



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO DE EDAFOLOGÍA

**BIORREMEDIACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON  
PETRÓLEO INTEMPERIZADO MEDIANTE  
BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN EN  
PRESENCIA DE *Clitoria ternatea* L.**

**GILBERTO MORALES GUZMÁN**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO**

**2017**

La presente tesis titulada: **Biorremediación de suelo contaminado con petróleo intemperizado mediante la bioestimulación y la bioaugmentación en presencia de *Clitoria ternatea* L.** realizada por el alumno: **Gilberto Morales Guzmán**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EDAFOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

Consejero



---

Dr. Alejandro Alarcón

Asesor



---

Dr. Ronald Ferrera Cerrato

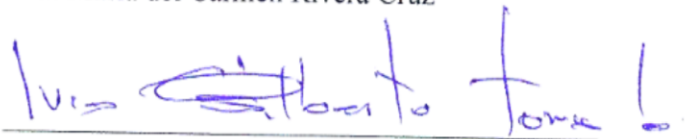
Asesora



---

Dra. María del Carmen Rivera Cruz

Asesor



---

Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos

Asesora



---

Dra. Ma. Remedios Mendoza López

Montecillo, Texcoco, Estado de México, marzo 2017

**BIORREMEDIACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO ÍNTEMPERIZADO  
MEDIANTE BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN EN PRESENCIA DE *Clitoria***

*ternatea*

**Gilberto Morales Guzmán, Dr.**

**Colegio de Postgraduados, 2017**

**RESUMEN**

Este estudio identificó y seleccionó bacterias emulsificantes hidrocarbonoclastas para usarlas en procesos de biorremediación de suelos con hidrocarburos del petróleo intemperizado (HTPI) mediante la inoculación de bacterias (bioaumentación), y la aplicación de fertilizante inorgánico (bioestimulación), y un surfactante químico, en presencia de *Clitoria ternatea* (Fabaceae). Este trabajo se dividió en tres fases experimentales. La primera fase (**Capítulo IV**), evaluó las poblaciones bacterianas (bacterias totales, lipolíticas, solubilizadoras de fosfatos, fijadoras de nitrógeno de vida libre, e hidrocarbonoclastas), a partir de un suelo recolectado en La Venta, Tabasco (México), caracterizando las bacterias con mejor capacidad emulsificante y degradadora de diésel. La segunda fase (**Capítulo V**) evaluó la fitotoxicidad de un Gleysol contaminado de origen, con diferentes concentraciones de HTPI, en el crecimiento de plantas de *C. ternatea*, inoculadas con bacterias emulsificantes. La tercera fase (**Capítulo VI**) describe la influencia de la bioestimulación, la bioaumentación, y la aplicación de un surfactante químico (Triton X-100) en combinación con *C. ternatea*, en la eficiencia de la biodegradación de HTPI. Los suelos evaluados presentaron bacterias emulsificantes e hidrocarbonoclastas de las que se purificaron e identificaron seis bacterias, que contribuyen a atenuar la fitotoxicidad inducida por HTPI, dependiendo de su concentración en el suelo. La aplicación de bioestimulación y bioaumentación solas o combinadas, mejoró la degradación de HTPI (65%, en promedio) en el suelo contaminado.

**Palabras clave:** Fitorremediación, fitotoxicidad, bacterias emulsificantes, surfactante, fertilización.

**BIOREMEDIATION OF CONTAMINATED SOIL WITH WEATHERED PETROLEUM BY  
MEANS OF BIOESTIMULATION AND BIOAUGMENTATION IN PRESENCE OF *Clitoria  
ternatea***

**Gilberto Morales Guzmán, Dr.**

**Colegio de Postgraduados, 2017**

**ABSTRACT**

This study identified and selected emulsifying hydrocarbonoclastic bacteria for further use in soil bioremediation contaminated with weathered petroleum hydrocarbons (WPH) by means of bacterial inoculation (bioaugmentation), inorganic fertilization (biostimulation), and the application of a surfactant, in presence of *Clitoria ternatea* (Fabaceae). The study was split in three experimental stages. First stage (**Chapter IV**), evaluated the bacterial populations (total, lipolytic, P-solubilizers, N-fixing free and hydrocarbonoclastic bacteria), from soils collected at La Venta, Tabasco (Mexico), and characterized bacteria with high emulsification and degradation of diesel. Second stage (**Chapter V**) evaluated the phytotoxic effects of a Gleysol contaminated with several concentrations of WPH, on the growth of *C. ternatea* plants inoculated with emulsifying bacteria. Third stage (**Chapter VI**) describes the influence of biostimulation, bioaugmentation, and the application of a chemical surfactant (Triton X-100) in combination with *C. ternatea*, on the efficiency of WPH-degradation. Contaminated soils had emulsifying and hydrocarbonoclastic bacteria from which, six isolates were purified and identified; bacteria attenuated phytotoxic effects of WPH depending on their concentration in soils. Bioestimulation and bioaugmentation (alone or combined), enhanced WPH-degradation (65%, in average) in contaminated soils.

**Key words:** Phytoremediation, phytotoxicity, emulsifying bacteria, surfactant, fertilization.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por haberme dado la vida y por su gran bondad hacia mi persona.

A mis padres, Luis Morales Hidalgo y Maria Guzmán Diaz, quienes me han apoyado material y espiritualmente, y sus sabios consejos aún siguen fructificando en mi vida profesional.

A mi esposa Marcelina y mis hijos José Angel y Alan Geobany, que son el regalo más hermoso que Dios me ha dado.

A mis hermanos Marcial, Yolanda, Alvaro, Juana, Marcelino, Luis, Guadalupe y Yeni; quienes forman parte importante en mi vida.

A todos mis amigos y amigas del laboratorio de Microbiología de Suelos quienes me apoyaron de forma directa e indirecta mi estancia en la investigación.

A los Doctores Alejandro, Ronald, Jesús y Julián, del Área de Microbiología de Suelos, quienes me permitieron formar parte de un excelente grupo de investigación.

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el financiamiento otorgado para la culminación de este trabajo de investigación.

Al Colegio de Postgraduados Campus-Montecillo por permitir que forme parte de un excelente ambiente laboral y académico.

Al Dr. Alejandro Alarcón, por todas las facilidades proporcionadas a mi persona para la culminación de este trabajo, por su apoyo otorgado. Agradezco su amistad, su confianza, su dedicación y su paciencia durante el tiempo que duró esta etapa profesional.

Agradezco a los miembros de mi Comité de Tesis: al Dr. Ronald Ferrera Cerrato por su apoyo incondicional, consejos y valiosas aportaciones al trabajo; a las Dra. María del C. Rivera Cruz, Dra. Ma. Remedios Mendoza López, por su disposición y apoyo a la investigación, además de su valiosa amistad; al Dr. Luis Gilberto Torres Bustillos, por sus acertadas aportaciones y valiosos comentarios a la tesis.

A mi familia Marcelina Martínez Arenas, José Angel Morales Martínez y Alan Geobany Morales Martínez, quienes gracias a su apoyo y comprensión se terminó satisfactoriamente la investigación.

A mis padres y hermanos por su apoyo

A mis suegros Rodolfo Martínez y Hermelinda Arena, así como al Cabo Bartolo Martínez Arenas y a su Familia, por su gran apoyo y hospitalidad brindado durante mi estancia.

## CONTENIDO

	Pags.
PORTADA.....	i
HOJA DE FIRMA .....	ii
RESUMEN .....	iii
ABSTRACT.....	iv
DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTOS .....	vi
CONTENIDO .....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE CUADROS.....	xiv
CAPÍTULO I. ....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
CAPÍTULO II. ....	4
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.2. Objetivos específicos .....	4
2.3. Hipótesis general.....	5
2.4. Hipótesis particulares.....	5
CAPÍTULO III.....	6
REVISIÓN DE LITERATURA .....	6
3.1. El petróleo.....	6
3.2. Petróleo crudo .....	6
3.3. Petróleo intemperizado .....	7
3.4. Propiedades físicas y químicas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) .....	8
3.5. Origen y distribución de HAP en el medio ambiente .....	9
3.6. Impactos ambientales de los hidrocarburos .....	9
3.7. Efectos de los hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de los suelos .....	10
3.8. Bacterias degradadoras de hidrocarburos .....	12
3.9. Factores que afectan a la degradación petroquímica .....	13

3.10. Biorremediación.....	14
3.10.1. Biorremediación <i>in situ</i> .....	15
3.10.2. Biorremediación <i>ex situ</i> .....	16
3.10.3. Tecnologías utilizadas en la biorremediación de los hidrocarburos del petróleo .....	17
3.10.4. Atenuación natural .....	18
3.10.5. Bioestimulación .....	20
3.10.6. Bioaumentación .....	21
3.11. Surfactantes.....	22
3.12. Biosurfactantes.....	24
3.13. Clasificación de los biosurfactantes.....	24
3.14. Microorganismos productores de biosurfactantes .....	27
3.15. Papel fisiológico de los biosurfactantes en los microorganismos.....	27
3.16. Fitorremediación .....	29
3.17. Origen, distribución, características botánicas, agronómicas y usos de <i>Clitoria ternatea</i> .....	31
3.18. Discusión general de la revisión bibliográfica y planteamiento del problema .....	32
CAPÍTULO IV.....	34
CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE DIÉSEL POR BACTERIAS EMULSIFICANTES NATIVAS DE SUELOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO INTEMPERIZADO .....	34
Resumen.....	34
Abstract.....	35
4.1. INTRODUCCIÓN .....	36
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
4.2.1. Sitio de muestreo.....	38
4.2.2. Análisis microbiológico.....	38
4.2.3. Selección de cepas emulsificantes .....	39
4.2.4. Caracterización bioquímica de las cepas aisladas.....	41
4.2.5. Identificación molecular de las cepas seleccionadas .....	41



4.2.6. Prueba de biodegradación de diésel .....	42
4.2.7. Análisis estadístico.....	43
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	43
4.3.1. Poblaciones bacterianas .....	44
4.3.2. Caracterización, selección de cepas productoras de surfactantes y actividad bioquímica.....	46
4.3.3. Identificación de las cepas bacterianas productoras de biosurfactantes .....	49
4.3.4. Biodegradación de diésel por las cepas bacterianas. ....	49
4.4. CONCLUSIONES .....	52
CAPÍTULO V .....	54
5.1. INTRODUCCIÓN .....	56
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	58
5.2.1. Área de estudio y recolecta del suelo.....	58
5.2.2. Determinación de parámetros físicos y químicos del suelo.....	58
5.2.3. Análisis de hidrocarburos totales del petróleo .....	58
5.2.4. Material microbiológico.....	59
5.2.5. Preparación de los inóculos .....	59
5.2.6. Establecimiento del experimento e inoculación de las bacterias .....	59
5.2.7. Variables de crecimiento vegetal y eficiencia del fotosistema II .....	60
5.2.8. Diseño experimental y análisis estadístico .....	60
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	61
5.3.1. Propiedades físicas y químicas de los suelos .....	61
5.3.2 Crecimiento y eficiencia fotosintética del PSII de <i>Clitoria ternatea</i> .....	62
5.4. CONCLUSIONES .....	72
CAPÍTULO VI.....	73
EFFECTO DE BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN EN LA FITORREMEDIACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS INTemperizados DE LA VENTA TABASCO (MÉXICO).....	73
Resumen.....	73

Abstract.....	74
6.1. INTRODUCCIÓN.....	75
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	77
6.2.1. Recolecta de suelo y análisis de propiedades físicas y químicas .....	77
6.2.2. Preparación de los inóculos bacterianos .....	78
6.2.3. Fertilizantes inorgánicos y surfactantes Triton X-100 utilizados .....	79
6.2.4. Establecimiento del experimento e inoculación .....	80
6.2.5. Descripción de los tratamientos .....	80
6.2.6. Evaluación de variables de crecimiento, microbianas y degradación de hidrocarburos	80
6.2.7. Diseño experimental y análisis estadístico. ....	82
6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	82
6.3.1. Crecimiento y producción de biomasa de <i>Clitoria ternatea</i> .....	82
6.3.2. Poblaciones bacterianas hidrocarbonoclastas .....	88
6.3.3. Biodegradación de los hidrocarburos totales de petróleo intemperizado .....	88
6.4. CONCLUSIÓN.....	91
CAPÍTULO VII .....	92
DISCUSIÓN GENERAL DE RESULTADOS .....	92
CAPÍTULO VIII.....	96
CONCLUSIONES GENERALES.....	96
LITERATURA CITADA .....	98

## LISTA DE FIGURAS

	Pags.
<b>Figura 3.1.</b> Composición químicas del petróleo crudo.....	7
<b>Figura 3.2.</b> Estructura general de un biosurfactante y su capacidad para formar una micela y micelas inversas.....	23
<b>Figura 3.3.</b> Estructuras de los principales glicolípidos. a) mono- y dirramnolípidos b) estructura general de un trehalolípidos, y c) soforolípidos en equilibrio con su forma de lactona.....	24
<b>Figura 3.4.</b> Estructura de los tres principales lipopéptidos con actividad biosurfactante. a) gramicidina s; b) polimixina b; c) surfactina.....	26
<b>Figura 4.1.</b> Comportamiento de la población de bacterias totales (BT) (A), bacterias lipolíticas, (Blipol) (B) y bacterias solubilizadoras de fósforo (Bsolp) (C), y cuantificadas en suelos con diferente concentración de petróleo intemperizado (50 000 y 150 00 mg k <sup>-1</sup> de HTPI). Las barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05), n.=4.....	45
<b>Figura 4.2.</b> . Poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (BFN) (A), bacterias hidrocarbonoclastas (BFND) (B), y cuantificadas en suelos con diferente concentración de petróleo intemperizado (50000 y 15000 mg kg <sup>-1</sup> HTPI) (C). Las barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05), n = 4.....	48
<b>Figura 4.3.</b> Índice de emulsificación (E24%) (A), hidrofobicidad de la superficie celular a las 48 h (B), y (C) porcentaje de degradación de diésel. <i>Citrobacter freundii</i> (C4S3), <i>Raoultella ornithinolytica</i> (C5S3), <i>Serratia marcescens</i> (C11S1), <i>Serratia marcescens</i> (C7S3), <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (C10S1), <i>Stenotrophomonas pavanii</i> (C5S3F), y el consorcio bacteriano (Cs) en un periodo de 8 días. Barras±error estándar; n = 4.....	51
<b>Figura 5.1.</b> Altura de <i>Clitoria ternatea</i> crecidas en tres suelos con concentraciones de HTPI de la venta Tabasco (A) (n= 24), inoculación bacteriana (B) (, n = 9), e interacción de los HTPI x inoculación bacteriana (C) (n = 3),	

después de 30 días. Medias  $\pm$  error estándar, n=3. Barras con diferentes asteriscos son estadísticamente diferentes (LSD,  $P \leq 0.05$ ). Abreviaturas: *Serratia marcescens* C11S1 (Sm), *Citrobacter freudii* C4S3 (Cfr), *Serratia marcescens* C7S3 (Sm2), *Rutella ornitholyticam* C5S3 (Ro), *Stenotrophomonas pavanii* C5S3F (Spa), *Stenotrophomonas maltophilia* C10S1 (Sml), Cs = consorcio..... 63

**Figura 5.2.** Biomasa seca radical, aérea y total de *Clitoria ternatea* crecidas en tres suelos con concentraciones de HTPI de la venta Tabasco (A, D y G) (n = 24), inoculación bacteriana (B, E y H) (n = 9), e interacción de los HTPI x inoculación bacteriana (C, F y I) (n =3), después de 30 días. Medias  $\pm$  error estándar, n=3. Barras con diferentes asteriscos son estadísticamente diferentes (LSD,  $P \leq 0.05$ ). Abreviaturas: *Serratia marcescens* C11S1 (Sm), *Citrobacter freudii* C4S3 (Cfr), *Serratia marcescens* C7S3 (Sm2), *Rutella ornitholyticam* C5S3 (Ro), *Stenotrophomonas pavanii* C5S3F (Spa), *Stenotrophomonas maltophilia* C10S1 (Sml), Cs = consorcio ..... 65

**Figura 5.3.** Área foliar y área foliar específica de *Clitoria ternatea* crecidas en tres suelos con concentraciones de HTPI de la venta Tabasco (A y D) (n = 24), inoculación bacteriana (B y E) (n = 9), e interacción de los HTPI x inoculación bacteriana (C y F) (n =3), después de 30 días. Medias  $\pm$  error estándar, n=3. Barras con diferentes asteriscos son estadísticamente diferentes (LSD,  $P \leq 0.05$ ). Abreviaturas: *Serratia marcescens* C11S1 (Sm), *Citrobacter freudii* C4S3 (Cfr), *Serratia marcescens* C7S3 (Sm2), *Rutella ornitholyticam* C5S3 (Ro), *Stenotrophomonas pavanii* C5S3F (Spa), *Stenotrophomonas maltophilia* C10S1 (Sm), Cs = consorcio..... 68

**Figura 5.4.** Valores de Fv/Fm de plantas de *Clitoria ternatea* crecidas en tres suelos con concentraciones de HTPI de la Venta Tabasco (A), inoculación bacteriana (B), e interacción de los HTPI x Inoculación bacteriana (C), después de 30 días ..... 71

- Figura 6.1.** Altura de plantas de *Clitoria ternatea*, crecidas en suelo contaminado con HTPI (39000 mg kg<sup>-1</sup>), después de 72 días. Abreviaturas: T = Testigo con planta; Cs =Consortio bacteriano; F = Fertilizante (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> Baker<sup>®</sup> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck<sup>®</sup>); TX = Tritón X-100 (100 mg kg<sup>-1</sup>). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (LSD,  $\alpha$  =0.05). Promedio  $\pm$  error estándar, n = 4 ..... 83
- Figura 6.2.** Biomasa seca aérea, radical y total de plantas de *Clitoria ternatea*, crecidas en suelos contaminados con HTPI (39000 mg kg<sup>-1</sup>), después de 72 días. Abreviaturas: T= Testigo con planta; Cs =Consortio bacteriano; F = Fertilizante (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> Baker<sup>®</sup> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck<sup>®</sup>); TX = Tritón X-100 (100 mg kg<sup>-1</sup>). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (LSD,  $\alpha$  =0.05). Promedio  $\pm$  error estándar, n = 4 ..... 84
- Figura 6.3.** Aérea foliar y aérea foliar específica de *Clitoria ternatea*, crecidas en suelo contaminado con HTPI (39000 mg kg<sup>-1</sup>), después de 72 días. Abreviaturas: T= Testigo con planta; Cs =Consortio bacteriano; F = Fertilizante (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> Baker<sup>®</sup> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck<sup>®</sup>); TX = Tritón X-100 (100 mg kg<sup>-1</sup>). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (LSD,  $\alpha$  =0.05). Promedio  $\pm$  error estándar, n = 4 ..... 87
- Figura 6.4.** Poblaciones bacterianas hidrocarbonoclastas y porcentaje de degradación de HTPI en presencia de *Clitoria ternatea*, crecidas en suelos contaminados (39,000 mg HTPI kg<sup>-1</sup>), después de 72 días. Abreviaturas: T= Testigo con planta; Cs =Consortio bacteriano; F = Fertilizante (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> Baker<sup>®</sup> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck<sup>®</sup>); TX = Tritón X-100 (100 mg kg<sup>-1</sup>). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (LSD,  $\alpha$  =0.05). Promedio  $\pm$  error estándar, n = 4 ..... 89

## LISTA DE CUADROS

Pags.

<b>Cuadro 3.1.</b> Características físicoquímicas y carcinogénicas de los 17 hidrocarburos aromáticos policíclicos considerados contaminantes prioritarios seguna la USEPA (Agencia de Proteccinón al medio Ambienta) y la IARC (Agencia internacional para la investigación del cáncer) (Berthe-Corti <i>et al.</i> , 2007; Okere y Semple., 2012).....	11
<b>Cuadro 3.2.</b> Factores que determinan la degradación de hidrocarburos del petróleo por los microorganismos del suelo (Martin <i>et al.</i> , 2014).....	14
<b>Cuadro 3.3.</b> Tratamientos in situ más comunes (Sherma, 2012).....	17
<b>Cuadro 3.4.</b> Características de los principales tratamientos de acuerdo al sitio de biorremediación (Kumar <i>et al.</i> , 2011).....	19
<b>Cuadro 3.5.</b> Algunos de los principales biotensoactivos y sus microorganismos productores (Saharan <i>et al.</i> , 2011).....	28
<b>Cuadro 4.1.</b> Identificación, actividad bioquímica y biosurfactante de bacterias aisladas de la Venta, Tabasco México.....	53
<b>Cuadro 5.1.</b> Características físicas y químicas de los tres suelos en estudio.....	62
<b>Cuadro 6.1.</b> Descripción de los tratamientos utilizados en el presente experimento.....	81

## GLOSARIO

**Hidrocarburos.** Son compuestos de origen orgánico, más densos que el agua, se extraen de la superficie terrestre siendo sus proporciones de carbono, hidrogeno, oxígeno, azufre y algunos metales diferentes.

**Hidrocarburos saturados.** son aquellos que no poseen dobles enlaces. Se dividen en función de su estructura química en alcanos o parafinas y cicloalcanos o naftalenos.

**Hidrocarburos aromáticos.** Son aquellos que poseen uno o más anillos aromáticos, y pueden estar sustituidos, o no, por radicales alquilo.

**Resinas y asfaltenos.** Son compuestos en general de alto peso molecular que además de carbono e hidrógeno, contienen trazas de oxígeno, nitrógeno y azufre.

**Petróleo intemperizado.** Es un petróleo crudo sometido a procesos de meteorización e intemperismo en la superficie del suelo cuando ocurre el derrame

**Suelo.** Se define como aquel material no consolidado compuesto por partículas inorgánicas, materia orgánica, agua, aire y organismos, que comprende desde la capa superior de la superficie terrestre hasta diferentes niveles de profundidad

**Suelo contaminado.** Es aquel en el cual se encuentran presentes hidrocarburos o materiales extraños que por sus cantidades y características afectan la naturaleza del suelo.

**Xenobiótico.** Producto totalmente sintético que no se da en la naturaleza.

**Remediación.** Es la acción de remediar o estar trabajando en el sitio.

**Biorremediación.** Describe una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos.

**Surfactantes.** Son moléculas que tiene una doble afinidad debido a que tienen una cabeza hidrofílica (polar) y una cola hidrofóbica (no polar).

**Biosurfactante.** Agente de superficie o surfactante producido por microorganismos, molécula anfifílica compuesta por un grupo químico hidrofílico y uno hidrofóbico, que tiende a formar agregados estables (micelas) en soluciones arriba de su concentración crítica.

**Emulsión.** Dispersión coloidal de partículas líquidas en otro líquido.

**Concentración Micelar Crítica (CMC).** Es la concentración de soluto a la cual las micelas se empiezan a formar.

**Microorganismo.** Organismo microscópico constituido por una sola célula o varias, incluyendo los virus.

**Bacterias.** Procariotas relacionados filogenéticamente, pertenecientes al dominio *Bacteria* y distintos al dominio *Archaea*.

**Rizosfera.** Porción o capa fina del suelo que se encuentra adherida a la raíz de la planta, es la zona de suelo donde los exudados radicales se depositan y pueden estimular, inhibir y/o afectar la actividad de los microorganismos

**Bioaugmentación.** Adición de microorganismos no autóctonos del sitio, nutrientes y/o aceptores de electrones para optimizar la actividad microbiana.

**Biodegradación.** Rompimiento de la estructura de los contaminantes debida a la actividad microbiana.

**Biodisponibilidad.** Accesibilidad de un nutriente por un organismo capaz de transportar el sustrato a través de la membrana o por enzimas extracelulares.

**Bioestimulación.** Aumento de la actividad de los microorganismos autóctonos mediante la adición de nutrientes y/o aceptores de electrones.



# CAPÍTULO I.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El petróleo es una de las fuentes de energía más importantes y de materia prima de la industria química (Silva *et al.*, 2014). El mundo depende del petróleo, y su uso como combustible ha llevado al desarrollo económico intensivo de muchos países (Pérez-Hernández *et al.*, 2013); sin embargo, el crecimiento a gran escala de la industria del petróleo ha dado como resultado el aumento de la contaminación del suelo, del agua y del aire (Masciandaro *et al.*, 2013). La presencia de los hidrocarburos del petróleo en el suelo se debe prácticamente a los derrames accidentales o intencionales del petróleo crudo y sus productos derivados, durante las actividades de extracción, transporte, almacenamiento, refinación y distribución (Pinedo *et al.*, 2013). Los derrames de petróleo, independientemente de su causa, representan una seria amenaza para los ecosistemas terrestres y marinos; además, algunas de las fracciones de los hidrocarburos pueden ser mutagénicos y carcinogénicos para el ser humano (Kulkarni *et al.*, 2012; Maletić *et al.*, 2012; Gill *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014). Para hacer frente a la contaminación por hidrocarburos, varios métodos (biológicos, fisicoquímicos y térmicos) de remediación han sido desarrollados (Volke y Velasco, 2002). Uno de los mejores enfoques para la restauración de suelos contaminados es hacer uso de microorganismos capaces de degradar compuestos tóxicos mediante procesos de biorremediación (Bento *et al.*, 2005).

La biorremediación es un enfoque atractivo para la limpieza de los hidrocarburos del petróleo, ya que es fácil de mantener, y es aplicable sobre grandes áreas; además, es rentable y se considera como un método eficaz y amigable con el ambiente (Xu *et al.*, 2014). Las técnicas de biorremediación, incluyen la atenuación natural, la bioestimulación y la bioaugmentación, las cuales han ganado recientemente la atención por su capacidad para eliminar los hidrocarburos del petróleo, debido a su simplicidad y rentabilidad (Jorfi *et al.*, 2013; Tahri *et al.*, 2013; Pimmata *et al.*, 2013;

Pontes *et al.*, 2013). La atenuación natural generalmente implica la eliminación o degradación de los contaminantes de forma natural por los microorganismos autóctonos u otros procesos naturales (absorción, dispersión, dilución, y volatilización) (Pimmata *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2014; Shahsavari *et al.*, 2015). La bioaumentación implica la adición de microorganismos que tienen la capacidad de crecer, metabolizar, y utilizar los contaminantes como fuentes de carbono (Sheppard *et al.*, 2014). La bioestimulación consiste en la adición de fertilizantes inorgánicos (principalmente nitrógeno y fósforo) y orgánicos, para estimular el crecimiento de microorganismos autóctonos degradadores de petróleo y aumentar así, la biodegradación (Abed *et al.*, 2014a). Estudios previos (Silva-Castro *et al.*, 2012; Cerqueira *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2013; Silva-castro *et al.*, 2015) han demostrado que la atenuación natural, la bioaumentación, y la bioestimulación mejoran la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo. Sin embargo, hay casos en que la bioaumentación ha fallado, porque los microorganismos exógenos no son capaces de competir con aquellos autóctonos (Cerqueira *et al.*, 2011). Por otra parte la biodegradación de los hidrocarburos es compleja, y por lo general requiere de diferentes especies o consorcios microbianos, ya que un solo microorganismo puede tener un rango degradativo muy corto (Mukherjee y Bordoloi, 2011; Hassanshahian *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2014). Por lo tanto, es recomendable utilizar un conjunto de poblaciones o consorcios de microorganismos con amplias capacidades enzimáticas y metabólicas que permitan acelerar y aumentar la degradación de los hidrocarburos del petróleo (Mukherjee y Das, 2005; Aleer *et al.*, 2014). Algunos géneros bacterianos muestran una amplia gama de mecanismos metabólicos en la degradación de los compuestos del petróleo, que incluyen la producción de agentes surfactantes y emulsificantes, que conducen a la mayor solubilización de los compuestos hidrófobos, para que sean utilizados como co-sustrato, o como fuente de carbono de fácil asimilación para otros microorganismos (Bento *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2011; Chandankere *et al.*, 2014). Los biosurfactantes son un grupo de moléculas y metabolitos secundarios de superficie activa producidas por una variedad de microorganismos, especialmente

por bacterias que degradan hidrocarburos (Campos *et al.*, 2014; Rao *et al.*, 2014). Estos compuestos son moléculas que afectan la tensión superficial e interfacial, además, los biosurfactantes tienen innumerables ventajas en comparación con los surfactantes químicos, especialmente en términos de solubilización, emulsificación, biodegradabilidad, baja toxicidad, y compatibilidad con el ambiente. Además, pueden conservar sus propiedades fisicoquímicas en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Nalini y Parthasarathi, 2013; Souza *et al.*, 2014; Chandankere *et al.*, 2014). Hassanshahian *et al.* (2014) concluyen que *Corynebacterium* cepa PG-Z, evidencio una relación directa entre la degradación y la capacidad de emulsionar los hidrocarburos. Por su parte Ibrahim *et al.* (2013) identificaron siete especies de bacterias con potencial para degradar petróleo crudo, destacando entre ellas *Serratia marcescens* por su capacidad de producir un lipopéptido, con altos valores de emulsificación, a diferentes pH, temperatura y salinidad, mostrando valores significativos de degradación de hidrocarburos de petróleo del 70 al 90%. El biosurfactante producido por *Bacillus subtilis* B30 (lipopéptido) aumentó la degradación de petróleo crudo (Al-Wahaibi *et al.*, 2014). Reportes recientes han indicado que la interacción planta-bacteria tiene un alto potencial de mineralización de los compuestos orgánicos (Afzal *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2013; Fester *et al.*, 2014). Por lo antes expuesto, el objetivo general de esta investigación consistió en aislar bacterias emulsificantes y degradadoras de diésel a partir de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos del petróleo intemperizado para usarlas en procesos de biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleo intemperizado mediante la adición de un consorcio microbiano (bioaumentación), y la adición combinada de fertilizantes inorgánicos (bioestimulación), y un surfactante químico en presencia *Clitoria ternatea* (Fabaceae).

## CAPÍTULO II.

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 2.1. Objetivo general

Evaluar la efectividad de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo intemperizado mediante la adición de un consorcio microbiano (bioaumentación), la adición combinada de fertilizantes inorgánicos (bioestimulación), y un surfactante en presencia de *Clitoria ternatea*.

#### 2.2. Objetivos específicos

- Identificar bacterias emulsificantes y evaluar su capacidad degradadora de hidrocarburos, nativas de suelos crónicamente contaminado con hidrocarburos del petróleo intemperizado.
- Evaluar la fitotoxicidad de un Gleysol contaminado con petróleo intemperizado en el crecimiento de *Clitoria ternatea*, y el efecto de la inoculación de bacterias emulsificantes en la atenuación de la toxicidad de los suelos en estudio.
- Evaluar el efecto de la bioestimulación y bioaumentación en la biorremediación y fitorremediación de suelos contaminados crónicamente con hidrocarburos intemperizados, en presencia de *Clitoria ternatea*.

### **2.3. Hipótesis general**

La bioestimulación y la bioaumentación favorecen la biorremediación y fitorremediación de suelos crónicamente contaminados con petróleo intemperizados, en presencia de *Clitoria ternatea*.

### **2.4. Hipótesis particulares**

- Los suelos contaminados crónicamente con hidrocarburos intemperizados estimulan el crecimiento de bacterias emulsificantes y degradadoras de hidrocarburos.
- Las cepas bacterianas emulsificantes favorecen el desarrollo de *Clitoria ternatea* L. en suelos crónicamente contaminado con petróleo intemperizados.
- La biorremediación y la fitorremediación de suelos contaminados crónicamente con hidrocarburos intemperizados en presencia de *Clitoria ternatea* L. aumenta o mejora mediante la interacción de la bioestimulación y la bioaumentación.

## CAPÍTULO III.

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. El petróleo

El petróleo procede del latín *petroleum* (*petra*-piedra y *oleum*-aceite), significa aceite de piedra, constituido de carbono (76 a 86 %) e hidrógeno, oxígeno, azufre y nitrógeno (10 a 14 %); además, contiene trazas de metales pesados como hierro, níquel, vanadio, aluminio y cobre, que son considerados impurezas (PEMEX, 1988). El petróleo es un complejo conjunto de compuestos químicos que se encuentran en el subsuelo impregnado en formaciones de tipo arenosa y calcárea, en el que coexisten las fases sólidas, líquidas y gaseosas en condiciones de temperatura y presión elevadas. El color del petróleo varía entre ámbar y negro, con una densidad de 0.75 a 1.01 g $\text{mL}^{-1}$  menor que la del agua (999.97 kg/m $^3$ ) (Roussak y Gesser, 2013). Además, no presenta olor, color y es insípido en estado gaseoso (PEMEX, 1988).

#### 3.2. Petróleo crudo

El petróleo es una mezcla heterogénea, cuya diversidad de componentes hace difícil que se encuentren dos tipos idénticos. En numerosas ocasiones se utiliza la palabra crudo para denominar al petróleo sin refinar (Kulkarni *et al.*, 2012). El petróleo crudo natural, es una mezcla compleja que contiene diversos compuestos químicos, agrupados principalmente en cuatro grupos: a) saturados (alcanos o parafinas y cicloalcanos o naftalenos), b) aromáticos, c) resinas, y d) asfaltenos, con fracciones de nitrógeno, azufre, y compuestos que contienen oxígeno (Maletić *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014). La fracción alifática incluye alcanos lineales o de cadena ramificada y cicloparafinas. Los alcanos, a partir del pentano (C $_5$ H $_{12}$ ), y octano (C $_8$ H $_{18}$ ), son destilados de la gasolina, mientras que el nonano (C $_9$ H $_{20}$ ), y el hexadecano (C $_{16}$ H $_{34}$ ) en el diésel y el queroseno (Kulkarni *et al.*, 2012; Maletić *et al.*, 2013). La fracción aromática de los hidrocarburos aromáticos

políciclicos (HAP) está compuesta por estructuras polinucleares/cíclicas y cadenas laterales fusionadas en cicloparafinas. Las resinas están constituidas por compuestos piridinicos, quinolinas, tiofenos, carbazoles, sulfóxidos y aminas y la estructura de los asfaltenos incluyen los agregados de poli aromáticos, fenoles, ácidos grasos, o porfirinas (Leahy y Colwel, 1990; Uribe-Alvarez *et al.*, 2011) (Figura 3.1).

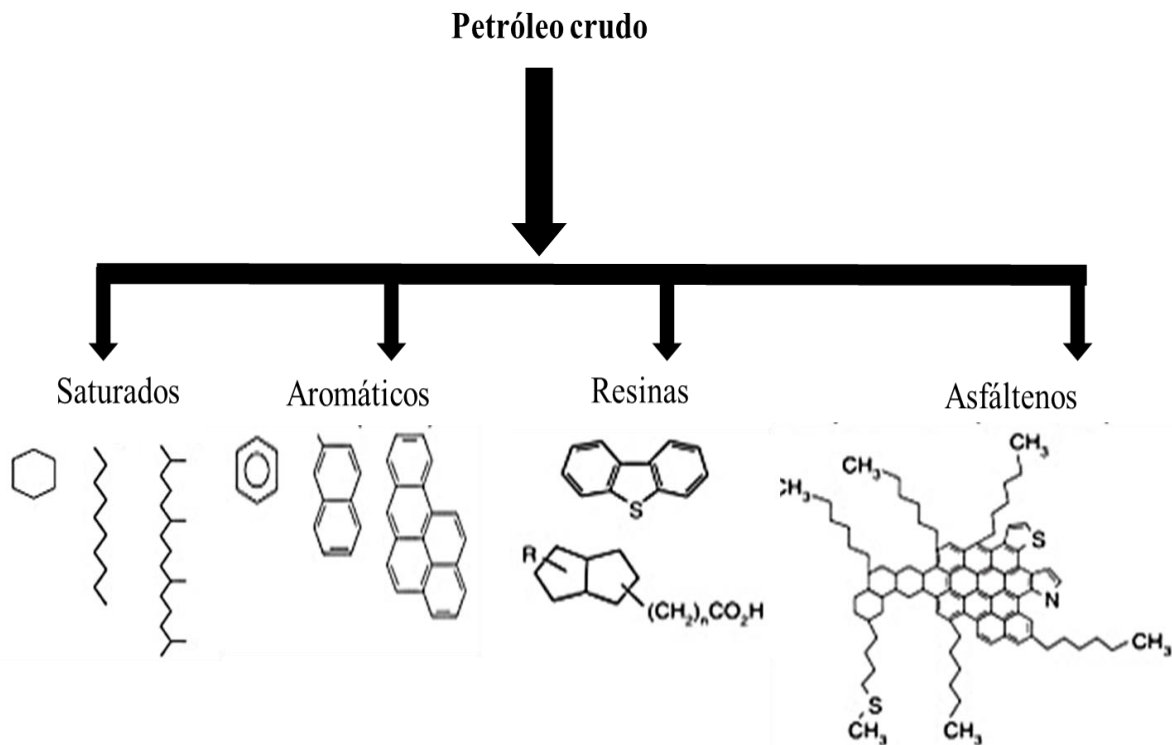


Figura 3.1. Composición químicas del petróleo crudo (Chrisman *at al.*, 2012).

### 3.3. Petróleo intemperizado

El petróleo intemperizado es aquél que ha estado expuesto a las condiciones ambientales en la superficie del suelo por cierto tiempo para que los hidrocarburos de fracción más ligera se eliminen del suelo, por procesos naturales como volatilización, mineralización (transformación a CO<sub>2</sub> y agua), y biodegradación de componentes simples (Botello, 1996). Sin embargo, aquellos

hidrocarburos de fracción pesada o con anillos aromáticos abundantes como los HAP, permanecen y se vuelven recalcitrantes, por ejemplo las fracciones de base aromática de C<sub>60</sub> a C<sub>66</sub> (Botello, 1996).

