



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS POR INVESTIGACIÓN

**RESTAURACIÓN DE SUELO CONTAMINADO POR PETRÓLEO, CON
VEGETACIÓN DE MANGLAR EN TABASCO**

MARCIA EUGENIA OJEDA MORALES

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO





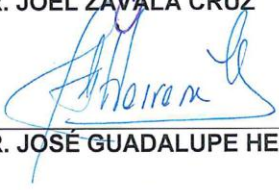

2017

La presente tesis titulada: **RESTAURACIÓN DE SUELO CONTAMINADO POR PETRÓLEO, CON VEGETACIÓN DE MANGLAR EN TABASCO**, realizada por la alumna: Marcia Eugenia Ojeda Morales, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS POR INVESTIGACIÓN

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA	 DRA. MARIVEL DOMÍNGUEZ DOMÍNGUEZ
ASESOR	 DR. MIGUEL ÁNGEL HERNÁNDEZ RIVERA
ASESOR	 DR. JUAN GABRIEL ÁLVAREZ RAMÍREZ
ASESOR	 DR. JOEL ZAVALA CRUZ
ASESOR	 DR. JOSÉ GUADALUPE HERRERA HARO
ASESOR	 DR. RANDY HOWARD ADAMS SCHROEDER

H. Cárdenas, Tabasco., 04 de Enero de 2017.

RESUMEN GENERAL

**RESTAURACIÓN DE SUELO CONTAMINADO POR PETRÓLEO, CON
VEGETACIÓN DE MANGLAR EN TABASCO**

Marcia Eugenia Ojeda Morales
Colegio de Postgraduados, 2017

Los bosques de manglar son ecosistemas muy complejos con múltiples funciones ecológicas, alto valor económico y social. Infortunadamente, estos ecosistemas han sido impactados por derrames de petróleo alrededor del mundo. Cuando el petróleo se libera en aguas costeras y de estuarios, se adhiere en las raíces finas de árboles y plántulas, y se adsorbe en las superficies oleofílicas de la biota de los manglares que es asfixiada, envenenada y muerta en cuestión de meses o incluso días, repercutiendo en todos los niveles de la cadena trófica.

Con el objetivo de evaluar la restauración de suelos con *Rhizophora mangle*, se aplicó un tensioactivo sintetizado por una cepa bacteriana y otro con base en aceite de pino. Para esto, inicialmente se aislaron cepas bacterianas petrofílicas fijadoras de nitrógeno y productoras de tensioactivos, identificadas como *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense*. Al tensioactivo puro (con base en lipopéptidos) sintetizado por *A. lipoferum*, se le determinaron propiedades fisicoquímicas, de superficie y concentración letal media. Este tensioactivo presentó propiedades de estabilidad de emulsión 260 min; capacidad de emulsión 90 %; concentración letal media 90695 ppm y reducción de la tensión superficial del agua 35.5 mN.m⁻¹. También se evaluó el crecimiento de plántulas de *R. mangle* y la restauración de suelo contaminado con petróleo emulsificado con el tensioactivo producido por *A. lipoferum*, y el tensioactivo con base en aceite de pino.

Los tratamientos con petróleo emulsificado con el tensioactivo de *A. lipoferum*, permitió mayor remoción de petróleo emulsificado (93.97% a 30000 ppm) y mayor crecimiento de área foliar, longitud de tallo, diámetro de tallo, incremento de biomasa total seca y biomasa total húmeda en plántulas de *R. mangle*, en comparación con los tratamientos con petróleo emulsificado con el tensioactivo con base en aceite de pino. Por otra parte, el suelo

contaminado a 30000 ppm de petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano en condiciones de invernadero, presentó la remoción mayor de hidrocarburos totales del petróleo (93.97%) y crecimiento bacteriano (25148 UFC.g⁻¹), respecto al suelo con petróleo emulsificado con pino 81.39% y 8463 UFC.g⁻¹ respectivamente a la misma concentración de petróleo. El suelo con petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano tuvo mayor crecimiento de plántulas de *R. mangle*. Los resultados de este estudio mostraron que la aplicación del petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano, alcanzó una buena eficiencia en la remoción de hidrocarburos totales del petróleo, reafirmando esta técnica como algo prometedor en la restauración de suelo con vegetación de *R. mangle*. Puede considerarse una técnica de corrección de contaminación en ecosistemas de alta importancia ecológica.

Palabras claves: Restauración, *Azospirillum sp*, tensioactivo, *Rhizophora mangle*

GENERAL SUMMARY
**RESTORATION OF OIL CONTAMINATED SOIL, WITH MANGROVE SWAMP
VEGETATION IN TABASCO**

Marcia Eugenia Ojeda Morales
Colegio de Postgraduados, 2017

Mangrove swamps are complex ecosystems with multiple ecological functions and high social value. Unfortunately, they have been impacted by oil spills all around the world. When oil is spilled on coastal waters and estuaries, it adheres to the fine roots of trees and seedlings and it is absorbed by the oily surface of the biota of mangroves which is suffocated, poisoned and dead in a lapse of months or even days, having repercussions in all levels of the trophic chain.

With the objective of evaluating the soils restoration with *Rhizophora mangle* was applied a tensioactive synthesized by a bacterial strain and another that is based on pine oil. In order to get the goal, initially the tensioactive producer and nitrogen fixing petrofilic bacterial strains were isolated and were identified as *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. To the pure tensioactive (lipopeptide based) synthesized by *A. lipoferum* were determined its physicochemical properties, surface properties and lethal concentration 50 (LC50). It presented properties such as emulsion stability of 260 min, 90% in emulsion capacity, LC50 at 96,695 ppm and a reduction of surface tension of water of 35.5mN m⁻¹ in.

The growth of *R. mangle* seedlings, as well as the restoration of a soil contaminated by oil emulsified with the tensioactive synthesized by *A. lipoferum*, and pine oil tensioactive were evaluated. The treatments with emulsified oil with the tensioactive of *A. lipoferum* generated higher removal of emulsified oil (93.97% at 30000 ppm) and higher growing of: foliar area, length and diameter of stem, increase in wet and dry total biomass in seedlings of *R. mangle* than those obtained in treatments with emulsified oil with the pine oil based tensioactive. In the other hand, the polluted soil at 30000 ppm of emulsified oil with bacterial tensioactive in greenhouse conditions, it presented a major removal of total

hydrocarbons of petroleum (93.97 %) and bacterial growing (25148 UFC.g⁻¹), with respect to the soil with emulsified oil with pine 81.39 % and 8463 UFC.g⁻¹ respectively to the same petroleum concentration.

The soil with emulsified oil with a bacterial tensioactive generated a higher growing of seedlings of *R. mangle*. The results of this research showed that the application of emulsified oil with bacterial tensioactive reached a good efficiency in the removal of total hydrocarbons of petroleum. This confirms the technique is promising in restoration of soils with *R. mangle* vegetation. This technique can be considered as the way to correct the polluted ecosystems of high ecological importance.

Key words: *Restoration, Azospirillum sp, tensioactive, Rhizophora mangle*

AGRADECIMIENTOS

A mi consejera: la Dra. Marivel Domínguez Domínguez por haberme guiado con tanta dedicación profesional desde el inicio, hasta la culminación del presente estudio.

A mi consejo particular, gracias por todo el apoyo y haber aportado sus experiencias y conocimientos en el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Colegio de Postgraduados, porque en sus laboratorios recibí la atención y el conocimiento intelectual y humano.

A los Ingenieros Irma Elisa Juárez, Claudio Ulises Mena Sánchez, Rafael Torres Ricárdez, y la Dra. Yolanda Córdova Bautista y por su activa participación durante el desarrollo de esta tesis.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN GENERAL	iii
GENERAL SUMMARY	v
AGRADECIMIENTOS	vii
CONTENIDO	viii
LISTA DE CUADROS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
CAPÍTULO I.	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Referencias	5
1.2 Objetivos	9
1.3 Hipótesis	9
CAPÍTULO II. BIOSURFACTANT PRODUCTION BY STRAINS OF AZOSPIRILLUM ISOLATED FROM PETROLEUM-CONTAMINATED SITES ...	10
2.1 Abstract	11
2.2 Introduction	11
2.3 Materials and Methods	14
2.3.1 Isolation of native nitrogen-fixing bacterial strains in the laboratory and collection of plant specimens for taxonomic identification	14
2.3.2 Rhizosphere sampling for the isolation of nitrogen-fixing bacteria	14
2.3.3 Microbial evaluation of the rhizosphere.....	14
2.3.4 Microbial evaluation of the hydrocarbonoclastic strains	15
2.3.5 Production and extraction of the biosurfactant from hydrocarbonoclastic nitrogen-fixing bacterial strains.....	15
2.3.6 Recovery of pure biosurfactants.....	16
2.3.7 Identification of polar lipids associated with the surfactant activity	16
2.3.8 Species-level identification of hydrocarbonoclastic nitrogen-fixing bacterial strains capable of producing biosurfactant	17
2.3.9 Determination of emulsion capacity and emulsion stability of pure biosurfactant	17
2.3.10 Measurement of surface tension of pure biosurfactant	18
2.3.11 Determination of the critical micelle concentration	18

2.3.12 Fourier transform infrared spectroscopy	18
2.4 Results and Discussion	18
2.4.1 Isolation of native hydrocarbonoclastic nitrogen-fixing bacterial strains in the laboratory	18
2.4.2 Determination of physiological and biochemical characteristics differentiating each <i>Azospirillum</i> species	21
2.4.3 Microbial evaluation of the hydrocarbonoclastic strains	23
2.4.4 Biosurfactant production into Kim medium	24
2.4.5 Polar lipids associated with the surfactant activity	26
2.4.6 Critical micelle concentration	27
2.4.7 Measurement of emulsion capacity, emulsion stability of pure biosurfactant	28
2.4.8 Measurement of surface tension of pure biosurfactant	29
2.4.9 Fourier transform infrared spectroscopy	30
2.5 Conclusion	31
2.6 References	32
CAPÍTULO III. BIOSURFACTANT SYNTHESIZED BY <i>Azospirillum lipoferum</i> ALM1B2: CHARACTERIZATION AND APPLICATION FOR ENVIRONMENTAL PROTECTION	40
3.1 Abstract	41
3.2 Introduction	41
3.3 Materials and Methods	43
3.3.1 Microorganisms and culture conditions	43
3.3.2 Elemental analysis of the pure biotensioactive	44
3.3.3 Average molecular weight determination	44
3.3.4 Effects of temperature and pH on the production of the biotensioactive in the Kim medium	44
3.3.5 Viscosity determination	45
3.3.6 Effect of the biotensioactive on the weight of the earthworm <i>Eisenia foetida</i> (Acute toxicity assay)	45
3.3.7 Determining the median lethal concentration (LC ₅₀)	46
3.3.8 Determination of the saponification index and acidity index (AI) of pure biosurfactante	46
3.3.9 Effects of NaCl concentration and temperature on the surface tension of the biotensioactive	46

3.3.10 Effect of NaCl concentration on the density and emulsifying capacity	47
3.4 Results and Discussion	48
3.4.1 Elemental Analysis	48
3.4.2 Average molecular weight determination	49
3.4.3 Effects of temperature and pH on the production of the biotensioactive	50
3.4.4 Viscosity	52
3.4.5 Acute toxicity	53
3.4.6 Median lethal concentration	55
3.4.7 Acidity index and saponification index	56
3.4.8 Effects of NaCl concentration and temperature on the surface tension of the biosurfactant	56
3.4.9 Effect of NaCl concentration on the density and emulsifying capacity ..	58
3.5 References	61
CAPÍTULO IV. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE <i>Rhizophora mangle</i> EN SUELOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO EMULSIFICADO	69
4.1 Resumen	69
4.2 Introducción	70
4.3 Materiales y Métodos	71
4.3.1 Colecta de muestras	71
4.3.2 Producción de tensioactivo bacteriano	73
4.3.3 Establecimiento del bioensayo	73
4.3.4 Análisis de sustrato. Mediciones de las características morfológicas de las plántulas de mangle del bioensayo	73
4.3.5 Análisis estadístico	74
4.4 Resultados y Discusión	74
4.4.1 Efecto del tipo de tensioactivo y concentraciones de petróleo en el crecimiento de las plántulas	75
4.4.2 Efecto de la emulsión tensioactivo bacteriano-petróleo en el crecimiento de plántulas de <i>R. mangle</i>	82
4.5 Recomendaciones	92
4.6 Conclusión	92
4.7 Referencias	92

CAPÍTULO V. RESTAURACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO EMULSIFICADO, CON PLÁNTULAS DE <i>Rhizophora mangle</i>.....	98
5.1 Resumen	98
5.2 Introducción.....	99
5.3 Materiales y métodos	101
5.3.1 Colecta de muestras	101
5.3.2 Producción de tensioactivo bacteriano.....	102
5.3.3 Establecimiento del bioensayo.....	102
5.3.4 Análisis estadístico.....	103
5.3.5 Análisis del sustrato	103
5.4 Resultados y Discusión	103
5.4.1 Respuesta a través el tiempo de los tratamientos con tensioactivo bacteriano	110
5.5 Recomendaciones.....	118
5.6 Conclusión.....	118
5.7 Agradecimientos	119
5.8 Referencias	119
CONCLUSIONES GENERALES	128

LISTA DE CUADROS

DEL CAPÍTULO II

	Página
Table 1. Plant species collected in a flood plain of the Chico Zapote river, on the low basin of the Tonalá river in Tabasco, México	20
Table 2. Physiological and biochemical characteristics differentiating each <i>Azospirillum</i> species.....	22

DEL CAPÍTULO IV

	Página
Cuadro 1. Análisis de varianza de las variables: Área foliar, longitud de tallo, longitud de raíces, diámetro de tallo, biomasa total seca y biomasa total húmeda de plántulas de <i>Rhizophora mangle</i> con petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano y de pino	79
Cuadro 2. Análisis de medidas repetidas para la variable Área foliar. Efecto simple por tratamiento (concentración de petróleo emulsificado), periodo (edad de la plántula) e interacción (Tratamiento×Periodo). Prueba de comparación de medias Tukey de mínimos cuadrados, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).....	111
Cuadro 3. Análisis de medidas repetidas para la variable Longitud de tallo. Efecto simple por tratamiento (concentración de petróleo emulsificado), periodo (edad de la plántula) e interacción (Tratamiento×Periodo). Prueba de comparación de medias Tukey de mínimos cuadrados, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).....	86

Cuadro 4. Análisis de medidas repetidas para la variable Diámetro de tallo. Efecto simple por tratamiento (concentración de petróleo emulsificado), periodo (edad de la plántula) e interacción (Tratamiento×Periodo). Prueba de comparación de medias Tukey de mínimos cuadrados, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)..... 87

Cuadro 5. Análisis de medidas repetidas para la variable Biomasa húmeda total. Efecto simple por tratamiento (concentración de petróleo emulsificado), periodo (edad de la plántula) e interacción (Tratamiento×Periodo). Prueba de comparación de medias Tukey de mínimos cuadrados, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)..... 88

Cuadro 6. Análisis de medidas repetidas para la variable Biomasa total seca. Efecto simple por tratamiento (concentración de petróleo emulsificado), periodo (edad de la plántula) e interacción (Tratamiento×Periodo). Prueba de comparación de medias Tukey de mínimos cuadrados, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$)..... 90

DEL CAPÍTULO V

Página

Cuadro 1. Análisis de varianza de las variables hidrocarburos totales del petróleo (HTP's) y unidades formadoras de colonias (UFC.g⁻¹) de suelo contaminado con petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano y de pino con plántulas de *R. mangle*..... 104

Cuadro 2. Análisis de medidas repetidas para la variable hidrocarburos totales del petróleo (HTP's). Efecto simple por tratamiento (Concentración de petróleo emulsificado), periodo (Tiempo de evaluación del sustrato) e interacción (Tratamiento×Periodo). Prueba de comparación de medias Tukey de mínimos cuadrados, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) 111

Cuadro 3. Análisis de medidas repetidas para la variable unidades formadoras de colonias (UFC.g⁻¹). Efecto simple por tratamiento (Concentración de petróleo emulsificado), periodo (Tiempo de evaluación del sustrato) e interacción (Tratamiento×Periodo). Prueba de comparación de medias Tukey de mínimos cuadrados, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$) 117

ÍNDICE DE FIGURAS

DEL CAPÍTULO II

	Página
Figure 1. Sampling site located in the flood plain of the Chico Zapote river in the lower basin of the Tonalá River, Benito Juárez Village, Cárdenas, Tabasco, México.....	19
Figure 2. Electron microscopy of a) <i>Azospirillum brasilense</i> and b) <i>Azospirillum lipoferum</i>	22
Figure 3. Growth of a) <i>Azospirillum lipoferum</i> and b) <i>Azospirillum brasilense</i> in liquid mineral medium with oil as the only carbon source....	24
Figure 4. Biosurfactant production by strains <i>A. brasilense</i> and <i>A. lipoferum</i> in experimental units (e.u.) of 250 mL in Kim medium. Values of treatments with different letters have statistically significant differences ($\alpha \leq 0.05$).....	25
Figure 5. Detection of lipopeptides associated with surfactant activity produced by a) <i>Azospirillum lipoferum</i> and b) <i>Azospirillum brasilense</i>	26
Figure 6. Determination of critical micelle concentration. Formation of micelles in a polar environment measured at 30 °C. Biosurfactant produced by strains a) <i>Azospirillum lipoferum</i> and b) <i>Azospirillum brasilense</i>	28
Figure 7. Surface tension as a function of the concentration of pure biosurfactant in water measured at 30 °C. Biosurfactant produced by strains a) <i>Azospirillum lipoferum</i> and b) <i>Azospirillum brasilense</i>	29

Figure 8. FT-IR spectrum of the purified biosurfactant produced by strains a) <i>Azospirillum lipoferum</i> and b) <i>Azospirillum brasilense</i>	31
---	----

DEL CAPÍTULO III

	Página
Figure 1. Elemental analysis of pure biosurfactant by scanning electron microcospy	49
Figure 2. Effects of pH and temperature on biosurfactant production by <i>A. lipoferum</i> . Production of biosurfactant a) 25 °C, b) 30 °C, c) 35 °C, and d) 40 °C. All values are average of triplicate measurements and the bars represent standard deviation.....	51
Figure 3. Effect of biosurfactant concentration produced by <i>A. lipoferum</i> and temperature on viscosity. All values are average of triplicate measurements and the bars represent standard deviation	52
Figure 4. Weight of <i>E. foetida</i> at a specific biosurfactant concentration produced by <i>A. lipoferum</i> . All values are average of quadruplicate measurements and bars represent standard deviation	54
Figure 5. Effect of biosurfactant concentration produced by <i>A. lipoferum</i> in estimate probability of loss weight of <i>E. foetida</i>	54
Figure 6. Effect of NaCl concentration on surface tension of a biosurfactant produced by <i>A. lipoferum</i> at different temperatures pH0% = 7.0, pH1% = 7.0, pH3% = 7.0, pH6% = 6.98, pH9% = 6.95, pH12% = 6.92, pH15% = 6.90. All values are average of five measurements and the bars represent standard deviation	57

Figure 7. Density of a biosurfactant produced by *A. lipoferum* as a function of NaCl concentration, measured at different temperatures. The pH1% = 7.0, pH3% = 7.0, pH6% = 6.98, pH9% = 6.95, pH12% = 6.92, pH15% = 6.90. All values are average of five measurements and the bars represent standard deviation..... 59

Figure 8. Effect of NaCl concentration on emulsion capacity of biosurfactant produced by *A. lipoferum*, $28 \pm 1^\circ\text{C}$. The pH1% = 7.0, pH3% = 7.0, pH6% = 6.98, pH9% = 6.95, pH12% = 6.92, pH15% = 6.90. All values are average of triplicate measurements and the bars represent standard deviation..... 59

DEL CAPÍTULO IV

Página

Figura 1. Efecto de las concentraciones de petróleo (0, 30000, 40000, 50000, 60000 y 70000 ppm) y tipo de tensioactivo (bacteriano y de pino) en a) longitud de tallo b) diámetro de tallo c) biomasa total húmeda d) biomasa total seca y e) área foliar en plántulas de *R. mangle* de 14 meses de edad, expresado en valores promedio 78

Figura 2. Efecto de las concentraciones de petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano en a) área foliar, b) longitud de tallo, c) diámetro de tallo, d) biomasa húmeda total y e) biomasa seca total durante los 11 meses de evaluación 91

DEL CAPÍTULO V

	Página
Figura 1. Efecto de las concentraciones de petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano y de pino en la remoción de hidrocarburos totales de petróleo en suelos contaminados al final del experimento. Valores promedio de remoción de HTP's a concentraciones de 30000, 40000, 50000, 60000 y 70000 ppm	105
Figura 2. Efecto de las concentraciones de petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano y de pino en las unidades formadoras de colonias en suelos contaminados, y graficado con valores promedio a concentraciones de 30000, 40000, 50000, 60000 y 70000 ppm.....	108
Figura 3. Efecto de las concentraciones de petróleo emulsificado en la degradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP's) durante los 11 meses de evaluación. Las barras representan la desviación estándar de tres repeticiones.....	112
Figura 4. Efecto de las concentraciones de petróleo emulsificado en las unidades formadoras de colonias (UFC.g ⁻¹) durante los 11 meses de evaluación. Las barras representan la desviación estándar de tres repeticiones.....	115

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los manglares se desarrollan en las planicies costeras de los trópicos y están conformados por árboles y arbustos que poseen mecanismos que les permiten eliminar el exceso de sal (NaCl) del agua, por lo cual han desarrollado tolerancia a suelos anegados y con alta salinidad (Domínguez-Domínguez et al. 2011). Su importancia ecológica reside en las funciones que desempeñan en la estabilización y protección de las líneas costeras, proporcionando un área de cría y alimentación de numerosas especies de peces y crustáceos, hábitat para cangrejos y moluscos y lugares de anidamiento de aves costeras (CONABIO 2014). Así mismo, son refugio de un significativo número de especies de varios grupos de invertebrados, peces, reptiles, aves y mamíferos (Aburto et al. 2008; López y Ezcurra 2012).

Las comunidades de manglar proveen diversos servicios ambientales, y son considerados a nivel mundial, como los mejores filtros biológicos de aguas contaminadas. La alta producción de hojarasca es uno de los servicios más importantes de las comunidades de manglar en las áreas costeras del noroeste de México. Esta productividad contribuye a disminuir el CO₂ atmosférico, contribuyendo relativamente a mitigar el cambio climático (Moreno et al. 2002; Ochoa 2014).

En el estado de Tabasco existen registradas cuatro especies de mangle: mangle rojo (*Rhizophora mangle*), mangle blanco (*Laguncularia racemosa*), mangle negro (*Avicennia germinans*) y mangle botoncillo (*Conocarpus erectus*), que actualmente se ven afectadas por muchos factores como la utilización de tierras para la ganadería extensiva, agricultura, apertura de diques, construcción de carreteras, actividades de la industria petrolera y crecimiento de la población (CONABIO 2014). Sin duda, el impacto de la actividad humana en los manglares ha provocado problemas de tipo ambiental derivados de la industria petrolera y aprovechamientos forestales sin control de algunas comunidades (Domínguez-Domínguez et al. 2011). Aunque las especies de manglar están consideradas bajo protección especial en la NOM-ECOL-059/2001 (SEMARNAT 2002), su uso, restauración y

conservación en México está regido por la NOM-EM-001-RECNAT-1999 (SEMARNAT 1999).

El estado de Tabasco, además de contribuir a la economía nacional, principalmente por la industria petrolera, representa una reserva natural de gran impacto en la biósfera. No obstante, esta industria ha dañado una parte considerable de suelos y cuerpos de agua de la región, localizados en la franja costera, donde predomina el manglar. (Zavala et al. 2009; Domínguez-Domínguez et al. 2011).

El petróleo es la materia prima más importante usada en la sociedad moderna, y base de la economía de varios países. Este recurso natural no renovable no sólo es utilizado en la manufacturación de plásticos, prótesis, órganos artificiales, implantes para odontología, fertilizantes, herbicidas, colorantes, detergentes, envases, embalajes, gasolinas, lubricantes, ceras, asfalto, etc., también es utilizado para la producción de combustibles (Libes 2009). Generalmente, los hidrocarburos derivados del petróleo se dividen en cuatro grupos: parafinas, olefinas, naftenos y compuestos aromáticos (Riazi 2005).

Cuando el petróleo impacta los bosques de manglar, las plántulas menores de un año sufren alteraciones en su desarrollo morfológico, en comparación con las plántulas de sitios no contaminados (Santos et al. 2010; Requena-Pavón et al. 2012; Duke 2016). Así mismo, existen investigaciones que señalan que la restauración de un manglar dañado por derrames de petróleo puede tomar hasta 20 años; aunque en muchas ocasiones, la pérdida es total e irreversible (CONABIO 2009; Hoff et al. 2014; Duke y Schmitt 2015; Duke 2016).

En el mismo contexto, Domínguez-Domínguez et al. (2011) hacen mención que existen al menos 13 sitios de vegetación de manglar en Tabasco contaminados por petróleo, que superan el límite máximo permisible (LMP) de hidrocarburos en su fracción pesada establecidos por la NOM-138-SEMARNAT/ss-2003. Estos derrames afectan la reproducción y crecimiento de las plantas de mangle (Duke y Schmitt 2015). Los sitios contaminados con petróleo pueden ser restaurados utilizando procesos químicos, físicos y biológicos. Sin embargo, los procesos *in situ* que utilizan microorganismos son los más recomendados, debido a que son

considerados amigables con el ambiente, y su aplicación implica menos daño al sitio impactado (Adams et al. 2015; Duke 2016; Rivera-Cruz et al. 2016).

La mayoría de los hidrocarburos derivados del petróleo son biodegradables, pero la biodegradación se ve limitada debido a la baja biodisponibilidad de estos compuestos hidrocarbúricos. Una de las propuestas para mejorar la biodegradación del petróleo es mediante el uso de tensioactivos o dispersantes (Bharali et al. 2011).

Los tensioactivos son moléculas en las que se observan dos secciones con características químicas diferentes: una fracción polar o cabeza hidrofílica y una fracción no polar o cola hidrofóbica, manteniéndose principalmente en la interfase aceite/agua o aire/agua; estos compuestos pueden ser de origen químico o bacteriano (Thies et al. 2004; Kuttuvan et al. 2013; Luna et al. 2013; Nathália et al. 2014; Huang et al. 2015). Cuando el tensioactivo es sintetizado por un microorganismo, se le conoce como biotensioactivo.

Los biotensioactivos poseen baja toxicidad, alta biodegradabilidad, digestibilidad, compatibilidad con el medio ambiente, alta estabilidad a temperaturas extremas, pH y salinidad altos, se sintetizan a partir de fuentes renovables, alta actividad de superficie y actividad biológica antimicrobiana y antitumoral (Müller et al. 2012), dichas propiedades constituyen una ventaja al compararlos con los surfactantes sintéticos, ya que estos últimos son considerados altamente contaminantes para el medio ambiente (Kitamoto y Nakahara, 2002).

A pesar de que los manglares son reconocidos como un recurso económico y biológico, con una serie de servicios altamente beneficiosos para sostener un ecosistema, con complejas interrelaciones entre plantas y animales, tienen un alto riesgo a grandes y crónicos derrames de petróleo. Una vez que el petróleo está dentro del manglar, se han aplicado medidas como i) ninguna acción, ii) aplicar plumas y otras barreras, incluyendo cabellos y almohadas absorbentes, iii) extracción manual, iv) lavado del petróleo con agua de mar, v) biorremediación y vi) tensioactivos químicos con acción dispersante. Sin embargo no hay investigaciones suficientemente detalladas en las que se hayan generado

tecnologías sustentables, para la restauración de suelos contaminados por petróleo con vegetación de manglar, que involucren el uso de un tensioactivo sintetizado por bacterias fijadores de nitrógeno.

En este contexto, Duke (2016) menciona que los dispersantes son una buena opción para restaurar ecosistemas de manglar impactados por derrames de petróleo debido a su potencial de emulsificar hidrocarburos, separar fases y aumentar la humectación en sitios impactados con aceites.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la restauración de suelos con especies de mangle a través de la aplicación de un emulsificante bacteriano y uno con base en aceite de pino, y determinar su eficiencia en la degradación de petróleo.

La presente tesis se dividió en cinco capítulos, en el primero se describe de modo general el contexto de la investigación.

En el segundo capítulo se describe el procedimiento para la obtención de cepas fijadoras de nitrógenos y petrofílicas, con capacidad de producir tensioactivos.

En el tercer capítulo se caracterizó el tensioactivo producido *A. lipoferum*. Se determinaron las propiedades termodinámicas (pH y densidad), de superficie (concentración micelar crítica), transporte (viscosidad), físicas (capacidad y estabilidad de la emulsión), químicas (índice de saponificación y de acidez), y biológicas (toxicidad aguda y concentración letal media). Las características del tensioactivo permitieron visualizar sus aplicaciones potenciales en la restauración de sitios con vegetación de manglar contaminados con petróleo.

En el cuarto capítulo se evaluó el crecimiento en longitud y diámetro del tallo, longitud de raíces, área foliar, biomasa fresca y seca de las plántulas de *R. mangle* en seis concentraciones de petróleo emulsificado con un biotensioactivo de origen bacteriano y de pino, en invernadero durante 11 meses para determinar los tratamientos con la emulsión tensioactivo bacteriano-petróleo que permitan el mejor crecimiento de

plántulas de *R. mangle* en comparación con los tratamientos con biotensioactivo de pino.

En el quinto capítulo se evaluó la remoción de hidrocarburos totales del petróleo y las unidades formadoras de colonias en un suelo contaminado con petróleo emulsificado con un tensioactivo bacteriano y un tensioactivo con base en aceite de pino, en invernadero durante 11 meses, para determinar los tratamientos con la emulsión tensioactivo bacteriano-petróleo y de pino que permitieran la mayor remoción de hidrocarburos totales de petróleo y crecimiento bacteriano.

La importancia de este trabajo es haber generado datos de dosis-respuesta al aplicar petróleo emulsificado con un biotensioactivo producido por una cepa bacteriana fijadora de nitrógeno. La base de datos se obtuvo al hacer la evaluación del proceso durante restauración del suelo, y de la medición de variables dasométricas de la vegetación de manglar del suelo contaminado.

1.1 Referencias

- Adams, R.H., Domínguez-Rodríguez, V.I. & Zavala-Cruz, J. (2015). *Vibrio fischeri* bioassay for determination of toxicity in petroleum contaminated soils from tropical southeast Mexico. *Sains Malaysiana*, 44, 337–346. doi: 10.17576/jsm-2015-4403-04.
- Aburto, O., Ezcurra, E., Danemann, G., Valdez, V., Murray, J. and Sala, E. (2008). Mangroves in the Gulf of California increase fishery yields. Proceedings of the National Academy of Sciences. *Environmental Sciences*, 105, 10456–10459.
- Bharali, P., Das, S., Konwar, B., Thakur, A. (2011). Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*. *Internacional biodeterioration & biodegradation*. doi: 10. 1016/j.ibiod.2011.04.001.
- CONABIO. (2009). Manglares de México: Extensión y distribución. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. México, D.F. 99 p.

- CONABIO. (2014). Manglares de México: Extensión, distribución y monitoreo comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. México.
- Domínguez-Domínguez, M., Zavala-Cruz, J., Martínez-Zurimendi, P. (2011). *Manejo forestal sustentable de los manglares de Tabasco*. Secretaría de recursos naturales y protección ambiental. Colegio de Postgraduados. Villahermosa, Tabasco, México. 137 p.
- Duke, N.C. (2016). Oil spill impacts on mangroves: Recommendations for operational planning and action based on a global review. *Marine Pollution Bulletin*, 109, 700-715.
- Duke, N.C. y Schmitt, K. (2015). Mangroves: Unusual forests at the seas edge, in: Pancel, L., M. (Eds), *Tropical forest handbook*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 78, 340-357.
- Hoff, R., Michel, J., Hensel, P., Proffitt, C., Delgado, P., Shigenaka, G., Yender R., Mearns, A. (2014). Oil spills in mangroves: Planning and response considerations. Washington, D.C.: National oceanic and atmospheric administration, NOAA Ocean Service, Office of response and restoration. 96 p.
- Huang, X., Shen, C., Liu, J., Lu, L. (2015). Improved volatile fatty acid production during waste activated Sludge anaerobic fermentation by different bio-surfactants. *Chemical Engineering J*, 264, 280-290. doi: 10.1016/j.cej.2014.11.078.
- Kitamoto, D., and Nakahara, T. (2002). Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy saving materials to gene delivery carriers. *J. Biosc. Bioeng.* doi:10.1016/S1389-1723(02)80149-9.
- Kuttuvan, S., Rajeev, S., Himani, J., Kunduru, R., Sanjit, K., Rachapudi, N., Ashok, P. (2013). Studies on biosurfactants from *Pseudozyma sp.* NII 08165 and their

potential application as laundry detergent additives. *Biochem. Eng, J.* 78, 85-92.

Libes, S. (2009). *Introduction to Marine Biogeochemistry* 2d. Edition. Elsevier. USA. 893 p.

López, J. y Ezcurra, E. (2012). Los manglares de México una revisión. *Madera y bosques* número especial. Artículo de Fórum. Pp. 27-51.

Luna, M., Rufino, D., Sarubbo, A., Campos, G. (2013). Characterization, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloid and Surface B*, 102, 202-209.

Moreno, E., Guerrero, A., Gutiérrez, M., Ortiz, C. Palma, D. (2002). Los manglares de Tabasco, una reserva natural de carbono. *Madera y Bosques*. Pp. 115-128.

Müller, M., Kügler, J., Henkel, M., Gerlitzki, M., Hörmann, B., Pöhnlein, M., Syldakt, C. y Hausmann, R. (2012). Rhamnolipids: Next generation surfactants? *J. of Biotechnol*, 162, 366-388. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.05.022.

Nathália, M., Rocha, S., Rufino, R., Luna, J. (2014). Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactants production using low-cost substrates. *Biocatalysts and Agricultural Biotechnol*, 3,132-139.

Ochoa, J. (2014). *Estructura y Productividad de Balandra, BCS. México*. Tesis de Maestría. Departamento de Biología Marina, Área de Conocimientos del Mar de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. 112 p.

Requena-Pavón, G., Agraz-Hernández, C., Vázquez-Botello, A., Osti-Saéñz, J., Reyes-Castellanos, J., Chan-Keb, C., García-Zaragoza, C. (2012). Evaluación del impacto ambiental en la morfometría de plántulas de mangle por petróleo crudo. *Universidad Autónoma Indígena de México*, 8, 99-105.

- Riazi, M. (2005). Characterization and properties of petroleum fractions. ASTM international. Estados Unidos de América. 427 p.
- Rivera-Cruz, M.C., Trujillo-Narcía, A., Trujillo-Rivera, E.A., Arias-Trinidad, A. y Mendoza-López, M.R. (2016). Natural attenuation of weathered oil using aquatic plants in a farm in southeast Mexico. *International Journal of phytoremediation*, 18,877–884. [doi: 10.1080/15226514.2016.1156632](https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1156632).
- Santos, H., Carmo, F., Paes, J., Rosado, A. y Peixoto, R. (2010). Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. *Water Air & Soil Pollut.* doi: 10.1007/s11270-010-0536-4.
- SEMARNAT (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales). (1999). Especificaciones para la preservación, conservación y restauración del manglar. Norma Oficial Mexicana NOM-EM-001-RECNAT- 1999. México.
- SEMARNAT (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales). (2002). Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Faunas Silvestres-Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión Exclusión o Cambio-Listas de Especies en Riesgo. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. México.
- Thies, S., Schübel, B., Kovacic, F., Rosenau, R., Hausmann, K., Jaeger. (2004). Heterologous production of the lipopeptide biosurfactant *serrawettin* W1 in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 181,27-30.
- Zavala, J., Castillo, A., Ortiz, C., Palma, J., Juárez, L., Salgado, J., Rincón, E., Moreno, C. y Ramos, R. (2009). Capacidad de uso del suelo urbano en Tabasco, con base en suelo, uso actual y vegetación. Colegio de Postgraduados, SAOP, SERNAPAM y CCYTET. Villahermosa, Tabasco, México. 204 p.

1.2 Objetivos

General

Evaluar la restauración de áreas con vegetación de manglar a través de la aplicación de un tensioactivo bacteriano obtenido de una cepa bacteriana y determinar su eficiencia en la degradación de petróleo.

Particulares

1. Evaluar cepas bacterianas autóctonas fijadoras de nitrógeno con capacidad de degradar petróleo crudo.
2. Caracterizar un tensioactivo sintetizado por bacterias fijadoras de nitrógeno para determinar su aplicación en suelo contaminado con petróleo, con plántulas de mangle.
3. Evaluar el crecimiento de *Rhizophora mangle* en suelos contaminados con petróleo tratados con tensioactivos.

