



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**MODELOS DE CLASIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN  
QUIMIOMÉTRICA DE HIDROCARBUROS FRACCIÓN  
PESADA DURANTE LA BIORREMEDIACIÓN DE UN  
HISTOSOL CONTAMINADO CON PETRÓLEO CRUDO**

**CLAUDIO ULISES MENA SÁNCHEZ**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2021

La presente tesis, titulada “MODELOS DE CLASIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN QUIMIOMÉTRICA DE HIDROCARBUROS FRACCIÓN PESADA DURANTE LA BIORREMEDIACION DE HISTOSOL CONTAMIANDO CON PETRÓLEO”, realizado por el alumno: **Claudio Ulises Mena Sánchez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. ARMANDO GUERRERO PEÑA

ASESORA:



DRA. MARCIA EUGENIA OJEDA MORALES

ASESOR:



DR. JOEL ZAVALA CRUZ

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2021

## **Agradecimientos**

A Dios por haberme permitido haber llegado hasta esta etapa en mi vida, ser mi fortaleza en los momentos más difíciles y brindarme salud, fuerzas y empeño durante todos estos años.

A mis padres Claudio Mena Quiroga y Cleotilde Sánchez Lara. Les doy las gracias por haber confiado siempre en mí y haber formado de mí una persona con principios morales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento económico durante el estudio del Postgrado.

Al Colegio de Postgraduados Campus Tabasco y al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (D.A.I.A) por proporcionarme la formación académica y aprendizaje científico basados en procedimientos nacionales e internacionales para la búsqueda de nuevos conocimientos.

Al Dr. Armando Guerrero Peña. Gracias por brindarme su confianza, su tiempo, esfuerzo y dedicación.

A la Dra. Marcia Eugenia Ojeda Morales. Por haberme dedicado tiempo, darme motivación, pero sobre todo por brindarme su confianza, amistad y consejos.

A mis amigas Mariela Guadalupe Maza Landero y Sandra Patricia Francisco Santiago. Por los agradables momentos que hemos tenidos, comidas, risas y palabras de apoyo. Gracias por estar siempre a mi lado.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
El suelo.....	3
Suelos Histosols de Tabasco .....	3
Hidrocarburos del petróleo .....	6
Origen del petróleo .....	6
Composición química del petróleo.....	6
Clasificación del petróleo .....	7
Producción de petróleo en México .....	8
La industria petrolera en Tabasco y su impacto ambiental.....	8
Biorremediación.....	10
Atenuación natural .....	11
Bioestimulación.....	11
Bioaumentación .....	11
Métodos para el análisis de hidrocarburos derivados del petróleo.....	12
Extracción gravimétrica.....	12
Extracción por ultrasonido .....	12
Espectrometría de infrarrojo cercano (NIRS) .....	12
Cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas y un generador por espacio de cabeza HS-GC-MS.....	14
Quimiometría.....	15
Modelos de calibración.....	16
Análisis de componentes principales (PCA) .....	17
Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).....	18

<b>CAPITULO 1. BIODEGRADACIÓN DE PETRÓLEO CRUDO POR UN CONSORCIO MICROBIANO PRODUCTOR DE BIOSURFACTANTE.....</b>	<b>19</b>
1.1 RESUMEN.....	20
1.2. ABSTRACT .....	21
1.3 INTRODUCCIÓN.....	22
1.4 OBJETIVOS.....	24
1.5 HIPOTESIS.....	24
1.6 MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
1.6.1 Sitio de muestreo y recolección de muestras .....	25
1.6.2 Aislamiento y caracterización de colonias bacterianas .....	25
1.6.3 Diseño experimental .....	25
1.6.4 Preparación e inoculación de las unidades experimentales .....	26
1.6.5 Elaboración del consorcio.....	27
1.6.6 Extracción e identificación de lípidos polares.....	27
1.6.7 Cromatografía en capa fina y espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR).....	28
1.6.8 Caracterización de las muestras de suelo .....	28
1.6.9 Diseño experimental .....	28
1.6.10 Inoculación de las unidades experimentales y monitoreo del experimento .....	29
1.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
1.7.1 Caracterización de los microorganismos .....	29
1.7.2 Crecimiento microbiano en medios de cultivo enriquecidos con fertilizantes .....	30
1.7.3 Curva de crecimiento microbiano.....	32
1.7.4 Lípidos polares asociados a la acción surfactante .....	32
1.7.5 Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR).....	33
1.7.6 Caracterización inicial de las muestras de suelo.....	34
1.7.7 Determinación de pH.....	36
1.7.8 Población microbiana presente en los tratamientos.....	36

1.7.9 Degradación de Hidrocarburos de Fracción Pesada (HFP).....	38
<b>1.8 CONCLUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>CAPITULO 2.- ESTUDIO DE SUELO HISTOSOL CONTAMINADOS POR PETRÓLEO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA NIR, CROMATOLOGRAFÍA DE GASES- MASAS y GENERADOR DE ESPACIO DE CABEZA .....</b>	<b>40</b>
<b>2.1 RESUMEN.....</b>	<b>41</b>
<b>2.2 ABSTRACT .....</b>	<b>42</b>
<b>2.3 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>43</b>
<b>2.4 OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>2.5 HIPÓTESIS.....</b>	<b>45</b>
<b>2.6 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
2.6.1 Muestreo de suelo.....	46
2.6.2 Determinación de Hidrocarburos Fracción pesada (HFP).....	46
2.6.5 Análisis de componente principales (PCA) .....	47
2.6.6 Regresión de mínimos cuadros parciales (PLS).....	47
<b>2.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
2.7.1 Espectrometría de infrarrojo cercano VIS-NIR-SWIR de las muestras de suelo.....	49
2.7.2 Clasificación mediante análisis de componentes principales (PCA) .....	50
2.7.3 Modelos de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) .....	51
2.7.4 Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas y generador de espacio de cabeza (HS-GC-MS) .....	53
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>57</b>

# **MODELOS DE CLASIFICACIÓN Y CUANTIFICACION QUIMIOMÉTRICA DE HIDROCARBUROS FRACCIÓN PESADA DURANTE LA BIORREMEDIACIÓN DE UN HISTOSOL CONTAMINADO CON PETRÓLEO CRUDO**

Claudio Ulises, Mena Sánchez, MC

Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, 2021

## **RESUMEN**

Los derrames de petróleo ocurren continuamente en las tierras bajas del estado de Tabasco, los suelos más afectados pertenecen al grupo orgánico Histosol. Los efectos negativos que puede causar el petróleo derramado en los suelos son poco conocidos en los ecosistemas tropicales. Una técnica prometedora para la degradación del petróleo en suelos contaminados con petróleo es el uso de microorganismos. La eficiencia de biodegradación del petróleo se mide por métodos gravimétricos y cromatográficos, sin embargo, estas técnicas requieren de un tiempo prolongado para la extracción de los compuestos derivados del petróleo y el uso de estos solventes químicos son dañinos para el ambiente y la salud humana. El objetivo general de esta investigación fue, implementar la espectrometría VIS-NIR-SWIR y cromatografía de gases con un generador de espacio de cabeza para la detección de hidrocarburos del petróleo, contribuyendo a reducir los costos analíticos, tiempo de operación y evitar el uso de solventes químicos como el hexano, diclorometano, acetona o éter de petróleo como extractantes de los compuestos derivados del petróleo. La investigación se realizó durante un proceso de biorremediación en los meses de septiembre-diciembre 2020. Primero se aislaron cepas bacterianas que degradan el petróleo y, se evaluó su desarrollo en dos fertilizantes agrícolas como fuente de nitrógeno. También, se determinó el efecto de la relación carbono/nitrógeno (C/N) de 20 y 25 en el desarrollo de los microorganismos. Un consorcio microbiano fue elaborado con las cepas bacterianas y se evaluó su potencial para degradar hidrocarburos del petróleo en un

suelo Histosol. Para evaluar el proceso de biodegradación, se realizó un muestreo cada 15 días y se midieron algunas propiedades como pH, hidrocarburos fracción pesada (HFP), hidrocarburos fracción media (HFM) y conteo de células viables. Para la realización de modelos de clasificación y cuantificación de HFP, y detección de compuestos derivados del petróleo, se utilizaron medición con el NIRS y cromatografía de gases-espectroscopia de masas con generador de espacio de cabeza (HS-GC-MS).

Como resultado se obtuvo un consorcio microbiano con potencial para biodegradar el petróleo crudo. Se demostró que el consorcio microbiano produce sustancias biotensioactivas a base de lipopéptido. También se demostró que los fertilizantes nitrofoska y triple 17 pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno para aumentar la densidad celular bajo una buena relación C/N de 20. En cuanto a la espectrometría VIS-NIR-SWIR se generaron modelos de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) con altos coeficientes de correlación entre el valor de referencia y valor estimado en HFP y conteo de células viables. Se demostró que la técnica de HS-GC-MS posee alta selectividad y sensibilidad para detectar compuestos derivados del petróleo reduciendo el uso de sustancias químicas y costos analíticos.

Palabras claves: biorremediación, espectrometría NIR, contaminación, petróleo.



# **MODELS FOR THE CHEMOMETRIC CLASSIFICATION AND QUANTIFICATION OF HEAVY FRACTION HYDROCARBONS DURING THE BIOREMEDIATION OF A HISTOSOL CONTAMINATED WITH CRUDE OIL**

Claudio Ulises, Mena Sánchez, MC

Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, 2021

## **ABSTRACT**

Oil spills occur continuously in the lowlands of the state of Tabasco, the most affected soils belong to the organic group Histosol. The negative effects that spilled oil can cause on soils are poorly understood in tropical ecosystems. A promising technique for oil degradation in oil-contaminated soils is the use of microorganisms. The biodegradation efficiency of petroleum is measured by gravimetric and chromatographic methods, however, these techniques require a long time for the extraction of petroleum-derived compounds and the use of these chemical solvents are harmful to the environment and human health. The general objective of this research was to implement VIS-NIR-SWIR spectrometry and gas chromatography with a headspace generator, for the detection of petroleum hydrocarbons, contributing to reduce analytical costs, operating time and avoid the use of chemical solvents such as hexane, dichloromethane, acetone or petroleum ether, as extractants of compounds derived from petroleum. The research was carried out during a bioremediation process in the months of September-December 2020, first, bacterial strains that degrade oil were isolated, their growth in agricultural fertilizers as a nitrogen source was evaluated, and the effect of the carbon / nitrogen ratio was evaluated. (C/N) of 20 y 25 in the development of microorganisms, a microbial consortium was also generated and its potential to degrade petroleum hydrocarbons in a Histosol soil was evaluated. To evaluate the biodegradation process, a sampling was carried out every 15 days and some properties such as pH, heavy fraction hydrocarbons (HFP), medium fraction hydrocarbons (HFM) and viable cell count were measured. To

perform HFP classification and quantification models, and detection of petroleum-derived compounds, measurement with NIRS and gas chromatography-mass spectroscopy with headspace generator (HS-GC-MS) were used.

As a result, a microbial consortium with the potential to biodegrade crude oil was obtained. The microbial consortium was shown to produce lipopeptide-based biosurfactants. It was also shown that nitrophoska and triple 17 fertilizers can be used as a nitrogen source to increase cell density under a good C/N ratio of 20. Regarding the VIS-NIR-SWIR spectrometry, partial least squares (PLS) regression models were generated with high correlation coefficients between the reference value and the estimated value in HFP and viable cell count. The HS-GC-MS technique was shown to have high selectivity and sensitivity to detect petroleum-derived compounds reducing the use of chemicals and analytical costs.

Keywords: bioremediation, NIR spectrometry, pollution, oil. Keywords: bioremediation, NIR spectrometry, pollution, oil.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Grupos mayores de suelo del estado de Tabasco, México (Palma-López et al., 2017).....	4
Figura 2. Cuencas petroleras del sureste de México (PEMEX, 2013).....	9
Figura 3. Ejemplo ilustrativo de espectros de suelo en el infrarrojo cercano y visible (VIS-NIR) a lo largo del tiempo: suelo Control (TC) y suelo contaminado después de 48 h (T2 d), 12 meses (T12 m) y 20 meses (T20 m) (Douglas et al., 2018).....	14
Figura 4. Esquema simplificado de configuración de un generador espacio de cabeza-cromatografía de gases-espectrómetro de masas (HS-GC-MS) (Shinde y Ormond, 2020).....	15

### CAPÍTULO 1

Figura 5 Medición de las DO de los microorganismos. A) DO máxima de las cepas bacterianas utilizando los fertilizantes como fuente de nitrógeno B) efecto de la DO en los fertilizantes bajo la relación de C/N de 20 y 25.....	31
Figura 6 Curva de crecimiento del consorcio microbiano utilizando el fertilizante triple 17 a una relación C/N de 20. ....	32
Figura 7 Identificación de lípidos polares, a) fosfolípidos, b) lipopéptidos y c) glicolípidos .....	33
Figura 8.- Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR) del biosurfactante producido por el consorcio microbino. ....	34
Figura 9. Observación del pH durante la biorremediación del suelo contaminado con petróleo. ....	36
Figura 10. Grafica de crecimiento poblacional de los microorganismos degradadores de hidrocarburos.....	37
Figura 11.-porcentaje de remoción de hidrocarburos fracción pesada (HFP) durante el proceso de biorremediación. ....	39

### CAPÍTULO 2

Figura 12 Espectros VIS-NIR-SWIR sin procesar de 70 muestras de suelo (56 contaminadas con petróleo y 14 sin contaminación).....	49
Figura 13 Análisis de componentes principales PCA: grupo A) suelo libre de contaminación, grupos B) y C) suelos contaminados con petróleo. ....	50

Figura 14 Modelos de predicción de los hidrocarburos fracción pesada en un Histosol mediante modelación de espectros VIS-NIR-SWIR. ....	51
Figura 15 Modelo de regresión PLS para UFC de las muestras de suelos contaminadas con petróleo con coeficiente de Variación $R^2= 99.9998$ .....	52
Figura 16 Degradación de los compuestos derivados del petróleo representados por cromatografía con generación de espacio de cabeza.....	54

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del petróleo de acuerdo con su densidad $^{\circ}$ API. ....	7
Tabla 2. Producción petróleo en México.....	8

### CAPÍTULO 1

Tabla 3. Porcentaje de nitrógeno (N) y carbono (C) utilizados en las u.e. ....	26
Tabla 4.- Características morfológicas y microscópicas de las UFC aisladas de suelo contaminado con petróleo .....	30
Tabla 5 Variables analizadas en las muestras de suelo.....	35

### CAPÍTULO 2

Tabla 6 Indicadores estadísticos para seleccionar y evaluar el modelo de calibración. .....	48
--	----

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El petróleo es una mezcla de hidrocarburos formados en su mayoría por átomos de carbono, hidrógeno y otros elementos trazas, su composición varía de acuerdo con las condiciones geológicas del yacimiento (Fingas, 2020). Es el recurso natural no renovable y la principal fuente de energía a nivel mundial, tan solo en el año 2019 México aportó una producción anual de 1.7698 miles de barriles diarios, siendo Tabasco la entidad federativa a nivel nacional con la mayor aportación de petróleo crudo en tierra (190.837 Mbd) (PEMEX, 2019). Sin embargo, la extracción de petróleo y las actividades asociadas tienen como consecuencia la diseminación de los hidrocarburos del petróleo en el ambiente (Hernández *et al.*, 2017). Los efectos tóxicos y la persistencia de los compuestos del petróleo en el ambiente dependen del grado de contaminación y las propiedades físicas, químicas y biológicas del sitio contaminado (Butnariu y Butu, 2020). Para contrarrestar los efectos nocivos causados por los derrames de petróleo en suelos, se han desarrollado técnicas químicas y biológicas, la biorremediación es una de ellas, siendo la alternativa más utilizada y menos costosa empleada para remover el mayor porcentaje de contaminantes en sitios impactados por derrames de petróleo, la biorremediación emplea microorganismos como bacterias, hongos y levaduras con la capacidad de acelerar la degradación de los compuestos tóxicos presentes en el suelo (Szulc *et al.*, 2014).

