy alto contenido de nitrógeno (mayor de 0.26). Se obtuvo un fósforo disponible de 19.5 mg/kg, según Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000 el contenido es alto (mayor de 11.1 mg/kg).

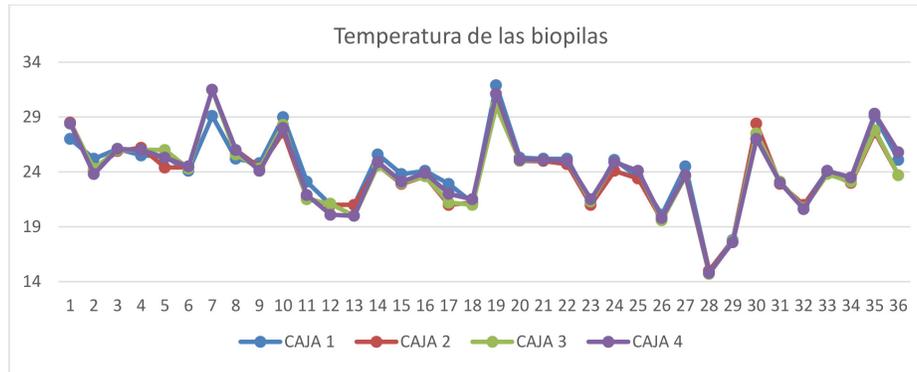
Durante el monitoreo de biopilas los porcentajes de humedad se registraron cada quince días. El porcentaje de humedad con respecto a la capacidad de campo se expresa en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Porcentajes de humedad durante en el proceso de biorremediación.

Muestras Tratamientos	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
C1	63.06	51.45	73.39	80.99	89.63	74.50	88.52
C2	56.18	50.93	83.76	86.01	80.93	75.38	94.59
C3	64.43	42.06	87.35	84.02	88.52	75.51	86.86
C4	60.45	51.71	76.72	79.49	73.85	70.59	81.48

Las humedades oscilaron entre los 50 y 90%, siendo solo en el segundo muestreo donde la humedad fue baja con un promedio de 49.04%, mientras que la mayor registrada se presentó en la caja 2 con un 94.59%. En promedio el porcentaje de humedad con respecto a la capacidad de campo es de 74.01% (Figura 1).

Figura 1. Monitoreo de temperatura en el tratamiento



El registro del pH se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Valores de pH obtenidos en cada muestreo, durante la biorremediación.

Fechas de muestreos	Caja 1	Caja 2	Caja 3	Caja 4
M1 14/10/13	6.98	6.65	7.4	7.37
M2 20/11/13	7.01	7.08	7.08	7.2
M3 05/12/13	7.8	7.93	7.89	7.95
M4 18/12/13	7.84	7.71	7.9	7.88
M5 08/01/14	7.72	7.85	7.65	7.66
M6 17/01/14	7.39	7.42	7.58	7.61
M7 31/01/14	7.03	7.35	7.56	7.63

El contador de bacterias arrojó que la cantidad de células para biopila testigo (C1) fue de  $5.98 \times 10^5$  células/ml, para tratamiento 1 (C2) de  $5.93 \times 10^5$  células/ml, para tratamiento 2 (C3)  $2.29 \times 10^5$  células/ml y para tratamiento 3 (C4)  $4.93 \times 10^5$  células/ml. En la Tabla 3 se muestran las concentraciones iniciales y finales de las fracciones de hidrocarburos.

**Tabla 3.** Concentraciones iniciales y finales de hidrocarburos en el proceso de biorremediación.

Tratamientos	Fracción aromática		Fracción alifática	
	Inicial ppm	Final ppm	Inicial ppm	Final ppm
C1	15387.2	35476.3	22221.8	1417.98
C2	9985.5	519.3	15471.9	1481
C3	21049.1	12885.2	17922.2	1997.85
C4	48092.3	8642	19135.2	2469

De igual forma podemos observar el porcentaje final de remoción de hidrocarburos que se obtuvo durante el tratamiento en las fracciones alifáticas y aromáticas (Tabla 4).