1.3 Hipótesis

Las bacterias fijadoras de nitrógeno autóctonas del estado de Tabasco, tienen la capacidad de producir metabolitos para reducir la tensión superficial de compuestos hidrófobos.

El tensioactivo producido por bacterias fijadoras de nitrógeno tiene potencial para restaurar suelo contaminado con petróleo, con plántulas de mangle.

Un suelo contaminado con petróleo emulsificado con tensioactivo de origen bacteriano permite el crecimiento de *R. mangle* y remoción de petróleo, en comparación con un suelo contaminado por petróleo emulsificado con tensioactivo con base en aceite de pino

CAPÍTULO II

BIOSURFACTANT PRODUCTION BY STRAINS OF AZOSPIRILLUM ISOLATED FROM PETROLEUM-CONTAMINATED SITES¹

Marcia E. Ojeda-Morales¹, Marivel Domínguez-Domínguez¹✉,
Miguel A. Hernández-Rivera², Joel Zavala-Cruz¹.

¹Colegio de Postgraduados, Campus, Tabasco.

²Laboratorio de biotecnología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Email author: mdguez@colpos.mx

Resumen

Algunos microorganismos producen biosurfactantes al estar en contacto con petróleo, lo que favorece la formación de micelas, permitiendo que las células microbianas las metabolicen eficazmente. En esta investigación se presentan resultados de la evaluación de cepas bacterianas fijadoras de nitrógeno e hidrocarbonoclastas con capacidad de generar biotensioactivos. El sitio de muestreo fue en la planicie de inundación del río Chico Zapote, en la cuenca baja del Río Tonalá en Tabasco, México. Se colectaron rizósferas y el suelo contaminado con petróleo además de ejemplares botánicos para su identificación taxonómica. El suelo rizosférico colectado fue sembrado en medio de cultivo Rojo Congo para la obtención de las cepas bacterianas fijadoras de nitrógeno del género *Azospirillum* (BFN). Las cepas BFN fueron colocadas en medio mineral líquido con petróleo como única fuente de carbono, para obtener bacterias fijadoras de nitrógeno e hidrocarbonoclastas. El biosurfactante producido por *A. brasilense* mostró una estabilidad de la emulsión de 229 min, rendimiento de 0.1375 g.L⁻¹, y una capacidad de emulsión de 80 % y tensión superficial de 38 mN.m⁻¹, mientras que el biosurfactante producido por *A. lipoferum* tuvo una estabilidad de emulsión de 260 min, rendimiento de 0.22 g.L⁻¹, capacidad de emulsión de 90 % y una tensión superficial de 35.5 mN.m⁻¹.

¹ Este artículo fue publicado en la Revista Water, Air, & Soil Pollution (2016) 227:181
DOI 10.1007/s11270-015-2659-0

2.1 Abstract

Some microorganisms can produce biotensioactive when in contact with hydrocarbons, which favours micelle formation, allowing microbial cells to metabolise them effectively. In this study, we evaluated the capacity of nitrogen-fixing and hydrocarbonoclastic bacterial strains to generate biotensioactive. The sampling site was in a flood plain of the Chico Zapote River, on the low basin of the Tonalá River in Tabasco, Mexico. Rhizospheres and soil contaminated by oil were collected, and the concentration of oil and botanic samples were determined for their taxonomic classification. The collected rhizosphere oil was seeded into Congo red cultures to obtain *Azospirillum* (NFB) bacteria. The NFB strain was placed in liquid mineral medium with oil as the only carbon source to identify the hydrocarbonoclastic strains. Biochemical and physiological evaluations determined that the species were *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. The strains were placed into Kim medium for generating a biosurfactant. The biosurfactant produced by *A. brasilense* showed an emulsion stability of 229 min, yield of 0.1375 g.L⁻¹, emulsion capacity of 80 % and superficial tension of 38 mN.m⁻¹, and while the biotensioactive produced by *A. lipoferum* had an emulsion stability of 260 min, yield of 0.22 g.L⁻¹, emulsion capacity of 90 % and superficial tension of 35.5 mN.m⁻¹.

Keywords. *Azospirillum* Biosurfactants Hydrocarbonoclastic bacteria

2.2 Introduction

Oil is a non-renewable natural resource and is currently the main energy source available to humans. According to a report by the Mexico Energy Secretariat in 2013, 86,575.3 thousand barrels daily (TBD) of crude oil were produced worldwide in 2011 alone. The main oil processing plants are refineries and petrochemical plants, and although they are beneficial for society, they produce approximately 10,000 m³ per day of oil solid residues worldwide (Souza et al. 2014).

Mexico is the eighth largest oil producer in the world. In 2012, national production was 2547 TBD, with the north-eastern maritime region contributing the greatest percentage of 51.38 %. Likewise, in the coast of the Gulf of Mexico alone, the production of hydrocarbons in onshore wells was 25.11 %. The state of Tabasco

reported production of 433 TBD, which represents 16.99 %, making it the state with the highest hydrocarbon extraction in the nation (PEMEX 2013).

Oil production has been accompanied by several mismanagement-related consequences during its extraction, transport and storage, causing a negative impact on ecosystems. According to The Federal Attorney for Environmental Protection of Mexico (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente de México - PROFEPA), between 2000 and 2012, 1415 oil spills were reported in the country, of which 34 % occurred in Tabasco. A total of 92.6 % of oil spills or leaks from pipelines accumulated in the soil (PROFEPA 2011). Currently, there is great concern regarding potential contamination in soils, water and air caused by oil-related activities. Based on this concern, research is being conducted to develop treatment processes of contaminant materials using chemical or biological methods. In the case of the latter, it is known that microorganisms are capable of oxidising hydrocarbons and using them as energy sources (Silva et al. 2014; Ojeda et al. 2013; Hernández et al. 2011), transforming them into less toxic products and intermediate metabolites (Madigan et al. 2012). In addition to the efficiency of degradation or catabolic pathways, biological restoration must also consider that the limiting timeframe for the removal of most contaminant compounds in the environment is related to their bioavailability (Yahya et al. 2014).

If a substrate is not available, the cell will not be able to use it as an energy source for metabolism; this is exactly what happens with hydrocarbons that are highly insoluble in water, deterring their removal. Bioavailability can be improved with the use of surfactant materials of chemical or biological origin. The latter are known as biosurfactants, and these have been obtained and purified using several laboratory processes (Luna et al. 2013; Kuttuvan et al. 2013; Nathália et al. 2014; Thies et al. 2014). Biosurfactants can be from bacterial or fungal origin (Ojeda et al. 2012), but one limiting factor for their commercial use is production time. However, production time can be reduced using nitrogen-fixing and hydrocarbonoclastic bacteria due to their rapid growth, as demonstrated in this study.

It is important to identify and study strains of microorganisms that possess the capacity to produce biosurfactants. Biosurfactants are compounds that concentrate

or accumulate at the interface between two mediums, altering the surface tension. In dispersion, larger particles are formed by groups of molecules known as micelles that are held together by attraction forces between the particles instead of by chemical bonds. Biosurfactants generally have a linear and asymmetric molecular structure with two zones, one hydrophobic and the other hydrophilic, and are found mostly at the interface, which leads to the formation of emulsions. If the emulsion contains drops of oil (o) in water (w) it is called an o/w emulsion, but if the dispersed phase is water, then the emulsion is called w/o, and it causes humidification, dispersion, detergence and/or solubilisation of the two immiscible phases (Riojas et al. 2010; Laurencio and Delgado 2008; Nehal et al. 1999).

The biosurfactants have the ability to emulsify hydrocarbons, separate phases and increase moisture in sites affected by oil. Moreover, given their biological origin, they could be used to optimize petrochemical and pharmaceutical processes (Cortés et al. 2013), benefit the food and cosmetics industry or improve the restoration of sites affected by oil spills (Rakeshkumar et al. 2013; Ruffino et al. 2013). In contrast, the impact caused by hydrophobic substances spilled in coastal zones is devastating. Mangrove plants, which are considered natural protection barriers against floods, have been affected by anthropogenic activities, damaging 11.2 % of the mangrove surface in Tabasco via activities such as oil-related infrastructure (oil wells, separation units, compression stations, pipelines), roads and dirt paths, dredging, pastures for livestock, urban uses and forest fires (Domínguez-Domínguez et al. 2011; Santos et al. 2011).

The damage produced by natural phenomena in zones where mangrove forests have decreased is not quantifiable. It is important to save plant species that help maintain the coastline; therefore, the use of biosurfactants in sites affected by oil can offer advantages compared to chemical technologies and lead to the discovery of biosurfactants of higher quality.

The aim of this study was the detection of new bacterial strains with the capacity to produce biosurfactants.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Isolation of native nitrogen-fixing bacterial strains in the laboratory and collection of plant specimens for taxonomic identification

The sampling of plant specimens and field recording of information was performed according to Lot and Chiang (1986). This included describing the habitat; common names; plant uses and biological features, such as life form, type, flower colour, fruit, seed and tree bark. The plant specimens collected in the study area were placed in a plant press labelled with the date and name of the person sampling. Then, they were dried and taxonomically identified using specialized literature (Bueno et al. 2005).

The identification of plant species was performed to assess the diversity of plant species capable of surviving in natural soils and water with high hydrocarbon concentrations.

The sampling site was located in the flood plain of the Chico Zapote River in the Tonalá river lower basin near the Benito Juárez Village. This area belongs to Cárdenas Municipality in the western part of Tabasco State, México. The exposure period of plant species to oil was 20 years, as they were located in the Sánchez Magallanes oil field.

2.3.2 Rhizosphere sampling for the isolation of nitrogen-fixing bacteria

A rhizosphere sample was taken from every plant specimen collected in the study area and was processed according to Hernández et al. (2003). They were tested to assess microbial populations of nitrogen-fixing bacteria that tolerated crude oil. The rhizospheres of each plant species collected were stored in closed amber glass vials according to the Official Mexican Guideline NOM-021 (SEMARNAT 2002) and kept under refrigeration at 4 °C.

2.3.3 Microbial evaluation of the rhizosphere

The culture medium used for bacteria belonging to the genus *Azospirillum* was Congo red supplemented with the following (g.L⁻¹): malic acid (5), MgSO₄·7H₂O (2), NaCl (0.2), FeCl (0.02), KOH (4.8), yeast extract (0.5), bacteriological agar (18), Congo red 1:400 and 10 % w/v K₂HPO₄.

Bacterial samples from the rhizosphere were cultured in Congo red-malic acid medium. Bacterial culture was performed using the streak plate method (Madigan et al. 2012). Growth conditions were 28 °C for an incubation period of 100–168 h until growth and presence of nitrogen-fixing bacterial (NFB) were observed in the medium. Macroscopic characterization was performed taking into account features such as colour, size and consistency (Ramírez et al. 2001). Simultaneous to the sampling process from the rhizosphere, three water samples were obtained from the surface to determine oil concentrations according to NMX-AA-SCFI-117.

Evaluation of the population development of NFB colonies with the capacity to degrade oil in liquid mineral medium.

2.3.4 Microbial evaluation of the hydrocarbonoclastic strains

Colony forming units (CFU.mL⁻¹) of NFB were evaluated in liquid cellulose agar medium for oil-degrading bacteria. This medium was composed of solution A with the following (g.L⁻¹): K₂HPO₄ (0.86), KH₂PO₄ (0.2), KCl (0.1), Na₂MoO₄·2H₂O (0.002) and disodium EDTA (0.04), and of solution B with the following (g.L⁻¹): MgSO₄·7H₂O (1.8), CaCl₂·2H₂O (0.6) and biotin (0.005). Lastly, crude oil was added as the only carbon source. Bacterial strains were sampled every 48 h until the death phase was achieved to determine if NFB strains were hydrocarbonoclastic (HNFB). Viable cell counts were performed using the streak plate method (Madigan et al. 2012). The effect of time on bacterial growth of *Azospirillum* species was determined using a correlation between observations. The data were analysed using SAS statistical software (SAS Inst, Inc., 2009).

2.3.5 Production and extraction of the biosurfactant from hydrocarbonoclastic nitrogen-fixing bacterial strains

Hydrocarbonoclastic nitrogen-fixing bacterial strains were cultured in Kim medium (Kim et al. 2000). To determine the production of biosurfactants, a bioassay was established under in vitro conditions according to a completely randomized single-factor experimental design. Using a test of means, the behaviour of the strains to produce biosurfactants was determined.

Kim medium was composed of the following (g.L⁻¹): yeast extract (0.2), meat extract (5), glucose or dextrose (2), monobasic KH₂PO₄ (0.2), dibasic K₂H₂PO₄ (0.3),

MgSO₄ (0.1), Na₂SO₄ (0.1), CaCl₂ (0.1) and FeSO₄ (0.1). The medium was prepared in a 250-mL glass bioreactor that was previously disinfected with 12 % benzalkonium chloride and ultraviolet radiation for 15 min. The bioreactor had a glass tube air inlet of 6-mm internal diameter connected to an air compressor of 3.5 W (3.5 psi), and it was coupled to a microbiological filter to avoid the entry of microorganisms. Each experimental unit featured an atmospheric vent through a 4-mm diameter glass tube to release pressure from the system (Hernández et al. 2011). During biosurfactant production, viable cell counts were performed every 24 h to record the change in colony forming units per milliliter from the initial phase until the death phase. Once the experiment was completed, the bioassay was dismantled under axenic conditions to recover the medium.

2.3.6 Recovery of pure biosurfactants

The culture medium with nitrogen-fixing bacteria was filtered with Whatman No. 1 filter paper to filter the biomass. Then, it was centrifuged at 2500 rpm for 30 min to remove any traces of biomass that may have passed through the filter.

Extraction of the biosurfactant was performed from the biomass-free culture medium. For the precipitation of non-surfactant substances, a 1:1.2 culture medium/acetone ratio was used (Almazán et al. 2000). The acetone was slowly added to the medium while maintaining agitation. The precipitate obtained was separated from the supernatant by filtration through Whatman No. 1 filter paper. The acetone was removed using a rotary evaporator at 40 °C and 375 mmHg.

Recovery of the active product was performed in a separation funnel by three successive extractions of the free-cell supernatant using a mix of chloroform/methanol at a 2:1 ratio. The organic extracts were joined and evaporated at 30 °C and 375 mmHg until dryness was achieved.

2.3.7 Identification of polar lipids associated with the surfactant activity

As a preliminary test, the presence of a polar lipid associated with surface activity was evaluated. The presence of glycolipids, lipopeptides and phospholipids was determined by thin layer chromatography using developer solutions (Hamilton and Hamilton 1992).

2.3.8 Species-level identification of hydrocarbonoclastic nitrogen-fixing bacterial strains capable of producing biosurfactant

Identification of *Azospirillum* capable of producing biosurfactants at the species level was performed by measuring the width of the cell in micrometres (μm), by growth in potato dextrose agar (PDA) to determine the type of colony, by biochemical reactions (reduction of nitrates to nitrites, indole formation (tryptophan among them), glucose fermentation, arginine dihydrolase, urease, hydrolysis (β -glucosidase and protease)) and by assimilation assays (d-glucose, l-arabinose, d-mannose, d-mannitol, d-ribose, *N*-acetyl-glucosamine, d-sorbitol and d-fructose). The reaction readings were performed with the help of identification tables according to the biochemical characteristics of *Azospirillum* species proposed by Holt et al. (1994).

Microscopic studies were performed in the NFB strains, and the macroscopic characterisation of the colonies included shape, height, size, colour, surface and border according to Ramírez et al. (2001).

2.3.9 Determination of emulsion capacity and emulsion stability of pure biosurfactant

Emulsion capacity is used to explain the stabilising activity of the cell and culture emulsion. It was determined at $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ and was a modification of the method used by Cassidy and Hudok (2001). Briefly, 2.0 mL of the biosurfactant and 1 mL of water were added to an assay tube ($180 \times 18\text{ mL}$), closed system and atmospheric pressure (14.7 lb/in.^2), the contents were vigorously agitated for 30 s, 500 rpm in a Barnstead Thermolyne brand vortex mixer model, and then a volume of 0.2 mL of oil was added (10 % emulsion capacity) and agitated again. To determine emulsion stability, the time from 0 min to phase separation was recorded. The mix was left to settle during 48 h until the phases completely separated, and the elapsed time was recorded (min) to report emulsion stability. The oil addition cycle was repeated until a fraction of pure oil was observed in the upper phase of the liquid. The volume of total oil used was divided by the volume of the aqueous phase and multiplied by 100. The resulting value represented the percentage of emulsion capacity.

2.3.10 Measurement of surface tension of pure biosurfactant

Solutions with different concentrations of biosurfactant were prepared in water, covering an interval of 1×10^{-6} to 1×10^{-2} weight percentage. Once the solutions were prepared, they were left to settle at 30 °C for 2 days in 20 cm³ sealed vials. The measurements of static surface tension were performed using a Krüs K 10 ST digital tensiometer model, which measures the surface and interphase tension of liquids at a controlled temperature. The measurements were performed at 30 °C, and the Wilhelmy plate method described by Álvarez et al. (2009) was used.

2.3.11 Determination of the critical micelle concentration

The concentration at which the micelles begin to form is defined as the critical micelle concentration (CMC). This is determined by a sudden change in surface tension, viscosity, density, etc. The CMC of the biosurfactants was determined by graphically representing the viscosity as a function of the concentration.

2.3.12 Fourier transform infrared spectroscopy

Samples of biosurfactants generated by *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense* were structurally characterised by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) to support the results obtained by thin layer chromatography. The samples were analysed on a KBr tablet (Sigma-Aldrich grade FT-IR). They were subsequently analysed in a Shimadzu model IRAffinity-1 FT-IR spectrometer at an interval of 750–4500 cm⁻¹ and a resolution of 2 cm⁻¹ in 40 scans, and the data obtained were processed with IRsolution™ software.

2.4 Results and Discussion

2.4.1 Isolation of native hydrocarbonoclastic nitrogen-fixing bacterial strains in the laboratory

Geographic latitude and longitude coordinates were obtained using a global positioning system (GPS) at five sampling points: 1: 18° 10' 33.996" and 93° 54' 34.1994"; 2: 18° 10' 4.368" and 93° 54' 8.676"; 3: 18° 9' 42.5514" and 93° 54' 58.4274"; 4: 18° 9' 42.336" and 93° 54' 58.5354"; 5: 18° 9' 41.652" and 93° 54' 58.644" (Fig. 1).

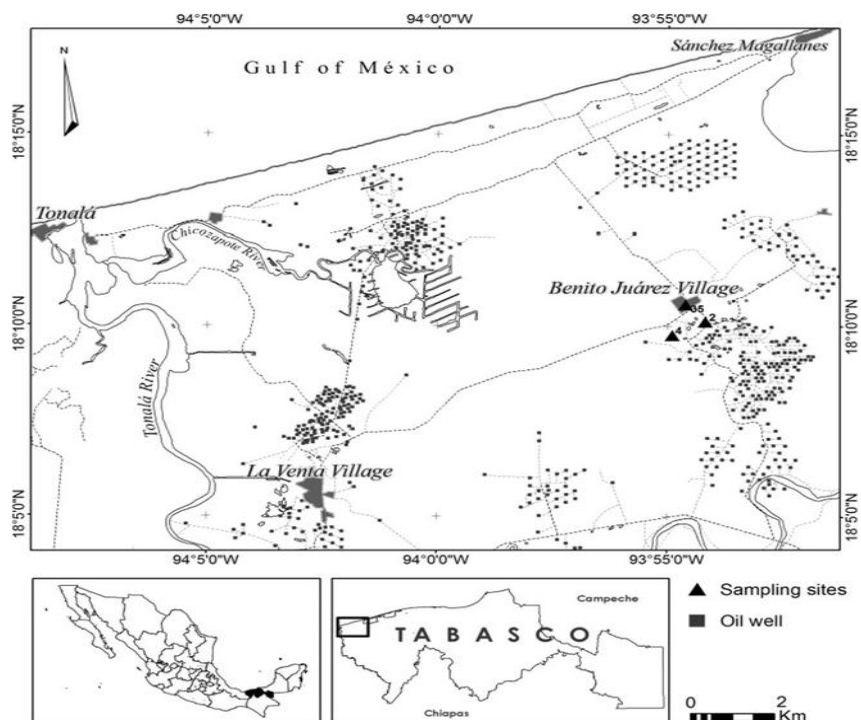


Figure 1. Sampling site located in the flood plain of the Chico Zapote river in the lower basin of the Tonalá river, Benito Juárez Village, Cárdenas, Tabasco, México

The sites where the plant and rhizosphere samples were taken showed an average concentration of 138000 ppm of total oil hydrocarbon and pH 7.69 in the flood plain of the Chico Zapote river. From the study zone, 30 specimens belonging to 22 plant families were taxonomically classified (Table 1).

The site where the rhizospheres were collected showed contamination with hydrocarbons in the C_{18}^+ phase due to hydrocarbon spread via flow of surface water in the flood plains of the Chico Zapote River. These hydrocarbons likely derived from oil spills in the Sanchez Magallanes oil field, Cárdenas, Tabasco, México. These results agree with reports for gleysols, histosols and solonchaks soils with hydrophytic vegetation and mangroves in oil fields in the lower basin of the Tonalá river (Zavala et al. 2005; García et al. 2006; Domínguez-Domínguez et al. 2011; Guerrero et al. 2012).

Table 1 Plant species collected in a flood plain of the Chico Zapote river, on the low basin of the Tonalá river in Tabasco, México

Plant family	Genus	Species
Alismataceae	<i>Sagittaria</i>	<i>lancifolia</i> L.
Apiaceae	<i>Arracacia</i>	sp.
Apocynaceae	<i>Asclepias</i>	<i>curassavica</i> L.
Araceae	<i>Pistia</i>	<i>stratiotes</i> L.
Arecaceae	<i>Acoelorrhaphe</i>	<i>wrightii</i> H. Wendl. & Becc.
Asteraceae	<i>Parthenium</i>	<i>hysterophorus</i> L.
Dryopteridaceae	<i>Dryopteris</i>	<i>filix-mas</i> L.
Campanulaceae	<i>Lobelia</i>	<i>cardinalis</i> L.
Cyperaceae	<i>Cyperus</i>	<i>articulatus</i> L.
Cyperaceae	<i>Cyperus</i>	<i>giganteus</i> Vahl.
Cyperaceae	<i>Cyperus</i>	<i>luzuloe</i> (L.) rest
Fabaceae	<i>Mimosa</i>	<i>pigra</i> L.
Fabaceae	<i>Mimosa</i>	<i>somnians</i> Humb. & Bonpl. ex. Willd
Heliconiaceae	<i>Heliconia</i>	<i>latispatha</i> Benth.
Lamiaceae	<i>Hyptis</i>	<i>sinuata</i> Pohl ex Benth.
Malvaceae	<i>Hibiscus</i>	<i>tiliaceus</i> L.
Marantaceae	<i>Calathea</i>	<i>lutea</i> (Aubl.) Schult.
Marantaceae	<i>Thalia</i>	<i>geniculata</i> L.
Moraceae	<i>Ficus</i>	<i>elastica</i> Roxb.
Onagraceae	<i>Ludwigia</i>	<i>peruviana</i> (L.) Hara
Piperaceae	<i>Piper</i>	<i>glabrescens</i> (Miq.) C. DC.
Poaceae	<i>Echinochloa</i>	<i>colona</i> (L.) Link
Poaceae	<i>Leersia</i>	<i>hexandra</i> Sw.
Poaceae	<i>Panicum</i>	<i>repens</i> Linn
Pontederiaceae	<i>Eichhornia</i>	<i>crassipes</i> (Mart.) Solms.
Pontederiaceae	<i>Pontederia</i>	<i>sagittata</i> C.P.
Pteridaceae	<i>Acrostichum</i>	<i>aureum</i> L.
Salviniaceae	<i>Salvinia</i>	<i>auriculata</i> Aubl.
Typhaceae	<i>Typha</i>	<i>latifolia</i> L.
Verbenaceae	<i>Lantana</i>	<i>camara</i> L.

Taxonomic identification of 30 specimens belonging to 22 plant families, of which 83.33 % were herbaceous, 13.33 % shrubs and 3.33 % trees.

When evaluating the bacterial strains from the rhizosphere of each plant species identified, 42 bacterial strains belonged to the genus *Azospirillum*. Based on the microbial reproduction in the liquid mineral culture where oil was the only carbon source, 28 strains showed the ability to complete the microbial population growth curve with log, exponential, stationary and death phases. At the end of the stationary phase, oil emulsion stability was evaluated. Treatments in which the emulsion stability was greater than 150 min were identified with the codes M₁B₂, M₁B₈, M₇B₅ and M₄B₁.

Plant species found in the study area agree with previous studies performed on the plant cover of the lower basin in the Tonalá river in vascular plants (Lot 1991) and in aquatic plants (García et al. 2006). Several plant species have economic importance for roof construction (Marantaceae, *Calathea lutea*), basketry items (Cyperaceae, *Cyperus articulatus*), medicinal uses (Asteraceae, *Parthenium hysterophorus*; Campanulaceae, *Lobelia cardinalis*; Piperaceae, *Piper glabrescens*; Verbenaceae, *Lantana camara*, etc.) and as ornamental species (Fabaceae, *Mimosa pigra*; Marantaceae, *Thalia geniculata*; Pontederiaceae, *Pontederia sagittata*, etc.). Plant resources in the area have great importance for the local population; therefore, studies on their use and conservation have been performed (García et al. 2012).

2.4.2 Determination of physiological and biochemical characteristics differentiating each *Azospirillum* species

The evaluation of physiological characteristics, such as cell width (Fig. 2), and characteristics differentiating both bacterial strains (Table 2) revealed two species: *A. lipoferum* (M₁B₂) and *A. brasilense* (M₁B₈, M₇B₅ and M₄B₁), both found in *C. lutea* of the Marantaceae family. *A. brasilense* was found in *Typha latifolia* (Typhaceae) and in one species of the genus *Ficus elastica* (Moraceae).

The microscopic tests revealed that both strains are Gram-negative. However, the macroscopic tests showed that *A. brasilense* forms circular, flat, rough, whole and opaque colonies, while *A. lipoferum* forms circular, flat, red, smooth, whole and shiny colonies.

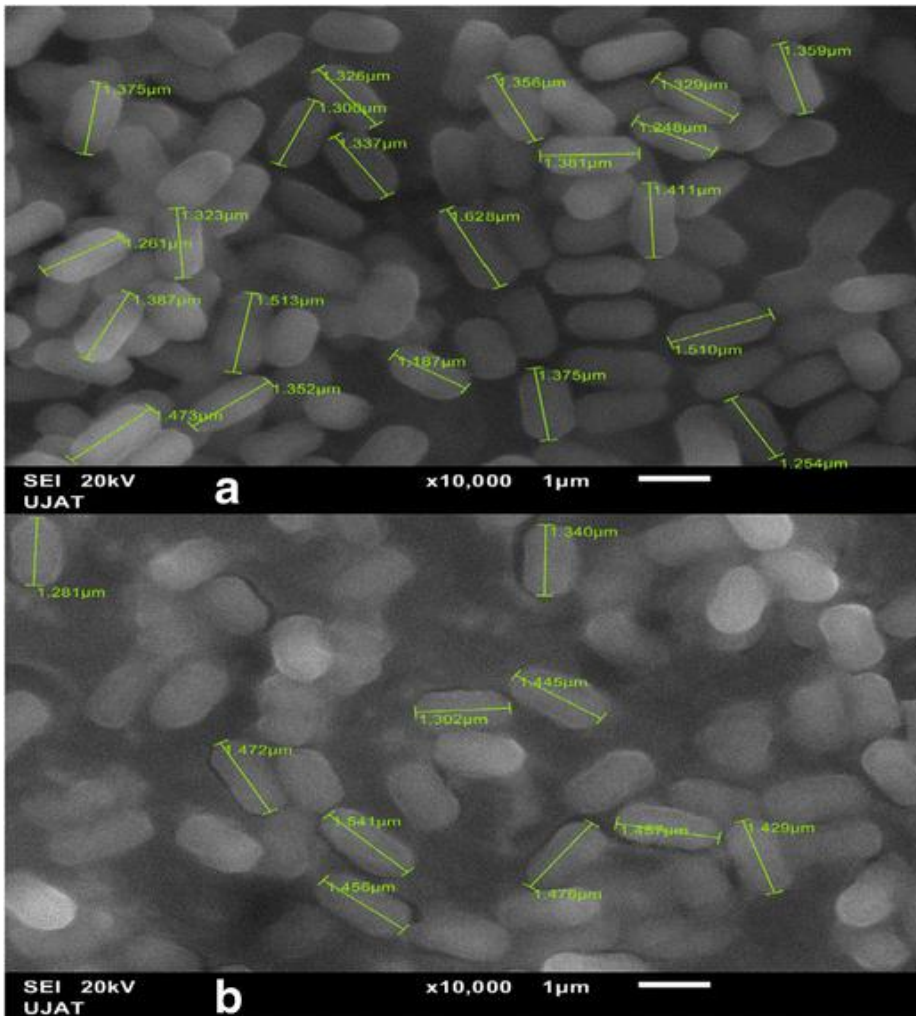


Figure 2. Electron microscopy of a) *Azospirillum brasilense* and b) *Azospirillum lipoferum*

Table 2 Physiological and biochemical characteristics differentiating each *Azospirillum* species

Reactions/enzymes	Reaction/characteristic	
	M ₁ B ₂ <i>Azospirillum lipoferum</i>	M ₁ B ₈ <i>Azospirillum brasilense</i>
Cell width (µm)	1.0–1.5	1.0–1.2
Growth in PDA	+	+
Type of colony in PDA pink, elevated, wavy	+	+
Gram	–	–
Reduction of nitrates to nitrites	+	+
Indole formation (tryptophan)	–	–
Fermentation (glucose)	–	–
Arginine dihydrolase	–	–
Urease	–	–
Hydrolysis (β-glucosidase) (aesculin)	+	+

Reactions/enzymes	Reaction/characteristic	
	M ₁ B ₂ <i>Azospirillum</i> <i>lipoferum</i>	M ₁ B ₈ <i>Azospirillum</i> <i>brasilense</i>
Hydrolysis (protease) (gelatine)	+	+
Assimilation (glucose)	+	-
Assimilation (arabinose)	+	-
Assimilation (mannose)	-	-
Assimilation (mannitol)	+	-
Assimilation (ribose)	+	-
Assimilation (sorbitol)	+	-
Assimilation (fructose)	+	-
Assimilation (N-acetyl-glucosamine)	+	-

Response of two *Azospirillum* species in biochemical tests and physical characteristics

The bacterial strains identified as *A. lipoferum* and *A. brasilense* are not pathogenic (Madigan et al. 2012), which is of vital importance for their industrial use as biosurfactant producers.

The production of biosurfactants is important because it targets improved recovery of hydrocarbons due to oil is the base of the economy in many countries, the improvement of oil drainage in oil wells, stimulating the release of trapped oil, moistening of solid surfaces, reduction of oil viscosity and decreasing interphase tension for tertiary oil recovery (Müller et al. 2012). However, mismanagement of hydrocarbons also has negative impacts on the environment. Coastal oil spills have contributed to hydric stress and death by suffocation of seedlings of different mangrove species. Mangrove seedlings do not survive oil impacts because hydrocarbons damage cell membranes in the roots, impeding the normal process of salt exclusion (Proffitt et al. 1995; Inckot et al. 2011).

2.4.3 Microbial evaluation of the hydrocarbonoclastic strains

In the semi-logarithmic graph, the data were fit to a straight line. The correlation analysis between population growth and the time elapsed showed high sample correlation coefficients ($r=0.95861$ for *A. lipoferum* and $r=0.99404$ for *A. brasilense*) (Fig. 3). The maximum activity for both species in liquid mineral medium was obtained 144 h after beginning the bioassay, corresponding to 56×10^6 CFU.mL⁻¹ for *A. lipoferum* and 25×10^6 CFU.mL⁻¹ for *A. brasilense*. When

evaluating microbial growth in liquid mineral media for hydrocarbonoclastic bacteria, there was a strong association between population development and the time the experiment lasted, thus classifying them as hydrocarbonoclastic bacterial strains.

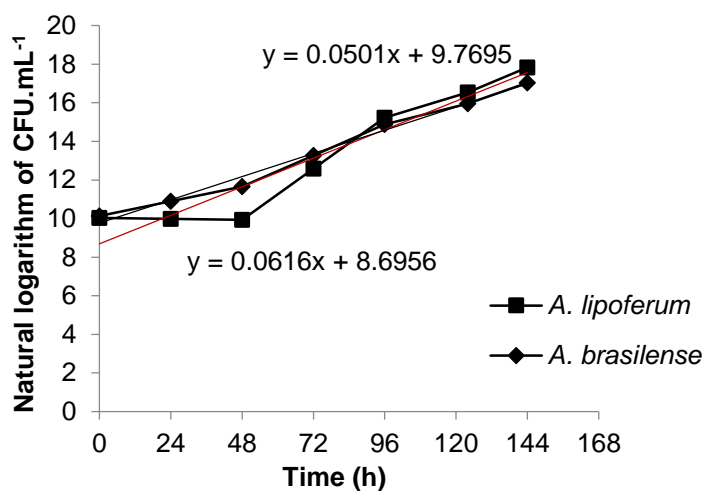


Figure 3. Growth of **a)** *Azospirillum lipoferum* and **b)** *Azospirillum brasilense* in liquid mineral medium with oil as the only carbon source

It is important to study the production of biosurfactants over time; as shown in this study, production can vary. This might be because substrates in treatments are not renewed and therefore interfere with the ability of bacteria to use biosurfactants as a nutrient source.

2.4.4 Biosurfactant production into Kim medium

The results of biosurfactant production by *A. lipoferum* and *A. brasilense* inoculated into Kim medium did not show significant differences between treatments during the first 168 h of the bioassay. However, after 192 h, there were significant differences between treatments, where *A. lipoferum* produced the highest amount of biosurfactant (Fig. 4). The highest microbial population growth and highest biosurfactant production for both *Azospirillum* species were obtained after 72 h in Kim medium. The *A. brasilense* strain had a maximum growth of 75×10^6 CFU.mL⁻¹ and biosurfactant production of 0.1375 g.L⁻¹, while *A. lipoferum* obtained a maximum growth of 80×10^6 CFU.mL⁻¹ and biosurfactant production of 0.22 g.L⁻¹, 72 h after the bioassay began. At the end of the experiment, the microbial population of *A. lipoferum* was 33×10^4 CFU.mL⁻¹ with 0.05 g.L⁻¹ of biosurfactant produced,

while microbial population growth for *A. brasilense* was 35×10^4 CFU.mL⁻¹ with production of 0.0175 g.L⁻¹.

This yield can be compared to that of *Azotobacter chroococcum* studied by Thavasi et al. (2009), which produced a yield of 4.6 g.L⁻¹, 96 h after the bioassay began. In the same context, Pérez et al. (2010) reported a nitrogen-fixing bacterial strain *Stenotrophomonas sp.*, with a biosurfactant production yield of 0.5 g.L⁻¹ after 288 h. Although the production times varied, comparison of these yields demonstrates that the production of biosurfactants by *A. lipoferum* and *A. brasilense* is competitive with other nitrogen-fixing strains. The Kim medium consists of pure salts, and in this study, the production of both biosurfactants was low. However, the yield could be optimized in future studies by varying the parameters of the culture conditions, such as pH, temperature, oxygen and mixing conditions (Fonseca et al. 2007), in addition to changing the carbon and nitrogen sources (from industrial waste) and trace elements, such as iron and manganese which would make industrial level biosurfactant production sustainable (Jiménez et al. 2010).

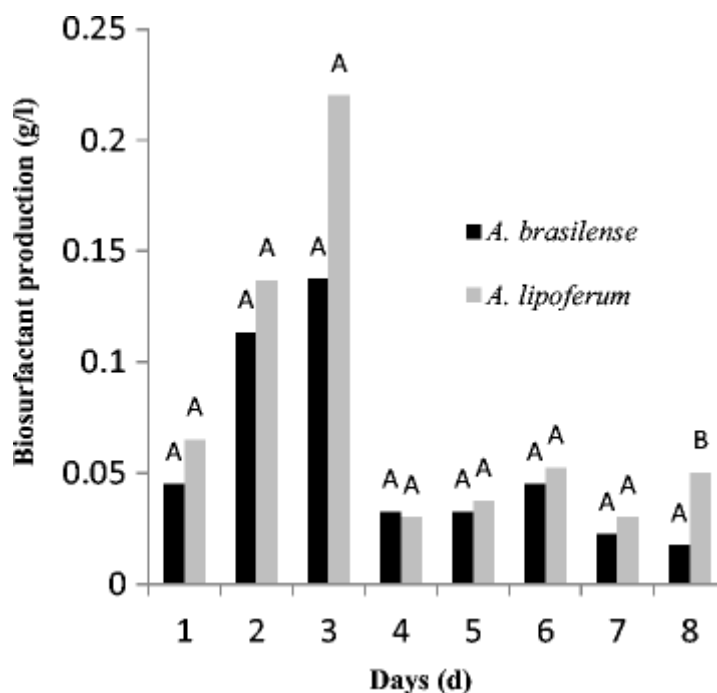


Figure 4. Biosurfactant production by strains *A. brasilense* and *A. lipoferum* in experimental units (e.u.) of 250 mL in Kim medium. Values of treatments with different letters have statistically significant differences ($\alpha \leq 0.05$)

Differences in production and biosurfactant quality may be due to the incubation time in the Kim medium (Ron and Rosenberg 2001).