Para determinar la concentración y la composición de hidrocarburos del petróleo en los suelos contaminados, existen métodos analíticos (gravimétricos e instrumentales) que resultan costosos por el uso de insumos (reactivos químicos) utilizados para el análisis, además, requieren de un tiempo de medición prolongado para su determinación (Adipah, 2019). Entre los métodos más usados, se encuentra la extracción Soxhlet que requiere un tiempo de extracción sin considerar las propiedades físicas y químicas del suelo (Pons-Jiménez *et al.*, 2011); por otra parte, la cromatografía de gases (GC) equipado con un detector de ionización de llama (FID) y cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas (GC-MS), son métodos rápidos, pero requieren el

tratamiento previo de la muestra contaminada para su evaluación (Christensen y Tomasi, 2007).

Los métodos analíticos son herramientas disponibles para aplicar en estrategias multidisciplinarias y desarrollar procedimientos alternativos (Douglas *et al.*, 2017). Las técnicas multivariante o quimiométricas aplicadas en datos espectrales han mejorado notablemente la calidad de los análisis, especialmente en la identificación de parámetros físicos y químicos de muestras de suelo (Mejia-Ospino *et al.*, 2011). La espectrometría NIR es un método rápido para la detección y cuantificación de hidrocarburos derivados del petróleo. El escaneo de muestra solo toma unos minutos, no se requiere preparación de muestras y no necesita de productos químicos. La cromatografía de gases combinada con estadísticas multivariantes también puede proporcionar una herramienta más completa y precisa para monitorear los cambios en los perfiles de hidrocarburos del petróleo durante su evaluación (Tomasi y Christensen, 2009).

Cuando las propiedades físico-químicas se determinan con los métodos convencionales, el tiempo de medición es considerable, por lo que se requieren de una apreciable cantidad de muestra y el análisis suele ser costoso debido a la cantidad de reactivos químicos utilizados, además, cuando los productos presentan pequeñas diferencias o anomalías en su composición química, estas no son fácilmente detectables. Por lo que los objetivos de esta investigación fueron: a) evaluar la biodegradación de petróleo crudo utilizando un consorcio microbiano aislado de suelo contaminado con petróleo, y b) modelar y correlacionar espectrometría NIRS y cromatografía de gas (GC) para la detección y cuantificación rápida de hidrocarburos derivados del petróleo.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

### **El suelo**

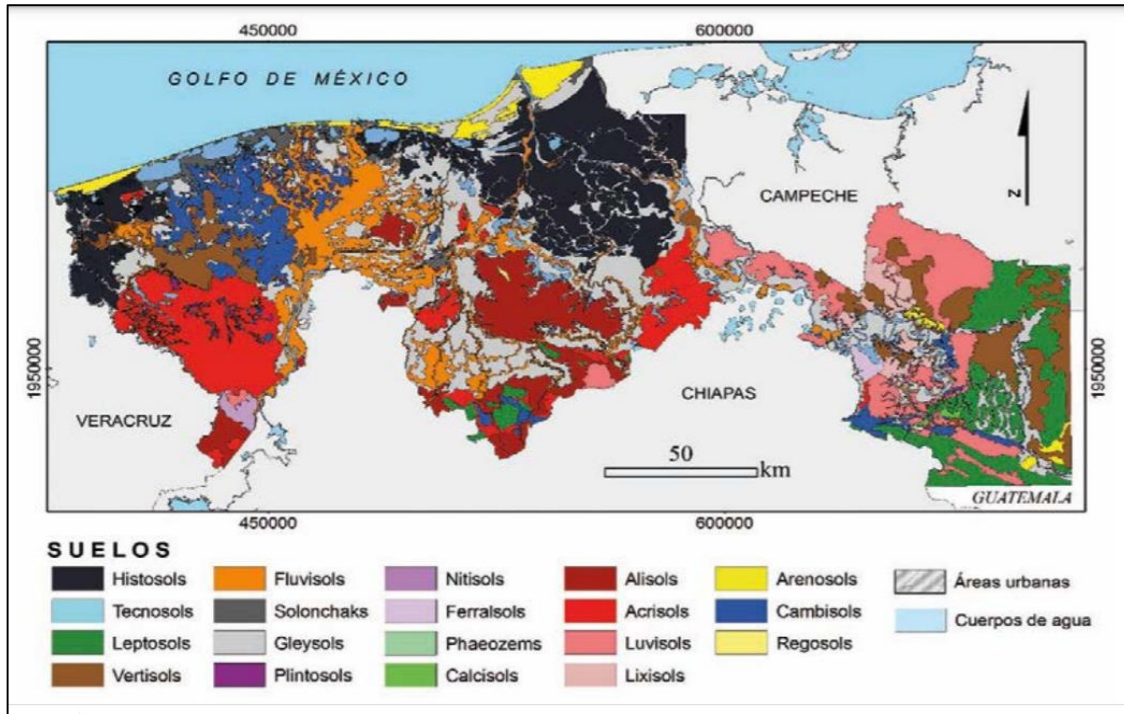
El suelo es un recurso indispensable para el ser humano, desde el punto de vista agrícola, el suelo es un sistema dinámico y complejo formado por una capa superficial delgada que se ubica sobre la litosfera. De acuerdo con el sistema de clasificación de suelos de los Estados Unidos de América (Soil Survey Staff, 2003), “Es un cuerpo natural formado por sólidos (minerales y materia orgánica), líquidos y gases que ocurren sobre la superficie de las tierras, ocupa un espacio y tiene una o ambas de las siguientes características: horizontes o capas que se diferencian del material inicial como resultado de adiciones, pérdidas, transferencia y transformaciones de energía y materia, o por la habilidad de soportar raíces de plantas en un ambiente natural”.

El proceso de formación del suelo está determinado por la interacción de cinco factores de formación: clima, organismos, topografía, material parental y tiempo; sin embargo, el ser humano tiene una gran influencia sobre el suelo, tanto por las prácticas agrícolas y ganaderas como a través del desarrollo urbano e industrial. El suelo es muy sensible a las prácticas de fertilización, laboreo, desforestación y drenaje, por lo que puede degradarse con facilidad e incluso desaparecer (Figueroa *et al.*, 2018; Aparicio, 2015).

### **Suelos Histosols de Tabasco**

El estado de Tabasco cuenta con una extensión territorial de 2, 466, 100) ha y forma parte de dos provincias fisiográficas: Planicie Costera del Golfo Sur (PCGS) y la Sierra de Chiapas y Guatemala (SCHG). Cuenta con 12 paisajes geomorfológicos que contribuyen a la distribución geográfica de los suelos del estado. Los grupos de suelos predominantes se formaron sobre sedimentos no consolidados en planicies fluviales, palustres, lagunares y costeras que datan del periodo Cuaternario Holoceno (Zavala-Cruz *et al.*, 2016). Palma-López *et al.* (2017) reportan que el estado de Tabasco tiene 19 grupos de suelo con base en sus características físicas, químicas y factores de formación (Figura 1). Los grupos de suelos predominantes son Histosols, Gleysols y Fluvisols, los cuales ocupen un 13.4, 20.5 y 10.4 % de la superficie total del estado.





**Figura 1.** Grupos mayores de suelo del estado de Tabasco, México (Palma-López *et al.*, 2017)

En el trópico húmedo uno de los requisitos indispensables para que se acumule la materia orgánica es que exista un anegamiento que no permita la circulación de oxígeno. Las condiciones solo pueden darse en lugares muy bajos sujetos a inundación durante la mayor parte del año, de tal forma, que estos suelos solo están libres de manto freático en la superficie por 30 a 40 días, en los cuales el manto freático desciende a veces hasta 50 cm de profundidad (Palma-López *et al.*, 2007).

En el caso de los suelos Histosols el material parental se forma por el proceso de paludización, que consiste en la acumulación de materiales orgánicos con el paso del tiempo, en zonas con drenaje restringido, la actividad de los microorganismos es baja y como consecuencia los residuos orgánicos experimentan una transformación muy lenta. En cuanto al relieve, la formación de los Histosols se relaciona con la curvatura del terreno y la altitud, una situación favorable es una pendiente cóncava con baja o nula permeabilidad donde el agua pueda quedar retenida o estancada, en zonas con climas

húmedos la precipitación y la temperatura favorecen la acumulación de material orgánico en diferentes estados de descomposición (Ibañez *et al.*, 2014; Buol *et al.*, 2011).

En el estado de Tabasco, México. Los Histosoles ocupan el (13.4 %) de la superficie del estado, son formados por la acumulación de materiales orgánicos (30 % o más de materia orgánica) dentro de los primeros 80 cm de profundidad, geomorfológicamente se forman en planicies bajas de inundación lagunar, que se caracteriza por tener un relieve cóncavo, el suelo permanece inundado por las corrientes de agua salobre durante casi todo el año o a través de la desembocaduras de ríos al mar, que comunican a las lagunas costeras con el Golfo de México. También puede desarrollarse en planicie palustre donde los suelos Histosols permanecen inundados con agua dulce la mayor parte del año, el material orgánico es aportado por la vegetación hidrófila, el cual se deposita sobre sedimentos aluviales finos, son conocidos como turbas o pantanos (Zavala-cruz *et al.*, 2016; Palma-López *et al.*, 2017). Los suelos Histosols se clasifican por el grado de descomposición de la materia orgánica: Fíbrico, Hémico, Sáprico, y Sállico, y se caracterizan por tener un horizonte hístico (del griego *hitos* que significa tejido) saturado con agua freática y agua de escurrimiento superficial que inicia desde los primeros 40 cm de profundidad.

*Histosol Fíbrico.* Son los Histosoles que se desarrollan en zonas húmedas en las cuales los materiales orgánicos están escasamente descompuestos. Más de dos tercios (en volumen) del suelo, está formado por fibras que persisten después de someterlas a fricción entre los dedos dentro de los primeros 40 cm de profundidad, el origen vegetal de los restos orgánicos es fácilmente reconocible, además poseen una capa freática próxima a la superficie del suelo (Ibañez-Asensio *et al.*, 2014).

*Histosol Rhéico-Hémico.* Son suelos con saturación de agua desde la superficie, presentan colores que van desde negro a gris oscuro, el calificador hémico indica que el material orgánico después de frotarlo tiene entre dos tercios y un sexto en volumen de tejido vegetales dentro de los 100 cm de profundidad, se ubican en depresiones palustres con pendientes cóncavas menores al 1 %, altitud entre 1 y 2 metros sobre el nivel mar (msnm), son pobremente drenados y su vegetación es hidrófila (popal, tular

y molinillo), se localizan entre la Venta, campo petrolero Sánchez Magallanes, terraza Benito Juárez y la planicie costera (Zavala-Cruz., *et al.*, 2012).

*Histosol Rhéico-Sáprico.* Son suelos que en los primeros 35 cm de profundidad se componen de material orgánico poco descompuesto y el contenido en fibra es dominante, pero en capas subyacentes prevalecen los materiales sápricos con mayor grado de descomposición, esto indica que después de frotarlo entre los dedos tienen menos de un sexto del material orgánico dentro de los primeros 100 cm de profundidad, descansan sobre sedimentos aluviales, palustres y marinos, y se asocian a vegetación es hidrófila de popal y tular, matorral inundable y manglar (Palma-López *et al.*, 2007).

*Histosol sálico.* Son suelos que se caracterizan por tener un horizonte sálico en los primeros 100 cm de profundidad, presentan una alta concentración de sales y una conductividad eléctrica mayor de  $15 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$ , se localizan en la planicie de inundación lagunar cerca de los ríos Chico Zapote y Tonalá asociados a vegetación de manglar, son afectados por corrientes de agua salobre que comunican a los ríos con el Golfo México (Zavala-Cruz *et al.*, 2012; Domínguez-Domínguez *et al.*, 2011).

## **Hidrocarburos del petróleo**

### **Origen del petróleo**

La palabra petróleo proviene del latín *petra* (piedra o roca) y *Óleum* (aceite), en su estado natural es un líquido oleaginoso e inflamable constituido por una mezcla de hidrocarburos que se originaron por descomposición de organismos animales y vegetales que se sedimentaron en el fondo de los mares, lagos y pantanos en edades geológicas muy antiguas, se encuentra formado principalmente por átomos de carbono (C) e hidrógeno (H) y otros elementos traza (García y Velera, 2014).

### **Composición química del petróleo**

La composición del petróleo varía de un yacimiento petrolífero a otro, está compuesto por un 84-87 % (en peso) de carbono, 11-14 % (en peso) de hidrógeno, y otros elementos

presentes en el petróleo crudo, como azufre 0-8 % (en peso), oxígeno y nitrógeno 0-4 % (Valdéz-Zegarra, 2008; García y Valera, 2014).

### Clasificación del petróleo

La industria del petróleo utiliza como índice de clasificación del crudo de petróleo la densidad expresada en °API (parámetro internacional *American Petroleum Institute*). La unidad de °API representa una fracción del crudo (ligero, mediano y pesado) contenido en el petróleo, entre mayor °API más ligero el crudo; con base en esta característica se pueden clasificar en cinco distintos tipos de petróleo (Tabla 1.)