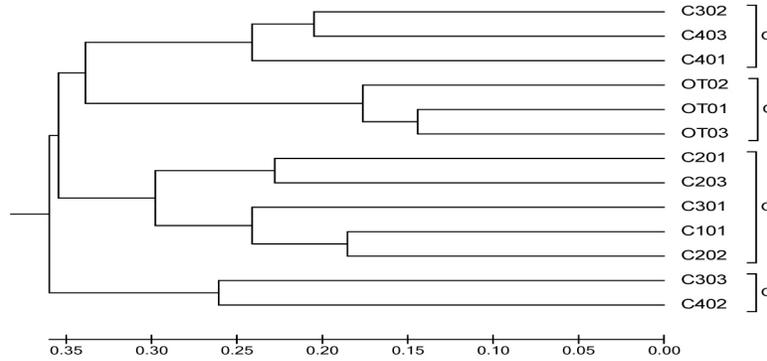
**Tabla 4.** Porcentajes de remoción en las fracciones de hidrocarburos en el proceso de biorremediación.

Tratamientos	Fracción aromática	Fracción alifática
	% Remoción	% Remoción
C1	0	93.62
C2	94.8	90.43
C3	38.79	88.86
C4	82.04	87.1

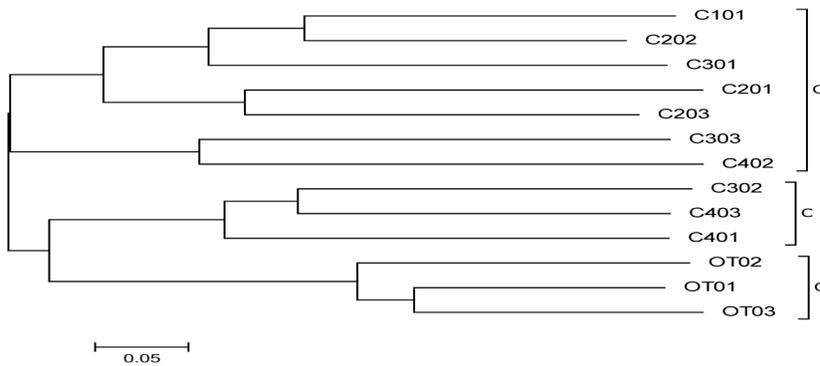
Se logró la extracción y amplificación de ADN genómico de 13 muestras en total. Tres corresponden a las bacterias inoculadas al inicio del tratamiento y 10 restantes a las bacterias aisladas al finalizar. Se logró la purificación y secuenciación de ADN genómico de 13 secuencias con un total de 400 pares de bases cada una.

Se obtuvieron dos árboles filogenético generados mediante algoritmo del vecino más cercano y UPGMA respectivamente con programa MEGA. Dentro del algoritmo UPGMA se muestran cuatro clados denominados grupo I, II, III y IV (Figuras 2 y 3). El primer grupo está compuesto por C302 no identificada, C403 *Burkholderia* y C401 *Mycobacterium*. El segundo está constituido por los individuos inoculados inicialmente, que corresponden a OTEC 01, 02 y 03 denominados *Acinetobacter Sp*, *Sphingobacterium Sp* y *Stenotrophomonas Sp*. El tercer grupo está conformado por C203 *Pseudomonas*, C201, C301, C101 y C202 no identificadas y por último el cuarto grupo se compone por C303 *Streptomyces* y C402 *Bacteroides*. El árbol generado mediante el algoritmo vecino más cercano, está conformado por tres clados denominados grupo I, II y III. El primer grupo está compuesto por C101, C202, C301, C201, C203, C303 y C404. El segundo grupo está compuesto por C302, C403 y C401 y el grupo III por OTEC 01, 02 y 03 como podemos observar en la Figura 2.

**Figura 2.** Cladograma del algoritmo UPGMA programa MEGA a través de p-distance. El número en los nodos corresponde a los valores de soporte bootstrap con 100 repeticiones.



**Figura 3.** Cladograma del algoritmo del vecino más cercano programa MEGA a través de p-distance. El número de nodos corresponde a soporte bootstrap con 100 repeticiones.



*Discusión de resultados*

El suelo proveniente de la UMA La Huella, tiene un alto contenido de arena, grupo sw de sucs, suelo poroso, presenta limos y arcillas, supone la presencia de nutrientes, los cuales dieron como resultado: 7.45% de carbono, 0.46% de nitrógeno y 19.5 mg/kg de fósforo, con muy alto contenido los primeros dos y alto el fósforo. No fue posible conocer la biodisponibilidad de los nutrientes en el suelo, sin embargo, los resultados de la degradación del hidrocarburo suponen que los microorganismos existentes durante el tratamiento

lograron desarrollarse en el ambiente, proceso para el que es necesaria la presencia de nutrientes biodisponibles. Acuña *et al.* (2012) mencionan que la baja concentración de nutrientes biodisponibles (nitrato, nitrito, amonio y fosfato) es desfavorable para el proceso de biorremediación que podría ser solucionado con bioestimulación.