2.4.5 Polar lipids associated with the surfactant activity

Thin layer chromatography, used for the identification of polar lipids, led to the detection of lipopeptides in the biosurfactants produced by *A. brasilense* and *A. lipoferum* (Fig. 5). This compound has been associated with the surfactant activity of biosurfactants (Hamilton and Hamilton 1992). Lipopeptides were detected in biosurfactants obtained from *A. lipoferum* and *A. brasilense*. These compounds are classified as low-molecular weight compounds (Rodríguez et al. 2006; Banat et al. 2010), and they possess activity emulsifying, dispersing and wetting properties capable of reducing surface tension. Microorganisms capable of synthesising biosurfactants perform this action to break the surface and interphase tension between liquid/liquid and gas/liquid.

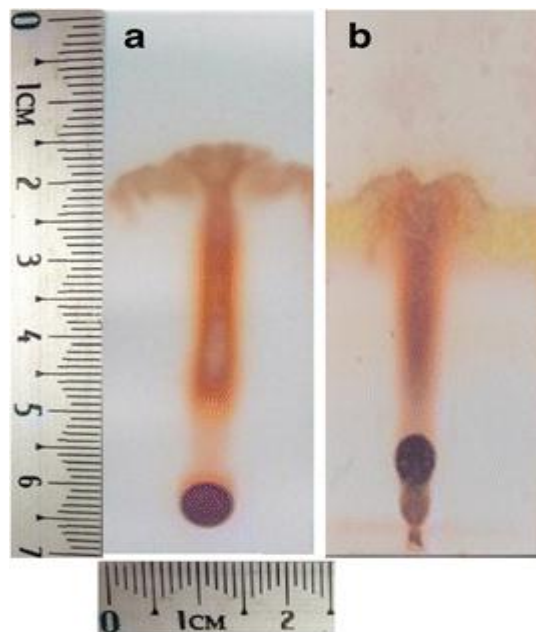


Figure 5. Detection of lipopeptides associated with surfactant activity produced by **a)** *Azospirillum lipoferum* and **b)** *Azospirillum brasilense*

2.4.6 Critical micelle concentration

An important characteristic of the efficiency of surfactant substances is the formation of micelles in a polar environment, and this is closely related to the critical micelle concentration (CMC), which represents the minimum surfactant concentration required for the spontaneous formation of micelles. The CMC of the biosurfactants produced by *A. lipoferum* and *A. brasilense* was 0.25 % (Fig. 6a) and 0.12 % of weight (Fig. 6b), respectively. The lipopeptides present in both biosurfactants in this study could increase the apparent solubility of hydrocarbons by incorporating them into the hydrophobic cavities of the micelles. The CMC of biosurfactants in aqueous solution varies depending on their structure (Deshpande et al. 1999).

The application of a biosurfactant with a value less than its CMC would be most appropriate if the contaminants could be solubilised at low concentrations and if exposure of toxic substances to soil microorganisms was minimal (Lee et al. 2005). Notably, the implementation of biosurfactants with concentrations greater than their CMC, as well as being costly, can be toxic to microorganisms (Riojas et al. 2010; Laha and Luthy 1992). The CMC value found for biosurfactants in this study is similar to that reported by other researchers (Diniz et al. 2014; Janek et al. 2013; Prince et al. 2012; Ferhat et al. 2011). The CMC represents a range of concentrations, not an exact or absolute value, because phase transitions occur gradually (Aparicio 2012). In a similar context, Thies et al. (2014) indicated that biosurfactant agents with concentrations greater than the CMC may be appropriate for soil cleansing; however, these high concentrations may be inappropriate for bioremediation, which contrasts with the results of Kim et al. (2011), who found that the solubility of polycyclic aromatic hydrocarbons is proportional to the concentration of biosurfactants, i.e. values greater than the CMC improve the solubility, but it decreases for values below or near the CMC.

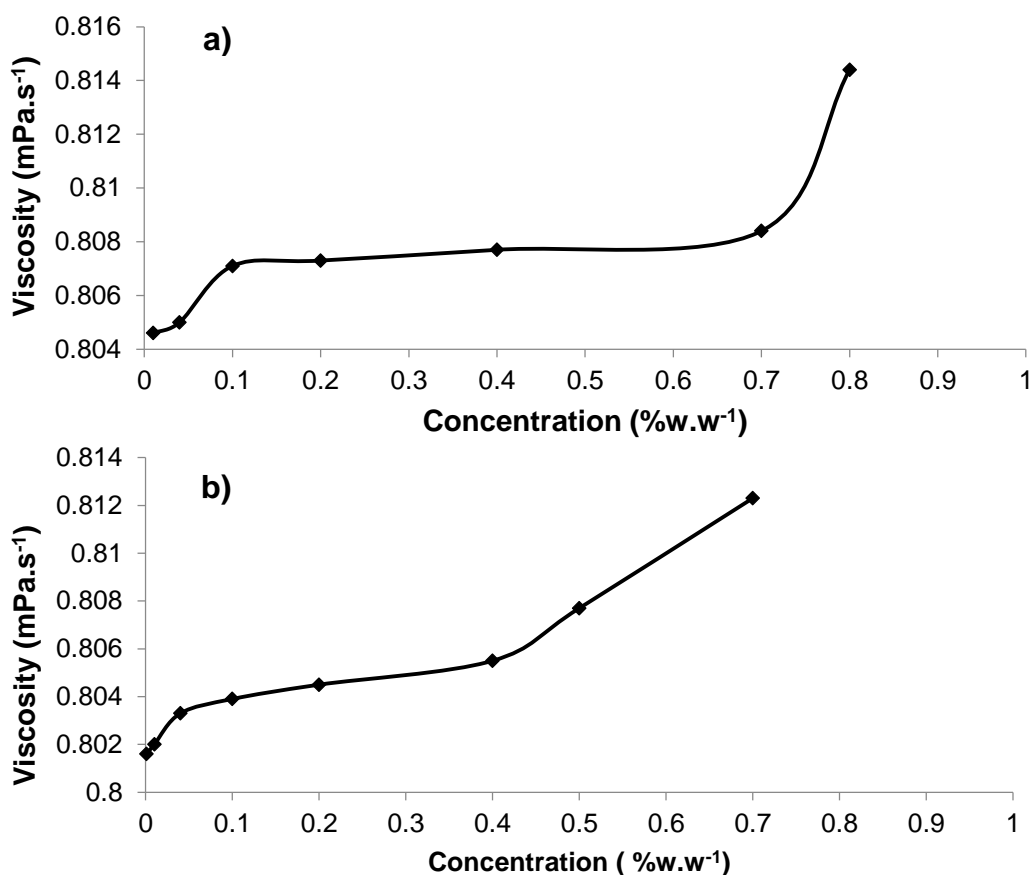


Figure 6. Determination of critical micelle concentration. Formation of micelles in a polar environment measured at 30 °C. Biosurfactant produced by strains **a)** *Azospirillum lipoferum* and **b)** *Azospirillum brasilense*

2.4.7 Measurement of emulsion capacity, emulsion stability of pure biosurfactant
 Several characteristics of the biosurfactants led us to consider possible applications. (1) The emulsification capacity was determined at a temperature of 30 °C ± 1°, resulting in 80 % capacity for the biosurfactant produced by *A. brasilense* and in 90 % capacity for the biosurfactant produced by *A. lipoferum*. (2) The emulsion stability of a surfactant determines the maximum time it can keep an emulsion stable. The results of this test showed that the biosurfactant produced by *A. brasilense* was stable for 229 min and pH of 6.9 while the biosurfactant produced by *A. lipoferum* was stable for 260 min and pH of 7.1.

2.4.8 Measurement of surface tension of pure biosurfactant

Another desirable characteristic in a surfactant is the capacity to decrease the surface tension of liquids.

The results of these tests showed that biosurfactants produced by *A. lipoferum* and *A. brasilense* were capable of decreasing the surface tension of water from 72 mN.m⁻¹ (values corresponding to the surface tension of HPLC-grade water) to 35 mN.m⁻¹ (Fig. 7a) and 38 mN.m⁻¹ (Fig. 7b), respectively. The biosurfactants produced by both *Azospirillum* species reduced surface tension and produced emulsions. Both actions allow for increased mass transfer, helping low-solubility carbon sources become available for biodegradation and to be imported into different metabolic pathways for the generation of energy and biomass synthesis. Biosurfactants favour the bioavailability of contaminants by establishing a desorption-solubilisation equilibrium. According to Kitamoto and Nakahara (2002), biosurfactants mainly move equilibrium towards the aqueous phase, allowing performance of different transport processes and biodegradation of contaminants.

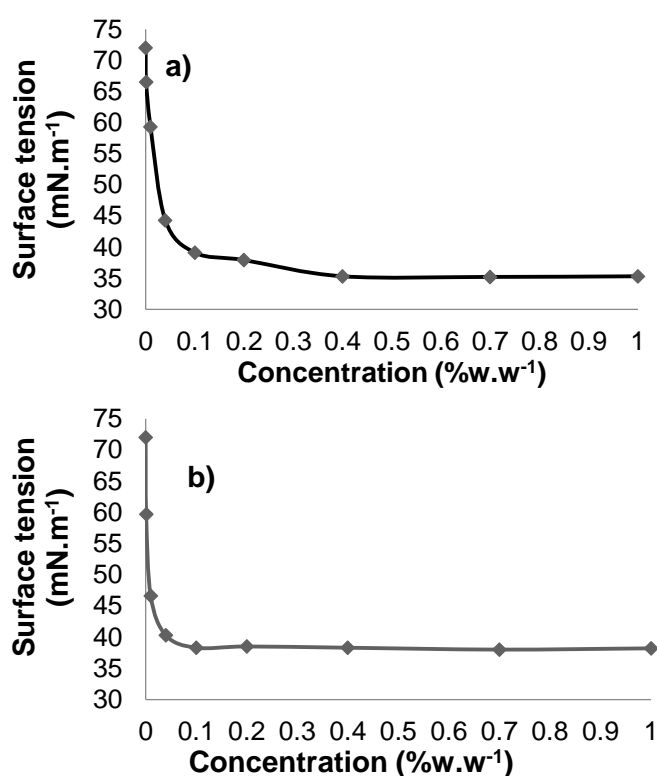


Figure 7. Surface tension as a function of the concentration of pure biosurfactant in water measured at 30 °C. Biosurfactant produced by strains **a)** *Azospirillum lipoferum* and **b)** *Azospirillum brasilense*

It is important to highlight that the emulsion stability of the biosurfactants produced by *A. brasilense* and *A. lipoferum* was higher at 220 min; therefore, they could be used to emulsify oil remaining from coastal spills, protecting species with high economic and environmental importance before they are impacted by hydrocarbons. Likewise, the emulsion capacity of the biosurfactants could optimise cleaning processes, such as bioremediation. Notably, if a biosurfactant is to be applied at an industrial scale, such as during the bioremediation of sites contaminated with hydrophobic compounds, it should be added as a broth because applying it in its purest form requires large amounts of solvents and energy for its production and purification. Thus, it would be interesting to measure the TS from the cell-free broth.

2.4.9 Fourier transform infrared spectroscopy

A classic technique for the structural analysis of organic compounds is FT-IR. Figure 8 shows the FT-IR spectrum of a pure biosurfactant produced by *A. lipoferum* and *A. brasilense*. The characteristic absorption bands of both biosurfactants usually correspond to functional groups formed by lipopeptides. In Fig. 8a, the major absorption bands were located at 3420 cm^{-1} (O-H bond typical of polysaccharides), 2931 and 2857 cm^{-1} (C-H bond, chains of aliphatic hydrocarbons), 1638 cm^{-1} (O=C-N bond, amide group), 1457 and 1403 cm^{-1} (C-N amine groups) and 1218 and 1085 cm^{-1} (alkyl radicals), while in Fig. 8b, the major absorption bands were located at 3499 cm^{-1} (O-H bond typical of polysaccharides), 2957 and 2885 cm^{-1} (C-H bond, chains of aliphatic hydrocarbons), 1648 cm^{-1} (O=C-N bond, amide group), 1438 cm^{-1} (C-N amine groups) and 1118 and 1034 cm^{-1} (alkyl radicals). The wave numbers obtained in this study are consistent with lipopeptide molecules. The FT-IR analysis of the biosurfactant obtained from the nitrogen-fixing strain of *A. lipoferum* was similar to the results obtained by Kuiper et al. (2004) and Das and Mukherjee (2007), who used FT-IR as an analytical tool to characterise the biosurfactant. The results of this study are consistent with a type of polar lipid of the nitrogen-fixing bacteria *A. chroococcum* (Thavasi et al. 2009), which is a lipopeptide with a lipid and protein proportion of 31.3:68.7.

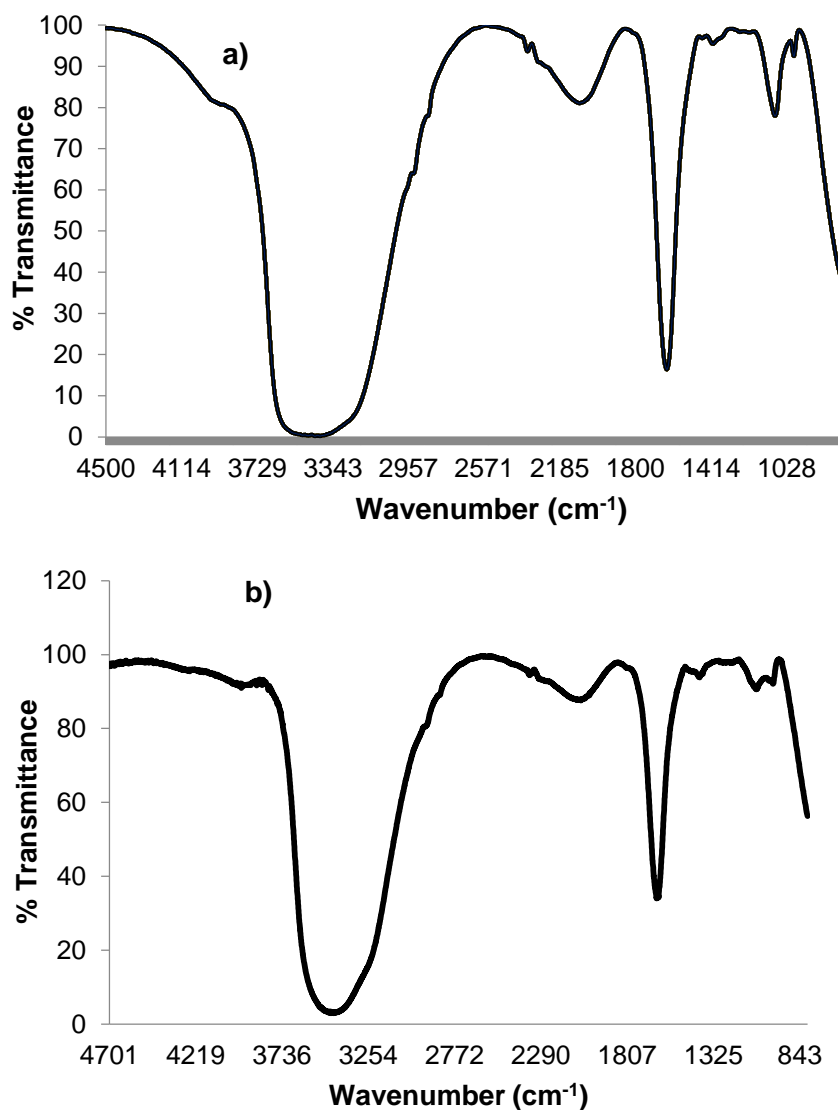


Figure 8. FT-IR spectrum of the purified biosurfactant produced by strains **a)** *Azospirillum lipoferum* and **b)** *Azospirillum brasilense*

2.5 Conclusion

We identified few free-living nitrogen-fixing bacterial strains associated with the rhizosphere of plants adapted to stressful ecosystems with 138000 ppm oil. However, *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense* were isolated, and they showed the capacity to produce biosurfactants in short time intervals. The biosurfactants produced by *A. lipoferum* and *A. brasilense* showed surface activity and emulsifying properties that could increase the bioavailability of hydrocarbons

and lead to their biodegradation. Based on these characteristics, they could be used to emulsify the remaining oil from hydrocarbon spills in the ocean, avoiding the mortality of species of great ecological importance, such as those present in mangrove ecosystems.

Acknowledgments

This study is part of a doctoral project entitled “Restoration of oil contaminated soils, with mangrove swamp vegetation in tabasco, México”. The isolation of free-living nitrogen-fixing bacterial strains with the capacity to produce biosurfactants was performed with the support from Engr. Carlo Mario Hernández Domínguez of the Biotechnology Laboratory of the Autonomous Juarez University of Tabasco. Thanks to M.C.A. Lucero Vázquez Cruz, Head of the Microbiology Laboratory, for the support in the identification of *Azospirillum* species. We also thank Dr. María De Los Ángeles Guadarrama Olivera, Head of the Laboratory of Vascular Plants of the Herbarium of the Autonomous Juarez University of Tabasco, for the support in the taxonomic identification of vascular plants. We also extend our thanks to Dr. Emma Rebeca Macías Balleza of the Rheology Laboratory of Guadalajara University for the support in the measurements of surface tension and critical micelle concentration.

Compliance with ethical standards

Conflict of Interests. The authors declare that they have no competing interests.

2.6 References

- Almazán, V., González, J., Pérez, J., Dieguez, F., Villaverde, M., Pérez, G., Joseph, N., Gan, R. (2000). Purificación e identificación de la naturaleza química de un tensoactivo producido por *Pseudomonas aeruginosa* Cepa Ido-330. *Revista Biología*, 14, 172–177.
- Álvarez, J., Fernández, V., Macías, E., Pignon, Y., Rharbi, R., & Gómez, J. (2009). Phase behavior studies of the Pluronic P103/Water system in the dilute and semidilute regimes. *J. of colloids and interface Sci.* doi:10.1016/j.jcis.2009.01.068.

- Aparicio, R. (2012). Determinaciones de las concentraciones micelares críticas (CMC) para el sistema p-fluorobenzoato del cetiltrimetilamonio (CTAPFB)/Agua. Tesis de licenciatura. Centro universitario de ciencias exactas e ingenierías. Universidad de Guadalajara. Jalisco, México. pp. 38.
- Banat, I., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M., Fracchia, L., Smyth, T., & Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. doi:10.1007/s00253-010-2589-0.
- Bueno, J., Álvarez, F., Santiago, S. (2005). Biodiversity of Tabasco State. [<http://www.conabio.gob.mx/institución/proyectos/resultados/FichapubCP008.pdf>]. México.
- Cassidy, D., & Hudok, A. (2001). Microorganism selection and biosurfactant production in a continuously and periodically operated bioslurry reactor. *J Hazard Mater.*, 84, 253–264.
- Cortés, A., Hernández, H., & Jaramillo, M. (2013). Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: new trends and possible therapeutic alternatives. *Microbiol*. doi:10.1016/j.micres.2012.07.002.
- Das, K., & Mukherjee, A. (2007). Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: some industrial applications of biosurfactants. *Process biochem.*, 42, 1191–1199.
- Deshpande, S., Shiau, B., Wade, D., Sabatini, D., & Harwell, J. (1999). Surfactants selection for enhancing *ex situ* soil washing. *Pergamon.*, 33, 351–60.
- Diniz, R., Moura, J., De Campos, G., & Asfora, L. (2014). Characterization and properties of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UPC 0998. *Eletronic J. of Biotechol*, 17, 34–38. doi:10.1016/j.ejbt.2013.12.006.
- Domínguez-Domínguez, M., Zavala-Cruz, J., Martínez-Zurimendi, P. (2011). Mangrove forest management in Tabasco [www.colpos.mx/tabasco/]

vinculación/LIBRO_MANGLARES_DE_TABASCO.pdf]. Graduate School. México.

Ferhat, F., Mnif, S., Badis, A., Eddouaouda, K., Alouaouil, R., Boucherit, A., Mhiri, N., & Moulai-mostefa, N. (2011). Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Chrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65, 1182–1188. doi:10.1016/J.IBIOD.2011.07013.

Fonseca, R., Silva, J., De Franca, P., Cardoso, L., & Sérvulo, F. (2007). Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. *Appl. Biochem and Biotech.*, 137, 471–486.

García, E., Zavala, J., & Palma, D. (2006). Characterization of plant communities in an area affected by hydrocarbon spills. *Terra Latinoamericana*, 24, 17–26 [<http://redalyc.org/pdf/573/57311494003.pdf>].

García, E., Zavala, J., & López, A. (2012). Plants and vegetation in the lower basin of Tonalá River. In J. Zavala & E. García (Eds.), *Soil and vegetation in the lower basin of Tonalá River* (pp. 103–123). México: Tabasco. Graduate School.

Guerrero, A., Hernández, L., Zavala, J., & Carrillo, E. (2012). Soil contamination by crude oil in the lower basin of the Tonalá River. In J. Zavala & E. García (Eds.), *Soil and vegetation in the lower basin of the Tonalá River, Tabasco* (pp. 85–101). Mexico: Graduate School [www.biblio.colpos.mx8080/xmlui/handle/10521/1605].

Hamilton, R., & Hamilton, S. (1992). Lipid analysis, IRL Press, the practical approach series, U.S.A. pp. 65–93.

Hernández, E., Ferrera, R., & Rodríguez, R. (2003). Free-living atmospheric nitrogen-fixing bacteria in bean rhizospheres contaminated with kerosene. *Terra latinoamericana*, 21, 81–89 [<http://www.redalyc.org/pdf/573/57321110.pdf>].

- Hernández, M., Ojeda, M., Martínez, J., & Córdova, Y. (2011). Optimal parameters for the development of the hydrocarbonoclastic microorganism *Proteus sp.* *Soil Sci. Plant Nutr.*, *11*, 29–43.
- Holt, J., Krieg, R., Sneath, H., Staley, T., Williams, T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. US.
- Inckot, C., De Oliveira, G., De Souza, A., & Bona, C. (2011). Germination and development of *Mimosa pilulifera* in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. *Flora.*, *206*, 261–266.
- Janek, T., Lukaszewicz, M., & Krasowska, A. (2013). Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *110*, 379–386. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.05.008.
- Jiménez, D., Medina, S., & Gracida, J. (2010). Properties, applications and production of biosurfactants. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, *1*, 65–84 [<http://revistas.unam.mx/index.php/rica/article/view/20446>].
- Kim, H., Jong, L., Ok, L., & Dong, L. (2000). Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia sp.* L. 417. *Biotechnol. Appl. Biochem.* doi:10.1042/BA19990111.
- Kim, I., Park, J., & Kim, K. (2011). Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry. *Appl. Geochem.*, *16*, 1419–1428.
- Kitamoto, D., & Nakahara, T. (2002). Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy saving materials to gene delivery carriers. *J. Biosc. Bioeng.* doi:10.1016/S1389-1723(02)80149-9.
- Kuiper, I., Legendijk, E., Pickford, R., Derrick, J., Lamers, G., Thomas, J., Lugtembeg, B., & Bloemberg, G. (2004). Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvíns I and II, which

inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol.*, 51, 97–113.

Kuttuvan, S., Rajee, S., Himani, J., Kunduru, R., Sanjit, K., Rachapudi, N., & Ashok, P. (2013). Studies on biosurfactants from *Pseudozyma sp.* NII 08165 and their potential application as laundry detergent additives. *Biochem. Eng.* doi:10.1016/j.bej.2012.12.014.

Laha, S., & Luthy, R. (1992). Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 40, 1367–1380.

Laurencio, H., & Delgado, Y. (2008). Rheological properties of emulsions of petroleum weighed in water. *Rev Chilena of engineering.*, 16, 244–249.

Lee, D., Kim, E., & Chang, H. (2005). Effect of Tween surfactant components for remediation of toluene-contaminated groundwater. *Geosciences J*, 9, 261–267.

Lot, A. (1991). Vegetation and aquatic vascular plants in the Veracruz State [<http://www1.inecol.edu.mx/herbarioxal/tesis.htm>]. Doctoral Thesis. National Autonomous University of Mexico. 217 pp.

Lot, A., & Chiang, F. (1986). Herbarium manual. Administration and management of collections, sampling and preparation of plant specimens. [<http://www.worldcat.org/title/manual-de-herbario-administracion-y-manejo-de-colecciones-tecnicas-de-recoleccion-y-preparacion-de-ejemplares-botanicos/oclc/13983653&referrer=brief-results>]. México.

Luna, M., Rufino, D., Sarubbo, A., & Campos, G. (2013). Characterization, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloid and Surface B.* doi:10.1016/j.colsurfb.2012.08.008.

Madigan, M., Martinko, M., Stahl, A., & Clark, D. (2012). *Brock biology of microorganisms*. España: Pearson Higher.

- Müller, M., Küglera, J., Henkela, M., Gerlitzki, M., Hörmanna, B., Pöhnleina, M., Syldatka, C., & Hausmannb, R. (2012). Rhamnolipids—next generation surfactants? *Biotechnol.* doi:10.1016/j.jbiotec.2012.05.022.
- Nathália, M. P., Rocha, S., Rufino, R. D., & Luna, J. M. (2014). Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactants production using low-cost substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnol.* doi:10.1016/j.bcab.2013.09.005.
- Nehal, A., Amal, N., Nael, Z., & Hussein, G. (1999). Stability and rheology of heavy crude oil-in-water emulsion stabilized by an anionic-nonionic surfactant mixture. *Petroleum Sci. and Technol.*, 17, 553–576.
- Ojeda, M., Hernández, M., Martínez, J., Díaz, L., & Rivera, M. (2012). Three *Proteus* sp inoculant dose in crude oil biodegradation. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 4, 112–1123.
- Ojeda, M., Hernández, M., Vázquez, J., Córdova, Y., & Hernández, Y. (2013). Optimal parameters for *in vitro* development of the fungus hydrocarbonoclastic *Penicillium* sp. *Advances in Chemical Engin and Sci.* doi:10.4236/aces.2013.34A1004.
- PEMEX. (2013). Annual statistical report 2013. Petróleos Mexicanos. [http://www.pemex.com/acerca/informes_publicaciones/Documents/anuario_estadistico_2013/anuario-estadistico2013_131014.pdf]. Accessed 17 July 2014.
- Pérez, J., Anaya, R., Chang, C., Membrillo, I., & Calva, J. (2010). Biosurfactant production by free-living nitrogen-fixing bacteria grown in hydrocarbons. *Revista CENIC*, 41, 1–10.
- Prince, N., Ray, K., Vermillon, K., Dunlap, C., & Kurtzman, C. (2012). Structural characterization of novel sophorolipid biosurfactants from a newly identified species of *Candida* yeast. *Carbohydrate Research.*, 348, 33–41. doi:10.1016/j.carres.2011.07.016.

- PROFEPA. (2011). National analysis of environmental emergencies. [http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/211/1/ms/analiss_nacional_de_emergenciasambientales.html]. Accessed 19 July 2014.
- Proffitt, C., Devlin, D., & Lindsey, M. (1995). Effects of oil on mangrove seedlings grown under different environmental conditions. *Marine pollution bulletin*, 30, 788–793.
- Rakeshkumar, M., Kalpana, M., Nidhi, J., Avinash, M., & Bhavanath, J. (2013). Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in bioremediation. *Int J Biol Macromol.*, 62, 52–58. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.08.030.
- Ramírez, R., Luna, B., Velázquez, O., Vierna, L., Mejía, A., Tsukuzi, G., Hernández, L., Müggenburg, I., Camacho, A., Urzúa, M. (2001). Manual of general microbiology methods. Mexico.
- Riojas, G., Torres, B., Mondaca, F., Balderas, C., & Moroyoqui, P. (2010). Efectos de los surfactantes en la biorremediación de los suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Química Viva*, 3, 121–137.
- Rodríguez, L., Banat, I., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimic. Chem.* doi:[10.1093/jac/dkl024](https://doi.org/10.1093/jac/dkl024).
- Ron, E., & Rosenberg, E. (2001). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotech.* doi:10.1016/S0958-1669(02)00316-6.
- Ruffino, M., Luna, H., Marinho, B., Farias, R., & Ferreira, A. (2013). Removal of petroleum derivate adsorbed to soil by biosurfactant trufisan produced by *Candida lipolytica*. *J Petrol Sci Eng.* doi:10.1016/j.petrol.2013.08.014.
- Santos, F., Flavila, C., Rosado, S., & Peixoto, S. (2011). Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. *Wat. air & soil pollut.* doi:10.1007/s11270-010-0536-4.

- SAS Institute Inc. (2009). SAS®. 9.2 SQ procedure user's guide. Cary: SAS Institute Inc.
- SEMARNAT. (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Section 6.1. Evaluation of conformity in soil sampling. Sampling for determining soil fertility. Secretariat of the Environment and Natural Resources. Official Gazette of the Federation, Second Section, December, 2002.
- Silva, J., Rocha, M., Rufino, D., Luna, M., Silva, O., & Sarubbo, A. (2014). Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. *Colloid and Surface B*. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.02.012.
- Souza, E., Vessoni, P., & Sousa, O. (2014). Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview. *Int Biodeter Biodegr*. doi:10.1016/j.ibiod.2014.01.007.
- Thavasi, R., Jayalakshmi, T., & Balasubramanian, I. (2009). Biosurfactant production by *Azotobacter chroococcum* isolated from the marine environment. *Mar. Biotechnol*. doi:10.1007/s10126-008-9162-1.
- Thies, S., Schübel, B., Kovacic, F., Rosenau, F., Hausmann, R., & Jaeger, K. (2014). Heterologous production of the lipopeptide biosurfactant *serrawettin* W1 in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.03.037.
- Yahya, A., Sanket, J., Saif, A., Abdulkadir, E., Al, A., & Biji, S. (2014). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloid and Surface B*. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.09.022.
- Zavala, J., Gavi, F., Adams, R., Ferrera, R., Palma, D., Vaquera, H., & Domínguez, J. (2005). Oil spills in soils and adaptation of tropical grasses in the Cinco Presidentes production center, Tabasco, México. *Terra latinoamericana*, 23, 293–302 [<http://www.redalyc.org/pdf/573/57323302.pdf>].

CAPÍTULO III
BIOSURFACTANT SYNTHESIZED BY *Azospirillum lipoferum* ALM1B2:
CHARACTERIZATION AND APPLICATION FOR ENVIRONMENTAL
PROTECTION²

Marcia E. Ojeda-Morales¹, Marivel Domínguez-Domínguez¹, Miguel A. Hernández-Rivera²✉, Juan G. Álvarez-Ramírez²

¹ Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco

² Laboratorio de Biotecnología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

Email author: miguel.hernandezr@ujat.mx

Resumen

En este estudio se caracterizó un biotensoactivo producido por la bacteria *Azospirillum lipoferum* aislada de rizósferas de plantas contaminadas con petróleo en la cuenca baja del río Tonalá, Villa Benito Juárez, municipio de Cárdenas, Tabasco, México. Se determinaron propiedades como: viscosidad a 25 °C, análisis elemental (%mol) por microscopía electrónica de barrido, densidad a diferentes temperaturas, peso molecular, toxicidad aguda, determinación de la concentración letal media (CL₅₀), índice de saponificación e índice de acidez. Se estudió el efecto que el pH (6.0, 7.0, 8.0 y 9.0) y temperatura (25, 30, 35 y 40 °C) tienen sobre la producción de biotensoactivo y el efecto del NaCl en la tensión superficial, densidad y capacidad de emulsión. La viscosidad se mantuvo estable entre 1.0914-1.1276 mPa.s, el biotensoactivo fue clasificado como de bajo peso molecular, el efecto de la toxicidad en la población de *Eisenia foetida* se manifestó a partir de 55000 ppm y la CL₅₀ ocurrió a 96695 ppm; por otra parte el mayor rendimiento en la producción de biotensoactivo se obtuvo a las 48 h en el tratamiento pH:7 y T:25 °C. La reducción la tensión superficial del biosurfactante sintetizado por *Azospirillum lipoferum* se llevó a cabo con concentraciones de 3-15 %NaCl (w.v⁻¹), en tanto que la capacidad de emulsión disminuyó de 95 % con 1 % de NaCl a 70 % con 15 %NaCl.

² Este artículo fue publicado en la Revista Water, Air, & Soil Pollution (2016) 227:181
DOI 10.1007/s11270-016-2871-6

3.1 Abstract

This study characterizes a biotensioactive produced by the bacterium *Azospirillum lipoferum*, which was isolated from the rhizospheres of contaminated plants with oil in the lower basin of the Tonalá river, Villa Benito Juárez, municipality of Cárdenas, Tabasco, México. The following properties were analysed: viscosity at 25 °C, elemental analysis (%mol) by scanning electron microscopy, density at different temperatures, molecular weight, acute toxicity, median lethal concentration (LC₅₀), and saponification and acidity indices. The effects of pH (6.0, 7.0, 8.0, and 9.0) and temperature (25, 30, 35, and 40 °C) on the production of the biotensioactive and the effect of NaCl on the surface tension, density, and emulsifying capacity were studied. The results showed that the viscosity remained stable between 1.0914 and 1.1276 mPa.s, so the biotensioactive was classified as low-molecular weight. Toxic effects on the population of *Eisenia foetida* began at surfactant concentrations above 55000 ppm, and the LC₅₀ was 96695 ppm. The highest yield of biotensioactive production was obtained 48 h after the beginning of the treatment at pH 8 and pH 9 and 25 °C. At 25 °C, the surface tension ranged from 44.60 mN.m⁻¹ at a 1 % concentration by weight of NaCl to 51.11 mN.m⁻¹ at 15 %NaCl, while at 60 °C, the surface tension ranged from 34.90 mN.m⁻¹ at 1 %NaCl to 40.22 mN.m⁻¹ at 15 %NaCl. The emulsifying capacity was 70 % (aqueous solution 15 %NaCl).

Keywords: *Azospirillum*, Hydrocarbons, Surface tension, Characterization, Toxicity

3.2 Introduction

Environmental pollution from spills of petroleum and its derivatives is an issue of great environmental importance due to its abundance, the difficulty involved in cleaning up and remediating spills, and petroleum's high toxicity. Oil is a nonrenewable natural resource that is currently the main source of energy around the world. According to information published by the Secretariat of Energy of Mexico in 2012, the global production of crude oil in 2011 was 86575.3 thousand barrels per day (kbpd). In 2012, Mexico produced 6978 kbpd of oil, which is the 8th highest in the world. The northeast maritime region is the richest region in hydrocarbons and contributed the largest percentage (51.38 %) of the national production in 2012. Oil production from onshore wells on the coast of the Gulf of Mexico represented 25.11 % of national production in 2012, and Tabasco, which is the state with the

highest hydrocarbon production in the country, accounted for 16.99 % of the national production (PEMEX 2013). However, considerable quantities of oil have contaminated water and soil as a result of the mismanagement of hydrocarbons during extraction, transportation, storage, and refining. When oil is spilled, most of the aliphatic compounds are volatilized, while some polycyclic aromatic hydrocarbons persist in the environment and have negative impacts on living organisms due to their toxic effects (Jiménez et al. 2010).

Sites that have been contaminated by petroleum can be remediated using chemical, physical, and biological processes. However, in situ processes using microorganisms are most commonly recommended because they are considered “friendly” because they restore the soil structure, require less energy, and result in the total destruction or immobilization of contaminants rather than their transfer from one environment to another (Bharali et al. 2011). However, even though most petroleum hydrocarbons are biodegradable, their biodegradation is limited due to their low bioavailability (Torres et al. 2015). One proposal for improving the biodegradation of oil is by using surfactants.

Surfactants are molecules that contain two sections with different chemical properties, such as a polar moiety or hydrophilic head and a nonpolar fraction or hydrophobic tail; thus, they accumulate mainly at the oil/water or air/water interface (Thies et al. 2014). These compounds may be of biological or chemical origin. The former, which are known as biosurfactants, have been obtained and purified by various laboratory processes (Kuttuvan et al. 2013; Nathália et al. 2014; Luna et al. 2015; Huang et al. 2015).

Several studies have reported successful applications of biosurfactants. These surface active agents are able to enhance the restoration of sites that have been impacted by petroleum oil spills (Rakeshkumar et al. 2013; Ruffino et al. 2013), such as mangrove ecosystems, clean tanks that contain hydrocarbon waste compounds, and have also been applied in microbial enhanced oil recovery (Mahmoud et al. 2011). In addition, biosurfactants have low toxicity and can emulsify hydrocarbons, induce phase separation, and increase moisture in sites that are impacted by oil. Due to their biological origin, biosurfactants can be applied to

optimize petrochemical and pharmaceutical processes (Cortés et al. 2013) and improve the food and cosmetics industry among other possible applications.