**Tabla 1.** Clasificación del petróleo de acuerdo con su densidad °API.

Aceite crudo	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Densidad (°API)
Extrapesado	>1.0	10.0
Pesado	1.0 – 0.92	10.0 – 22.3
Mediano	0.92 – 0.87	22.3 – 31.1
Ligero	0.87 – 0.83	31.1 – 39
Superligero	<0.83	>39

La NOM-138-SEMARNAT-2012 (SEMARNAT, 2012) clasifica a los hidrocarburos del petróleo de acuerdo con el número de átomos en la molécula; hidrocarburos fracción ligera (HFL), mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan entre 5 y 10 átomos de carbono (C5 a C10). Hidrocarburos fracción media (HFM), mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan entre 10 y 28 átomos de carbono (C10 a C28). Hidrocarburos fracción pesada (HFP), mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan entre 28 y 40 átomos de carbono (C28 a C40).

## Producción de petróleo en México

La industria petrolera es la principal fuente de energía y economía más importante a nivel nacional, en México la producción de petróleo en el año 2019 fue de 1.7698 miles de barriles diarios (Mbd), siendo las aguas territoriales con la mayor aportación de petróleo crudo (1.388. Mbd), el estado de Tabasco reportó una extracción de 190.837 Mbd de petróleo crudo en tierra (Tabla 2) (Pemex, 2019; SENER, 2019).

**Tabla 2.** Producción petróleo en México

Entidad federativa	Producción (Mbd)
Aguas territoriales	1388.367
Tabasco	190.837
Veracruz	84.206
Chiapas	15.872
Tamaulipas	12.307
Puebla	8.885
San Luis Potosí	0.223
Total	1700.698

México produce tres variedades de petróleo crudo y se clasifican de acuerdo sus grados API: Olmeca, petróleo súper ligero con densidad de 39.3 °API y 0.8 % de azufre en peso; Istmo, petróleo ligero con densidad de 33.6 °API y 1.3 % de azufre en peso, y Maya, petróleo pesado con densidad de 22 °API y 3.3 % de azufre en peso.

### La industria petrolera en Tabasco y su impacto ambiental

El estado de Tabasco México, es el mayor productor de petróleo en tierra, a nivel nacional, tan solo en el año 2019 tuvo una producción de 190.837 Mbd que representan el 11.22 % del total de producción del país de 1388.367 Mbd (PEMEX, 2019). Es preciso

señalar que Tabasco se encuentra dentro de la provincia petrolera del sureste, conocida como la más productora de aceite y gas del país. La provincia se encuentra dividida en tres cuencas: la cuenca salina del Istmo, Pilar Reforma–Akal y Macuspana (Figura 2), que ocupan parte del estado de Veracruz, Chiapas, Campeche y casi todo el estado de Tabasco (Pemex, 2013).

La industria petrolera en Tabasco ocupa más de 12 mil ha, entre las principales instalaciones petroleras sobresalen Activo integral Bellota-jujo, Muspac, Samaria-Luna, Macuspana y Cinco Presidentes, extendiendo una amplia red de oleoductos (8206 km de ductos) interconectados por 14 municipios del estado (Cárdenas, Huimanguillo, Comalcalco, Cunduacán, Teapa, Jalapa, Nacajuca, Centro, Jalpa de Méndez, Centla, Tacotalpa, Paraíso, Macuspana y Jonuta), los ductos son utilizados para la extracción y transporte de petróleo crudo y sus derivados (Fitz-Mendoza, 2016).



**Figura 2.** Cuencas petroleras del sureste de México (PEMEX, 2013)

La extracción de petróleo y las actividades asociadas tienen impactos negativos sobre el ambiente (Pérez-Muñoz, 2019). Los impactos generados por la industria inician en las prácticas operacionales de exploración y producción que incluyen la compactación del suelo, destrucción de la rizósfera y suelo superficial, erosión y pérdida de suelo (Morales *et al.*, 2020). Cuando ocurre un derrame de petróleo en suelo, genera efectos nocivos en la flora y fauna que se encuentre en la superficie de suelo (Bravo, 2011), los efectos tóxicos dependen de las características físicas y químicas del petróleo y del grado de contaminación, el petróleo tiende a formar una capa impermeable sobre la superficie del suelo causando daños irreversibles en las plantas, árboles pequeños y la microfauna, las propiedades del suelo como textura, estructura y porosidad, también son afectadas por la contaminación, sin embargo, los compuestos más pesados del petróleo se desplazan hasta llegar a la base del acuífero donde se mueve en dirección al flujo del agua ocasionando contaminación en toda su profundidad por efecto de arrastre (Arenas-Piza). En 2015, se registraron 159 derrames en el suelo, afectando 1162 hectáreas, los estados con mayor incidencia de derrames fueron Tabasco (40.2 %), Veracruz (32.1 %) y Chiapas (18.3 %) (PEMEX, 2016).

En respuesta a la problemática de contaminación por la industria petrolera, las investigaciones relacionadas con la biorremediación de suelos con petróleo son cada vez más importantes, como alternativa para la recuperación de los mismos. La biorremediación es una técnica que emplea microorganismos o sus productos para degradar o inactivar compuestos tóxicos (Buendía, 2012).

### **Biorremediación**

Es una técnica utilizada para reducir la concentración de compuestos tóxicos en un sitio contaminado, el sistema de tratamiento biológico tiene la ventaja de acelerar y transformar los contaminantes para integrarlos a los ciclos biogeoquímicos naturales (Boopatía, 2000). La biorremediación del petróleo en los ecosistemas naturales es proceso complejo, el éxito depende de una serie de parámetros ambientales como: temperatura, pH, humedad, nutrientes como el nitrógeno (N) y fósforo (P), la

composición química del petróleo y la naturaleza de la comunidad bacteriana que se ve afectada por un componente desconocido que podrá o no metabolizar (Leys *et al.*, 2005).

### **Atenuación natural**

La atenuación natural se refiere a la degradación natural de los contaminantes en el ambiente, el proceso es realizado por los procesos biológicos, fenómenos físicos y químicos que tienen lugar en el suelo (Yong y Mulligan, 2003). Los microorganismos nativos son un factor importante en la degradación natural de los contaminantes, la adaptabilidad que poseen les permitirá asimilar los contaminantes y reducir su concentración (Kumar *et al.*, 2018).

### **Bioestimulación**

Es un método de biorremediación que se utiliza para estimular las concentraciones microbianas presentes en un suelo contaminado. El método modifica las condiciones del suelo al adicionar agua, oxígeno, nutrientes y otros parámetros que permitan activar el desarrollo microbiano y acelerar la biodegradación. Los nutrientes más importantes son nitrógeno y fósforo, intervienen en la producción de aminoácidos, enzimas y compuestos energéticos que los microorganismos utilizan en los procesos de reproducción y degradación (Leys *et al.*, 2005).

### **Bioaumentación**

La bioaumentación es una técnica utilizada para la recuperación de suelos contaminados con petróleo, y se basa la introducción de especies microbianas externas o nativas al suelo contaminado (Tyagi *et al.*, 2011). Los microorganismos utilizados están adaptados o genéticamente modificados para degradar los contaminantes (Fantroussi y Agathos, 2005). Los avances tecnológicos han permitido aislar y producir en masa microorganismos degradadores de hidrocarburos que superan la degradación natural de los contaminantes (Rayu *et al.*, 2012). Las estructuras químicas de los contaminantes son tan complejas que hacen difícil su transformación, por lo que resulta necesario la adición de consorcios microbianos para facilitar su biodegradación (Kumar *et al.*, 2018).



## **Métodos para el análisis de hidrocarburos derivados del petróleo**

### **Extracción gravimétrica**

Los métodos gravimétricos se utilizan generalmente para la cuantificación de hidrocarburos en suelos, el método más utilizado es la extracción de grasas y aceites con n-hexano descrito en la norma mexicana NMX-AA-134-SCFI-2006 (DOF, 2006). Donde, el extracto pasa por un sorbente de silica gel para extraer materiales biogénicos y después evaporar el disolvente. Se pesa el residuo y la diferencia de peso se expresa como porcentaje del peso total de la muestra de suelo

*Extracción Soxhlet.* En la norma mexicana NMX-AA-134-SCFI-2006 (DOF, 2006) se especifican los lineamientos para extraer hidrocarburos no volátiles y semivolátiles mediante la recirculación de un disolvente en ebullición a través de la muestra de suelo, con un tiempo requerido de 24 horas.

### **Extracción por ultrasonido**

Es un método basado en el efecto de vibración provocada por una onda acústica que atraviesa la fase líquida de la muestra con una frecuencia igual o mayor a 16 kHz. Este es un método rápido para extraer hidrocarburos del petróleo, pero requiere una corrección profunda de la potencia utilizada (Pikovskii *et al.*, 2017). El método requiere de una purificación extra para concentrar los compuestos en rotavapor a  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta un volumen final aproximado de 10 mL, el extracto final se concentra a 2 mL empleando una columna Snyder NMX-AA-145-SCFI-2008 (DOF, 2008).

### **Espectrometría de infrarrojo cercano (NIRS)**

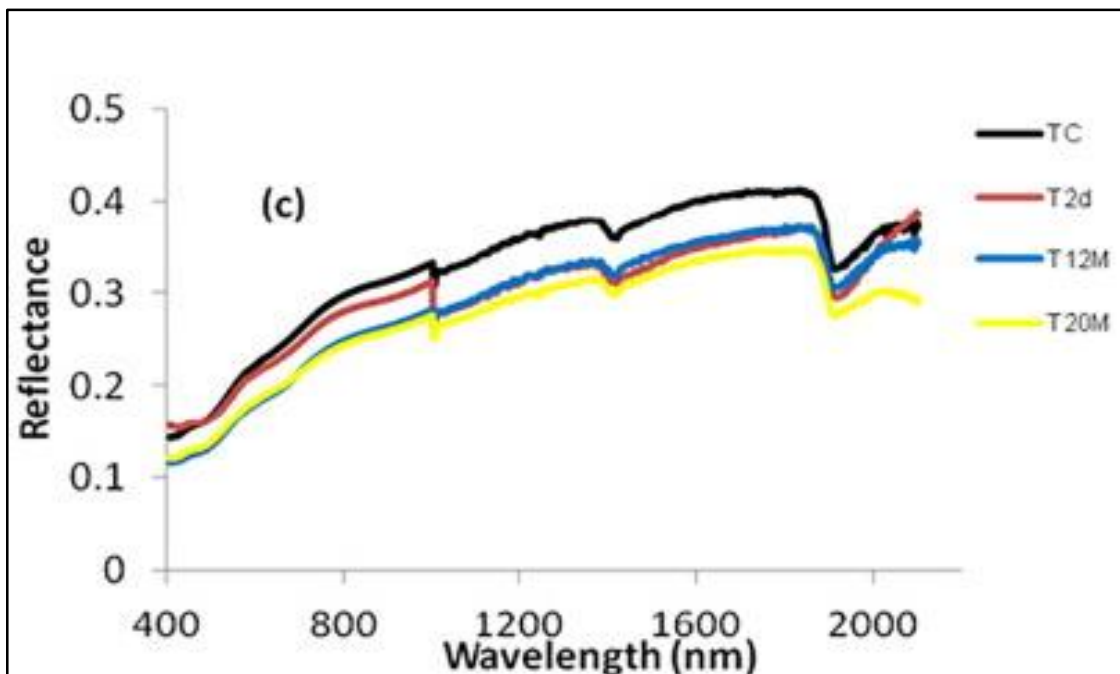
La espectrometría infrarroja es una técnica analítica no destructiva que se emplea para determinar cualitativa y cuantitativamente los compuestos moleculares de muestras sólidas, líquidas e incluso gases (Roggo *et al.*, 2007). Proporciona información estructural de una gran variedad de moléculas de manera simultánea, incluso estando dentro de mezcla complejas. Existen diferentes técnicas analíticas en el estudio de suelos contaminados, sin embargo, las técnicas espectroscópicas son de mayor

relevancia debido a la necesidad de buscar metodologías que sean amigables con el ambiente (Rodríguez *et al.*, 2016).

La técnica requiere una mínima preparación de muestra, lo que la convierte en una técnica analítica rápida, directa y respetuosa con el ambiente, por lo que resulta muy ventajosa para ser utilizada en el control de procesos de rutina (Manley, 2014).

La espectrometría NIR implica la interacción de la radiación infrarroja comprendida entre las microondas y la luz visible dentro del espectro electromagnético. La mayor energía de radiación es producida por el infrarrojo cercano NIR, donde, las longitudes de ondas se generan en un rango de 750 y 2500 nm (Okparanma *et al.*, 2014).

La técnica NIRS se puede utilizar para identificar y estudiar sustancias químicas inorgánicas. Para una muestra determinada, que puede ser sólida, líquida o gaseosa, el método o técnica de espectroscopia infrarroja utiliza un espectrómetro infrarrojo para producir un espectro infrarrojo en función de su composición, es decir, de la naturaleza de los enlaces de sus moléculas, absorberá una cierta cantidad de energía (Figura 3). La forma más habitual de cuantificar dicha absorción de energía es a partir de la medida de la energía reflejada ( $A = \log(1/R)$ ) o transmitida ( $A = \log(1/T)$ ) por la muestra, donde R y T son el valor de reflectancia o transmitancia respectivamente (Speight, 2017). Se ha demostrado que la espectroscopia de reflectancia (VIS-NIR-SWIR) es un método rápido y no destructivo en la detección de hidrocarburos derivados de petróleo en suelos (Douglas *et al.*, 2018; Wartini *et al.*, 2019) a nivel analítico se convierte en un método popular para el análisis químico debido al bajo costo que significa su utilización, así como la capacidad de realizar un análisis no destructivo y no invasivo de las muestras de manera muy rápida y sencilla (Ozdemir y Ozturk, 2007).



**Figura 3.** Ejemplo ilustrativo de espectros de suelo en el infrarrojo cercano y visible (VIS-NIR) a lo largo del tiempo: suelo Control (TC) y suelo contaminado después de 48 h (T2 d), 12 meses (T12 m) y 20 meses (T20 m) (Douglas *et al.*, 2018).