La arena prevaleció en este suelo, lo que permitió que el oxígeno penetrara en los poros consiguiendo así una adecuada oxigenación, las partículas finas presentes favorecerían la retención del agua incorporada en el suelo, condiciones necesarias para un correcto desarrollo microbiano (Acuña *et al.*, 2012). Al respecto García *et al.* (2012), resaltan que la disponibilidad y el contacto microorganismo hidrocarburo es clave para la biorremediación, los suelos del grupo sw pueden ser una opción viable para la aplicación de esta técnica. Aunado, a las características anteriores, un pH neutro es indispensable para un correcto desarrollo de la macro y microfauna en un tratamiento con biopilas (Acuña *et al.*, 2012).

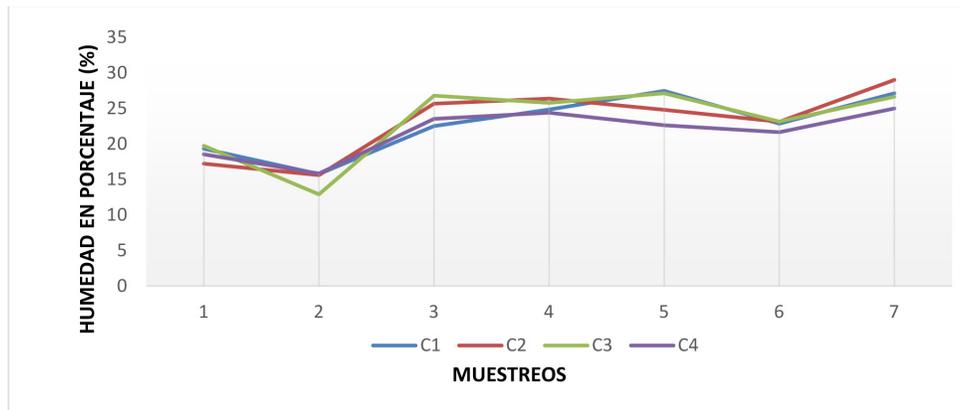
En el momento en que ocurre un derrame de hidrocarburos en suelos, como en el experimento, da como resultado una serie de procesos que impactan negativamente, las bacterias que se encuentran al ser modificado el ambiente al que estaban aclimatadas, crecen lentamente o mueren (Manacorda y Cuadros, 2005) y algunas logran adaptarse. Daubaras y Chakrabarty (1992) mencionan que si los contaminantes son sintéticos y nuevos en el medio ambiente, los microorganismos no tienen la capacidad de degradar los contaminantes ya que los genes biodegradativos adecuados no pueden haber evolucionado e incluso si los genes están presentes, la expresión funcional de los genes es esencial para producir las enzimas de degradación apropiadas. La cantidad de oxígeno disminuye debido a que los espacios del suelo se llenan con hidrocarburo (Restrepo, 2002) y los nutrientes fósforo y nitrógeno que los microorganismos usan para desarrollo generalmente se limitan en el medio por el exceso de carbono generado en el derrame de hidrocarburos (Tyagi *et al.*, 2011).

Las bacterias usadas en los tratamientos, *Acinetobacter Sp*, *Sphingobacterium Sp* y *Stenotrophomona Sp*, al haber sido extraídas de un suelo contaminado de manera crónica por hidrocarburos, de un lugar donde se usan sustancias como el aceite lubricante, son consideradas bacterias aptas para la degradación del contaminante usado, puesto que al haber estado presentes en el sitio afectado durante un largo período lograron adaptarse a este y desarrollar el sistema que les permite degradar contaminantes orgánicos derivados de las actividades humanas (Ruíz *et al.*, 2013). Al respecto Manacorda y Cuadros (2005) resaltan la importancia de microorganismos indígenas, ya que son los principales descomponedores del ecosistema puesto que esta actividad existía naturalmente en el ambiente

con anterioridad a la disposición del xenobiótico en él (Benavides *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2011).