It is expected that the biosurfactant produced by *A. lipoferum* strain isolated from petroleum contaminated soil can be able to reduce surface tension in the presence of NaCl and at different temperatures. On the other hand, due to its biological origin, it can exhibit reduced toxicity. The aim of current research was to obtain and characterize a biosurfactant from *Azospirillum lipoferum*, a strain which is capable to produce biosurfactant (Ojeda et al. 2015). Its characterization can help us to visualize its application for environmental pollution, so we can to minimize damage to species of high ecological importance, such as those in mangrove ecosystems, when they are impacted by oil spills.

3.3 Materials and Methods

3.3.1 Microorganisms and culture conditions

Several bacterial strains were isolated from soil samples that were collected at sites in a floodplain of the Chico zapote river in the lower basin of the Tonalá river in Tabasco, México, that had been contaminated with oil spills. The rhizosphere from each plant species was inoculated in Red Congo medium to culture the nitrogen-fixing bacterial strains (NFB) of the genus *Azospirillum*. One of the isolated populations was the bacterial strain of the species *lipoferum*, which was cultured in Kim medium (Kim et al. 2000). Kim medium was composed of the following (g.L⁻¹): yeast extract (0.2), meat extract (5), glucose or dextrose (2), monobasic KH₂PO₄ (0.2), dibasic K₂H₂PO₄ (0.3), MgSO₄ (0.1), NaSO₄ (0.1), CaCl₂ (0.1), and FeSO₄ (0.1). The medium was prepared in a 250 mL glass bioreactor that was previously disinfected with 12 % benzalkonium chloride and ultraviolet radiation for 15 min. The bioreactor had a glass tube air inlet of 6-mm internal diameter connected to an air compressor of 3.5 W (3.5 psi), and it was coupled to a microbiological filter to avoid the entry of microorganisms. Each experimental unit featured an atmospheric vent through a 4-mm diameter glass tube to release pressure from the system (Hernández et al. 2011). Once the experiment was completed, the bioassay was dismantled under axenic conditions to recover the medium (Ojeda et al. 2015). The biosurfactant was extracted from the broth by successive washings with solvents as

per Almazán et al. (2000). The purified biosurfactant was then analysed through various methodologies.

3.3.2 Elemental analysis of the pure biotensioactive

The elemental analysis was performed using the energy dispersive X-ray spectroscopy method with a JEOL model JSM-6010LA scanning electron microscope (SEM). For the analysis, the samples were fixed onto a steel sample holder using double-sided carbon tape, where they were metallized and then observed under low vacuum conditions.

3.3.3 Average molecular weight determination

The average molecular weight was determined according to the ASTM D 5558-95 Standard Test. For this test, the saponification index (SI) was previously determined using the technique that was reported by Khazainah et al. (2011) for fats and oils. This index is the weight in milligrams of KOH that is needed to saponify 1 g of fat or oil. All the measurements were repeated three times to obtain the average value.

3.3.4 Effects of temperature and pH on the production of the biotensioactive in the Kim medium

A completely randomized 4 × 4 experimental design was used to characterize the effects of temperature and pH on the production of the biotensioactive by *A. lipoferum*. Factor 1 was pH and consisted of four levels (6.0, 7.0, 8.0, and 9.0); factor 2 was the temperature, and it consisted of four levels (25, 30, 35, and 40 °C). Each treatment was realized in triplicate. To control the temperatures in the bioassay, four glass trays were used (40 × 32 × 9.5 cm). Each contained 5 L of water, and the temperature was controlled using a submersible thermostat. The experimental unit (bioreactor) was a 500 mL Erlenmeyer flask connected to an air compressor of 3.5 W (3.5 psi) by means of a glass tube air inlet of 6 mm of internal diameter which was coupled to a microbiological filter to avoid the entry of microorganisms. Each experimental unit featured an atmospheric vent through a 4-mm diameter glass tube to release pressure from the system (Hernández et al. 2011). To adjust the proposed pH, 0.1 N H₂SO₄ or NaOH was added as needed. Each experimental unit contained 300 mL of the Kim medium, which was sampled every 24 h. The bioassay was maintained for 192 h. To measure the generated

biosurfactant, the samples extracted from the culture medium were washed with solvents as described by Almazán et al. (2000). The experimental data were analysed through an analysis of variance (SAS Inst, Inc., 2003), and through a comparison of the means obtained by different treatments (Tukey) (Steel et al. 1997). The treatment resulting in the largest production of biotenseoactive was determined using this approach.

3.3.5 Viscosity determination

The viscosity measurements were performed on a Cannon Fenske Ostwald type viscometer. The viscometer was first calibrated with water, and the value of the constant for water for the working conditions was determined according to Álvarez et al. (2009). All the measurements were repeated three times to obtain the average value.

3.3.6 Effect of the biotenseoactive on the weight of the earthworm *Eisenia foetida* (Acute toxicity assay)

Bioassays with worms are widely used to assess the toxicity of contaminated soils. The most commonly used worms are various species from the genus *Eisenia* that belong to the family *Lumbricidae*. These species are exogenous to México (Dorn et al. 2002; Wilson et al. 2002). The toxicology test consisted of two phases: (1) a test by contact with filter paper to determine the appropriate concentrations at which the soil test should be performed and (2) a test with artificial soil and contaminated soil samples. Ten individuals were placed in 500mL flasks with 250 g of soil, and four replicates were used for each concentration. Eight concentrations (mg.kg^{-1}) of pure biosurfactant in the range of 10000 to 80000 ppm were used. This bioassay was based on the bioassay that was described in Guide 207 of the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) for the evaluation of substances (OECD 1984) and Publication 96-327 of the Department of Ecology of Washington State (WSDE 1996), as well as on the protocol that was proposed by Cuevas et al. (2012). In this bioassay, acute toxicity was evaluated by measuring the weight gained or lost by worms during the exposure time.

3.3.7 Determining the median lethal concentration (LC₅₀)

The LC₅₀ was assessed after 14 days of exposure using the California red worm *Eisenia foetida* (Savigny). Ten individuals were placed in 500 mL flasks with 250 g of soil, and four replicates were used for each concentration. Seven concentrations (mg.kg⁻¹) of pure biosurfactant in the range of 10000 to 80000 ppm were used. The pure biosurfactant was diluted in sterile distilled water until 80 % soil moisture was achieved. The data that were recorded for each concentration included the concentration (ppm) of the test substance, the number of organisms, the number of dead organisms, and the mortality. The results were analysed using the Probit Analysis Program software from the US Environmental Protection Agency (US EPA) followed by an ANOVA.

3.3.8 Determination of the saponification index and acidity index (AI) of pure biosurfactante

The SI is the amount of potassium hydroxide in milligrams that is required to saponify 1 g of oil or fat. This method is based on the chemical reaction of fatty acids with an alkali to form an organic salt. The SI was measured according to the Mexican standard NMX-F-174-S-1981 (NMX 1981). The method that is used to measure the acidity index is based on titration with alkali-free fatty acids. Using this method, the acidity index was determined with an accuracy of ±0.25 %. The procedure that was used to determine the AI is described in the Mexican standard NMX-F-101-1987 (NMX 1987). The biosurfactant used to determine the acid and saponification indices was extracted from the culture broth and purified according to the methodology proposed by Almazán et al. (2000). All the measurements were repeated three times to obtain the average value.

3.3.9 Effects of NaCl concentration and temperature on the surface tension of the biotensioactive

The static surface tension measurements were performed on a Krüss K 10 ST digital tensiometer, which allows measurements of the surface and interfacial tension of liquids at a controlled temperature. To perform this experiment, purified biosurfactant and NaCl (0.005 % impurities and ACS analytical grade) from Aldrich were used. The biotensioactive was purified from the broth through successive washings with organic solvents as described by Almazán et al. (2000). The solutions

were prepared by dissolving the mass in the required grams of NaCl (reagent grade) in the pure biosurfactant to obtain the desired concentration. The pH of the solutions was subsequently measured. All the measurements were repeated five times to obtain the average value. The measurements were performed in a temperature range of 25 to 60 °C over a range of NaCl concentrations of 1 to 15 % ($w.v^{-1}$). The Wilhelmy plate method that was described by Álvarez et al. (2009) was used to determine the surface tension of the solutions. This method can be used to determine the static surface tension of solutions that are applicable to liquid–air interfaces (Schukin et al. 1988). After calibration with water, the sample to be measured was poured into a container, which was placed inside the heating chamber and allowed to stabilize for 15 min to homogenize the sample at the desired temperature. Measurements were performed at 6 min intervals, three readings per sample were recorded, and the average was reported.

3.3.10 Effect of NaCl concentration on the density and emulsifying capacity

The density measurements were performed with the oscillating U-tube method using an Anton Paar DSA 4500 M densitometer. The measurements were performed in a temperature range of 25 to 60 °C and at different concentrations of NaCl in water ($w.v^{-1}$) (Bolotnikov et al. 2008); all the measurements were repeated five times to obtain the average value. Emulsion capacity is used to explain the stabilising activity of culture emulsion. It was determined at 30 °C \pm 1°, and it was a modification of the method proposed by Cassidy and Hudok (2001). Next, to determine the emulsion capacity, different concentrations of aqueous NaCl solutions were prepared (1, 3, 6, 9, 12, and 15 wt); 1 mL of each solution was added to a test tube containing 2.0 mL of biosurfactant, closed system, and atmospheric pressure (14.7 lb.in⁻²), the contents were vigorously agitated for 30 s, 500 rpm in a Barnstead Thermolyne brand vortex mixer model. The pH of each solution was measured with a Hanna digital potentiometer. Then, different volumes (mL) of petroleum were added to each test tube: 0.2 (10 % emulsion capacity), 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 (100 %) of and agitated again. Petroleum was added to each tube until a petroleum fraction was observed in the upper layer of the liquid. The total volume of used oil was divided by the volume of the aqueous phase and multiplied by 100, and the result was reported as the percentage of emulsifying

capacity. All the measurements were repeated three times to obtain the average value.

3.4 Results and Discussion

A classic technique for the structural analysis of organic compounds is FT-IR. Samples of biosurfactants generated by *A. lipoferum* was structurally characterised by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The sample was analysed on a KBr tablet (Sigma Aldrich grade FT-IR). The major absorption bands were located at 3420 cm^{-1} (O–H bond typical of polysaccharides); 2931 and 2857 cm^{-1} (C–H bond, chains of aliphatic hydrocarbons); 1638 cm^{-1} (O = C–N bond); 1457 and 1403 cm^{-1} (C–N amine groups); and 1218 and 1085 cm^{-1} (alkyl radicals). The characteristic absorption bands of biosurfactant usually correspond to functional groups formed by lipopeptides. On the other hand, another desirable characteristic in a surfactant is the capacity to decrease the surface tension of liquids. The results of these tests showed that biosurfactant produced by *A. lipoferum* was capable of decreasing the surface tension of water from $72\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (values corresponding to the surface tension of HPLC-grade water) to $35\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (Ojeda et al. 2015). Nonetheless, it is necessary to determine other properties that could be helpful in the identification of potential applications.

3.4.1 Elemental analysis

To establish a profile of the overall composition of the samples, an elemental analysis of the biotenseoactive was performed by scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy microanalysis. Figure 1 shows the spectra that were obtained with their characteristic emission patterns and compositions in mass% of the constituent elements. The sample contained carbon (Ka = 0.277 keV transition, 59.40 % by mass), oxygen (Ka = 0.525 keV transition, 29.82 % by mass), nitrogen (9.75 mass%), magnesium (0.62 mass%), and chlorine (0.40 mass%).

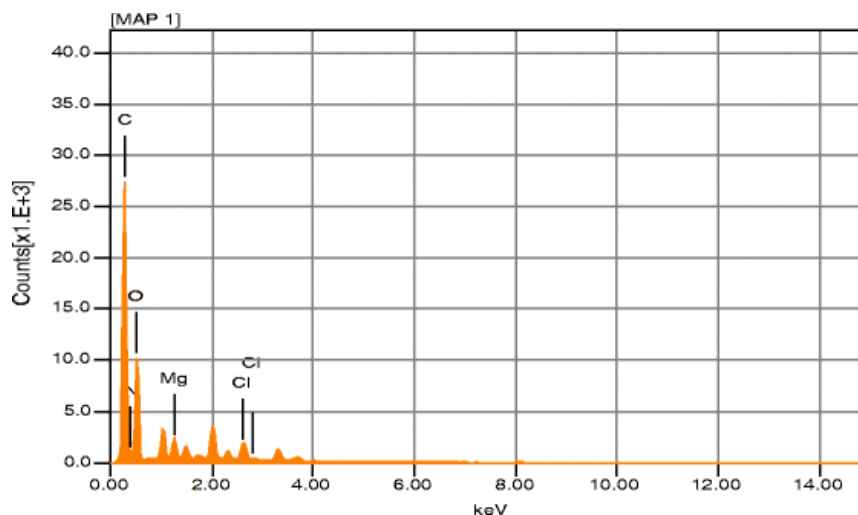


Figure 1. Elemental analysis of pure biosurfactant by scanning electron microscopy

The elemental analysis of the biotensioactive showed high proportions of nitrogen, carbon, and oxygen, which are constituents of lipopeptides. Lipopeptides feature covalent bonds, which are known as peptide bonds, between the carboxyl group and the amino group of amino acids (Madigan et al. 2012).

3.4.2 Average molecular weight determination

To determine the average molecular weight of the biosurfactant, its saponification index was determined. The SI value was 169 mg.L^{-1} ; thus, the average molecular weight of the biosurfactant was estimated as $994.50 \text{ g.gmol}^{-1}$.

The average molecular weight of the biotensioactive that was generated by *A. lipoferum* ($994.50 \text{ g.gmol}^{-1}$) allows this substance to be classified as a low-average molecular weight ($<1500 \text{ g.gmol}^{-1}$) biotensioactive. In general, low-average molecular weight biotensioactives include amino acids, peptide anions or cations, and mono-, di-, or polysaccharides in their hydrophilic group and saturated fatty acids in their hydrophobic group (Mejía 2008). Glycolipids (rhamnolipid, trehalolipids, and sophorolipids), which can reduce the surface tension of water from 72 to 35 mN.m^{-1} on average, are considered to be low-molecular weight biotensioactives. Similarly, biotensioactives that include lipopeptides are capable of reducing the surface tension of water to 26.5 mN.m^{-1} (Desai and Banat 1997). Lipopeptides are aliphatic acids that are bound to peptides that are five to ten amino acids long, have low CMCs, and increase the solubility of hydrocarbons by

incorporating them into the hydrophobic cavities of micelles. These biotensioactives are very effective at reducing the surface tension between phases but are not considered to be good emulsifiers (Raiger and López 2009; Gudiña et al. 2010; Pérez et al. 2010). The existence of potent biotensioactives such as surfactin, which reduces the water surface tension to 27.9 mN.m⁻¹ at concentrations of less than 0.005 % by weight, has been reported (Jiménez et al. 2010).

3.4.3 Effects of temperature and pH on the production of the biotensioactive

To evaluate the effect of temperature and pH on the production of biosurfactant, samples were randomized into a 4 × 4 experimental design: factor 1 (temperature; 25, 30, 35, and 40 °C) and factor 2 (pH; 6.0, 7.0, 8.0, and 9.0) (Fig. 2a–d). The analysis of variance showed no significant difference due to the interaction between treatment and time ($P > 0.05$); however, the effects due to treatment and sampling time were significant ($P < 0.05$). Through means comparison, it was determined that the treatments pH3T1 (\bar{x} 0.42877 g.L⁻¹) and pH4T1 (\bar{x} 0.4173 g.L⁻¹) resulted in the largest biosurfactant production at 25 °C and 48 h after inoculation of the *A. lipoferum* strain. Moreover, at 48 h after inoculation in Kim medium, the microbial population of *A. lipoferum* undergoing treatment pH3T1 was 75 × 10⁴ CFU.mL⁻¹ and 82 × 10⁴ CFU.mL⁻¹ for those undergoing treatment pH4T1. To determine the amount of produced biosurfactant, the culture broth was washed with solvents until purified liquid biosurfactant was obtained following Almazán et al. (2000); the produced mass was determined by measuring the density of the biosurfactant.

Similar studies were reported to the production of the biotensioactive from *Bacillus licheniformis* (Araji et al. 2007) and found that the lipopeptide-based biotensioactive reduced the surface tension of water to 28 mN.m⁻¹ and that the maximum biotensioactive production occurred at pH 7.2 and a temperature of 30 °C. Environmental factors such as temperature and pH affect the production of biotensioactive through their effects on cell growth or activity.

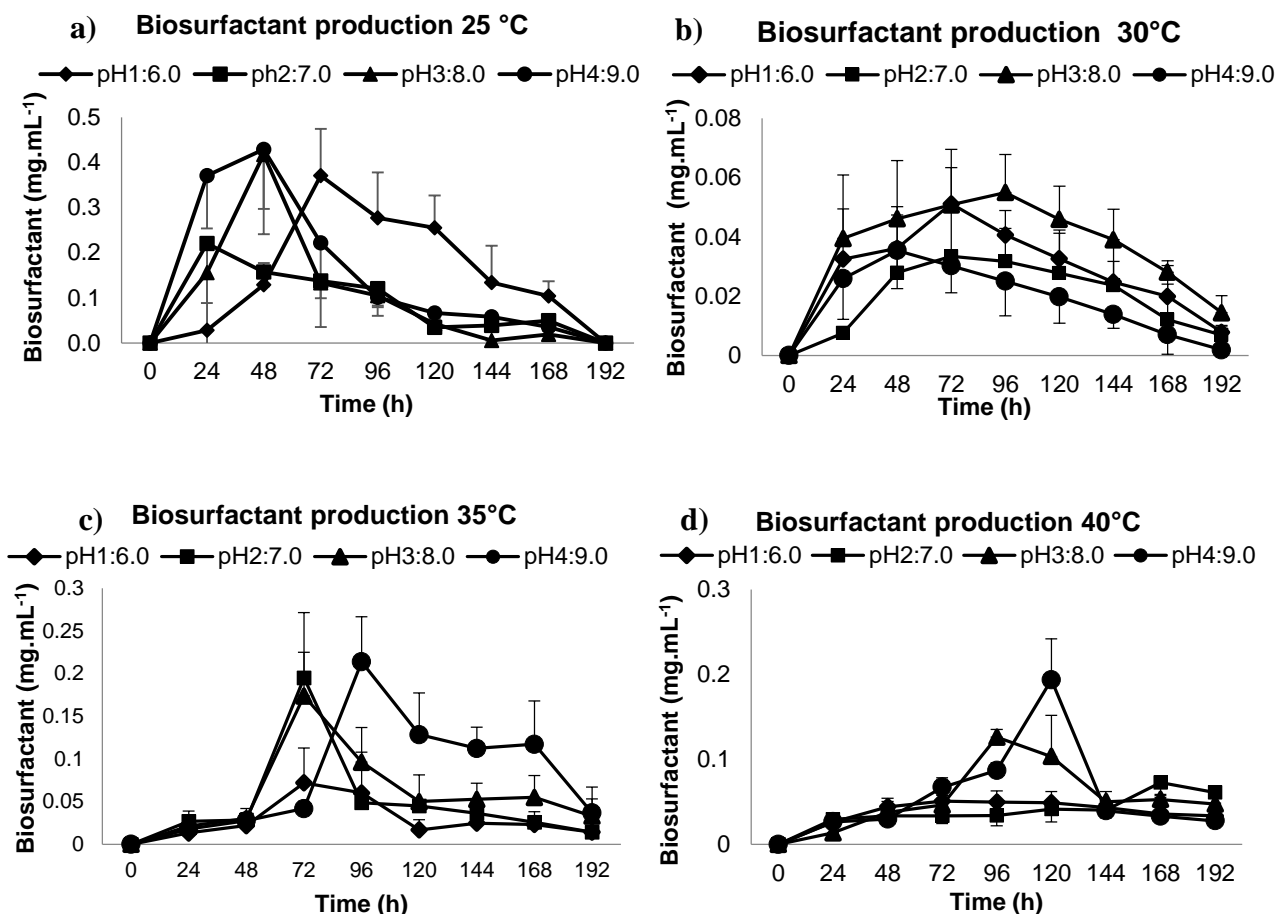


Figure 2 Effects of pH and temperature on biosurfactant production by *A. lipoferum*. Production of biosurfactant a) 25 °C, b) 30 °C, c) 35 °C, and d) 40 °C. All values are average of triplicate measurements and the bars represent standard deviation

As reported by Gobbert et al. (1984) and Guerra et al. (1984), the pH of the media can play an important role in the production of the biotensioactive. Both studies showed that a pH between 6 and 6.5 maximizes the production of biotensioactive. In contrast, Powalla et al. (1984) showed that the biotensioactive production by *Nocardia corybacteroides* decreased at pHs between 6.5 and 8.0; however, the surface tension and CMC were stable. Shin et al. (2004) reported that the optimum pH for solubilizing hydrocarbon may not be optimal for microbial growth. Moreover, Abu et al. (1991) performed an experiment in which the temperature varied between 20 and 40 °C and found that treatments at these temperatures did not have an appreciable effect on biotensioactive production or its properties, such as the surface and interfacial tension and the efficiency of emulsification. An increase in temperature results in a decrease in the density of the medium, more rapid transport

of the substrate that is solubilized by the micelles and the exchange of biotensioactive molecules (micelle with the cell) to transfer the substrate to the bacterial cell.

3.4.4 Viscosity

The dependence of viscosity on the concentration of biotensioactive was analysed, and the critical micelle concentration (CMC) was determined to be 0.0969 wt%, which is similar to the value that was calculated from the surface tension measurements (ST). The viscosity at 25 °C was stable over a range of 1.0914 and 1.1276 mPa.s. At 30 °C, the viscosity remained stable from 0.987 to 1.0111 mPa.s; at 35 °C, the viscosity was stable between 0.8854 and 0.9122 mPa.s (Fig. 3).

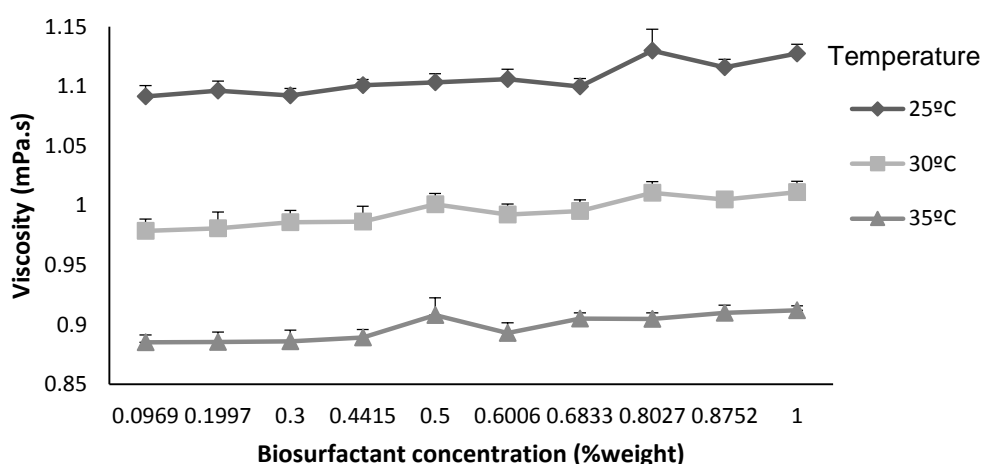


Figure 3, Effect of biosurfactant concentration produced by *A. lipoferum* and temperature on viscosity. All values are average of triplicate measurements and the bars represent standard deviation

The viscosity of the biotensioactive that was produced by *A. lipoferum* rises while temperature decrease. At 25 °C, the viscosity of the biotensioactive was slightly higher than that of water (1 cp), but at 30 °C, its viscosity was approximately 1 cp, and increasing the temperature decreased the viscosity. The similar viscosity of this biotensioactive to that of water makes it particularly attractive for applications in the oil industry because it could be used to reduce the viscosity of heavy crude oil for easy transport. This biotensioactive could reduce the viscosity of heavy crude oil (mass densities between 934 and 1000 kg.m⁻³ and API gravities between 22.3 and 10.1 API degrees), which would reduce the costs that are associated with reducing

viscosity by heating or dilution with lighter petroleum or diesel. Adding this biotensioactive to heavy hydrocarbons could provide new knowledge about their non-Newtonian behavior that could be used to develop solutions to various industrial problems that occur during their transport (Garcell 1998; Alfonso and Drubey 2008).

3.4.5 Acute toxicity

To evaluate the potential toxicity of the biosurfactant, its impact on the California red worm *E. foetida* (Dorn et al. 2002; Wilson et al. 2002) was analysed. The results may be useful to regulate the use of biosurfactants. The exposure of earthworms to the biosurfactant at concentrations of 10000 to 60000 ppm caused an increase in the weight of the population; however, there was a general decrease in the weight of the earthworms with increasing concentrations of the biotensioactive starting at 70000 ppm (Fig. 4). The Probit analysis was performed to assess the probability of weight loss among the earthworms according to the concentration of the biotensioactive (x^2 ; $\alpha > 0.05$); the results showed that there was no likelihood of weight loss in the range of biotensioactive concentrations from 10000 to 50000 ppm.

Figure 5 shows the estimated probability of weight loss of the worm *E. foetida* with respect to the biosurfactant concentration. The probability of the loss of weight of the earthworms was greater at higher biotensioactive concentrations. Figure 5 shows that there was a 10 % probability that the population would begin to lose weight at biotensioactive concentrations between 55000 and 60000 ppm, while the probability increased to 30 % at a concentration of 70000 ppm. The probability that the worm population would lose weight at a biotensioactive concentration of 80000 ppm was 60 %.

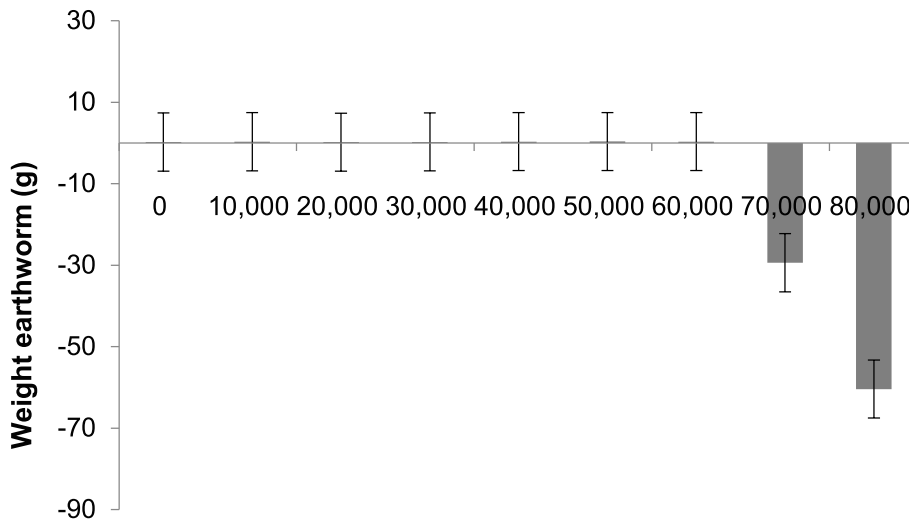


Figure 4. Weight of *E. foetida* at a specific biosurfactant concentration produced by *A. lipoferum*. All values are average of quadruplicate measurements and bars represent standard deviation

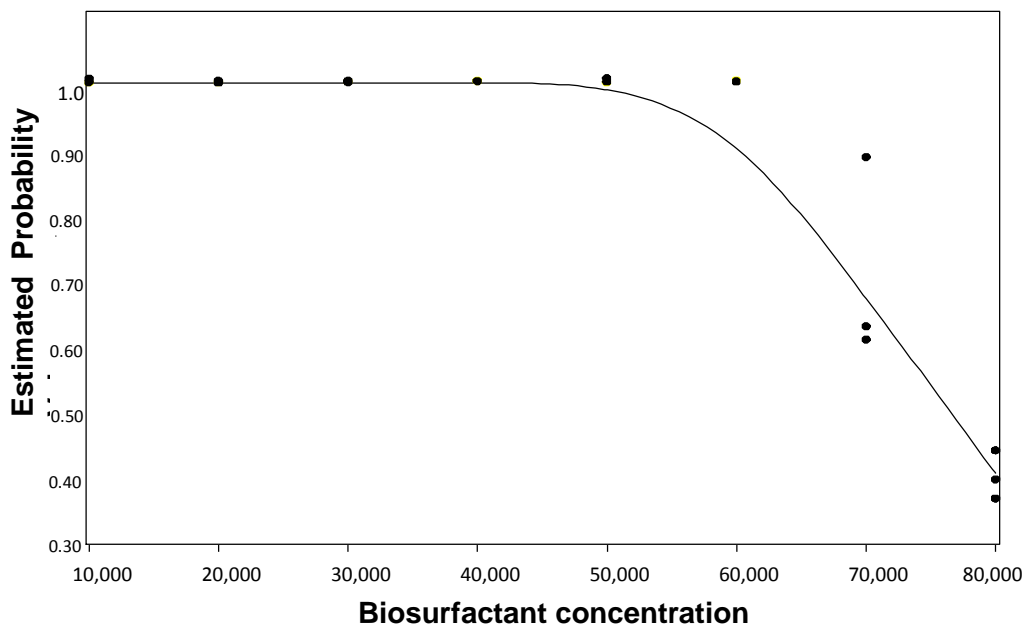


Figure 5. Effect of biosurfactant concentration produced by *A. lipoferum* in estimate probability of loss weight of *E. foetida*

The tests that were conducted during this investigation showed that the biotensioactive that was obtained from *A. lipoferum* has low toxicity. Biotensioactive concentrations above 90000 ppm begin to have toxic effects on the soil earthworm *E. foetida*. Several studies have reported toxicity of the lipopeptides that are produced by the bacterial strain *Bacillus subtilis* that have activity on cell membrane and can synthesize biotensioactive, such as surfactin, mycosubtilin, and

bacilomicina. Each of these lipopeptides has isoforms whose structures differ in length, fatty acid binding, and peptide group substitution; the production of these isoforms depends on the carbon source and the other available nutrients (Desai and Banat 1997). Another lipopeptide, iturin, has remarkable surface activity and inhibitory activity on the growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. This biotensioactive has antifungal and hemolytic activity; it forms transport pores in the membrane lipid layer and thus deforms the membrane structure by modifying the vesicles that consist of phospholipids. However, the different strains can respond differently to the various types of biotensioactive depending on the specific interactions between the biotensioactive molecules and the cell membrane (Aranda et al. 2005). This characteristic of lipopeptides allows for their use as biopesticides to protect agricultural crops (Desai and Banat 1997), because fungal diseases cause major economic losses. Aranda et al. (2005) reported a lipodecapeptide that is known as fengicina, which is produced by *B. subtilis* and has biological activity against filamentous fungi. In addition, Torres et al. (2003) found that the toxicity of a surfactant is determined by its tendency for adsorption and the ease of its penetration into the cell membrane.

3.4.6 Median lethal concentration

The LC₅₀ was calculated at a confidence level of 95 %. The estimate of the LC₅₀ provided data for the probability function ($r^2 = 0.99$) for a specific exposure level. The LC₅₀ value of the biotensioactive that was produced by *A. lipoferum* was 90695 ppm.

The biotensioactive may have antimicrobial activity, and it is likely that the microorganisms will produce molecules, such as antagonistic agents, to gain advantages over the substrate in the microbial communities; this process is known as amensalism (Desai and Banat 1997). In addition to having surface activity, the obtained biotensioactive may have pharmacological applications, such as inhibiting fibrin formation, erythrocyte lysis, and antithrombotic, hypocholesterolemic and anti-viral properties. Lipopeptides may be toxic when they can solubilize the lipid biofilm of the cell membrane (Castillo 2004).

3.4.7 Acidity index and saponification index

The saponification index of the biosurfactant that was obtained from the nitrogen-fixing bacteria *A. lipoferum* was 169 mg.L⁻¹, and the acidity index was 0.08041 (expressed in milligrams of potassium hydroxide). The value of the acidity index of the biotensioactive (less than 1 mg KOH) indicates that few natural free fatty acids are present; i.e., the sum of the simple fatty acids is the result of hydrolysis or the lipolytic decomposition of fatty acid triglycerides. This may be because a newly obtained biotensioactive could contain small quantities of free fatty acids; however, the concentration of free fatty acids can increase if the biotensioactive is not protected from air or light. The acidity index of oil can indicate whether it contains fatty acids, which are considered to be impurities in fat. On the other hand, the amount of KOH that is used in the saponification to produce alkali metal salts of fatty acids depends on the nature and proportion of the existing fatty acids that are present in the material that is being analysed. The saponification number is an indication of the molecular weight; the lower the molecular weight of the fatty acids that form the fats is, the greater the amount of KOH that is necessary to cause saponification (Alton 1984). The determination of the saponification and acid numbers was conducted in the purified biosurfactant.

3.4.8 Effects of NaCl concentration and temperature on the surface tension of the biosurfactant

Figure 6 shows the surface tension (ST) of the pure biosurfactant at temperatures of 25 to 60 °C and NaCl concentrations of 1 to 15 % (w.v⁻¹). At 25 °C, the surface tension ranged from 44.60 mN.m⁻¹ at a 1 % concentration by weight of NaCl to 51.11 mN.m⁻¹ at 15 %NaCl, while at 60 °C, the surface tension ranged from 34.90 mN.m⁻¹ at 1 % NaCl to 40.22 mN.m⁻¹ at 15 %NaCl. The correlations (slope) between temperature and surface tension were -0.385 at a NaCl concentration of 9 % and -0.322 at a concentration of 12 %. For a given NaCl concentration, the surface tension decreased with increasing temperature, while it increased with an increase in the NaCl concentration at a specific temperature. That is, at 25 and 30 °C, the ST increases linearly in the concentration of 0–15 %NaCl with respect to the addition of the solute, however, from 40 to 60 °C, concentrations of 0, 1, and 3 %NaCl has a negative correlation with respect to the concentrations of NaCl 6, 9, 12, and 15 %, it means that the higher temperature, the ST of the diluted solution

decreases with respect to the concentration of salt, while the ST increases in more concentrated solutions.

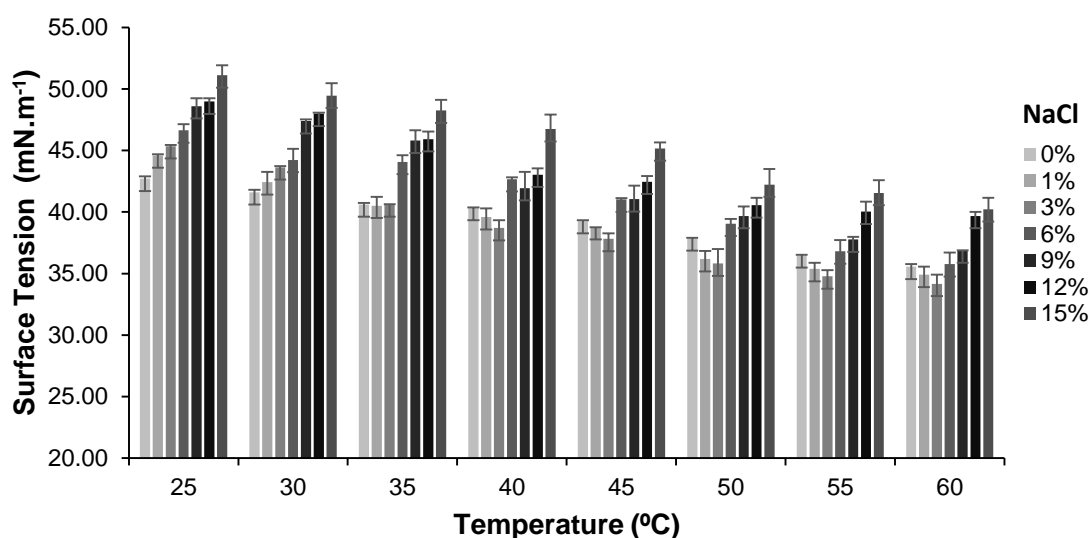


Figure 6. Effect of NaCl concentration on surface tension of a biosurfactant produced by *A. lipoferum* at different temperatures. $pH_{0\%} = 7.0$, $pH_{1\%} = 7.0$, $pH_{3\%} = 7.0$, $pH_{6\%} = 6.98$, $pH_{9\%} = 6.95$, $pH_{12\%} = 6.92$, $pH_{15\%} = 6.90$. All values are average of five measurements and the bars represent standard deviation

In this study, the ST depends on the temperature and decreases as this increases, it happens because in the case of a liquid in equilibrium with its vapor, the differences through the phases decreases as it approaches to the critical temperature, at this time the interface disappears and there is a single phase, so it can be expected the ST of pure biosurfactant decreases as the temperature increases toward its critical temperature. Moreover, in the changes in the ST, the temperature (25–60 °C) and composition (1–15 wt%NaCl) were not independent. A change in the temperature and the composition is associated with a change in the ST. However, the temperature can increase or decrease the ST, it means that the ST varies depending on the positive or negative NaCl adsorption in the interface (Castellan 2000). When the number of moles of NaCl in the interface is higher than in the bulk of biosurfactant, then the ST increases with the NaCl concentration, because the NaCl is desorbed by the interface and the NaCl concentration is smaller than in the bulk biosurfactant.