### **Cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas y un generador por espacio de cabeza HS-GC-MS**

El principio básico de la cromatografía de gases implica el calentamiento de la muestra, posteriormente se realiza una extracción de la fase gaseosa en la muestra, y los componentes de la muestra gaseosa son separados en una columna cromatográfica (Sparkman *et al.*, 2011). La técnica de cromatografía por HS-GC-MS es eficaz para la detección de compuestos volátiles en muestras sólidas y líquidas (Wei y Jen, 2007). Es un método muy limpio y de preparación muy simple al no requerir de un tratamiento previo de las muestras antes del análisis (Shariati-Feizabadi *et al.*, 2003). La muestra se coloca en un vial a temperatura ambiente dejando un espacio libre sobre la muestra. El vial es llevado a calentamiento para generar moléculas volátiles a una temperatura

determinada en el generador de espacio de cabeza, los compuestos volátiles se introducen en el cromatógrafo a través de la línea de transferencia hasta la columna capilar y son analizados por detector (Figura 4). Esta técnica ha sido utilizada en diversos estudios para la detección de hidrocarburos derivados del petróleo (Pérez-Pavón *et al.*, 2004; Serenjeh *et al.*, 2020; Wei y Jen, 2007).

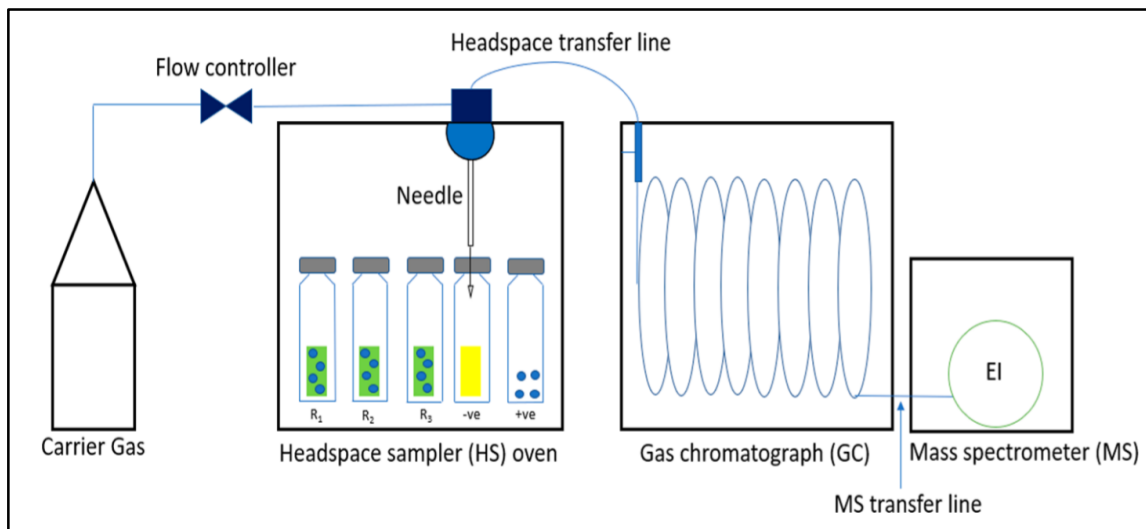


Figura 4. Esquema simplificado de configuración de un generador espacio de cabeza-cromatografía de gases-espectrómetro de masas (HS-GC-MS) (Shinde y Ormond, 2020).

## Quimiometría

La quimiometría fue introducida por primera vez en 1971 por el científico sueco Svante Wold, es una herramienta que se utiliza para extraer información de datos químicos multivariados, es decir, todas las variables se consideran al mismo tiempo (Lavine y Workman, 2008). Actualmente, la quimiometría se considera como una disciplina que utiliza métodos estadísticos, matemáticos y lógica formal en la química, que permite un tratamiento más avanzado de los datos derivados de mezclas químicas complejas (Sena *et al.*, 2017), tiene la capacidad de analizar y modelar una amplia variedad de datos que incluyen ajustes de curvas, procesamiento de señales, calibración simple y

multivalente, reconocimiento de patrones, diseño factorial y redes neuronales entre otros, los modelos utilizados permiten estudiar el efecto de las variables de respuesta con el número de experimentos posibles.

### **Modelos de calibración**

El proceso de calibración está relacionado con la respuesta de una técnica instrumental (absorbancia, área de un pico cromatógrafo, diferencia potencial, etc.) utilizada para identificar o predecir la propiedad de una muestra (Cavado-Osorio *et al.*, 2014). Las técnicas espectroscópicas son las más utilizadas para este tipo de calibración, debido a que un espectro es una forma rápida y simple de generar cientos de medidas y múltiples variables por cada muestra, por ello, el desarrollo de técnicas de calibración multivariantes tienen la finalidad de relacionar las variables con la propiedad a estudiar, tienen la ventaja de cuantificar una propiedad de interés a partir de medidas no selectivas (en presencia de interferencias) y detectar muestras discrepantes en predicción (Tanaka *et al.*, 2011).

Los modelos multivariantes tienen como objetivo realizar un análisis de calibración o de clasificación, los cuales poseen la característica de predecir las propiedades modeladas de muestras desconocidas, para la realización de un modelo de calibración multivariado se debe seguir el siguiente procedimiento (Porcel-García, 2001).

*1. Selección del conjunto de calibración.* El primer paso es adquirir el número de muestras de las que se desconoce la propiedad a determinar, es también denominado conjunto de entrenamiento y se debe contemplar que las muestras sean representativas de toda la variabilidad química y física del sistema. En modelos cualitativos se incluye el tamaño de partícula, densidad, viscosidad etc., en lo que respecta a los modelos cuantitativos, además de la variabilidad, deberán de incluir el valor del parámetro a determinar.

*2. Registro de la información analítica.* La información química puede extraerse de métodos o instrumentos los cuales contienen el conocimiento previo de las variables a determinar, los valores proporcionados deben ser precisos y exactos ya que de ellos

depende la calidad del modelo, el conjunto de muestras utilizadas para calibración y predicción deben seguir el mismo protocolo de análisis. La espectroscopia NIR suele ser útil para la realización de modelos quimiométricos por las características de sus bandas (anchas y solapadas), de manera que se requiere un tratamiento matemático de los datos para obtener la información.

3. *Pretratamiento de los datos.* Para realizar un análisis de calibración lo primero que se debe realizar es el pretratamiento de los datos, el cual consiste en manipulaciones matemáticas que se utilizan para reducir o eliminar variabilidad de los datos, ruido o cualquier fenómeno físico que no esté relacionado con una propiedad de interés (centrado, suavizado, corrección, línea base, etc.)

4. *Construcción del modelo.* El cálculo del modelo quimiométrico, sea cualitativo o cuantitativo, se realiza con un conjunto de muestras denominadas muestras de calibración, donde se evalúan los distintos parámetros implicados en el cálculo (pretratamiento, intervalo espectral, número de factores etc.)

5. *Evaluación del modelo quimiométrico.* La evaluación se realiza con la aplicación del modelo a un conjunto de muestras conocidas para los modelos cualitativos se conoce la identidad de la propiedad, mientras que para los modelos cuantitativos se conoce la concentración

### **Análisis de componentes principales (PCA)**

El propósito de los análisis de datos multivariados es descomponer los datos para detectar y modelar los "fenómenos ocultos". Al representar los datos como una matriz, el punto de partida es una matriz ( $X$ ) con ( $n$ ) objetos y ( $p$ ) variables, los objetos pueden ser observaciones, muestras, experimentos, etc., mientras que las variables suelen ser "medidas" para cada objeto (Maćkiewicz y Ratajczak, 1993). El análisis de componentes principales (PCA) es un método de análisis exploratorio multivariado, útil para separar la variación sistemática del ruido. Permite definir un espacio de dimensiones reducidas que conserva la información relevante de los datos originales y permite la visualización de objetos (puntuaciones) y variables (Geladi y Linderholm, 2020). La idea central del

PCA es reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos que consta de grandes cantidades de variables interrelacionadas (Douglas *et al.*, 2018).

### **Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)**

La regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), es una técnica de relación de variables introducida en 1975 por Svante Wold. El PLS es una técnica multivariante que se utiliza para modelar la relaciones entre variables dependientes e independientes, es una forma rápida y sencilla de realizar ecuaciones de predicción (Garthwaite, 1994). Las técnicas multivariantes se han utilizado en la actualidad para realizar estimaciones de compuestos derivados del petróleo. Mejía-Ospino *et al.* (2011) realizaron modelos de calibración PLS para estimar la composición del petróleo, compuestos saturados, aromáticos, resinas y asfáltenos (SARA). Douglas *et al.* (2018) utilizaron espectrometría VIS-NIR para realizar modelos de cuantificación rápida de hidrocarburos totales de petróleo (HTP), comparando el rendimiento de una regresión lineal de mínimos cuadrados parciales (PLSR) con una regresión aleatoria no lineal (RF).

**CAPITULO 1. BIODEGRADACIÓN DE PETRÓLEO CRUDO POR UN  
CONSORCIO MICROBIANO PRODUCTOR DE BIOSURFACTANTE**



## 1.1 RESUMEN

Las malas prácticas antropogénicas tienen como consecuencia la diseminación del petróleo provocando impactos negativos al ambiente. Una alternativa para la recuperación de los suelos es la biorremediación, aunque en ocasiones no es rentable por los costos elevados de productos químicos utilizados en la producción de biomasa microbiana. Por lo que, en esta investigación se evaluó el uso de dos fertilizantes como fuente de nitrógeno para la producción de biomasa microbiana. Para ello se evaluó el crecimiento por densidad óptica (DO) de cuatro cepas bacterianas aisladas de suelo contaminado con petróleo, como fuente de nitrógeno se utilizaron los fertilizantes nitrofoska y triple 17 bajo dos relaciones de carbono/nitrógeno (C/N) de 20 y 25, también se preparó un consorcio con las cuatro cepas y se evaluó su potencial en la biodegradación del petróleo. Los resultados demostraron que el fertilizante triple 17 estimula el crecimiento poblacional microbiano, sin embargo, el mejor crecimiento microbiano fue a una relación C/N igual a 20 con una DO de 0.39. El consorcio microbiano elaborado con las cuatro cepas degradó hasta un 53 % del petróleo en Hidrocarburos Fracción pesada (HFP), siendo mejor que la atenuación natural con una remoción del 32 %. También se demostró que el consorcio microbio es capaz de sintetizar lipopéptidos.

Palabras claves: biorremediación, fertilizante, petróleo, suelo

## 1.2. ABSTRACT

Bad anthropogenic practices have as a consequence the dissemination of oil causing negative impacts to the environment. An alternative for soil recovery is bioremediation, although it is sometimes not profitable due to the high costs of chemicals used in the production of microbial biomass. Therefore, in this research the use of two fertilizers as a nitrogen source for the production of microbial biomass was evaluated. For this, the growth by optical density (OD) of four bacterial strains isolated from oil-contaminated soil was evaluated, as a nitrogen source the fertilizers nitrofoska and triple 17 were used under two carbons / nitrogen (C / N) ratios of 20 and 25, a consortium was also prepared with the four strains and their potential in the biodegradation of oil was evaluated. The results showed that triple 17 fertilizer stimulates microbial population growth, however, the best microbial growth was at a C / N ratio equal to 20 with an OD of 0.39. The microbial consortium made with the four strains degraded up to 53% of the oil into Heavy Fraction Hydrocarbons (HFP), being better than natural attenuation with a removal of 32%. The microbe consortium was also shown to be capable of synthesizing a lipopeptide-based substance.

Keywords: bioremediation, fertilizer, oil, soil

### 1.3 INTRODUCCIÓN

La explotación, refinación, almacenamiento y transporte inadecuado de los hidrocarburos del petróleo figuran entre las principales fuentes de contaminación de suelo y agua (Pérez-Muños *et al.*, 2019). En Tabasco, las actividades de la industria petrolera han generado fugas y derrames de petróleo que afectan considerablemente los suelos de la región (Ojeda-Morales y Juárez-Palacios, 2019).

Las afectaciones más severas por derrames de petróleo ocurren en campos petroleros ubicados en zonas pantanosas, manglares y selvas inundables, donde, los ductos de los pozos conectados a las baterías de separación se han corroído debido a la acción de bacterias reductoras de sulfato. Los suelos más afectados se encuentran en zonas bajas del estado, mayormente planicies palustres, donde predominan suelos del grupo orgánico Histosol que se caracterizan por tener alto contenidos en materia orgánica (Zavala-Cruz *et al.*, 2005; De Mesa *et al.*, 2006).

Cuando ocurre un derrame de petróleo en suelo inicia una serie de procesos físico-químicos que, dependiendo de la cantidad vertida, tipo de petróleo y tipo de suelo, pueden ser muy lentos, ocasionando una mayor toxicidad para las plantas y las comunidades microbianas (Butnariu y Butu, 2020). Los contaminantes que pueden causar mayor impacto son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), los cuales tienen un alto potencial cancerígeno y mutagénico (Pérez-Muños *et al.*, 2019).

Existen diversas tecnologías aplicadas a la remediación de sitios contaminados con petróleo, los métodos fisicoquímicos y térmicos pueden remover, aislar o transformar los contaminantes a productos menos peligrosos, pero sus altos consumos de energía los hacen no sustentables para su aplicación (Singh y Haritash, 2019).

La biorremediación es una técnica utilizada para la recuperación de suelos contaminados con petróleo, emplea microorganismos con la capacidad de acelerar la degradación o inactivar los compuestos tóxicos (Szulc *et al.*, 2014). Las estrategias de biodegradación del petróleo en suelo incluyen la bioestimulación, que requiere la adición de nutrientes para estimular las poblaciones microbianas autóctonas del sitio

contaminado, o bioaumentación que se basa en la inoculación de una cepa o consorcio microbiano dentro del ecosistema para degradar el contaminante (Butnariu y Butu, 2020; Lin *et al.*, 2010).

La eficiencia de la degradación del petróleo resulta ser más eficiente al utilizar comunidades bacterianas mixtas, a diferencia de una sola población, los consorcios microbianos son capaces de sintetizar compuestos que otras especies no pueden transformar (Tirado-Torres *et al.*, 2015). Los microorganismos son capaces de producir biosurfactantes que mejoran la biodisponibilidad de los contaminantes optimizando la biorremediación; los biosurfactantes son moléculas que tienen dominios tanto hidrófobos como hidrófilos y son capaces de reducir la tensión superficial en el medio de crecimiento; poseen diferentes estructuras químicas: lipopéptidos, glicolípidos y lipopéptidos que presentan una fuerte emulsificación de compuestos hidrófobos (Abdeli *et al.*, 2019).

La bioaumentación es una forma de proporcionar microorganismos específicos en cantidades suficientes para completar la biodegradación. Sin embargo, la generación de un medio de cultivo económico se convierte en un factor importante a la hora de producir un inoculante bacteriano; principalmente, por los elevados costos de los nutrientes grado reactivo que son utilizados; por lo que, es necesario tener en cuenta los requerimientos nutricionales de las poblaciones microbianas.