Atlas *et al.* (1981a) definen al petróleo intemperizado como una mezcla compleja no resuelta que origina una curva cuya área incrementa con el grado de intemperismo. Por otra parte, Bohem y Fiest (1982) mencionan que la proporción de alcanos normales (n-alcanos) y isoprenoides (hidrocarburo de cinco átomos de carbono como el isopreno 2-metil-1,3-butadieno), es mayor que 1, y decrece con la biodegradación a valores igual a 1 o cercano a la unidad; por lo tanto, el pristano, el fitano y el farnesano se presentan como los hidrocarburos saturados dominantes en el petróleo intemperizado (Atlas *et al.*, 1981a). El colestano (C<sub>27</sub>) y los triterpenos pentacíclicos al ser relativamente resistentes a la degradación se transforman en compuestos únicos como indicadores de petróleo intemperizado (Albaigés y Albrecht, 1979; Dastillung y Albrecht, 1979; Boehm y Fiest, 1982), los compuestos aromáticos (HAP, por ejemplo) y asfaltenos son predominantes y más persistentes en los suelos (Rubio-Clemente *et al.*, 2014).

### **3.4. Propiedades físicas y químicas de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)**

Los HAP constituyen un grupo de más de 100 compuestos orgánicos de dos o más anillos aromáticos fusionados, en una disposición lineal o agrupados (Wang *et al.*, 2013; Ngo *et al.*, 2014); por lo general, sólo contienen carbono (C) e hidrógeno (H), aunque el nitrógeno (N), azufre (S), y oxígeno (O) pueden sustituir fácilmente en el anillo de benceno para formar compuestos aromáticos heterocíclicos (Jorfi *et al.*, 2013; Biache *et al.*, 2014). Las características físicas y químicas más importantes que condicionan el comportamiento de los HAP en el ambiente son la alta hidrofobicidad, recalcitrancia y estabilidad química por lo cual son más perdurables y menos biodisponibles en el ambiente (Rubio-Clemente *et al.*, 2014; Cofield *et al.*, 2008). La



hidrofobicidad y la estabilidad química aumentan sí el peso molecular y el número de anillos de benceno incrementan en los HAP (Wilson y Jones, 1993). Su coeficiente de partición octanol/agua ( $K_{ow}$ ) es alto lo que hace que los HPA se adsorban en tejidos grasos, suelo y sedimentos; además, les confiere menos labilidad a procesos de degradación y biodisponibilidad (Cofield *et al.*, 2008; Tahri *et al.*, 2013).

### **3.5. Origen y distribución de HAP en el medio ambiente**

Los HAP son formados principalmente por procesos de combustión incompleta de materiales orgánicos como la combustión de biomasa, las emisiones vehiculares, los procesos industriales, etc. Además, se encuentran formando parte de compuestos mono y policíclicos, así como de otras substancias más complejas como la lignina (Dave *et al.*, 2014). Así mismo, los HAP son contaminantes orgánicos persistentes, debido a su estabilidad química y resistencia a la biodegradación (Viet *et al.*, 2014; Rubio-Clemente *et al.*, 2014). Por estas razones, los HAP son de importancia ambiental, ya que algunos de ellos son tóxicos, mutagénicos y en algunos casos cancerígenos para los sistemas vivos (humanos, animales, y plantas), de acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental del Medio Ambiente (EPA por sus siglas en inglés), la Organización mundial de la Salud (OMS) y la Comunidad Económica Europea (CEE); además, la mayoría de los HAP pueden bioacumularse en la cadena alimenticia (Dave *et al.*, 2014). Además 17 de los HAP tienen potencial genotóxico, es decir se unen al ADN causando mutaciones en el organismo. Por ello, los HAP están ubicados como principales contaminantes según la USEPA (Cuadro 3.1).

### **3.6. Impactos ambientales de los hidrocarburos**

Las actividades como la extracción, el transporte, el procesamiento y el almacenamiento de petróleo y sus derivados, en algunos casos con llevan a la contaminación del ambiente de forma accidental o de forma deliberada, cuando tanques, oleoductos y diversas instalaciones sufren daños

(Díaz-Ramírez *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2012; Maletić *et al.*, 2013). Los líquidos migran hacia el suelo, subsuelo (zona vadosa) y hacia el agua subterránea (zona saturada-acuífero) o en la superficie del agua (Adams *et al.*, 2011). Según Bachu (2008), la migración de estos compuestos está regulada por la formación de cuatro fases distintas, conocidas como a) fase líquida residual, b) fase adsorbida, c) fase líquida, y d) fase disuelta. El proceso de transporte y movilidad de los HAP en los suelos está gobernado por una variedad de parámetros, incluyendo las propiedades de los HAP (densidad, viscosidad, solubilidad, presión de vapor, volatilidad, y tensión interfacial), las características del suelo en el que se desplazan (fuerza o presión capilar, distribución del tamaño de poros y contenido inicial en humedad, estructura geológica de los estratos, y velocidad del agua subterránea), y las funciones dependientes de la saturación (saturación residual y permeabilidad relativa). También se agregan aquellas vías preferentes de migración, como fracturas o canales de disolución de importancia en el movimiento de los HAP en el subsuelo, favoreciendo la contaminación de la capa freática (Scheibye *et al.*, 2014; Ngo *et al.*, 2014; Pimmata *et al.*, 2013; Farhadian *et al.*, 2008).

### **3.7. Efectos de los hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de los suelos**

El suelo es uno de los compartimentos ambientales más vulnerables a los efectos de los derrames de los hidrocarburos del petróleo, debido a los cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas. Un efecto inmediato que causan los hidrocarburos, es la formación de una capa impermeable que reduce el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físicos y químicos simultáneos como la evaporación y filtración de los hidrocarburos al subsuelo, que dependiendo del hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida puede ser más o menos lento, ocasionando mayor toxicidad, además de tener una moderada

**Cuadro 3.1.** Características físicoquímicas y carcinogénicas de los 17 hidrocarburos aromáticos policíclicos considerados contaminantes prioritarios segun la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (USEPA, por sus siglas en inglés) y la IARC (Agencia internacional para la investigación del cáncer) (Berthe-Corti *et al.*,2007; Okere y Semple, 2012)

Hidrocarburos aromáticos policíclico	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Solubilidad en agua a 25 °C (mg l <sup>-1</sup> )	Coefficiente de partición Octanol/agua (K <sub>ow</sub> )	Grupo carcinogénico
Naftalina	128.17	32	3.37	NR
Acenaftileno	152.20	3.93	4.07	NR
Acenafteno	154.2	1.93	3.92	NR
Fluoreno	166.22	1.89	4.90	3
Antraceno	178.20	0.015	4.45	3
Fenantreno	178.24	1.20	4.55	3
Fluoranteno	202.26	0.20-0.26	4.90	3
Pireno	202.26	0.0077	4.88	3
Benzo[ <i>a</i> ]antraceno	228.29	0.010	5.61	2A
Criseno	228.29	0.0028	5.16	3
Benzo[ <i>b</i> ]fluoranteno	252.32	$0.0013 \times 10^{-7}$	6.04	2B
Benzo[ <i>k</i> ]fluoranteno	252.32	-	6.11	2B
Benzo[ <i>a</i> ]pireno	252.32	0.0023	6.06	2A
Benzo[ <i>g, h, i</i> ]perileno	276.34	0.00026	6.50	3
Indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pireno	276.24	0.062	6.58	2B
Dibenzo[ <i>a, h</i> ]antraceno	278.35	$0.0005 \times 10^{-10}$	6.84	2A

Grupo carcinogénico según Clasificación IARC 2010: <https://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>. carcinogénico para los humanos, (2A), probablemente carcinogénicos para los humanos, (2B), posiblemente cancerígeno para los seres humanos, (3) no es clasificable en cuanto a carcinogenicidad en seres humanos, (4) probablemente no carcinogénico para los seres humanos. (NR), No reportado.

alta o extrema salinidad, dificultando su tratamiento (Ortínez *et al.*, 2003; Benavides *et al.*, 2006; Trujillo *et al.*, 2014). Además, se produce un desequilibrio en la disponibilidad de los nutrientes, particularmente el nitrógeno (N) y el fósforo (P), debido al aumento de la relación C:N y C:P que resultan en la inmovilización del N y el P por los microorganismos del suelo, agotando su disponibilidad (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2013; Ngo *et al.*, 2014). Al respecto, Zamora *et al.* (2012) encontraron una disminución del pH, de la conductividad eléctrica y de la capacidad de intercambio catiónico, así como el incremento en el porcentaje de saturación de bases en un suelo

franco arenoso contaminado con hidrocarburos del petróleo. Por último, las propiedades biológicas afectadas se relacionan con la inhibición de la actividad microbiana (bacterias, hongos), daño en las plantas y en los animales que viven dentro o sobre el suelo (Rivera-Cruz *et al.*, 2006), provocando la disminución de poblaciones microbianas importantes para la asimilación y el reciclaje de nutrientes (Vázquez-Luna *et al.*, 2010; Méndez *et al.*, 2011). La magnitud de la alteración del suelo dependerá de la cantidad, la composición del hidrocarburo, del tiempo y frecuencia de exposición, y de las características físicas del sitio donde ocurrió el derrame (Bustos, 2012).

### **3.8. Bacterias degradadoras de hidrocarburos**

El término biodegradación se define como el cambio en la estructura química de un compuesto llevado a cabo por los microorganismos (Meletic *et al.*, 2013). Por lo que la biodegradación es uno de los principales mecanismos por el cual los hidrocarburos del petróleo son eliminados del ambiente (Tahri *et al.*, 2013).

La importancia de la biodegradación en la eliminación de los contaminantes, se debe principalmente a que diversos compuestos orgánicos como los hidrocarburos del petróleo, los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno), y los HAP pueden ser eliminados o degradados por microorganismos, en sustancias no peligrosas y menos dañinas, que luego se integran en los ciclos biogeoquímicos naturales (Meletic *et al.*, 2013; Díaz *et al.*, 2013; Tejeda-Agredano *et al.*, 2014).

En la actualidad se realizan esfuerzos con el fin de aislar nuevos microorganismos que pueden degradar diferentes compuestos recalcitrantes tales como los HAP. Así mismo, es importante entender las complejas interacciones entre los microorganismos degradantes y los factores que limitan o promueven el proceso de biodegradación, por ejemplo, el tipo de contaminante, la

biodisponibilidad, toxicidad, temperatura y los nutrientes (Cerniglia, 1993, González-Paredes *et al.*, 2013; Zohra *et al.*, 2014). Las bacterias más utilizadas en procesos de biorremediación son *Pseudomonas*, *Mycobacter*, *Haemophilus*, *Rhodococcus*, *Paenibacillus*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Chrobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Modococi*, *Streptomyces*, *Bacillos*, *Arthrobacter*, *Aeromonas*, *Ralstonia*, *Caligenes*, *Neptunomonas*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Cycloclasticus*, *Staphylococcus*, *Burkholderia*, *Agmenellum*, y *Micrococcus* (Farhadian *et al.*, 2008; Thapa *et al.*, 2013; Zohra *et al.*, 2014). Estas bacterias degradan hidrocarburos derivados del petróleo e hidrocarburos aromáticos como benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (*Pseudomonas*, *Rhodococcus* y *Ralstonia*), así como HAP como naftaleno (*Pseudomonas*), fenantreno (*Pseudomonas* y *Haemophilus*), antraceno (*Rhodococcus*), pireno y el benzo[a]pireno altamente cancerígeno (*Haemophilus* y *Mycobacterium*) (Tyagi *et al.*, 2011). La biodegradación de hidrocarburos pueden ocurrir bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas; sin embargo, la degradación aeróbica suele proceder con mayor rapidez y se considera que es más efectiva que la vía anaeróbica (Kulkarni *et al.*, 2013).

### **3.9. Factores que afectan a la degradación petroquímica**

Hay una variedad de factores responsables de mantener o aumentar la actividad microbiana del suelo, que son determinantes en la biodegradación de los hidrocarburos de petróleo (Cuadro 3.2). En general, la biodegradación de los hidrocarburos disminuye al aumentar el peso molecular y la hidrofobicidad (Greenwood *et al.*, 2008).

**Cuadro 3.2.** Factores que determinan la degradación de hidrocarburos de petróleo por los microorganismos del suelo (Martin *et al.*, 2014).

Factor	Condiciones óptimas para la degradación de hidrocarburos de petróleo vía microbiana
Oxígeno	> 0.2 mg L <sup>-1</sup> de oxígeno disuelto; > 10% de espacio poroso
Capacidad de retención de agua	20-80% de porosidad lleno de agua
Macronutrientes	C: N: P = 120: 1 relación molar para el crecimiento microbiano: 10
pH	5.5 – 9.0
Temperatura	20-30°C
Potencial Redox	Eh > 50 mV
Concentración de hidrocarburos	10.05% del peso seco de suelo

### 3.10. Biorremediación

La biorremediación es un proceso que utiliza los mecanismos bioquímicos y metabólicos de los microorganismos (bacterias, hongos y microalgas) o plantas para transformar, detoxificar, o mineralizar los contaminantes (Atlas, 1981a; Tahri *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2013; Songa *et al.*, 2014; Gomez y Sartaj, 2014). Aunque la biorremediación es vista como una tecnología nueva, los microorganismos han sido utilizados en forma rutinaria para el tratamiento y transformación de contaminantes en aguas residuales (Ferreira *et al.*, 2013). La capacidad de biodegradación de los microorganismos depende de las características físicas, y químicas del suelo, y de las características químicas del contaminante (Leahy y Cowell, 1990; Singh y Chandra, 2013).

En concreto, cuando se refiere a petróleo, la biorremediación es un proceso para acelerar la degradación normal de sus contaminantes, y con ello contrarrestar su daño ecológico (Atlas, 1995a).

Dado el alto número de compuestos que conforman al petróleo y su alta complejidad estructural,

la biodegradación del petróleo produce un incremento en la resistencia a una posterior biodegradación de los compuestos recalcitrantes (Ali *et al.*, 2012).

El petróleo crudo no llega nunca a degradarse completamente, y siempre deja residuos complejos. Sin embargo, estos residuos, que contienen principalmente asfaltenos, tienen muy baja toxicidad, y terminan convirtiéndose en residuos inertes sin efecto ecológico (Atlas, 1995b). Las principales estrategias que utiliza la biorremediación para optimizar la degradación de los hidrocarburos del petróleo son la atenuación natural, la bioestimulación y la bioaumentación, debido a su simplicidad y rentabilidad. La contaminación por hidrocarburos implica un riesgo humano y ecológico, cuya exposición puede generar mutaciones y efectos carcinogénicos, razones por las cuales se han investigado e implementado tecnologías en la remediación de suelos, que se pueden aplicar de forma *in situ* o *ex situ* (Cuadro 3.3) (Couto *et al.*, 2012; Aleer *et al.*, 2014; Hassanshahian *et al.*, 2014; Gill *et al.*, 2014).

### **3.10.1. Biorremediación *in situ***

La biorremediación *in situ* se realiza directamente en el sitio, y el proceso de degradación se acelera mediante la adición de oxígeno, receptores de electrones y nutrientes (nitrógeno y fósforo) que favorecen el cometabolismo de los contaminantes (Cuadro 3.3). Unas de las principales ventajas de la biorremediación *in situ* es que no requiere excavación del suelo contaminado, y por lo tanto resulta ser rentable, con escasa modificación del entorno y baja generación de residuos; su desventaja se relaciona con el bajo control de variables y la dilución de biomasa y nutrientes, y para evitar este problema se puede propiciar la inmovilización de biomasa (Kumar *et al.*, 2011; Sherma, 2012; Chowdhury *et al.*, 2012; Díaz-Martínez *et al.*, 2013).

### **3.10.2. Biorremediación *ex situ***

Los tratamientos *ex situ* se pueden clasificar en *on site* si se implementan en la zona contaminada, u *off site* si el material es removido a un sitio adyacente (Cuadro 3.4). Dependiendo del contaminante la biorremediación se pueden subdividir en sistemas de fase sólida y en sistemas de fase en suspensión. En los tratamientos *off site* se controlan todas las variables como el nivel oxígeno, la temperatura y los nutrientes; sin embargo, los elevados costos de transporte y de equipamiento hacen que este método sea menos usado que los tratamientos *in situ*.

Un ejemplo de esta estrategia son las biopilas que consisten en apilar el material contaminado en grandes pilas de hasta 4 metros de altura y proporcionar aire y nutrientes a la microbiota autóctona (Jorgensen *et al.*, 2000).

Los costos de las técnicas biológicas son más rentables económicamente que las técnicas físicoquímicas. Una limitación que presentan las técnicas biológicas respecto a las técnicas físicoquímicas es el tiempo necesario para alcanzar una biodegradación aceptable. Durante la biorremediación se produce una reducción de la biodegradación ya sea por enriquecimiento de componentes más recalcitrantes, o por limitada biodisponibilidad de los contaminantes (Alexander, 1999; Alexander, 2000).



**Cuadro 3.3.** Tratamientos *in situ* más comunes (Sherma, 2012).

Tipo	Proceso
Atenuación natural	Proceso natural de descontaminación sin alterar las condiciones del suelo.
Bioventilación aeróbica	Suelos con bajos niveles de oxígeno son tratados mediante la ventilación aire u oxígeno, para facilitar la biodegradación aeróbica de los contaminantes. Se podrían añadir otros aditivos, como nutrientes o surfactantes, en caso que se considere necesario. Muy similar al bioventilación aeróbico, pero añadiendo un sustrato orgánico apropiado.
Bioventilación-cometabólica Bioventilación anaeróbica	Se inyecta nitrógeno y un donador de electrones en lugar de aire, generando así condiciones anaeróbicas en el suelo.

### **3.10.3. Tecnologías utilizadas en la biorremediación de los hidrocarburos del petróleo**

La necesidad de remediar los diferentes nichos ecológicos, ha impulsado la creación de nuevas tecnologías orientados a la destoxificación y a la destrucción de los contaminantes a productos metabólicos inocuos (Abed *et al.*, 2014a; Hassanshahian *et al.*, 2014). Los métodos fisicoquímicos toman las ventajas de las propiedades físicas y químicas de los contaminantes con fin de promover la volatilización, la quema, la descomposicon o inmovilización de los contaminantes de un suelo; estos métodos convencionales pueden eliminar rápidamente los hidrocarburos, pero en la mayoría de los casos, la eliminación simplemente no ocurre y el comtaninante se transfiere de un medio a otro e incluso pueden ser más tóxicos que los contaminantes no tratados, además, de los altos costos (Zohra *et al.*, 2014; Dave *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014). El petróleo crudo no puede ser completamente eliminado con los métodos fisicoquímicos. Por ello, las técnicas de biodegradación

han recibido especial atención para limpiar los sitios contaminados, debido a su eficiencia, seguridad ambiental, y costos relativamente bajos (Zohra *et al.*, 2014).

Las tecnologías biológicas son eficientes y económicas cuando se compara con las alternativas físicas y químicas convencionales para el tratamiento de suelos (Ferreira *et al.*, 2013). La biorremediación se ha aplicado exitosamente para tratar diferentes derrames de petróleo en todo el mundo. Además, la biorremediación puede ser llevada a cabo naturalmente, o a través de la estimulación de las poblaciones microbianas autóctonas (bioestimulación) o de la introducción de consorcios microbianos degradadores de hidrocarburos del petróleo (bioaumentación) (Pontes *et al.*, 2013; Abed *et al.*, 2014b; Meyer *et al.*, 2014).

#### **3.10.4. Atenuación natural**

La atenuación natural (AN) es un enfoque de recuperación pasiva que depende de mecanismos naturales de advección, dispersión, absorción, y transformación bióticos y abióticos, para degradar y eliminar los contaminantes del suelo y las aguas subterráneas (Chiu *et al.*, 2013). En el caso de los sitios contaminados con hidrocarburos del petróleo, la biodegradación es el proceso natural más importante para la reducción de los contaminantes.

Algunos estudios han demostrado que la biorremediación *in situ*, es una alternativa rentable de remediación (Chiu *et al.*, 2013) sin embargo, estos resultados dependen de la presencia o ausencia de microorganismos degradadores, además, del oxígeno, nivel de nutrientes y de la biodisponibilidad de los contaminantes (Almeida *et al.*, 2012; Méndez *et al.*, 2011). Al respecto, Aloor *et al.* (2011) y Makadia *et al.* (2011) investigaron la eficiencia de la bioestimulación y bioaumentación respecto a la atenuación natural, la cual utilizó suelo previamente biorremediado, concluyendo que la atenuación natural con el suelo reutilizado representa una estrategia prometedora para la biorremediación de hidrocarburos petrogénicos, debido a que no

evendenciaron diferencias entre la bioaumentación y la bioestimulación. Por su parte, Erkelens *et al.* (2012) mencionan que el uso de suelos previamente biorremediados con

**Cuadro 3.4.** Características de los principales tratamientos de acuerdo a la sitio de biorremediación (Kumar *et al.*, 2011).

Proceso	
Atenuación natural	Se genera una capa de entre 30 y 40 cm de suelo contaminado para promocionar la degradación aeróbica de los contaminantes. Los suelos se airean periódicamente y se añade agua para controlar la humedad cuando sea necesario. En algunos casos, se puede suplementar con nutrientes o incluso moderar el pH del suelo.
Compostaje	Proceso biológicamente controlado, que trata contaminantes orgánicos usando microorganismos en condiciones termófilas (40-50°C). El suelo se excava y se mezcla con compuestos para aumentar su porosidad. La degradación de estos compuestos se efectúa en condiciones termofílicas.
Biopila	Consiste en potenciar la biodegradación de los hidrocarburos, que de forma natural se produce en el suelo, como consecuencia de la existencia de microorganismos autóctonos (bacterias, hongos, levaduras) degradadores. Por lo tanto, para que el sistema tenga éxito hay que asegurar que los suelos de forma natural presenten un adecuado volumen de población bacteriana y que las condiciones ambientales dentro de la biopila sean las adecuadas (humedad, temperatura, pH, contenido en nutrientes, toxicidad).
Biorreactores "lodoliquidado"	Es una tecnología costosa y se suele aplicar para casos de contaminantes persistentes y altamente recalcitrantes. El suelo se suele tamizar y se suspende en un tanque de agua. La suspensión y la agitación del suelo deberían promover la transferencia de masas y aumentar el contacto entre los compuestos contaminantes y la microbiota del suelo.

hidrocarburos del petróleo incrementan la remediación de Trinitrotolueno (TNT) en un 70% respecto al control. Otro enfoque, es la atenuación natural monitoreada (ANM), técnica que se utiliza solo para supervisar o evaluar el progreso de los procesos naturales que favorecen la degradación de los contaminantes en el suelo o en las aguas subterráneas (Tahri *et al.*, 2013).

### **3.10.5. Bioestimulación**

La bioestimulación es otra técnica de biorremediación que consiste en proporcionar a las comunidades bacterianas autoctóneas, un entorno favorable que aumenten la capacidad de degradación de los contaminantes, mediante la adición de nutrientes para satisfacer sus actividades metabólicas (Simarro *et al.*, 2013; Tahri *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2014). Los derrames de los hidrocarburos representan una fuente sustancial de carbono para los microorganismos autóctonos, pero la presencia de nitrógeno (N) y fósforo (P) es limitada, por lo anterior la adición de estos nutrientes mejora el potencial degradativo (Tahri *et al.*, 2013).

Las condiciones ambientales pueden ser mejoradas para propiciar mayor degradación microbiana, por ejemplo, el pH y la humedad de los suelos contaminados (Atlas, 1981b; Tahri *et al.*, 2013). Al respecto, Nikolopoulou y Kalogerakis (2009) reportan 96% de biodegradación de hidrocarburos del diésel, después de adicionar al suelo, biosólidos (materia orgánica rica en nutrientes procedentes del tratamiento de aguas residuales), y fertilizantes inorgánicos.

Existen ejemplos sobre la bioestimulación aplicada durante la biodegradación de contaminantes por microorganismos autóctonos. Por ejemplo, Mair *et al.*, (2013) observaron una degradación del 92.7 % de los HTP (10000 mg kg<sup>-1</sup>) mediante la aplicación de NPK en un periodo de 30 semanas. Por su parte, Lladó *et al.* (2012) observaron que los tratamientos basados en la bioestimulación alcanzaron una degradación del 30 % después de 200 días.

### **3.10.6. Bioaumentación**

La bioaumentación consiste en incorporar poblaciones microbianas especializadas (cepas individuales o consorcios) al sitio contaminado con compuestos tóxicos recalcitrantes, con el objetivo de aumentar las poblaciones microbianas para lograr su capacidad de biodegradación (Leahy y Colwell 1990; Suja *et al.*, 2014; Szulc *et al.*, 2014). Esta técnica es ideal para sitios que (i) no tienen suficientes poblaciones microbianas, o (ii) la población autóctona no posee las rutas metabólicas necesarias para oxidar compuestos xenobióticos (Andreolli *et al.*, 2015).

Los tratamientos de bioaumentación exitosos por lo general requieren la aplicación de estrategias a decuadas, para las condiciones ambientales específicas del lugar contaminado, utilizando inóculos que consisten en cepas microbianas o consorcios que han sido adaptados al sitio a descontaminar. Los microorganismos exógenos (inóculos) se han aplicado con éxito pero su eficacia depende de la capacidad de competir con microorganismos autóctonos, depredadores y diversos factores abióticos (Tyagi *et al.*, 2011; Adams *et al.*, 2015). Así mismo, las cepas aisladas individualmente o cultivos enriquecidos, que se pueden obtener "antes" o "después" de la contaminación, se inoculan en los sitios a remediar (Hosokawa *et al.*, 2009). Sin embargo, una limitación importante en la degradación microbiana se relaciona con la hidrofobicidad de los hidrocarburos la cual limita el potencial de las bacterias para acceder a ellos y degradarlos (Szulc *et al.*, 2014). Por esta razón, la característica más importante de las bacterias degradadoras de hidrocarburos es la capacidad para aumentar su biodisponibilidad y facilitar la absorción de los hidrocarburos a través de favorecer su emulsión en solución mediante la producción de agentes activos de superficie (surfactantes) que dispersan los hidrocarburos en emulsiones de agua, microgotas o micelas, que posteriormente son transportadas y utilizadas como fuentes de carbono

y energía (Hommel, 1990; Ibrahim *et al.*, 2013; Nalini y Parthasarathi, 2013; Jorfi *et al.*, 2013; Ismail *et al.*, 2013; Darvishi *et al.*, 2013).

Alisi *et al.* (2009) obtuvieron una degradación completa del aceite, diésel y fenantreno, con una reducción del 60% de isoprenoides, además, reportan una reducción global aproximada del 75% de los hidrocarburos totales del petróleo, en 42 días, utilizando un consorcio microbiano aislado de cepas autóctonas. Asi mismo, Li *et al.* (2009) afirman que la tasa de degradación de los HAP aumentó en 41.3%, con la adición de consorcios microbianos autóctonos (cinco hongos: *Phanerochaete chrysosporium*, *Cuunninghamella* sp., *Alternaria* (Fr.) Keissler, *Penicillium chrysogenum*, y *Aspergillus niger*, y tres bacterias: *Bacillus* sp., *Zoogloea* sp y *Flavobacterium*). Gouda *et al.* (2008) observaron que alrededor del 86% del queroseno se degradó en suelos arcillosos con la bioaumentación con *Pseudomonas* sp., durante 20 días, y solo el 80% se relacionó con la biodegradación por atenuación natural.

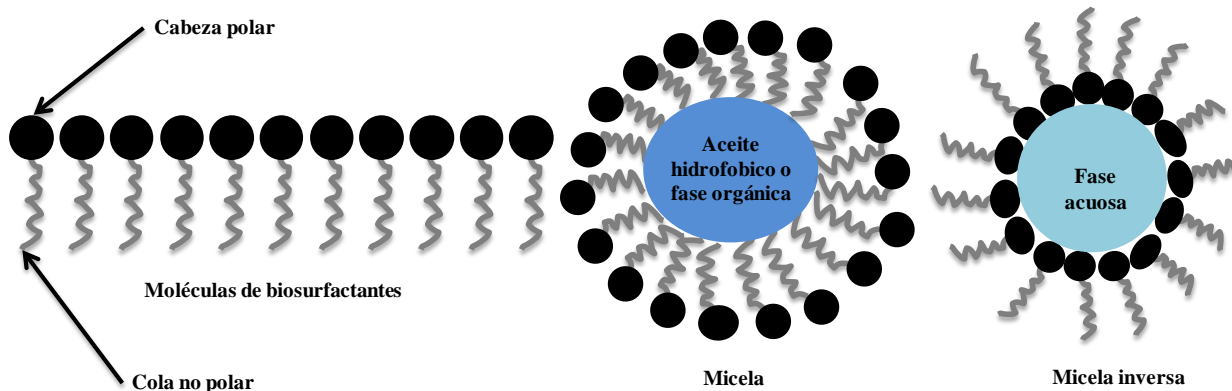
La presencia de consorcios microbianos desarrollados de forma natural puede ser más eficaz en comparación con cepas aisladas individuales aplicados como cultivos puros (Mrozik y Seget-Z, 2009). Al respecto, Coulon *et al.* (2012) indicaron que la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo (HTP) mediante la aplicación de microorganismos de origen comercial no tuvo ningún efecto significativo en la degradación de los HTP en comparación con el efecto de los microorganismos autóctonos (atenuación natural).

### **3.11. Surfactantes**

Los surfactantes son generalmente compuestos orgánicos anfifílicos (Campos *et al.*, 2014), ya que contienen tanto grupos hidrofóbicos ("colas") como grupos hidrofílicos ("cabeza") (Arias *et al.*, 2013; Lakra *et al.*, 2014; Hai-lin *et al.*, 2014). Los surfactantes se caracterizan por presentar una región polar y otra no polar (Nalini y Parthasarathi, 2013), Una de ellas tiene afinidad por el

agua (disolventes polares) y la otra por el aceite (disolventes no polares), debido a estas propiedades se forman agregados de entre 10 y 200 moléculas, llamados micelas (Figura 3.2), las cuales reducen la tensión superficial entre los fluidos que tienen diferentes grados de polaridad (Luna *et al.*, 2011).

En función de los grupos hidrofílicos que tengan, los surfactantes se clasifican en iónicos y no iónicos; y según su origen, se clasifican en químicos (producidos por síntesis química), y biosurfactantes (producidos por microorganismos) (Rao *et al.*, 2014). Los mecanismos que explican el aumento de la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos en presencia de surfactantes son: a) el aumento de la solubilidad de la fracción lipofílica y b) el transporte del contaminante desde la fase sólida hasta la fase líquida, debido a la disminución de la tensión superficial del agua en los poros presentes en el suelo (Bezza *et al.*, 2016; Takeuchia *et al.*, 2014).



**Figura 3.2.** Estructura general de un biosurfactante y su capacidad para formar una micela y micelas inversas (Daverey y Pakshirajan, 2011).

### 3.12. Biosurfactantes

Los biosurfactantes son moléculas anfífilas, producidos por diversos microorganismos tales como bacterias, levaduras y hongos filamentosos, que tienen la capacidad de reducir la tensión superficial e interfacial; además de tener propiedades emulsificantes, con ello formar micelas y microemulsiones entre las dos diferentes fases de un líquido (Figura 3.2) (Rao *et al.*, 2014; Chandankere *et al.*, 2014); además, cambian la afinidad célula-hidrocarburo, al aumentar la hidrofobicidad de la superficie celular (Silva *et al.*, 2014). Estas sustancias son sintetizadas principalmente en fase exponencial, y algunos ejemplos de microorganismos son *Pseudomonas aeruginosa* (produce rhamnolípidos), *Bacillus subtilis* que produce un lipopéptido llamado surfactina (Toribio-Jiménez *et al.*, 2014). Además, los microorganismos que producen surfactantes se dividen en tres categorías, según el sustrato que utilicen: a) los que usan alcanos exclusivamente como fuente de carbono, tales como *Corynebacterium* sp. o *Arthrobacter* sp.; b) los que solo usan sustratos solubles en agua como fuente de carbono, como es el caso de *Bacillus* sp., y c) los que usan tanto alcanos como sustratos solubles en agua como fuente de carbono como *Pseudomonas* sp. Debido a su diversidad estructural, baja toxicidad y biodegradabilidad, los biosurfactantes son excelente alternativa respecto a aquellos de origen químico (Sekhon *et al.*, 2012; Hošková *et al.*, 2013).

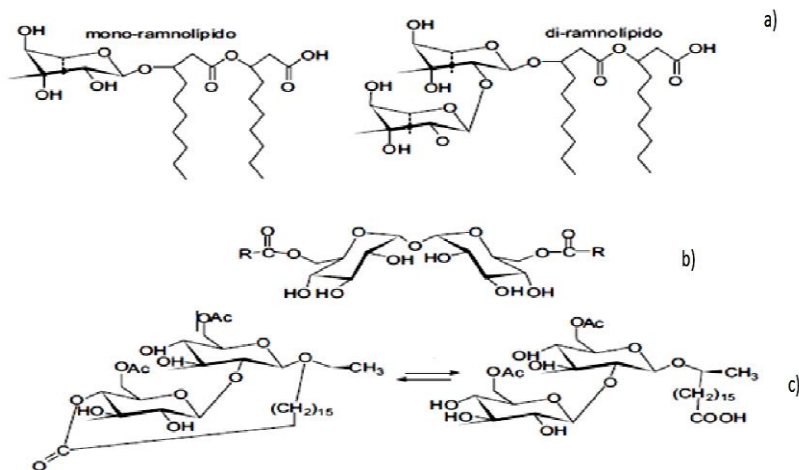
### 3.13. Clasificación de los biosurfactantes

Los biosurfactantes (BS) son moléculas complejas que cubren una amplia gama de tipos químicos, clasificándose principalmente con base en la composición bioquímica y origen microbiano y dividiéndose en: glicolípidos, fosfolípidos o lipopéptidos, ácidos grasos, lipoproteínas, y compuestos poliméricos y particulados (Cooper y Zajic, 1980; Okoliegbe y Agarry, 2012; Shoeb *et al.*, 2013; Sarafin *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2014).



Los biosurfactantes más estudiados son los de bajo peso molecular como los glicolípidos, los lipopéptidos, y los ácidos grasos (Okoliegbe y Agarry, 2012). Los glicolípidos son los biosurfactantes más comunes y están formados por mono, di, tri y tetrasacáridos en combinación con una o más cadenas de ácidos alifáticos o ácidos hidroxialifáticos (Figura 3.3) (Okoliegbe y Agarry, 2012; Hošková *et al.*, 2013; Lau *et al.*, 2014).

Los glicolípidos se subclasifican en ramnolípidos, trehalolípidos y soforolípidos. Los ramnolípidos están constituidos por mono y disacáridos de ramnosa ligados por un enlace glicosídico a una molécula de  $\beta$ -hidroxidecanoil- $\beta$ -hidroxidecanoato (Figura 3.3a) (Cortés-Sánchez *et al.*, 2013). Los trehalolípidos están constituidos por el disacárido trehalosa, en el que a cada unidad de glucosa se encuentra ligado un ácido graso por medio de un enlace  $\alpha$ -1-glicosídico (Figura 3.3b) (Abbasi *et al.*, 2013; Jiménez *et al.*, 2010).

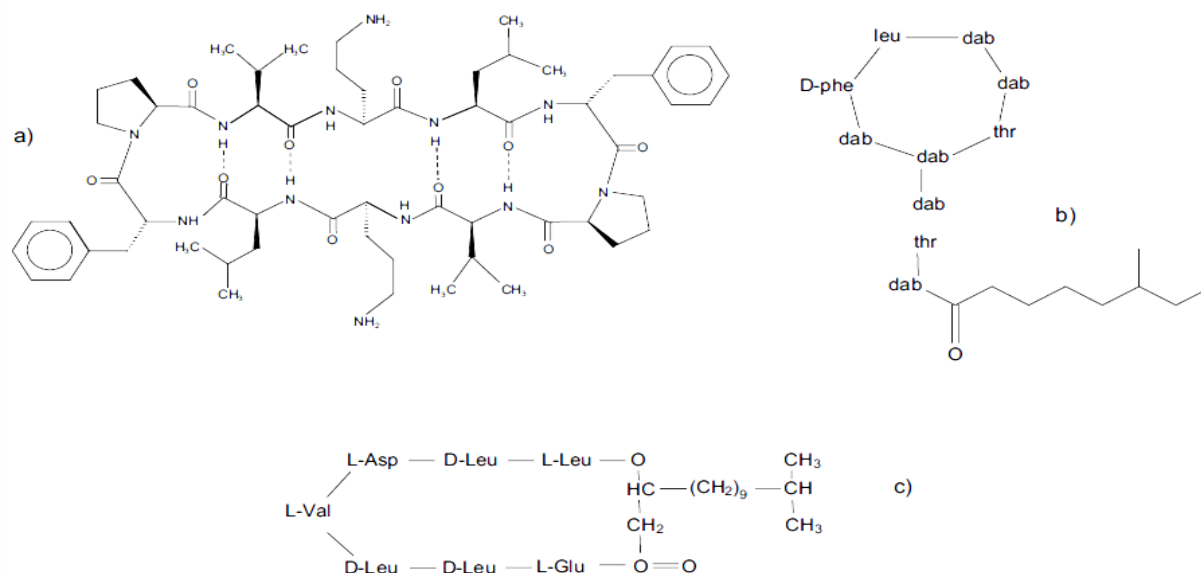


**Figura 3.3.** Estructuras de los principales glicolípidos. a) mono- y dirramnolípidos b) estructura general de un trehalolípidio, y c) soforolípidio en equilibrio con su forma de lactona (Jiménez *et al.*, 2010).

La estructura de los soforolípidos tiene como base al disacárido soforosa ( $\beta$ -D-Glc-(1,2)-D-Glc), el cual se encuentra ligado glicosídicamente al grupo 17-hidroxilo, ya sea a una molécula de ácido esteárico (ácido graso saturado de 18 carbonos) o a una molécula de ácido oleico (ácido insaturado *cis*-9-octadecaenoico). Una de las características estructurales destacables en los soforolípidos son el grupo carboxilo, el cual está usualmente ligado a la segunda unidad de glucosa mediante el grupo 4-hidroxilo para formar una lactona; por otra parte, los grupos 6-hidroxilo de cada unidad de glucosa pueden o no encontrarse acetilados (Figura 3.3c) (Jiménez *et al.*, 2010; Geys *et al.*, 2014).