Posterior al derrame, se dieron las condiciones aeróbicas adecuadas al suelo para que las bacterias realizaran sus funciones y se reprodujeran a una mayor velocidad y degradaran el contaminante. Los factores que se controlaron durante el tratamiento fueron: humedad, temperatura, pH y oxígeno, mismos que se monitorearon a lo largo del proceso. La Figura 4 indica las humedades registradas cada quince días durante el tratamiento.

**Figura 4.** Porcentajes de humedad registrada durante el tratamiento.



De acuerdo a los resultados expresados podemos observar que las biopilas tuvieron la misma humedad, aunque no fue constante durante el tratamiento. En la Tabla 5 se presenta el porcentaje de humedad expresado en relación con la capacidad de campo. Podemos observar que en ocasiones se elevó llegando a 94.59%, correspondiente al muestreo 7 del tratamiento 1 (C2). Según Roldán e Iturbe (2005), humedades excesivas son indeseables para la biorremediación con biopilas, puesto que los espacios en el suelo son ocupados por agua provocando una deficiencia en aireación. El exceso de agua incrementa la generación de lixiviados, tanto de hidrocarburos como de nutrientes. Debido al tamaño y cantidad de suelo manejado la lixiviación fue casi imperceptible en las biopilas.

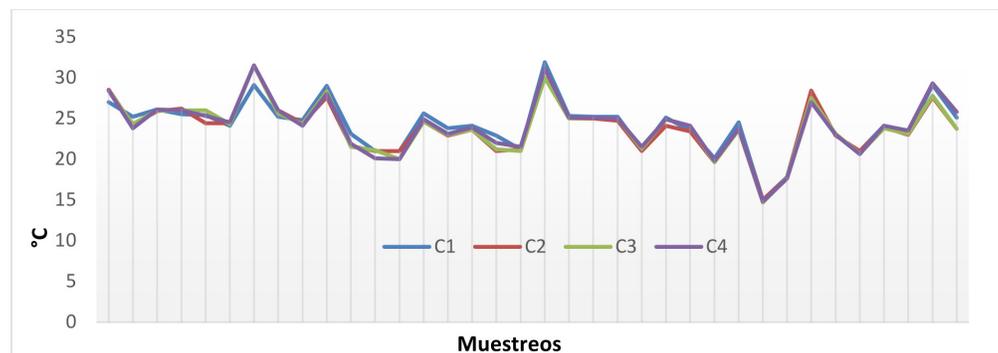
Los rangos óptimos de humedad de 40 a 85% (Volke y Velasco, 2012), de 70 a 95% de la capacidad de campo (Roldán e Iturbe, 2005); humedades altas pueden ser usadas en el proceso sin generar problemas en la degradación del hidrocarburo. En momentos la humedad fue menor que la establecida en el diseño experimental (60 al 70%), durante segundo muestreo con 51.45%, la biopila testigo (C1); 50.93%, el tratamiento 1 (C2); 42.06%, el tratamiento 2 (C3) y 51.71%, el tratamiento 3 (C4) y el tratamiento 1 (C2)

del primer muestreo con 56.18%. La humedad es necesaria para el transporte de nutrientes, los procesos metabólicos y mantener la estructura de la célula (Roldán e Iturbe, 2005). García et al. (2012) ajustaron el valor de la humedad entre 40 y 60% de la capacidad de campo, lo que indica que aun con las humedades bajas registradas se lograron condiciones que aceleraran el proceso de degradación. La Figura 5 representa el comportamiento de la temperatura en el suelo registrada cada dos días durante el tratamiento.

**Tabla 5.** Porcentaje de humedad registrada en relación con la capacidad de campo.

Muestras tratamientos	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	5 (%)	6 (%)	7 (%)
C1	63.06	51.45	73.39	80.99	89.63	74.50	88.52
C2	56.18	50.93	83.76	86.01	80.93	75.38	94.59
C3	64.43	42.06	87.35	84.02	88.52	75.51	86.86
C4	60.45	51.71	76.72	79.49	73.85	70.59	81.48