Los nutrientes deben estar en proporciones adecuadas para asegurar una elevada viabilidad y concentración de los microorganismos. Es por ello, que los objetivos de esta investigación fueron: a) evaluar el efecto de la relación C/N en el desarrollo de los microorganismos utilizando dos fertilizantes agrícolas como medio de cultivo, y b) evaluar la biodegradación del petróleo crudo utilizando un consorcio microbiano elaborado con bacterias aisladas de un suelo Histosol contaminado con petróleo.

## 1.4 OBJETIVOS

- Utilizar los fertilizantes agrícolas (nitrofoska y triple 17) como fuente de nitrógeno para el desarrollo de los microorganismos bajo dos relaciones de C/N 20 y 25
- Evaluar la biodegradación del petróleo crudo utilizando un consorcio microbiano elaborado con bacterias aisladas de un suelo Histosol contaminado con petróleo.
- Determinar la producción de lípidos polares asociados a la acción surfactante

## 1.5 HIPOTESIS

- Los fertilizantes nitrofoska y triple 17 pueden utilizarse como fuente nitrógeno para estimular el desarrollo microbiano.
- El consorcio microbiano puede biodegradar los hidrocarburos del petróleo en suelo Histosol.
- El consorcio microbiano tiene la capacidad de producir lípidos polares asociados a la acción surfactante

## **1.6 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1.6.1 Sitio de muestreo y recolección de muestras**

Para el presente estudio se seleccionó un suelo Histosol en el área de influencia del Activo Integral Cinco Presidentes del estado de Tabasco, México, ubicado en el paisaje geomorfológico de planicie palustre (Zavala-Cruz *et al.*, 2016 y Palma López *et al.*, 2017). Las muestras de suelo se recolectaron en un derrame de petróleo a orillas de la carretera Sánchez Magallanes del municipio de Cárdenas Tabasco, en las coordenadas 400823.0X – 2013574.7Y, Zona 15Q. El suelo contaminado con petróleo fue recolectado a 0-30 y 30-60 cm de profundidad (30 kg por cada capa de muestreo), de la misma manera se recolectaron 30 kg de suelo libre de contaminación a una distancia de 30 m de donde ocurrió el derrame. El muestreo del suelo se realizó con base en la norma oficial mexicana NOM-138-SEMARNAT-2012 (SEMARNAT, 2012).

### **1.6.2 Aislamiento y caracterización de colonias bacterianas**

El aislamiento de los microorganismos se preparó de la siguiente manera. En 90 mL de agua destilada se preparó una suspensión madre con 10 g de suelo contaminado con petróleo, después se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . Posteriormente, una alícuota de 0.1 mL de cada dilución se vertió en placas con Agar Bushnell Haas utilizando petróleo como fuente de carbono (2 mL.L). La alícuota se extendió por el método de extensión en placa y las placas se incubaron a 30 °C por 7 días (Madigan *et al.*, 2017).

Terminado el tiempo de incubación se seleccionaron siete unidades formadoras de colonias (UFC) identificadas como: B1, B2, B3, B4, B5, B6 y B7. Posteriormente, por el método de estriado en superficie fueron sembradas en placas con agar nutritivo y aisladas por el método de diluciones seriadas para su identificación morfológica a nivel colonia (Ramírez *et al.*, 2015; Madigan *et al.*, 2017). Las UFC fueron inoculadas en placas con Agar Bushnell Has e incubadas a 30 °C por 14 días para observar su potencial en la degradación del petróleo.

### 1.6.3 Diseño experimental

El diseño de experimento se estableció para identificar el efecto del factor sobre el crecimiento microbiano y consistió en un arreglo factorial no balanceado de 3 factores (4x2x2). Los factores fueron: tipo de cepa bacteriana (B2, B3, B5 y B7), fertilizante (nitrofoska y triple 17) y relación C/N de 20 y 25. Un total de 16 experimentos fueron desarrollados por triplicado. El monitoreo de la densidad óptica (DO) de las unidades experimentales (u.e.) se midió cada 12 horas a una longitud de onda de 600 nm (espectrofotómetro ThermoSpectronic.4001/4). Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos-vías y prueba de medias Tukey a un 95 % de confianza usando el Software estadístico Statgraphic Centerion-6.0.

### 1.6.4 Preparación e inoculación de las unidades experimentales (u.e)

Las u.e. fueron preparadas en matraces Erlenmeyer de 500 mL con volumen de trabajo de 300 mL. Se utilizó como fuente de nitrógeno nitrofoska y triple 17 (1 g.L<sup>-1</sup>) y como fuente de carbono glucosa. Para obtener la relación la relación C/N de 20 y 25 en cada fertilizante, la glucosa se adicionó de acuerdo al porcentaje de carbono que contiene 1 gramo de glucosa (Tabla 3). Después, las u.e. fueron selladas con tapón de hule y esterilizadas en autoclave a 121°C durante 20 min a 1,3 kg/cm<sup>2</sup>.

**Tabla 3.** Porcentaje de nitrógeno (N) y carbono (C) utilizados en las u.e.

Fertilizantes	Relación C/N	N (%)	Glucosa (g.L <sup>-1</sup> )
Nitrofoska	C/N <sub>20</sub>	12	8.5
	C/N <sub>25</sub>	12	10.625
Triple 17	C/N <sub>20</sub>	17	6
	C/N <sub>25</sub>	17	7.5

Las cepas bacterianas B2, B3, B5 y B7 fueron aclimatadas en medio de cultivo kim (Kim *et al.*, 2000) por 16 horas con el objetivo de tener células potencialmente maduras (Rueda-Puente *et al.*, 2009). Después, se extrajo un inóculo de cada cepa bacteriana a una  $DO_{600} = 1$  que se adicionó en cada tratamiento (nitrofoska C/N<sub>20</sub> Y C/N<sub>25</sub>, triple 17 C/N<sub>20</sub> C/N<sub>25</sub>). Posteriormente, las u.e. fueron selladas con un tapón de hule No 5 con 3 horadaciones. En cada horadación se introdujo tubos de vidrio con un diámetro interno de 3 mm; los tubos se utilizaron para las siguientes funciones: suministro de aire estéril, liberación de presión y toma de muestra (Ojeda Morales *et al.*, 2009).

### **1.6.5 Elaboración del consorcio**

Las cepas bacterianas B2, B3, B5 y B7 fueron aclimatadas en biorreactores con medio de cultivo kim hasta alcanzar una DO de 1 a 600 nm. Para asegurar que las concentraciones de las cepas fueran homogéneas en la elaboración del consorcio, se extrajo un inóculo de 10 mL de caldo con medio kim de cada biorreactor. Cada volumen de 10 mL del inóculo fue introducido en un matraz Erlenmeyer de 250 mL hasta obtener una mezcla de 40 mL de caldo. Posteriormente, una muestra de 10 mL de la mezcla se inoculó en un biorreactor utilizando como fuente de nitrógeno el fertilizante triple 17 a una relación C/N del 20. La curva de crecimiento del consorcio microbiano se construyó por DO a 600 nm.

### **1.6.6 Extracción e identificación de lípidos polares**

Un biorreactor fue diseñado con un matraz Erlenmeyer de 1000 mL, el cual contenía un consorcio microbiano suspendido en un caldo compuesto por fertilizante (triple 17 a una C/N<sub>20</sub>). El biorreactor se dejó en reposo durante 96 horas para el crecimiento poblacional microbiano, después, se retiró la biomasa microbiana utilizando el método de filtración con succión (Silva, 2011) para eliminar las sustancias no tensoactivas, el caldo libre de biomasa se mezcló con acetona ACS a 4 °C empleando una relación caldo/acetona 1:1.2 (Almazán *et al.*, 2000), la acetona ACS se eliminó del caldo utilizando un rotavapor marca ECISHEL; posteriormente, la extracción se realizó lavando el caldo con una mezcla de cloroformo/metanol relación 2:1, la mezcla de



solventes se añadió al caldo en relación 1:1 a flujo constante y se mezcló durante 15 minutos, después, el caldo se separó del sobrenadante por diferencias de densidades en embudos de separación (Almazán *et al.*, 2000; Mulligan *et al.*, 1989). El sobrenadante fue purificado en rotavapor a 30 °C y 30 rpm hasta obtener la muestra pura libre de solventes.

### **1.6.7 Cromatografía en capa fina y espectroscopia de infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR)**

La cromatografía en capa fina se realizó para identificar lípidos polares (glicolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos) asociados a la acción surfactante, con base en Halmilton y Halmilton (1992).

El análisis de infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR) se utilizó para la identificación de los grupos funcionales, para ello, se utilizó un espectrofotómetro marca Shimadzu Modelo IRAffinity-1, la lectura espectroscópica se realizó en rango espectral comprendido entre de 1000 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### **1.6.8 Caracterización de las muestras de suelo**

La caracterización de las muestras de suelo se realizó midiendo los siguientes parámetros: pH, humedad, materia orgánica, nitrógeno total y fósforo disponible con base en lo establecido en la NOM-021-SEMARNAT-2002 (SEMARNAT, 2002), hidrocarburos fracción pesada (HFP) e hidrocarburos fracción media (HFM) de acuerdo con la NOM-138-SEMARNAT-2012 (SEMARNAT, 2012), y conteo de células viables (Madigan *et al.*, 2017).

### **1.6.9 Diseño experimental**

Para evaluar el proceso de biodegradación del petróleo se estableció un experimento con arreglo factorial de 2x2. El factor 1 fue la concentración de petróleo en el suelo con dos niveles (A1 = 262,000.2 g/kg y B1= 123,594.1 g.kg<sup>-1</sup> en HFP) y el factor 2 fue atenuación natural (A2 y B2) más un control (suelo sin contaminación).

### **1.6.10 Inoculación de las unidades experimentales y monitoreo del experimento**

Las u.e. experimentales fueron establecidas en botes de plástico con 5 kg de suelo preparado de la siguiente manera: suelo contaminado con petróleo a una concentración de 262,000.2 y 123,594.11 g.kg<sup>-1</sup> en HFP con tres réplicas más un testigo (atenuación natural) y un blanco (suelo libre contaminación). Posteriormente, las u.e con suelo contaminado fueron saturados con el inoculante triple 17-C/N<sub>20</sub>, las u.e testigo y blanco se saturaron con agua de grifo previamente estéril.

El monitoreo del experimento se llevó acabo realizando un muestreo de las u.e cada 15 días por 3 meses, tiempo durante el cual se realizaron los siguientes análisis: pH, humedad, HFP y HFM, y conteo de células viables en placas con agar bushnell hass utilizando petróleo como fuente de carbono para los microorganismos. Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA y pruebas de medias Tukey con 95 % de confianza.

## **1.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1.7.1 Caracterización de los microorganismos**

Se aislaron cuatro unidades formadoras de colonias (UFC) del suelo contaminado con petróleo. En la Tabla 4 se muestran las características morfológicas de cada una de las cepas bacterianas. El estudio microscópico permitió observar que la UFC clasificada como: B2 tiene forma de cocos, las UFC: B3, B5 forma de bacillos, mientras que la UFC B7 forma de estreptobacilo.

**Tabla 4.** Características morfológicas y microscópicas de las UFC aisladas de suelo contaminado con petróleo

UFC	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Observación microscópica	Gram
B2	Circular	Entero	Plana	Creмосa	Cocos	+
B3	Circular	Entero	Elevada	Brillante	Bacilos	+
B5	Rizoide	Lobulado	convexa	Creмосa	Bacilos	+
B7	Irregular	Ondulado	Plana	Rugosa	Estreptobacilo	+

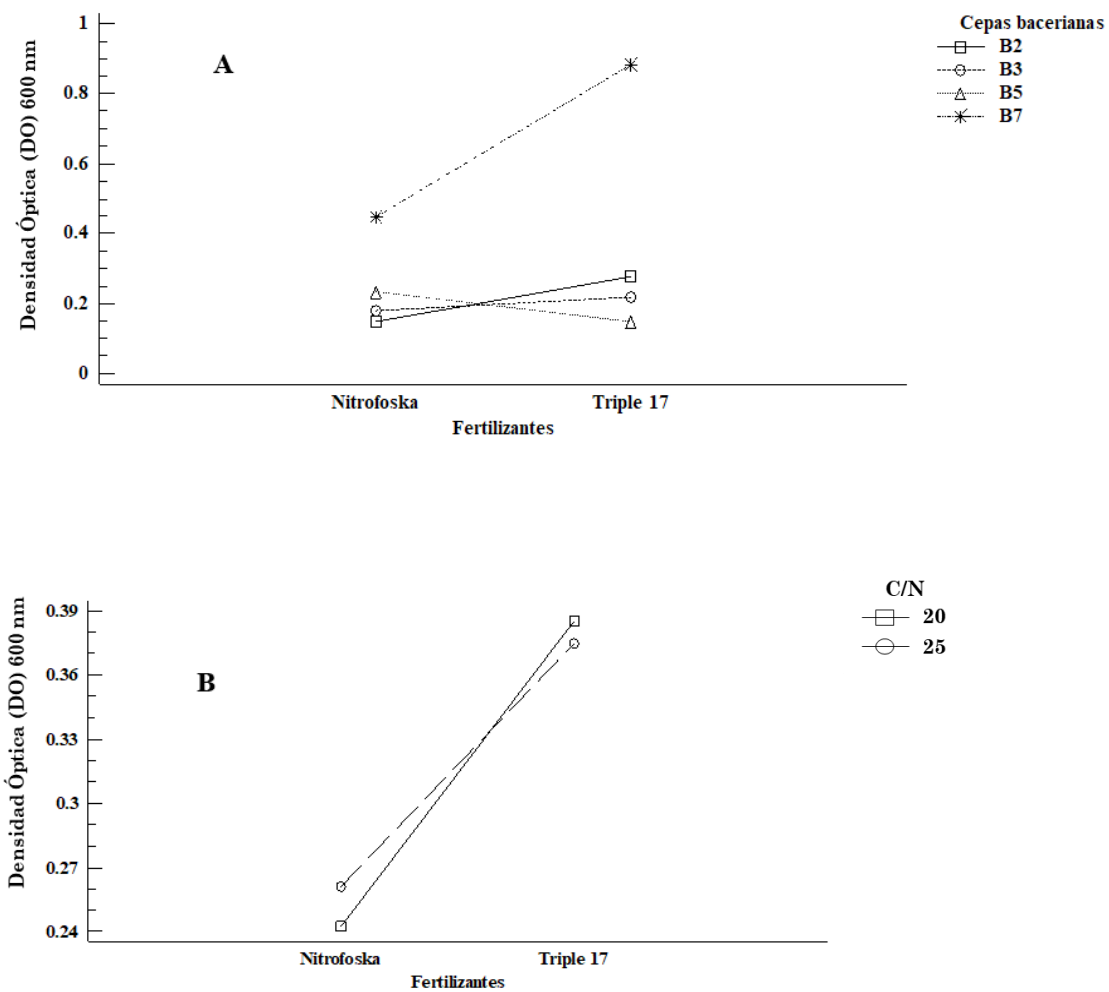
En la biorremediación de suelo contaminado con petróleo suelen utilizarse bacterias autóctonas del sitio contaminado. En un estudio realizado por Nasser-AlKaabi *et al.* (2020) aislaron y emplearon bacterias autóctonas *del género Bacillus, Virgibacillus y Pseudomonas* para remediar un sitio contaminado con petróleo.