Los lipopéptidos son producidos principalmente por miembros de la especie *Bacillus* y *Pseudomonas*, constituidos principalmente de péptidos hidrófilos, generalmente entre 7 y 10 aminoácidos de largo, vinculados a una estructura de ácido graso hidrófobo. Además, los lipopéptidos están compuestos por diferentes familias, y cada familia está constituida por diversas variantes, los más conocidos y estudiados son surfactina e iturina (Okoliegbe y Agarry, 2012).

Los lipopéptidos tienen capacidad biosurfactante significativa. Por ejemplo, los lipopéptidos cíclicos tales como la gramicidina S y las polimixina B (Figura 3.4a y 3.4b). Estas dos clases de biotensoactivos poseen también actividad antibacteriana debido a su capacidad de solubilizar enzimas de membrana. Dentro de este grupo también se encuentra a la surfactina la cual es conocida por su alto poder surfactante (Figura 3.4c), cuyas concentraciones menores del 0.005 % en peso, reducen la tensión superficial del agua de 72 a 27.9 Nm<sup>-1</sup> (Jiménez *et al.*, 2010; Okoliegbe y Agarry, 2012).



**Figura 3.4.** Estructura de los tres principales lipopéptidos con actividad biosurfactante. a) gramicidina S; b) polimixina B; c) surfactin (Jiménez *et al.*, 2010).

### 3.14. Microorganismos productores de biosurfactantes

Los biosurfactantes son producidos por diversos microorganismos, principalmente bacterias, hongos y levaduras, los cuales son diversos en su composición química (Cuadro 3.5), su naturaleza y cantidad dependerá del tipo de microorganismo que produce el biosurfactante en particular (Saharan *et al.*, 2011; Jara *et al.*, 2013; Geys *et al.*, 2014).

### 3.15. Papel fisiológico de los biosurfactantes en los microorganismos

Los biosurfactantes producidos por los microorganismos, son secretados de forma extracelular o unidos a partes de las células durante el cultivo (Jara *et al.*, 2013). Las principales hipótesis sobre las funciones que cumplen los biosurfactantes son: Capacidad para emulsificar y solubilizar los compuestos insolubles en la fase acuosa, (como los hidrocarburos) facilitando la disponibilidad de estos sustratos para el crecimiento bacteriano (Burgos-Díaz *et al.*, 2011). Adherencia y liberación

**Cuadro 3.5.** Algunos de los principales biotensoactivos y sus microorganismos productores (Saharan *et al.*, 2011).

<b>Biosurfactantes</b>	<b>Microorganismo(s)</b>	<b>Importancia económica actual</b>
Celubiolípidos	<i>Ustilago maydis</i>	Compuestos antifúngicos
Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>	Emulsificación de hidrocarburos
Lípidos polioles	<i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>R.</i>	Actividad antiproliferativa
Trehalolípidos	<i>Rhodococcus erythropolis</i> ,	Disolución de hidrocarburos
Lípidos ortina	<i>Pseudomonas</i> sp.,	Bio-emulsionante
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Leuconostoc mesenteriods</i>	Tensoactivos lipopéptidos
Ramrólípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,	Biorremediación de superficie,
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ,	antimicrobiana y propiedades de
Carbohidratos-	<i>P.fluorescens</i> , <i>Debaryomyces</i>	Bio-emulsionante
Proteína PA	<i>P.aeruginosa</i>	Bio-emulsionante
Diglicosil	<i>Lactobacillus fermentii</i>	Bio-remediación
Células enteras	<i>Cyanobacteria</i>	Bio-floculante
Ácidos grasos	<i>Clavibacter</i>	Bio-emulsionante
Soforolípidos	<i>Candida bombicola</i> , <i>C.</i>	Antimicrobiana, Antiviral,
Liposán	<i>C. tropicalis</i>	Bio-emulsante
Lípidos	<i>C.antartica</i> , <i>Kurtzmanomyces</i>	Compuestos antifúngicos
Surfactina/Iturina	<i>B. subtilis</i> , <i>B.</i>	Propiedades antimicrobianas
Subtilisina	<i>B. subtilis</i>	Propiedades antimicrobianas
Aminoácidos	<i>Bacillus</i> sp.	Propiedades antimicrobianas
Lichenysin	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B.</i>	Recuperación microbiana mejorada
Péptido- lipídico	<i>B. licheniformis</i>	Propiedades antimicrobianas
fosfolípidos	<i>Acinetobacter</i> sp.	Biorremediación
Vesículas y	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ,	Biorremediación
Emulsán	<i>A. calcoaceticus</i>	Recuperación microbiana mejorada
Alasán	<i>A. radioresistens</i>	Biodegradación de compuestos

de células en superficie, esta característica les permite regular las propiedades de la superficie celular, proporcionando la adherencia o la liberación de acuerdo a los requerimientos nutricionales o para evadir ambientes desfavorables (Rosenberg et al.,1989). Facilitar el transporte de hidrocarburos a nivel de membrana, función atribuida a los biosurfactante del tipo glicolipídico ligados a membrana celular (Inès y Dhouha, 2013). Actividad antibiótica, la que ha sido demostrada por varios biosurfactante, principalmente los lipopéptidos y glicopéptidos. Ejemplos

de éstos son los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* y la surfactina de *Bacillus subtilis*, los cuales presentan actividad como antibióticos, lo que les permite solubilizar los principales componentes de las membranas celulares microbianas (Toribio-Jiménez *et al.*, 2014). Estas características les permiten tener una mayor oportunidad de supervivencia en nichos con alta competitividad por los nutrientes a los microorganismos productores de surfactantes (Desai y Banat, 1995; Burgos-Díaz *et al.*, 2011). Cuando las plantas o animales son infectados por microorganismos patogénicos, éstos producen biosurfactantes que impiden la dispersión del agente patógeno (Jara *et al.*, 2013). Otro posible papel de los biotensoactivos se refieren al almacenamiento de fuentes de carbono y energía (Fakruddin, 2012).

### **3.16. Fitorremediación**

La fitorremediación es definida como el uso combinado de las plantas y las practicas agronómicas para eliminar los contaminantes del medio ambiente o disminuir su toxicidad (Wiszniewska *et al.*, 2016), basandose principalmente en la capacidad de las plantas para estabilizar, extraer, acumular, degradar o transformar los contaminantes en los suelos, sedimentos o ambientes acuáticos; mediante los procesos de fitodegradación, fitoestabilización o fitoextracción (Moreira *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2013). El principal mecanismo involucrado en la fitorremediación de hidrocarburos del petróleo es la biodegradación en la rizosfera o rizadorremediación (Ma *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2013). Durante la remediación de los contaminantes orgánicos, las plantas pueden beneficiarse de bacterias asociadas que poseen vías de degradativas y capacidades metabólicas, que mejoran la degradación de los hidrocarburos del petróleo y reducen la fitotoxicidad causada por los hidrocarburos volátiles (Alarcón *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2014). La interacción planta y las comunidades microbianas son cruciales para el transporte, la transformación de los contaminantes orgánicos y para la estabilización de los ecosistemas

afectados (Fester *et al.*, 2014). Numerosos estudios han demostrado que la presencia de las plantas pueden contribuir a un mayor crecimiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos (Kirk *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2006, Zhuang *et al.*, 2007 y Gaskin *et al.*, 2008).

La asociación planta-microorganismos degradadores de hidrocarburos es una estrategia que se puede utilizar para superar algunas de las limitantes, tanto de la biorremediación convencional como en la fitorremediación (Glick, 2010). Las raíces de las plantas pueden aumentar la velocidad de gradación de los hidrocarburos del petróleo en diferentes formas por ejemplo; las raíces de las plantas exudan compuestos orgánicos al suelo que aumentan la densidad, la diversidad y la actividad de los microorganismos que son principalmente responsables de la degradación de los hidrocarburos (Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2016).

Algunas de las características de estas bacterias expuestas a los hidrocarburos es la capacidad de promover el crecimiento de los vegetales (PGPB) y puede aumentar la biomasa de las plantas a través de varios mecanismos que incluyen: la producción de fitohormonas, sideróforos, enzima desaminasa del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), la fijación nitrógeno, así como la solubilización del fósforo (Glick, 2010; Gerhardt *et al.*, 2009; Kukla *et al.*, 2014). Además, las raíces junto con algunas bacterias de la rizosfera producen biosurfactantes que aumentan la biodisponibilidad y la adsorción de los hidrocarburos a las plantas, facilitando aún más su eliminación (Khan *et al.*, 2013; Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2016). Este aspecto puede ser beneficioso, especialmente en los suelos con hidrocarburos intemperizados, en el cual la disponibilidad del hidrocarburo es baja para los procesos de rizorremediación en comparación a los suelos recién contaminado (Truu *et al.*, 2015). La capacidad de las bacterias para degradar, promover el crecimiento de las plantas y mejorar la biodisponibilidad de los hidrocarburos a través de la

producción de biosurfactante es crucial para reducir la toxicidad y mejorar la fitorremediación de los suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo.

### **3.17. Origen, distribución, características botánicas, agronómicas y usos de *Clitoria ternatea***

*Clitoria ternatea* es una leguminosa originaria de África, América central y Sudamérica, que es considerada como recurso forrajero para el trópico seco; es una planta perenne de crecimiento erecto, y tiene buen crecimiento en suelos arcillosos y arcillo-arenosos. *Clitoria ternatea* está ampliamente distribuida en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, y en México se encuentra en forma silvestre en Tabasco y sur de Veracruz (Flores, 1983). Esta especie prospera bien desde el nivel del mar hasta los 1,600 m o inclusive, hasta los 1,800 msnm (Bogdan, 1977; Flores, 1983). Requiere precipitaciones desde 400 mm, con un mejor desempeño en áreas con 1, 500 mm anuales (Skerman, 1977), tolera la salinidad y se cultiva en suelos con pH alto (Skerman, 1977). Además, presenta crecimiento lento y baja persistencia en suelos infértiles, pero se desarrolla exitosamente en suelos arcillosos y fértiles (Hall, 1985), es tolerante a la sequía, y se adapta muy bien en suelos de buena fertilidad, profundos y húmedos (Peralta, 1988). *Clitoria ternatea* es una planta perenne, semiarbusciva, de tallos lisos de 0.5-3 m de longitud; tiene hojas pinnadas con 5-7 foliolos los cuales son oblongo-lanceolados de 1.5-7.0 cm de longitud y 0.3-4.0 cm de ancho, glabros en la parte superior y pubescentes abajo. Tiene flores únicas o en pares de color azul de cáliz tubular, con el pedicelo inclinado a 180°, de tal manera que el estandarte está hacia abajo. Las vainas son lineales, planas de 6-12 cm de longitud y 0.7-1.2 cm de ancho, con aproximadamente 10 semillas las cuales son de color verde, café o negro, frecuentemente moteadas o jaspeadas de 4.5-7.0 mm de longitud y 3-4 mm de ancho (Bogdan, 1977; Hall, 1985).

*Clitoria ternatea* L. es considerada como “la alfalfa del trópico”; es de ciclo perenne, presenta altos rendimientos de materia seca ( $8 \text{ t ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ), buen valor nutritivo, y una excelente aceptación

por el ganado; además, se adapta a varios tipos de suelo y es capaz de fijar nitrógeno atmosférico (Bogdan, 1977; Peralta, 1988).

En el caso de la remediación de sitios contaminados, *C. ternatea* puede ser una alternativa potencial en la limpieza de suelos contaminados por metales pesados causados por los derrames de hidrocarburos del petróleo, utilizándola como especie fitorremediadora, en los procesos de fitoestabilización o fitoextracción (De la Cruz-Landero, 2010). Por su parte Sangabriel (2006) concluyen que *C. ternatea* no es tolerante a altas concentraciones de combustóleo ( $50000 \text{ mg kg}^{-1}$ ), este efecto denota la susceptibilidad de *C. ternatea* para crecer y desarrollarse a esta concentración. Sin embargo, esta leguminosa puede ser utilizada como una especie bioindicadora de toxicidad de suelos contaminados con combustóleo.

### **3.18. Discusión general de la revisión bibliográfica y planteamiento del problema**

En la actualidad uno de los principales problemas es la contaminación de los ecosistemas terrestres y acuáticos ocasionado principalmente por las actividades de la industria petrolera. Las actividades petroleras involucradas en los derrames son: la extracción, transporte, procesamiento y almacenamiento de sus derivados, lo que ocasiona alteraciones en las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos (Díaz-Ramírez *et al.*, 2013). Los contaminantes frecuentemente persisten por largos períodos en el suelo, ya que su compleja estructura química impide su fácil degradación (Trujillo-Narcía *et al.*, 2014). Tales características han provocado que algunos de los componentes de los hidrocarburos sean considerados residuos peligrosos, con propiedades mutagénicas y carcinogénicas de acuerdo a la EPA y la OMS.

Por lo anterior, surge la necesidad de investigar y buscar técnicas alternativas que permitan disminuir o eliminar hidrocarburos de los sitios contaminados. Existen varias técnicas de remediación, una de las más importantes es la biorremediación, debido a los mínimos impactos



negativos ocasionados a los ecosistemas, y además, por su bajo costo, y resultados rentables. La biorremediación implica la incorporación de microorganismos para reducir la concentración de los compuestos de los hidrocarburos, mediante procesos de biodegradación. Esta técnica (biorremediación) puede ser llevada a cabo mediante la atenuación natural, o bien, mediante la bioestimulación de las poblaciones microbianas autóctonas, o a través de la introducción de consorcios microbianos capaces de degradar los hidrocarburos del petróleo (bioaugmentación). Estudios recientes han demostrado que algunos géneros bacterianos degradadores de hidrocarburos del petróleo tienen la capacidad de producir surfactantes, los cuales aumentan el área superficial de los sustratos hidrofóbicos mediante la reducción de la tensión superficial y aumentando su biodisponibilidad.

Considerando lo anterior, esta investigación plantea aislar bacterias emulsificantes, capaces de mejorar el proceso de degradación al reintroducirlas en un suelo contaminado con petróleo intemperizado del estado de Tabasco, en un sistema de fitorremediación, comparado con la biostimulación con fertilizantes inorganicos, y la aplicación de un surfactante químico.

## CAPÍTULO IV

### CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE DIÉSEL POR BACTERIAS EMULSIFICANTES NATIVAS DE SUELOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO INTEMPERIZADO

#### Resumen

En el presente trabajo se evaluó las poblaciones de bacterias totales, lipolíticas, solubilizadoras de fosfatos, fijadoras de nitrógeno de vida libre, e hidrocarbonoclastas a partir de suelo no contaminado y crónicamente contaminado con hidrocarburos del petróleo intemperizado (HTPI), y caracterizó bacterias emulsificantes y degradadoras de diésel. Los suelos recolectados del estado de Tabasco (México) fueron considerados como medianamente ( $50\ 000\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ ), y altamente contaminados ( $150\ 000\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ ), y se consideró un suelo no contaminado. Las poblaciones bacterianas mostraron diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) entre los tres suelos; el suelo altamente contaminado mostró mayor población bacteriana. Trece cepas bacterianas fueron aisladas del suelo no contaminado, y del altamente contaminado. Estas bacterias mostraron capacidad para producir surfactantes mediante los métodos de índice de emulsificación (E24%), hidrofobicidad de la superficie celular, colapso de la gota, desplazamiento de hidrocarburo, y para degradar diésel. Las bacterias con mayor actividad emulsificante fueron identificadas molecularmente (16S rRNA) como *Serratia marcescens* (C11S1), *S. marcescens* (C7S3), *Citrobacter freundii* (C4S3), *Raoultella ornithinolytica* (C5S3), *Stenotrophomonas maltophilia* (C10S1), y *St. pavanii* (C5S3F). La cepa C7S3 mostró mayor capacidad para emulsificar diésel (74.2%), hidrofobicidad celular alta (173%), y degradación de diésel (96%). El consorcio bacteriano integrado por las seis cepas mencionadas mostró alta degradación de diésel (97%). Las pruebas bioquímicas demostraron que las cepas evaluadas tienen la capacidad de producir ácido indol acético.

**Palabras clave:** Poblaciones bacterianas, consorcio bacteriano, índice de emulsificación, biosurfactante, *Serratia marcescens*.

## CHAPTER IV

### DIESEL DEGRADATION BY EMULSIFYING BACTERIA ISOLATED FROM CONTAMINATED SOILS WITH WEATHERED PETROLEUM

#### Abstract

This study evaluated bacterial populations (total, lipolytic, P-solubilizers, N-fixing free, and hydrocarbonoclastic bacteria) from soils uncontaminated or contaminated with weathered petroleum hydrocarbons (WPH), and characterized as emulsifying and diesel-degrading bacteria. Soils collected from Tabasco state (Mexico) were characterized as moderately ( $50\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$ ), and highly contaminated ( $150\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$ ), and non-contaminated soils was also included. Bacterial populations showed significant differences ( $P \geq 0.05$ ) among the three soils; highly contaminated soil had the highest bacterial population. Thirteen bacterial strains were isolated from non-contaminated and highly contaminated soils. These bacteria were able to degrade diesel and to produce surfactants determined by the following methods: emulsification index (E24%), cell surface hydrophobicity, drop collapse, hydrocarbon displacement. Bacteria with high emulsification activity were molecularly identified (16S rRNA) as *Serratia marcescens* (C11S1), *S. marcescens* (C7S3), *Citrobacter freundii* (C4S3), *Raoultella ornithinolytica* (C5S3), *Stenotrophomonas maltophilia* (C10S1), and *St. pavanii* (C5S3F). The strain C7S3 showed the highest capability of diesel emulsification (74.2%), high cell hydrophobicity (173%), and diesel degradation (96%). The consortium conformed by the six bacterial strains showed high diesel degradation (97%). The biochemical tests demonstrated that the bacterial strains were also able to produce indole acetic acid.

**Key words:** Bacterial populations, bacterial consortium, emulsification index, biosurfactant, *Serratia marcescens*.

#### 4.1. INTRODUCCIÓN

En México existen extensas áreas contaminadas con hidrocarburos derivados del petróleo debido principalmente por derrames accidentales o por fugas de tanques de almacenamiento subterráneo (Trindade *et al.*, 2005; Chandankere *et al.*, 2013; Chandankere *et al.*, 2014). Lo anterior ha causado impactos y riesgos negativos significativos para los agroecosistemas y para la salud humana (Basumatary *et al.*, 2012; Mair *et al.*, 2013; Masciandaro *et al.*, 2013; Ojeda-Morales *et al.*, 2013; Baldan *et al.*, 2015).

La biorremediación es una opción que presenta ventajas con respecto a métodos físicos y químicos para el tratamiento de suelos contaminados (Jorfi *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2014). Así, la inoculación de microorganismos alóctonos con alta capacidad degradadora de hidrocarburos (bioaumentación), es una de las prácticas más importantes en la biorremediación de suelos contaminados con petróleo (Bento *et al.*, 2005; Nikolopoulou y Kalogerakis, 2008; Hassanshahian *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014; Quiao *et al.*, 2014; Fodelianakis *et al.*, 2015). La biodegradación de los hidrocarburos del petróleo es compleja, y por lo general requiere de diferentes especies o consorcios microbianos con amplias capacidades enzimáticas que permitan acelerar y aumentar su degradación (Mukherjee y Das, 2005; Mukherjee y Bordoloi, 2011; Aler *et al.*, 2014; Hassanshahian *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2014). No obstante, la eficacia de la biorremediación por acción microbiana está generalmente limitada por la baja disponibilidad y solubilidad de los hidrocarburos del petróleo, por su hidrofobicidad y adsorción en las partículas del suelo, y por su intemperización (Chia-Wei *et al.*, 2013; Chandankere *et al.*, 2014; Bezza *et al.*, 2015). El petróleo intemperizado se caracteriza por ser un material sólido, que no presenta ningún grado de fluidez a temperatura

ambiente, y es resistente a la degradación al no estar disponibles para los microorganismos (Gao, 2009; Tang *et al.*, 2012; Riveroll-Larios *et al.*, 2015).

En el suelo existen bacterias con capacidad para producir surfactantes que favorecen la emulsión de los hidrocarburos (Campos *et al.*, 2014; Rao *et al.*, 2014), así, la adhesión de las células microbianas a los sustratos hidrofóbicos permite que sean utilizados como co-sustrato, y como fuente de carbono para satisfacer el metabolismo microbiano (Hassanshahian *et al.*, 2012; Chandankere *et al.*, 2014; Onur *et al.*, 2015). Los biosurfactantes corresponden a un grupo de moléculas y metabolitos secundarios con superficie activa, con una porción hidrofóbica y una hidrofílica que proporcionan la habilidad de actuar en la interfase de diferentes compuestos (Nalini y Parthasarathi, 2013; Rao *et al.*, 2014). Algunas bacterias, como las del género *Acinetobacter*, producen una sustancia con características de los biosurfactantes para degradar varios hidrocarburos como el diésel (Gallego *et al.*, 2001). Los biosurfactantes tienen varias ventajas en comparación con los surfactantes químicos, especialmente en términos de emulsificación, biodegradabilidad, compatibilidad con el ambiente, baja toxicidad, e incluso por mantener su actividad bajo condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Reddy *et al.*, 2010; Hassanshahian *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2014; Chandankere *et al.*, 2014).

Existen pocos estudios acerca del uso de bacterias productoras de biosurfactantes o bioemulsificantes para la recuperación de suelos crónicamente contaminados, como es el caso del extremo occidente del estado de Tabasco (México), donde la mayoría de las instalaciones petroquímicas son antiguas (> 50 años), y que son factor de riesgo de ocurrencia de derrames de hidrocarburos por la presencia de tubos afectados por la corrosión (Adams *et al.*, 1999; Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia, 2004). Por lo tanto, el uso de bacterias emulsificantes en los sitios afectados por petróleo intemperizado puede contribuir en forma significativa a su degradación a mediano o

a largo plazo. El objetivo del presente trabajo fue aislar y seleccionar bacterias con capacidad emulsificante a partir de suelos contaminados con petróleo intemperizado del estado de evaluar su capacidad degradadora de diésel.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1. Sitio de muestreo**

Se seleccionaron dos suelos (Gleysol) contaminados con petróleo intemperizado: A) 50 000 mg kg<sup>-1</sup> (medianamente contaminado), y B) 150 000 mg kg<sup>-1</sup> (altamente contaminado), recolectados del ejido José Narciso Roviroso en el área aledaña al sur del Complejo Procesador de Gas La Venta, en el estado de Tabasco (18° 4'39.83"N, 94° 2'39.42"O y 18° 4'39.22"N 94° 2'38.46"O). Además, se obtuvo un suelo testigo sin previo impacto de contaminación (150 mg kg<sup>-1</sup> de hidrocarburos de origen biogénico) recolectado del ejido Blasillo Huimanguillo Tabasco (18° 3'9.35" N 93°55'59.34" O). La extracción de los HTPI se realizó con didiclorometano en equipo soxhlet según el método 418.1 (EPA, 1986). En los tres suelos se realizó un muestreo puntual del horizonte superficial (0-30 cm), cada muestra se realizo por tiplicado de acuerdo con las indicaciones establecidas en la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002).

### **4.2.2. Análisis microbiológico**

Se evaluaron las poblaciones cultivables de bacterias totales (BT), bacterias lipolíticas (Blipol), bacterias solubilizadoras de fosfatos (Bsolp), bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (BFN), y BFN-hidrocarbonoclastas (BFND). Estos grupos bacterianos se consideraron por su importancia en el reciclaje de nutrientes, y por su contribución en la degradación de los hidrocarburos.

La cuantificación de microorganismos cultivables se realizó mediante la técnica de dilución y conteo en placa (Madigan *et al.*, 2009), utilizando medios de cultivos específicos para bacterias totales (agar nutritivo, Baker®), para bacterias solubilizadoras de fosfatos de calcio (Pikovskaya, 1948), y bacterias lipolíticas (Sierra, 1957). Las BFN se cuantificaron empleando el medio propuesto por Rennie (1981). La composición del medio se realizó a partir de dos soluciones: Solución A ( $\text{g L}^{-1}$ ): 0.8  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1  $\text{NaCl}_2$ , y 0.025  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; y solución B, la cual se preparó en 100 mL de agua destilada con 0.2  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0.06  $\text{CaCl}_2$ . El pH de ambas soluciones se ajustó a 7.0 y se esterilizaron por separado durante 15 min a 121 °C, se enfriaron y se mezclaron bajo condiciones de esterilidad. Posteriormente, este mismo medio de cultivo se suplementó con 300  $\mu\text{L}$  de diésel para evaluar las BFN-hidrocarbonoclastas (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007). Las placas de todos los medios de cultivo se incubaron a 28°C durante 24 h y 48 h y los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias ( $\text{UFC g}^{-1}$ ).

#### **4.2.3. Selección de cepas emulsificantes**

La selección de las cepas bacterianas emulsificantes se realizó utilizando diésel como fuente de hidrocarburos, y de acuerdo las siguientes pruebas.

El índice de emulsificación ( $E_{24\%}$ ) se determinó mediante la adaptación del método descrito por Cooper y Goldenberg (1987). Se adicionaron 2 mL de diésel en 4 mL de cultivo bacteriano, propagado en medio Luria-Bertani ( $\text{g L}^{-1}$ : 10 Triptona, 5 extracto de levadura, 5 NaCl, 1 L-Triptofano). La mezcla se agitó en vórtex durante 2 min, seguido de 24 h de reposo a temperatura ambiente. El efecto emulsificante bacteriano se comparó con el de un surfactante químico (medio de cultivo:tween 80, 2:1 v/v) como estándar. El índice de emulsificación ( $E_{24\%}$ ) se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$E_{24\%} = \frac{\text{Altura total de la emulsión}}{\text{Altura total del sistema}} \times 100$$

La hidrofobicidad de la superficie celular (HSC) se determinó utilizando el método bifásico agua-hidrocarburo MATH (Microbial Adhesion Test Hydrocarbons) descrito por Rosenberg *et al.* (1980). Las cepas bacterianas se propagaron en el medio Luria-Bertani previamente descrito. Se tomaron muestras de bacterias en la fase exponencial (72 h) mediante tres lavados con solución buffer PUM [Phosphorus-Urea-Magnesium: (g L<sup>-1</sup>): 19.7 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7.26 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.8 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, pH 7.1] durante 5 min a 8000 g. La población celular se ajustó a una densidad óptica de 0.5 (A<sub>600</sub>) en solución buffer PUM. En tubos de dilución con 2 mL de diésel, se agregaron 2 mL de la suspensión bacteriana correspondiente, y se agitaron vigorosamente por 2 min en vórtex; posteriormente, la mezcla se dejó reposar por 15 min para permitir la separación de fases. La densidad óptica (A<sub>600</sub>) se midió nuevamente en la fase acuosa. La hidrofobicidad se expresó como el porcentaje de adhesión al diésel mediante la siguiente ecuación:  $HSC\% = [1 - (A_{600} \text{ Final} / A_{600} \text{ Inicial})] * 100$  (Blanco *et al.*, 2010).

La técnica cualitativa del colapso de la gota, se determinó mediante el método de Bodour y Miller-Maier (1998). En una placa de 96 pozos (Costar 3591, Corning®), se aplicó una fina capa de diésel (50 µL por pozo) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente, se colocaron por triplicado, 100 µL del correspondiente cultivo bacteriano (Jain *et al.*, 1991). La producción de biosurfactantes se evidenció al observar la dispersión de la gota en el pozo. Se utilizó agua destilada como testigo negativo (Bodour y Miller-Maier, 1998).

La técnica de desplazamiento de hidrocarburo se realizó mediante el método modificado de Bodour y Miller-Maier, (1998) y Sarafin *et al.* (2014). El método de desplazamiento de hidrocarburo se realizó formando una fina capa de diésel en caja de Petri, añadiendo 100 µL de diésel con 25 mL de agua destilada. Posteriormente, se agregaron 20 µL del medio del cultivo bacteriano sobre la capa del diésel. La actividad biosurfactante de cada bacteria



seleccionada fue determinada como el área de diésel desplazada (mm) (Rodríguez *et al.*, 2006). Cada uno de los métodos antes mencionados se realizó con cuatro repeticiones.

#### **4.2.4. Caracterización bioquímica de las cepas aisladas**

La producción de ácido indol acético (AIA) se realizó de acuerdo con el método modificado por Brick *et al.* (1991). Las cepas bacterianas se cultivaron en medio Luria-Bertani a 28 °C y 180 rpm por 72 h. Posteriormente, en una microplaca de 96 pozos se añadieron 100 µL del cultivo bacteriano correspondiente, por triplicado, y se adicionaron 100 µL de solución Salkowski (2% (p/v) con FeCl<sub>3</sub> 0.5M disuelto en ácido perclórico al 35% (Brick *et al.*, 1991). La microplaca se incubó en oscuridad por 30 min a temperatura ambiente. El cambio de color amarillo a rosado fue considerado como actividad positiva a la producción de AIA para cada cultivo bacteriano.

Las pruebas bioquímicas catalasa y oxidasa, de las cepas bacterianas seleccionadas, se realizó de acuerdo con Ibrahim *et al.* (2015). La prueba catalasa se realizó añadiendo una gota de peróxido de hidrógeno en un portaobjetos limpio, sobre la gota se colocó una azada de la cepa bacteriana seleccionada. La aparición de burbujas fue considerada como una reacción positiva. La prueba oxidasa, se realizó tomando con un palillo de madera estéril una muestra bacteriana de 24 h de crecimiento. La muestra se colocó en contacto con el reactivo Bactident® Oxidase (MERCK Darmstadt Germany). La aparición de un color azul-violeta sobre la muestra durante 30 s, se consideró como prueba positiva.

#### **4.2.5. Identificación molecular de las cepas seleccionadas**

Las técnicas utilizadas en la identificación de especies y géneros de bacterias, incluyen la extracción directa del DNA y la amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica analiza normalmente secuencias de DNA ribosomal,

especialmente las regiones conservadas ITS (*internal transcribed spacers*) como se describe a continuación.

El DNA genómico se extrajo a partir de 3 colonias de las cepas con el sistema comercial EZ-10 Spin® Column Bacterial DNA mini-preps kit (Bio Basic Inc., Canadá), la integridad del DNA genómico se verificó en un gel de agarosa al 0.8%. Se amplificó vía una PCR un fragmento de ≈500 pb del gen 16S rDNA, correspondiente a las regiones hipervariables V1 a V3 que permiten la asignación de identidad de manera confiable hasta nivel de género y especie, según el grupo bacteriano. Los productos de amplificación se enviaron al servicio de secuenciación del INMEGEN. Se editaron las secuencias de las cepas con software bioinformático, se convirtieron las secuencias a formato \*fasta con el programa BioEdit versión 7.0.9.0 (Hall, 1999) y se analizaron las secuencias en la plataforma BLAST (Morgulis *et al.*, 2008), se descargaron hasta 10 secuencias del GenBank con similitudes mayores al 98% para generar un alineamiento múltiple con el programa Clusta IX versión 2.0 (Larkin *et al.*, 2007), el alineamiento se editó para generar la secuencia consenso con el programa Seaview versión 4.0 (Galtier *et al.*, 1996). Se analizó la secuencia consenso en la plataforma BLAST para generar una minería de secuencias homologas de las especies con mayor similitud; con la minería, se construyó un árbol filogenético por cada secuencia con el programa MEGA versión 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) para comparar la topología de la filogenia con el resultado de BLATS, el criterio de asignación de identidad fue que se tuvieran porcentajes de identidad mayores al 97% para nivel de especie, 95-96% para nivel de género y porcentajes de cobertura mayores al 85%, con base a lo descrito por Rosselló-Mora y Aman (2001).

#### **4.2.6. Prueba de biodegradación de diésel**

La prueba de biodegradación de diésel se evaluó mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS). Las cepas que mostraron mayor porcentaje de emulsificación fueron que las que se evaluaron en esta prueba. Las cepas bacterianas utilizadas se sembraron en medio Luria-Bertani por 72 h a 28 °C y 1800 rpm, los cultivos se centrifugaron a 7500 revoluciones por minuto durante 10 min; posteriormente, las pastillas celulares se lavaron tres veces con agua estéril. El inóculo bacteriano se preparó suspendiendo las pastillas celulares en agua destilada estéril hasta obtener una densidad óptica de 0.5 ( $A_{600}$ ), equivalente a  $1 \times 10^8$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$ . El consorcio bacteriano se preparó mezclando proporciones iguales (0.5 mL) de cultivo puro de cada una de las cepas. La prueba de degradación se realizó en frascos de 200 mL con 30 mL de medio mineral (Rennie, 1981 modificado por Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007) suplementado con 300  $\mu\text{L}$  de diésel e incubados a 28 °C, 180 rpm, por ocho días.

La extracción de cada cultivo se obtuvo agregando 30 mL de hexano grado HPLC (J.T. Baker®) y con agitación en vórtex durante 10 min. De cada cultivo se tomó 1 mL de la fase orgánica. La cuantificación y análisis de abundancia de diésel en medio líquido fue realizado mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), con base al procedimiento descrito por González-Paredes *et al.* (2013).

#### **4.2.7. Análisis estadístico**

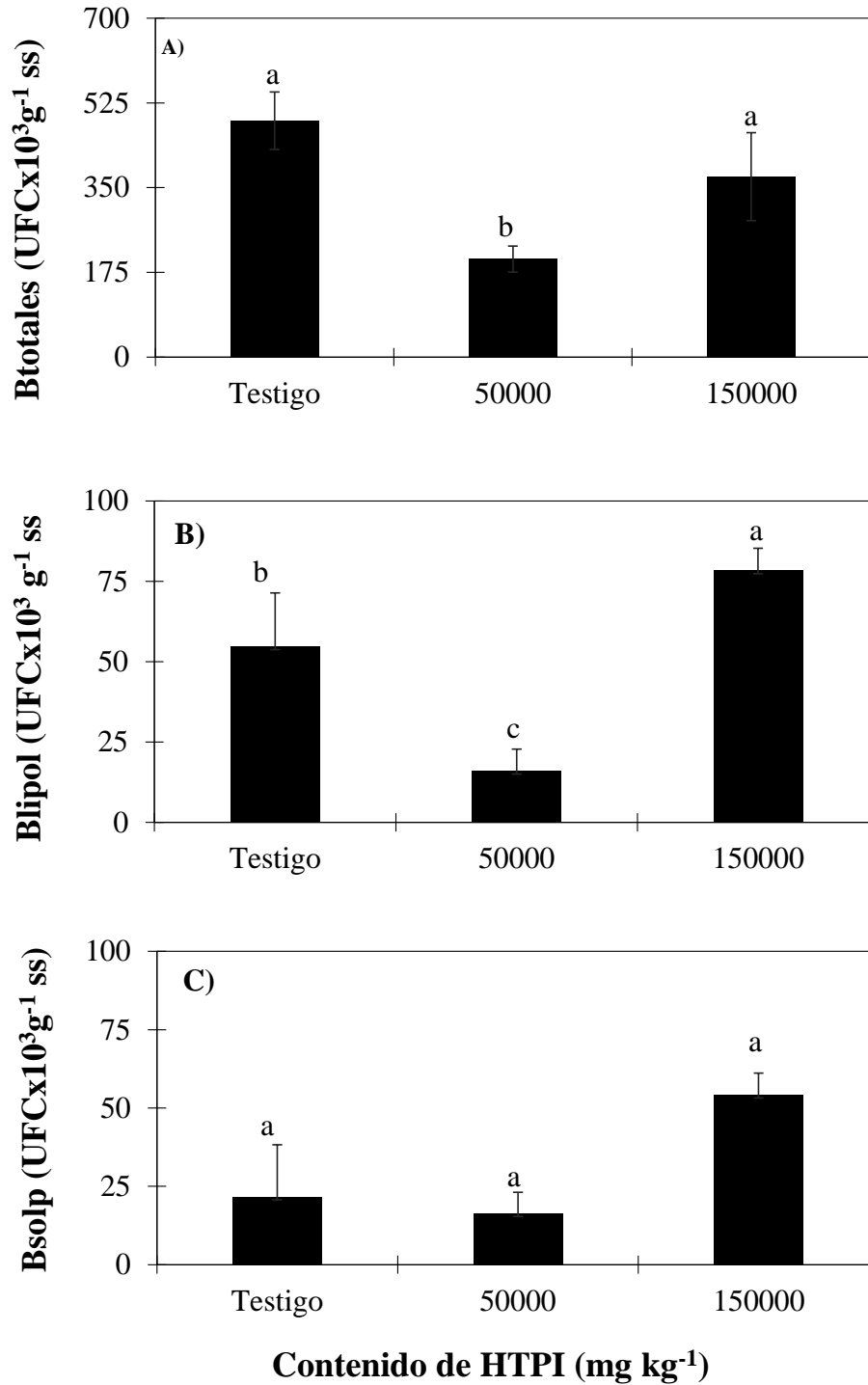
Se utilizó el promedio de cinco repeticiones para estimar las poblaciones microbianas ( $\text{UFC g}^{-1}$  de suelo), mediante un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD,  $P \leq 0.05$ ), utilizando el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2002).

### **4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.3.1. Poblaciones bacterianas**

La mayor población de bacterias totales, se encontró en el suelo testigo, seguido del suelo altamente contaminado; en contraste, el suelo medianamente contaminado mostró la menor población. La disminución de las bacterias totales observada en los suelos contaminados fue del 23.67 y 58.51% con respecto al testigo (Figura 4.1a). La población de Blipol fue estimulada por el suelo altamente contaminado respecto al suelo testigo; mientras que, el suelo medianamente contaminado mostró una reducción del 43.32% con respecto al suelo testigo (Figura 4.1b). Las Bsolp no mostraron diferencias significativas; sin embargo, la mayor población se observó en el suelo altamente contaminado (Figura 4.1c).

Las BFN y BFND mostraron resultados similares, observándose mayor población en el suelo altamente contaminado respecto al suelo testigo y al suelo medianamente contaminado (Figura 4.2). Estos resultados pueden atribuirse a la capacidad inherente de resistencia y adaptabilidad de las bacterias a niveles altos de contaminación, utilizando a los hidrocarburos como fuente de carbono y energía. Estudios previos han demostrado que diferentes tipos y concentraciones de hidrocarburos favorecen el incremento de la comunidad microbiana, y una reducción en la diversidad, debido a la selectividad de algunos organismos capaces de adaptarse y utilizar nuevos sustratos, aunque algunos componentes tóxicos de los hidrocarburos podrían inhibir el crecimiento de ciertos grupos microbianos (Cappello *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2010 Castro-Mancilla *et al.*, 2013).