**Figura 5.** Temperaturas registradas durante el tratamiento.

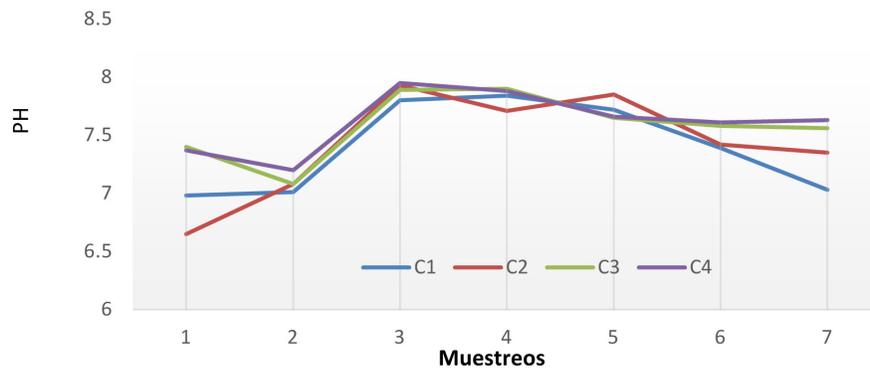


Las temperaturas variaron a lo largo del tratamiento con picos superiores a 30°C y menores a 20°C. Las biopilas presentaron temperaturas similares durante el procedimiento, lo cual indica que el experimento fue controlado adecuadamente. Volke y Velasco (2012) mencionan la temperatura ideal entre 25 y 35°C. Acuña *et al.* (2012) resaltan la importancia de temperatura para el desarrollo de microorganismos.

La Figura 6 presenta el pH registrado cada quince días a lo largo del procedimiento. El pH según Roldán e Iturbe (2005) y Volke y Velasco (2012) debe estar en un rango de 6 a 9 y de 6 a 8, respectivamente, con pH óptimo

de 7. Los resultados se mantuvieron en rango neutro durante el tratamiento, lo cual favoreció la biorremediación (Acuña *et al.*, 2012).

**Figura 6.** pH registrado en el proceso de biorremediación.



Roldán e Iturbe (2005) proponen niveles de hidrocarburos menores a 50,000 ppm. Vásquez *et al.* (2010) removieron el 70 al 90% en diferentes tiempos con concentraciones entre 10,000 y 50,000 ppm. Las concentraciones usadas en este estudio (10,000, 30,000 y 50,000 ppm) y los niveles de remoción alcanzados 63.82% a 92.61% son similares a lo reportado en la literatura. En la Tabla 6 se observan las especies bacterianas aisladas del suelo al finalizar el tratamiento.

**Tabla 6.** Especies aisladas del suelo contaminado al término del tratamiento.

Biopila	Muestra	Bacteria o especie	Porcentaje Identificación	Plataforma	Observaciones
C1	C101	No identificado	-----	Todas	No se encontró ninguna especie de bacteria en la base de datos del genbank
C2	C201	No identificado	-----	Todas	No se encontró ninguna especie de bacteria en la base de datos del genbank
	C202	No identificado	-----	Todas	No se encontró ninguna especie de bacteria en la base de datos del genbank
	C203	<i>Pseudomonas</i>	33%	blast-blastx <sup>1</sup>	Productoras de biosurfactantes involucrados en la remoción de aceite

C3	C301	No identificado	-----	Todas	No se encontró ninguna especie de bacteria en la base de datos del genbank
	C302	No identificado	-----	Todas	No se encontró ninguna especie de bacteria en la base de datos del genbank
	C303	<i>Streptomyces</i>	41%	blast-blastx <sup>1</sup>	Se encuentran en suelos y en la vegetación descompuesta y produce numerosos antibióticos de uso clínico
C4	C401	<i>Mycobacterium</i>	84%	blast-blastx <sup>1</sup>	Degradan hidrocarburos aromáticos policíclicos en especial pyreno, benzo (a) pyreno es altamente cancerígeno
	C402	<i>Bacteroides</i>	37%	blast-blastx <sup>1</sup>	Son candidatos para el tratamiento de terrenos contaminados con htp
	C403	<i>Burkholderia</i>	75%	blast-tblastx <sup>2</sup>	Es excelente degradadora de hidrocarburos aromáticos

- 1) Búsqueda de proteínas utilizando una base de nucleótidos.
- 2) Búsqueda de base de datos de nucleótidos utilizando una consulta de nucleótidos traducida.