The values of the surface tension of the biosurfactant at various concentrations of NaCl and at different temperatures are consistent with those that have been reported for other biosurfactants. The effect of the biosurfactant on the surface properties was studied at different NaCl concentrations to analyze the stability of the biosurfactant. The results show that the increase in the surface tension with increasing NaCl concentration may be due to the presence of the ionic NaCl bond. These results are consistent with those that have been reported in the literature for the behavior of biotensioactive that were obtained from other strains (Changjun et al. 2014; Abouseoud et al. 2008).

The changes of surface tension with temperature were small. Thus, the surface tension was considered to be stable, which is consistent with the stability of the surface tension of the biosurfactant that is produced by *B. subtilis*, which has a polar lipid that is associated with the surfactant action of lipopeptides (Bento et al. 2005; Satpute et al. 2010; Youssef et al. 2013; Ojeda et al. 2015). In contrast, Renata et al. (2016) found that addition of salts to the oil and grease emulsions reduced significantly the effect of surface tension of the surfactant Tween 80. Ojeda et al. (2015) reported surface tension measurements of aqueous solutions of biotensioactive derived from the *Azospirillum* strain.

The surface tension decreases rapidly as the biosurfactant concentration increases. A minimum surface tension value of 35 mN.m^{-1} has been reported for that strain, and its C.M.C. value has been estimated to be 0.18 % by weight. The surface tension and C.M.C. values obtained for the biotensioactive derived from the *Azospirillum* strain are consistent with the values reported by other authors (Pornsunthorntawee et al. 2008; Nitschke and Pastore 2006). Generally, the ability to reduce ST to below 35 mN.m^{-1} is one of the criteria for selecting biosurfactant-producing microorganisms (Chandankere et al. 2014).

3.4.9 Effect of NaCl concentration on the density and emulsifying capacity

Figure 7 shows the variation of the density of the pure biosurfactant mixtures at different NaCl concentrations (w.v⁻¹) at temperatures from 25 to 60 °C. The density at 25 °C was 1.003 g.cm^{-3} at a 1 % NaCl concentration and 1.122 g.cm^{-3} at a 15 % concentration. The density variation, at a given temperature (25 °C), was from

0.09 g.cm⁻³ at 9 % NaCl concentration to 0.113 g.cm⁻³ at 15 % concentration, respect to the pure biosurfactant. On the other hand, the emulsion capacity decreased with increasing NaCl concentration; at a 1 %NaCl concentration, the emulsifying capacity was 90 %, and at 15 %NaCl concentration, the emulsifying capacity was 70 % (Fig. 8).

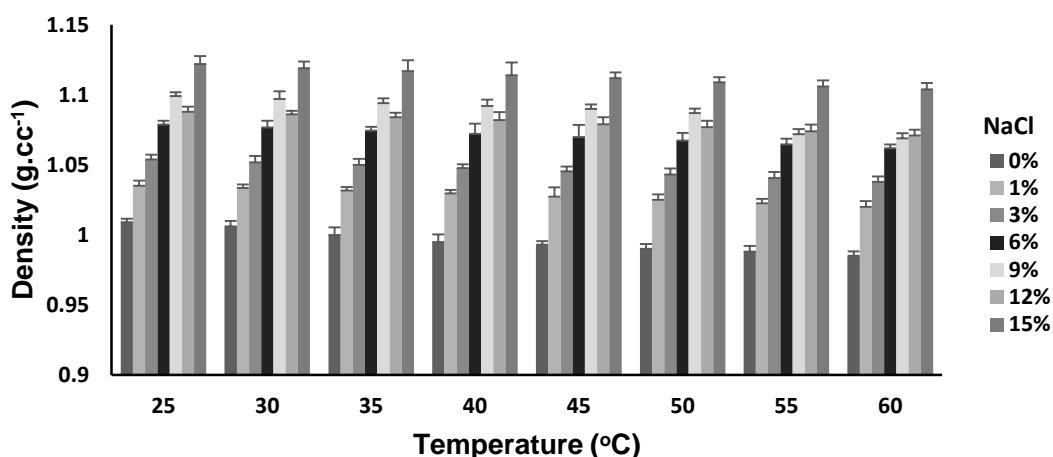


Figure 7. Density of a biosurfactant produced by *A. lipoferum* as a function of NaCl concentration, measured at different temperatures. The pH_{1%} = 7.0, pH_{3%} = 7.0, pH_{6%} = 6.98, pH_{9%} = 6.95, pH_{12%} = 6.92, pH_{15%} = 6.90. All values are average of five measurements and the bars represent standard deviation

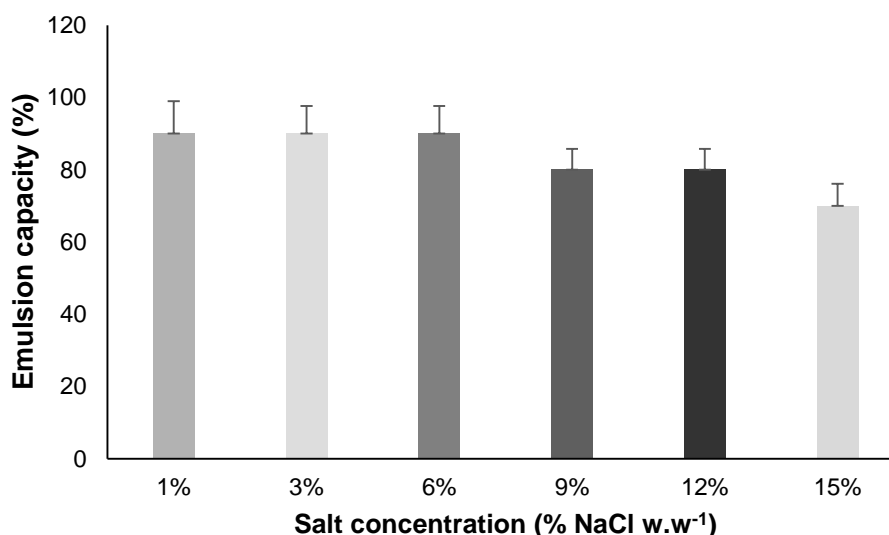


Figure 8. Effect of NaCl concentration on emulsion capacity of biosurfactant produced by *A. lipoferum*, 28 ± 1 °C. The pH_{1%} = 7.0, pH_{3%} = 7.0, pH_{6%} = 6.98, pH_{9%} = 6.95, pH_{12%} = 6.92, pH_{15%} = 6.90. All values are average of triplicate measurements and the bars represent standard deviation

Varying the NaCl concentration in the range of 1–15 % w.v⁻¹ has a very small impact on the density. The inadequate of emulsifying of capacity of some hydrocarbons may be to the inability of the biotensioactive to stabilise the microscopic droplets. On the other hand, the data that were obtained on emulsifying capacity of the biotensioactive in systems with NaCl (%w.v⁻¹) could be important in the application of this biotensioactive in bioremediation processes or to emulsify petroleum in brackish water (9–12 %NaCl). As shown in Fig. 8, with a 15 wt% concentration of NaCl, a value of capacity emulsifying of 70 % was found.

Researchers such as Domínguez-Domínguez et al. (2011) have reported that large mangrove tracts in the southern Gulf of Mexico have been contaminated with crude oil. They also investigated how to minimize the impact of petroleum from coastal spills in mangrove seedlings because the oil completely covers them and kills them by suffocation and preventing the normal salt exclusion process. Based on its emulsifying performance with respect to the NaCl concentration, this biosurfactant may be used to emulsify the oil and minimize the mortality of ecologically important seedlings, such as in mangrove forests. It is important to investigate the effect of different salinities on the surface activity of the biosurfactant for its use in the oil industry. The biosurfactant that was synthesized by *A. lipoferum* offers advantages over chemical surfactants because most chemical surfactants are inactivated by 2 to 3 %NaCl (w.v⁻¹) and are environmentally toxic.

The surfactant that was obtained in this study has characteristics that make it highly applicable for bioremediation to minimize damage to species of high ecological importance, such as those in mangrove ecosystems, when they are impacted by oil spills, which is due to its negligible toxicity to the environment, stimulating the catabolism of hydrocarbons through a cometabolic process.

An important advantage of the biosurfactant is that unlike chemical surfactants that are synthesized from nonrenewable sources, such as petroleum, they can be synthesized from renewable sources, such as waste, oils, and fats from animal or vegetable sources.

Acknowledgments

This study is part of a doctoral project entitled “Restoration of oil contaminated soils, with mangrove swamp vegetation in tabasco, México o”. The characterization of biosurfactante produced by *Azospirillum lipoferum* was performed with support Engr. Claudio Ulises Mena Sanchez and Engr. Jesus Octavio Macias Mendoza of the Biotechnology Laboratory of the Autonomous Juarez University of Tabasco (UJAT). Specially, thanks to from Master Ana Laura Severo Domínguez, Head of the Chemistry Engineering Laboratory of UJAT, for the support to measure surface tension and density with NaCl.

Conflict of Interests. The authors declare that they have no conflict of interests.

3.5 References

- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Maachi, R., Nabi, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of a biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Sci. Direct*. doi:10.1016/j.desal.2007.01.198.
- Abu, A., Banat, I., Haditirto, S., Salem, A., & Kadri, M. (1991). Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization and evaluation. *Acta Biotechnol*, 11, 315–324.
- Alfonso, H., & Drubey, Y. (2008). Rheological properties of heavy oil emulsions in water. *Chilean Engin. Magazine*, 16, 244–249.
- Alton, E. (1984). *Industrial oils and fat* (pp. 36–105). Madrid: Editorial Reverte, S.A.
- Álvarez, J., Fernández, V., Macías, E., Pignon, Y., Rharbi, R., Gamez, J. (2009). Phase behavior studies of the pluronic P103/water system in the dilute and semidilute regimes. *J. of colloids and interface Sci*. doi: 10.1016/j.jcis.2009.01.068.
- Almazán, V., González, J., Pérez, J., Dieguez, F., Villaverde, M., Pérez, G., Joseph, N., & Gan, R. (2000). Purification and identification of the chemical nature of

tensoactive produced by *Pseudomonas aeruginosa* Cepa Ido-330. *Revista Biología*, 14, 172–177.

Araji, L., Zalia, R., Rahman, A., & Basri, M. (2007). Microbial Surfactant. Asia Pacific Journal of Molecular. *Biol. and Biotechnol*, 15, 99–105.

Aranda, F., Teruel, J., & Ortiz, A. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochemical et Biophysical Act*, 17(13), 51–56.

Bento, F., De Oliveira Camargo, F., Okeke, B., Frankernberger W. (2005). Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiol. Res.* doi:10.1016/j.micres.2004.08.005.

Bharali, P., Das, S., Konwar, B., Thakur, A. (2011). Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*. *Int. Biodeterioration & biodegradation*. doi: 10.1016/j.ibiod.2011.04.001.

Bolotnikov, A., Abdul-jabbar, N., Babolola, O., Camarda, G., Cui, Y. (2008). Effects of the inclusions on the performance of Cd/ZnTe radiation detectors. doi: 10.1109/TNS.2008.2003355.

Cassidy, D., & Hudok, A. (2001). Microorganism selection and biosurfactants production in a continuously and periodically operated bioslurry reactor. *J. of Hazardous Materials*, 84, 253–264.

Castellan, G. (2000). *Physicalchemistry*. Pearson Addison Wesley Longman (p. 1080). Massachusetts: E.U.A.

Castillo, G. (2004). Toxicological testing and assessment methods for water quality. Standardization, intercalibration results and applications. Mexico: International research center for development. *Mexican Institute of Water Technol*, 32, 349-360.

- Chandankere, R., Yao, J., Cai, M., Masakorala, K., Jain, A., & Choi, M. (2014). Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. *Fuel*, 122, 140–148.
- Changjun, Z., Meng, W., Xing, X., Guihong, L., Tingting, G., Xueling, Y., G. (2014). Characterization and optimization of biosurfactants produced by *Acinetobacter baylyi* ZJ2 isolated from crude oil-contaminated soil sample toward microbial enhanced oil recovery applications. *Biochem. Engin. J.* doi:10.1016/j.bej.2014.05.007.
- Cortés, A., Hernández, H., & Jaramillo, M. (2013). Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: new trends and possible therapeutic alternatives. *Microbiol. Research*, 160, 22–32.
- Cuevas, M., Ferrera, L., & Rodríguez, V. (2012). *Response of Eisenia Andrei a TPH's and pyrene in acute tests* (p. 78). Puebla: Congress Ecotoxicology and Environmental Chemistry.
- Desai, J., & Banat, I. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *American Society for Microbiology*, 61, 47–64.
- Domínguez, M., Zavala, M., and Martínez, P. (2011). Mangrove forest management in Tabasco [www.colpos.mx/tabasco/vinculacion/LIBRO_MANGLARES_DE_TABASCO.pdf]. Graduate School. Mexico.
- Dorn, P., Vipond, T., Salanitro, J., & Wisniewski, H. (2002). Assessment of the acute toxicity of crude oils in soil using earthworms, microtox, and plants. *Chemosphere*, 37, 845–860.
- Garcell, L. (1998). Interfacial and rheological characteristics of maghemite aqueous suspensions. *J. of Colloid and Interface Sci*, 205, 470–475.
- Gobbert, U., Lang, S., & Wagner, F. (1984). Sophorose lipids formation by resting cells of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnol. Letters*, 6, 225–230.

- Gudiña, E., Teixeira, J., Rodríguez, L. (2010). Isolation and functional characterization of biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.11.008.
- Guerra, L., Kappeli, O., & Fiechter, A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. and Environ. Microbiol*, 48, 301–305.
- Hernández, M., Ojeda, M., Martínez, J., & Córdova, Y. (2011). Optimal parameters for the development of the hydrocarbonoclastic microorganism *Proteus sp.* *Soil Sci. & Plant Nut*, 11, 29–43.
- Huang, X., Shen, C., Liu, J., Lu, L. (2015). Improved volatile Fatty acid production during waste activated Sludge anaerobic fermentation by different biosurfactants. *Chemical Eng. J.* doi: 10.1016/j.cej.2014.11.078.
- Jiménez, D., Medina, S., & Gracida, J. (2010). Properties, applications, and production of biosurfactants. *Rev Int Contam Ambiental*, 26, 65–84.
- Khazainah, K., Mushaireen, M., Kamauruzaman, J., Rahman, A., Zetty, M., & Zaini, M. (2011). Lowering of palm oil cloud point by enzymatic acidolysis. *World Appl Sci J*, 12, 28–31.
- Kim, H., Jong, L., Ok, L., and Dong, L. (2000). Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia sp.* L. 417. *Biotechnol. Appl. Biochem.* doi:10.1042/BA19990111.
- Kuttuvan, S., Rajeev, S., Himani, J., Kunduru, R., Sanjit, K., Rachapudi, N., & Ashok, P. (2013). Studies on biosurfactants from *Pseudozyma sp.* NII 08165 and their potential application as laundry detergent additives. *Biochemical Eng. J*, 78, 85–92.

- Luna, M., Rufino, D., Sarubbo, A., & Campos, G. (2015). Characterization, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloid Surface B*, 102, 202–209.
- Madigan, M., Martinko, M., Stahl, A., & Clark, D. (2012). *Brock Biology of microorganisms* (13th ed.). España: Pearson Higher education.
- Mahmoud, S., Mohebbi 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*. doi:[10.1016/j.colsurfb.2010.10.005](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.10.005).
- Mejía, M. (2008). *Evaluation of effect C-N reaction and level of dissolved oxygen on production of biosurfactants by Bacillus subtilis*. México: IPN.
- Nathália, M., Rocha, S., Rufino, R., & Luna, J. (2014). Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactants production using low-cost substrates. *Biocatalysts and Agricultural Biotechnol*, 3, 132–139.
- Nitschke, M., & Pastore, G. (2006). Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, 97, 336–341.
- NMX-F-101-1987. Foods, vegetables or animal oils and fats. Determination. Normas Mexicanas. Dirección general de normas.
- NMX-F-174-S-1981. Foods for humans. Determination of the saponification index in oils and vegetal or animal fats. Normas Mexicanas. Dirección general de normas.
- Ojeda, M., Domínguez, M., Hernández, M., Zavala, J. (2015). Biosurfactant production by strains of *Azospirillum* isolated from petroleum-contaminated sites. *Water, air & soil pollut.* doi: 10.1007/s11270-015-2659-0.

- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). (1984). *Earthworm, acute toxicity test guideline for testing of chemicals No, 207*. Paris: OCDE.
- PEMEX. (2013). Annual Statistical Report 2013. Petróleos Mexicanos. [http://www.pemex.com/acerca/informes_publicaciones/Documents/anuario_estadistico_2013/anuario-estadistico_2013_131014.pdf]. Accessed 17 July 2014.
- Pérez, J., Anaya, R., Chang, C., Membrillo, I., & Calva, G. (2010). Production of biosurfactants by free-living bacteria grown in nitrogen-fixing hydrocarbons. *CENIC*, 41, 1–10.
- Pornsunthorntawee, O., Arttaweeporn, N., Paisanjit, S., Somboonthanate, P., Abe, M., Rujiravanit, R., & Chavadej, S. (2008). Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. *Biochem. Engin. J*, 42, 172–179.
- Powalla, M., Lang, S., & Wray, V. (1984). Penta- and disaccharide lipid formation by *Nocardia corynebacteroides* grown on *n*-alkanes. *Appl. Microbiology and Biotechnol*, 31, 473–479.
- Raiger, L., & López, I. (2009). Surfactants and gas industry. *Rev Quimica Viva*, 3, 146–161.
- Rakeshkumar, M., Kalpana, M., Nidhi, J., Avinash, M., & Bhavanath, J. (2013). Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in bioremediation. *Int. J. Biol. Macromolecules*, 62, 52–58.
- Renata, S., Paulo, S., Ariana, M., Ruphuy, G., Costa, M., Rui, A., Vítor, J., Vilar, W. (2016). Insights on the removal of mineral oil from oil-in-water emulsions using cork by-products: Effect of salt and surfactants content. *Chemical Eng. J*. doi: 10.1016/j.cej.2015.10.007.

- Ruffino, M., Luna, H., Marinho, B., Farias, R., & Ferreira, A. (2013). Removal of petroleum derivate adsorbed to soil by biosurfactant rufisan produced by *Candida lipolytica*. *J. Petrol. Sci. Eng*, *109*, 117–122.
- SAS, institute Inc. (2003). Logistic Regression Examples Using the SAS System, Version 9.1, First Edition, (p. 163) Cary, NC, Statistical Analysis System.
- Satpute, S., Banat, I., Dhakephalkar, P., Banpurkar, A., Chopade, B. (2010). Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnol.* doi:10.1016/j.biotechadv.2010.02.006.
- Schukin, E. D., Pertsov, A. B., & Améline, E. A. (1988). *Química Coloidal*. Moscú: Ed. Mir.
- Shin, K., Kim, K., & Seagren, E. (2004). Combined effects of pH and biosurfactant addition on solubilization and biodegradation of phenanthrene. *Appl. Microbiology and Biotechnol*, *65*, 336–343.
- Steel, R. G. D., Torrie, J. H., & Dickey, D. A. (1997). *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. 3rd Edition, McGraw Hill* (p. 667). New York: Inc. Book Co.
- Thies, S., Schübel, B., Kovacic, F., Rosenau, F., Hausmann, R., & Jaeger, K. (2014). Heterologous production of the lipopeptide biosurfactant *serrawettin* W1 in *Escherichia coli*. *J. of Biotechnol*, *181*, 27–30.
- Torres, L., Iturbe, R., & Orantes, L. (2003). Three surfactants CMC and diesel removal efficiencies from highly contaminated sandy soils. *Eviron Geosci*, *10*, 28–36.
- Torres, N., Marques, S., Fonseca, C., Castelo, F. (2015). Direct xylan conversion into glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma*

Antarctica PYCC 5048^T. *Enzyme and Microbial Technology*. doi:10.1016/j.enzmictec.2014.10.008.

Washington State Department of Ecology (WSDE). 1996. Publication No, 96-327. Earthworm Bioassay protocol for soil toxicity screening.

Wilson, J., Hathcer, J., & Goudey, J. (2002). Ecotoxicological end points for contaminated site remediation. *Annali dell. Istituto Superiore de Sanità*, 38, 143–147.

Youssef, N., Simpson, D., McInerney, M., Duncan, K. (2013). *In-situ* lipopeptide biosurfactant production by *Bacillus strains* correlates with improved oil recovery in tow oil wells approaching their economic limit of production. *Biodegradation*. doi:10.1016/j.ibiod.2012.05.01014.

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS DE *Rhizophora mangle* EN SUELOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO EMULSIFICADO

Marcia E. Ojeda-Morales¹, Marivel Domínguez-Domínguez^{1✉}, José G. Herrera-Haro², Miguel A. Hernández-Rivera³, Randy H. Adams Schroeder⁴

¹ Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, Periférico Carlos A. Molina km 3.5, Cárdenas, Tabasco, México, C.P. 86500.

² Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, Montecillos, Texcoco, México.

³ Laboratorio de Biotecnología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Cunduacán-Jalpa Km. 1 Colonia La Esmeralda, Cunduacán, Tabasco, México, C.P. 86400.

⁴ Laboratorio de Biorremediación, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa- Cárdenas Km. 0.5. Villahermosa, Tabasco, México. C.P. 86150

Palabras Clave: *Rhizophora mangle*, petróleo emulsificado, tensioactivo bacteriano

4.1 Resumen

Los bosques de manglar alrededor del mundo son ecosistemas complejos con diversas funciones ecológicas, además de un alto valor económico que generan beneficios para las comunidades. Son considerados ecosistemas sujetos a contaminación por derrames petroleros. En México se ha deforestado a una tasa anual del 1 al 5 %. Por ello, es importante desarrollar tecnologías para disminuir el impacto adverso que los derrames de petróleo tienen en el desarrollo de las plántulas. En los últimos años se han realizado estudios sobre el efecto de estos derrames en el desarrollo de plántulas de diversas especies de mangle, sin embargo, no existe una propuesta que evalúe el efecto del petróleo emulsificado en variables dasométricas de plántulas de mangle rojo (*Rhizophora mangle*), por lo que para evaluarlo se colectaron suelos de manglar y propágulos en la localidad de Paraíso, Tabasco, México. Los propágulos fueron sembrados en bolsas de polietileno y a los tres meses de edad se les vertieron diversas concentraciones de petróleo emulsificado con un tensioactivo bacteriano con base en su capacidad de

emulsión. Las plántulas fueron evaluadas cada 30 días durante 11 meses y se midieron: longitud y diámetro del tallo, longitud de raíces, área foliar, biomasa total húmeda y seca. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza según un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos 2 x 6 y medidas repetidas en tiempo, usando el PROC MIXED de SAS y comparaciones de medias usando la prueba de Tukey. Los resultados mostraron que los tratamientos con petróleo emulsificado tensioactivo bacteriano permitieron una mayor sobrevivencia, crecimiento y biomasa de las plántulas de *R. mangle* en comparación con los tratamientos con petróleo emulsificado con tensioactivo comercial con base en aceite de pino.

4.2 Introducción

Los humedales son ecosistemas de los más importantes en México, dentro de los cuales se distinguen los manglares por su riqueza natural y los servicios ambientales que proveen, además poseen mecanismos que les permiten desempeñar algunas de las funciones más importantes como estabilizar y proteger las líneas costeras y desalar el agua. Los ecosistemas de manglar proporcionan áreas de cría y alimentación de numerosas especies de peces y crustáceos, y hábitat para cangrejos y moluscos. Por otra parte, el manglar tiene un valor económico derivado de su papel como criadero de especies para la pesca, así como, para la extracción de taninos de la corteza del mangle y la extracción de madera para diversos usos artesanales y comerciales (Rodríguez et al. 2013; Duke 2016).

Por otra parte, México posee otra riqueza natural utilizada como recurso energético, el petróleo. A pesar de que éste es uno de los recursos naturales más importantes; su exploración, explotación y transformación, han sido los principales protagonistas en la contaminación de las diversas zonas de manglar (SENER, 2014) dañando una parte considerable de suelos y cuerpos de agua de la región, como los localizados en la franja costera donde predominan (Domínguez-Domínguez et al. 2011).

En los últimos años una de las estrategias empleadas para la restauración de sitios contaminados por derrames petroleros, es la aplicación de tecnologías de

restauración biológica, las cuales, se han auxiliado del uso de sustancias capaces de emulsificar petróleo como los tensioactivos provenientes de pino. Estos metabolitos contienen un ácido graso con acción tensioactiva necesarios en los fluidos de perforación, ya que permiten no solo hacer emulsiones de agua en aceite o viceversa, sino también convertir elementos oleofóbicos en oleofílicos (Petroleumworld 2009). Los tensioactivos comerciales, como los provenientes de pino, han sido utilizados para recuperar petróleo en zonas costeras por ser fácilmente accesibles y baratos (Liú 2005; Garzona 2015).

Se han realizado estudios sobre el efecto de los derrames de petróleo en el desarrollo de plantas de *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans* y *Laguncularia racemosa* (Proffitt et al. 1995; Holguin et al. 2007; CONAFOR 2013; Tansel et al. 2015) además del grado de tolerancia de esas especies a diversas concentraciones de petróleo. Sin embargo, se requieren más estudios acerca del efecto del petróleo emulsificado con un tensioactivo que permita el desarrollo de las plántulas de mangle rojo (*R. mangle*). Es importante desarrollar tecnologías con el fin de disminuir el impacto adverso que el petróleo tiene en el desarrollo de las plántulas, y evitar que el petróleo inhiba el intercambio gaseoso al cubrir el suelo o lenticelas y asfixie a las plántulas, por lo que, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto que produce el petróleo emulsificado con un tensioactivo producido por una bacteria del género *Azospirillum* en el crecimiento de las plántulas de *R. mangle* en el estado de Tabasco.

4.3 Materiales y Métodos

La selección de los sitios de colecta de propágulos y suelo fue con base en ecosistemas de manglar que no hubieran sido impactados por petróleo en la localidad de Paraíso, Tabasco, México. El tipo de suelo se clasificó de acuerdo a Zavala y García (2012) y Domínguez-Domínguez et al. (2011).

4.3.1 Colecta de muestras

En México, las especies de manglar están bajo protección especial (SEMARNAT 2010), por lo que se solicitó permiso para colecta de propágulos ante la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

Se colectaron 1000 propágulos de la especie de mangle rojo (*R. mangle*) mediante recorrido en campo, de acuerdo con la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR 2008). Se ubicaron dos sitios de muestreo de suelos y colecta de propágulos. El primer sitio se ubicó en El Bellote, Paraíso, Tabasco con coordenadas 18°24'11.8" latitud norte y 93°11'00.5" longitud oeste, en suelo tipo Solonchak hipersálico gléyico de acuerdo a Domínguez-Domínguez et al. (2011). El segundo sitio fue localizado en dunas costeras y cordones litorales drenados al norte y noroeste de Paraíso, Tabasco con coordenadas 18°25'38.8" latitud norte y 93°12'50.6" longitud oeste, suelo clasificado como Arenosol éutrico (Zavala et al. 2009). Los propágulos seleccionados (uniformidad en longitud, peso y sin daños causados por depredadores) fueron trasladados a un invernadero ubicado en el Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco hasta su siembra en bolsas de polietileno de 10 cm x 25 cm con 1 kilogramo de sustrato (Domínguez 1994).

Al mismo tiempo de la colecta de propágulos se colectaron muestras de suelo de manglar y de dunas, ambos suelos se secaron a la sombra durante cinco días y se mezcló un kilogramo en una proporción 1:1, ya que de acuerdo con CONAFOR (2008), esta es la relación más propicia para un buen desarrollo de plántulas de mangle.

Previo a la siembra de los propágulos de *R. mangle*, éstos se desinfectaron para evitar en lo posible las enfermedades fungosas y bacterianas (Simola 1985). Los propágulos fueron puestos en bolsas de plástico de acuerdo a Domínguez (1994). Una vez establecido el bioensayo, a las plántulas se les aplicó riego con agua de pozo (pH 7.02, conductividad eléctrica 0.69 mS.cm⁻¹) cada 24 horas hasta que estas completaron tres meses de crecimiento.

Una de las alternativas para mitigar el efecto que pudiera tener el petróleo (°API=31.97) sobre las plántulas es dispersarlo (Duke et al. 2000; Duke 2016), por lo que fue necesario obtener tensioactivos (metabolitos excretados por bacterias) en condiciones *in vitro*.

La obtención de tensioactivo bacteriano sintetizado por *Azospirillum lipoferum* clasificada como petrofílica y productora de tensioactivo por Ojeda et al. (2015), fue

registrada en el Laboratorio Forestal del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, México. Para su reactivación, las cepas fueron purificadas y aisladas con la técnica de estriado en superficie, en condiciones axénicas (Madigan et al. 2012) y fueron reproducidas en el medio de cultivo Rojo Congo para bacterias fijadoras de nitrógeno.

4.3.2 Producción de tensioactivo bacteriano

La producción de tensioactivo se realizó en tres contenedores de vidrio de capacidad nominal de 20 L, conteniendo el medio de cultivo Kim (Kim et al. 2000), el cual es un medio estimulador para la producción de tensioactivo. A cada tapón de los contenedores se le instalaron dos tubos de vidrio, de acuerdo al diseño del biorreactor propuesto por Hernández et al. (2011). Para llevar a cabo la producción del tensioactivo bacteriano se colocó la cepa bacteriana *Azospirillum lipoferum* en el biorreactor, y de acuerdo a Ojeda et al. (2015) se dejó 72 h para alcanzar la mayor producción del tensioactivo.

4.3.3 Establecimiento del bioensayo

En el laboratorio se prepararon diversas concentraciones de petróleo emulsificado con un tensioactivo bacteriano producido por *A. lipoferum* (Ojeda et al. 2015). El tensioactivo con base en aceite de pino, proviene de *Pinus sylvestris* (Petroleumworld 2009; Cruz 2014). Los tensioactivos bacteriano y de pino fueron agregados al suelo en una mezcla con base en la capacidad de emulsión del caldo:petróleo y aceite de pino:petróleo en una relación 1:0.5. La mezcla fue agitada con un agitador mecánico a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 3 minutos y después fueron agregadas a los tratamientos correspondientes. Al experimento se le aplicó riego con agua de pozo, cada tercer día (Domínguez 1994) durante 11 meses.

4.3.4 Análisis de sustrato. Mediciones de las características morfológicas de las plántulas de mangle del bioensayo

Las plántulas de *R. mangle* se evaluaron cada 30 días durante 11 meses (Domínguez 1994). Las variables de respuesta fueron: *Longitud del tallo*. Se midió con una regla, desde la base del tallo sobre el propágulo hasta la punta extrema del tallo. *Longitud del propágulo*. Medida desde la superficie del sustrato hasta la

punta del propágulo. *Diámetro del tallo*. Se midió utilizando un vernier digital en la base del tallo. *Diámetro del propágulo*. Se midió utilizando un vernier digital con respecto a la superficie del sustrato. *Área foliar*. Se hizo a través de un integrador de área foliar marca: LI-3100 Area meter Biosciences en laboratorio. *Longitud de raíces*. Se midió utilizando una regla desde la base del tallo a la punta de la raíz. *Biomasa total húmeda*. Después de la extracción de las plantas, tanto la parte aérea (dividida en hojas y tallos) como la raíz fueron pesadas en una balanza electrónica. *Biomasa total seca*. Después de la extracción de las plantas, tanto la parte aérea (dividida en hojas y tallos) como la raíz fueron introducidas en una estufa de aire forzado, a una temperatura de 70 °C durante tres días, y posteriormente se pesaron en una balanza electrónica.

4.3.5 Análisis estadístico

Las variables evaluadas durante el crecimiento de plántulas de mangle (área foliar, longitud y diámetro del tallo, y del propágulo, longitud de raíces y biomasa total húmeda y seca) fueron analizados con un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos 2 x 6 y medidas repetidas en tiempo, usando el PROC MIXED de SAS (SAS Inst, Inc., 2004). El modelo para los análisis incluyó los efectos principales de tratamientos, factor A: niveles de tensioactivos (bacteriano y de pino), factor B: concentración de petróleo: 0, 30000, 40000, 50000, 60000 y 70000 ppm de petróleo, tiempo y la interacción tratamiento x tiempo. Cada combinación de tratamiento (tensioactivo x concentración) constó de cinco repeticiones con mediciones mensuales durante 11 meses. La información fue expresada como medias de mínimos cuadrados \pm EEM (error estándar) y comparadas con la prueba de Tukey ajustada (Herrera y García 2011). Para conocer si la variabilidad genética de los propágulos debida a la colecta en distintos árboles, pudo haber modificado el crecimiento a través del tiempo de las plántulas, se incluyó en el modelo la longitud y diámetro de propágulo como covariables.

4.4 Resultados y Discusión

El análisis exploratorio de los datos no mostró efecto de las covariables ($Pr > 0.05$) en las variables de respuesta, indicando que no influyeron en el crecimiento de las

plántulas de *R. mangle*, por lo que no fueron incluidas en el modelo de análisis de los datos.

4.4.1 Efecto del tipo de tensioactivo y concentraciones de petróleo en el crecimiento de las plántulas

Los análisis de varianza realizados mostraron que la interacción Tensioactivo×Concentración, fue significativa en las variables: área foliar ($Pr<0.0001$), longitud de tallo ($Pr=0.0016$), diámetro de tallo ($Pr<0.0001$), biomasa total húmeda ($Pr<0.0001$) y biomasa total seca ($Pr<0.0001$) (Cuadro 1), lo que indicó que el efecto en el crecimiento de las plántulas estuvo afectado por el tipo tensioactivo aplicado y que este comportamiento se modificó cuando se cambiaron las concentraciones de petróleo emulsificado, excepto en la longitud de raíces, la cual fue únicamente afectada por el tipo de tensioactivo, es decir no presentaron efectos de interacción.

A los 11 meses de evaluación, el mayor crecimiento en longitud de tallo (\bar{x} 36.26 cm) en plántulas de *R. mangle* se obtuvo en los tratamientos con tensioactivo bacteriano a 30000 ppm con petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano.

Por otra parte, en los tratamientos con petróleo emulsificado con tensioactivo de pino, la longitud de tallo de las plántulas registró menor tasa de crecimiento que las de los tratamientos con tensioactivo bacteriano (Fig. 1a).

El tipo de tensioactivo generó mayor efecto en el crecimiento de diámetro de tallo que las diversas concentraciones de petróleo, es decir, la separación vertical en las líneas de la gráfica que representó el efecto entre el tensioactivo bacteriano y de pino, fue mayor que el ángulo de inclinación respecto a la horizontal (León y Montero 2011). El diámetro de tallo mayor se registró en los tratamientos testigo (\bar{x} 6.45 mm), sin embargo, los tratamientos con petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano registraron valores similares (\bar{x} 6.1 mm) a 40000 ppm. En contraste, el diámetro de tallo de plántulas de *R. mangle* de los tratamientos con tensioactivo de pino, fue hasta 40 % menor que el testigo (Fig. 1b).

La interacción entre concentraciones de petróleo y tipo de tensioactivo en biomasa total húmeda fue significativa (Cuadro 1). El tipo de tensioactivo generó mayor efecto en la biomasa total húmeda de plántulas de *R. mangle* que las concentraciones de petróleo (León y Montero 2001). La biomasa total húmeda mayor se registró en los tratamientos testigos (\bar{x} 39.23 g) sin embargo, los tratamientos con petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano registraron valores similares, siendo el mayor (\bar{x} 34.47 g) a 40000 ppm. En contraste, la biomasa total húmeda de las plántulas de *R. mangle* de los tratamientos con tensioactivo de pino, fueron hasta 60 % menores que el testigo (Fig. 1c).

En el mismo contexto, la interacción entre las concentraciones de petróleo y tipo de tensioactivo en biomasa total seca fue significativa (Cuadro 1). El tipo de tensioactivo generó mayor efecto en la biomasa total seca de plántulas de *R. mangle* que las concentraciones de petróleo (León y Montero 2001). La biomasa total seca mayor se registró en las plántulas de los tratamientos testigo (\bar{x} 21.07 g) no obstante, los tratamientos con petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano registraron valores similares, siendo el mayor (\bar{x} 17.09 g) a 30000 ppm. Por otra parte, la biomasa total seca de las plántulas de *R. mangle* de los tratamientos con tensioactivo de pino, fue hasta 32 % menor que el testigo (Fig. 1d).

La pérdida de humedad de plántulas durante el secado fue mayor en los tratamientos con tensioactivo bacteriano (46 al 56 %), en comparación con las registradas con tensioactivo de pino (24 al 31 %). Esto indicó que las plántulas de tratamientos con tensioactivo tuvieron mayor hidratación que las plántulas con tensioactivo de pino.