**Figura 4.1.** Comportamiento de la población de bacterias totales (BT) (A), bacterias lipolíticas, (Blipol) (B) y bacterias solubilizadoras de fósforo (Bsolp) (C), y cuantificadas en suelos con diferente concentración de petróleo intemperizado (50000 y 15000 mg k<sup>-1</sup> de HTPI). Las barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05), n = 4.

Al respecto, Abed *et al.* (2014a) reportaron mayor diversidad bacteriana predominando el phylum Proteobacteria, en suelos muy contaminados respecto a los suelos no contaminados. Los resultados obtenidos en el presente trabajo evidenciaron efectos negativos del suelo medianamente contaminado en los grupos bacterianos evaluados. Atlas (1991) indica que las poblaciones microbianas disminuyen por efecto de la contaminación del suelo, lo que coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

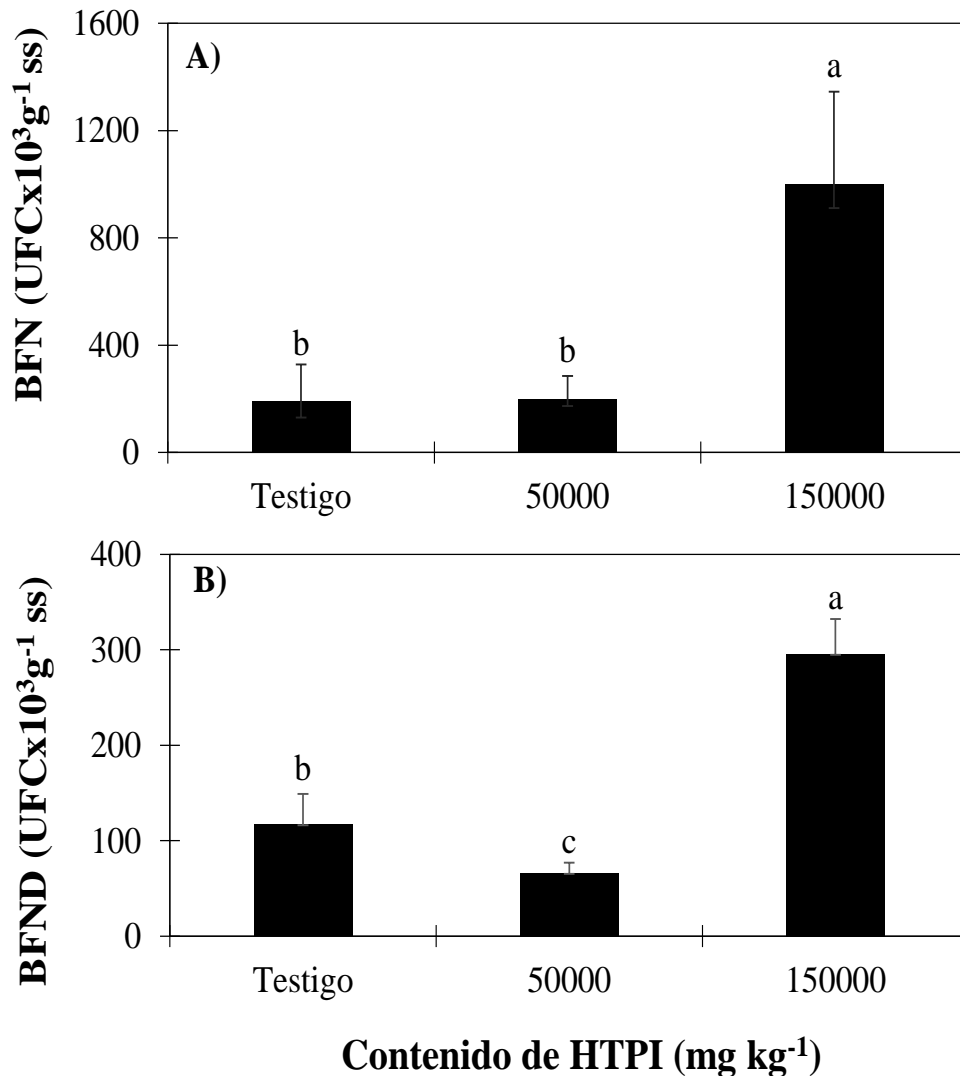
#### **4.3.2. Caracterización, selección de cepas productoras de surfactantes y actividad bioquímica.**

Trece cepas bacterianas morfológicamente distintas fueron aisladas de suelo no contaminados y del suelo con alta contaminación (150000 mg kg<sup>-1</sup>), cuya capacidad de liberar surfactantes fue evaluada. El 46% de estas bacterias mostraron actividad emulsificante, en tres de los cuatro métodos evaluados. Con base en este resultado se seleccionaron seis cepas bacterianas identificadas con las claves C11S1, C7S3, C4S3, C10S1, C5S3 y C5S3F (Cuadro 4.1.)

La Figura 4.3A muestra el índice de emulsificación ( $E_{24}$ ) de las cepas bacterianas seleccionadas. La cepa C7S3 presentó el índice de emulsificación más alto (74.2%), seguido de las cepas C4S3 y C11S1 con 60 y 57.9%, respectivamente. En contraste, los índices de emulsificación más bajos correspondieron a las cepas C5S3F, C5S3 y C10S1. Todas las cepas bacterianas produjeron una actividad emulsificante estable durante más de 78 h. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ibrahim *et al.* (2013) quienes reportaron valores altos de emulsificación (>50%) en *Serratia marcescens*, *Bacillus firmus*, *B. lentus* y *P. paucimobilis*. Chandankere *et al.* (2014) identificaron a *Bacillus methytrophycus* USBa como una cepa capaz de emulsificar petróleo crudo en un 90% con respecto al surfactante químico SDS (dodecil sulfato de sodio). En contraste, *Actinomycetes nocardioipsis* A17 tiene la capacidad de emulsificar keroseno

hasta en 92% (Chakraborty *et al.*, 2015). Además, resultados similares a los obtenidos en esta investigación se han reportado en las bacterias *Sphingomonas*, *Bacillus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *S. marcescens*, *Micrococcus kristinae*, así como en *Rhodococcus* (Banat, 1995; Nasr *et al.*, 2009; Bayoumi *et al.*, 2010; Shavandi *et al.*, 2011).

La hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana (HSC), de las seis cepas obtenidas de suelos contaminados varió de 7 hasta 173%. Las cepas C7S3 y C5S3 mostraron la mayor hidrofobicidad (173.84 y 81.87%), respecto a C4S3, C5S3F C10S1 y C11S1, que presentaron los porcentajes más bajos (HSC<16%) (Figura 4.3B). Resultados similares fueron descritos por Salek *et al.* (2013) al evaluar la hidrofobicidad de *Pseudomonas stutzeri* en presencia de diésel. Por su parte, Hesham *et al.* (2014) reportaron que *Sphingomonas koreensis* ASU-06 mostró valores de hidrofobicidad de hidrocarburos poliaromaticos del 37 al 65%. La hidrofobicidad de la superficie celular afecta la unión directa entre las células bacterianas y los hidrocarburos, condición que puede ser cambiada con la producción de surfactantes o emulsificantes por microorganismos para aumentar el proceso de biodegradación (Zhao *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2013; Hassanshahian *et al.*, 2014; Sakthipriya *et al.*, 2015). Este efecto fue observado en el presente trabajo en la cepa C7S3 la cual mostró la capacidad de cambiar la hidrofobicidad del diésel.



**Figura 4.2.** Poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (BFN) (A), bacterias hidrocarbonoclastas (BFND) (B), y cuantificadas en suelos con diferente concentración de petróleo intemperizado (50000 y 15000 mg kg<sup>-1</sup> HTPI) (C). Las barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ),  $n = 4$ .

La técnica cualitativa del colapso de la gota, se evaluó de forma visual, para detectar la producción de biosurfactantes, y demostró que el 53% de las cepas evaluadas tuvieron reacción positiva (Cuadro 4.1). Estos resultados coinciden con Sarafin *et al.* (2014) quienes reportaron a *Kocuria marina* BS-15 y *Kurthia* sp. (Ku) con actividad positiva en la producción de biosurfactantes al utilizar este método; a su vez, Ben-Ayed *et al.* (2015) reportaron efectos



similares en *Bacillus amyloliquefaciens* AN6. Lo anterior permite concluir que este método cualitativo permite detectar bacterias con alto potencial para producir biosurfactantes. La prueba de dispersión de aceite es una medida indirecta de la actividad de superficie que tiene un surfactante respecto al hidrocarburo (Ibrahim *et al.*, 2013); sin embargo, los resultados obtenidos en este método fueron considerados como negativos (Cuadro 4.1).

Este resultado posiblemente se debió a que el volumen de diésel utilizado (20 µL) no fue suficiente para ocasionar un contraste sobre la superficie del agua, el cual permitiera observar el halo de desplazamiento. Por ejemplo, Roy *et al.* (2015), Luna *et al.* (2015), y Deepika *et al.* (2016) reportaron resultados positivos al evaluar la producción de biosurfactantes utilizando la prueba de dispersión de aceite utilizando petróleo crudo. De acuerdo con las pruebas bioquímicas evaluadas, las cepas bacterianas dieron negativo en la prueba catalasa y oxidasa; con formas coloniales circulares, bordes enteros, texturas pastosas, productoras de AIA y gram-negativas (Cuadro 4.1).

#### **4.3.3. Identificación de las cepas bacterianas productoras de biosurfactantes**

Las cepas bacterianas fueron identificadas como *Serratia marcescens* (C7S3), *Citrobacter freundii* (C4S3), *Serratia marcescens* (C11S1), *Stenotrophomonas maltophilia* (C10S1), *Stenotrophomonas pavanii* (C5S3F), y *Raoultella ornithinolytic* (C5S3) respectivamente. Las secuencias completas se depositaron en la base de datos del GenBank, cuyos números de acceso se mencionan en el Cuadro 4.1.

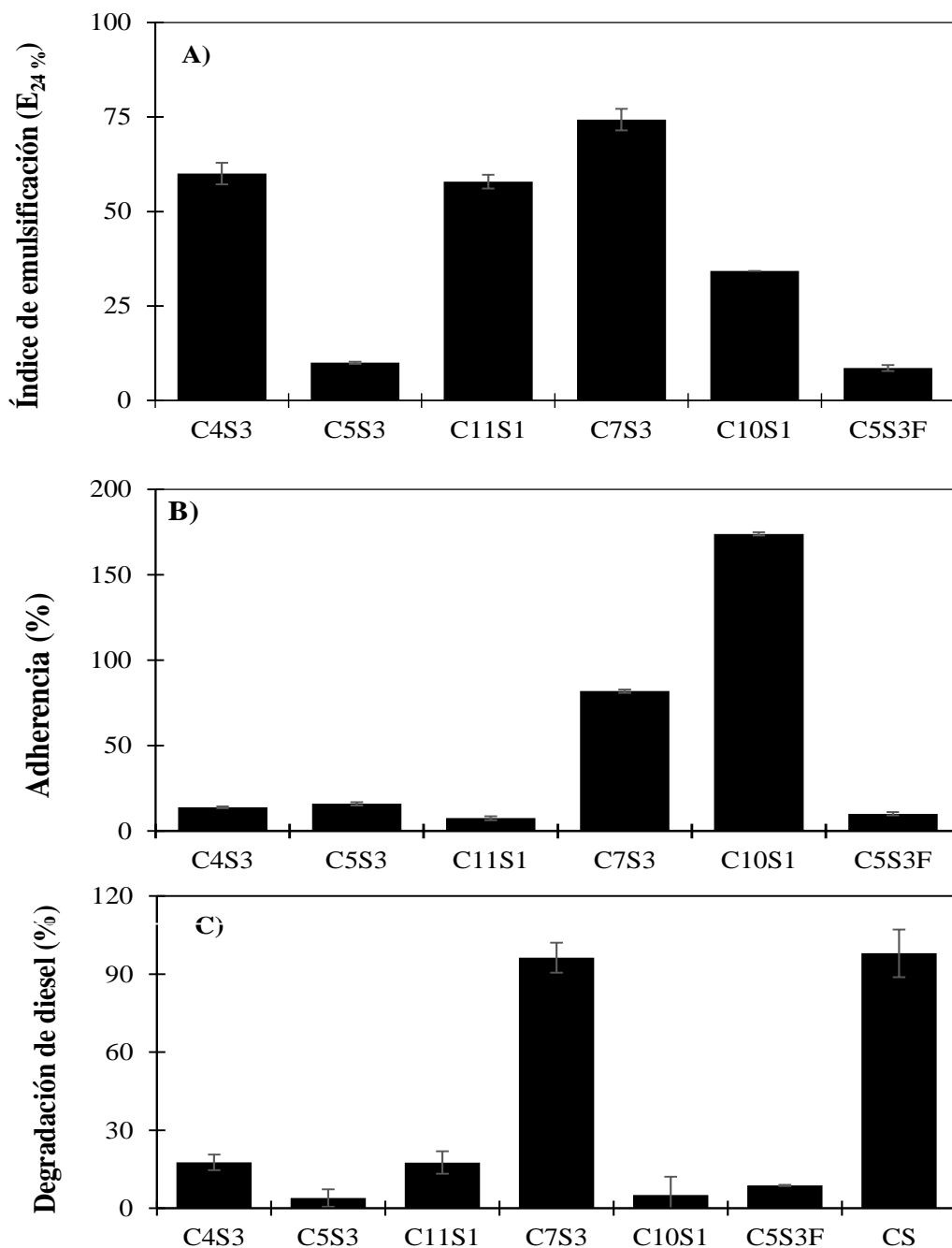
#### **4.3.4. Biodegradación de diésel por las cepas bacterianas.**

Todas las cepas bacterianas mostraron la capacidad de crecer y utilizar el diésel como fuente de carbono y energía, al mostrar capacidad de degradación, destacando el consorcio bacteriano y la cepa *Serratia marcescens* (C7S3) con 97.98 y 96.25% de degradación respectivamente, seguidos de las cepas *Citrobacter freundii* (C4S3) y *Serratia marcescens* (C11S1) con 17% de

degradación, en promedio; en contraste las cepas *Stenotrophomonas maltophilia* (C10S11), *Stenotrophomonas pavanii* (C5S3F), y *Raoultella ornithinolytica* (C5S3), presentaron una degradación menor al 9% (Figura 4.3C). Raju *et al.* (2016) reportaron un consorcio mixto de bacterias y hongos con capacidad para eliminar hidrocarburos totales del petróleo en un 87%.

Por su parte, Souza *et al.* (2015) reportaron 69% de biodegradación al utilizar un consorcio integrado por *Staphylococcus saprophyticus*, *Serratia marcescens*, *Rhodotorula aurantiaca* y *Candida ernobi*. Mu-Tai *et al.* (2012) reportaron 79% de degradación de petróleo crudo al utilizar *Ochrobactrum* sp. N1, *Brevibacillus parabrevis* N2, *B. parabrevis* N3 y *B. parabrevis* N4.

La capacidad degradativa de una sola cepa bacteriana no es comparada con la degradación generada por un consorcio bacteriano; sin embargo, la degradación de diésel obtenida con la cepa *Serratia marcescens* (C7S3) en el presente trabajo, fue similar a la obtenida con el consorcio. Resultados similares han sido reportados por Zhang *et al.* (2000), Nalini y Parthasarathi, (2013) y Montero-Rodríguez *et al.* (2015) al demostrar la capacidad *Pseudomonas*, *Serratia rubidaea* y *Serratia marcescens* de producir biosurfactantes y biodegradar diferentes hidrocarburos (>36%). Las bacterias que liberan biosurfactantes se caracterizan por producir mayor degradación de los hidrocarburos (Banat *et al.*, 2000; Bento *et al.*, 2005; Ibrahim *et al.*, 2013; Montero-Rodríguez *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran buen potencial del consorcio bacteriano (CS) y de la cepa *Serratia marcescens* C7S3 (Sm) para degradar diésel. Además, la capacidad de emulsificar, liberar biosurfactantes, producir AIA y biodegradar diésel por parte de *Serratia marcescens*



### Cepas bacterianas

**Figura 4.3.** Índice de emulsificación (E<sub>24</sub>%) (A), hidrofobicidad de la superficie celular a las 48 h (B), y (C) porcentaje de degradación de diésel. *Citrobacter freundii* (C4S3), *Raoultella ornithinolytica* (C5S3), *Serratia marcescens* (C11S1), *Serratia marcescens* (C7S3), *Stenotrophomonas maltophilia* (C10S1), *Stenotrophomonas pavanii* (C5S3F), y el consorcio bacteriano (CS) en un periodo de 8 días. Barras±error estándar; n = 4.

C7S3 (Sm), le permiten poder ser utilizada a futuro para reducir la fitotoxicidad ocasionada por los hidrocarburos, así como para su uso en procesos de biorremediación o fitorremediación (Glick, 2010; Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2016).

Este aspecto puede ser beneficioso, especialmente en los suelos con hidrocarburos intemperizados, en los cuales la disponibilidad de los hidrocarburos es baja en comparación con los suelos con reciente contaminación (Truu *et al.*, 2015). La capacidad de las bacterias para degradar, promover el crecimiento de las plantas y mejorar la biodisponibilidad de hidrocarburos a través de la producción de biosurfactantes, es crucial para reducir la toxicidad y mejorar la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo intemperizado, como es el caso de los suelos contaminados en el estado de Tabasco.

#### 4.4. CONCLUSIONES

El suelo altamente contaminado mostró mayor población de bacterias totales, BFN, BFN-hidrocarbonoclastas, bacterias lipolíticas y bacterias solubilizadoras de fósforo. A partir de las 13 cepas bacterianas seleccionadas, sólo seis (46% de ellas) produjeron surfactantes. *Serratia marcescens* (C7S3) se caracterizó por producir mayor porcentaje de emulsificación (74%), y mayor degradación de diésel (96%), con respecto a las cinco cepas restantes. El consorcio bacteriano integrado por las seis cepas bacterianas degradó 97% de diésel.

Cuadro 4.1. Identificación, actividad bioquímica y biosurfactante de bacterias aisladas de la Venta, Tabasco México

Identificación genética de las cepas bacteriana		Pruebas y bioquímicas						Métodos de detección de biosurfactantes	
Clave de las cepas bacterianas	Especie y géneros	Número de accesoión GENBANK	Porcentaje de similitud (%)	Gram	Indoles	catalasa	oxidasa	CPG	DPH
C5S3F	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	NR_041577.1	99	-	+	-	-	+	-
C4S3	<i>Citrobacter freundii</i>	NR_028894.1	95	-	+	-	-	+	-
C11S1	<i>Serratia marcescens</i>	NR_114043.1	96	-	+	-	-	+	-
C5S3	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	NR_102983.1	97	-	+	-	-	+	-
C7S3	<i>Serratia marcescens</i>	NR_114043.1	96	-	+	-	-	+	-
C10S1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NR_041577.1	97	-	+	-	-	+	-

Abreviaturas: CPG = Colapso de gota; DPH = Desplazamiento de los hidrocarburos; (-) = Actividad negativa; (+) = Actividad positiva.

## CAPÍTULO V

### EFECTO DE BACTERIAS EMULSIFICANTES EN LA ATENUACIÓN DE LA FITOTOXICIDAD DE SUELOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO INTEMPERIZADO

#### Resumen

Este trabajo evaluó la toxicidad de suelos (Gleysol) contaminados con hidrocarburos totales del petróleo intemperizado (HTPI) en plantas de *Clitoria ternatea* inoculadas con bacterias emulsificantes. Se usaron suelos con 50000 y 150000 mg HTPI kg<sup>-1</sup>, y un suelo testigo con 150 mg HTPI kg<sup>-1</sup> (origen biogénico), y la inoculación de seis bacterias y su combinación (consorcio). La fitotoxicidad de los HTPI se evaluó considerando la altura, la biomasa seca (radical, aérea y total), el área foliar, el área foliar específica, y la eficiencia del fotosistema II, a los 30 días. Los HTPI no afectaron la altura, pero el suelo con 50000 mg HTPI kg<sup>-1</sup> redujo la biomasa seca radical y total, y el área foliar con respecto a las plantas en los suelos testigo y con 150000 mg HTPI kg<sup>-1</sup>. Ninguna cepa bacteriana promovió la altura, la biomasa radical, ni el área foliar específica. La cepa Sml (*Stenotrophomonas maltophilia* C10S1) estimuló significativamente la biomasa seca aérea y total; la cepa Ro (*Rutella ornitholytica* C5S3) produjo mayor área foliar específica con respecto a plantas no inoculadas. En el suelo testigo, el consorcio bacteriano estimuló la altura; las cepas Sm (*Serratia marcescens* C11S1) y Sm2 (*S. marcescens* C7S3) mejoraron la altura y el área foliar específica con respecto a plantas no inoculadas, en suelo con 50000 mg HTPI kg<sup>-1</sup>. En el suelo con 150000 mg HTPI kg<sup>-1</sup>, las cepas Spa (*Stenotrophomonas pavanii* C5S3F) y Cfr (*Citrobacter freundii* C4S3) estimularon la biomasa seca radical y aérea. La eficiencia del fotosistema II no fue afectada por ningún suelo. Las bacterias redujeron la fitotoxicidad de HTPI, pero dependiendo del contenido de HTPI en los suelos.

**Palabras clave:** *Clitoria ternatea*, eficiencia fotosintética del PSII, Gleysol, bacterias. 54

## CHAPTER V

### DIESEL DEGRADATION BY EMULSIFYING BACTERIA ISOLATED FROM CONTAMINATED SOILS WITH WEATHERED PETROLEUM

#### Abstract

This study evaluated the toxicity of soils (Gleysol) contaminated with weathered petroleum hydrocarbons (WPH) on plants of *Clitoria ternatea* inoculated with emulsifying bacteria. Soils with 50000 and 150000 mg WPH kg<sup>-1</sup>, and a control soil with 150 mg WPH kg<sup>-1</sup> (biogenic origin) were utilized; the inoculation of six bacterial strains and their combination (consortium) was also used. Phytotoxicity of WPH was evaluated on the basis of determining plant height, leaf area, specific leaf area, and photochemical efficiency of photosystem II (PEPII), after 30 days. The WPH did not affect plant height, but soil with 50000 WPH kg<sup>-1</sup> diminished the root and total dry weight, and the leaf area when compared to the control soil and to the soil with 150000 mg WPH kg<sup>-1</sup>. None bacterial strain promoted the plant height, root dry weight, nor specific leaf area. The strain Sml (*Stenotrophomonas maltophilia* C10S1) significantly stimulates the shoot and total dry weight; the strain Ro (*Rutella ornitholytica* C5S3) produced high specific leaf area with respect to uninoculated plants. In control soil, the bacterial consortium stimulate plant height; the strains Sm (*Serratia marcescens* C11S1) and Sm2 (*S. marcescens* C7S3) enhanced plant height and the specific leaf area when compared to inoculated plants at soil with 50000 mg WPH kg<sup>-1</sup>. At soil with 150000 mg WPH kg<sup>-1</sup>, the strains Spa (*Stenotrophomonas pavanii* C5S3F) and Cfr (*Citrobacter freundii* C4S3) enhanced the roots and shoot dry weight. The PEPSII was unaffected by soil contamination. Bacteria reduced the phytotoxic effects of WP, but depending on the content of WPH in soils.

**Key words:** *Clitoria ternatea*, photochemical efficiency of PSII, Gleysol, bacteria.

## 5.1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el petróleo es una de las fuentes de energía más importantes para la economía mundial. En Tabasco la explotación de este recurso no renovable ha originado un impacto negativo en el ambiente (Barquín *et al.*, 2011). Tan solo entre 2000 y 2014, se registraron 7590 derrames de petróleo en el país (1.48 por día), de los cuales el 10.42% ocurrieron en Tabasco (PROFEPA, 2015).

Los contaminantes hidrofóbicos como los hidrocarburos del petróleo (HP), pueden ser adsorbidos en la matriz del suelo haciéndolos menos biodisponibles para microorganismos y plantas (Maletić *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2012). El tiempo de exposición de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) a las condiciones ambientales (inundación-sequía, temperaturas extremas, lixiviación y radiación solar) dan como resultado hidrocarburos totales del petróleo intemperizados (HTPI) los cuales son más complejos, recalcitrantes y menos biodisponibles (Gao, 2009; Maletić *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2012, Riveroll-Larios *et al.*, 2015). Estos HTPI se consideran tóxicos, lo cual puede ser un criterio importante al evaluar el impacto sobre las plantas y microorganismos del suelo (Adams *et al.*, 2011b). Además, Alexander (1999) propuso que la toxicidad de los hidrocarburos como el principal criterio para evaluar la remediación de suelos. Algunas especies vegetales son utilizadas como bioindicadoras de toxicidad de suelos contaminados con hidrocarburos. La fitotoxicidad se manifiesta como necrosis del follaje, y raíz, ocasionando la disminución en la actividad fotosintética, reducción de la biomasa aérea, e incluso la muerte de la planta (Chaineau *et al.*, 1997; Adam y Duncan, 2002). Las especies utilizadas en la fitorremediación incluyen gramíneas y leguminosas (Khan *et al.*, 2013); aunque las leguminosas son más susceptibles que las gramíneas a sufrir daños severos por exposición a los HTPI en el suelo, por lo que pueden ser utilizadas como indicadoras de toxicidad inducida por estos



compuestos (Sangabriel *et al.*, 2006; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2013). Los bioensayos de fitotoxicidad son utilizados para medir la respuesta fisiológica de las plantas a diferentes concentraciones de HTPI, y para evaluar la eficacia de los procesos de remediación (Molina-Barahona *et al.*, 2005; Adam y Duncan 2002; Balseiro-Romero y Monterroso, 2014; Cartmill *et al.*, 2014).

La toxicidad de los hidrocarburos del petróleo hacia las plantas puede ser atenuada mediante el uso de rizobacterias y microorganismos endófitos productoras de surfactantes, degradadoras de hidrocarburos y productoras de fitohormonas (Khan *et al.*, 2013). Las bacterias productoras de surfactantes mejoran la dispersión y favorecen la remoción de los compuestos del petróleo, mediante procesos de emulsificación que permiten que sean utilizados como co-sustrato y fuente de energía para satisfacer el metabolismo microbiano, con ello se incrementa la degradación de los hidrocarburos del petróleo, y se favorece el crecimiento vegetal (Hassanshahian *et al.*, 2012; Chandankere *et al.*, 2014; Onur *et al.*, 2015). *Clitoria ternatea* L. (Fabaceae) es una leguminosa que se adapta a varios tipos de suelos, se emplea como forraje debido a su alto contenido de proteína, y como mejoradora de suelos agrícolas, esta especie de planta ha demostrado crecer en suelos contaminados con hidrocarburos y presentar tolerancia a concentraciones menores a 5000 mg kg<sup>-1</sup> de combustóleo (Bogdan, 1977; Peralta, 1988; Sangabriel *et al.*, 2006).

Debido a la importancia ambiental de *C. ternatea* en la restauración de suelos degradados, así como la contribución de bacterias emulsificantes en la degradación de hidrocarburos, ambos elementos biológicos constituyen una alternativa potencial de bajo costo y amigable con el ambiente en la atenuación de la toxicidad de los suelos crónicamente contaminados. Por lo anterior, la presente investigación evaluó la fitotoxicidad de un Gleysol contaminado de origen, con diferentes

concentraciones de petróleo intemperizado, recolectado en la Venta Tabasco México, en el crecimiento de plantas de *Clitoria ternatea*, inoculadas con bacterias emulsificantes.

## **5.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.2.1. Área de estudio y recolecta del suelo**

Se seleccionaron dos suelos (Gleysol) contaminados con hidrocarburos totales del petróleo intemperizado (HTPI): A) 50000 mg kg<sup>-1</sup> y B) 150000 mg kg<sup>-1</sup>, recolectados en el ejido José Narciso Roviroso en el área aledaña al sur del Complejo Procesador de Gas La Venta, en el estado de Tabasco (18° 4'39.83"N, 94° 2'39.42"O y 18° 4'39.22"N 94° 2'38.46"). Además, se utilizó un suelo testigo (150 mg kg<sup>-1</sup> de hidrocarburos de origen biogénico) recolectado del ejido Blasillo Huimanguillo Tabasco (18° 3'9.35" N 93°55'59.34" O). En los tres suelos se realizó un muestreo puntual del horizonte superficial (0-30 cm), de acuerdo con las indicaciones establecidas en la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002).

### **5.2.2. Determinación de parámetros físicos y químicos del suelo**

Las muestras de cada suelo se secaron bajo sombra a temperatura ambiente, se molieron con mazo de madera y se tamizaron en mallas de 0.5 y 2 mm de apertura. En cada muestra se determinó, el pH (potenciometría), contenido de materia orgánica (Walkley y Black, 1934); la capacidad de intercambio catiónico (CIC, extracción con acetato de amonio 1 N [pH 7]), fósforo aprovechable (Método Olsen), el contenido de nitrógeno total (N-total), y la textura (Bouyoucos), de acuerdo con los métodos analíticos especificados en la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002).

### **5.2.3. Análisis de hidrocarburos totales del petróleo**

El contenido de hidrocarburos totales del petróleo intemperizados (HTPI) de las muestras colectadas se extrajeron en equipo soxhlet usando diclorometano (Sigma-Aldrich®) como

solvente con el método EPA 3540B (USEPA, 1996). Las muestras se acidificaron con HCl a pH 2 y después se secó con MgSO<sub>4</sub>. El solvente se evaporó y el extracto se cuantificó por gravimetría (mg kg<sup>-1</sup>) (DOF, 2006).

#### **5.2.4. Material microbiológico**

Se utilizaron seis cepas bacterianas previamente aisladas de los suelos contaminados HTPI (ver Capítulo IV): *Serratia marcescens* C11S1 (Sm), *Citrobacter freudii* C4S3 (Cfr), *Serratia marcescens* C7S3 (Sm2), *Rutella ornitholyticam* C5S3 (Ro), *Stenotrophomonas pavanii* C5S3F (Spa), *Stenotrophomonas maltophilia* C10S1 (Sml), y un consorcio integrado por la combinación de estas seis bacterias (Cs).

#### **5.3.5. Preparación de los inóculos**

Cada una de las cepas fue cultivada en medio Luria-Bertani (g L<sup>-1</sup>: 10 Triptona, 5 extracto de levadura, 5 NaCl, 1 L-triptofano), a 28 °C por 72 h; posteriormente, se centrifugaron a 7000 x g durante 15 min para separar la pastilla bacteriana del medio de cultivo, la cual se lavó dos veces con agua destilada estéril. Cada inóculo se preparó suspendiendo las pastillas bacterianas en agua destilada estéril hasta obtener una densidad óptica de 0.5 (A600), equivalente a 108 UFC mL<sup>-1</sup>. El consorcio bacteriano se preparó mezclando proporciones iguales (0.5 mL) de cultivo puro de cada una de las cepas.

#### **5.2.6. Establecimiento del experimento e inoculación de las bacterias**

Las semillas de *Clitoria ternatea* fueron recolectadas en el estado de Veracruz, México; las cuales mostraron 95% de germinación. La siembra se realizó en charolas de poliestireno con 10 cavidades por tratamiento, cada cavidad fue considerada como una unidad experimental (UE). En cada UE se sembraron dos semillas en un sustrato conformado por cada suelo (Testigo, 50000 y 150000 mg HTPI kg<sup>-1</sup>), las cuales fueron inoculadas con 5 mL del respectivo inóculo bacteriano

correspondiente. Se hicieron riegos controlados con agua destilada para mantener el suelo a capacidad de campo (28-30%). Las plantas se mantuvieron en invernadero durante 30 días después de la inoculación.

### **5.2.7. Variables de crecimiento vegetal y eficiencia del fotosistema II**

Las plantas fueron cosechadas para evaluar la altura, la biomasa seca total, el área foliar y el área foliar específica. El área foliar ( $\text{cm}^2$ ) se obtuvo con la medida de la superficie de las hojas fotosintéticamente activas mediante el medidor de área foliar marca LICOR (LI 3000, Inc. Lincoln, NE, EUA). El área foliar específica se estimó dividiendo el área foliar entre el peso seco de las hojas ( $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$ ). Las hojas, tallos y raíces se secaron en un horno (FELISA, Modelo 242-A, D.F. México) a  $70^\circ\text{C}$  por 72 h hasta obtener peso constante para determinar la biomasa seca total.

La eficiencia fotoquímica del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) se evaluó con un fluorómetro portátil (fluorómetro OS-30p+Opti-Sciences, USA) a temperatura ambiente. Para ello, se seleccionó la hoja recientemente madura de cada planta y se cubrió previamente con un clip foliar por 15 min para adaptarla a la oscuridad. La emisión de fluorescencia de la clorofila corresponde al rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria cuando todos los centros de reacción del fotosistema II están oxidados o "abiertos", y se expresa como la relación de fluorescencia variable y fluorescencia máxima ( $F_v/F_m$ ) (Bramley *et al.*, 2014).

### **5.2.8. Diseño experimental y análisis estadístico**

El experimento tuvo un diseño factorial  $3 \times 8$ , con tres niveles de contaminación del suelo (Testigo, 50000 y 150000  $\text{mg kg}^{-1}$ ), y ocho niveles de inoculación (*Serratia marcescens* C11S1 (Sm), *Citrobacter freundii* C4S3 (Cfr), *Serratia marcescens* C7S3 (Sm2), *Rutella ornitholyticam* C5S3 (Ro), *Stenotrophomonas pavanii* C5S3F (Spa), *Stenotrophomonas maltophilia* C10S1 (Sml), y el consorcio bacteriano (Cs), más un tratamiento sin inoculación), obteniendo un total de

24 tratamientos, con seis repeticiones cada uno. Los datos obtenidos en cada variable fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD,  $P \leq 0.05$ ) mediante el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2002), y la estimación del error estándar para cada media de cada tratamiento.

### **5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **5.3.1. Propiedades físicas y químicas de los suelos**

Las propiedades físicas y químicas de los suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, condicionan las técnicas de remediación a utilizar, y capacidad microbiana para degradar los compuestos (Hernández-Acosta *et al.*, 2006). De acuerdo con la clasificación que establece la NOM-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002), los suelos utilizados en el presente trabajo presentaron un pH muy ácido a ligeramente ácido (<5 a 6.5), la materia orgánica, la capacidad de intercambio catiónico, contenido de nitrógeno total y de fósforo mostraron concentraciones de altas a muy altas (Cuadro 5.1). Los suelos se consideraron salinos y ligeramente salinos (2-4 dSm<sup>-1</sup>), con textura franco-arcillosa, y franco-arcillo-arenosa, los cuales son considerados como suelos con alta fertilidad de acuerdo a Palma-López *et al.* (2006). Las características físicas y químicas mencionadas son adecuadas para la biodegradación HTPI, debido al alto contenido de materia orgánica, de nitrógeno y de potasio, mismos que son requeridos para el crecimiento microbiano y para desarrollo de las plantas (Cuadro 5.1). Además, la textura franco-arcillo-arenosa de los suelos con mayor contenido de HTPI favorece la aeración y el contacto entre los microorganismos con los hidrocarburos, y con ello se estimula el proceso de biodegradación (Cookson, 1995; Riser-Roberts, 1998; Hernández-Acosta *et al.*, 2006; García *et al.*, 2012; Balseiro-Romero y Monterroso, 2014).

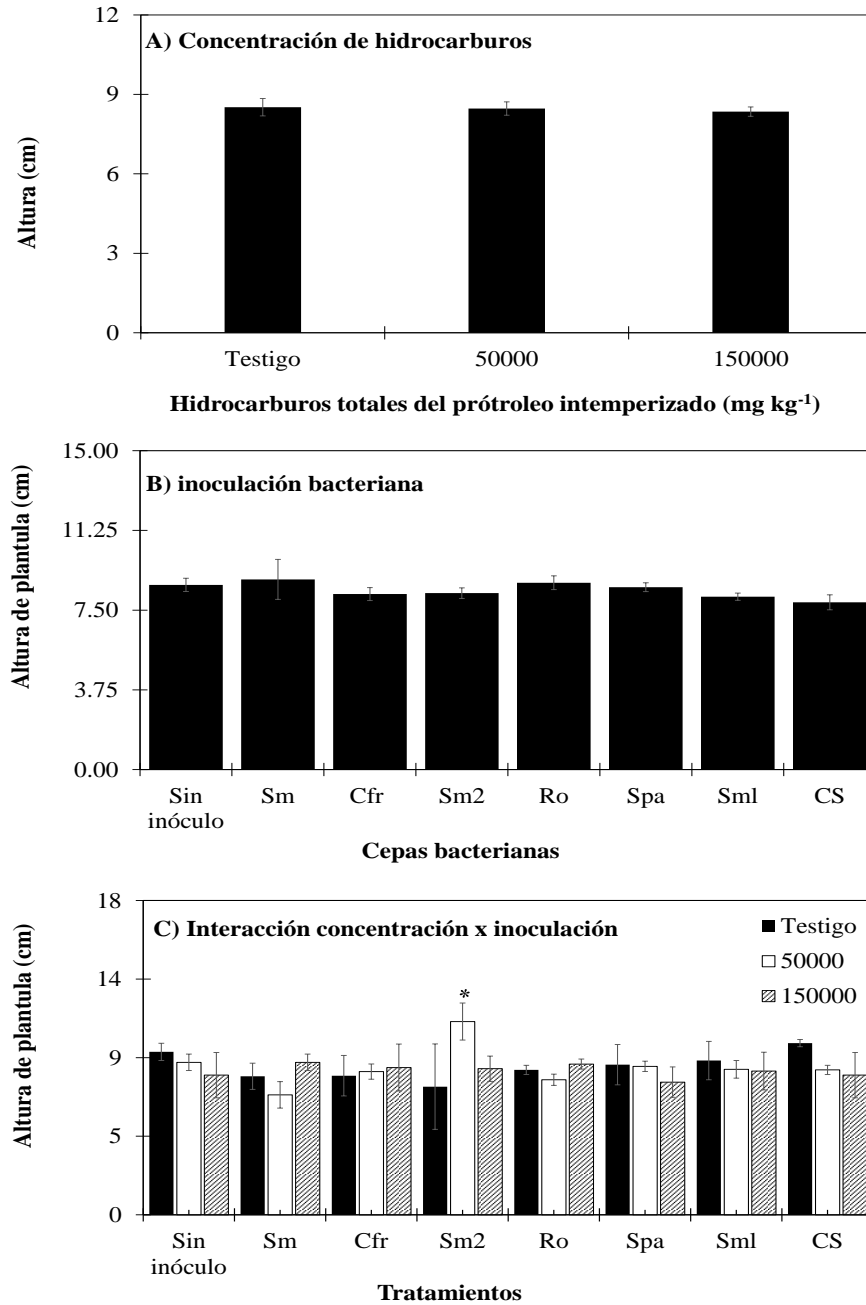
**Cuadro 5.1.** Características físicas y químicas de los tres suelos en estudio

Suelo	pH	MO	CE	CIC	K	N-total	Textura
HTPI mg kg <sup>-1</sup>		%	dSm <sup>-1</sup>	Cmol(+)kg <sup>-1</sup>	Mg kg <sup>-1</sup>	%	%
150	6.5	8.6	1.12	57	192	0.49	Franco arcillosa
50000	5	7.9	4.73	29.9	184	0.39	Franco arcilloso arenosa
150000	5.5	26.2	2.93	62.3	312	0.59	Franco arcilloso arenosa

MO = Materia orgánica, CE= conductividad eléctrica; CIC = Capacidad de intercambio Catiónico, P = Fósforo, N-Total = Nitrógeno total, HTPI = Hidrocarburos totales del petróleo intemperizado. Los resultados obtenidos fueron comparados con los rangos de referencias establecidos en la NOM-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002).