Se puede observar que las bacterias inoculadas inicialmente no se lograron aislar de las muestras obtenidas, respecto a esto Tyagi *et al.* (2011) mencionan que los microorganismos autóctonos tienen más probabilidades de sobrevivir y desarrollarse cuando se reintroducen en el sitio en comparación con las cepas transitorias o ajenas a este hábitat. Al finalizar el tratamiento se obtuvieron cepas bacterianas degradadoras de hidrocarburos, que lograron sobrevivir al entorno recién contaminado. Las cepas liberadas pudieron haber transferido plásmidos catabólicos a los microorganismos autóctonos, de la misma forma el ambiente en el que se encuentran modula el reclutamiento y la evolución de los genes de la vía de degradación en las bacterias (Cisneros, 2011; Daubaras y Chakrabarty, 1992), lo que explica su sobrevivencia y aparición al finalizar el tratamiento. Los porcentajes de remoción promedio del contaminante a 90 días por biopila se expresan en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Porcentaje de remoción final de hidrocarburos totales por tratamiento.

Tratamiento	Porcentajes de remoción (%)
C1	46.81
C2	92.61
C3	63.82
C4	84.56

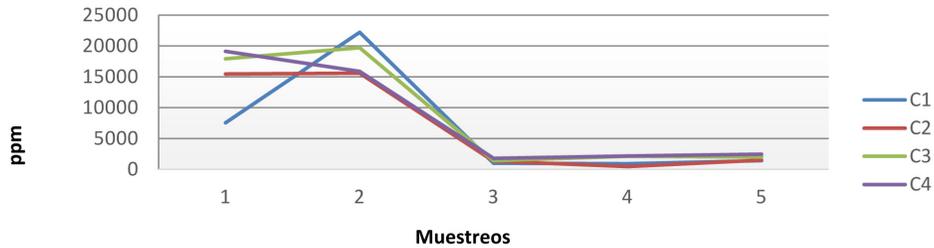
La biopila que logró la mayor cantidad de remoción fue la que tuvo la menor concentración de hidrocarburo al inicio del tratamiento (10,000 ppm), condición que influyó para que las bacterias lograran degradar el contaminante. En esta biopila se identificó el género *pseudomona*, bacterias reconocidas por su capacidad de biorremediación, siendo capaz de degradar hidrocarburos aromáticos: benceno, tolueno, etilbenceno, xileno, naftaleno y fenantreno; además produce biosurfactantes extracelulares. El tratamiento con la concentración media (30,000 ppm), logró una remoción menor; la presencia de la especie bacteriana identificada como no degradadora de hidrocarburos, supone una competencia con las bacterias inoculadas y pueden causar incremento en el periodo de aclimatación previo a la degradación de los compuestos (Steffensen y Alexander, 1995; citado por Cineros, 2011).

El tratamiento con mayor concentración del contaminante (50,000 ppm), logró remociones por encima del tratamiento con concentración media. En la Tabla 8, se observa que aparte de las cepas biorremediadoras inoculadas, existió presencia de otros microorganismos biorremediadores como es el caso de *Mycobacterium*, la cual es capaz de degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos en especial pyreno, benzo (a) pyreno el cual es altamente cancerígeno, *Bacteroides* género candidato en el tratamiento de terrenos contaminados con HTP y *Burkholderia*, excelente degradadora de hidrocarburos aromáticos (Benavides et al., 2006; Tyagi et al., 2011), esa biopila presentó más especies bacterianas biorremediadoras, lo que explica el alto porcentaje de remoción.

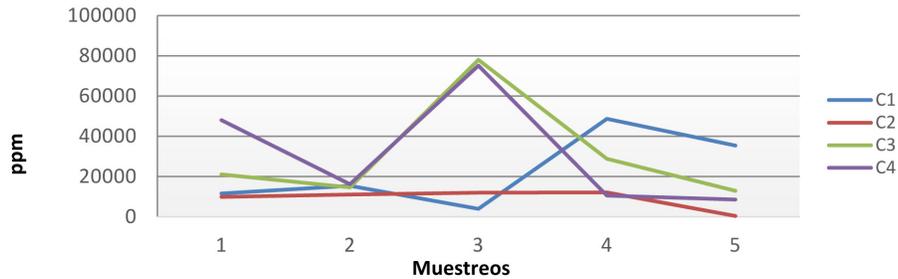
La biopila testigo tuvo la menor remoción, lo que prueba la importancia de agregar bacterias que estén adecuadas a un medio contaminado y hayan desarrollado la capacidad de degradar dicho contaminante. Daubaras y Chakrabarty (1992), mencionan que para degradar un compuesto sintético y nuevo en el ambiente, un microorganismo debe evolucionar los genes que codifican enzimas que tienen afinidad por el compuesto químico, razón por la que se reduce o detiene la tasa de crecimiento bacteriano; lo que explica la ausencia de microorganismos al finalizar el tratamiento.