### 1.7.2 Crecimiento microbiano en medios de cultivo enriquecidos con fertilizantes

La comparación estadística de la fuente de nitrógeno con respecto al desarrollo de las cepas bacterianas por DO mostró diferencias significativas ( $p \leq 0.01$ ). En la Figura 5 A se observa que el crecimiento poblacional máximo lo registró la UFC B7 en triple 17 a una DO de 0.88, y de 0.43 en nitrofoska. De la misma manera, las UFC B2 y B3 alcanzaron su máximo desarrollo poblacional en triple 17, mientras que, la UFC B5 tuvo un mejor crecimiento poblacional en nitrofoska a una DO de 0.22.

La fuente de nitrógeno que permitió un mejor desarrollo en las UFC fue el fertilizante triple 17 con una relación C/N de 20 (Figura 5 B). De acuerdo con Upadhyay *et al.* (2020), la concentración de los nutrientes que contienen los medios de cultivo influyen en la fisiología microbiana, nutrición, multiplicación celular, producción de metabolitos primarios y secundarios. Los microorganismos necesitan una fuente de carbono para

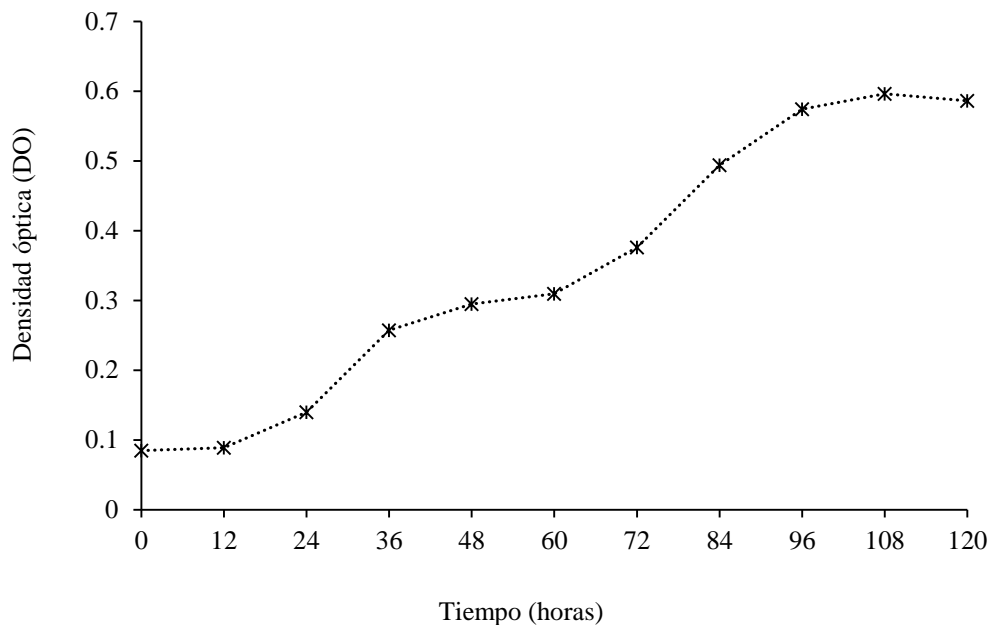
satisfacer sus demandas energéticas y construir biomasa microbiana, por lo que un balance estequiométrico carbono/nutrientes puede reflejar la demanda energética y nutricional de los microorganismos (Soong *et al.*, 2020). Además, la biodisponibilidad del C en la relación C/N de 25 favorece la actividad microbiana y regula la capacidad para inmovilizar el N, no obstante, la biomasa microbiana disminuye cuando la fuente N es limitante (Montaño *et al.*, 2016).



**Figura 5.** Medición de las DO de los microorganismos. A) DO máxima de las cepas bacterianas utilizando los fertilizantes como fuente de nitrógeno B) efecto de la DO en los fertilizantes bajo la relación de C/N de 20 y 25.

### 1.7.3 Curva de crecimiento microbiano

El consorcio microbiano alcanzó la fase estacionaria después de las 96 horas de la inoculación a una DO de 0.55 nm (Figura 6), de acuerdo con Rosales *et al.* (2020) las curvas de crecimiento microbiano por DO son una herramienta útil para determinar la respuesta de los microorganismos en condiciones variables, y para estimar los parámetros óptimos de crecimiento como es la densidad celular y el cálculo del tiempo de duplicación bacteriana. Zhang *et al.* (2021) han reportado curvas de crecimiento de consorcios microbianos por DO durante la biodegradación de hidrocarburos alifáticos de bajo peso molecular como el *n*-decano, *n*-dodecano y *n*-hexadecano.

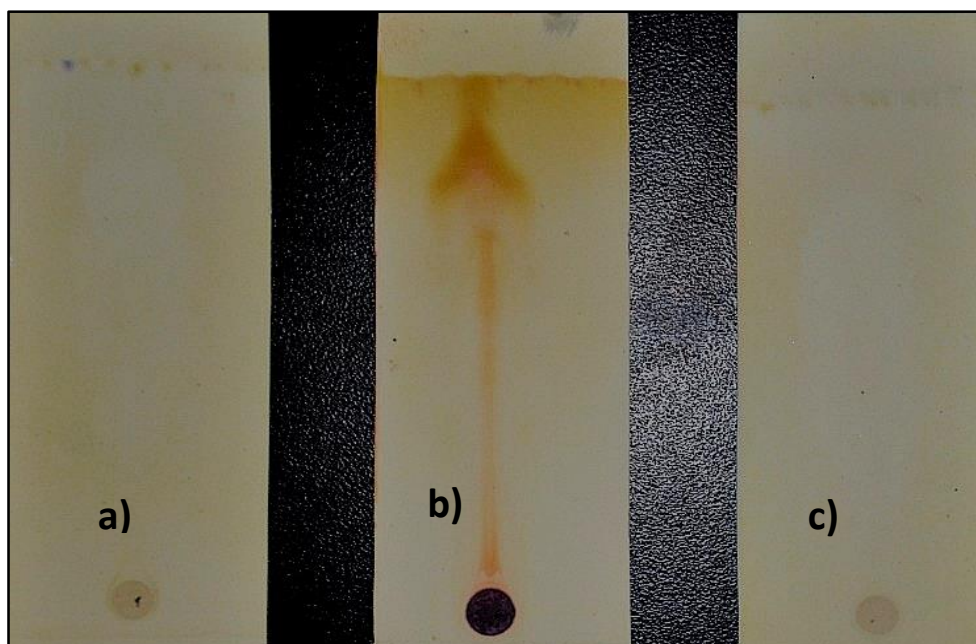


**Figura 6.** Curva de crecimiento del consorcio microbiano utilizando el fertilizante triple 17 a una relación C/N de 20.

### 1.7.4 Lípidos polares asociados a la acción surfactante

La determinación de lípidos polares realizada por cromatografía en capa fina, permitió la identificación de lipopéptidos asociados a la acción surfactante, los lipopéptidos aparecieron como una mancha color rojo-violeta sobre la placa de cromatografía (Figura

7), estos resultados son similares a los reportados por Ibrar y Zhang (2020) quienes obtuvieron y caracterizaron dos biosurfactantes de consorcios microbianos con base en lipopéptidos, y que además poseían la capacidad de generar emulsiones estables y aumentaban la solubilidad de algunos compuestos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), mejorando su biodegradación.

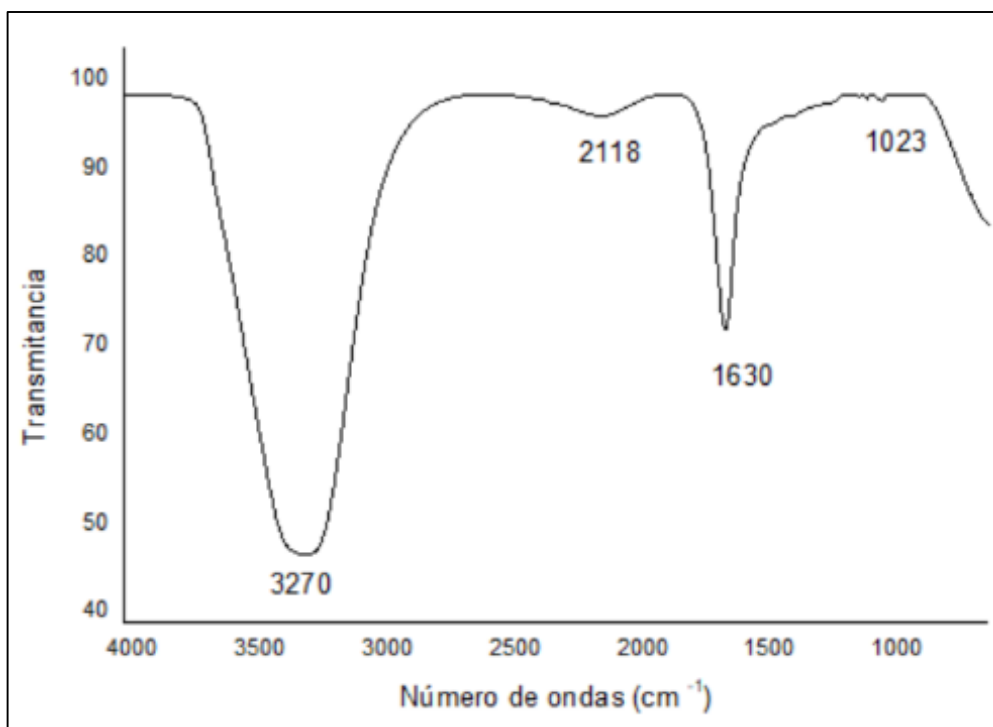


**Figura 7.** Identificación de lípidos polares, a) fosfolípidos, b) lipopéptidos y c) glicolípidos

### 1.7.5 Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR)

En la Figura 8 se muestra el espectro FT-IR del biosurfactante por el consorcio microbiano, las bandas características de absorción pertenecen a los grupos funcionales formados por los lipopéptidos, los picos más importantes fueron localizados a una longitud de onda de  $3270\text{ cm}^{-1}$  (enlaces O-H característicos de los polisacáridos),  $2118\text{ cm}^{-1}$  (picos de enlaces C-H: cadenas de hidrocarburos alifáticos) y  $1630\text{ cm}^{-1}$  (enlaces CO-N de grupos y radicales alquilos en a una longitud de onda de  $1023\text{ cm}^{-1}$ ). El

espectro de IR del biosurfactante producido por el consorcio fue similar a la estructura del biosurfactante producido por *B. licheniformis* publicado por Joshi *et al.*, (2016), quienes obtuvieron estructuras de lipopéptidos similares a las surfactinas reportados como excelentes agentes tensioactivos con potencial en la aplicación de la recuperación mejorada de petróleo.



**Figura 8.** Espectroscopía de infrarrojo con transformadas de Fourier (FT-IR) del biosurfactante producido por el consorcio microbino.

### 1.7.6 Caracterización inicial de las muestras de suelo

La muestra de suelo Histosol se utilizó para establecer los tratamientos de biorremediación, para ello, se caracterizó de forma inicial con el fin de monitorear el experimento, las variables analizadas se muestran en la Tabla 5.

Las muestras de Histosol libre de contaminación registraron un porcentaje muy alto en materia orgánica (MO) y fósforo (P), los valores de N fueron clasificados como bajos de acuerdo con las especificaciones para fertilidad y clasificación de suelos de la NOM-021-RECNAT-2002 (SEMARNAT, 2002). El análisis de microorganismo presentes en el suelo fue en promedio de 240 UFC.mL<sup>-1</sup> y un pH moderadamente ácido (5.5). De acuerdo con Zavala-Cruz y García-López (2012), los Histosoles se encuentran saturados con agua durante casi todo el año y el drenaje muy lento contribuye a la acumulación de la materia orgánica bajo condiciones anaerobias, principalmente por el bajo contenido de oxígeno presente en el agua.

La muestra de suelo contaminada con petróleo registró una concentración de HFP por encima del límite máximo permisible establecido por la NOM-138-SEMARNAT-2012 (SEMARNAT, 2012), la concentración de HFM fue de 59.086 y 82.856 mg.kg<sup>-1</sup> valores que se encuentran por debajo del límite máximo permisible. La concentración HFP son muchos más elevadas que los reportados por Domínguez-Domínguez *et al*, 2011 en suelos influenciados por el campo cinco presidentes. El análisis de microorganismos presentes en suelo fue de 37x10<sup>2</sup> y 24x10<sup>2</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, el pH fue moderadamente ácido (5.5) y el contenido en MO fue muy elevada 93 y 89 % (SEMARNAT, 2002).