### 5.3.2 Crecimiento y eficiencia fotosintética del PSII de *Clitoria ternatea*

Los hidrocarburos del petróleo en el suelo son fitotóxicos, ya que inhiben la germinación de semillas y el crecimiento de algunas leguminosas (Adáms y Duncan, 2002; Kim, 2014; Balseiro-Romero y Monterroso, 2014). En la presente investigación la concentración de los HTPI y la inoculación bacteriana no produjeron diferencias significativas en la altura de *C. ternatea* (Figura 5.1A). La interacción de los factores (concentración x inoculación), mostró diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ); el suelo con 50000 mg HTPI kg<sup>-1</sup> inoculado con la cepa Sm2 produjo mayor altura de planta con respecto al testigo sin inocular (Figura 5.1B). Así mismo, el consorcio bacteriano favoreció la altura de las plantas crecidas en el suelo con 150 mg HTPI kg<sup>-1</sup> (Testigo) (Figura 5.1C). Los hidrocarburos del petróleo típicamente reducen el crecimiento de las plantas (López-Ortiz *et al.*, 2012; Díaz-Martínez *et al.*, 2013;



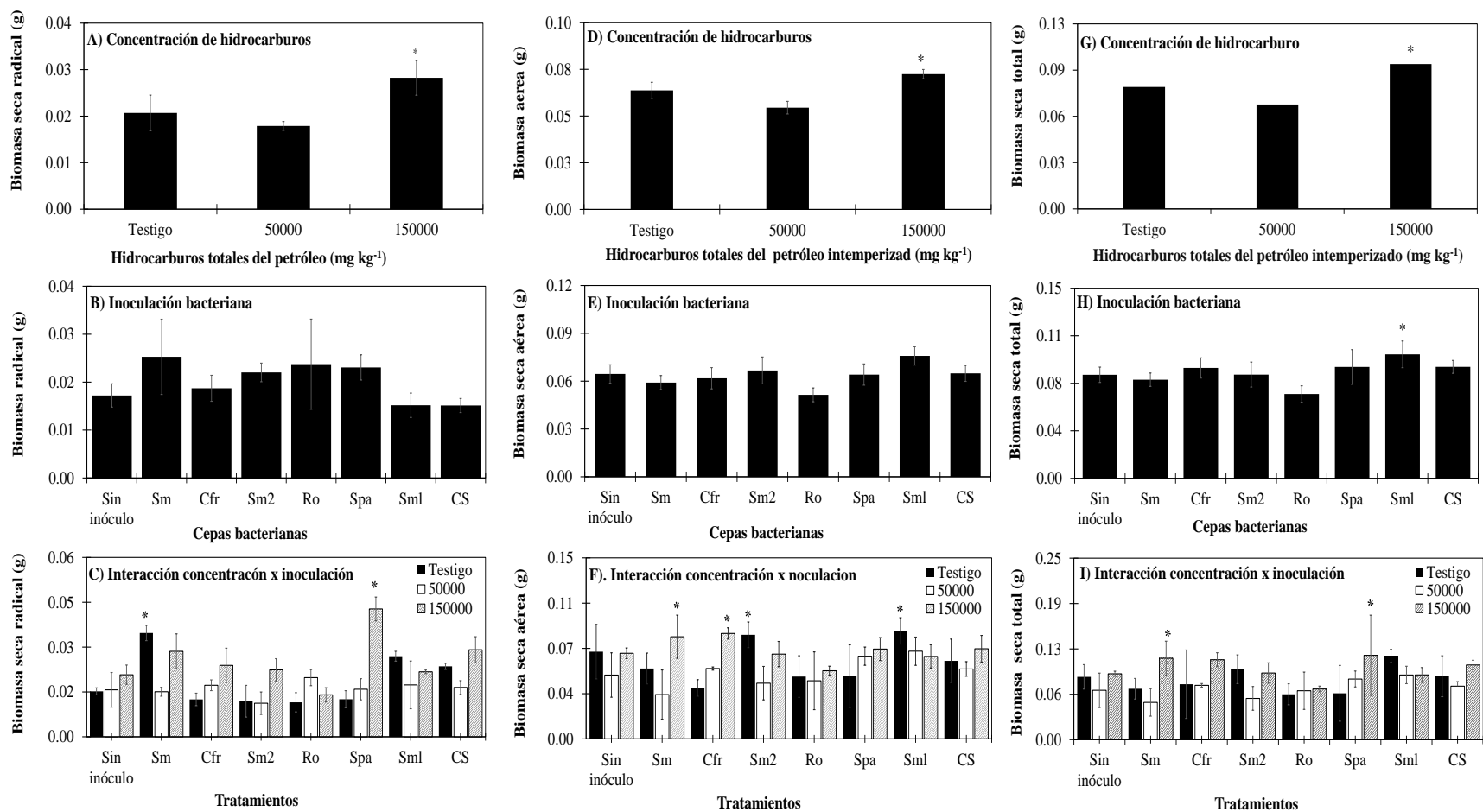
**Figura 5.1.** Altura de *Clitoria ternatea* crecidas en tres suelos con concentraciones de HTPI de la venta Tabasco (A) (n = 24), inoculación bacteriana (B) (n = 9), e interacción de los HTPI x inoculación bacteriana (C) (n = 3), después de 30 días. Medias  $\pm$  error estándar, n = 3. Barras con diferentes asteriscos son estadísticamente diferentes (LSD,  $P \leq 0.05$ ). Abreviaturas: *Serratia marcescens* C11S1 (Sm), *Citrobacter freudii* C4S3 (Cfr), *Serratia marcescens* C7S3 (Sm2), *Rutella ornitholyticam* C5S3 (Ro), *Stenotrophomonas pavanii* C5S3F (Spa), *Stenotrophomonas maltophilia* C10S1 (Sml), Cs = consorcio.

Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007); sin embargo, algunas plantas pueden sobrevivir ante estos contaminantes (Bramley-Alves *et al.*, 2014). Las fracciones de petróleo pueden acelerar el proceso de germinación de las semillas de algunas especies de plantas, ya que ciertos hidrocarburos funcionan como estimuladores del crecimiento (Salanitro *et al.*, 1997; Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia, 2004).

La biomasa seca (radical, aérea, y total) mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) por efecto del factor concentración de HTPI. Las plantas en el suelo con 150000 mg HTPI kg<sup>-1</sup> mostraron mayor biomasa seca con respecto al suelo testigo, por el contrario el suelo con 50000 mg HTPI kg<sup>-1</sup> redujo 15% la biomasa vegetal, en promedio (Figura 5.2A, D, y G). En contraste, la inoculación bacteriana solo mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en la biomasa seca aérea y total (Figura 5.2E, y H), destacando la cepa Sml al incrementar 17% la biomasa respecto a plantas sin inocular. La interacción de los dos factores mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en la biomasa seca (Figura 5.2C, F, y I). Las plantas en el suelo con 150000 mg HTPI kg<sup>-1</sup>, inoculadas con Spa, Sm, Cs y Cfr, mostraron mayor biomasa seca radical con respecto al tratamiento sin inóculo (Figura 5.2C). La biomasa seca aérea fue estimulada por Sps y Sml, en el suelo con 50000 mg HTPI kg<sup>-1</sup> con respecto a tratamiento sin inóculo (Figura 5.2F). La inoculación del suelo Testigo con las cepas Sm, Sm2 y Sml produjo mayor biomasa seca radical y aérea, con respecto al tratamiento sin inocular (Figura 5.2C y F).

Las propiedades físicas y químicas de los suelos influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas, cuyo sistema radical estimula la actividad microbiana y favorece la degradación de los hidrocarburos (Ma *et al.*, 2015). Contrario a lo esperado, el suelo con mayor concentración de HTPI (150000 mg HTPI kg<sup>-1</sup>) estimuló el crecimiento y la producción de biomasa vegetal. El efecto positivo de la concentración más alta de los HTPI en el crecimiento y desarrollo de *C.*





**Figura 5.2.** Biomasa seca radical, aérea y total de *Clitoria ternatea* crecidas en tres suelos con concentraciones de HTPI de la venta Tabasco (A, D y G) (n = 24), inoculación bacteriana (B, E y H) (n = 9), e interacción de los HTPI x inoculación bacteriana (C, F y I) (n = 3), después de 30 días. Medias ± error estándar, n = 4. Barras con diferentes asteriscos son estadísticamente diferentes (LSD, P ≤ 0.05). Abreviaturas: *Serratia marcescens* C11S1 (Sm), *Citrobacter freundii* C4S3 (Cfr), *Serratia marcescens* C7S3 (Sm2), *Rutella ornitholyticam* C5S3 (Ro), *Stenotrophomonas pavanii* C5S3F (Spa), *Stenotrophomonas maltophilia* C10S1 (Sml), Cs = consorcio.

*ternatea* obtenido en esta investigación, posiblemente se debió a su alto contenido de materia orgánica (26%), la cual puede adsorber los hidrocarburos del petróleo reduciendo su toxicidad y aumentando los procesos de transformación u oxidación biológica (mineralización), en combinación con la planta (rizorremediación) (Totsche *et al.*, 1997; Charman y Murphy, 2007; Adams *et al.*, 2015). En este sentido, Rodríguez-Rodríguez *et al.* (2016) atribuyen mayor biomasa aérea del pasto *Leersia hexandra* a procesos de hormesis producido por petróleo intemperizado, el cual lo inhibe en dosis mayores a 5500 mg kg<sup>-1</sup>, efecto similar fue reportado por Adams *et al.* (2015), quienes observaron mayor biomasa en pasto *Brachiaria humidicola* expuestas a concentraciones menores de 4000 mg kg<sup>-1</sup> de hidrocarburos intemperizados.

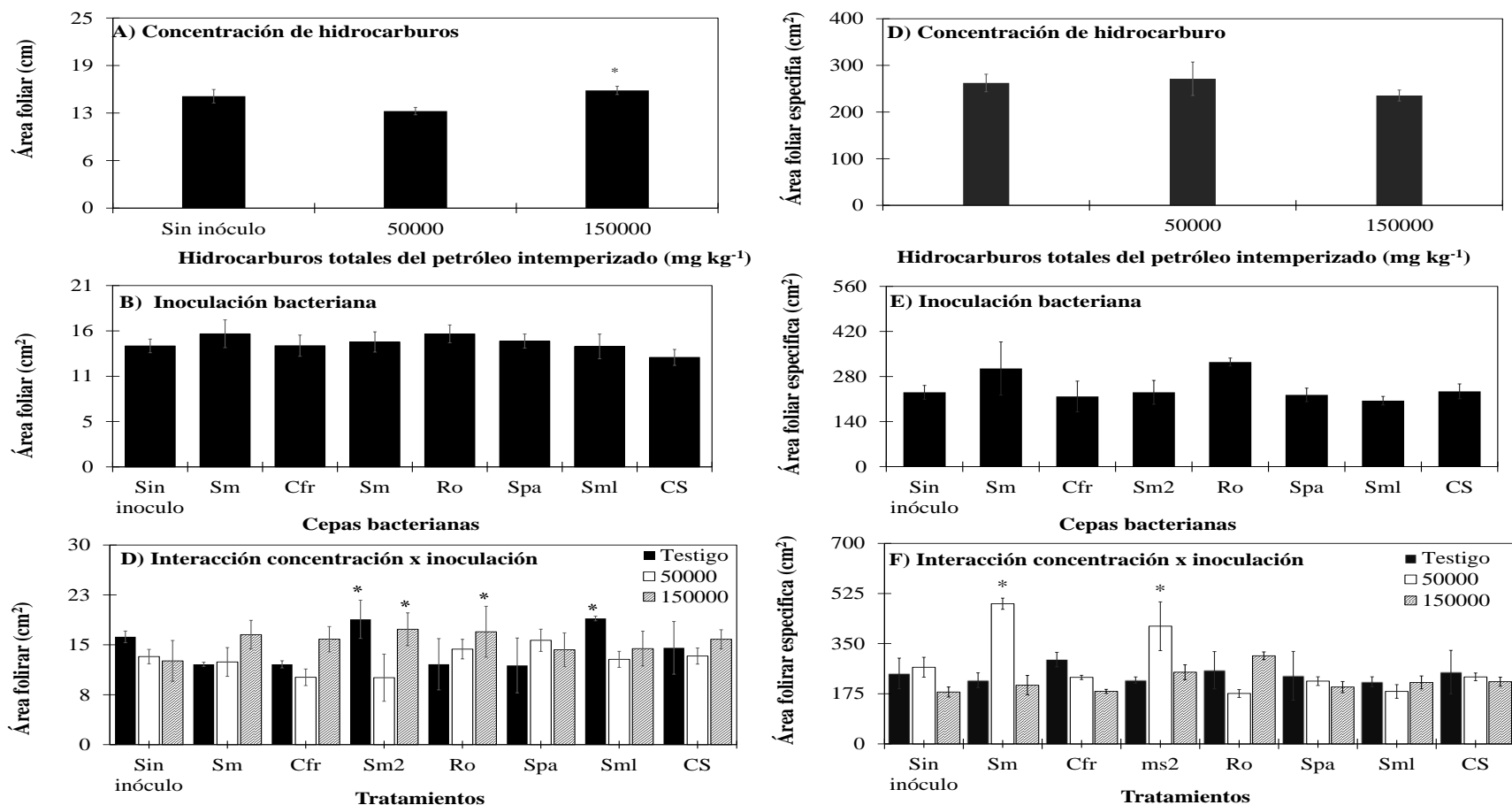
La nula toxicidad de los HTPI (150000 mg HTPI kg<sup>-1</sup>) observada en el crecimiento de *C. ternatea* también ha sido reportada para especies como *Poa foliosa*, *Leucaena leucocephala*, *Festuca arundinacea*, *Sorghum bicolor*, expuestas a los hidrocarburos alifáticos y aromáticos ( $\geq 5000$  mg kg<sup>-1</sup>) (Muratova *et al.*, 2009; López-Ortiz *et al.*, 2012; Bramley-Alves *et al.*, 2014).

La inoculación de las bacterias Sm, Sm2, Ro, y Spa estimularon la producción de biomasa seca radical. Este resultado posiblemente se debió a que tienen la capacidad de producir surfactantes el cual aumenta la degradación (ver Capítulo IV) y por ende, reducen la toxicidad de los HTPI. Estudios previos han demostrado que *Serratia marcescens* y *Stenotrophomonas maltophilia* tienen actividad nitrogenasa, y son capaces de solubilizar fosfatos, y producir ácido indolacético (AIA), además de tener actividad la enzima ACC-desaminasa (Mehnaz, *et al.*, 2010; Selvakumar *et al.*, 2008; Ahemad y Kibret, 2014). El AIA a menudo puede inducir un efecto benéfico sobre el crecimiento y el desarrollo de plantas o mejorar el estrés causado por los hidrocarburos, mediante la producción de la enzima ACC-desaminasa, la cual reduce los niveles de etileno de la planta, e induce mayor crecimiento y biomasa radical, lo que a su vez estimula el crecimiento de las

poblaciones microbianas y su actividad en la disponibilidad de nutrientes esenciales como el nitrógeno, fósforo y potasio (Glick *et al.*, 1998; Bashan *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Gurska *et al.*, 2009; Afzal *et al.*, 2011; Balseiro-Romero y Monterroso, 2014; Balseiro-Romero *et al.*, 2016). En este sentido, Khan *et al.* (2013) mencionan que las bacterias productoras de surfactantes pueden degradar hidrocarburos y con ello disminuir sus efectos fitotóxicos. Así, la inoculación de bacterias productoras de surfactantes como *Pseudomonas* sp ITRI53, *Planomicrobium chinence*, *Burkholderia phytofirmans* PsJN, y *Sphingobacterium* sp, reducen la fitotoxicidad de los hidrocarburos al mejorar el crecimiento y desarrollo de *Lolium perenne*, *Casuarina equisetifolia*, *Vigna radiata* y *Withania somnifera* al conferirles tolerancia a condiciones de estrés mediante la degradación de los contaminantes (Afzal *et al.*, 2013; Díaz-Martínez *et al.*, 2013; Das y Tiwary, 2014; Kumar *et al.*, 2014).

El área foliar fue estadísticamente mayor ( $P \leq 0.05$ ) en el suelo con 150000 mg HTPI  $\text{kg}^{-1}$  respecto al suelo testigo; por el contrario, el suelo con 50000 mg HTPI  $\text{kg}^{-1}$  redujo 13% el área foliar (Figura 5.3A). En cuanto a la inoculación, las cepas Sm, y Ro produjeron incrementos del 10% en el área foliar con respecto al testigo sin inoculación, aunque no se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos (Figura 5.3B). En cuanto a la interacción de los factores, el suelo testigo inoculado con las cepas Sm2, y Sml incrementaron significativamente el área foliar ( $P \leq 0.05$ ) con respecto al suelo testigo sin inoculación (Figura 5.3C). En el caso de suelo con 150000 mg HTPI  $\text{kg}^{-1}$  inoculado con las cepas Sm2 y Ro, el área foliar fue estimulada.

En lo que respecta al área foliar específica, el factor concentración de HTPI no mostró diferencias significativas entre tratamientos (Figura 5.3D). En contraste, la interacción de los dos factores (concentración x inoculación) mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ )



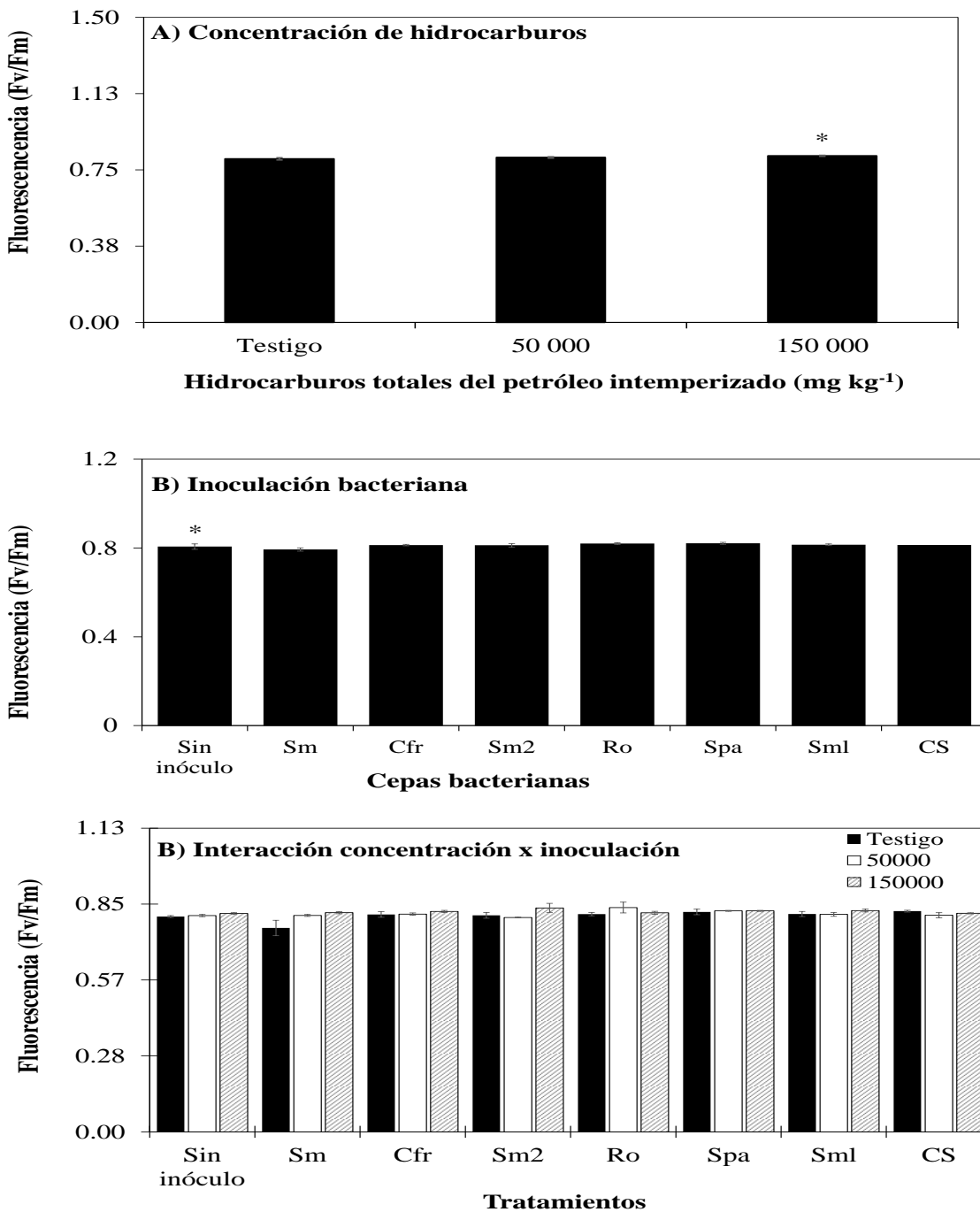
**Figura 5.3.** Área foliar y área foliar específica de *Clitoria ternatea* crecidas en tres suelos con concentraciones de HTPI de la venta Tabasco (A y D) (n = 24), inoculación bacteriana (B y E) (n = 9), e interacción de los HTPI x inoculación bacteriana (C y F) (n = 3), después de 30 días. Medias ± error estándar, n = 3. Barras con diferentes asteriscos son estadísticamente diferentes (LSD, P ≤ 0.05). Abreviaturas: *Serratia marcescens* C11S1 (Sm), *Citrobacter freudii* C4S3 (Cfr), *Serratia marcescens* C7S3 (Sm2), *Rutella ornitholyticam* C5S3 (Ro), *Stenotrophomonas pavanii* C5S3F (Spa), *Stenotrophomonas maltophilia* C10S1 (Sml), Cs = consorcio

(Figura 5.3F); el suelo con 50000 mg HTPI kg<sup>-1</sup> inoculado con las cepas Sm y Sm2, resultó en mayor área foliar (99 y 767 %) respecto al suelo testigo inoculado sin inocular (Figura 5.3E). El efecto negativo de los HTPI en el área foliar y área foliar específica se atribuye a la toxicidad de los hidrocarburos no biodegradados y recalcitrantes (compuestos cíclicos, aromáticos, asfaltenos y resinas), los cuales disminuyen el crecimiento de la raíz y por ende, disminuyen la biomasa aérea. Debido a lo anterior, es posible que el hidrocarburo forme una capa fina sobre la raíz de las plantas impidiendo la absorción de nutrientes y agua, esenciales para el crecimiento de la planta (Cartmill *et al.*, 2014). Resultados similares han sido descritos para *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Chloris gayana*, *Triticum aestivum*, *Phragmites australis*, *Arabidopsis*, *Lolium multiflorum*, *Poa foliosa*, *Cucumis melo*, *Capsicum frutescens*, *Solanum lycopersicum*, *Amaranthus hybridus*, cuando fueron expuestas a hidrocarburos aromáticos y poliaromáticos (Anoliefo y Nwoko, 1954, Odjegba y Sadiq, 2002; Agbogidi *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2008; García *et al.*, 2013; Cartmill *et al.*, 2014; Bramley-Alves *et al.*, 2014, Zhu *et al.*, 2015; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2016).

La eficiencia fotosintética (Fv/Fm) ha sido un indicador de la máxima eficiencia cuántica de las reacciones fotoquímicas del PSII (Butler, 1978). En plantas sanas y no estresadas, los valores oscilan entre 0.74 a 0.84 (Genty *et al.*, 1989). En el presente trabajo el máximo rendimiento del PSII no mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), por efecto de los factores (concentración de HTPI, inoculación e interacción de los dos factores) (Figura 5.4A, B y C), sin embargo, los valores oscilaron entre 0.74 a 0.82; el cual se considera como un rango óptimo de la eficiencia fotosintética del PSII (Genty *et al.*, 1989). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Shiri *et al.* (2015) y Bramley-Alves *et al.* (2014) al no observar efectos negativos en el máximo rendimiento cuántico del PSII (Fv/Fm) de *Thellungiella salsuginea*, *Poa foliosa* expuesta a fenantreno (25 mM) y combustible SAB (combustible Blend Antártico). Contrario a los resultados obtenidos en la

presente investigación, Kummerová *et al.* (2008) reportaron una disminución en la relación Fv/Fm, al aumentar en las concentraciones de fenantreno (0.05, 0.5 y 5 mM) y fluoranteno en *Witthania somnifera*. En este sentido, Jalal *et al.* (2015) observaron una disminución significativa en la relación Fv/Fm, después de la aplicación foliar de 100  $\mu$ M de fenantreno, y posibles efectos fotoinhibidores en el PSII.

De forma general, los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran que los hidrocarburos totales de petróleo intemperizado, a pesar de que han estado expuestos por más de 20 años a las condiciones ambientales, aún tienen efectos fitotóxicos, debido a su recalcitrancia que los hace menos susceptibles de ser degradados, y a la adsorción a la matriz del suelo, haciéndolos agentes potencialmente tóxicos, cancerígenos y mutagénicos para los seres vivos (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2016), aunque ciertas concentraciones (150000 mg HTPI  $\text{kg}^{-1}$ ) de este tipo de hidrocarburos parecen estimular el crecimiento vegetal. Lo que explica que la actividad fotosintética de la planta no fuera afectada por las concentraciones de los HTPI, lo que sugiere que no se produjo estrés oxidativo, el cual se caracteriza por la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que generan daños al causar la peroxidación de lípidos, ácidos nucleicos y consecuentemente, la muerte celular (Mitler, 2002; Singh-Tomar y Jajoo, 2013). La capacidad fotosintética de las hojas de muchas plantas es muy plástica, dependiendo de la disponibilidad de recursos (nutrientes, agua, luz), y está determinada primordialmente por la cantidad y actividad catalítica de las enzimas fotosintéticas (Percy *et al.*, 1987).



**Figura 5.4.** Valores de Fv/Fm de plantas de *Clitoria ternatea* crecidas en tres suelos con concentraciones de HTPI de la venta Tabasco (A), inoculación bacteriana (B), e interacción de los HTPI x inoculación bacteriana (C), después de 30 días. Medias  $\pm$  error estándar, n=3. Barras con diferentes asteriscos son estadísticamente diferentes (LSD,  $P \leq 0.05$ ). Abreviaturas: *Serratia marcescens* C11S1 (Sm), *Citrobacter freundii* C4S3 (Cfr), *Serratia marcescens* C7S3 (Sm2), *Rutella ornitholyticam* C5S3 (Ro), *Stenotrophomonas pavanii* C5S3F (Spa), *Stenotrophomonas maltophilia* C10S1 (Sml), Cs = Consorcio.

En la presente investigación, posiblemente las concentraciones de los HTPI no limitaron la absorción los nutrientes ni del agua, aunado a la presencia de bacterias productoras surfactantes, degradadoras de hidrocarburos, productoras de fitohormonas y productoras de la enzima ACC-desaminasa que reduce los niveles de etileno de la planta, lo cual confiere resistencia al estrés causado por los HTPI y contribuyendo así, a la atenuación de la toxicidad de los mismos y a la supervivencia de las plantas ante esas condiciones.

El uso de bacterias individuales o consorcios con capacidades emulsificantes y degradadoras de hidrocarburos que favorezcan la adaptación y la promoción del crecimiento de las plantas, y que coadyuven a la atenuación de la toxicidad de los hidrocarburos intemperizados, constituye una alternativa biológica de bajo costo para sitios crónicamente contaminados con hidrocarburos del petróleo.

#### **5.4. CONCLUSIONES**

El suelo con 50000 mg HTPI kg<sup>-1</sup> mostró el mayor efecto fitotóxico al reducir el crecimiento y la producción de biomasa vegetal. La concentración 150000 mg HTPI kg<sup>-1</sup> favoreció el crecimiento, producción de biomasa y el área foliar. La actividad fotosintética evaluada como fluorescencia del fotosistema II (Fv/Fm) no fue afectada por los hidrocarburos bajo estas condiciones, por lo cual esta variable no puede ser utilizada como indicador del efecto del contaminante. La inoculación de las cepas bacterianas favoreció la atenuación de la toxicidad de los HTPI al favorecer el crecimiento, producción de biomasa y el área foliar.



**CAPÍTULO VI**

**EFFECTO DE BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN EN LA**

**FITORREMEDIACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS**

**INTEMPERIZADOS DE LA VENTA TABASCO (MÉXICO)**

**Resumen**

Este trabajo evaluó el efecto de la fertilización inorgánica (F), la inoculación de un consorcio bacteriano (Cs), y la adición del surfactante Triton X-100 (TX) en el crecimiento de *Clitoria ternatea*, durante la fitorremediación de un Gleysol contaminado con hidrocarburos totales del petróleo intemperizado (39000 mg HTPI kg<sup>-1</sup>), recolectado en el ejido José Narciso Rovirosa, La Venta, Tabasco México. El experimento tuvo un diseño completamente al azar con siete tratamientos y cuatro repeticiones cada uno, establecido bajo condiciones de invernadero. La aplicación de F (bioestimulación) estimuló el crecimiento y la producción de biomasa vegetal; por el contrario, la adición de TX mostró efectos negativos en el crecimiento vegetal; sin embargo, favoreció la degradación de los HTPI. La bioaumentación (Cs) por sí sola no mostró efectos significativos en las plantas. La combinación de la bioestimulación con la bioaumentación (Cs+F, Cs+TX, y Cs+F+TX) favoreció el crecimiento, la biomasa seca vegetal, la población de bacterias hidrocarbonoclastas, y la biodegradación de los HTPI en comparación a los tratamientos bioaumentados (Cs) y bioestimulados (F).

**Palabras clave:** Biorremediación, surfactante, degradación, suelo crónicamente contaminado, *Clitoria ternatea* L.

## CHAPTER VI

### BIOESTIMULATION AND BIOAUGMENTATION EFFECTS ON THE PHYTOREMEDIATION OF SOIL CONTAMINATED WITH WEATHERED PETROLEUM HYDROCARBONS FROM LA VENTA TABASCO (MEXICO)

#### Abstract

This study evaluated the effect of inorganic fertilization (F), bacterial consortium inoculation (Cs), and the application of the surfactant Triton X-100 (TX) on the growth of *Clitoria ternatea*, during the phytoremediation of a Gleysol contaminated with weathered petroleum hydrocarbons (39,000 mg WPH kg<sup>-1</sup>), collected from the county Jose Narciso Rovirosa, La Venta, Tabasco, México. The experiment consisted in a completely randomized design with seven treatments and four replications each, under greenhouse conditions. Application of F (biostimulation) increased growth and biomass production; on the contrary, the addition of TX had negative effects on plant growth, but favored the WPH degradation. Bioaugmentation (Cs) by itself did not show significant effects on plants. The combination of biostimulation with bioaugmentation (Cs+F, Cs+TX, and Cs+F+TX) enhanced the growth, the dry weight, the population of hydrocarbonoclastic bacteria, and the degradation of WPH when compared to those treatments with the sole application of bioaugmentation (Cs) or biostimulation (F).

**Key words:** Bioremediation, surfactant, degradation, chronically contaminated soil, *Clitoria ternatea* L.

## 6.1. INTRODUCCIÓN

El petróleo se compone principalmente de hidrocarburos saturados, resinas, asfaltenos (Wu *et al.*, 2016), e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), los cuales tienen efectos negativos en la salud humana y en el ambiente (USEPA, 1986). La presencia de los hidrocarburos del petróleo crudo o de sus productos derivados en el suelo, se debe principalmente a derrames accidentales o intencionales durante las actividades de extracción, transporte, almacenamiento, refinación y distribución (Pinedo *et al.*, 2013; Chiu *et al.*, 2014; Meyer *et al.*, 2014; Andreolli *et al.*, 2015; Bordoloi y Basumatary, 2015).

La biorremediación surge como alternativa económica, y de bajo impacto para eliminar los contaminantes, y consiste en utilizar mecanismos bioquímicos y metabólicos de los microorganismos para acelerar la degradación de los contaminantes, y con ello contrarrestar sus daños ecológicos (Kalantary *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2016). Existen dos tipos principales de tecnologías de biorremediación, la bioestimulación y la bioaumentación (Lladó *et al.*, 2012; Simarro *et al.*, 2013). La bioestimulación consiste en la adición de nutrientes (orgánicos e inorgánicos) y oxígeno, que son necesarios para contrarrestar limitaciones metabólicas de grupos microbianos que tienen la capacidad de degradar o transformar los contaminantes orgánicos (Masakorala *et al.*, 2013; Abed *et al.*, 2014b; Dias *et al.*, 2015 Shahi *et al.*, 2016). Por ejemplo, Tellechea *et al.* (2016) observaron una degradación mayor a 70 %, al aplicar fertilizantes inorgánicos (NPK), en suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Wu *et al.* (2013) reportaron la degradación del 60% de los hidrocarburos totales del petróleo en un periodo de seis semanas, al utilizar  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como fuente de N y P.

La bioaumentación implica la introducción de cepas microbianas específicas o consorcios que tienen la capacidad de degradar los hidrocarburos del petróleo. La inoculación se recomienda en

sitios donde las poblaciones microbianas son bajas o no posee las rutas metabólicas necesarias para metabolizar o biotransformar estos compuestos orgánicos (Pontes *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2014). En este sentido, Wu *et al.* (2016) reportaron una reducción del 34 % de los hidrocarburos totales del petróleo. Crisafi *et al.* (2016) reporta 79 % de degradación de hidrocarburos del petróleo con un consorcio bacteriano (bioaumentación) integrado por *Alcanivorax borkumensis*, *A. dieselolei*, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Cycloclasticus* sp. 78-ME y *Thalassolituus oleivorans*. Nikolopoulou *et al.*, (2013a) obtuvieron una degradación del 73 % de hidrocarburos en sedimentos.

La fitorremediación de los suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo puede ser incrementada significativamente, mediante la combinación de la bioestimulación y la bioaumentación. Por ejemplo, Nikolopoulou *et al.* (2013b) evaluaron el efecto de la combinación de bioaumentación y bioestimulación, reportando una degradación del 88 % de HAP, durante 90 días. En la actualidad, se ha demostrado que la bioaumentación y la bioestimulación mejoran la biodegradación de los hidrocarburos en el suelo (Suja *et al.*, 2014; Silva-Castro *et al.*, 2016; Masy *et al.*, 2016); sin embargo, los resultados son inconsistentes y varían de acuerdo al inoculante microbiano y al tipo de nutriente aplicado (Simarro *et al.*, 2013; Suja *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016).

En general, la bioaumentación y la bioestimulación son métodos prometedores para remediar suelos contaminados con petróleo (Wu *et al.*, 2016). Sin embargo, una limitación importante es la baja solubilidad y alta hidrofobicidad de los hidrocarburos, lo que limita el potencial de las bacterias para acceder a ellos y degradarlos (de la Cueva *et al.*, 2016). A fin de superar este obstáculo se ha propuesto el uso de surfactantes y/o biosurfactantes, los cuales incrementan la biodegradación y mejoran la biodisponibilidad de los hidrocarburos totales del petróleo para los microorganismos quienes forman micelas, y transfieren los hidrocarburos de la fase sólida a la fase

líquida, mediante la acción paralela de la desorción y la emulsificación del contaminante (Simarro *et al.*, 2013; Bezza *et al.*, 2016). A pesar de los beneficios de los surfactantes químicos aplicados al suelo, se debe considerar los posibles efectos de inhibición o de toxicidad que ejercen hacia los microorganismos y las plantas (Liao *et al.*, 2015; Liao *et al.*, 2016).

Durante la remediación de los contaminantes orgánicos, las plantas pueden beneficiarse de bacterias asociadas que poseen capacidades metabólicas para degradar los hidrocarburos del petróleo y reducir con ello su fitotoxicidad (Alarcón *et al.*, 2008; Das y Tiwary, 2014; Shahsavari *et al.*, 2015; Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2016). La interacción de la bioestimulación, bioaumentación y la fitodegradación (rizodegradación) podrían integrar una estrategia dirigida para superar algunas de las limitantes durante la biorremediación (Lebeau *et al.*, 2008; Glick, 2010; de Bashan *et al.*, 2012). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar la influencia de la bioestimulación, la bioaumentación, y la aplicación de un surfactante químico (Triton X-100) en el crecimiento de *Clitoria ternatea* y en su capacidad de biodegradar hidrocarburos del petróleo intemperizados.