En las Figuras 7 y 8 se observa la reducción de hidrocarburos en las fracciones analizadas. En el caso de la biopila testigo, la reducción solo se observó para la fracción alifática (Ifeanyichukwu, 2011), es normal encontrar niveles de degradación similares tanto en los tratamientos como en la biopila testigo. Los HAP's, que constituyen la fracción más recalcitrante y peligrosa del aceite de motor, son más difíciles de degradar (Cerniglia, 1992) lo que explica un menor porcentaje de remoción.

**Figura 7.** Concentración de hidrocarburos alifático durante el proceso de biorremediación.



**Figura 8.** Concentración de hidrocarburos fracción aromática durante el tratamiento.



Se registraron porcentajes de remoción para la fracción alifática (Tabla 8), con estabilización del contaminante en el ambiente en el día 60. Los hidrocarburos fracción aromática tuvieron un comportamiento diferente a la fracción alifática (Tabla 8). Se observó un aumento del 30.56% para la C1, lo que indica que el proceso de degradación en la biopila testigo fue lento. Durante el tratamiento se observaron en C3 y C4 picos elevados alrededor del día 30, que representan un aumento en la concentración de los hidrocarburos en esta fracción que también presentó la biopila testigo el día 60 y al finalizar el tratamiento. Esto se deba al desdoblamiento de las moléculas provocado por la actividad de las bacterias degradadoras, tal como explica Cerniglia (1992), las bacterias usan enzimas para romper las cadenas de hidrocarburos y de esta manera ser metabolizadas. Por otro lado un mismo microorganismo, puede presentar diferentes porcentajes de degradación ante crudos de diferente procedencia o composición química en iguales condiciones experimentales (Ortiz *et al.*, 2005).

**Tabla 8.** Porcentajes de remoción de hidrocarburos durante el tratamiento.

Tratamiento	Día 1		Día 15		Día 30		Día 60		Día 90	
	Aromáticos	Alifáticos								
C1	0.00	0.00	0.00	0.00	-73.93	-95.50	216.96	-95.79	130.56	-93.62
C2	0.00	0.00	10.85	0.74	-99.98	-91.43	-21.33	-97.14	-94.80	-90.43
C3	0.00	0.00	-30.08	9.97	270.64	-92.03	37.27	-88.16	-38.79	-88.85
C4	0.00	0.00	237.49	-17.04	56.26	-90.66	-77.89	-88.63	-82.03	-87.10

### CONCLUSIONES

De acuerdo con los parámetros físico-químicos analizados el suelo resultó ser apto para tratamiento con biopilas. En C1 para la fracción alifática se logró una remoción de 93.7%, para C2 de 90.4%, C3 de 88.8% y C4 de 87.1%. Respecto a los hidrocarburos fracción aromática se lograron remociones de 0 para C1, 94.8 para C2, 38.8 para C3 y de 82.0 para C4 en 90 días de tratamiento, con aplicación de bacterias biorremediadoras y la identificación de cepas bacterianas nativas que lograron resistir el cambio en su ambiente.

Se comprobó que se puede utilizar la biorremediación para el tratamiento de residuos característicos aceitosos de los hidrocarburos pesados ya que redujeron las concentraciones de hidrocarburos, en sus fracciones alifáticas y aromáticas. La degradación de la fracción aromática fue notoria en los tratamientos a los que se les inoculó las bacterias.

Es recomendable usar microorganismos nativos y bacterias externas para permitir la adaptación de bacterias nativas y lograr reducir los niveles de hidrocarburos. En conjunto las bacterias nativas y externas fueron capaces de utilizar el aceite usado de motor como fuente de carbono y energía.

Con los resultados de esta investigación, se sustenta que la presencia de bacterias externas y nativas, la adición de agua y la oxigenación, tiene efectos positivos en la reducción de concentraciones de hidrocarburos totales para suelos contaminados por aceites usados. Como parte de una caracterización inicial del contaminante, es importante determinar la concentración de metales, puesto que una cantidad por encima de las 2,500 ppm podría ser perjudicial para el proceso de biorremediación (Roldán e Iturbe, 2005).