En el Cuadro 1. Se muestra que la interacción entre concentraciones de petróleo de acuerdo al tipo de tensioactivo en área foliar fue significativa. El tipo de tensioactivo generó mayor efecto que las concentraciones de petróleo. El área foliar mayor (\bar{x} =58.92 cm²) se registró en las plántulas de los tratamientos con petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano a 30000 ppm. Por otro lado, las plántulas de los tratamientos con tensioactivo de pino tuvieron una defoliación total a excepción del testigo (Fig. 1e).

La interacción concentración de petróleo y tipo de tensioactivo en longitud de raíces fue no significativa ($P=0.0786$). En el ANOVA solo fue significativo el efecto por tipo de tensioactivo ($P<0.0001$), lo que indicó que las concentraciones de petróleo no tuvieron efecto en el crecimiento de las raíces de plántulas de *R. mangle*. Los tratamientos con tensioactivo bacteriano tuvieron un mayor crecimiento en la longitud de raíces en comparación con tratamientos con tensioactivo de pino.

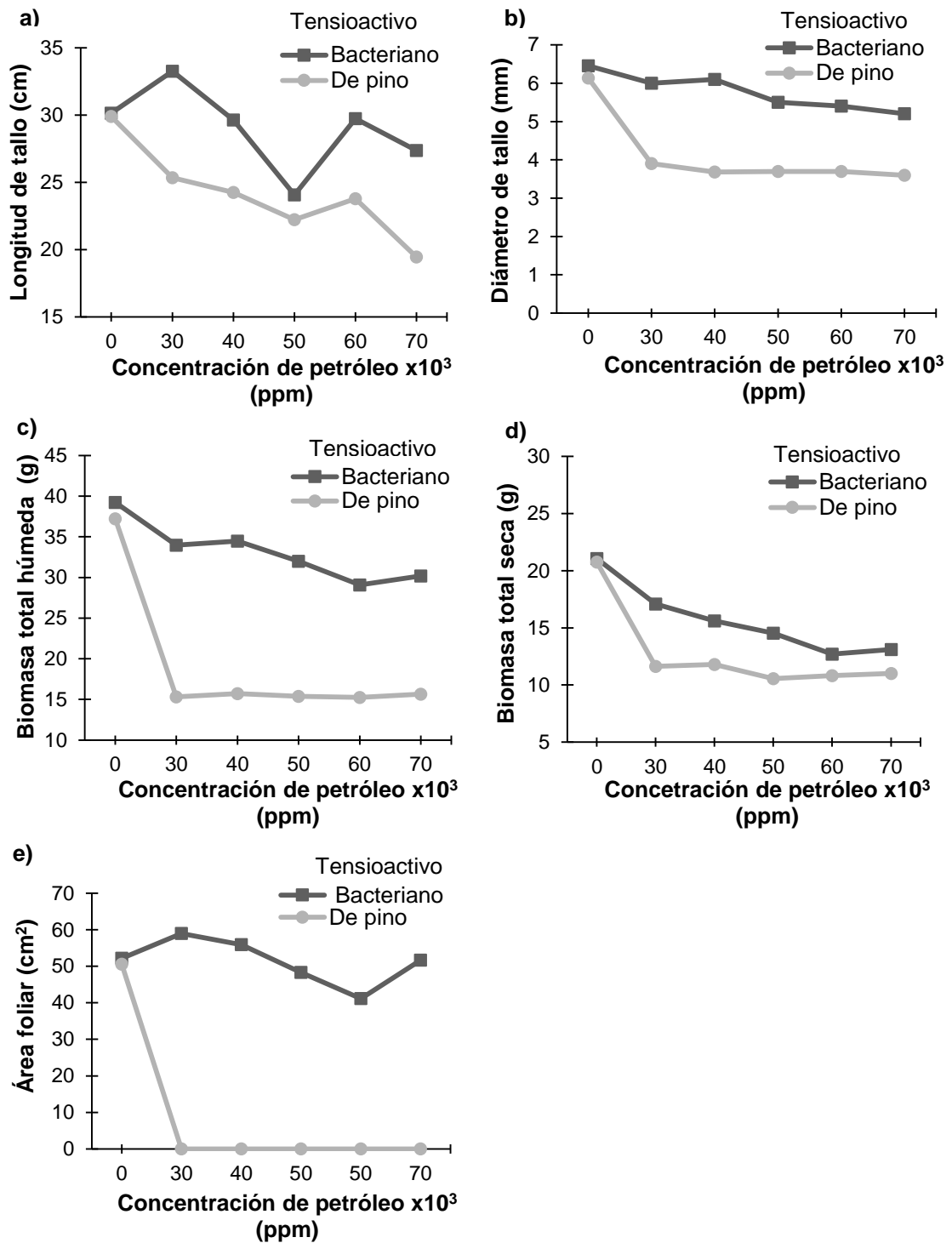


Figura 1. Efecto de las concentraciones de petróleo (0, 30000, 40000, 50000, 60000 y 70000 ppm) y tipo de tensioactivo (bacteriano y de pino) en a) longitud de tallo b) diámetro de tallo c) biomasa total húmeda d) biomasa total seca y e) área foliar en plántulas de *R. mangle* de 14 meses de edad, expresado en valores promedio.

Cuadro 1. Análisis de varianza de las variables: Área foliar, longitud de tallo, longitud de raíces, diámetro de tallo, biomasa total seca y biomasa total húmeda de plántulas de *Rhizophora mangle* con petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano y de pino.

Fuente de variación	Grados de Libertad	Área Foliar	Longitud de Tallo	Longitud de Raíces	Diámetro de Tallo	Biomasa total seca	Biomasa total húmeda
Tensioactivo	1	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Concentración	5	< 0.0001	0.1706	0.5861	< 0.0001	0.0007	< 0.0001
Tensioactivo×Concentración	5	< 0.0001	0.0016	0.0786	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Tiempo	11	< 0.0001	< 0.0001	0.0003	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Tensioactivo×Tiempo	11	< 0.0001	0.0177	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Concentración×Tiempo	55	< 0.0001	0.0038	0.2439	< 0.0001	0.0135	0.0001
Tensioactivo×Concentración×Tiempo	55	0.0002	0.0084	0.7127	0.0008	0.0024	< 0.0001
R²		0.86	0.43	0.39	0.75	0.64	0.79

Para determinar el tipo de tensioactivo que generó la mayor sobrevivencia, crecimiento y biomasa de plántulas de *R. mangle*, se realizó una prueba de comparación de medias Tukey en cada variable de los 12 tratamientos. La prueba de medias evidenció que el tensioactivo bacteriano generó mayor efecto en crecimiento de plántulas de *R. mangle* en todas las variables. Por otro lado, las plántulas de *R. mangle* de los tratamientos con tensioactivo de pino registraron una mortandad del 100% al final del experimento, debido probablemente a la naturaleza química del tensioactivo.

Garzona (2015) describió al alfa-pineno como un elemento altamente reactivo conocido por su efectividad como antimicrobiano y citotóxico para las plantas; por lo que cuando la emulsión fue vertida a nivel de sustrato en cada plántula de *R. mangle*, su efecto principal fue posiblemente la desactivación de la microbiota característica de la rizósfera de la planta inhibiendo la acción bioestabilizadora y remediadora que pudiesen desempeñar los microorganismos presentes para ayudar a la metabolización de petróleo. Por otra parte, el monoterpeno es considerado una sustancia bioacumulable, capaz de ser absorbida por organismos vivos. Las plántulas de *R. mangle* pudieron haber absorbido el alfa-pineno a través del conjunto de raíces en el sustrato provocando lisis celular de las estructuras internas de la plántula, deteriorándolas de forma agresiva desde el interior. Este terpeno pudo haber afectado los cambios en la permeabilidad de la membrana

celular debido a la naturaleza anfipática de las moléculas que componen el tensioactivo, impidiendo la absorción de nutrientes y el intercambio de gases esenciales (O₂) al obstruir las lenticelas en tallos y raíces de plántulas, lugar donde este fenómeno se lleva a cabo (Costa y Alves 2006).

Tansel et al. (2015) demostraron que el transporte de agua a través de raíces de *R. mangle* es altamente afectado por la presencia de hidrocarburos, así como por tensioactivos químicos en el agua provocando un daño estructural de forma rápida, y observaron una separación visible entre las capas que forman las raíces (epidermis, córtex, endodermis y xilema) indicando un debilitamiento estructural y pérdida del transporte radial de agua en los tejidos, esto indicó que el alfa-pineno pudo generar un efecto similar en este experimento provocando un alto nivel de deshidratación en la plántula. La presencia del alfa-pineno permite también la penetración de fracciones de petróleo a través de los tejidos de las raíces, así como su movilidad en dirección vertical, sin embargo, en dirección radial, el petróleo es rechazados por la endodermis acumulándose en el córtex impidiendo el paso del agua hacia el xilema, lo que provocó la muerte lenta de la plántula por deshidratación. Además, el aceite de pino tiene como principal componente al alfa-pineno adquiere propiedades antimicrobianas y citotóxicas (Liú 2005; Garzona 2015).

De acuerdo con Bona et al. (2011) los síntomas más comunes observados en las plántulas de *R. mangle* debido a la presencia del tensioactivo químico con petróleo incluyen: la erosión de la cera epicuticular, alteraciones en el mecanismo de los estomas, reducción en la fotosíntesis y respiración, aumento de la producción de fitohormonas relacionadas con el estrés (ácido abscísico), acumulación de sustancias tóxicas o sus subproductos en el tejido vegetal y disminución de tamaño, producción de follaje y biomasa total de la plántula; todo esto se resume en el aumento de mortalidad como en los resultados obtenidos por el efecto de la emulsión tensioactivo de pino-petróleo . En este contexto, se encontró que el mayor crecimiento y biomasa (área foliar, longitud de tallo, diámetro de tallo, longitud de raíces, biomasa total húmeda y biomasa total seca) de las plántulas de *R. mangle* se presentó en los tratamientos con emulsión tensioactivo bacteriano-petróleo.

Cortés et al. (2013) señalaron que la aplicación de la emulsión tensioactivo bacteriano-petróleo redujo los efectos negativos sobre plántulas de mangle, en comparación con el petróleo sin emulsificar. En este contexto este estudio utilizó un tensioactivo sintetizado por una cepa del género *Azospirillum*, al mismo tiempo Ojeda-Morales et al. (2015) reportaron la presencia de lipopéptidos en un tensioactivo bacteriano sintetizado por *Azospirillum lipoferum*. Los lipopéptidos son compuestos de bajo peso molecular y poseen excelentes propiedades dispersantes y humectantes con capacidad para reducir la tensión superficial.

Los tensioactivos bacterianos rompen la tensión superficial e interfacial entre fases formando micelas en un entorno polar y relacionándolas estrechamente con la concentración micelar crítica, la cual representa la concentración mínima de tensioactivo para que ocurra espontáneamente la formación de micelas. El tensioactivo utilizado solubilizó el petróleo en el agua, lo que permitió que este estuviera biodisponible para su biodegradación, y poder introducirlo a las diversas rutas metabólicas para la generación de energía y síntesis de biomasa.

Los manglares en presencia de petróleo, por si solos pueden eliminar cierta cantidad de contaminantes (Tansel et al. 2015). Además, los tensioactivos bacterianos favorecen la biodisponibilidad de los contaminantes (Kitamoto y Nakahara 2002). Por otra parte, Tansel et al. (2015) mencionaron que el flujo de agua a través de las raíces de mangle puede ser considerado similar a un sistema de membranas, donde el rango de presión hidrostática disponible en el transporte del agua a través de la estructura de mangle lo hace similar al de una nanofiltración. Dentro de este sistema, cuando existe la presencia de petróleo y se aplica un tensioactivo, éste permite que las raíces absorban y transporten el agua en dirección vertical a través de la planta sin obstruirlas, ayudándolas al mantenimiento del nivel de hidratación, evitando su mortandad por efectos tóxicos del petróleo y acumulación de sal.

En estudios realizados por Ramírez et al. (2014) se evaluaron e identificaron grupos microbianos funcionales aislados de la rizósfera de *Avicennia germinans*, *Laguncularia racemosa*, *Conocarpus erectus* y *Rhizophora mangle*, confirmando la presencia de bacterias degradadoras de petróleo, por lo que la adición del caldo

con bacterias petrofílicas (*A. lipoferum*) pudo haber aumentado la población microbiana y por lo tanto la degradación del petróleo. Otros estudios de evaluación de la degradación de compuestos tóxicos también determinaron que la presencia de compuestos exudados por las raíces, como hidratos de carbono, ácidos orgánicos y aminoácidos podrían estimular la degradación de los contaminantes (Jonner et al. 2005). En relación a esto, Proffitt et al. (1995) reportaron una sobrevivencia del 30 % en plántulas de *R. mangle* contaminadas con petróleo sin emulsificar, en comparación con el 100% de sobrevivencia obtenida por la adición de la emulsión tensioactivo bacteriano-petróleo en tratamientos con hasta 70000 ppm petróleo.

4.4.2 Efecto de la emulsión tensioactivo bacteriano-petróleo en el crecimiento de plántulas de *R. mangle*

En general, los tratamientos que permitieron mayor crecimiento de plántulas de *R. mangle* fueron con tensioactivo bacteriano. Por lo que se estudió el efecto de la emulsión tensioactivo bacteriano-petróleo en cada variable de respuesta a través del tiempo. El ANOVA para los seis tratamientos con tensioactivo bacteriano en los 11 meses de evaluación, indicó que la interacción Tratamiento×Tiempo fue significativa ($Pr < 0.05$) para las variables: área foliar ($Pr = 0.002$), longitud de tallo ($Pr = 0.031$), diámetro de tallo ($Pr = 0.0083$), biomasa total húmeda ($Pr = 0.0013$) y biomasa total seca ($Pr < 0.0001$), esto señaló que las tendencias en el tiempo de cada variable están estrechamente relacionadas con la cantidad de petróleo emulsificado adicionados en cada tratamiento; la longitud de raíces únicamente resultó significativa con respecto al tiempo, es decir, no influyeron las diversas concentraciones de petróleo emulsificado en su respuesta.

Los periodos en los que se registró el área foliar mayor fueron a los cuatro y cinco meses de edad, y no se registraron diferencias significativas en las medias de los tratamientos (Cuadro 2). Los datos fueron: 0 ppm (\bar{x} 134.54 cm²), 30000 ppm (\bar{x} 136.38 cm²), 40000 ppm (\bar{x} 134.18 cm²), 50000 ppm (\bar{x} 114.14 cm²), 60000 ppm (\bar{x} 127.82 cm²) y 70000 ppm (\bar{x} 130.38 cm²). Lo que indicó una tolerancia de 70000 ppm de petróleo emulsificado. La respuesta de esta variable en plántulas de *R. mangle* fue similar a la del tratamiento testigo, esto pudo deberse al efecto del

tensioactivo bacteriano de aumentar la biodegradación del petróleo. En comparación con lo reportado por Lewis (1979) y Lewis & Haines (1980) donde un derrame de petróleo de 50000 ppm provocó una tasa de mortandad del 100% en plántulas de *R. mangle* y *A. germinans* menores de un año.

Área foliar. Durante los primeros seis meses de evaluación no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos dentro del mismo mes evaluado, es decir, no hubo efecto de la emulsión a diferentes concentraciones de petróleo. Sin embargo, a partir del séptimo mes de aplicación de la emulsión (nueve meses de edad de las plántulas) se presentaron diferencias estadísticas significativas entre las medias (Cuadro 2). Las lecturas mínimas se registraron a los 14 meses de edad en las concentraciones de petróleo emulsificado de 30000 ppm (\bar{x} 58.92 cm²), 40000 ppm (\bar{x} 55.9 cm²), 50000 ppm (\bar{x} 48.32 cm²), 60000 ppm (\bar{x} 41.16 cm²) y 70000 ppm (\bar{x} 51.62 cm²) (Fig. 2a).

El tratamiento testigo presentó la defoliación mayor (\bar{x} 22.07 cm²) entre los 6 y 9 meses de edad de la plántula (marzo-junio), en comparación con los demás tratamientos. Durante este periodo, se registraron temperaturas de hasta 48 °C en el invernadero, esto generó estrés hídrico en las plántulas, lo que pudo haber provocado un aumento en la concentración de ácido absícico (fitohormona) en sus hojas causando cierre de los estomas, disminución en la transpiración e inhibición del crecimiento normal de la plántula, además de la pérdida de hojas durante este periodo (Garzona 2015).

Posteriormente, las plántulas se estabilizaron en un lapso de dos meses (julio-agosto), tiempo en el que pudieron regenerar sus hojas, mostrando a la edad de 12 meses (septiembre) un aumento en el área foliar. En contraste, las plántulas de los tratamientos con la emulsión tensioactivo bacteriano-petróleo resultaron menos vulnerables a estas condiciones de temperatura.

Cuadro 2. Análisis de medidas repetidas para la variable Área foliar. Efecto simple por tratamiento (concentración de petróleo emulsificado), periodo (edad de la plántula) e interacción (Tratamiento×Periodo). Prueba de comparación de medias Tukey de mínimos cuadrados, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

Test de hipótesis de efectos fijos												
Pr>F												
Tratamiento: Concentración de petróleo emulsificado (ppm)	Periodo: Edad de plántulas (meses)											Tratamiento×Periodo
0.03	<0.0001											0.02
Efectos simples												
Tratamiento												
0	30000	40000	50000	60000	70000	Error estándar						
67.71 B	83.56 A	81.31 BA	78.38 BA	73.68 BA	74.11 BA	3.38						
Periodo												
3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Error estándar
73.97 CBD	121.91 A	129.57 A	84.66 CB	86.22 B	86.92 B	66.54 CED	52.93 FE	44.01 F	64.71 ED	57.21 FED	50.88 FE	4.04
Efecto por interacción: Tratamiento×periodo												
Tratamiento: Concentración de petróleo emulsificado (ppm)	Periodo: Edad de plántulas (meses)											
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	95.50 A	129.40 A	134.54 A	92.29 A	80.38 A	78.35 A	23.07 C	22.30 B	20.84 A	37.08 B	49.48 A	49.36 A
30000	67.50 A	124.90 A	136.38 A	106.06 A	84.83 A	85.54 A	87.54 A	61.08 BA	46.22 A	73 BA	70.78 A	58.92 A
40000	70.28 A	127.26 A	134.18 A	82.70 A	81.87 A	87.88 A	81.39 BA	60.80 BA	61.18 A	80.70 A	51.58 A	55.90 A
50000	69.20 A	126 A	114.14 A	75.87 A	92.29 A	93.78 A	89.09 A	47.24 A	52.46 BA	75.58 BA	56.68 A	48.32 A
60000	73.26 A	113.54 A	127.82 A	77.07 A	90.33 A	85.76 A	71.97 BA	56.64 BA	39.60 A	57.10 BA	49.98 A	41.16 A
70000	68.10 A	110.34 A	130.38 A	74 A	87.62 A	90.21 A	46.17 BC	69.56 A	31.76 A	64.80 BA	64.80 A	51.62 A

Longitud de tallo. Los periodos en los que se registró la longitud de tallo mayor fueron a los seis y ocho meses de edad de las plántulas, en donde no se registraron diferencias significativas en las medias de estos tratamientos (Cuadro 3). La longitud de tallo de las plántulas de *R. mangle* a lo largo del tiempo no mostró una tendencia marcada en su crecimiento, los valores registrados oscilaron entre 23 y 37 cm en las diversas concentraciones de la emulsión, debido posiblemente a que se midieron mensualmente diferentes plántulas al aplicar un muestreo destructivo.

Los tallos de algunas plántulas presentaron áreas necrosadas, esto pudo deberse de acuerdo con Krauss et al. (2008), las altas temperaturas pueden provocar lesiones necróticas en el tallo y el propágulo. El comportamiento del crecimiento de la longitud del tallo a través del tiempo se puede observar en la Fig. 2b.

En los primeros 10 meses de evaluación no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos dentro del mismo mes evaluado, es decir, no hubo efecto de la emulsión a diversas concentraciones de petróleo en longitud de tallo excepto en el mes cinco. Sin embargo, en los últimos dos meses de evaluación, se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, siendo la emulsión con 30000 ppm de petróleo emulsificado la que generó la longitud de tallo mayor (Cuadro 3).

Resultados similares fueron encontrados por Moreira et al. (2011), donde se observó un aumento del 22 % en el crecimiento de las plántulas de *R. mangle* expuestas a suelo contaminado con petróleo en comparación a las que se cultivaron en el suelo testigo. En un estudio realizado por Chindah et al. (2007) mencionaron que las plántulas de *R. mangle* expuestas al petróleo crudo demostraron un aumento del 24.01 % en el crecimiento del tallo, mientras que las plántulas control obtuvieron un aumento del 23.32 %, lo que sugiere una buena adaptación de las plántulas, debido posiblemente a los componentes orgánicos del petróleo que en bajas concentraciones realizan funciones de fertilizantes (Torres 2015).

Diámetro de tallo. El periodo en el que se registró el diámetro de tallo mayor fue a los cinco meses de edad (febrero) (Cuadro 4).

A partir de este mes, las plántulas de *R. mangle* de todos los tratamientos presentaron una disminución en su valor hasta los 10 meses de edad de la plántula (julio). Este comportamiento puede ser debido a la adaptación de la plántula ante el derrame de petróleo emulsificado. El diámetro de tallo de las plántulas de *R. mangle* comienza a aumentar a partir de los 12 meses de edad (Fig. 2c).

Cuadro 3. Análisis de medidas repetidas para la variable Longitud de tallo. Efecto simple por tratamiento (concentración de petróleo emulsificado), periodo (edad de la plántula) e interacción (Tratamiento×Periodo). Prueba de comparación de medias Tukey de mínimos cuadrados, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

Test de hipótesis de efectos fijos												
Pr>F												
Tratamiento: Concentración de petróleo emulsificado (ppm)		Periodo: Edad de plántulas (meses)						Tratamiento×Periodo				
0.0039		0.0005						0.031				
Efectos simples												
Tratamiento												
0	30000	40000	50000	60000	70000	Error estándar						
29.30 A	30.51 A	28.94 BA	26.18 B	26.86 BA	27.59 BA	0.6976						
Periodo												
3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Error estándar
27.63 BA	26.11 B	28.77 BA	30.24 A	26.31 B	30.88 A	27.43 BA	28.92 BA	27.66 BA	28.73 BA	29.37 BA	28.70 BA	0.8107
Efecto por interacción Tratamiento*periodo												
Tratamiento: Concentración de petróleo emulsificado (ppm)	Periodo: Edad de plántulas (meses)											
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	29 A	27.74 A	29.74 A	32.48 A	32.10 A	34.76 A	25.54 A	27 A	26.18 A	31.24 A	28.70 B	28.16 BA
30000	28.96 A	29.20 A	29.80 A	29.42 A	26.88 BA	31.12 A	28.14 A	31.84 A	29.80 A	30.54 A	37.26 A	33.26 A
40000	25.88 A	25.68 A	27.78 A	29.22 A	23.50 B	33.02 A	26.54 A	28.76 A	32.40 A	32.86 A	29.06 BA	29.64 BA
50000	27.54 A	24.16 A	27.68 A	28.06 A	25.60 BA	28.76 A	24.02 A	26.60 A	27.46 A	25.52 A	24.76 B	24.06 B
60000	27.18 A	23.24 A	26.64 A	31.90 A	22.66 B	30.42 A	29.48 A	32.34 A	24.70 A	25.40 A	30.62 BA	29.74 BA
70000	27.26 A	27.66 A	31.02 A	30.40 A	27.16 BA	27.24 A	27.90 A	26.98 A	25.42 A	26.84 A	25.84 B	27.36 BA

Este resultado que concuerda con los datos de Chindah et al. (2007) quienes mencionaron que el tratamiento control con plántulas de *R. mangle* alcanzó un aumento en su diámetro del 34.29 %, en comparación con los obtenidos en los tratamientos con exposición aguda (un solo vertido de 120 mL al inicio) (17.64 %) y crónica (dosis semanales de 15 mL durante 59 semanas) (15.12 %) de petróleo crudo. De acuerdo con Proffitt et al. (1995) esto se debe posiblemente a una reducción en el transporte de agua a través de la plántula al aumentar las concentraciones de la emulsión.

Este hecho indicó que, en esta variable, la emulsión tensioactivo bacteriano-petróleo redujo los efectos negativos del petróleo en el crecimiento de diámetro de tallo plántulas de *R. mangle*, pero no los eliminó por completo.

Cuadro 4. Análisis de medidas repetidas para la variable Diámetro de tallo. Efecto simple por tratamiento (concentración de petróleo emulsificado), periodo (edad de la plántula) e interacción (Tratamiento×Periodo). Prueba de comparación de medias Tukey de mínimos cuadrados, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

Test de hipótesis de efectos fijos												
Pr>F												
Tratamiento: Concentración de petróleo emulsificado (ppm)		Periodo: Edad de plántulas (meses)						Tratamiento×Periodo				
0.0015		<0.0001						0.0083				
Efectos simples												
Tratamiento												
0	30000	40000	50000	60000	70000	Error estándar						
5.78	5.57	5.60	5.34	5.26	5.33	0.085						
A	BA	BA	B	B	B							
Periodo												
3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Error estándar
5.56	5.37	5.98	5.58	5.31	5.35	5.53	4.90	5.21	5.72	5.48	5.77	0.099
BAC	BC	A	BAC	BDC	BDC	BAC	D	DC	BA	BC	BA	
Efecto por interacción Tratamiento×Periodo												
Tratamiento: Concentración de petróleo emulsificado (ppm)	Periodo: Edad de plántulas (meses)											
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	5.88	5.59	6.30	5.57	4.66	5.19	6.19	6.20	5.11	6.05	6.19	6.45
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	BA	A	A
30000	5.53	5.68	5.89	5.85	5.57	5.20	5.55	4.76	5.24	5.93	5.71	5.96
	A	A	A	A	A	A	A	B	A	BA	BA	BA
40000	5.88	5.10	6.10	6.01	5.41	5.61	5.39	4.72	5.15	6.08	5.69	6.07
	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A	BA	BA
50000	5.35	5.44	5.72	5.26	5.55	5.43	5.53	4.40	5.25	5.76	5.15	5.51
	A	A	A	A	A	A	A	B	A	BA	B	BA
60000	5.46	5.18	5.98	5.44	5.13	5.32	5.30	4.60	5.15	5.06	5.07	5.49
	A	A	A	A	A	A	A	B	A	B	B	B
70000	5.26	5.21	5.89	5.36	5.54	5.31	5.24	4.72	5.37	5.76	5.10	5.19
	A	A	A	A	A	A	A	B	A	BA	B	B

Biomasa total húmeda (peso húmedo). El periodo en el que se registró el peso húmedo mayor, fue entre los tres a los cinco meses de edad (Cuadro 5). La biomasa total húmeda de las plántulas de *R. mangle* presentó una disminución en su valor en el periodo de 3 a 10 meses de edad. Los valores menores para esta variable fueron registrados a los 10 meses de edad en las concentraciones de: 0 ppm (\bar{x} 25.34 g), 30000 ppm (\bar{x} 31.97 g), 40000 ppm (\bar{x} 27.63 g), 50000 ppm (\bar{x} 27.96 g) y 60000 ppm (\bar{x} 26.21 g); y en la concentración a 70000 ppm a los 9 meses de edad (\bar{x} 24.32 g). A partir de los 11 meses de edad, el peso húmedo de las plántulas aumentó, sin embargo, de 13 a 14 meses de edad se registró nuevamente una disminución de biomasa total húmeda en la mayoría de las concentraciones de petróleo emulsificado, a excepción del testigo (Fig. 2d).

Durante el primer mes de evaluación se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, lo cual pudo deberse a la diferencia morfológica de las plántulas y no a los tratamientos, ya que la primera evaluación se llevó a cabo cuando aún

no se adicionaba emulsión. Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre cuatro a 11 meses de edad de las plántulas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de medidas repetidas para la variable Biomasa húmeda total. Efecto simple por tratamiento (concentración de petróleo emulsificado), periodo (edad de la plántula) e interacción (Tratamiento×Periodo). Prueba de comparación de medias Tukey de mínimos cuadrados, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

Test de hipótesis de efectos fijos												
Pr>F												
Tratamiento: Concentración de petróleo emulsificado (ppm)			Periodo: Edad de plántulas (meses)						Tratamiento×Periodo			
0.044			<0.0001						0.0013			
Efectos simples												
Tratamiento												
0	30000	40000	50000	60000	70000	Error estándar						
37.34	38.77	38.17	35.91	35.00	35.45	0.937						
A	A	A	A	A	A							
Periodo												
3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Error estándar
43.42	42.74	42.55	38.19	35.98	37.14	30.72	28.22	34.59	41.98	32.94	38.81	1.1507
A	A	A	BAC	EDC	BDC	EF	F	EDC	BA	EFDC	EFD	
Efecto por interacción Tratamiento× Periodo												
Tratamiento: ppm	Periodo: Edad de plántulas (meses)											
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	52.35	45.91	45.73	35.23	30.46	39.43	29.93	25.34	33.26	34.42	38.82	37.21
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A
30000	45.51	45.99	43.32	36.98	41.54	41.03	35.53	31.97	35.49	43.50	34.44	33.95
	BA	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
40000	48.23	43.34	41.55	43.31	31.57	34.80	30.59	27.63	34.39	54.17	33.98	34.47
	BA	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
50000	35.65	41.33	38.66	34.94	37.09	36.22	33.83	29.96	39.54	42.99	29.73	31.98
	B	A	A	A	A	A	A	A	A	BA	A	A
60000	37.83	40.08	44.77	39.45	35.89	34.37	34.13	26.21	30.15	37.62	30.48	30.19
	B	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A
70000	39.96	39.81	41.30	39.23	39.30	37.00	24.32	30.20	34.70	39.21	30.21	29.09
	B	A	A	A	A	A	A	A	A	B	A	A

El comportamiento de biomasa total húmeda a través del tiempo se puede observar en la Fig. 2d. Además, en esta variable se identificó que a la edad de 10 meses (mes de julio), todos los tratamientos presentaron la disminución mayor, esto pudo ser debido al incremento de la temperatura, ya que se registraron hasta 48 °C. Al respecto Krauss et al. (2008), observaron que los órganos de *R. mangle* sufren daños por calor a temperaturas altas (44 a 55 °C), y que la sensibilidad al calor también está correlacionada con la etapa de crecimiento, siendo las plántulas las más susceptibles debido a la inmadurez de sus tejidos. Para evadir este tipo de daños, las plántulas disipan el calor mediante un enfriamiento por evaporación durante la transpiración, lo cual se refleja en la pérdida de peso húmedo.

La ganancia mayor de biomasa total húmeda total (\bar{x} 54.17 g) se presentó a los 12 meses de edad a 40000 ppm de petróleo emulsificado. Caso contrario presentado

por Torres (2015) quien afirmó que el petróleo crudo afectó la ganancia de peso fresco de plántulas *R. mangle*, y que este efecto iba amentando proporcionalmente a la concentración de petróleo, además que el valor mayor de biomasa total húmeda en *R. mangle* la obtuvo el tratamiento testigo. En contraste con este estudio, el análisis de medias Tukey realizado a las medias poblacionales de biomasa total húmeda (14 meses de edad) presentó diferencias significativas ($Pr < 0.05$) entre los tratamientos en todas las concentraciones de petróleo emulsificado.

Biomasa total seca. El periodo en el que se registró la biomasa total seca mayor fue a los cinco meses de edad (Cuadro 6). La biomasa total seca de plántulas de *R. mangle* representada en peso seco, no mostró tendencia marcada en sus valores a lo largo del tiempo, puesto que oscilaron entre 27 y 12 g, debido posiblemente a la variación de unidades experimentales muestreadas cada mes, sin embargo, al comparar los valores de biomasa total seca de plántulas de 3 meses de edad (16 a 27 g) con valores registrados a los 14 meses (12 a 21 g), se observó una disminución en la biomasa total seca de las plántulas en la mayoría de los tratamientos con petróleo emulsificado a excepción de 0 ppm, que mostró un incremento del 5%. El comportamiento de la biomasa total seca a través del tiempo se puede observar en la Fig. 2e.

Durante el primer mes de evaluación se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos dentro del mismo periodo de evaluación, es decir, que estas diferencias pudieron ser debidas a la variabilidad morfológica de las plántulas (Cuadro 6).

Por otro lado, en esta variable al igual que en biomasa total húmeda, se observó que, a la edad de 10 meses, todas las plántulas de los tratamientos presentaron la disminución mayor en sus valores, debido probablemente al incremento de la temperatura, lo que indicó que existió una relación directa entre los factores ambientales y respuesta en ganancia de peso seco

Cuadro 6. Análisis de medidas repetidas para la variable Biomasa total seca. Efecto simple por tratamiento (concentración de petróleo emulsificado), periodo (edad de la plántula) e interacción (Tratamiento×Periodo). Prueba de comparación de medias Tukey de mínimos cuadrados, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

Test de hipótesis de efectos fijos												
Pr>F												
Tratamiento: Concentración de petróleo emulsificado (ppm)		Periodo: Edad de plántulas (meses)						Tratamiento×Periodo				
0.001		<0.0001						<0.0001				
Efectos simples												
Tratamiento												
0	30000	40000	50000	60000	70000	Error estándar						
17.62	20.09	19.98	19.48	16.97	17.37	0.579						
BA	A	A	BA	B	B							
Periodo												
3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Error estándar
20.93	20.16	23.71	22.25	16.39	15.95	19.30	15.53	17.80	22.43	13.16	15.43	0.8157
BAC	BDAC	A	BA	FDEG	FEG	BDEC	FEG	FDEC	BA	G	FG	
Efecto por interacción Tratamiento×periodo												
Tratamiento: Concentración de petróleo emulsificado (ppm)	Periodo: Edad de plántulas (meses)											
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
0	20.08	21.87	23.48	18.43	13.97	17.17	19.00	13.08	16.04	15.33	13.44	19.57
	BA	A	A	B	A	A	A	A	A	C	A	A
30000	26.44	23.13	24.01	19.31	21.08	19.18	20.63	16.86	18.23	20.73	14.34	17.09
	A	A	A	B	A	A	A	A	A	BC	A	A
40000	27.89	19.67	27.26	24.03	13.24	14.92	20.06	16.16	17.10	30.16	13.66	15.61
	A	A	A	BA	A	A	A	A	A	A	A	A
50000	17.46	21.10	22.41	31.78	15.87	14.37	21.39	15.53	21.56	24.88	12.93	14.53
	B	A	A	A	A	A	A	A	A	BA	A	A
60000	16.04	15.48	25.27	19.45	16.09	14.20	20.59	14.59	15.84	20.87	12.54	13.09
	B	A	A	B	A	A	A	A	A	BC	A	A
70000	17.68	19.74	19.85	20.49	17.95	15.87	14.12	16.96	18.06	22.63	12.05	12.69
	B	A	A	B	A	A	A	A	A	BA	A	A

Además, estas condiciones exponen a las plántulas a un estrés por deshidratación, lo que puede causar un decremento en los niveles de fotosíntesis, haciéndolas más susceptibles a las altas intensidades de luz solar, ocasionando foto-inhibición (desnaturalización de los pigmentos involucrados en el fotosistema 2) debido a la energía absorbida en exceso por la clorofila, es decir, cuando la plántula absorbe más luz de la que puede utilizar en el proceso (Krauss et al. 2008).