## **6.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.2.1. Recolecta de suelo y análisis de propiedades físicas y químicas**

Se recolectaron muestras de un suelo (Gleysol) contaminado con petróleo intemperizado (39000 mg HTPI kg<sup>-1</sup>), colectado en el ejido José Narciso Roviroso, al sur del Complejo Procesador de Gas La Venta, Tabasco (18° 4'39.22"N 94° 2'38.46"), con una altitud de 20 msnm (Rivera-Cruz *et al.*, 2005). El clima predominante corresponde a tropical húmedo con lluvias en verano (Amf), con precipitación pluvial media anual de 2200 mm, 1200 mm de evaporación, y 32 °C de temperatura media anual (INEGI, 2005; CONAGUA, 2014). El muestreo del suelo se realizó

de manera puntual recolectando del horizonte superficial (0-30 cm), de acuerdo con las indicaciones establecidas en la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF 2002).

La muestra del suelo se secó bajo sombra a temperatura ambiente (28°), se molió con mazo de madera y se tamizó en mallas de 0.5 y 2 mm de apertura. En cada muestra se determinó el pH (potenciometría), el contenido de materia orgánica (Walkley y Black, 1934), la capacidad de intercambio catiónico (CIC; extracción con acetato de amonio 1 N, pH 7), el contenido de fósforo aprovechable (Método Olsen), conductividad eléctrica (CE), nitrógeno total (N-total), y la textura (Bouyoucos). Estas últimas variables se realizaron de acuerdo con los métodos especificados en la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002). El contenido de los hidrocarburos totales del petróleo intemperizado (HTPI) de la muestra se extrajo en equipo soxhlet usando diclorometano (Sigma-Aldrich®) como solvente de acuerdo al método EPA 3540B (USEPA 1996). Las muestras se acidificaron con HCl a pH 2 y después se secaron con MgSO<sub>4</sub>. El solvente se evaporó y el peso seco del extracto se cuantificó mediante (mg kg<sup>-1</sup>) gravimetría (DOF, 2006).

El suelo presentó pH fuertemente ácido (5.0), ligeramente salino (4.73 dSm<sup>-1</sup>), con alta capacidad de intercambio catiónico (29.9 Cmol<sup>+</sup> kg<sup>-1</sup>), y contenidos muy altos de N-total (0.39 %), de fósforo (184 mg kg<sup>-1</sup>) y de materia orgánica (7.9 %). El suelo se clasificó como un Gleysol con textura franco arenosa (Palma-López *et al.*, 2006).

### **6.2.2. Preparación de los inóculos bacterianos**

El inóculo bacteriano estuvo conformado por seis cepas: *Serratia marcescens* C11S1 (Sm), *Citrobacter freundii* C4S3 (Cfr), *S. marcescens* C7S3 (Sm2), *Rutella ornitholytica* C5S3 (Ro), *Stenotrophomonas pavanii* C5S3F (Spa), *Stenotrophomonas maltophilia* C10S1 (Sml), previamente aisladas de suelos con hidrocarburos intemperizados. Las cepas bacterianas utilizadas en esta investigación se caracterizan por su capacidad de utilizar diésel como fuente de carbono y

energía, tienen la capacidad de producir surfactantes y auxinas (ácido índol acético) (ver capítulo IV).

Las bacterias fueron propagadas individualmente en frascos de vidrio con 35 mL de medio Luria-Bertani ( $\text{g L}^{-1}$ ): 10 Triptona, 5 extracto de levadura, 5 NaCl, 1 L-triptofano), a 28 °C por 72 h; posteriormente, se centrifugaron a 7000 rpm durante 15 min para separar la pastilla del medio de cultivo. Las pastillas celulares se lavaron dos veces con agua destilada estéril. Cada inóculo se preparó al resuspender las pastillas celulares en agua destilada estéril hasta obtener una densidad óptica de 0.5 ( $A_{600}$ ), equivalente a  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Finalmente, el consorcio bacteriano se preparó mezclando proporciones iguales (1.2 mL) de cultivo puro de cada una de las cepas para obtener un volumen final de 200 mL con agua destilada estéril, y con ello se inocularon los tratamientos y sus respectivas repeticiones.

### **6.2.3. Fertilizantes inorgánicos y surfactantes Triton X-100 utilizados**

Para los tratamientos con aplicación de bioestimulación, se utilizó nitrato de amonio  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Baker<sup>®</sup>) y fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Merck<sup>®</sup>) grado reactivo como fuentes de nitrógeno inorgánico y fósforo, respectivamente. La dosis de fertilización fue determinada con base en la relación C:N:P de 100:10:1, recomendada para la fitorremediación de hidrocarburos (Hutchinson *et al.*, 2001). La relación C:N:P, se obtuvo pesando  $0.07 \text{ mg kg}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $0.4 \text{ mg kg}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  por cada unidad experimental (Cookson, 1995).

La influencia de un surfactante en la fitorremediación se realizó aplicando el surfactante químico Tritón X-100 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) con pureza del 99%, a una concentración de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  (Bento *et al.*, 2005). El Tritón X-100, es un surfactante no iónico con peso molecular de 625 g mol, y una concentración micelar crítica (CMC) de 106-160 (Abu-Ghunmi *et al.*, 2014).

#### **6.2.4. Establecimiento del experimento e inoculación**

Las semillas de *Clitoria ternatea* fueron recolectadas en el estado de Veracruz (México), con germinación superior al 95%. Las unidades experimentales consistieron de macetas de plástico con capacidad de 1000 g (8.7 cm de altura y 9.3 cm de diámetro). En cada unidad experimental se colocaron 600 g de suelo seco contaminado (39000 mg HTPI kg<sup>-1</sup>), y 24 h antes de la siembra de las semillas de *C. ternatea*, se aplicaron 70 mL de la solución del fertilizante inorgánico (0.07 mg kg<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y 0.4 mg kg<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), o del surfactante químico (60 mg kg<sup>-1</sup> de Tritón X-100) en cada unidad experimental, de acuerdo al tratamiento correspondiente. En cada unidad experimental, se sembraron dos semillas de *C. ternatea*, mismas que fueron inoculadas con su respectivo tratamiento, 24 h después de la siembra, aplicando 7.2 mL de la suspensión bacteriana. La humedad de las macetas se mantuvo con riegos controlados con agua destilada para mantener el suelo a capacidad de campo (28%). Las plantas se mantuvieron en invernadero durante 72 días.

#### **6.2.5. Descripción de los tratamientos**

La fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos totales del petróleo intemperizado se efectuó con la aplicación de nutrientes inorgánicos (bioestimulación), un surfactante químico; y la adición de un consorcio bacteriano (bioaumentación); más la combinación de bioestimulación con bioaumentación en presencia de *C. ternatea* (Cuadro 6.1).

#### **6.2.6. Evaluación de variables de crecimiento, microbianas y degradación de hidrocarburos**

Después de 72 días las plantas fueron cosechadas para evaluar la altura, el área foliar, la biomasa seca radical, aérea y total. El área foliar (cm<sup>2</sup>) se determinó con un medidor de área foliar marca LICOR (LI 3000, Inc. Lincoln, NE, EUA). El área foliar específica se estimó dividiendo el área foliar, entre el peso seco de las hojas (cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>). Las hojas, tallos y raíces se secaron en un



horno (FELISA, Modelo 242-A, D.F. México) a 70 °C por 72 h hasta obtener peso constante para determinar la biomasa seca total.

La cuantificación de las poblaciones microbianas degradadoras de hidrocarburos se realizó mediante el método del Número Más Probable (MPN) modificado (Kalantary *et al.*, 2013) utilizando medio Luria-Bertani. Se utilizaron diluciones seriadas en condiciones estériles, las cuales consistieron en diluir 10 g de suelo en 90 mL de agua estéril (Madigan *et al.*, 2009). Se realizaron diluciones decimales de  $10^{-2}$  a  $10^{-8}$ ; de la dilución inicial se tomó 1 mL para inocular los tubos de ensaye (Pirex®) con 9 mL de medio Luria-Bertani suplementado con 300  $\mu$ L de diésel, incubados por 72 h; además, se utilizaron tubos sin inocular como controles. Los tubos fueron considerados como positivos si mostraron crecimiento microbiano con respecto al testigo. La población bacteriana se estimó de acuerdo a la tabla estadística de NMP (Ramírez *et al.*, 2015; Alexander, 1965).

**Cuadro 6.1.** Descripción de los tratamientos utilizados en el presente experimento.

Tratamientos	Descripción de los tratamientos
T	Testigo
Cs	Consortio bacteriano
F	Fertilizante
TX	Tritón X-100
Cs+F	Consortio + Fertilizante inorgánico
Cs+TX	Consortio + Tritón X-100
Cs+F+TX	Consortio + Fertilizante inorgánico + Tritón X-100

El contenido de los HTPI de las muestras de suelo se extrajeron en equipo soxhlet, usando diclorometano (Sigma-Aldrich®) como solvente con base en el método EPA 3540B (USEPA 1996). Las muestras se acidificaron con HCl a pH 2 y después se secó con MgSO<sub>4</sub>. El solvente se evaporó y el extracto se cuantificó por gravimetría (mg kg<sup>-1</sup>) (DOF, 2006).

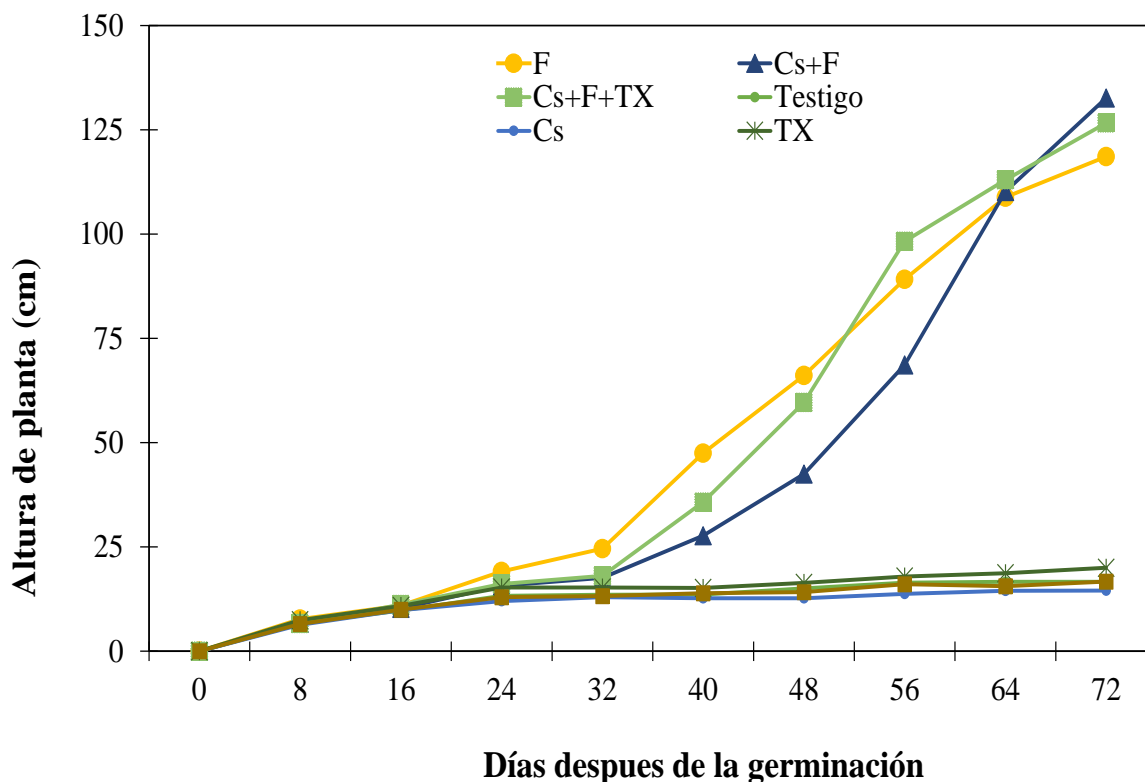
#### **6.2.7. Diseño experimental y análisis estadístico.**

El experimento contempló un diseño experimental completamente al azar con siete tratamientos, y cuatro repeticiones cada uno (Cuadro 8). Los datos obtenidos en cada variable fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD,  $P \leq 0.05$ ) mediante el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2002), y la estimación del error estándar para cada media de cada tratamiento.

### **6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

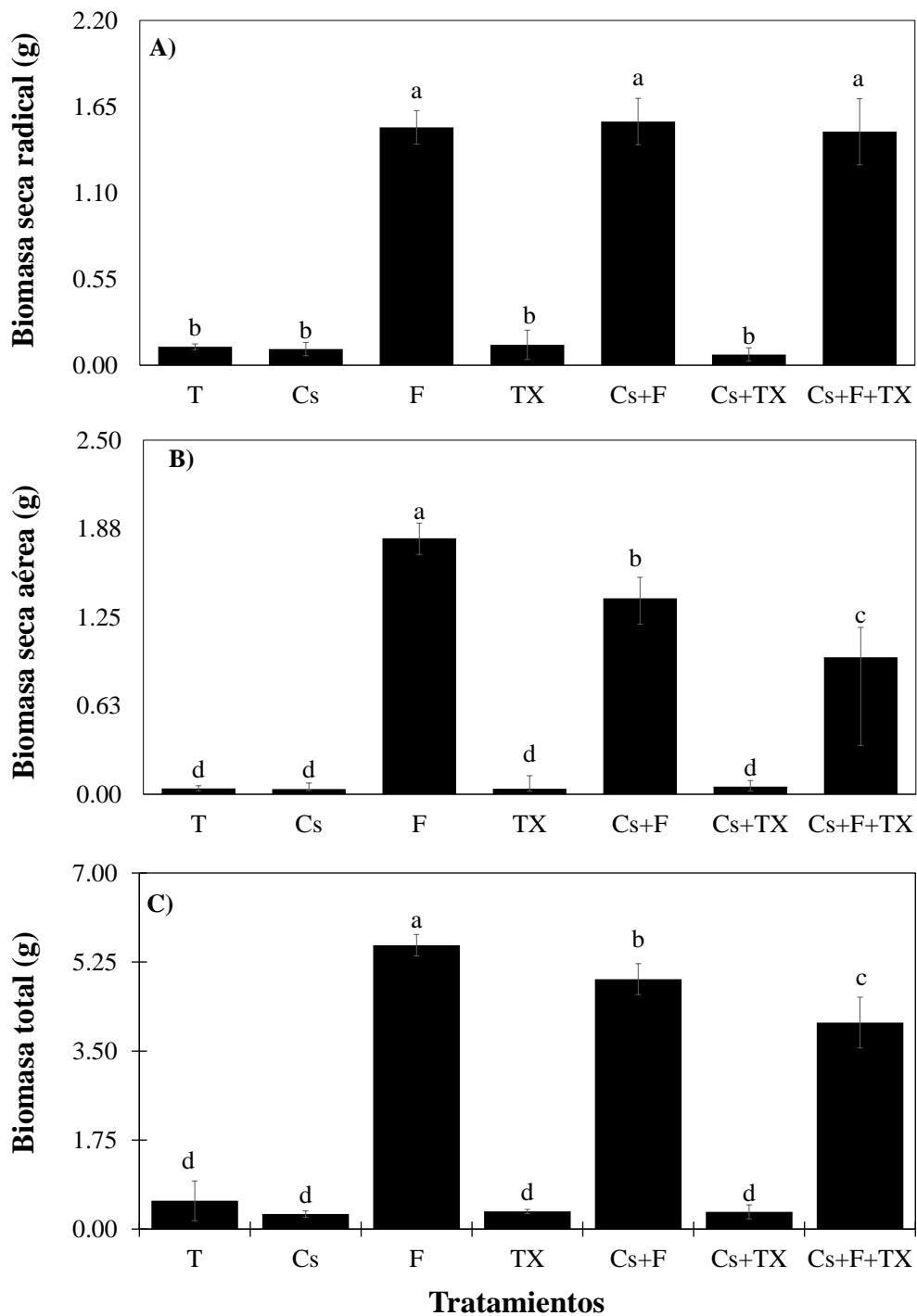
#### **6.3.1. Crecimiento y producción de biomasa de *Clitoria ternatea***

Los hidrocarburos del petróleo en el suelo efectos negativos tanto en la parte aérea como raíz de las plantas (Alarcón *et al.*, 2013; Castro-Mancilla *et al.*, 2013; Cartmill *et al.*, 2013). El crecimiento de *C. ternatea* mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos (Figura 6.1). La mayor altura de planta se obtuvo en los tratamientos Cs+F, Cs+F+TX, seguido del tratamiento F cuyo efecto incrementó en promedio, 7.5 veces más con respecto al testigo. Los tratamientos Cs, TX, y la combinación Cs+TX mostraron en promedio, resultados similares al testigo (17 cm) (Figura 6.1).



**Figura 6.1.** Altura de plantas de *Clitoria ternatea*, crecidas en suelo contaminado con HTPI (39000 mg kg<sup>-1</sup>), después de 72 días. Abreviaturas: T = Testigo con planta; Cs =Consortio bacteriano; F = Fertilizante (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> Baker® y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck®); TX = Tritón X-100 (100 mg kg<sup>-1</sup>). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (LSD, P ≤ 0.05). Promedio ± error estándar, n= 4.

La biomasa seca aérea, radical, y total mostraron diferencias estadísticas significativas (P ≤ 0.01) entre tratamientos (Figura 6.2). El tratamiento F y las combinaciones Cs+F y Cs+F+TX mostraron la mayor biomasa aérea (33 veces más) respecto al testigo, mientras que los tratamientos Cs, TX, y Cs+F+TX mostraron resultados similares al testigo (Figura 6.2A). Los tratamientos F, Cs+F y Cs+F+TX, estimularon la mayor biomasa radical (1.51 g), pero sin mostrar diferencias estadísticas significativas entre sí. El resto de los tratamientos (Cs, TX, y Cs+TX), mostraron



**Figura 6.2.** Biomasa seca aérea, radical y total de plantas de *Clitoria ternatea*, crecidas en suelos contaminados con HTPI (39000 mg kg<sup>-1</sup>), después de 72 días. Abreviaturas: T= Testigo con planta; Cs =Consortio bacteriano; F = Fertilizante (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> Baker® y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck®); TX = Tritón X-100 (100 mg kg<sup>-1</sup>). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (LSD, P ≤ 0.05). Promedio ± error estándar, n= 4.

una reducción del 93% en promedio, en la biomasa seca radical con respecto al testigo (Figura 6.2B). Por el contrario, la biomasa seca total incrementó 10 veces más por efecto del tratamiento F, y 8 veces más por efecto de los tratamientos Cs+F y Cs+F+TX con respecto al testigo (Figura 6.2C).

Los resultados indican que *C. ternatea* presentó inhibición de su crecimiento por efecto de los HTPI presentes en el suelo y por la aplicación del surfactante TX. Estos resultados se relacionan con los obtenidos en estudios previos, al observar disminución en la producción de biomasa vegetal al adicionar TX (Ramamurthy y Memarian, 2012; Liao *et al.*, 2015). Los surfactantes pueden aumentar la permeabilidad de las células de la raíz e incrementar la absorción de los nutrientes (Zhu y Zhan, 2008); sin embargo, en los suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, el aumento de la permeabilidad de las células, aumenta la absorción de los contaminantes, ocasionando toxicidad a las plantas, y afectando su crecimiento o alterando su fisiología (LeWis, 1990; Agnello *et al.*, 2015; Liao *et al.*, 2015; Alam *et al.*, 2016).

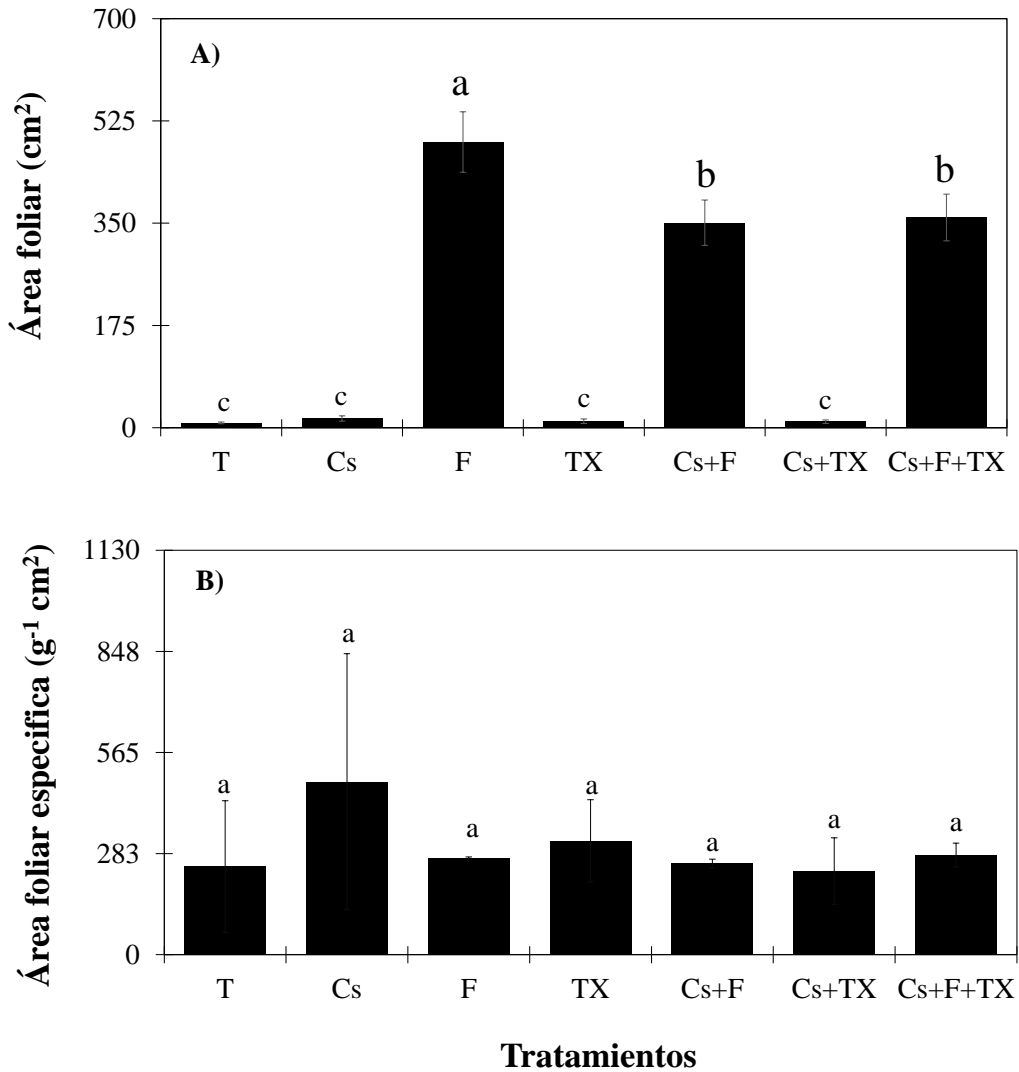
La aplicación del fertilizante inorgánico permitió a la planta tolerar el estrés generado por los HTPI, lo cual favorece la biomasa radical, y el crecimiento y la acumulación biomasa vegetal aérea (Díaz-Martínez *et al.*, 2013; Alam *et al.*, 2016). Por otro lado, la combinación de la bioestimulación con la bioaumentación (Cs+F) favoreció el crecimiento y la producción de biomasa vegetal. Resultados similares han sido reportados por Ruffini *et al.* (2016), Shahzad *et al.* (2016), y Fatima *et al.* (2016) al evaluar el efecto de la bioestimulación y bioaumentación en plantas de *Zea mays* L., *Vicia faba* L., *Brachiaria mutica*, y *Leptochloa fusca*. Estos resultados sugieren que *C. ternatea* bajo las condiciones de estudio, es una planta con potencial para fitorremediar suelos contaminados con hidrocarburos intemperizados mediante la aplicación de fertilizante inorgánico e inoculación del consorcio bacteriano.

El área foliar fue significativamente mayor ( $P \leq 0.05$ ) en el tratamiento F, seguido de los tratamientos Cs+F y Cs+F+TX, los cuales incrementaron 43% el área foliar con respecto al testigo (Figura 6.3A). En lo que respecta a los tratamientos Cs, TX, y Cs+TX éstos estimularon 1.5 veces más el área foliar en comparación con el testigo (Figura 15A). El área foliar específica no mostró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Figura 6.3B).

Los efectos benéficos de la bioestimulación y la bioaumentación, en suelos contaminados con hidrocarburos se han aplicado a leguminosas como *Crotalaria pallida*, *Vicia faba* L., así como en gramíneas como *Lolium perenne* y en *Zea mays*, entre otras, destacando beneficios en la producción de biomasa aérea, radical y área foliar (Ayolagha *et al.*, 2013; Baruah *et al.*, 2016; Ruffni *et al.*, 2016; Shahzad *et al.*, 2016).

Dichos resultados se relacionan con lo reportado en el presente trabajo, donde la inoculación del consorcio bacteriano y la aplicación del fertilizante, aun con la adición del surfactante (F, Cs+F, Cs+F+TX), mejoraron la tolerancia de la planta al estrés causado por los HTPI en el suelo, al favorecer el área foliar en las plantas. El incremento del área foliar está relacionado con mayor crecimiento y producción vegetal, el cual puede ser aprovechada en el proceso de fitorremediación de los compuestos orgánicos (Khan *et al.*, 2013; Afzal *et al.*, 2014). Por el contrario, la reducción del área foliar de *C. ternatea* en los tratamientos testigo, Cs, TX y Cs+TX, se le puede atribuir a la toxicidad inherente de los HTPI (Agbogidi *et al.*, 2007; Cartmill *et al.*, 2014), y a la aplicación del surfactante químico (Triton X-100), el cual incrementa la desorción de los hidrocarburos del suelo e incrementa la permeabilidad de las membranas de la pared celular de las plantas permitiendo una mayor absorción de los HTPI (Mohamed, 2002; Afzal *et al.*, 2014; Agnello *et al.*, 2015; Agnello *et al.*, 2016), ocasionando toxicidad e inhibiendo el crecimiento, además de influir en los procesos bioquímicos y fisiológicos de la planta (Kirk *et al.*, 2005; Afzal *et al.*, 2014; Shabir

*et al.*, 2016). Así mismo, algunos de los compuestos de los hidrocarburos como los HAP se acumulan en los tilacoides alterando la estructura de la membrana tilacoidal afectando el aparato fotosintético (Nakano *et al.*, 1997; Jajoo *et al.*, 2014; Singh y Jajoo, 2014).



**Figura 6.3.** Aérea foliar y aérea foliar específica de *Clitoria ternatea*, crecidas en suelo contaminado con HTPI (39000 mg kg<sup>-1</sup>), después de 72 días. Abreviaturas: T= Testigo con planta; Cs =Consortio bacteriano; F = Fertilizante (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> Baker<sup>®</sup> y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck<sup>®</sup>); TX = Tritón X-100 (100 mg kg<sup>-1</sup>). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (LSD, P ≤ 0.05). Promedio ± error estándar, n= 4.

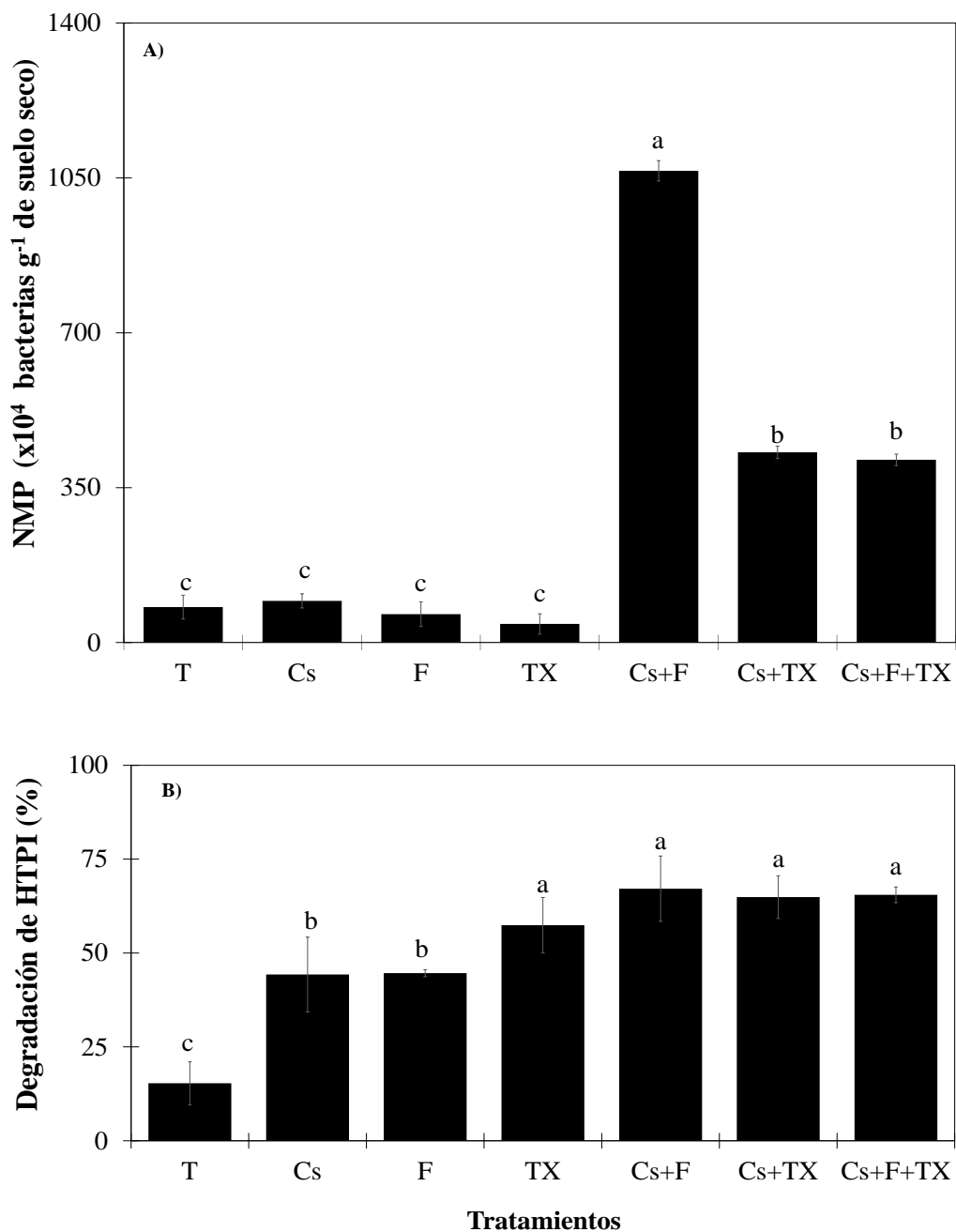
### **6.3.2. Poblaciones bacterianas hidrocarbonoclastas**

Las poblaciones de bacterias hidrocarbonoclastas fue estadísticamente mayor ( $P \leq 0.05$ ) en el tratamiento Cs+F, con respecto al tratamiento testigo; en contraste, los tratamientos Cs+TX y Cs+F+TX estimularon seis veces más la población de bacterias en comparación al testigo y al resto de los tratamientos (Figura 6.4A). Las poblaciones microbianas están influenciadas por la liberación de los exudados radicales de las plantas y por las condiciones del suelo (Zhang *et al.*, 2016). Contrario a lo reportado por Wrenn y Venosa (1996); Bordoloi y Basumatary, (2015); y Agnello *et al.* (2016), en la presente investigación los tratamientos F y TX mostraron efectos negativos en la población de bacterias hidrocarbonoclastas; sin embargo, este efecto fue atenuado en los tratamientos Cs+F, Cs+TX y Cs+F+TX (combinación de bioestimulación y bioaumentación) al estimular las poblaciones de estas bacterias, lo que coincide con los resultados obtenidos en estudios previos (Shahzad *et al.*, 2016; Castiglione *et al.*, 2016). Este resultado posiblemente se debe a que las bacterias y las plantas no tienen que competir por los nutrientes esenciales para su crecimiento (Díaz-Martínez *et al.*, 2013; Bordoloi y Basumatary, 2015; Cartmill *et al.*, 2013), aunado a que el TX aumenta la desorción y la solubilidad de los hidrocarburos haciéndolos más accesibles a las poblaciones bacterianas hidrocarbonoclastas (Kaczorek *et al.*, 2011; Abu-Ghunmi *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2015; Alam *et al.*, 2016).

### **6.3.3. Biodegradación de los hidrocarburos totales de petróleo intemperizado**

La degradación de los HTPI en la rizosfera de *C. ternatea* fue afectada significativamente por efecto de los tratamientos (6.4B). El mayor porcentaje de degradación de los HTPI se observó en los tratamientos Cs+F, Cs+TX, y Cs+F+TX, con un valor promedio del 65 %, seguido de los tratamientos Cs, F y TX que estimularon 4 veces más la degradación, respecto al testigo (Figura 6.4B).





**Figura 6.4.** Población de bacterias hidrocarbonoclastas y porcentaje de degradación de HTPI en presencia de *Clitoria ternatea*, crecidas en suelos contaminados ( $39,000 \text{ mg HTPI kg}^{-1}$ ), después de 72 días. Abreviaturas: T= Testigo con planta; Cs =Consortio bacteriano; F = Fertilizante ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$  Baker<sup>®</sup> y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Merck<sup>®</sup>); TX = Tritón X-100 ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (LSD,  $P=0.05$ ). Promedio  $\pm$  error estándar,  $n= 4$ .

En la presente investigación la adición del Cs (bioaumentación) y la aplicación del F (biostimulación) mostraron resultados similares al estimular 44 % en promedio, la biodegradación de los HTPI. Lo anterior es contrario a lo reportado en investigaciones previas que indican que la bioestimulación es más eficiente que la bioaumentación para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Sayara *et al.*, 2011; Abed *et al.*, 2014b). La adición del surfactante químico (TX), incremento 12% más la biodegradación de los HTPI respecto a los tratamientos Cs y F. Este resultado posiblemente se debe a la capacidad de desorción del surfactante, el cual incrementa la biodisponibilidad de los contaminantes para la degradación microbiana, lo que conlleva a mayor reducción de los hidrocarburos del petróleo en el suelo (Li *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2015). No obstante, la combinación del Cs con TX o F (Cs+F, Cs+TX, Cs+F+TX) resultó en 20 % más degradación de los HTPI, respecto a los tratamientos Cs, F y al testigo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Shahzad *et al.* (2016) al observar un incremento del 18% en la biodegradación de lodos aceitosos por efecto de la combinación de tratamientos de bioestimulación y bioaumentación. Por su parte, Suja *et al.* (2014) reportaron 79 % de biodegradación de HTP por la combinación de bioestimulación y bioaumentación. Jiang *et al.* (2016) observaron mayor degradación de fracciones alifáticas y aromáticas de los hidrocarburos en la combinación de los tratamientos mencionados.

En general, se considera que la bioestimulación y la bioaumentación son métodos prometedores para incrementar la biorremediación de los hidrocarburos del petróleo (Pontes *et al.*, 2013). Sin embargo, cuando se aplican de forma individual estas técnicas, se pueden presentar limitaciones, por tanto, se pueden utilizar combinadas para recuperar suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo (Nikolopoulou y Kalogerakis, 2009; Tyagi *et al.*, 2011), y así, estimular mayor degradación de hidrocarburos, como lo observado en la presente investigación.

#### 6.4. CONCLUSIÓN

La bioestimulación y bioaumentación favorecieron 49% la rizodegradación de los HTPI. Sin embargo, la interacción bioestimulación-bioaumentación fue mejor en la rizodegradación de los HTPI. La adición del surfactante TX-100 no mostró efectos positivos en el crecimiento vegetal, pero favoreció la degradación de los HTPI (42%). La biorremediación de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos intemperizados mediante la interacción de la bioestimulación y bioaumentación mejoró la Fitorremediación de suelos contaminados crónicamente con hidrocarburos intemperizados en presencia de *Clitoria ternatea* L. al aumentar la degradación de los HTPI EN (66%)

## CAPÍTULO VII

### DISCUSIÓN GENERAL DE RESULTADOS

México tiene extensas áreas contaminadas con hidrocarburos del petróleo derivado principalmente, de derrames accidentales o por fugas de tanques de almacenamiento subterráneo. Lo anterior ha causado impactos y riesgos negativos significativos para los agroecosistemas y para la salud humana. Por ello, en las últimas décadas se tiene la necesidad de contar con tecnologías ecológicas y de bajo costo para recuperar suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos. Un ejemplo de ello, es la fitorremediación donde el principal mecanismo involucrado en la disipación de hidrocarburos del petróleo es la biodegradación en la rizosfera (rizodegradación). Sin embargo, la rizodegradación está limitada por la baja disponibilidad de los contaminantes. Para superar está limitante, la fitorremediación asistida mediante el uso de microorganismos productores de surfactantes y con capacidades metabólicas para degradar los hidrocarburos podrían potencializar la rizodegradación. Por tal razón, se evaluó la población bacteriana y productora de biosurfactantes en la atenuación de la toxicidad de suelos contaminados con petróleo intemperizado, así como la biorremediación de suelo contaminado con petróleo intemperizado mediante la bioestimulación y la bioaumentación en presencia de *Clitoria ternatea* L.