## REFERENCIAS

- Benavides**, J., Quintero, G., Guevara, A. L., Jaimes, D. C., Gutiérrez, S. M., Miranda, J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4 (5), 82-90.
- Cisneros Pérez**, Crhistian. 2011. Identificación y caracterización de cepas degradadoras de fenol. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- Daubaras**, D. y Chakrabarty, A.M. 1992. The environment, microbes and bioremediation: microbial activities modulated by the environment. *Biodegradation*, 3, 125-135.
- Espinoza** M.E. y García D.M. 2003. Manual de laboratorio de genética. ECOSUR, San Cristóbal de las Casas, Chiapas. El Colegio de la Frontera Sur.
- García**, M. G., Infante, C., López, L. 2012. Biodegradación de un crudo mediano en suelos de diferente textura con y sin agente estructurante. *Bioagro* 24 (2), 93-102.
- Ifeanyichukwu** A. H. 2011. The Potential of *Chromolaena Odorata*(L) to Decontaminate Used Engine Oil Impacted Soil Under Greenhouse Conditions. *International Journal of Phytoremediation*, 13, 627-641.
- Manacorda**, A. M., Cuadros, D. 2005. Técnicas de Remediación Biológicas. Escuela Superior de Salud; Microbiología Ambiental.
- Maroto**, M. E. y Rogel, J. M. 2013. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. GEOCISA. Div. Protección Ambiental de Suelos, 297-305. Consultada en agosto, <http://aguas.igme.es/igme/publica/pdflib15/028.pdf>.
- Martínez Prado**, A., Pérez López, M. E., Pinto Espinoza, J., Gurrola Nevárez, B. A. y Osorio Rodríguez, A.L. 2011. Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(3) 241-252.
- NOM-052-SEMARNAT-2005**. Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. México: Diario Oficial de la Federación.
- Ortiz**, E., Núñez, R., Fonseca, E., Oramas, J., Almazán, V., Cabranes, Y., Miranda, A., Barbán, O., Martínez, C., Díaz, Y. y Borges, G. (2005). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Contribución a la Educación y la Protección del Medio Ambiente*. 6, 51-60.
- Pérez Silva**, R. M., Camacho Pozo M. I., Gómez Montes de Oca J. M., Ábalos Rodríguez A., Viñas M. y Cantero Moreno D. 2007. Aislamiento y

- selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 39(1), 44- 51.
- Randy Schroeder, H., Domínguez Rodríguez V. I, García Hernández L.** 1999. Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe*. 17 (002), 159-174.
- Restrepo, R.** 2002. Derrame de hidrocarburos. Impacto en los ecosistemas tropicales. *ECOPETROL Instituto Colombiano de Petróleo, Colombia*.
- Roldán M. A. e Iturbe Arguelles R.** 2005. Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas. *Instituto de Ingeniería, UNAM. Cd. Universitaria*.
- Ruíz Marín A., Zavala Loria J. C., Canedo López Y. y Cordova Quiroz A. V.** 2013. Aislamiento de bacterias tropicales en suelo de mangle contaminado por hidrocarburos: biorremediación por atenuación natural y bioaumentación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 12 (03), 1-8.
- SEMARNAT.** 2013. Acciones y Medidas de Descontaminación. Consultada en agosto, <http://www.semarnat.gob.mx/temas/gestionambiental/Materiales%20y%20Actividades%20Riesgosas/sitioscontaminados/GTZ/B-Acciones%20y%20medidas%20de%20descontaminacion.pdf>.T
- Torres Delgado, K. Zuluaga Montoya, T.** 2009. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Trabajo de grado. *Universidad Nacional de Colombia. Colombia*.
- Tyagi, Meenu, da Fonseca, Manuela R., de Carvalho, Carla.** 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Springer*. (2011). 22:231–241.
- Vásquez M. C., Guerrero Figueroa, J. T., del Pilar Quintero, A.** 2010. Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. *Revista Colombiana Biotecnológica*. 12 (1), 141- 157.
- Valadez, M. H. y Kahl G.** 2000. Huellas del ADN en el genoma de las plantas. *Editorial Mundi Prensa. México D.F.* 19 pp.
- Volke Sepúlveda, T. L. y Velazco, J. A.** 2002. El composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. *Gaceta Ecológica*, 66, 41- 53.