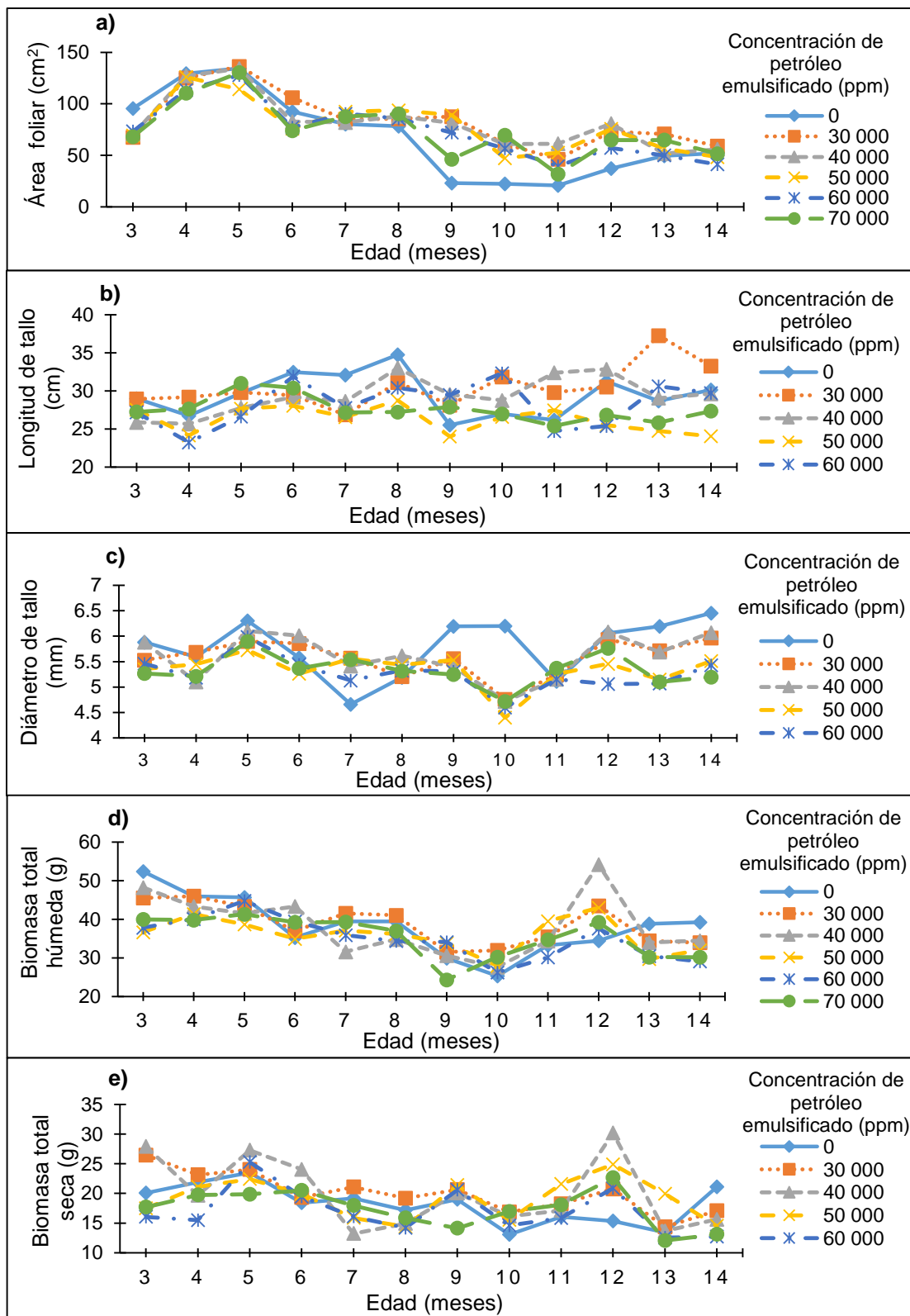


Figura 2. Efecto de las concentraciones de petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano en a) área foliar, b) longitud de tallo, c) diámetro de tallo, d) biomasa húmeda total y e) biomasa seca total durante los 11 meses de evaluación.

El efecto principal por tiempo resultó significativo en longitud de raíces de acuerdo con el análisis de varianza, lo que indicó que el efecto en la variable de respuesta no se vio influenciado por las concentraciones de petróleo emulsificado. Resultado similar fue reportado por Torres (2015), quien mencionó que no hubo efecto de las concentraciones de petróleo, ni del tiempo de exposición en longitud de raíces en *R. mangle* y *A. germinans*.

La longitud de raíces tuvo su mayor crecimiento a los 12 meses de edad con un valor de \bar{x} 119.24 cm, en comparación con el valor mínimo registrado a los 8 meses de edad con \bar{x} = 91.61 cm, lo que señaló un crecimiento del 30 %.

4.5 Recomendaciones

Se recomienda que, en futuras investigaciones se realice un experimento factorial que considere las concentraciones de tensioactivos respecto a su concentración micelar crítica, debido a que, aunque la toxicidad de los tensioactivos bacterianos es menor que la de los tensioactivos terpénicos, la CMC de estos últimos es menor.

4.6 Conclusión

Las plántulas de *R. mangle* en tratamientos con petróleo emulsificado con un tensioactivo proveniente de *A. lipoferum* tuvieron mayor crecimiento de área foliar, longitud de tallo, diámetro de tallo, e incremento de biomasa total húmeda y biomasa total seca que las plántulas en tratamientos con petróleo emulsificado con un tensioactivo comercial de origen terpénico.

4.7 Referencias

- Bona C., De Rezende I., De Oliveira G., & De Souza L. 2011. Effect of Soil Contaminated by Diesel Oil on the Germination of Seeds and the Growth of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) Seedlings. *Braz Arch Biol Technol*, 54, 1379-1387. doi: 10.1590/S1516-89132011000600025
- Chindah, A., Braide, S., Amakiri, J., & Onokurhefe J. (2007). Effect of crude oil on the development of mangrove (*Rhizophora mangle* L.) seedlings from Niger Delta, Nigeria. *UDO Agrícola*, 7, 181-194.

- Chunguang, Z. (2006). The effect of lubricating oil Pollution on growth and Physiological response of Mangrove. Tesis doctoral. Universidad de la ciudad de Hong Kong. 206 p.
- CONAFOR. (2008). Conservación y restauración de manglares: Manual de experiencias comunitarias. Consejo Nacional Forestal. 40 p.
- CONAFOR. (2013). Inventario estatal forestal y de suelos. Consejo Nacional Forestal. México, D.F. 117 p.
- Cortés, A., Troconis, I., & Jaramillo, M. (2013). Surfactantes biológicos con aplicación potencial en tecnología de alimentos: una revisión. *Biológicas*, 15, 16–23.
- Cruz, D. (2014). Evaluación de los aceites esenciales (alfa-pineno y limonene) contra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* productores de enterotoxinas *in vitro*. Tesis de licenciatura. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Honduras. 41 p.
- Domínguez, D. M. (1994). Evaluación del crecimiento de plántulas de *Rhizophora mangle* L. bajo diferentes condiciones de sustrato e intensidad de Luz. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 102 p.
- Domínguez-Domínguez, M., Zavala-Cruz, J., & Martínez-Zurimendi, P. (2011). Manejo forestal sustentable de los manglares de Tabasco. Secretaría de Recursos Naturales y Protección Ambiental. Colegio de Postgraduados. Villahermosa, Tabasco, México. 137 p.
- Duke, N. C., Burns, K. A., Swannell, R. P., Dalhaus, O., & Rupp, R. (2000). Dispersant use and a bioremediation strategy as alternate means of reducing impacts of large oil spills on mangroves: The Gladstone field trials. *Mar Pollut Bull*, 41, 403-412. doi: matterPII: S0025-326X (00)00133-8.

- Duke, N.C. (2016). Oil spill impacts on mangrove: Recommendations for operational planning and action based on global review. *Mar Pollut Bull*, 109, 700-715. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.06.082.
- Garzona, L. (2015). Isomerización de alfa-pineno sobre heteropolicompuesto. Tesis doctoral. Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata. 233 p.
- Hernández, M., Ojeda, M., Martínez, J., & Córdova, Y. (2011). Optimal parameters for *in vitro* the development of the hydrocarbonoclastic microorganism *Proteus* sp. *Soil Sci Plant Nutr*, 11, 29-43. doi: 10.4067/S0718-95162011000100003.
- Herrera, J., & García, C. (2011). Bioestadística en ciencias veterinarias. Procedimientos de análisis de datos con SAS. Ed. Colegio de Postgraduados, Universidad Complutense de Madrid. Madrid. 250 p.
- Hoff, R., Michel, J., Hensel, P., Proffitt, C., Delgado, P., Shigenaka, G., Yender R., & Mearns, A. (2014). *Oil Spills in Mangroves: Planning and Response Considerations*. Washington, D.C.: National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA Ocean Service, Office of Response and Restoration. 96 p.
- Holguin, G., Flores, A., Eberhard, A., Winans, S., Dávila, A., Villicaña, C., Geraldo N., Bacilio M., López de los Santos Y., & Ruiz, M. (2007). Microbiología de manglar y técnicas moleculares para su estudio. Sánchez, J. (ed) *Potencial biotecnológico de microorganismos en ecosistemas naturales y agroecosistemas*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Pp. 94-103.
- Jonner, E., Corgie, S., Amellal, N., & Leyval, C. (2005). Nutritional constraints to PAH degradation in a rhizosphere model. *Soil Biol. Biochem*, 34, 859–864. doi: 10.1016/S0038-0717(02)00018-4.

- Kim, H., Jong, L., & Dong L. (2000). Purification and characterization of biosurfactans from *Nocardia* sp. L. 417. *Biotechnol Appl. Biochem*, 31, 249-253. doi: 10.1042/BA19990111.
- Krauss, K., Lovelock, C., McKee, K., López, L., Ewe, S. & Sousa, W. (2008). Environmental drivers in mangrove establishment and early development: A review. *Aquatic Botany*. 89, 105-127. doi: 10.1016/j.aquabot.2007.12.014.
- León, O., & Montero, I. (2001). Cómo explicar el concepto de interacción sin estadística: análisis gráfico de todos los casos posibles en un diseño 2 x 2. *Psicothema*, 13, 159-165.
- Lewis, R., & Haines, K. (1980). Large scale mangrove on St. Croix, US Virgin Islands-II. Second year. 137-148.
- Liú, W. (2005). Terpenes: Expansion of the Chiral Pool. *Handbook of Chiral Chemical*. Ed. D. Ager. NSC Technologies. Illinois, USA. 83-87.
- Madigan, M., Martinko, M., & Stahl Ay Clark, D. (2012). *Brock Biology of microorganisms*. 13a. Edition. Pearson Higher education. España.1152 p.
- Ojeda-Morales, M., Domínguez-Domínguez, M., Hernández-Rivera, M., & Zavala-Cruz, J. (2015). Biosurfactant production by strains of *Azospirillum* isolated from petroleum-contaminated sites. *Water Air Soil Poll*, 226:401. doi: 10.1007/s11270-015-2659-0.
- Petroleumworld. (2009). PDVSA Intevep impulsa el uso de materia prima agrícola en materia de energía. Consultado en: <http://www.petroleumworldvw.com/aceite de.html>. Fecha de consulta. Julio de 2015.
- Proffitt, C., Devlin, D., & Lindsey, M. (1995). Effects of oil on mangroves seedlings grown under different environmental conditions. *Mar Pollut Bull*, 30, 788-793. doi: 10.1016/0025-326X(95)00070-4.

- Ramírez, M., Ferrera, R., Alarcón, A., Almaráz, J., Ramírez, G., De Bashan, L., Esparza, F., & García, O. (2014). Identification of culturable microbial functional groups isolated from the rhizosphere of four species of mangroves and their biotechnological potential. *Appl Soil Ecol*, 82, 124. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.05.001.
- Rodríguez, M., Troche, C., Vázquez, A., Márquez, J., Vázquez B., Valderrama, L., Velázquez, S., Cruz, M., Ressler, R., Uribe, A., Cerdeira, S., Acosta, J., Díaz, J., Jiménez, R., Fueyo, L., & Galindo, C. (2013). Manglares de México/Extensión, distribución y monitoreo. SENER, 2014 Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México D.F. 128 p.
- SAS Institute Inc. (2004). SAS/STAT Software: Changes and Enhancements. Release 9.1. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- SEMARNAT. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diciembre, 2010.
- SENER. (2014). Prospectiva de petróleo crudo y petrolíferos 2014-2028. Secretaría de Energía. México, D.F. 209 p.
- Simola, L. (1985). Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula f. purpurea*. *Scientia Horticulturae*, 26, 77-85. doi: 10.1016/0304-4238(85)90104-9.
- Tansel, B., Arreaza, A., Tansel, D., & Lee, M. (2015). Decrease in osmotically driven water flux and transport through mangrove roots after oil spills in the presence and absence of dispersants. *Mar. Pollut. Bull*, 98, 34–39. doi: 10.1016/j.marpolbul.2015.07.016.

Torres, R. (2015). Evaluación del impacto del petróleo crudo en el crecimiento de dos especies de plántulas de mangle. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Cunduacán, Tabasco. 116 p.

Zavala, J., Castillo, A., Ortiz, C., Palma, J., Juárez, L., Salgado, J., Rincón, E., Moreno, C. y Ramos, R. (2009). Capacidad de uso del suelo urbano en Tabasco, con base en suelo, uso actual y vegetación. Colegio de Postgraduados, SAOP, SERNAPAM y CCYTET. Villahermosa, Tabasco, México. 204 p.

CAPÍTULO V

RESTAURACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO EMULSIFICADO, CON PLÁNTULAS DE *Rhizophora mangle*

Marcia E. Ojeda-Morales¹, Marivel Domínguez-Domínguez^{1✉}, Joel Zavala-Cruz¹, José G. Herrera-Haro², Miguel A. Hernández-Rivera³, Randy H. Adams Schroeder⁴

¹ Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, Periférico Carlos A. Molina km 3.5, Cárdenas, Tabasco, México, C.P. 86500.

² Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, Montecillos, Texcoco, México.

³ Laboratorio de Biotecnología, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Cunduacán-Jalpa Km. 1 Colonia La Esmeralda, Cunduacán, Tabasco, México, C.P. 86400.

⁴ Laboratorio de Biorremediación, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Carretera Villahermosa- Cárdenas Km. 0.5. Villahermosa, Tabasco, México. C.P. 86150

Palabras Clave: *Rhizophora mangle*, petróleo, biosurfactante, suelo contaminado.

5.1 Resumen

Los bosques de manglar son ecosistemas frágiles y muy complejos, con múltiples funciones ecológicas, valor económico y social. En las últimas décadas, estos ecosistemas han sido impactados por derrames de petróleo en zonas con industria petrolera en todo el mundo. Cuando el petróleo se libera en aguas costeras y de estuarios, se adhiere en las raíces finas de árboles y plántulas, y se adsorbe en las superficies oleofílicas de la biota de los manglares, entonces, esta es asfixiada, y muerta en cuestión de días. Como alternativa de solución al problema, se planteó el objetivo de evaluar la restauración de suelos con *Rhizophora mangle*, a través de la aplicación de un tensioactivo de origen bacteriano y otro con base en aceite de pino. Para esto, se colectaron y sembraron propágulos de *R. mangle* en invernadero, sobre macetas con suelo Solonchak-Arenosol y a los tres meses de edad se les derramó petróleo emulsificado. Las variables evaluadas fueron hidrocarburos totales del petróleo y unidades formadoras de colonias. Estas variables fueron analizadas con un

diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 6 y medidas repetidas en tiempo. El Factor A: tipos de tensioactivos (bacteriano y aceite de pino), Factor B: 6 concentraciones de petróleo emulsificado: 0, 30000, 40000, 50000, 60000 y 70000 ppm; tiempo y la interacción tratamiento x tiempo. Cada tratamiento constó de tres repeticiones con mediciones mensuales durante 11 meses. Los resultados de este análisis se mostraron altamente significativos ($Pr < 0.0001$) tanto para efectos principales: Concentración de petróleo emulsificado y Tensioactivo, como para interacción: Tensioactivo x Concentración. Los resultados evidenciaron que la remoción de petróleo en los tratamientos con petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano fue 93.97 % y de pino 81.39 %.

5.2 Introducción

El ecosistema de manglar está conformado por árboles tolerantes a las sales (NaCl) existentes en la zona intermareal cercana a la desembocadura de ríos en latitudes tropicales y subtropicales. Los manglares son reconocidos a nivel mundial como un ecosistema muy importante por su riqueza natural y los servicios ambientales que aportan; así como por el importante papel ecológico y económico que desempeñan. México, junto con Indonesia, Brasil, Nigeria, Australia y Malasia, es uno de los seis países con mayor superficie de este ecosistema. Estos países en conjunto contienen el 50 % de la superficie mundial de manglares (Spalding et al. 2010; Rodríguez et al. 2013; Duke 2016).

Los manglares están ubicados en una zona de transición entre los ecosistemas terrestres y los marinos. Su importancia ecológica reside en las funciones que desempeña en la estabilización y protección de las líneas costeras, proporcionando un área de cría, alimentación y hábitat de numerosas especies de peces, crustáceos, moluscos y lugares de anidamiento de aves costeras (CONABIO 2013).

Los manglares son reconocidos como vulnerables a grandes y crónicos derrames de petróleo, siendo que son un recurso biológico con una serie de servicios ecológicos y económicos altamente beneficiosos (Mukherjee et al. 2006; Duke y Schmitt 2015). Sin embargo, es preocupante que estos servicios han sido poco valorados en las últimas décadas y eso se ha visto reflejado en la sustitución de

estos hábitats naturales, alteraciones y degradación general asociados con el mal manejo de las zonas costeras (Richards y Friess 2016).

Por otra parte, el estado de Tabasco, en México tiene gran contribución a la economía nacional, debido a la industria petrolera. Sin embargo, el mal manejo del petróleo ha dañado una parte considerable de suelos y cuerpos de agua de la región en la franja costera, donde predomina el manglar (Domínguez-Domínguez et al. 2011; Torres 2015). Según la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente de México (PROFEPA), durante el periodo del 2000 al primer semestre del 2014 se reportaron 1475 derrames de petróleo cuantificados en el país, equivalentes a 93.32 miles de barriles (mbls) de los cuales el 30% ocurrieron en Tabasco (37.52 mbls) (PROFEPA 2014).

Tabasco tiene cuatro especies de manglares registradas: mangle rojo (*Rhizophora mangle*), mangle blanco (*Laguncularia racemosa*), mangle negro (*Avicennia germinans*) y mangle botoncillo (*Conocarpus erectus*) (CONABIO 2013). Sin embargo, Requena et al. (2012) mencionan que las especies *R. mangle* y *A. germinans* sufren alteración en su desarrollo morfológico por contaminación de hidrocarburos en comparación con sitios no contaminados. De la misma manera, Torres (2015) indicó que la especie de mangle más susceptible a cambios en la morfología y mortandad por contaminación de petróleo a partir de 40000 ppm de concentración es *R. mangle*.

Numerosas investigaciones señalan que la restauración de un manglar que ha sido severamente dañado puede tomar muchos años; en muchas ocasiones la pérdida es total e irreversible (CONABIO 2009; Duke 2014; Duke 2016). En este contexto, García-López et al. (2006) reportan 27 derrames de petróleo en manglares de tres campos petroleros de Tabasco. Domínguez-Domínguez et al. (2011) mencionan que existen al menos 13 sitios con vegetación de manglar contaminados por campos petroleros que superan el límite máximo permisible (LMP) de hidrocarburos en su fracción pesada, establecidos por la NOM-138-SEMARNAT/ss-2003, afectando la reproducción y el crecimiento de las plantas de mangle.

Por lo tanto, como alternativa para la restauración de suelos de manglar contaminados con petróleo, el objetivo de este estudio fue evaluar la biorremediación de un suelo contaminado con petróleo emulsificado, con plántulas de *R. mangle* en condiciones de invernadero, mediante el análisis de HTP's y UFC.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Colecta de muestras

En México, las especies de manglar están bajo protección especial (SEMARNAT 2010), por lo que para coleccionar propágulos se solicitó permiso ante la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Los propágulos de *R. mangle* fueron coleccionados mediante recorrido en campo, de acuerdo con la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR 2008).

El sustrato se elaboró con suelos coleccionados en sitios de manglar y de dunas. El primer sitio se ubicó en El Bellote, Paraíso, Tabasco con coordenadas 18°24'11.8" latitud norte y 93°11'00.5" longitud oeste, en suelo Solonchak hipersálico gléyico (Domínguez-Domínguez et al. 2011). El segundo se ubicó en dunas costeras bien drenadas al noroeste de Paraíso, Tabasco, con coordenadas 18°25'38.8" latitud norte y 93°12'50.6" longitud oeste, en suelo Arenosol éutrico (Zavala et al. 2009). Los suelos se secaron a la sombra durante cinco días, se mezcló un kilogramo en una proporción 1:1, ya que de acuerdo con CONAFOR (2008), esta es la relación más propicia para un buen desarrollo de plántulas de mangle.

De la misma manera, en estos sitios se llevó a cabo la colecta de propágulos. Éstos fueron seleccionados con uniformidad en longitud, peso y sin daños causados por depredadores y trasladados a un invernadero ubicado en el Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, hasta su siembra en bolsas de polietileno de 10 cm x 25 cm con 1 kilogramo de sustrato (Domínguez 1994).

Los propágulos se sembraron en el sustrato contenido en bolsas de plástico de acuerdo a Domínguez (1994). Una vez establecido el bioensayo, a las plántulas se les aplicó riego con agua de pozo (pH 7.02, conductividad eléctrica 0.69 mS.cm⁻¹) cada 24 horas hasta que completaron tres meses de desarrollo. Una alternativa viable para mitigar el efecto que pudiera tener el petróleo derramado en las

plántulas es emulsificarlo, de tal manera que se disperse antes que impacte a las plántulas menores de 1 año (Duke et al. 2000; Duke 2016), por lo que fue necesario obtener una emulsión caldo:petróleo.

La obtención de tensioactivo bacteriano sintetizado por *A. lipoferum* clasificada como petrofílica y productora de biotensioactivo (Ojeda et al. 2015), fue registrada en el Laboratorio Forestal del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, México. Para su reactivación, las cepas fueron purificadas y aisladas con la técnica de estriado en superficie, en condiciones axénicas (Madigan et al. 2012) y fueron reproducidas en el medio de cultivo Rojo Congo para bacterias fijadoras de nitrógeno. Posteriormente el biotensioactivo producido se mezcló con petróleo (°API=31.97) de acuerdo a su capacidad de emulsión.

5.3.2 Producción de tensioactivo bacteriano

La producción de tensioactivo se realizó en tres contenedores de vidrio de capacidad nominal de 20 L, conteniendo el medio de cultivo Kim (Kim et al. 2000), el cual es un medio estimulador para la producción de tensioactivo. A cada tapón de los contenedores se le instalaron dos tubos de vidrio, de acuerdo al diseño del biorreactor propuesto por Hernández et al. (2011). Para llevar a cabo la producción del tensioactivo bacteriano se colocó la cepa bacteriana *A. lipoferum* en el biorreactor con medio Kim y de acuerdo a Ojeda et al. (2015) se dejó un tiempo máximo de residencia de 72 h para alcanzar la mayor producción del biotensioactivo. Por otra parte, el tensioactivo de pino provino de aceite de madera de pino (*Pinus sylvestris* L.) (Petroleumworld 2009; Cruz 2014).

5.3.3 Establecimiento del bioensayo

Las emulsiones caldo:petróleo fueron agregadas a cada unidad experimental. Antes de realizar la emulsión caldo:petróleo se determinó la capacidad de emulsión, ésta fue de 50% para el caldo:petróleo (emulsión 1:0.5) y para la emulsión tensioactivo con base en pino:petróleo. La mezcla fue agitada 5 min y después agregada al tratamiento correspondiente.

5.3.4 Análisis estadístico

Las variables evaluadas fueron hidrocarburos totales del petróleo y unidades formadoras de colonias y fueron analizadas con un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos 2×6 y medidas repetidas en tiempo, usando el procedimiento GLM y el PROC MIXED de SAS (SAS Inst, Inc., 2004). El modelo para los análisis incluyó los efectos principales de tratamientos: Factor A con 2 tipos de tensioactivos, bacteriano y de pino; Factor B con 6 concentraciones de petróleo, 0, 30000, 40000, 50000, 60000 y 70000 ppm; tiempo 0, 1, 2,...,11 meses de mediciones; y la interacción tratamiento x tiempo. Cada combinación de tratamiento (tipo de tensioactivo x concentración) constó de tres repeticiones con mediciones mensuales. La información fue expresada como medias de mínimos cuadrados \pm EEM (error estándar) y comparadas con la prueba de Tukey ajustada (Herrera y García 2011).

5.3.5 Análisis del sustrato

Los suelos contaminados con petróleo emulsificado con plántulas de *R. mangle* se evaluaron cada 30 días durante 11 meses. Las variables de respuesta fueron: Hidrocarburos totales del petróleo (HTP's) de acuerdo con Fernández et al. (2006). Unidades formadoras de colonias (UFC.g⁻¹) de acuerdo al método de recuento en placas de células viables por diluciones en serie (Madigan et al. 2012). Por otra parte, el pH del suelo fue medido de acuerdo al método AS-02. Apartado 7.1.2. de la NOM-021 (SEMARNAT 2000a) y la determinación del Cloruro de sodio del suelo se realizó con un medidor de salinidad, modelo HI98203 marca HANNA instruments.

El porcentaje de masa de los elementos en el suelo se determinó al inicio del experimento, para conocer las características del suelo de estudio. El análisis se realizó por el método de energía dispersiva de rayos X (EDS) utilizando un microscopio electrónico de barrido (EMB) marca JEOL, modelo JSM-6010LA.

5.4 Resultados y Discusión

Los resultados del análisis de varianza para describir el efecto que pudiera existir entre el factor A: tipo de tensioactivo (bacteriano y de pino), con el factor B: seis

concentraciones de petróleo emulsificado (0, 30000, 40000, 50000, 60000 y 70000 ppm) se mostraron altamente significativos ($Pr < 0.0001$), así como los efectos por interacción: tipo de tensioactivo×Concentración de petróleo emulsificado ($Pr < 0.0001$), con base en estos resultados, el análisis por separado de los efectos principales pierde sentido, ya que el efecto de un factor depende del nivel considerado en el otro factor, por lo que se procedió a analizar el efecto por interacción (Herrera y García 2011). El tiempo se consideró como una variable continua no manipulable, por lo que las interacciones donde éste fuera un factor, se descartaron (Cuadro 1).

Cuadro 1. Análisis de varianza de las variables hidrocarburos totales del petróleo (HTP's) y unidades formadoras de colonias (UFC.g⁻¹) de suelo contaminado con petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano y de pino con plántulas de *R. mangle*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Valor de Pr>F	
		HTP's	UFC
Surfactante	1	< 0.0001	< 0.0001
Concentración	5	< 0.0001	< 0.0001
Surfactante×Concentración	5	< 0.0001	< 0.0001
Tiempo	11	< 0.0001	< 0.0001
Surfactante×Tiempo	11	< 0.0001	< 0.0001
Concentración×Tiempo	55	< 0.0001	< 0.0001
Surfactante×Concentración*Tiempo	55	< 0.0001	< 0.0001
R²		0.9996	0.9994

El efecto del tipo de tensioactivo bacteriano y de origen de pino no es el mismo en todas las concentraciones de petróleo, por lo que se comparó la diferencia entre los dos tensioactivos en una concentración de petróleo con respecto a otra concentración, y se analizó en una gráfica la interacción de primer orden, donde de acuerdo a Garrido (2008) se utilizan comparaciones que involucran cuatro medias (Fig. 1).

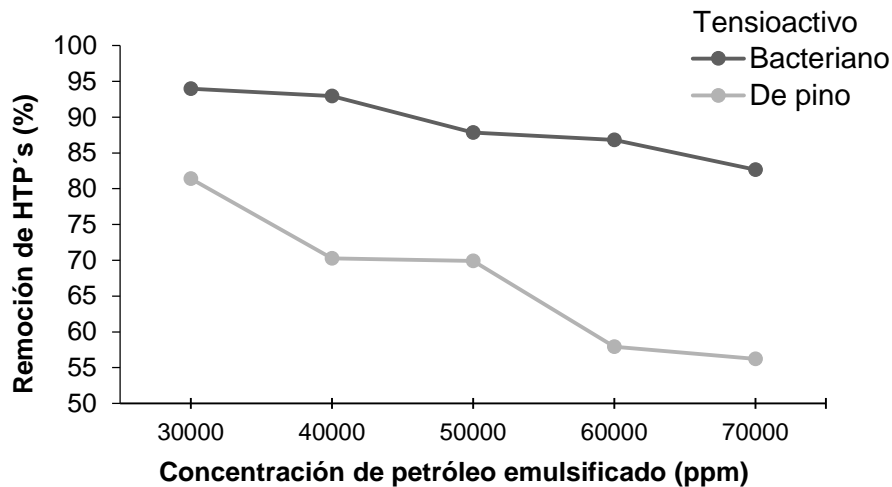


Figura 1. Efecto de las concentraciones de petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano y de pino en la remoción de hidrocarburos totales del petróleo en suelos contaminados al final del experimento. Valores promedio de remoción de HTP's a concentraciones de 30000, 40000, 50000, 60000 y 70000 ppm.

En este contexto, León y Montero (2001) mencionan que cuando las líneas en las gráficas no son paralelas existe una interacción y ésta depende del efecto de las variables independientes. Se denomina variable independiente principal, aquella representada en el eje de las abscisas y variable independiente condicionante, aquella que genere las condiciones en las que se da la principal. Si las líneas de la gráfica de interacción se separan en sentido vertical, entonces tendrá un mayor efecto la variable independiente condicionante, pero si las líneas de la gráfica se separan de la horizontal formando un ángulo de inclinación, entonces, la variable que tendrá mayor efecto será la variable independiente principal.

Los resultados del porcentaje de remoción de HTP's al final del tratamiento mostraron que los tratamientos con petróleo emulsionado con tensioactivo bacteriano presentaron mayor remoción de HTP's alcanzando hasta 93.97 % en el tratamiento a 30000 ppm. A la misma concentración, los tratamientos con petróleo emulsionado con tensioactivo de pino alcanzaron 81.39 %, lo que indicó mayor remoción de hidrocarburos totales del petróleo en los tratamientos con tensioactivo bacteriano.

A los 2 meses del derrame de petróleo emulsificado con tensioactivo de pino, las plántulas de *R. mangle* comenzaron a perder las hojas, llegando a la defoliación total a los 4 meses del derrame, mientras que las plántulas con petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano no tuvieron este comportamiento. Además, la remoción de petróleo emulsificado fue mayor en todos los tratamientos con petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano que con tensioactivo de pino.

En estudios similares, Moreira et al. (2011) evaluaron sedimentos contaminados por petróleo con *R. mangle* y testigo (sin *R. mangle*), se observó una eficiencia mayor en la remoción de petróleo por fitorremediación (87 %) que la alcanzada por biorremediación sin vegetación de *R. mangle* (70 %). Esta mayor eficiencia presentada por la remediación de la planta se potenció con el mayor crecimiento de bacterias en su rizósfera, alcanzando hasta 31×10^6 UFC.g⁻¹. También se observó un mayor crecimiento de longitud de planta (46.3 cm) expuestas a sedimentos contaminados, en comparación con los cultivados en sedimentos de referencia (34.4 cm), lo que sugiere una buena adaptación. Otra variable que puede influir en la respuesta del hábitat, es la sensibilidad de las especies de mangle ante un derrame de petróleo (Lewis et al. 2011).

Por otra parte, en este estudio, los hidrocarburos totales del petróleo fueron disminuyendo con respecto al tiempo. La remoción mayor de petróleo emulsificado fue con tensioactivo bacteriano de 94 % a 30000 ppm, mientras que con tensioactivo de pino fue de 56 % a 70000 ppm. Esta diferencia puede ser debido a que a concentraciones mayores de petróleo existe mayor toxicidad (Rivera-Cruz, 2016), pudiendo provocar condiciones tóxicas para los microorganismos petrofilicos que pudieran ayudar al proceso de biorremediación. Aunado a esto, Moreira et al. (2011) reportan que la población de microorganismos en suelos sin plantas de *R. mangle* mostraron una disminución de 78.32 % en las UFC.g⁻¹, mientras en los suelos con *R. mangle*, la población microbiana aumentó un 243 %, demostrando una fuerte relación microorganismos-planta.

El sustrato de este estudio, estuvo compuesto por la mezcla de suelo tipo Solonchak hipersálico gléyico y suelo tipo Arenosol éutrico presentó características de Densidad (1.2 g.L⁻¹), análisis granulométrico: arena 58.9 %, limo 41 % y arcilla

0.1 %; conductividad eléctrica 1.13 mS/cm, pH 7.2, cloruros (Cl^{-1}) 283.6 ppm, fósforo disponible 3.63 mg.kg^{-1} , materia orgánica 1.345 % y nitrógeno total 1.4 %. El análisis elemental de barrido dio como resultado (%mol): carbono 15.31, nitrógeno 0.84, oxígeno 59.57, sodio 1.07, magnesio 1.32, aluminio 5.1, silicio 13.5, fósforo 0.08, potasio 0.73, calcio 0.65 y titanio 0.17.

La materia orgánica tiene propiedad mayormente oleofílica y favorece la retención de aceite y otros contaminantes (Santos et al. 2011). El sustrato de este estudio tuvo de materia orgánica 1.34 %, lo cual está considerado como bajo (materia orgánica para suelos minerales <0.6-1.5%) (SEMARNAT 2000b). Las plántulas en los tratamientos con concentraciones de petróleo emulsificado mayor a 50000 ppm tuvieron la menor biomasa total seca en el bioensayo en comparación con concentraciones menores. Sin embargo, la mortandad de plántulas de *R. mangle* se redujo un 100% (Ojeda et al. com. pers.).

Los resultados anteriores confirman, que los impactos con petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano podrían minimizarse, ya que se remueve hasta el 93.97 % de HTP's. Estos resultados ofrecen ventaja para suelos de manglar impactados por petróleo, ya que según Duke et al. (2016) y Lewis et al. (2011), en los bosques de manglar contaminados por petróleo, se puede observar a través de largos periodo de tiempo (hasta décadas), síntomas como muerte de árboles, defoliación de árboles y adelgazamiento de tallo, amarilleamiento de hojas, reducción del crecimiento de la altura de los árboles sobrevivientes y el establecimiento de plantas no muy sanas. Esto puede ser debido a que los sedimentos, especialmente de manglares son a menudo de grano fino, y ricos en materia orgánica en los cuales se adhiere el contaminante.

Al final del experimento, la densidad poblacional de bacterias (UFC.g^{-1}) fue mayor en los tratamientos con petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano que con pino. Cabe mencionar que en los tratamientos con petróleo emulsificado con tensioactivo de pino, hubo un 100 % de mortandad de plántulas de *R. mangle*, por lo que de acuerdo a Moreira et al. (2011) es posible que ya no existía asociación entre la rizósfera de las plántulas con la comunidad de microorganismos, lo cual se refleja en la disminución de UFC.g^{-1} .

La densidad poblacional se muestra inversamente proporcional con la concentración de petróleo emulsificado. El tensioactivo con base en aceite de pino resultó eficaz para dispersar el petróleo, pero por su naturaleza química resultó tóxico para plántulas de *R. mangle* y microorganismos rizosféricos (Fig. 2).

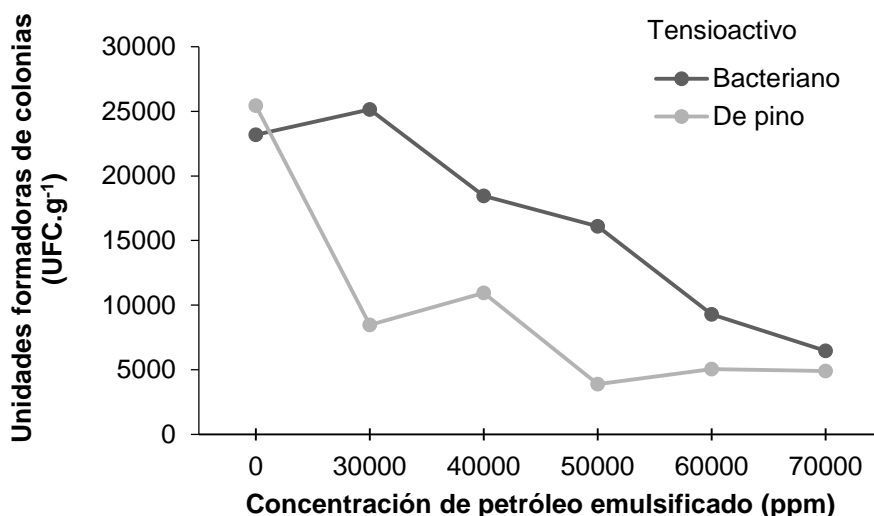


Figura 2. Efecto de las concentraciones de petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano y de pino en las unidades formadoras de colonias en suelos contaminados, y graficado con valores promedio a concentraciones de 30000, 40000, 50000, 60000 y 70000 ppm.

El aceite de pino es una mezcla de mono terpenos y sesquiterpenos, con aproximadamente 57 % de alfa-pineno como su principal componente (Foitzick 2008). El alfa-pineno es considerado el monoterpene más abundante y químicamente explotado por la industria por ser accesible y barato, siendo la base de la mayor parte de las síntesis en la familia de los terpenoides (Liu 2005). Garzona (2015) describe al alfa-pineno como un elemento altamente reactivo conocido por su efectividad como antimicrobiano y citotóxico para las plantas; esto indicó que, cuando la emulsión tensioactivo de pino-petróleo fue vertida a nivel de sustrato, su efecto principal constituyó posiblemente en la desactivación de la microbiota característica de la rizósfera de la planta, inhibiendo así, la acción bioestabilizadora y remediadora que desempeñan los microorganismos presentes para ayudar a la metabolización del petróleo vertido.