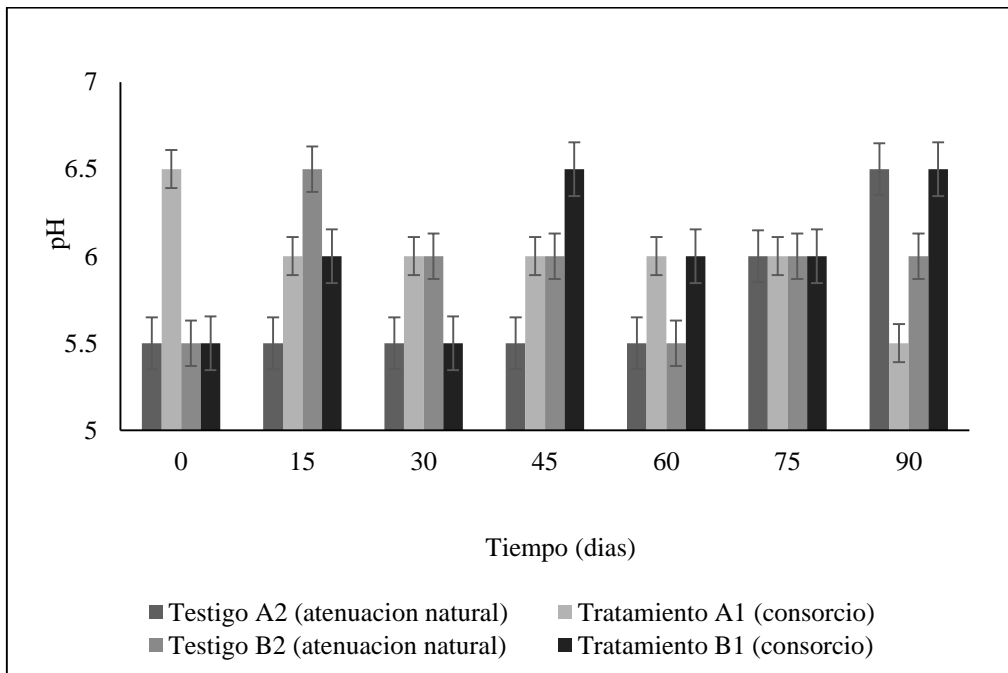
**Tabla 5.** Variables analizadas en las muestras de suelo

Muestra de suelo	Muestreo (cm)	MO (%)	N (%)	P (mg.kg <sup>-1</sup> )	HFP (mg.kg <sup>-1</sup> )	HFM (mg.kg <sup>-1</sup> )	pH	(UFC.mL <sup>-1</sup> )
Contaminado con petróleo	0-30	93	1.78	2.91	262,000	59.086	5.5	37X10 <sup>2</sup>
	30-60	89	1.50	2.33	123,594	82.856	5.5	24X10 <sup>1</sup>
No contaminado	0-30	88	2.64	12.99	824.73	ND	6.5	40X10 <sup>1</sup>
	30-60	68	2.84	21.76	695.12	ND	5.5	38X10 <sup>1</sup>



### 1.7.7 Determinación de pH

Durante el proceso de biorremediación el pH registrado fue moderadamente ácido, el tratamiento A1 tuvo un valor de 5.5, mientras que el tratamiento A2 y el tratamiento B1 mantuvieron un valor estable de 6.0 durante los 90 días del tratamiento, sin embargo, el tratamiento B2 fue en aumento durante el proceso de biorremediación, variando de 5.5 hasta 6.5 (Figura 9). El pH es una variable que influye en la biorremediación de suelos contaminados con petróleo, Romero *et al.* (2008) mencionan que valores de pH fuertemente ácidos o fuertemente alcalinos pueden afectar las poblaciones microbianas haciendo la biodegradación lenta.

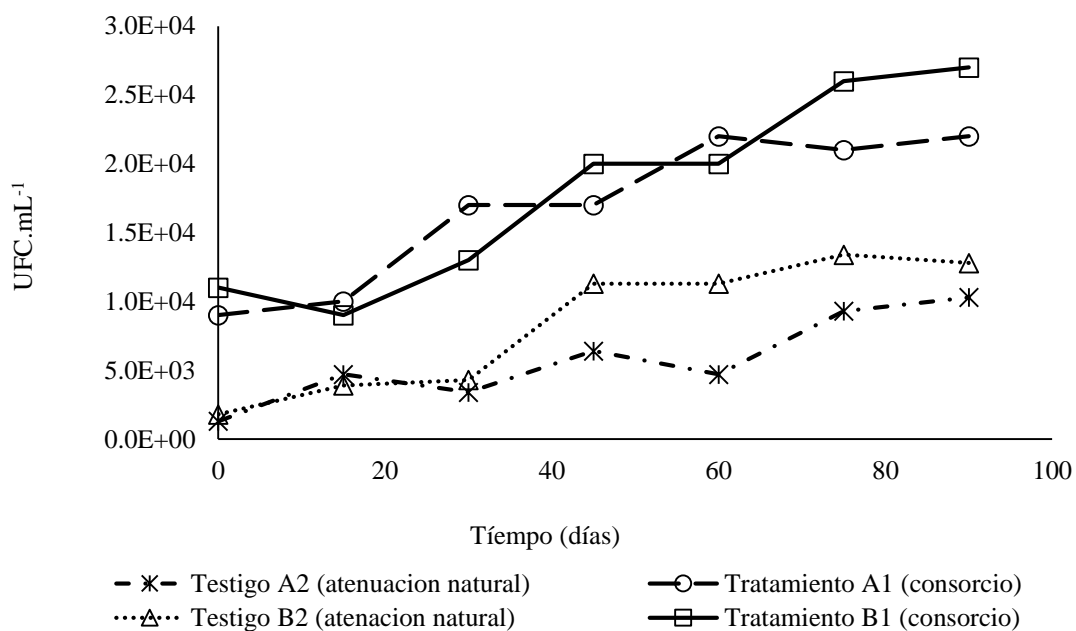


**Figura 9.** Observación del pH durante la biorremediación del suelo contaminado con petróleo.

### 1.7.8 Población microbiana presente en los tratamientos

Las UFC microbianas presentes en suelo es otro de los factores bióticos que condicionan a la biorremediación (Ojeda-Morales y Juárez-Palacio, 2019). En la Figura 10 se

observa el crecimiento poblacional de los microorganismos degradadores de petróleo crudo, desde el día cero hasta los 90 días de experimentación, en donde, los tratamientos con bioaumentación (A1 y B1) utilizando el consorcio microbiano y atenuación natural (sin bioaumentación) mantuvieron una actividad microbiológica en constante crecimiento; sin embargo, el tratamiento con el consorcio microbiano (A1 y B1) registró la mayor carga microbiana durante el proceso de biorremediación ( $2E+04$  y  $2.5 E+04$  UFC.mL<sup>-1</sup> respectivamente), mientras la atenuación natural (Testigo A2 y B2) tuvieron una actividad microbiana baja ( $5.4E+03$  y  $1.5E+4$  UFC.mL<sup>-1</sup>) en comparación con la bioaumentación.

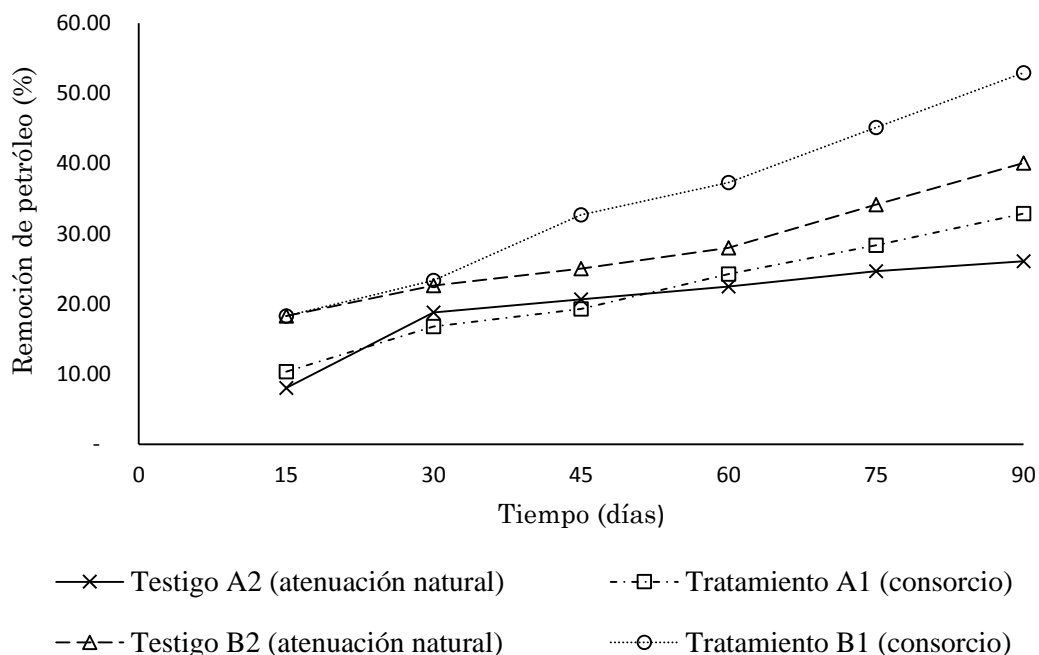


**Figura 10.** Grafica de crecimiento poblacional de los microorganismos degradadores de hidrocarburos

En los procesos de biorremediación, los nutrientes son los factores que aumentan la actividad microbiana, los más importantes son: carbono, nitrógeno, fósforo y potasio que son necesarios para la producción de aminoácidos, proteínas, enzima, y otros constituyentes celulares como los fosfolípidos, que son útiles para acelerar la biodegradación (Romero *et al.*, 2008). El triple 17 utilizado tiene una concentración de nutrientes en N, P y K (17-17-17), elementos que fueron incorporados al suelo durante la bioaumentación con el consorcio microbiano, estimulando al mismo tiempo el desarrollo de microorganismos degradadores de petróleo.

### **1.7.9 Degradación de Hidrocarburos de Fracción Pesada (HFP)**

La comparación estadística de la remoción de petróleo con respecto al tiempo presento diferencias significativas ( $p \leq 0.01$ ) en un intervalo de confianza de 95 % de medias Tukey. Durante el proceso de biorremediación, en los tratamientos se registró una disminución de los hidrocarburos del petróleo en su fracción pesada (HFP) utilizando el consorcio microbiano y atenuación natural (Figura 11). Donde la biorremediación con el consorcio microbiano en los tratamientos testigo A1 y B1 registraron una disminución de los HFP de 38 y 52 % respectivamente; por otra parte, los tratamientos sin bioaumentación (atenuación natural) A2 y B2 registraron un porcentaje de remoción de los HFP de 23 % y de 30%.



**Figura 11.** Porcentaje de remoción de hidrocarburos fracción pesada (HFP) durante el proceso de biorremediación.

## 1.8 CONCLUSIÓN

En el presente estudio se demostró que los fertilizantes nitrofoska y triple 17 pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno para aumentar la densidad celular de los microorganismos, además, una buena relación C/N refleja la actividad enzimática de los microorganismos para producir biomasa microbiana. El consorcio microbiano elaborado de cepas bacterianas aisladas de suelo contaminado con petróleo, demostró su efectividad para biodegradar hasta un 52 % de hidrocarburos del petróleo en el suelo Histosol, y se demostró que el consorcio tiene la capacidad de producir un compuesto en base a lipopéptidos, sustancia que puede aumentar la solubilidad de los contaminantes y mejorar la biodegradación.

**CAPITULO 2.- ESTUDIO DE SUELO HISTOSOL CONTAMINADOS POR PETRÓLEO  
MEDIANTE ESPECTROMETRÍA NIR, CROMATOLOGRAFÍA DE GASES-MASAS y  
GENERADOR DE ESPACIO DE CABEZA**

## 2.1 RESUMEN

El petróleo es la fuente de contaminación más común de los suelos con impactos negativos sobre la flora y fauna. Los efectos tóxicos dependen del grado de contaminación y el tiempo de persistencia de los compuestos químicos que componen a cada hidrocarburo. Los métodos más utilizados en la detección y cuantificación de petróleo en suelos son: 1) extracción gravimétrica y 2) detección por cromatografía de gases con detectores de espectrometría de masas (GC-MS). Ambos métodos se caracterizan por requerir de la extracción de los compuestos derivados del petróleo con solventes químicos, lo que resulta en acumulación de residuos químicos peligrosos, operación prolongada y costosa para el análisis de muestras contaminadas con petróleo. En esta investigación se realizó un modelo de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS) para detectar y estimar las concentraciones de hidrocarburos de petróleo en suelos Histosoles, empleando espectrometría VIS-NIR-SWIR y cromatografía de Gases-Masa con generador espacio de cabeza (headspace). El coeficiente de calibración  $R^2$  y el error estándar de calibración (SEC) para el modelo de calibración NIR fue de una  $R^2 = 0.9998$  y  $SEC = 1585.34$ . Mediante la cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas y generador de espacio de cabeza (HS-GC-MS), se identificaron los compuestos presentes en los suelos contaminados alcanos lineales y ramificados como: tetradecano, nonadecano, heptadecano, dodecano y dimetildecano en las muestras de suelos contaminados con petróleo.

Palabras claves: espectrometría, cromatografía, petróleo, suelo

## 2.2 ABSTRACT

Oil is the most common source of soil contamination with negative impacts on flora and fauna. The toxic effects depend on the degree of contamination and the persistence time of the chemical compounds that make up each hydrocarbon. The most used methods in the detection and quantification of oil in soils are: 1) gravimetric extraction and 2) detection by gas chromatography with mass spectrometry detectors (GC-MS). Both methods are characterized by requiring the extraction of petroleum-derived compounds with chemical solvents, which results in accumulation of hazardous chemical residues, prolonged and expensive operation for the analysis of samples contaminated with petroleum. In this investigation, a partial least squares (PLS) regression model was performed to detect and estimate the concentrations of petroleum hydrocarbons in Histosol soils, using VIS-NIR-SWIR spectrometry and headspace generator chromatography. The calibration coefficient  $R^2$  and the standard error of calibration (SEC) for the NIR calibration model was  $R^2 = 0.9998$  and  $SEC = 1585.34$ . By means of gas chromatography-mass spectroscopy coupled to a headspace generator (HS-GC-MS), the compounds present in contaminated soils linear and branched alkanes were identified as: tetradecane, nonadecane, heptadecane, dodecane and dimethyldecane in oil-contaminated soil samples.

Keywords: spectrometry, chromatography, oil, soil

## 2.3 INTRODUCCIÓN

Las malas prácticas en la producción, almacenamiento y transporte de los hidrocarburos del petróleo son las principales causas de contaminación del suelo, agua y aire (Pérez-Muños *et al.*, 2019). La incorporación del petróleo al suelo modifica las propiedades físicas y químicas de los suelos, como la densidad y foto toxicidad, y altera las comunidades microbianas (Butnariu y Butu, 2020). De los métodos analíticos empleados para la caracterización y cuantificación de hidrocarburos derivados del petróleo en suelos, el más utilizado es la extracción Soxhlet descrita en la norma oficial mexicana NMX-AA-134-SCFI-2006 (DOF, 2006). El método indica un tiempo de extracción prolongado y puede utilizarse como disolvente hexano, diclorometano, éter etílico, acetona, metanol o la combinación entre ellos; sin considerar las propiedades físicas y químicas del suelo (Pons-Jiménez *et al.*, 2011). Se ha implementado la cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas (GC-MS) para la detección y cuantificación de compuestos específicos derivados del petróleo, el método proporciona selectividad y sensibilidad reduciendo el tiempo de operación, pero no reduce la manipulación de solventes químicos como agentes extractantes de los compuestos derivados del petróleo (Pollo *et al.*, 2018).