Las poblaciones bacterianas evaluadas en el presente estudio, sugieren que los suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos totales del petróleo intemperizados albergan diversos grupos microbianos funcionales que potencialmente pueden ser dirigidos a la restauración de suelos agrícolas contaminados. Lo anterior permitió seleccionar microorganismos productores de biosurfactantes o emulsificantes, con capacidades metabólicas para biodegradar

hidrocarburos (Ver Capítulo IV). Sin embargo, los suelos evaluados mostraron efectos negativos en los grupos bacterianos evaluados. Los hidrocarburos totales del petróleo intemperizados se consideran tóxicos, lo cual puede ser un criterio importante al evaluar el impacto sobre las plantas y los microorganismos del suelo. Por ello, en la segunda fase experimental (Capítulo V) se evaluó la toxicidad de un Gleysol contaminado de origen, con diferentes concentraciones de petróleo intemperizado, recolectado en La Venta, Tabasco (México), en el crecimiento de *Clitoria ternatea*, con inoculación de bacterias emulsificantes. Los resultados muestran que el suelo altamente contaminado ( $50000 \text{ mg HTPI kg}^{-1}$ ) estimuló el crecimiento vegetal. Sin embargo, se observaron efectos negativos la producción de biomasa seca radical y total por el suelo con  $50000 \text{ mg HTPI kg}^{-1}$ . Este resultado es consistente con lo obtenido en el Capítulo IV donde la concentración media ( $50000 \text{ mg HTPI kg}^{-1}$ ) mostró las menores poblaciones de los cinco grupos bacterianos evaluados. Estos resultados demuestran que la concentración de los hidrocarburos intemperizados no está relacionada con la toxicidad de los hidrocarburos totales del petróleo. Por otra parte, la inoculación con las cepas Sm, Spa, Cfr y Sml, favorecieron la altura, la biomasa radical, aérea y total, mientras que las cepas Sm2 y Ro incrementaron el área foliar. Este resultado posiblemente se debió a que estas cepas tienen la capacidad de producir surfactantes, lo cual aumenta la degradación (ver Capítulo IV) y por ende, atenúan la fitotoxicidad de los HTPI.

El uso de las plantas en la biorremediación ofrece una opción potencial de aumentar la rizodegradación de los hidrocarburos. De acuerdo con lo anterior, *C. ternatea* puede ser considerada como una planta sensible a concentraciones menores de  $50000 \text{ mg HTPI kg}^{-1}$ , y tolerantes a concentraciones superiores a  $150000 \text{ mg HTPI kg}^{-1}$ . La tolerancia de las plantas a los hidrocarburos y la capacidad de los microorganismos de producir biosurfactantes o

bioemulsificantes, son cualidades que incrementan la rizodegradación de los hidrocarburos, debido a que las plantas son capaces de proporcionar las condiciones favorables para el crecimiento y la actividad de los microorganismos hidrocarbonoclastas.

Con base en lo anterior, en el Capítulo VI, se evaluó la capacidad de un consorcio bacteriano (productor de surfactantes e hidrocarbonoclasta) como elementos de bioaumentación, y el efecto de la bioestimulación basada en la aplicación del fertilizante inorgánico ( $0.07 \text{ mg kg}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $0.4 \text{ mg kg}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y la adición del surfactante Tritón TX-100 ( $60 \text{ mg kg}^{-1}$ ), en la degradación de HTPI, durante la fitorremediación con *C. ternatea*. Los resultados demuestran que la bioestimulación mediante la aplicación de fertilizante (F) favoreció el crecimiento y la producción de biomasa vegetal; en contraste la adición del TX-100 tuvo efectos negativos en el crecimiento vegetal, pero incrementó la altura de la planta y la rizodegradación de los HTPI. La bioaumentación por sí sola no mostró efectos significativos en la planta. La combinación de la bioestimulación con la bioaumentación ( $\text{Cs}+\text{F}$ ,  $\text{Cs}+\text{TX-100}$ , y  $\text{Cs}+\text{F}+\text{TX-100}$ ) estimuló el crecimiento, la acumulación de biomasa vegetal, y las poblaciones microbianas hidrocarbonoclastas. La rizodegradación de los HTPI fue incrementada significativamente por efecto de la bioestimulación y de la bioaumentación; sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron al combinar las dos estrategias de biorremediación ( $\text{Cs}+\text{F}$ ,  $\text{Cs}+\text{TX-100}$ , y  $\text{Cs}+\text{F}+\text{TX-100}$ ).

En general, los resultados del presente trabajo muestran el potencial del consorcio bacteriano (Cs), y particularmente, de la cepa *Serratia marcescens* (C7S3), misma que además tiene la capacidad de liberar biosurfactantes, producir AIA y biodegradar diésel. La capacidad de las

bacterias para promover el crecimiento de las plantas, mejora la biodisponibilidad de los hidrocarburos a través de la producción de biosurfactantes y degradar contaminantes, aunado a la aplicación combinada de fertilizantes inorgánicos y la adición del Triton TX-100, contribuyendo en el mejoramiento de la fitorremediación. Así, esta biotecnología representa una estrategia para mejorar los procesos de fitorremediación de suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos, ya que puede incrementar la degradación de los HTP, e inducir el desarrollo de la vegetación que paulatinamente, permita conservar e incrementar la fertilidad de los suelos. Tal sería el caso del extremo occidente del estado de Tabasco (México) que presenta alta contaminación de suelos y que potencialmente están en riesgo de mayor contaminación debido a que la mayoría de las instalaciones petroquímicas son antiguas (> 50 años), y son factor de riesgo de ocurrencia de derrames de hidrocarburos por la presencia de tubos afectados por la corrosión.

## CAPÍTULO VIII

### CONCLUSIONES GENERALES

#### CAPÍTULO IV.

- Los suelos crónicamente contaminados con hidrocarburos totales del petróleo intemperizados albergan diversos grupos microbianos funcionales que potencialmente pueden ser dirigidos a los procesos de fitorremediación de suelos agrícolas contaminados, debido a que tienen la capacidad metabólica para biodegradar los hidrocarburos, y para producir biosurfactantes. Sin embargo, estos suelos (Gleysol) presentan fitotoxicidad al inhibir en el crecimiento y la producción vegetal.

#### CAPÍTULO V.

- La fitotoxicidad del suelo (Gleysol) contaminado con petróleo intemperizado no está relacionada con la concentración de los hidrocarburos. La mayor concentración (150000 mg HTPI kg<sup>-1</sup>) favoreció el crecimiento y la producción de biomasa vegetal. Por el contrario, el suelo con 50000 mg HTPI kg<sup>-1</sup> inhibió el crecimiento vegetal. Este efecto fue atenuado con la inoculación de las cepas bacterianas las cuales favorecieron el crecimiento y la producción de biomasa de *C. ternatea*. Con base en estos resultados se demuestra el potencial de *C. ternatea* para fitorremediar suelos contaminados con hidrocarburos intemperizados, debido a su capacidad de tolerar concentraciones medias y altas de hidrocarburos. Lo anterior denota características esenciales en las plantas que se utilizan en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.



## CAPÍTULO VI.

- *Clitoria ternatea* tiene potencial de uso en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos mediante la rizodegradación. Además, la bioestimulación y la bioestimulación contribuyeron en la reducción de los HTPI en la rizosfera de *Clitoria ternatea*. Sin embargo, la rizodegradación fue incrementada significativamente por efecto de la interacción de la bioaumentación (consorcio bacteriano) o de la biostimulación (fertilizantes y Triton TX-100). Lo anterior sugiere, que el uso de bacterias con capacidad de producir surfactantes y degradar hidrocarburos del petróleo, nativas de suelos crónicamente contaminados, es crucial para reducir la toxicidad y mejorar la rizodegradación de suelos contaminados, como es el caso de los suelos del estado de Tabasco.

## LITERATURA CITADA

- Abbasi, H., Noghabi, K.A., Hamed, M.M., Zahiri H.S., Moosavi-Movahedi, A.A., Amanlou, M., Teruel, J.A., Ortíz, A. 2013. Physicochemical characterization of a monorhamnolipid secreted by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 in aqueous media. An experimental and molecular dynamics study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101: 256-265.
- Abed, M.M.R., Al-Kindi, S., Al-Kharusi, S. 2014a. Diversity of bacterial communities along a htpetroleum contamination gradient in desert soils. *Microbial Ecology*, 95-115.
- Abed, R.M.M., Al-Sabahi, J., Al-Maqrashi, F., Al-Habsi, A., Al-Hinai, M., 2014b. Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the Sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 89: 58-66.
- Abu-Ghunmi, L., Badawi, M., Fayyad, M. 2014. Fate of Triton X-100 applications on water and soil environments: A Review. *Journal of Surfactants and Detergents*, 17: 833-838.
- Adams, G., y Duncan. H, 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental pollution*, 120: 363-370.
- Adams, O.G., Tawari, F.P., Okoro, S.E., Ehinomen, I. 2015. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation*, 3: 28-39.
- Adams, R.H., A.L., Ovando-Alvarez, E., Escalante-Espinosa, Gutierrez-Rojas, M. 2006. Dose-response relationship of organisms in soil with heavily weathered hydrocarbons and changes in fertility parameters. 13th International Environmental Petroleum Conference. 16-20 October. San Antonio, Texas: *International Environmental Petroleum Consortium*.

- Adams, R.H., Castillo-Acosta, O., Escalante-Espinosa, E., Zavala-Cruz, J., 2011. Natural attenuation and phytoremediation of petroleum hydrocarbon impacted soil in tropical wetland environments, En: Torres L.G., Bandala E.R., (Ed.), Remediation of Soils and Aquifers. Nova Publishers, New York. 24 p.
- Adams, R.H., Guzman-Osorio, F.J., Zavala-Cruz, J. 2008. Water repellency in oil contaminated sandy and clayey soils. *International Journal of Environmental Science and Technology* 5: 445-454.
- Adams, R.H., Kanga-Leyva, K., Guzmán-Osorio, F.J., Escalante-Espinosa, E. 2011b. Comparison of moisture management methods for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. *African Journal of Biotechnology*, 10: 394-404.
- Adams, S.R.H., Domínguez, R.V.I., García, H.L. 1999. Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra*, 17: 159-174.
- Afzal, M., Khan, M.Q., Sessitsch, A. 2014. Endophytic bacteria: prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. *Chemosphere*, 117; 232-242.
- Afzal, M., Khan, S., Iqbal, S., Mirza, M.S., Khan, Q.M., 2013. Inoculation method affects colonization and activity of *Burkholderia phytofirmans* PsJN during phytoremediation of diesel-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 85: 331-336.
- Afzal, M., Yousaf, S., Reichenauer, T.G., Kuffner, M., Sessitsch, A. 2011. Soil type affects plant colonization, activity and catabolic gene expression of inoculated bacterial strains during phytoremediation of diesel. *Journal of Hazardous Materials*, 186: 1568-1575.
- Agbogidi, O.M., Eruotor, P.G., Akparobi, S.O., Nnaji, G.U. 2007. Evaluation of crude oil contaminated soil on the mineral nutrient elements of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Agronomy*, 6: 188-193.

- Agnello, A.C., Huguenot, D., van Hullebusch, E.D., Esposito, G. 2015. Phytotoxicity of citric acid and tween® 80 for potential use as soil amendments in enhanced phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, 17: 669-677
- Agnello, A.C., Huguenot, D., Van Hullebusch, E.D., Esposito, G. 2016. Citric acid-and Tween® 80-assisted phytoremediation of a co-contaminated soil: alfalfa (*Medicago sativa* L.) performance and remediation potential. *Environmental Science and Pollution Research*. 23; 9215-9226.
- Ahemad, M., Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University Science*. 26: 1-20.
- Alam, Ch.S., Imran K.M., Tang, X., Shen, Ch., Farooq, M., Chen, Y. 2016. Surfactant enhanced pyrene degradation in the rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Journal of Environmental Management*, 23: 1-8.
- Alarcón, A., Davies, F.T., Autenrieth, R.L., Zuberer, D.A. 2008. Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 10: 251-263.
- Albaigés, J., Albrecht, P., 1979. Fingerprinting marine pollutant hydrocarbons by computerized gas chromatography mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 6: 171-190.
- Aleer, S., Adetutu, E.M., Weber, J., Ball, A.S., Juhasz, A.L., 2014. Potential impact of soil microbial heterogeneity on the persistence of hydrocarbons in contaminated subsurface soils. *Journal of Environmental Management*, 136: 27-36.

- Aleer, S., Adetutu, M.E., Makadia, H.T., Patil, S., Ball, S.A. 2011. Harnessing the hydrocarbon-degrading potential of contaminated soils for the bioremediation of waste engine oil. *Water Air Soil Pollution*, 218: 121-130.
- Alexander, M. 1965. Most-probable-number method for microbial populations. *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological. Properties. American Society of Agronomy*, Madison, 6: 1467-1472.
- Alexander, M. 1999. Biodegradation and bioremediation. (2nd Ed.). Academic Press. San Diego, California, USA. 433 p.
- Alexander, M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science and Technology*, 34: 4259-4265.
- Ali, H.R., Nour, S.H., El-Gendy, Y.M., Roushdy, M.I., Hashem, A.I. 2012. Degradation of asphaltenic fraction by locally isolated halotolerant bacterial strains. *ISRN Soil Science*, 1-11.
- Alisi, C., Musella, R., Tasso, F., Ubaldi, C., Manzo, S., Cremisini, C., Sprocati, A.R. 2009. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Science of Total Environment*, 407: 3024-3032.
- Almeida, R.M., Reis, I., Couto, N.M., Bordalo, A.A., Mucha, P.A., 2012. Potential of the microbial community present in an unimpacted beach sediment to remediate petroleum hydrocarbons. *Environmental Science and Pollution Research*, 20: 3176-3184.
- Al-Wahaibi, Y., Joshi, S., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., Shibulal, B. 2014. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114: 324-333.

- Andreolli, M., Lampis, S., Brignoli, P., Vallini, G. 2015. Bioaugmentation and biostimulation as strategies for the bioremediation of a burned woodland soil contaminated by toxic hydrocarbons : *Journal of Environmental Management*, 153: 121-131.
- Anoliefo, G.O., Nwoko, D.F. 1954. Effect of spent lubricating oil on the growth of *Capsicum annum* (c) and *Lycopersium esculentum* (Miller). *Environmental Pollution*, 88: 361-364.
- Arias, K.S., Al-Resayes, S.I., Climent, M.J., Corma, A., Iborra, S. 2013. From biomass to chemicals: synthesis of precursors of biodegradable surfactants from 5-hydroxymethylfurfural. *ChemSusChem*, 6: 123-131.
- Arias, T.A. 2012. La ecotoxicidad y el pasto japonesa (*Leersia* sp.) en la fitorremediación de un Gleysol contaminado con petróleo fresco, intemperizado y sulfatos. Tesis de Maestría en ciencia en Produccion Agroalimentaria en el Trópico. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. H. Cárdenas Tabasco, México. 149 p.
- Atlas, M.R., Horowitz, A., Krichevly, M., Bej, K.A., 1981b. Response of microbial population to Benckiser, G., 1997. Fauna in soil ecosystems: Recycling processes, nutrient fluxes, and agricultural production, Marcel Dekker, Inc., New York, 414 p.
- Atlas, R.M. 1991. Microbial hydrocarbon degradation-Bioremediation of oil spills. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 52: 149-156.
- Atlas, R.M. 1995a Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 35: 317-327.
- Atlas, R.M. 1995b Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*. 31: 178-182.
- Atlas, R.M., 1981a. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiological Reviews*. 45: 180-209.

- Ayolagha, G.A., Peter, K.D., Ebie, S.J. 2013. Effect of remediation of crude oil polluted inceptisols on maize (*Zea mays*) production using organic and inorganic fertilizers at Yenagoa, Bayelsa State. *International Journal of Soil Science*, 8: 47-57.
- Bachu, S. 2008. CO<sub>2</sub> storage in geological media: role, means, status and barriers to deployment. *Progress in Energy and Combustion Science*. 34: 254-273.
- Baldan, E., Basaglia, M., Fontana, F., Shapleigh P.J., Casella, S. 2015. Development, assessment and evaluation of a biopile for hydrocarbons soil remediation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 98: 66-72.
- Balseiro-Romero, M., Gkorezis, P., Kidd, P.S., Vangronsveld, J., Monterroso, C. 2016. Enhanced degradation of diesel in the rhizosphere of after inoculation with diesel-degrading and plant growth-promoting bacterial strains. *Journal of Environmental Quality*, 45: 924-932.
- Balseiro-Romero, M., P.S., Kidd, Monterroso. C. 2014. Influence of plant root exudates on the mobility of fuel volatile compounds in contaminated soils. *International Journal Phytoremediation*, 16: 824–839.
- Banat, I.M, Makkar, R.S, Cameotra, S.S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53: 495-508.
- Banat, I.M., 1995. Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technology*, 51: 1-12
- Barquín, M., Ríos, S.M., Nudelman, N. 2011. Test de toxicidad sobre la especie *Atriplex lampa*, su aplicación para la evaluación de riesgo asociado a derrames de petróleo en suelos de la Patagonia. *Revista de Toxicología*, 28: 135-139.

- Baruah, P., Deka, S., Baruah, P.P. 2016. Phytoremediation of crude oil-contaminated soil employing *Crotalaria pallida* Aiton. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 10595-10603
- Bashan, Y., Holguin, G., de Bashan, L.E. 2004. Azospirillum plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 521-577.
- Basumatary, B., Bordoloi, S., Sarma, P.H. 2012. Crude oil-contaminated soil phytoremediation by using *Cyperus brevifolius* (Rottb.) Hassk. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223: 3373-3383.
- Bayoumi, R.A., Haroun, B.M., Ghazal, E.A., Mahe, Y.A. 2010. Structural analysis and characterization of biosurfactants produced by some crude oil utilizing bacterial strains. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4: 34-84.
- Benavides, J.L., Quintero, G., Guevara, V.L.V., Jaimes, D.C.C., Gutierrez, S.M.R., Miranda, J.G. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4: 55-65.
- Ben-Ayed, H., Jemil N., Maalej, H., Bayouhd, A., Hmidet, N., Nasri, M. 2015. Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 99: 8-14.
- Bento, M.F., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T. 2005. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiological Research*, 160: 249-255.
- Berthe-Corti, L., Del Panno, M.T., Hulsch, R., Morelli, I.S., 2007. Bioremediation and bioaugmentation of soils contaminated with polyaromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Microbiology*, 3: 1-30.



- Bezza, F.A., Beukes, M., Chirwa, E.M.N. 2015. Application of biosurfactant produced by *Ochrobactrum Intermedium* CN3 for enhancing petroleum sludge bioremediation. *Process Biochemistry*, 50: 1911-1922.
- Bezza, F.A., Chirwa, E.M.N. 2016. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere*, 144: 635-644.
- Biache, C., Mansuy-Huault, L., Faurea, P., 2014. Impact of oxidation and biodegradation on the most commonly used polycyclic aromatic hydrocarbon (HAP) diagnostic ratios: implications for the source identifications. *Journal of Hazardous Materials*. 267: 31-39.
- Blanco, M.T., Sacristán, B., Lucio, L., Blanco, J., Pérez-Giraldo, C., Gómez-García, C.A. 2010. La hidrofobicidad de la superficie celular como indicador de otros factores de virulencia en *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27: 195-199.
- Bodour, A.A., Miller-Maier, R.M., 1998. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 32: 273-280.
- Bogdan, A.V. 1977. Tropical pasture and fodder plants. (Ed.), Longman group limited. london and New York. Longman Inc. 475 p.
- Bohem, P.D., Fiest, D.L. 1982. Subsurface distribution of petroleum from of shore well blowout-the Ixtoc-I blowout. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47: 565-571.
- Bordoloi S., Basumatary, B. 2015. Phytoremediation of hydrocarbon contaminated soil using sedge species. En: Ansari, A.A., Singh, G.S., Ritu, G., Guy, R.L., Lee, N. (Ed.), *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*, 1: 279-282.
- Botello, A.V. 2005. Características, Composición y Propiedades fisicoquímicas del petróleo. In: Botello, A.V., J. Rendón-Von Osten., G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Ed.), Golfo

- de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnostico y Tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. Universidad Autónoma de México. Instituto Nacional de Ecología. Campeche, México. 696 p.
- Bramley, A.J., Wasley, J., King, C.K., Powell, S., Robinson, S.A. 2014. Phytoremediation of hydrocarbon contaminants in subantarctic soils: An effective management option. *Journal of Environmental Management*, 142: 60-69.
- Brick, J.M., Bostock, R.M., Silverstone, S.E. 1991. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 535-538.
- Burgos-Díaz, A., Oakeshott, J.G., Rakesh, K.J. 2008. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal Microbiology*, 48: 95-113.
- Busto, B.E. 2012. Remediación electro-cinética de suelos contaminados con hidrocarburos, En: Torres, B.L.G., Bandalas, G.E.R., Villatoro, M.W.R. (Ed.), Remediación de suelos y acuíferos contaminados en México, Bases teóricas y experiencias reales. Fundación Universitaria de Derecho, Administración y Políticas, S.C. México, pp. 81-97.
- Butler, W.L. 1978. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*, 29: 345-78.
- Campos, M.J., Stamford, L.M.T., Sarubbo, A.L., 2014. Production of bioemulsifier with potential application in the food Industry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 72: 3234 -3252.
- Cappello, S., Caruso, G., Zampino, D., Monticelli, L.S., Maimone, G., Denaro, R., Tripodo, B., Troussellier, M., Yakimov, M., Giuliano, L. 2007. Microbial community dynamics during assays of harbor oil spill bioremediation: a microscale simulation study. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 184-194.

- Cartmill, A.D., Cartmill, D.L., Alarcón, A. 2013. Short-term biodegradation of petroleum in planted and unplanted sandy soil. *Journal of Environmental Quality*, 42: 1080-1085.
- Cartmill, A.D., Cartmill, D.L., Alarcon, A. 2014. Short-term biodegradation of petroleum in planted and unplanted sandy soil. *Journal of environmental quality*, 42: 1080-1085.
- Castiglione, M. R., Giorgetti, L., Becarelli, S., Siracusa, G., Lorenzi, R., Di Gregorio, S. 2016. Polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soils: bioaugmentation of autochthonous bacteria and toxicological assessment of the bioremediation process by means of *Vicia faba* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 7930-7941.
- Castro-Mancilla, Y.V., Castro-Meza, B.I., de la Garza-Requena, F.R., Rivera-Ortiz, P., Heyer-Rodríguez, L., Ortiz-Carrizales, Y.P. 2013. Variación de las poblaciones microbianas del suelo por la adición de hidrocarburos. *Terra*, 31: 221-230.
- Cerniglia, C.E., 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 4: 331-338.
- Cerqueira, V.S., Hollenbach, E.B., Maboni, F., Vainstein, M.H., Camargo, F.A.O., Peralba, M.R., Bento, F.M., 2011. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresource Technology*, 102: 11003-11010.
- Chaineau, C.H., Morel, J.L., Oudot, J. 1997. Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *Journal of Environmental Quality*, 26: 1478-1483.
- Chakraborty, S., Ghosh, M., Chakraborti, S., Jana, S., Kumar, K., Kokare, C., Zhang, L. 2015. Biosurfactant produced from *Actinomyces nocardiformis* A17: Characterization and its biological evaluation. *International Journal of Biology and Biotechnology*, 79: 405-412.

- Chandankere, R., Yao, J., Cai, M., Masakorala, K., Jain, A.K., Choi, M.M.F., 2014. Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. *Fuel*, 122; 140-148
- Chandankere, R., Yao, J., Choi, M.F.M., Masakorala, K., Chan, Y. 2013. An efficient biosurfactant-producing and crude-oil emulsifying bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa isolated from petroleum reservoir. *Biochemical Engineering Journal*, 74, 46-53.
- Charman, P.E., Murphy, B.W. 2007. Soils their properties and management. Hong Kong: Oxford University Press. 250 p.
- Chia-Wei, P., Bakar, N.F.A., Hamzah, A. 2013. A comparative study on biosurfactant activity of crude oil-degrading bacteria and its correlation to total petroleum hydrocarbon degradation. *Bioremediation Journal*, 17, 240-251.
- Chiu, H. Y., Hong, A., Lin, S. L., Surampalli, R. Y., Kao, C. M. 2013. Application of natural attenuation for the control of petroleum hydrocarbon plume: Mechanisms and effectiveness evaluation. *Environmental Health Perspectives*, 505: 126-137.
- Chowdhury, S., Bala, N.N., Dhauria, P., 2012. Bioremediation a natural way to clean environment. IJPCBS commonly regulated elemental surface soil contamination. *Journal of Environmental Management*, 2: 72-95.
- Chrisman, E., Lima, V., Menechini, P. 2012. Asphaltenes-Problems and Solutions in E&P of Brazilian Crude Oils, En: El-Sayed, M., Abdul-Raouf (Ed.), Crude Oil Emulsions-Composition Stability and Characterization, InTech. 27 p.
- Cofield, N., Banks, M.K., Schwab, A.P. 2008. Lability of polycyclic aromatic hydrocarbon sin the rhizosphere. *Chemosphere*, 70: 1664-1652.

- CONAGUA. 2014. Normales climatológicas por estación. Available from [http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&i=D168&tmpl=component](http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&i=D168&tmpl=component) Accessed: 06 January, 2015
- Cookson, Jr. John .T. 1995. Bioremediation engineering design and application. McGrawHill. Appendix B. New York. 524 p.
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G., 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 224-229.
- Cooper, D.G., Zajic, J.E., 1980. Surface active compounds from microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 26: 229-253.
- Cortés-Sánchez, J.A., Hernández-Sánchez, H., Aramillo-Flores, A.E. 2013. Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: New trends and possible therapeutic alternatives. *Research in Microbiology*, 68: 22-32.
- Coulon, F. Brassington, K.J., Bazin, R., Linnet, P.E., Thomas, K.A., Mitchell, T.R., Lethbridge, G., Smith, J. W.N., Pollard, S.J.T. 2012. Effect of fertilizer formulation and bioaugmentation on biodegradation and leaching of crude oils and refined products in soils, *Environmental Technology*, 33: 1879-1893.
- Couto, M.N.P.F.S., Pinto, D., Basto, P.C.M., Vasconcelos, T.S.D., 2012. Role of natural attenuation, phytoremediation and hybrid technologies in the remediation of a refinery soil with old/recent petroleum hydrocarbons contamination. *Environmental Technology*, 33: 2097-210.
- Crisafi, F., Genovese, M., Smedile, F., Russo, D., Catalfamo, M., Yakimov, M., Denaro, R. 2016. Bioremediation technologies for polluted seawater sampled after an oil-spill. En: Taranto

- Gulf (Italy): A comparison of biostimulation, bioaugmentation and use of a washing agent in *Surfaces B: Biointerfaces*, 84: 292-300.
- Das, R., Tiwary, B.N. 2014. Production of indole acetic acid by a novel bacterial strain of *Planomicrobium chinense* isolated from diesel oil contaminated site and its impact on the growth of *Vigna radiata*. *European Journal of Soil Biology*, 62: 92-100.
- Dastillung, M., Albrecht, P. 1979. Molecular test for oil pollution in surface sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 7: 13-15.
- Dave, B.P., Ghevariya, M.Ch., Bhatt, K. J., Dudhagara, R.D., Rajpara, K.R., 2014. Enhanced biodegradation of total polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by marine halotolerant *Achromobacter xylosoxidans* using Triton X-100 and b-cyclodextrin - A microcosm approach. *Marine Pollution Bulletin*, 79: 123-129.
- Daverey, A., Pakshirajan, K. 2011. Recent advances in bioremediation of contaminated soil and water using microbial surfactants. En: Ahmad, I., Ahmad, F., Pichtel, F. (Ed.), *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*. Springer New York Dordrecht Heidelberg London. pp. 207-228.
- de Bashan, L.E., Hernandez. J-P., Bashana, Y. 2012. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation-A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology*, 61: 171-189.
- De la Cruz Landero, N. 2010. Especies de leguminosas como fitorremediadoras en suelos contaminados. Tesis de Doctorado en ciencias, postgrado de edafología, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. México. 145 p.

- de la Cueva, S.C., Rodríguez, C.H., Cruz, N.O.S., Contreras, J.A.R., Miranda, J.L. 2016. Changes in bacterial populations during bioremediation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons. *Water Air Soil Pollution*, 227: 1-12.
- Deepika, K.V., Kalam, S., Sridhar, R.P., Podile, A.R., Bramhachari, P.V. 2016. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production by mangrove sediment bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KVD-HR42 using response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5: 38-47.
- Desai, J.D., Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 61: 47-64.
- Dias R.L., Lucas, R., Calabró A., Lo Balbo A., Del Panno, M.T., Mac Cormack W.P. 2015. Hydrocarbon removal and bacterial community structure in on-site biostimulated biopile systems designed for bioremediation of diesel-contaminated Antarctic soil. *Polar Biology*, 38: 677-687
- Díaz, E., Jiménez, J., Nogales, I.J., 2013. Aerobic degradation of aromatic compounds. *Current Opinion in Biotechnology* 24: 431-442.
- Díaz-Martínez, M.E., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suarez, J.J., García-Barradas, O., 2013. Crecimiento de *casuarina equisetifolia* (Casuarinaceae) en suelo con diésel, y aplicación de bioestimulación y bioaumentación. *Revista de Biología Tropical*, 61: 1039-1052.
- Díaz-Ramírez, I. Escalante-Espinosa, E. Schroeder, R.A., Fócil-Monterrubio R. Ramírez-Saad H. 2013. Hydrocarbon biodegradation potential of native and exogenous microbial inocula in mexican tropical soils. En: Chamy, R., Rosenkranz F. (Ed.), Biodegradation of hazardous and special products. *InTech*. pp. 155-178

- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2003. NOM-138- SEMARNAT/SS-2003. Norma Oficial Mexicana NOM-138- SEMARNAT/SS-2003. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Diario Oficial de la Federación. 29 de Enero de 2015
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2006. NMX-AA-134-SCFI-2006. Suelo-hidrocarburos fracción pesada extracción y gravimetría método de prueba. Diario Oficial 12 de octubre 2006. Secretaria de Economía, México D.F.
- DOF, Diario Oficial de la Federación. 2002. NOM-021-SEMARNAT-2003. Norma Oficial Mexicana NOM-021- SEMARNAT -2003, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación. 31 diciembre 2014. Segunda sección. 75 p.
- Dong, W.H, Zhang, Y., Lin, X.Y., Tabouré, A., 2014. Adsorption studies of 1, 2, 4-trichlorobenzene onto shallow aquifer media at the *Luhuagang's* landfill site in Kaifeng, China. *Environmental Earth Sciences*, 71: 4353-4362.
- Erkelens, M., Adetutu, E.M., Taha, M., Tudararo-Aherobo, L., Antiabong, J., Provatas, A., Ball, A.S. 2012. Sustainable remediation-The application of bioremediated soil for use in the degradation of TNT chips. *Journal of Environmental Management*, 110: 69-76.
- Fakruddin, M. 2012. Biosurfactant: Production and Application. *Petroleum and Environmental*, 3: 1-5.
- Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D., Larroche, C., 2008. *In situ* bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review. *Bioresource technology*, 99: 5296-5308.



- Fatima, K., Imran, A., Amin, I., Khan, Q.M., Afzal, M. 2016. Plant species affect colonization patterns and metabolic activity of associated endophytes during phytoremediation of crude oil-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 23; 6188-6196.
- Feng, W., Swift, S., Singhal, N. 2013. Effects of surfactants on cell surface tension parameters and hydrophobicity of *Pseudomonas putida* 852 and *Rhodococcus erythropolis* 3586. *Colloids and Surfaces B*: 105: 43-50.
- Ferreira, N.T.C., Santos, O.F.J., Pessoa, De F.F., 2013. Biorremediación de un suelo tropical contaminado con residuos aceitosos intemperizados. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29: 21-28.
- Ferrera-Cerrato, R. Alarcón, A. 2013. Microorganismos rizosféricos durante la fitorremediación de hidrocarburos del petróleo en suelos. En: Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R. (Ed.), Biorremediación de suelos y aguas contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos. Trillas, México, pp. 15-30.
- Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Mendoza-López, M.R., Sangabriel, W., Trejo-Aguilar, D., Cruz-Sánchez, J., López-Ortiz, C., Delgadillo-Martínez, J. 2007. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia*, 41: 817-826.
- Fester, T., Giebler, J., Wick, L.Y., Schlosser, D., Kästner, M. 2014. Plant–Microbe interactions as drivers of ecosystem functions relevant for the biodegradation of organic contaminants. *Current Opinion in Biotechnology*, 27: 168-175.
- Flores, M.J.A. 1983. Bromatología animal. (3<sup>ra</sup> Ed.), Limusa. México. 1096 p.
- Fodelianakis, S., Antoniou, E., Mapelli, F., Magagnini, M., Nikolopoulou, M., Marasco, R., Barbato, M., Tsiola, A., Tsikopoulou, I., Giaccaglia, L., Mahjoubi, M., Jaouani, A., Amer, R.,

- Hussein, E., Al-Horani, F.A., Benzha, F., Blaghen, M., Malkawi, H. I., Abdel-Fattah, Y., Cherif, A., Daffonchio, D., Kalogerakis, N. 2015. Allochthonous bioaugmentation in *ex situ* treatment of crude oil-polluted sediments in the presence of an effective degrading indigenous microbiome. *Journal of Hazardous Materials*, 287: 78-86.
- Gallego, J.L.R., Loredó, J., Llamas, J.F., Vázquez, F., Sánchez, J. 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*, 12: 325-335.
- Galtier N., Gouy, M., Gautier, C. 1996. Seaview and Phylowin, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 543-548.
- Gao, H.J. 2009. Bioaccumulation of hexachlorobenzene in *Eisenia foetida* at different aging stages. *Journal of Environmental Science*, 21: 948-953.
- Gao, Y., Guo, S., Wang, J., Li, D., Wang, H., Zeng, D.-H., 2014. Effects of different remediation treatments on crude oil contaminated saline soil. *Chemosphere*, 117: 486-493.
- García, E., Ferrera-Cerrato, R., Almaráz, J.J., Rodríguez, R., García, E. 2013. Biodegradación de queroseno en la rizósfera de gramíneas en condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense*, 37: 125-134
- 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: 93-10
- Gaskin, S., Soole, K., Bentham, R., 2008. Screening of Australian native grasses for rhizoremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 10: 378-389.

- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 990: 87-92.
- Gerhardt, K.E., Huang, X., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants. *Plant Science*, 176: 20-30.
- Geys, R., Soetaert, W., Bogaert, V.I., 2014. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. *Current Opinion in Biotechnology*, 30: 66-72.
- Gill, R.T., Harbottle, M.J., Smith, J.W.N., Thornton, S.F., 2014. Electrokinetic-enhanced bioremediation of organic contaminants: A review of processes and environmental applications. *Chemosphere*, 107: 31-42.
- Glick, B.R. 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 28: 367-374.
- Glick, B.R., Penrose, D.M., Li, J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190: 63-68.
- Gomez, F., Sartaj, M. 2014. Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 89: 103-109.
- González-Paredes, Y., Alarcón A., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz, J.J., Martínez-Romero, E., Cruz-Sánchez, J.S., Mendoza-López, Ma.R., Ormeno-Orrillo, E., 2013. Tolerance, growth and degradation of phenanthrene and benzo[a] pyrene by *Rhizobium tropici* CIAT 899 in liquid culture medium. *Applied Soil Ecology*, 63: 105-111.

- Gouda, M.K., Omar, S.H., Eldin, H.M., Checkroud, Z.A., 2008. Bioremediation of kerosene II: a case study in contaminated clay (laboratory and field: microcosm scale). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 1451-1460.
- Greenwood, P.F., Wibrow, S., George, S.J., Tibbett, M. 2008. Sequential hydrocarbon biodegradation in a soil from arid coastal Australia, treated with oil under laboratory controlled conditions. *Organization of Geochemistry*, 39: 1336-46.
- Gurska, J., Wang, W., Gerhardt, K.E., Khalid, A.M., Isherwood, D.M., Huang, X.-D., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2009. Three year field test of a plant growth promoting rhizobacteria enhanced phytoremediation system at a land farm for treatment of hydrocarbon waste. *Environmental Science and Technology*, 43: 4472-4479.
- Hai-lin, Z., Zhi-yong, H., Jian-long, W., Duan-lin, C., 2014. Micellization of gemini surfactant with dibenzyl ether spacer in water–organic mixed media. *Journal of Molecular Liquids*. 195: 54-58.
- Hall, T.J. 1985. Adaptation and agronomy of *Clitoria ternatea* in Northern Australia. *Trop. Grasslands*, 19: 156-163.
- Hosokawa, R., Nagai, M., Morikawa, M., Okuyama, H., 2009. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 1519-1528.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Cappello, S. 2012. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea Mar. *Marine Pollution Bulletin*, 64: 7-12.

- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Caruso, G., Cappello, S., 2014 Bioremediation (bioaugmentation/biostimulation) trials of oil polluted seawater: A mesocosm simulation study. *Marine Environmental Research*, 95: 28-38.
- Hernández-Acosta E., Gutiérrez-Castorena, M.C., Rubiños-Panta, J.E., Alvarado-López, J. 2006. Caracterización del suelo y plantas de un sitio contaminado con hidrocarburos. *Terra*, 24: 463-470.
- Hesham, A.E. L., Mawad, A.M. M., Mostafa, Y. M., Shoreit, A. 2014. Biodegradation ability and catabolic genes of petroleum-degrading *Sphingomonas koreensis* strain ASU-06 isolated from Egyptian oily soil. *BioMed Research International*, Volume 2014, Article ID 127674.
- Hommel, R.K., 1990. Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon utilizing microorganisms. *Biodegradation*, 1: 107-119.
- Hošková, M., Schreiberová, O., Ježdík, R., Chudoba, J., Masák, J., Sigler, K., Rezanka, T., 2013. Characterization of rhamnolipids produced by non-pathogenic *Actinetobacter* and *Enterobacter* bacteria. *Bioresource Technology*, 130: 510-516.
- Huang, X.D., El-Alawi, Y., Gurska, J., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2005. A multiprocess phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchemical Journal*, 81: 139-147.
- Ibrahim, M.L., Ijah, U.J.J., Manga, S.B., Bilbis, L.S., Umar, S. 2013. Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 81: 28-34.
- Ibrahim, M.M., Al-Turki, A., Al-Sewedi, D., Ibrahim, A.A., El-Gaaly, G. 2015. Molecular application for identification of polycyclic aromatic hydrocarbons degrading bacteria

- (PAHD) species isolated from oil polluted soil in Dammam, Saud Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22: 651-655.
- INEGI. 2005. Síntesis de Información Geográfica del Estado de Tabasco (1a. ed.). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México. 100 p. C Mapa 1:500,000.
- Inès, M., Dhouha, G. 2015. Glycolipid biosurfactants: Potential related biomedical and biotechnological applications. *Carbohydrate Research*, 416: 59-69.
- Ismail, W., Al-Rowaihi, I.S., Al-Humam, A.A., Hamza, R.Y., El Nayal, A.M., Bououdina, M., 2013. Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by a crude-oil-emulsifying *Bacillus* sp. I-15. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 84: 168-178.
- Jain, D.K., Collins-Thompson, D.L., Lee, H., Trevors, J.T., 1991. A drop-collapsing test for screening biosurfactant-producing microorganisms. *Journal Microbiology Methods*, 13: 271-279.
- Jajoo, A., Rao, M. N., Singh, T. R., Grieco, M., Tikkanen, M. Eva-Mari, A.2014. Inhibitory effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on photosynthetic performance are not related to their aromaticity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 137: 151-155.
- Jalal, A.G., Li, X., Xiao-Jian X., Shi K., Yan-Hong Z. Jing-Quan Y. 2015. Enhanced photosynthetic capacity and antioxidant potential mediate brassinosteroid-induced phenanthrene stress tolerance in tomato. *Environmental Pollution*, 201: 58-66.
- Jara, M.A.T. A., Andrade, F.S. R., Campos-Takaki, M. G., 2013. Physicochemical characterization of tensio-active produced by *Geobacillus stearothermophilus* isolated from petroleum-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 101: 315-318.