Por otra parte, este monoterpeneo es considerado una sustancia bioacumulable, capaz de ser absorbida por organismos vivos. Las plántulas de *R. mangle* a través del conjunto de raíces son capaces de absorber el alfa-pineno del sustrato, lo que puede provocar la lisis celular de las estructuras internas de la plántula, deteriorándolas así de forma agresiva desde el interior, afectando principalmente los cambios en la permeabilidad de la membrana celular debido a la naturaleza anfipática de las moléculas que componen el tensioactivo, impidiendo la absorción de nutrientes, y el intercambio de gases esenciales (O₂), al obstruir las lenticelas en tallos y raíces de la plántula, lugar donde este fenómeno se lleva a cabo (Costa y Alvez 2006).

La comunidad microbiana de sedimentos con vegetación suele ser mayor que aquellos sin plantas (Rivera-Cruz et al. 2004). Es importante destacar que la presencia de contaminantes y los exudados de las raíces, por lo general modifican la composición y la actividad de las comunidades bacterianas (Walton et al. 1994; Espinosa et al. 2005). Esta concentración mayor de bacterias en sedimentos contaminados, también fue evidenciado por otros estudios que evaluaron la degradación de compuestos orgánicos (Espinosa et al. 2005) quienes confirmaron que el crecimiento de los microorganismos degradadores de petróleo fue favorecido por la presencia de la planta.

R. mangle produce compuestos alelopáticos (terpenoides, ácido oxálico, ácido acético, ácido succínico y ácido butírico), similares a los compuestos orgánicos que estimulan las defensas de las comunidades de microorganismos frente a las condiciones de estrés ambiental, además de que la rizósfera permita la posible entrada de oxígeno (Siciliano et al. 2001; Weibner et al. 2002). En otros estudios que evalúan la degradación de compuestos tóxicos también encontraron la presencia de compuestos exudados por las raíces, tales como carbohidratos, ácidos orgánicos y aminoácidos, los cuales probablemente podrían haber estimulado la degradación de los contaminantes (Joner et al. 2005).

5.4.1 Respuesta a través el tiempo de los tratamientos con tensioactivo bacteriano
Los tratamientos que permitieron el porcentaje mayor de remoción de hidrocarburos totales del petróleo y el número mayor de UFC.g⁻¹ fueron los que presentaban la emulsión tensioactivo bacteriano-petróleo, en contraste con los tratamientos con tensioactivo de pino, los cuales fueron menos efectivos.

Resulta interesante profundizar el estudio del efecto de la emulsión tensioactivo bacteriano-petróleo en cada variable de respuesta a través del tiempo. Para ello, a los seis tratamientos con emulsión tensioactivo bacteriano-petróleo se les realizó un análisis de varianza, durante los 11 meses de evaluación. Los resultados obtenidos indicaron que la interacción Tratamiento×Tiempo fue significativa para las variables hidrocarburos totales del petróleo (Pr<0.0001) y UFC.g⁻¹ (Pr<0.0001); esto evidenció que las tendencias en el tiempo de cada variable están íntimamente relacionadas con la cantidad de la emulsión adicionada en cada tratamiento con tensioactivo bacteriano (Cuadro 2).

Los hidrocarburos totales del petróleo disminuyeron durante los 11 meses de evaluación. Hubo una disminución de 92.93%, 87.84%, 86.82% y 82.64%, en los tratamientos de 30000, 40000, 50000, 60000 y 70000 ppm respectivamente (Figura 3).

Cuadro 2. Análisis de medidas repetidas para la variable hidrocarburos totales del petróleo (HTP's). Efecto simple por tratamiento (Concentración de petróleo emulsificado), periodo (Tiempo de evaluación del sustrato) e interacción (Tratamiento×Periodo). Prueba de comparación de medias Tukey de mínimos cuadrados, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

Test de hipótesis de efectos fijos													
Pr>F													
Tratamiento: Concentración de petróleo emulsificado (ppm)				Periodo: Tiempo de evaluación (meses)				Tratamiento×Tiempo					
Pr<.0001				Pr<0.0001				Pr<0.0001					
Efectos simples													
Tratamiento: petróleo emulsificado (ppm)													
0	30000		40000		50000		60000		70000		Error estándar		
18530	13700		24630		30490		38410		46920		125.20		
E	E		D		C		B		A				
Prueba de medias por Periodo													
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Error estándar	
41667	38705	36927	35295	34080	31635	28770	20880	15747	11498	7979	5127	174.68	
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L		
Efecto por interacción: Tratamiento×Tiempo													
Tratamiento: Concentración de petróleo emulsificado (ppm)		Periodo: Tiempo de evaluación (meses)											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0		1.09x10 ⁻¹¹	1.46x10 ⁻¹¹	1.09x10 ⁻¹¹	2.91x10 ⁻¹¹	7.28x10 ⁻¹¹	2.91x10 ⁻¹¹	2.55x10 ⁻¹¹	1.46x10 ⁻¹¹	1.46x10 ⁻¹¹	3.64x10 ⁻¹²	364x10 ⁻¹⁴	5.82x10 ⁻¹¹
		F	F	F	F	F	F	F	F	D	E	E	E
30000		30000	27456	24428	22257	16365	8511.55	10145	7198.46	6736.70	6055.38	3426.52	1804.57
		E	E	E	E	E	E	E	E	C	D	D	D
40000		40000	36466	33281	32945	32104	31975	28878	21274	16666	11480	7653.52	2825.17
		D	D	D	D	D	D	D	D	B	C	C	D
50000		50000	46398	45394	42364	41676	39006	32834	23134	17467	13360	8215.88	6075.06
		C	C	C	C	C	C	C	C	B	B	C	C
60000		60000	54794	53613	51503	52336	48444	42186	32823	26243	18698	11303	7906.09
		B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	B	B
70000		70000	67118	64843	62713	62003	61876	58576	40852	27372	19396	17274	12149
		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

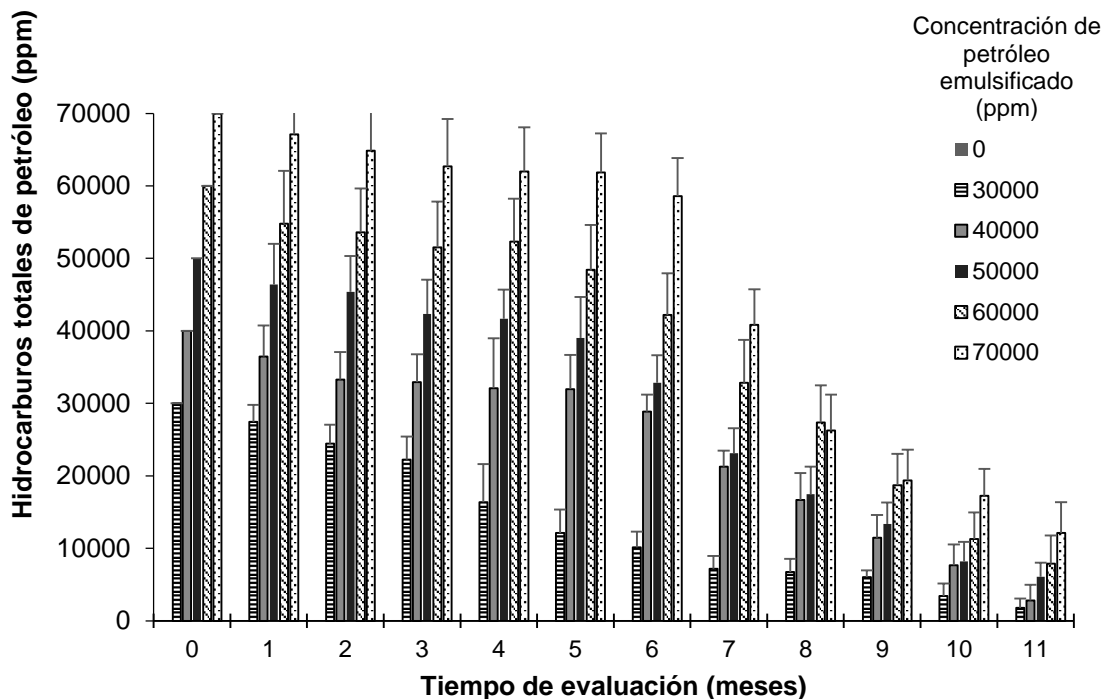


Figura 3. Efecto de las concentraciones de petróleo emulsificado en la degradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP's) durante los 11 meses de evaluación. Las barras representan la desviación estándar de tres repeticiones.

La remoción de petróleo fue mayor a concentraciones menores de petróleo y fue disminuyendo inversamente proporcional a la concentración del contaminante. Los suelos contaminados con petróleo tienen poca oxigenación debido a la cubierta hidrofóbica que provee el petróleo. Sin embargo, el biotensioactivo permite humectar los suelos donde el oxígeno se utiliza generalmente como aceptor final de electrones en el metabolismo microbiano, y su limitación es una razón principal para la reducción de la biodegradación de petróleo en los suelos de manglares. La importancia del oxígeno proviene de la participación de oxigenasas y oxígeno molecular en las vías principales de degradación de hidrocarburos.

En los manglares, la tasa de difusión de oxígeno en el sedimento se reduce debido a las inundaciones diarias por las mareas (Barbier et al. 2008; Li et al. 2009; Tsai et al. 2009) o por estaciones, sobre todo los asociados con sistemas deltaicas: río Papaloapan, río Coatzacoalcos, río Tonalá, río González, Usumacinta en México, así como en otros países (Amazona, Orinoco, Níger, Ganga, etc.).

La mayor remoción de petróleo fue en el suelo con vegetación de manglar. Esto puede deberse a que, en el sedimento de manglar, la transformación y rizodegradación de hidrocarburos totales del petróleo son procesos importantes que ocurren durante la fitorremediación. La degradación microbiana en la rizósfera (rizodegradación) puede ser el mecanismo principal para limpiar una variedad de suelo contaminado por petróleo, incluyendo plantas acuáticas (Rivera-Cruz et al. 2016) y sedimentos de manglar. Esto ocurre porque los contaminantes, tales como los hidrocarburos de petróleo son altamente hidrofóbicos, y su absorción en el suelo reduce su biodisponibilidad para la captura por plantas y, en consecuencia, su fitotransformación (Kamath et al. 2004; Pérez-Hernández 2013). El éxito de la rizodegradación depende de la presencia e interacción entre microorganismos específicos, condiciones ambientales adecuadas y disponibilidad (Moreira et al. 2011).

Otro factor que pudo afectar a la restauración de suelo contaminado con petróleo es la biodisponibilidad de los contaminantes, siendo baja para los hidrocarburos policíclicos aromáticos, debido a su naturaleza altamente hidrofóbica y su fuerte tendencia a ser absorbida por sedimento. La aplicación de los agentes movilizadores es una forma de aumentar la desorción y disolución de contaminantes orgánicos hidrofóbicos en los sedimentos, y como resultado el proceso de biodegradación. El uso de disolventes orgánicos como biotensioactivos es una alternativa para aumentar la biodisponibilidad del petróleo mejorando la tasa de biodegradación.

Cuando el petróleo se libera en aguas costeras y de estuarios, se deposita en las raíces finas de la vegetación donde es adsorbido. Las plántulas mueren en su mayoría en pocos días. Por el contrario, los árboles adultos y arbustos más altos, al cubrirse con petróleo únicamente sus raíces y sedimentos podrían persistir durante seis o más meses, antes de morir. Los sedimentos contaminados por petróleo provocan mortandad en plántulas, y son asfixiadas y muertas ante un derrame. Los hidrocarburos más ligeros son los más tóxicos (Duke y Burns 1999; Duke y Burns 2003).

Es posible que no siempre se produzcan efectos negativos en las plantas, su crecimiento o reproducción debido a los derrames de petróleo. Adams et al. (2015) estudiaron áreas de ecosistemas de manglar, pantano de agua dulce (*Pachira aquatica*), pantano y pasto en la llanura costera y terrazas del Plioceno-Pleistoceno. Detectaron toxicidad significativa en los suelos orgánicos no contaminados (22.2 - 49.1 unidades de toxicidad (TU) comparables a los niveles encontrados en áreas contaminadas con hidrocarburos (22.3 - 42.0 TU). Es interesante conocer que la toxicidad en los suelos orgánicos fue mucho mayor, que la encontrada en los suelos minerales con niveles de cuantificación por debajo de 9.3 TU).

La adición del petróleo emulsificado representó una bioaumentación debido a que el tensioactivo bacteriano no se agregó puro, sino inmerso en el medio de cultivo con biomasa. Cantidades altas de UFC.g⁻¹ fueron determinadas en los tratamientos a 0 ppm (\bar{x} 121124), 30000 ppm (\bar{x} 117262), 40000 ppm (\bar{x} 132059) y 50000 ppm (\bar{x} 120114.66) inmediatamente después de la contaminación (Fig. 4).

El número de UFC.g⁻¹ descendió drásticamente de diciembre a Mayo. Hubo una disminución de 95, 90, 94, 98 y 96 % en los tratamientos a 30000, 40000, 50000, 60000 y 70000 ppm respectivamente. Al parecer, los valores de UFC.g⁻¹ son más relacionados a heterótrofos en general y no a los microorganismos degradadores de hidrocarburos. Por esto, cuando se consumen los sustratos orgánicos fácilmente biodegradables, la cantidad de UFC.g⁻¹ disminuye (tiempo de evaluación 1-5 meses). Subsecuentemente, entre los 6-8 meses se reduce más fuertemente los HTP's, con una segunda población de microorganismos, descomponiendo tal vez, los hidrocarburos menos disponibles, o los de fracción más pesada). Posteriormente, se incrementa las UFC.g⁻¹ entre los 9-11 meses, tal vez usando los subproductos de la biodegradación de hidrocarburos.

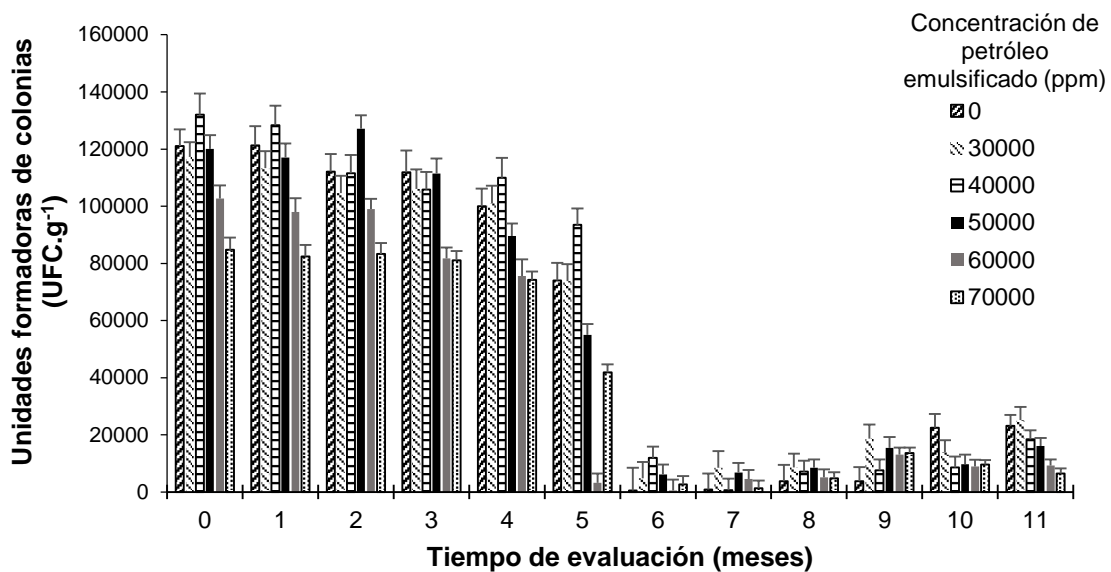


Figura 4. Efecto de las concentraciones de petróleo emulsificado en las unidades formadoras de colonias (UFC.g⁻¹) durante los 11 meses de evaluación. Las barras representan la desviación estándar de tres repeticiones.

Al mismo tiempo, el análisis elemental de barrido del suelo contaminado por petróleo mostró 0.02 % magnesio, 0.05 % aluminio, 0.002 % titanio, entre otros. Los metales pesados son bioacumulables y podrían causar efectos inmediatos como inhibición del crecimiento normal y el desarrollo de las plantas, así como la disminución de las poblaciones microbianas del suelo (Prieto et al. 2009).

En el suelo, los metales pesados como iones libres, pueden tener acción directa sobre los seres vivos lo que ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos -SH (sulfhidrilos) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos. Repercutiendo en la degradación de HTP's.

La interacción tratamiento (petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano) × tiempo fue significativa (Pr<0.0001), lo que indicó que ambos factores influyeron en el crecimiento poblacional microbiana. El efecto por concentración de petróleo resultó significativo (Pr<0.0001), siendo el tratamiento a 30000 ppm de petróleo

el que presentó el mayor crecimiento poblacional durante el experimento (Cuadro 3).

Al respecto Cortés et al. (2013) señalan que la aplicación de petróleo emulsificado con tensioactivos bacterianos reduce sus efectos negativos sobre plántulas, separando sus fases y aumentando la humectación. El biotensioactivo producido por *A. lipoferum* tiene lipopéptidos (Ojeda et al. 2015). Los lipopéptidos son compuestos clasificados de bajo peso molecular y que además poseen excelentes propiedades emulsificantes, dispersantes y humectantes con capacidad para reducir la tensión superficial (Ojeda et al. 2016).

Cuadro 3. Análisis de medidas repetidas para la variable Unidades formadoras de colonias (UFC.g⁻¹). Efecto simple por tratamiento (Concentración de petróleo emulsificado), periodo (Tiempo de evaluación del sustrato) e interacción (Tratamiento×Periodo). Prueba de comparación de medias Tukey de mínimos cuadrados, medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$).

Test de hipótesis de efectos fijos													
Pr>F													
Tratamiento: Concentración de petróleo emulsificado (ppm) Pr <0.0001			Periodo: Tiempo de evaluación (meses) Pr <0.0001					Tratamiento×Tiempo Pr <0.0001					
Efectos simples													
Tratamiento: Concentración de petróleo emulsificado (ppm)													
0	30000		40000		50000		60000		70000		Error estándar		
57930 B	57988 B		61303 A		56926 C		41820 D		40510 E		32.2762		
Edad de plántulas (meses)													
3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Error estándar	
113001 A	110065 B	106296 C	99682 D	91781 E	56907 F	4429 J	3805 K	6324 I	12038 H	12189 H	16438 G	51.360	
Efecto por interacción: Tratamiento×Tiempo													
Tratamiento: Concentración de petróleo emulsificado (ppm)		Periodo: Tiempo de evaluación (meses)											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0		121125 B	121344 B	112132 B	111895 A	100046 C	73986 B	578.43 E	856 ED	3746.67 D	3796.33 F	22471 A	23187 B
30000		117263 D	113328 D	104653 D	106057 B	101057 B	73813 B	4749 C	8534 A	8604.33 A	18717 A	13927 B	25149 A
40000		132059 A	128336 A	111532 C	105855 B	110027 A	93506 A	11915 A	637 E	7132.67 B	7625.67 E	8549.67 D	18459 C
50000		120115 C	117000 C	127107 A	111422 A	89647 D	55026 C	6150 B	6850 B	8529.67 A	15424 B	9740.67 C	16100 D
60000		102654 E	98008 E	99023 E	81732 C	75645 E	3250 E	532.33 E	4605.67 C	5180 C	13048 D	8890 D	9277 E
70000		84789 F	82376 F	83331 F	81130 D	74262 F	41858 D	2649 D	1348.67 D	4749.67 C	13618 C	9552.67 C	6453.67 F

De acuerdo con esto, los tensioactivos bacterianos rompen la tensión superficial e interfacial entre las fases líquido/líquido y gas/líquido formando micelas en un entorno polar y relacionándolas estrechamente con la concentración micelar crítica, la cual representa la concentración mínima de tensioactivo para que ocurra espontáneamente la formación de micelas. Por lo tanto, el tensioactivo bacteriano generado por *A. lipoferum* redujo la tensión superficial y produjo emulsiones. Ambas acciones permitieron aumentar la transferencia de masa, ayudando a que las fuentes de carbono de baja solubilidad sean biodisponibles para su biodegradación, e introducirlos a las diferentes rutas metabólicas para la generación de energía y síntesis de biomasa. Este proceso pudo haber permitido la degradación de petróleo, el crecimiento de la población bacteriana y crecimiento de plántulas de *R. mangle*.

Es importante obtener datos de dosis-respuesta de los derrames de petróleo en suelos y seguir los procesos de largo plazo asociadas con la acumulación y la descomposición del aceite en el sedimento, debido a que hay complejas interrelaciones entre plantas-suelo-microorganismo, y es claro que cada uno depende del otro de manera significativa. Por lo tanto, una disminución en la condición de uno de ellos afectará el bienestar de los otros tipos.

5.5 Recomendaciones

Finalmente es importante evaluar este modelo de restauración en condiciones *in situ* a gran escala y un periodo mayor de 1 año, para conocer su efectividad; así como analizar la asociación de microorganismos rizosféricos-plántulas de mangle, y estudios que evalúen a la plántula como fitorremediadora.

5.6 Conclusión

El suelo contaminado a 30000 ppm de petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano en condiciones de invernadero, presentó la remoción mayor de hidrocarburos totales del petróleo (93.97 %) y crecimiento poblacional bacteriano, en comparación con los tratamientos con petróleo emulsificado con tensioactivo de pino, los cuales generaron la máxima remoción de hidrocarburos totales del petróleo de 81.39 % y el crecimiento

máximo de UFC.g⁻¹ de 8463. El mayor crecimiento de las plántulas de *R. mangle* se obtuvo en los tratamientos con petróleo emulsificado con tensioactivo bacteriano.

La aplicación de la emulsión caldo:petróleo, alcanzó la mayor remoción de hidrocarburos totales de petróleo, reafirmando esta técnica como algo prometedor en la restauración de suelo contaminado por petróleo, con vegetación de *R. mangle*, por lo que podría considerarse una técnica de corrección de ecosistemas de gran importancia ecológica.

5.7 Agradecimientos

Esta investigación es parte del proyecto doctoral titulado “Restauración de suelo contaminado por petróleo, con vegetación de manglar en Tabasco”. Se agradece al Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, por las facilidades otorgadas para llevar a cabo el experimento y a la Ing. Irma Elisa Juárez Palacios por su participación activa en el trabajo de investigación.

5.8 Referencias

- Adams, R. H., Domínguez-Rodríguez, V. I. & Zavala-Cruz, J. (2015). *Vibrio fischeri* Bioassay for determination of toxicity in petroleum contaminated soils from tropical Southeast Mexico. *Sains Malaysiana*, 44, 337–346.
- Anderson, T. A., Guthrie, E. A. y Walton, B. T. (1993). Bioremediation in the rhizosphere, *Environ. Sci. Technol*, 27, 2630–2636.
- Barbier, E. B., Koch, E. W., Siliman, B. R., Hacker, S. D., Wolanski, E., y Primavera, J. (2008). Coastal ecosystem based management with nonlinear ecological functions and values. *Science*, 318, 321–323.
- CONAFOR. (2008). Conservación y restauración de manglares: Manual de experiencias comunitarias. Consejo Nacional Forestal. 144 p.

- CONABIO. (2009). Manglares de México: Extensión y distribución. 2ª ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 99 pp.
- CONABIO. (2013). Manglares de México. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. 108 p.
- Cortés, A., Troconis, I. y Jaramillo, M. (2013). Surfactantes biológicos con aplicación potencial en tecnología de alimentos: una revisión. *Biológicas*, 8, 21-29.
- Costa, L. y Alves, L. (2006). Evaluation of the impacts of petroleum hydrocarbonates in the reproductive cycle of *Avicenia shaueriana*, *Rizophora mangle*, and *Laguncularia racemosa* in Brazilian mangroves. *J of coastal research*, 3, 1459-1462.
- Cruz, D. (2014). Evaluación de los aceites esenciales (alfa-pineno y limonene) contra el crecimiento de *Staphylococcus aureus* productores de enterotoxinas *in vitro*. Tesis de licenciatura. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Honduras. 41 p.
- Domínguez, M. (1994). Evaluación del crecimiento de plántulas de *Rhizophora mangle* L. bajo diferentes condiciones de sustrato e intensidad de Luz. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 102 p.
- Domínguez-Domínguez, M., Zavala-Cruz, J., Martínez-Zurimendi, P. (2011). Manejo forestal de los manglares de Tabasco. Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. México. 137 p.
- Duke, N.C., (2014). Mangrove Coast. *In*: Harff, J., Meschede, M., Petersen, S., Thiede, J. (Eds.), *Encyclopedia of Marine Geosciences*. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 1–17.

- Duke, N.C. 2016. Oil spill impacts on mangrove: Recommendations for operational planning and action based on global review. *Marine pollution bulletin*, 109, 700-715. doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.082.
- Duke, N. C. y Burns, K. A. (1999). Fate and effects of oil and dispersed oil on mangroves ecosystems in Australia. Final report to the Australian petroleum production exploration association. Australian Institute of Marine Science and CRC Reef Research Centre.
- Duke, N. C. y Burns, K. A. (2003). Fate and effects of oil and oil disperse on mangroves ecosystems in Australia. Environmental implications of offshore oil and gas development in Australia: Further research. A compilation of three scientific marine studies. Australian Petroleum Production and Exploration Association (APPEA), Canberra. Pp. 232-363.
- Duke, N. C., Burns, K. A., Swannell, R. P., Dalhaus, O. and Rupp, R. (2000). Dispersant use and a bioremediation strategy as alternate means of reducing impacts of large oil spills on mangroves: The Gladstone field trials. *Marine pollution bulletin*, 41, 403-412. Matter PII: S0025-326X(00)00133-8.
- Duke, N. C. y Schmitt, K. (2015). Mangroves: Unusual forests at the seas edge, *in*: Pancel, L., M. (Eds), Tropical forest handbook. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Espinosa, E., Martínez, M. E., Torres, E. F. y Rojas, M. G. (2005). Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere*, 59, 405–413.
- Fernández, L. C., Rojas, N. G., Roldán, T. G., Ramírez, M. E., Zegarra, H. G., Uribe, R., Reyes, R. J., Flores, D., Arce, J. M. (2006). *Manual de técnicas de análisis de*

suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo. México.

Foitzick, M. (2008). Alfa-pineno en el humedal del Rio Cruces. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile: Facultad de Ciencias. Escuela de Química y Farmacia. Valdivia, Chile. 73 p.

García-López, E., Zavala-Cruz, Joel., Palma-López, D. J. (2006). Caracterización de las comunidades vegetales en un área afectada por derrames de hidrocarburos. *TERRA Latinoamericana*, 24, 17-26. Universidad Autónoma Chapingo. México.

Garrido, J. (2008). La interacción entre factores en el análisis de varianza: errores de interpretación. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Psicología. España, Madrid. 245 p.

Garzona, L. (2015). Isomerización de alfa-pineno sobre heteropolicompuesto. Tesis doctoral. Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata. 233 p.

Hernández, M., Ojeda, M., Martínez, J., Córdova, Y. (2011). Optimal parameters for *in vitro* the development of the hydrocarbonoclastic microorganism *Proteus* sp. *Soil Sci. Plant Nutr*, 11, 29-43. doi:10.4067/S0718-95162011000100003.

Herrera, J. y García, C. (2011). Bioestadística en ciencias veterinarias. Procedimientos de análisis de datos con SAS. Ed. Colegio de Postgraduados, Universidad Complutense de Madrid. Madrid. 250 p.

Joner, E. J., Corgie, S., Amellal, N., Leyval, C. (2005). Nutritional constraints to PAH degradation in a rhizosphere model. *Soil Biol Biochem*, 34, 859–864.

Kamath, R., Rentz, J. A., Schnoor, J. L. y Álvarez, P. J. (2004). Phytoremediation of hydrocarbon contaminated soils: principles and applications, *in*: R. Vazquez-

Duhalt, R. Quintero-Ramirez (Eds.), Studies in surface science and catalysis, Elsevier.

Kim, H., Jong, L., Dong, L. (2000). Purification and characterization of biosurfactans from *Nocardia* sp. L. 417. *Biotechnol. Appl. Biochem*, 31, 249-253. doi:10.1042/BA19990111.

León, O. y Montero, I. (2001). Cómo explicar el concepto de interacción sin estadística: análisis gráfico de todos los casos posibles en un diseño 2 x 2. *Psicothema*. 13, 159-165.

Lewis, M., Pryor, R. y Wilking, L. (2011). Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangroves ecosystems: a review. *Environ. Pollut*, 159, 2328-2346.

Li, C. H., Zhou, H. W., Wong, Y. S., & Tam, N. F. (2009). Vertical distribution and anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments in Hong Kong, South China. *Sci. of the Total Environ*, 21, 5772–5779.

Liu, W. (2005). Terpenes: Expansión of the Chiral Pool. Handbook of chiral chemical. Ed. D. Ager. NSC Technologies. Illinois, USA. Pp. 83-87.

Madigan, M., Martinko, J., Stahl, A., Clark, D. (2012). *Brock Biology of microorganisms*. 13a. Edición. Pearson Higher education. España. 1152 p.

Moreira I., Oliveira O., Triguiza J., Dos Santos A., Queiroza A., Martinsa C., Silva C., Jesusa R. (2011). Phytoremediation using *Rizophora mangle* L. in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's). *Microchemical J*, 99, 376–382. doi:10.1016/j.microc.2011.06.011.

Mukherjee S., Palashpriya D. Ramkrishna S. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnol*, 24, 509-515.

- Ojeda-Morales, M. E., Domínguez-Domínguez, M., Hernández-Rivera, M. A., Zavala-Cruz, J. (2015). Biosurfactants production by strains of *Azospirillum* isolated from petroleum contaminated sites. *Water, Air & Soil Pollut.* doi: 10.1007 / s11270-015-2659-0.
- Ojeda-Morales, M. E., Domínguez-Domínguez, M., Hernández-Rivera, M. A., Álvarez-Ramírez, J. (2016). Biosurfactant synthesized by *Azospirillum lipoferum* AIM1B2. Characterization and application for environmental protection. *Water, Air & Soil Pollut.* doi: 10.1007/s11270-016-2871-6.
- Pérez-Hernández, I., Ochoa-Gaona, S., Adams Schroeder, R. H., Rivera-Cruz, M. C. & Geissen, V. (2013). Tolerance of four tropical tree species to heavy petroleum contamination. *Water Air & Soil Pollut.* 224:1637 doi 10.1007/s11270-013-1637-7.
- Petroleumworld. (2009). PDVSA Intevep impulsa el uso de materia prima agrícola en materia de energía. Consultado en: <http://www.petroleumworldvw.com/aceite de.html>. Fecha de consulta. Julio de 2015.
- Prieto, J., González, C., Román, A. D., Prieto, F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10, 29-44.
- PROFEPA. (2011). National analysis of environmental emergencies. <http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/211/1/ms/>.
- PROFEPA. (2014). Informe de la Comisión Nacional de Hidrocarburos 2014. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente.

- Ramírez, M., Ferrera, R., Alarcón, A., Almaráz, J., Ramírez, G., De Bashan L., Esparza, F. y García, O. (2014). Identification of culturable microbial functional groups isolated from the rhizosphere of four species of mangroves and their biotechnological potential. *App. Soil Ecol*, 82, 124-132. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.05.001.
- Requena, G., Agraz, C., Vázquez, A., Osti, J., Reyes, J., Chan, C., García, C. (2012). Evaluación del impacto ambiental en la morfometría de plántulas de mangle por petróleo crudo. Ra Ximhai. Universidad Autónoma de Campeche. id= 46123333009.
- Richards, D.R. y Friess, D.A. (2016). Rates and drivers of mangrove deforestation in Southeast Asia, 2000-2012. *PNAS*. 113, 344-349.
- Rivera-Cruz, M.C., Ferrera-Cerrato, R., Sánchez-García, P., Volke-Haller, V., Fernández-Linares, L., Rodríguez-Vázquez, R. (2004). Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.]. *Agrociencia*, 38, 1-12.
- Rivera-Cruz, M. C., Trujillo-Narcía, A., Trujillo-Rivera, E. A., Arias-Trinidad, A. y Mendoza-López, M. R. (2016). Natural attenuation of weathered oil using aquatic plants in a farm in Southeast Mexico. *International J. of Phytoremediation*, 18, 877–884. doi.org/10.1080/15226514.2016.1156632.
- Rodríguez, M., Troche, C., Vázquez, A., Márquez, J., Vázquez, B., Valderrama, L., Velázquez, S., Cruz, M., Ressler, R., Uribe, A., Cerdeira, S., Acosta, J., Díaz, J., Jiménez, R., Fueyo, L., Galindo, C. (2013). *Manglares de México /Extensión, distribución y monitoreo*. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. México D.F. 128 p.

- Santos, H., Carmo, F., Paes, J.S., Rosado, A., Peixoto, R. (2011). Biorremediation of mangroves impacted by petroleum. *Water Air & Soil Pollut*, 216, 329-350.
- SAS Institute Inc. (2004). Logistic Regression Examples Using the SAS System. Version 9.4. First Edition. McGraw Hill. Cary, N.C.163 p.
- SEMARNAT. (2000a). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNACT-2000. Apartado 7.1.2. Método AS-02. Determinación del pH del suelo medido en agua. Diario oficial de la federación, segunda edición. Diciembre del 2002.
- SEMARNAT. (2000b). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNACT-2000. Apartado 7.1.7. Método AS-07. Determinación de materia orgánica del suelo por el método AS-07, de Walkley y Black Diario Oficial de la federación, segunda edición. Diciembre del 2002.
- SEMARNAT. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo.
- Siciliano, S.D., Fortin, N., Mihoc, A., Wisse, W., Labelle, S., Beaumier, D., Ouellette, D., Roy, R., Whyte, L.G., Banks, M.K., Schwab, P, Lee,K. y C.W. Greer. (2001). Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination, *Appl. Environ. Microbiol*, 67, 2469–2475.
- Silva, J., Rocha, M., Rufino, D., Luna, M., Silva, O. y Sarubbo, A. (2014). Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. *Colloid & Surface B*, 117, 36-41. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.02.012.

- Spalding, M., Kainuma, M. y Collins, L. (2010). World Atlas of Mangroves. The Nature Conservancy, UK International Society for Mangrove Ecosystems. Earthscan from Routledge. *J. Article*, 31, 321-332. doi: 10.1007/s13157-011-0224-1.
- Torres, R. (2015). Evaluación del impacto del petróleo crudo en el crecimiento de dos especies de plántulas de mangle. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Cunduacán, Tabasco. 116 p.
- Tsai, J. C., Kumar, M. y Lin, J. G. (2009). Anaerobic biotransformation of fluorene and phenanthrene by sulfate-reducing bacteria and identification of biotransformation pathway. *J. of Hazardous Materials*, 164, 847–855.
- Walton, B.T., Guthrie, E.A. y Hoylman, A.M. (1994). Toxicant degradation in the rhizosphere, in: T.A. Anderson, J.R. Coats (Eds.), *Bioremediation through rhizosphere Technology*, ACS Series, 563, Washington DC.
- Weibner, A., Kusch, P., Stottmeister, U. (2002). Oxygen release by roots of typha latifolia and juncus effuses in laboratory hydroponic systems, *Acta Biotechnol*, 1, 209–216.
- Zavala, J., Castillo, A., Ortiz, C., Palma, J., Juárez, L., Salgado, J., Rincón, E., Moreno, C. y Ramos, R. (2009). Capacidad de uso del suelo urbano en Tabasco, con base en suelo, uso actual y vegetación. Colegio de Postgraduados, SAOP, SERNAPAM y CCYTET. Villahermosa, Tabasco, México. 204 p.

CONCLUSIONES GENERALES

El tensioactivo proveniente de *Azospirillum lipoferum* y *Azospirillum brasilense* contienen lípidos polares con grupos funcionales a base de amidas (anillos peptídicos). Son considerados como tensioactivos aniónicos con base en lipopéptidos con capacidad de reducir la tensión superficial.

Este biotensioactivo muestra estabilidad para reducir tensión superficial, estabilidad de la emulsión y capacidad para seguir emulsionando en presencia de hasta el 15% de cloruro de sodio. El tensioactivo bacteriano producido por *A. lipoferum* tiene impacto positivo en la población de *Eisenia foetida* en concentraciones hasta de 50000 ppm y una toxicidad prácticamente nula cuando es derramado en suelos, ya que la concentración letal 50 es de 96,695 ppm. Este biotensioactivo tiene potencial para aplicado en suelo contaminado con petróleo emulsificado, con plántulas de *R. mangle*.

Las plántulas de *R. mangle* en tratamientos con petróleo emulsificado con tensioactivo sintetizado por *A. lipoferum* presentaron mayor crecimiento de área foliar, longitud de tallo, diámetro de tallo, e incremento de biomasa total seca y biomasa total húmeda, que las plántulas en tratamientos con petróleo emulsificado con tensioactivo con base en aceite de pino

La aplicación de la emulsión caldo:petróleo, alcanzó la mayor remoción de hidrocarburos totales de petróleo, reafirmando esta técnica como algo prometedor en la restauración de suelo contaminado por petróleo, con vegetación de *R. mangle*, por lo que podría considerarse una técnica de corrección de ecosistemas de gran importancia ecológica.