- Jiang, Y., Brassington, J.K., Prpich, G., Paton, I.G., Semple, T.K., Pollard, J.T.S., Coulon, F. 2016. Insights into the biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soils by bioaugmentation and nutrient stimulation. *Chemosphere*, 161: 300-307.
- Jiménez, I.D., Mmedina, M.S.A., Gracida, R.J.N., 2010. Propiedades, aplicaciones y producción de los biotensoactivos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 26: 65-84.
- Jorfi, S., Rezaee, A., Mobeh-Ali, G.-A., Jaafarzadeh, N.A. 2013. Application of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for bioremediation of soils contaminated by pyrene. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 22: 890-911.
- Jorgensen, K.S., Puustinen, J., Suortti, A.M. 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution*, 107: 245-254.
- Jung, S.W., Park, J.S., Kown, O.Y., Kang, J.N., Shim, W.J., Kim, Y.O. 2010. Effects of crude oil on marine microbial communities in short term outdoor microcosms. *Journal Microbiology*, 48: 594-600.
- Kaczorek, E., Moszynska, S., Olszanowski, A. 2011. Modification of cell surface properties of *Pseudomonas alcaligenes* S22 during hydrocarbon biodegradation. *Biodegradation*, 22: 359-366.
- Kalantary, R.R., Badkoubi, A., Mohseni-Bandpi, A., Esrafil, A., Jorfi, S., Dehghanifard, E., 2013. Modification of PAHs biodegradation with humic compounds. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 22: 185-198.
- Khan, S., Afzal, M., Iqbal, S., Khan, Q.M. 2013. Plant–Bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere*, 90: 1317-1332.

- Kim, J., Kang, S.-H., Min, K.-A., Cho, K.-S., Lee, I.-S., 2006. Rhizosphere microbial activity during phytoremediation of diesel-contaminated soil. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*: 41: 2503-2516.
- Kim, K.D. 2014. Effects of diesel and kerosene on germination and growth of coastal wetland plant species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 93: 596-602.
- Kirk, J.L., Klironomos, J.N., Lee, H., Trevors, J.T., 2005. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution*, 133: 455-465.
- Kukla, M., Płocniczak, T., Piotrowska-Seget, Z. 2014. Diversity of endophytic bacteria in *Lolium perenne* and their potential to degrade petroleum hydrocarbons and promote plant growth. *Chemosphere*, 117: 40-46.
- Kulkarni, S.V., Palande, A.S., Deshpande, M.V. 2012. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soils. En: Satyanarayana, T., Anil, P.B.N.J.P. (Ed.), *Microorganisms in environmental management: Microbes and environment*, Springer, New York. pp. 588-606.
- Kumar, A., Bisht, B.S., Joshi, V.D., Dhewa, T., 2011. Review on bioremediation of polluted environment: A Manage Tool. *International Journal of Environmental Sciences*, 1: 1079-1093.
- Kumar, R., Das, A.J., Juwarkar, A.A. 2014. Restoration of petrol contaminated soil by PGPR consortium producing rhamnolipids and enhancement of growth and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*, S5:001.  
<http://dx.doi.org/10.4172/2157-7463.S5-001>



- Kummerová, M., Váňová, L., Krulová, J., Zezulka, Š. 2008. The use of physiological characteristics for comparison of organic compounds phytotoxicity. *Chemosphere*, 71: 2050-2059.
- Lakra, Y., Tikarihaa, D., Yadav, T., Das, S., Ghosh, S., Manmohan, S.L., Ghosh, K.K., 2014. Mixed micellization of geminis and cationic surfactants: Physicochemical properties and solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering*, 451: 56-65.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., López, R., Thompson, J.D., Gibson, F.J., Higgins, D.G. 2007. Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-48.
- Lau, V.E., Gan, S., Kiat, H.N., Eong, P.P., 2014. Extraction agents for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil in soil washing technologies. *Environmental Pollution*, 184: 640-649.
- Leahy, J.G., Colwell, R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 54: 305-315.
- Lebeau, T., Braud, A., Jezequel, K., 2008. Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: a review. *Environmental Pollution*, 153: 497-522.
- Lewis MA. 1990. Chronic toxicities of surfactants and detergent builders to Algae: A Review and risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 20: 123-140.
- Li, H., Chen, J., Lin, J. 2014. Elevated critical micelle concentration in soil–water system and its implication on PAH removal and surfactant selecting. *Environmental Earth Sciences*, 71: 3991-3998.

- Li, X., Lin, X., Li, P., Liu, W., Wang, L., Ma, F., Chukwuka, K.S. 2009. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *Journal of Hazardous Materials*, 172: 601-605.
- Liao, C., Liang, X., Lu, G., Thai, T., Xu, W. 2015. Ecotoxicology and environmental safety effect of surfactant amendment to PAHs-contaminated soil for phytoremediation by maize (*Zea mays* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112: 1-6.
- Liao, Cha., Xua, W., Lua, G., Denga, F., Lianga, X., Guoa, Ch., Danga, Z., 2016. Biosurfactant-enhanced phytoremediation of soils contaminated by crude oil using maize (*Zea mays*. L). *Ecological Engineering*, 92: 10-17.
- Lin, M., Liu, Y., Chen, W., Wang, H., Hu, X. 2014. Use of bacteria-immobilized cotton fibers to absorb and degrade crude oil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 88: 8-12.
- Liu, R., Xiao, N., Wei, S., Zhao, L., An, J. 2014. Rhizosphere effects of PAH-contaminated soil phytoremediation using a special plant named Fire Phoenix. *Science of the Total Environment*, 473-474: 350-358.
- Lladó, S., Solanas, a M., de Lapuente, J., Borràs, M., Viñas, M. 2012. A diversified approach to evaluate biostimulation and bioaugmentation strategies for heavy-oil-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 435-436: 262-9.
- López-Ortiz, C., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón A., Almaraz, J.J., Martínez-Romero, E., Mendoza-López, M.R. 2012. Establecimiento y respuestas fisiológicas de la simbiosis *Rhizobium tropici*-*Leucaena leucocephala* en presencia de fenantreno y naftaleno. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 28: 333-342.
- Luna M.J., Rufino, D.R., Jara, A.T.A.M., Brasileiro, P.F.P., Sarubbo, A.L. 2015. Environmental applications of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost

- substrates. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 480: 413-418.
- Luna, J.M., Rufino, R.D., Albuquerque, C.D., Sarubbo, L.A., Campos-Takaki, G.M. 2011. Economic optimized medium for tensio-active agent production by *Candida sphaerica* and application in the removal of hydrophobic contaminant from Sand. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 2463-2476.
- Ma, B., He, Y., Chen, H., Xu, J., Rengel, Z. 2010. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the rhizosphere: synthesis through meta-analysis. *Environmental Pollution*. 158: 855-61.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Rocha, I., Oliveira, R.S., Freitas, H. 2015. Serpentine bacteria influence metal translocation and bioconcentration of *Brassica juncea* and *Ricinus communis* grown in multi-metal polluted soils. *Frontiers in Plant Science/Plant Biotechnology*, 5: 757.
- Madigan, M.T., Martiko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, P.D. 2009. Brock. Biología de los microorganismos. (12th Ed.), Pearson Educación, S. A. Madrid, España. 1259 p.
- Mair, J., Schinner, F., Margesin, R. 2013. A feasibility study on the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from an Alpine former military site: Effects of temperature and biostimulation. *Cold Regions Science and Technology*, 96: 122-128.
- Makadia, T.H., Adetutu, E.M., Simons, K.L., Jardine, D., Sheppard, P.J., Ball, A.S., 2011. Re-use of remediated soils for the bioremediation of waste oil sludge. *Journal of Environmental Management*, 92: 866-871.
- Maletić, S.P., Dalmacija, B.D., Rončević, S.D., Agbaba, J.R., Ugarčina, P.S.D. 2011. Impact of hydrocarbon type, concentration and weathering on its biodegradability in soil, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 46: 1042-1049.

- Martin, B.C., George, S.J., Price, C.A., Ryan, M.H., Tibbett, M. 2014. The role of root exuded low molecular weight organic anions in facilitating petroleum hydrocarbon degradation: Current knowledge and future directions. *Science of the Total Environment*, 472: 642-653.
- Masakorala, K., Yao, J., Cai, M., Chandankere, R., Yuan, H., Chen, H., 2013. Isolation and characterization of a novel phenanthrene (PHE) degrading strain *Psuedomonas* sp. USTB-RU from petroleum contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 263: 493-500.
- Masciandaro, G., Macci, C., Peruzzi, E., Ceccanti, B., Doni, S. 2013. Organic matter–microorganism–plant in soil bioremediation: a synergic approach. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12: 399-419.
- Masy, T., Sandrine Demaneche, S., Tromme, O., Thonart, P., Jacques, P., Serge Hiligsmann, S., Vogé, T.M. 2016. Hydrocarbon biostimulation and bioaugmentation in organic carbon and clay-rich soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 99: 66-74
- Mehnaz, S, Baig, D.N., Lazarovits, G. 2010. Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20:1614-1623.
- Méndez, E.D., Castellanos, G.I., Alba, G., Hernández, S., Solís, G., Levresse, M., Vega, F., Rodríguez, E., Urbina, M.C., Cuevas, M.G., García, E.B., 2011. Effect in the physical and chemical properties of Gleysol soil after an electro-kinetic treatment in presence of surfactant Triton X -114 to remove hydrocarbon. *International Journal of Electrochemical Science*, 6. 1250-1268.
- Meyer, D.D., Anderson, B.S., Bücken, F., Ruaro, P. M.do C., Guedes, F.A.P., Osti, J.F., Andrezza, R., de Oliveira, C.F.A., Bento, M.F., 2014. Bioremediation strategies for diesel and biodiesel

- in oxisol from southern Brazil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 95: 356-363.
- Mitler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405-410.
- Mohamed, T., Juan, A.O., Inmaculada, G.R. 2002 Production of xyloglucan lytic enzymes by *Trichoderma viride*, *Paecilomyces farinosus*, *Wardomyces inflatus*, and *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia*, 94: 404-410.
- Molina-Barahona, L., L. Vega-Loyo, M. Guerrero, S. Ramírez, I. Romero, C. Vega-Jarquín, A. Albores. 2005. Ecotoxicological evaluation of diesel-contaminated soil before and after a bioremediation process. *Environmental Toxicology*, 20: 100-109.
- Montero-Rodríguez, D., Rosileide, F.S.A., Luana, R.R.D., Ribeiro, R., Rubio-Ribeaux, D., Lima, R.A., Araújo, E.C.H., Campos-Takaki, M.G. 2015. Bioremediation of petroleum derivative using biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 in low-cost medium. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 4: 550-562.
- Moreira, I.T.A., Oliveira, O.M.C., Triguís, J. A., Queiroz, A.F.S., Ferreira, S.L.C., Martins, C.M.S., Falcão, B.A. 2013. Phytoremediation in mangrove sediments impacted by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's) using *Avicennia schaueriana*. *Marine Pollution Bulletin*, 67: 30-136.
- Moreira, I.T.A., Oliveira, O.M.C., Triguís, J.A., dos Santos, A.M.P., Queiroz, A.F.S., Martins, C.M.S., Jesus, R.S. 2011. Phytoremediation using *Rizophora mangle* L. in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's). *Microchemical Journal*, 99: 376-382.

- Morgulis, A., Aoulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T.L., Agarwala, R., Schäffer, A.A. 2008. Database indexing for production megablast searches. *Bioinformatics*, 15: 1757-64.
- Mrozik, A.P. Seget-Z. 2009. Bioaugmentation as a strategy for cleaning soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, 65: 363-375.
- Mukherjee, A.K., Bordoloi, K.N. 2011. Bioremediation and reclamation of soil contaminated with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: a pilot-scale study. *Environmental Science and Pollution Research*, 18: 471-478.
- Mukherjee, A.K., Das, K. 2005. Correlation between diverse cyclic lipopeptides production and regulation of growth and substrate utilization by *Bacillus subtilis* strains in a particular habitat. *FEMS Microbiology Ecology*, 54: 479-489.
- Muratova, A., Golubev, S., Wittenmayer, L., Dmitrieva, T., Bondarenkova, A., Hirche, F., Merbach, W., Turkovskaya, O. 2009. Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene on root exudation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Environmental and Experimental Botany*, 66: 514-521.
- Mu-Tai, B., Li-Na, W., Pei-Yan, S., Li-Xin, C., Jie, Z., Yi-ming, L. 2012. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated. *Marine Pollution Bulletin*, 64: 1177-1185.
- Nakano H, Makino A, Mae T. 1997. The effect of elevated partial pressures of CO<sub>2</sub>, on the relationship between photosynthetic capacity and N content in rice leaves. *Journal of Plant Physiology*, 115: 191-198.
- Nalini, S. Parthasarathi, R. 2013. Biosurfactant production by *Serratia rubidaea* SNAU02 isolated from hydrocarbon contaminated soil and its physico-chemical characterization. *Bioresource Technology*, 147: 619-622.

- Nasr, S., Soudi, M.R., Mehrnia, M.R., Sarrafzadeh, M.H., 2009. Characterization of novel biosurfactant producing strains of *Bacillus* spp. isolated from petroleum contaminated soil. *Iranian Journal of Microbiology*, 1: 54-61.
- Ngo, V.V., Michel, J., Gujisaitea, V., Abderrazak, L.A., Marie-Odile, S., 2014. Parameters describing nonequilibrium transport of polycyclic aromatic hydrocarbons through contaminated soil columns: Estimability analysis, correlation, and optimization. *Journal of Contaminant Hydrology*, 158: 93-109.
- Nikolopoulou, M., Eickenbusch, P., Pasadakis, N., Venieri, D., Kalogeraskis, N. 2013a. Microcosm evaluation of autochthonous bioaugmentation to combat marine oil spills, *New Biotechnology*, 30: 734-742
- Nikolopoulou, M., Kalogerakis, N. 2008. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Marine Pollution Bulletin*, 56: 1855-1861.
- Nikolopoulou, M., Kalogerakis, N., 2009. Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84: 802-807.
- Nikolopoulou, M., Pasadakis, N. y Kalogeraskis, N. 2013b. Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm simulated oil spills, *Marine Pollution Bulletin*, 72: 165-173.
- Odjegba, V.J., Sadiq, A.O., 2002. Effect of spent engine oil on the growth parameters, chlorophyll and protein level of *Amaranthus hybridus* L. *Environmentalist*, 22: 23-28.
- Ojeda-Morales, M.E., Hernández-Rivera, Martínez-Vázquez, G.J., Córdova-Bautista, Y., Hernández-Cardeno, Y.E. 2013. Optimal parameters for *in vitro* development of the fungus

- hydrocarbonoclastic *Penicillium sp.* *Advances in Chemical Engineering and Science*, 3: 19-29.
- Okere, U., Semple, K.T. 2012. Biodegradation of PAHS in pristine soils from different climatic regions. *Journal Bioremediation and Biodegradation*, 01: 1-11.
- Okoliegbe, I.N., Agarry, O.O., 2012. Application of microbial surfactant (Review). *Scholarly Journals of Biotechnology*, 1: 15-23.
- Onur, G., Yilmaz, F., Içgen, B. 2015. Diesel oil degradation potential of a bacterium inhabiting petroleum hydrocarbon contaminated surface waters and characterization of its emulsification ability. *Journal of Surfactants and Detergents*, 18: 707-717.
- Ortíz, B.O., Ize, I.I., Gavilán, A.G. 2003. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica ISSN*. 69: 1405-2849.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płociniczak, T., Iwan, J., Źarska, M., Chorązewski, M., Dzida, M., Piotrowska-Seget, Z. 2016. Isolation of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing bacteria and assessment their plant growth-promoting traits. *Journal of Environmental Management*, 168: 175-184.
- Palma-López, D.J., Cisneros, D.J., Moreno, C.E., Rincón-Ramírez, J.A., 2006. Plan de uso sustentable de los suelos de Tabasco. (3<sup>ra</sup> Ed.), ISPROTAB fundación PRODUCE Tabasco-Colegio de Postgraduados. Villahermosa, Tabasco, México. 196 p.
- Pearcy, R., Björkman, O., Caldwell, M., Keeley, J., Monson, R., Strain, B., 1987. Carbon gain by plants in natural environments. *Bioscience*, 37: 21-29.
- PEMEX., 1988. El petróleo. Edición revisada y editada por H. Covantes. México, D.F. 176 p.
- Peralta, M.A. 1988. Leguminosas en la producción de carne y leche en el trópico. *Revista Cebú*, 14: 35-52.



- Pérez-Hernández, I., Ochoa-Gaona, S., Adams, S.R.H., Rivera-Cruz, M.C., Geissen, V. 2013. Tolerance of four tropical tree species to heavy petroleum contamination *Water, Air, and Soil Pollut*, 224: 1637.
- Pikovskaya, R.I., 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17: 362-370.
- Pimmata, P., Reungsanga A., Plangklang, P. 2013. Comparative bioremediation of carbofuran contaminated soil by natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 85: 196-204.
- Pinedo, J., Ibáñez R., Lijzen, J.P.A., Irabien, Á. 2013. Assessment of soil pollution based on total petroleum hydrocarbons and individual oil substances. *Journal of Environmental Management*, 130: 72-79.
- Pontes, J., Mucha, A.P., Santos, H., Reis, I., Bordalo, A., Basto, M.C. 2013. Potential of bioremediation for buried oil removal in beaches after an oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 76: 258-265.
- PROFEPA. 2015. Análisis nacional de emergencias ambientales. [[http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/6846/1/mx/analisis\\_en\\_presa\\_%E2%80%9C el\\_comedero%E2%80%9D\\_no\\_muestran\\_signos\\_de\\_contaminacion\\_ni\\_jales\\_de\\_mina\\_%E2%80%9Cdos\\_senores%E2%80%9D\\_son\\_residuos\\_peligrosos:\\_profepa.html](http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/6846/1/mx/analisis_en_presa_%E2%80%9C el_comedero%E2%80%9D_no_muestran_signos_de_contaminacion_ni_jales_de_mina_%E2%80%9Cdos_senores%E2%80%9D_son_residuos_peligrosos:_profepa.html)]. Accessed: 25 de mayo 2016.
- Quiao, J., Zhang, C., Luo, S., Chen, W. 2014. Bioremediation of highly contaminated oilfield soil: bioaugmentation for enhancing aromatic compounds removal. *Front. Environmental Engineering Science*, 8: 293-304.

- Raju, M.N., Burgos, R., Kadiyala, V., Carrion, A.R., Bangeppagari, M. 2016. Removal of petroleum hydrocarbons from crude oil in solid and slurry phase by mixed soil microorganisms isolated from Ecuadorian oil fields. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 108: 85-90.
- Ramamurthy, A.S., Memarian, R. 2012. Phytoremediation of mixed soil contaminants. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223: 511-518.
- Ramírez, G.R.M., Urzúa, H.M del C., Camacho, C.A., Tsuzuki, R.G., Esquivel-Cote, R. 2015. Técnicas básicas de microbiología y su fundamento. México: Trillas, UNAM. DGAPA. 375 p.
- Rao, K.J., Chaudhuri, R.G., Paria, S. 2014. Naphthalene degradation in the presence of natural–synthetic surfactants mixture by mixed bacterial cultures. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2: 826-831
- Reddy, S. M., Naresh, B., Leela, T., Prashanthi, M., Madhusudhan, N., Dhanasri, G. Devi, P. 2010. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. *Bioresource Technology*, 101: 7980-7983.
- Rennie, R.J., 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 27: 8-14.
- Riser-Roberts, E. 1998. Remediation of petroleum contaminated soils. Lewis Publishers. USA. 576 p.
- Rivera-Cruz, M. C., Trujillo-García, A., Ferrera-Cerrato, R., Rodríguez-Vázquez, R., Volke, Haller, V., Sánchez-García, P., FernándezLinares, L. 2006. Fitorremediación de suelos con benzo (a) pireno mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán *Echinochloa polystachya* (H-B-K-) Hitchc. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*. 22: 1-12.

- Rivera-Cruz, M.C., Trujillo-Narcia A. 2004. Estudio de toxicidad vegetal en suelos contaminados con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia*, 29: 369-376.
- Rivera-Cruz, M.C., Trujillo-Narcia, A., Miranda, C.M.A., Maldonado, C.E. 2005. Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleo nuevo e íntemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia*, 30: 326-331.
- Rivera-Cruza, M.C., Trujillo-Narcia, A., Trujillo-Rivera, E.A., Arias-Trinidad, A., Mendoza-Lopez M.R. 2016. Natural attenuation of weathered oil using aquatic plants in a farm in Southeast Mexico. *International Journal of Phytoremediation*, 18:877-884.
- Riveroll-Larios, J., Escalante-espinoza, E., Fócil-Monterrubio R.L., Díaz-Ramírez I.J. 2015. Biological Activity Assessment in Mexican Tropical Soils with Different Hydrocarbon Contamination Histories. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226: 1-12.
- Rodríguez, L., Moldes, A., Teixeira, J., Oliveria, R., 2006. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochemical Engineering Journal*, 28: 109-116.
- Rodríguez-Rodríguez, N., Rivera-Cruz, M. C., Trujillo-Narcía, A., Almaráz-Suárez, J.J., Salgado-García, S. 2016. Spatial distribution of oil and biostimulation through the rhizosphere of *Leersia hexandra* in degraded Soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227; 319. doi: 10.1007/s11270-016-3030-9
- Rosenberg, M., Gutnick, D., Rosenberg, E. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9: 29-33.
- Rosselló-Mora, R., Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Review*, 25: 39-67.

- Roussak, O.V., Gesser, H.D. 2013. Crude Oil. En: Roussak O.V. Gesser H.D. (2<sup>nd</sup> Ed) Applied Chemistry: A Textbook for Engineers and Technologists. Springer, New York pp. 40-55.
- Roy, S., Chandni, S., Das, I., Karthik, L., Kumar, G., Bhaskara Rao, K.V. 2015. Aquatic model for engine oil degradation by rhamnolipid producing *Nocardiopsis* VITSISB. *Biotechnology*, 5: 153-164.
- Rubio-Clemente, A., Torres-Palma, R.A., Peñuela, G.A. 2014. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous environment by chemical treatments: *Science of the Total Environment*, 478: 201-225.
- Ruffini, C.M., Giorgetti, L., Becarelli, S., Siracusa, G., Lorenzi, R., Di Gregorio, S. 2016. Polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soils: bioaugmentation of autochthonous bacteria and toxicological assessment of the bioremediation process by means of *Vicia faba* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 23:7930-7941
- Saharan, B.S., Sahu, R.K., Sharma, D. 2011. Biosurfactants: Fermentation, current developments and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 2011: 1-14.
- Sakthipriya, N., Doble, M., Sangwai, S.J. 2015. Biosurfactant from *Pseudomonas* sp. with waxes as carbon source—their production, modeling and properties, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 31: 100-111.
- Salanitro, J.P., Dorn, P.B., Huesemann, M.H., Moore, K.O., Rhodes, I.A., Rice Jackson, L. M., Wisniewski, H.L. 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environmental Science and Technology*, 31:1769-1776.
- Salek, K., Zgoła-Grześkowiak, A., Kaczorek, E. 2013. Modification of surface and enzymatic properties of *Achromobacter denitrificans* and *Stenotrophomonas maltophilia* in association

- with diesel oil biodegradation enhanced with alkyl polyglucosides. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111: 36-42
- Sangabriel, W., Ferrera-Cerrato, R., Trejo-Aguilar, D., Mendoza-López, M.R., Cruz-Sánchez, J.S., López-Ortiz, C., Delgadillo-Martínez, J., Alarcón, A. 2006. Tolerancia y fitorremediación de suelo contaminado con combustóleo por seis especies vegetales. *Revista de Contaminación Ambiental*, 22: 63-73.
- Sarafin, Y., Birdilla, M., Donio, S., Velmurugan, S., Michaelbabu, M., Citarasu, T. 2014. *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21: 511-519.
- SAS Institute Inc. 2002 The SAS system for windows version 9.0 SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA.
- Sayara, T., Borrás, E., Caminal, G., Sarra, M., Sanchez, A., 2011. Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: Influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65: 859-865.
- Scheibye, K., Weisser, J., Borggaard, O.K., Larsen, M.M., Holm, E.P., Vammen, K., Christensen, H.J. 2014. Sediment baseline study of levels and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals in Lake Nicaragua. *Chemosphere*, 95: 556-565.
- Sekhon, K.K., Khanna, S., Cameotra, S.S. 2012. Biosurfactant production and potential correlation with esterase activity. *Asian Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*, 3: 1-33.
- Selvakumar, G., Mohan, M., Kundu, S., Gupta, A.D., Joshi, P., Nazim, S., Gupta, H.S., 2008. Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM

- (MTCC8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). *Letters in Applied Microbiology*, 46: 171-175.
- Shabir, G., Arslan, M., Fatima, K., Imran, A. M. I. N., Khan, Q. M., Afzal, M. 2016. Effects of inoculum density on plant growth and hydrocarbon degradation. *Pedosphere*, 26: 774-778.
- Shahi, A., Aydin, S., Ince, B., Ince, O., 2016. The effects of white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta* on microbial community structure and functional genes during the bioaugmentation process following biostimulation practice of petroleum contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 114: 67-74.
- Shahsavari, E., Adetutu, E.M., Taha, M., Ball, A.S. 2015. Rhizoremediation of phenanthrene and pyrene contaminated soil using wheat. *Journal of Environmental Management*, 155: 171-6.
- Shahzad, A., Saddiqui, S., Bano, A. 2016. The response of maize (*Zea mays* L.) plant assisted with bacterial consortium and fertilizer under oily sludge. *International Journal of Phytoremediation*. 18; 521-526.
- Shavandi, M., Mohebbali G., Haddadi A., Shakarami H., Nuhi A. 2011. Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82: 477-482.
- Sheppard, P.J., Simons, K.L., Adetutu, E.M., Kadali, K.K., Juhasz, A.L., Manefield, M., Ball, A.S. 2014. The application of a carrier-based bioremediation strategy for marine oil spills. *Marine Pollution Bulletin*. 84: 339-346.
- Shiri, M., Rabhi, M., Abdelly, Ch., El-Amrani, A. 2015. The halophytic model plant *thellungiella salsuginea* exhibited increased tolerance to phenanthrene-induced stress in comparison with the glycophytic one *Arabidopsis thaliana*: Application for phytoremediation. *Ecological Engineering*, 74: 125-134.

- Shoeb, E., Akhlaq, F., Badar, U., Akhter, J., Imtiaz, S. 2013. Classification and industrial applications of biosurfactants. *Journals Savap*, 4: 243-251.
- Sierra, G.A., 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 23: 15-22.
- Silva, R. de Cássia, F.S., Almeida, D.G., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Sarubbo, L.A., 2014. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 12523-12542.
- Silva-Castro, G. A., Uad, I., González-López, J., Fandiño, C.G., Toledo, F. L., Calvo, C. 2012. Application of selected microbial consortia combined with inorganic and oleophilic fertilizers to recuperate oil-polluted soil using land farming technology. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 14: 719-726.
- Silva-castro, G. A., Uad, I., Rodríguez-calvo, A., González-López, J., Calvo, C. 2015. Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments. *Environmental Research*, 137: 49-58.
- Silva-Castro, G.A., Rodriguez-Calvo, A., Laguna J., Gonzalez-López J., Calvo, C. 2016. Autochthonous microbial responses and hydrocarbons degradation in polluted soil during biostimulating treatments under different soil moisture. Assay in pilot plant. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 108: 91-98.
- Simarro, R., González, N., Bautista, L.F., Molina, M.C. 2013. Assessment of the efficiency of *in situ* bioremediation techniques in a creosote polluted soil: Change in bacterial community. *Journal of Hazardous Materials*, 262: 158-167.

- Singh, K., Chandra, S. 2013. Treatment of petroleum hydrocarbons polluted environment through bioremediation: A review. *Pakistan of journal biological sciences*, 17: 1-8.
- Singh, T. R. Jajoo A. 2014. Fluoranthene, a polycyclic aromatic hydrocarbon, inhibits light as well as dark reactions of photosynthesis in wheat (*Triticum aestivum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 109: 110-115
- Singh-Tomar, R., Jajoo, A. 2013. Alteration in PSII heterogeneity under the influence of polycyclic aromatic hydrocarbon (fluoranthene) in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Plant Science*, 09: 58- 63.
- Skerman, P.J. 1977. Tropical forage legumes. FAO-Plant Production and protection series. Rome, Italy. p. 609.
- Songa, X., Hong, E. Seagren, A.E. 2014. Laboratory-scale in situ bioremediation in heterogeneous porous media: Biokinetics-limited scenario. *Journal of Contaminant Hydrology*, 158: S78-92.
- Souza P.S. D., de Lima C.D., de Melo E.J.V., Ferreira, dos Santos P.N., Pacheco da L.E.L., Buarque, de G.N., Vieira, de Q.S. M. de F. 2015. Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 97: 85-89.
- Souza, E.C., Vessoni-Penna, T.Ch., Oliveira, R.P. de Souza. 2014. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 89: 88-94.
- Suja, F., Rahim, F., Raihan, T., M., Hambali, N., Razal, M.R., Khalid, A., Hamzah, A. 2014. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total



- petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. *International biodeterioration and biodegradation*, 90: 115-122.
- Szulc, A., Ambrozewicz, D., Sydow M., Lawniczak, Ł., Piotrowska-Cyplik, A., Marecik, R., Chrzanowski, Ł. 2014. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. *Journal of Environmental Management*, 132: 121-128.
- Tahri, J.N., Bahafid, W., Sayel, H., Ghachtouli, El N. 2013. Biodegradation: Involved microorganisms and genetically engineered microorganisms, En: Rolando, Ch. (Ed.), biodegradation life of Science. *InTech*, pp. 289-320.
- Takeuchia, E., Matsuoka, K., Ishii, S., Ishikawa, S., Honda, Ch., Endo, K. 2014. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in C16E7 nonionic surfactant solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 441: 133-139.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Tang, J., Lu, X., Sun, Q., Zhu, W. 2012. Aging effect of petroleum hydrocarbons in soil under different attenuation conditions. *Agriculture Ecosystems and Environment*, 149: 109-117.
- Tejeda-Agredano, M.C., Mayer, P., Ortega-Calvo, J.J. 2014. The effect of humic acids on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons depends on the exposure regime. *Environmental Pollution*, 184: 435-442.
- Tellechea, F.R.F., Martins, M.A., da Silva, A.A., da Gama-Rodrigues, E.F., Martins, M.L.L., 2016. Use of sugarcane filter cake and nitrogen, phosphorus and potassium fertilization in the

- process of bioremediation of soil contaminated with diesel. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 18027-18033.
- Thapa, B., Kumar, K. C. A., Ghimire, A. 2012. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*. 8: 164-170.
- Toribio-Jiménez, J., Velázquez-Aradillas, J.C., Romero-Ramírez, Y., Rodríguez-Barrera, M.A. Chávez-González, J.D., Guevara-Luna, J., Aguirre-Noyola, J.L., Fierro-Torres, A. 2014. *Pseudomonas* sp productoras de biosurfactantes, *Tlamati*. 5: 66-82.
- Totsche, K.U., Danzer, J., Kogel-Knabner, I. 1997. Dissolved organic matter-enhanced retention of polycyclic aromatic hydrocarbons soil miscible displacement experiment. *Journal of Environmental Quality*, 26:1090-1100.
- Trindade, P.V.O., Sobral, L.G., Rizzo, A.C.L., Leite, S.G.F., Soriano, A.U. 2005. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere*, 58: 515-522.
- Trujillo-Narcía, A., Rivera-Cruz, M., Lagunes-Espinoza, L.C., Palma-López, D.J., Sánchez-Soto, S., Ramírez-V. G. 2014. Uso de fertilizantes orgánicos en la enmendación de un fluvisol restaurado tras la contaminación con petróleo. *INTERCIENCIA*, 39: 266-273.
- Truu, J., Truu, M., Espenberg, M., Nõlvak, H., Juhanson, J. 2015. Phytoremediation and plant-assisted bioremediation in soil and treatment wetlands: A Review. *The Open Biotechnology Journal*, 9: 85-92.
- Tyagi, M., da Fonseca, M.M.R., de Carvalho, C.C.C.R. 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*. 22: 231-241.

- Uribe-Alvarez, C., Ayala, M., Pérez, G.L., Naranjo, L., Urbina, H., Vazquez-Duhalt, R. 2011. First evidence of mineralization of petroleum asphaltene by a strain of *Neosartorya fischeri*. *Microbial Biotechnology*, 4: 663-672.
- USEPA. 1986. U.S. Environmental Protection Agency, 1986. Test method for evaluating solid waste, SW-846, third ed., vol. 1A. U.S. EPA, Washington, DC.
- USEPA. 2004. Cleaning up the nation's waste sites: Markets and technology trends office of soil waste and emergency response. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. <http://www.epa.gov/download/market/2004market.pdf>. Consultada en Enero, 2010.
- USEPA-3540C. 1996. Soxhlet extraction organics. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. URL: <http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf>. Accessed: 10 enero 2010.
- Vázquez-Luna, D., Castelán-estrada, M., Rivera-cruz, M.C., Ortiz-ceballos, Á.I., Izquierdo, R.F. 2010. *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (Leguminosae): especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos de petróleo en el suelo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 26: 183-191.
- Viet, V., Ngo, V.V., Michel, J., Gujisaitea, V., Abderrazak, L.A., Marie-Odile, S. 2014. Parameters describing nonequilibrium transport of polycyclic aromatic hydrocarbons through contaminated soil columns: Estimability analysis, correlation, and optimization. *Journal of Contaminant Hydrology*, 158: 93-109
- Volke T. Velasco, J. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología, México. 64 p.

- Walkley, A., Black, I. A. 1934. An examination of the degtjareff method for determining organic carbon in soils: effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Science*, 63: 251-263.
- Wang, X.T., Miao, Y., Zhang, Y., Li, Y.C., Wu, M.H., Yu, G., 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface soil across the Tibetan Plateau: Spatial distribution, source and air-soil exchange. *Environmental Pollution*, 184: 38-144.
- Wilson, S.C., Jones, K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynucleararomatic hydrocarbons (PAHs): A Review. *Environmental Pollution*, 81: 229-249.
- Wiszniewska, A., Hanus-Fajerska, E., Muszyńska, E., Ciarkowska, K. 2016. Natural organic amendments for improved phytoremediation of polluted soils: A Review of Recent Progress. *Pedosphere*, 26: 1-12.
- Wrenn, B.A., Venosa, A.D. 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable number procedure. *Canadian Journal of Microbiology*, 42: 252-258.
- Wu, M., Dick, W. A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., Chen, L. 2016. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 107: 158-164
- Wu, M.L., Chen, L.M., Tian, Y.Q., Ding, Y., Dick, W.A., 2013. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microbial consortia enriched from three soils using two different culture media. *Environmental Pollution*, 178: 152-158.

- Xu, S.Y., Guang-Dong, S., Jing-Hua, J., Ying, L., Mu, L., Zhi-Ping, Z., Zhi-Pei, L. 2014. Successful bioremediation of an aged and heavily contaminated soil using a microbial/plant combination strategy. *Journal of Hazardous Materials*, 264: 430-438.
- Zamora, A., Ramos, J., Arias, M., 2012. Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro*, 24: 5-12.
- Zhang, L., Das, X. 2008. Rapid determination of damage to photosynthesis caused by salt and osmotic stress using delayed fluorescence of chloroplast. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 7: 352-360.
- Zhang, X., Liu, Z., Luc, N.T., Yu, Q., Liu, X., Liang, X. 2016. Impacts of soil petroleum contamination on nutrient release during litter decomposition of *Hippophae rhamnoides*. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 18: 398-405.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7: 203-214.
- Zhao, Z., Selvam, A., Woon-Chung W.J. 2011. Effects of rhamnolipids on cell surface hydrophobicity of PAH degrading bacteria and the biodegradation of phenanthrene. *Bioresource Technology*, 102: 3999-4007.
- Zhu, L., Wang, Y., Jiang, L., Lai, L., Ding, J., Liu, N., Rimmington, G.M. 2015. Effects of residual hydrocarbons on the reed community after 10 years of oil extraction and the effectiveness of different biological indicators for the long-term risk assessments. *Ecological Indicators*, 48: 235-243.
- Zhu, L., Zhang, M. 2008. Effect of rhamnolipids on the uptake of PAHs by ryegrass. *Environmental Pollution*, 156: 46-52.

Zhuang, X., Chen, J., Shim, H., Bai, Z., 2007. New advances in plant growthpromoting rhizobacteria for bioremediation. *Environmental Pollution*, 33: 406-413.

Zohra, F.F., Mnif, S., Badis, A., Rebbani, S., Fodil, D., Eddouaouda, K., Sayadi, S., 2014. Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 86: 300-308.