Por otra parte, la espectrometría de infrarrojo cercano (NIRS) y la Quimiometría hacen posible establecer modelos para identificar y cuantificar compuestos moleculares de muestras sólidas y líquidas (Alomar y Fuchslocher, 1998). La técnica requiere una mínima cantidad de muestra que se somete a una fuente de radiación infrarroja para producir un espectro con la información correspondiente a la composición química de la muestra de contaminado con petróleo crudo. Con la característica de ser una alternativa rápida, directa y respetuosa con el medio ambiente (Sun, 2009). El escaneo de las muestras no requiere la manipulación de solventes químicos, y la preparación solo toma unos minutos (Moro *et al.*, 2021). El NIR se ha implementado en la detección rápida de hidrocarburos totales del petróleo en suelos minerales (Basile *et al.*, 2021).

El espectro obtenido por instrumentación NIR puede correlacionarse con la composición química conocida de la muestra mediante modelos de calibración



multivariante (Moro *et al.*, 2021), el modelo puede predecir una propiedad de la muestra analizada: viscosidad, concentración de contaminantes, densidad, etc. (Cavado-Osorio *et al.*, 2014). Las técnicas quimiométricas más utilizadas en la espectrometría NIR son: el análisis de componentes principales (PCA); como un método de análisis exploratorio multivariado, útil para separar la variación sistemática del ruido, permite la identificación de similitudes y diferencias de grandes conjuntos de datos (Geladi y Linderholm, 2020). La regresión lineal de mínimos cuadrados parciales (PLS) como una técnica multivariante que se utiliza para modelar la relaciones entre múltiples variables de respuesta, es una forma rápida y sencilla de establecer una ecuación de predicción (Garthwaite, 1994). En la actualidad estudios realizados por Mejía-Ospino *et al.* (2011) y Douglas *et al.* (2018) han utilizado la espectrometría NIR en la detección y cuantificación de compuestos derivados del petróleo.

En estudios de Pérez-Pavón *et al.* (2004) y Jaén-González *et al.* (2021), se utilizó la cromatografía de gases – espectrometría de masas con acoplamiento directo de la muestra un generador de espacio de cabeza. El objetivo de la técnica fue la identificación rápida de compuestos derivados del petróleo, ya que es una técnica simple, limpia y amigable con el ambiente al no requerir de un tratamiento previo de las muestras antes del análisis (Shariati-Feizabadi *et al.*, 2003).

El presente estudio se desarrolló para proponer modelos de cuantificación y detección rápida de hidrocarburos del petróleo en suelo Histosol y de UFC mediante espectrometría VIS-NIR-SWIR y la identificación de compuestos derivados del petróleo en un proceso de biorremediación mediante HS-GC-MS.

## **2.4 OBJETIVOS**

- Analizar Hidrocarburos Fracción Pesada (HFP) e Hidrocarburos Fracción Media (HFM) en suelo Histosol contaminado con petróleo utilizando un espectrómetro de infrarrojo cercano (NIRS) y un cromatógrafo de gases-masas (CG-MS) con generador de espacio de cabeza (HS)
- Construir modelos de clasificación y cuantificación quimiométrica de los hidrocarburos del petróleo con la información generada del NIRS.

## **2.5 HIPÓTESIS**

- Los espectros VIS-NIR y los cromogramas (GC-MS-HS) pueden detectar los hidrocarburos del petróleo.
- Los modelos de clasificación y cuantificación generados por los espectros VIS-NIR pueden predecir la concentración de hidrocarburos del petróleo

## **2.6 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.6.1 Muestreo de suelo**

Las muestras de suelo proceden del proceso de biorremediación del suelo Histosol realizado en el capítulo 1. Las muestras de suelo se colectaron cada 15 días, por un periodo de tres meses, con un total de 70 muestras de suelo.

### **2.6.2 Determinación de Hidrocarburos Fracción pesada (HFP)**

El análisis de Hidrocarburos Fracción Pesada (HFP) se realizó por el método de extracción por sonicación siguiendo las especificaciones de la norma mexicana NMX-AA-134-SCFI-2006 (DOF, 2006). Para ello, una muestra de 10 g de suelo fue homogenizada con sulfato de sodio anhidro hasta adsorber humedad. Posteriormente se adicionaron 30 mL de hexano y se llevó a zonificación por 20 minutos (Powersonic 45. Modelo: LUC-405), el material extractable con hexano se filtró en un matraz balón, previamente llevado a peso constante, y se utilizó papel filtro Whatman del No 40, el hexano fue retirado del matraz en un rotavapor a 70 °C y 30 rpm, posteriormente, el matraz se llevó a peso constante a 110 °C para la cuantificación de los materiales extractable con hexano (HEM). El extracto final fue disuelto con 30 mL de hexano y filtrado en papel Whatman y a través de silica gel (3 g de silica gel por cada 1000 mg de HEM). El exceso de disolvente fue retirado del rotavapor y llevado a peso constante a 110 °C. El extracto final se cuantificó como hidrocarburos fracción pesada (HFP) con base en la NMX-AA-134-SCFI-2006 (DOF, 2006).

### **2.6.3 Análisis con NIRS**

Para eliminar el efecto del contenido de humedad en el análisis espectral, las muestras de suelo fueron secadas a la sombra a una temperatura de 27 °C, molidas y tamizadas a través de malla de 1 mm de diámetro (Pons-Jiménez *et al.*, 2011). Para la medición óptica, una muestra suelo fue colocada en una celda porta muestra de 24 cm<sup>3</sup> con ventana de cuarzo, para aproximadamente 50 g de suelo, la celda fue colocada en un espectrofotómetro de reflectancia en el infrarrojo cercano NIRS (marca Foss, modelo

6500 System II Vertical Type 461008). Las lecturas de reflectancia se realizaron en un rango espectral de 400 hasta 2498 nanómetros (nm) en intervalos de 2 nm. Por cada muestra se registró un total de 1050 datos con el programa ISIScan (Infrasoft. 2008. ISIScan, Quick Start Guide for System II Analyzer. Version 2.81. Infrasoft International LLC. State College, PA USA).

#### **2.6.4 Análisis con HS-GC-MS**

La medición cromatográfica se realizó utilizando la técnica de espacio de cabeza, para ello, una muestra de 5 g de muestra de suelo fue colocada en un vial con dimensiones de 22.5 x 50 mm y volumen de 10 mL, y se sellaron los viales. Posteriormente el vial fue colocado en el HS-GC-MS (marca Varian, modelo 3900) y calentado a 95 °C, se aplicó una inyección split con un volumen de muestra de 1 µL. Los compuestos volátiles fueron separados mediante una columna capilar compuesta en 95 % metilpolisiloxano y 5 % fenil (30 m x 0.25 mm x 0.25 DF). El gas acarreador fue helio (99.99 %). La rampa de temperatura del horno fue de 60 °C a 250 °C en intervalos de 10 °C min<sup>-1</sup>, y la temperatura se mantuvo durante 30 min (Guerrero-Peña, 2006). Los resultados del HS-GC-MS fueron procesados en el software Workstation toolbar, librería espectral MS-Search. versión 2.0.

#### **2.6.5 Análisis de componente principales (PCA)**

Los espectros de reflectancia de las 70 muestras de suelo fueron sometidos a un análisis de componentes principales (PCA) para identificar agrupaciones, similitudes y diferencias en las muestras de suelo. El análisis de PCA permite transformar la variable (longitudes de onda) en componentes principales (PC) para reducir la dimensionalidad del conjunto de datos, los espectros procesados fueron mostrados en una figura bidimensional generada con el Software Pirouette 4.5.

#### **2.6.6 Regresión de mínimos cuadros parciales (PLS)**

Los espectros VIS-NIR-SWIR de las 70 muestras suelo se sometieron a un tratamiento matemático para eliminar el ruido, alinear y mantener los espectros a una misma escala. El procedimiento incluyó: suavizado, primera derivada, segunda derivada,

logaritmo de base 10 ( $\log 10$ ) y variable normal estándar (SNV). Los datos procesados se utilizaron para realizar un modelo lineal multivariado para relacionar dos conjuntos de datos (variables predictoras X y variable de respuesta Y). En este estudio se desarrolló una base de datos combinando los espectros VIS-NIR-SWIR de las 70 muestras de suelo y datos referencia elaborados por métodos gravimétricos; hidrocarburos fracción pesada (HFP) y cuantificación de microorganismos presente en el suelo durante el proceso de biorremediación. Los datos espectrales VIS-NIR-SWIR se definieron como variables predictoras (Y) y los datos de referencia como variables de respuesta (X). Los modelos de predicción PLS fueron desarrollados en el software estadístico Pirouette 4.5 y evaluados mediante una validación cruzada utilizando como coeficiente de predicción la  $R^2$  (Tabla 6).

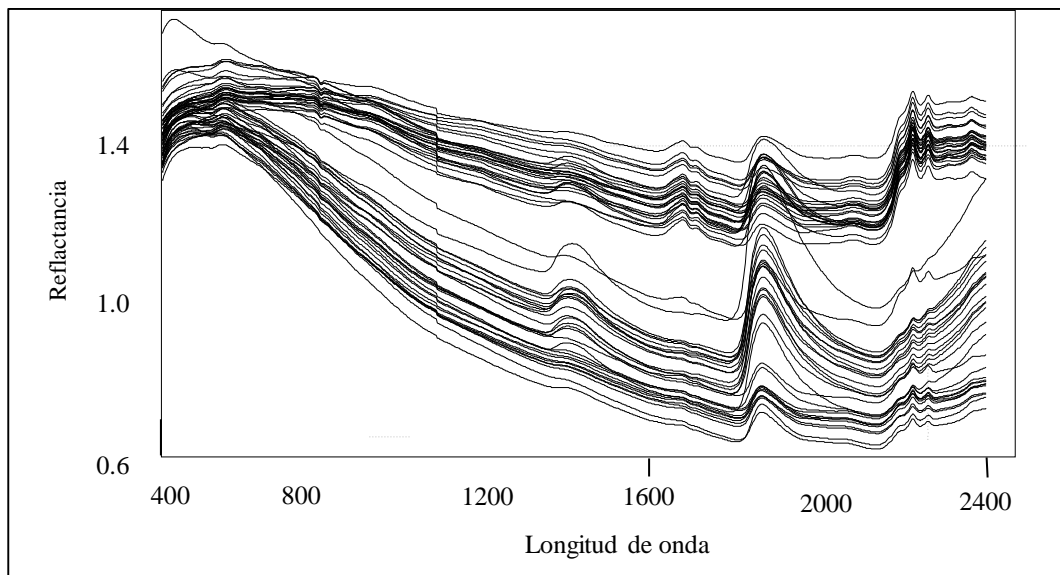
**Tabla 6** Indicadores estadísticos para seleccionar y evaluar el modelo de calibración.

<b>Validación interna</b>	
<b>Calificadores estadísticos</b>	<b>Ecuación</b>
RSQ (coeficiente de correlación múltiple)	$R^2 = 1 - \frac{SEC^2}{SD^2}$
SEC (error estándar de calibración)	$SEC = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}}{n-t-1}$
SECV (error estándar de validación cruzada)	$SECV = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}}{N}$
PRESS (suma del error residual predicho)	$\sum_i^n \hat{s}_i^2$

## 2.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.7.1 Espectrometría de infrarrojo cercano VIS-NIR-SWIR de las muestras de suelo

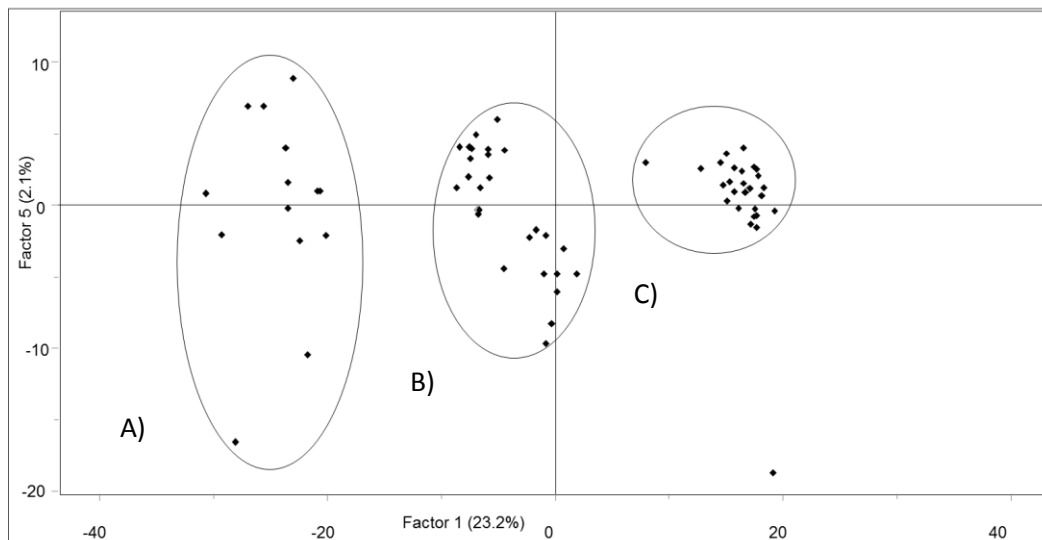
La Figura 12 muestra los espectros de las 70 muestras de suelo, los cuales se obtuvieron sin procesamiento previo, (56 espectros para muestras contaminadas con petróleo crudo y 14 muestras no contaminadas). Las muestras contaminadas con petróleo presentan un patrón de respuesta de reflectancia entre 2000 y 2300 nanómetros, por lo que pueden asociarse al estiramiento del enlace C-H vinculados a los hidrocarburos totales del petróleo (TPH). En estudios realizados por Douglas *et al.* (2018) reportaron bandas de absorción a 2207 nanómetros que se atribuyen a los espectros típicos de suelo con petróleo crudo. Las muestras de suelo no contaminadas no presentan bandas de absorción de energía en esas longitudes de ondas. Las bandas de absorción entre 1300 y 1500 según Jia *et al.* (2021) suceden por la presencia de humedad en las muestras de suelo. Estudios realizados por Jarquín-Sánchez *et al.* (2012) reportaron espectros NIR con picos de absorción a 1700 nanómetros relacionados con la presencia de nitrógeno (N) en suelo.



**Figura 12** Espectros VIS-NIR-SWIR sin procesar de 70 muestras de suelo (56 contaminadas con petróleo y 14 sin contaminación).

### 2.7.2 Clasificación mediante análisis de componentes principales (PCA)

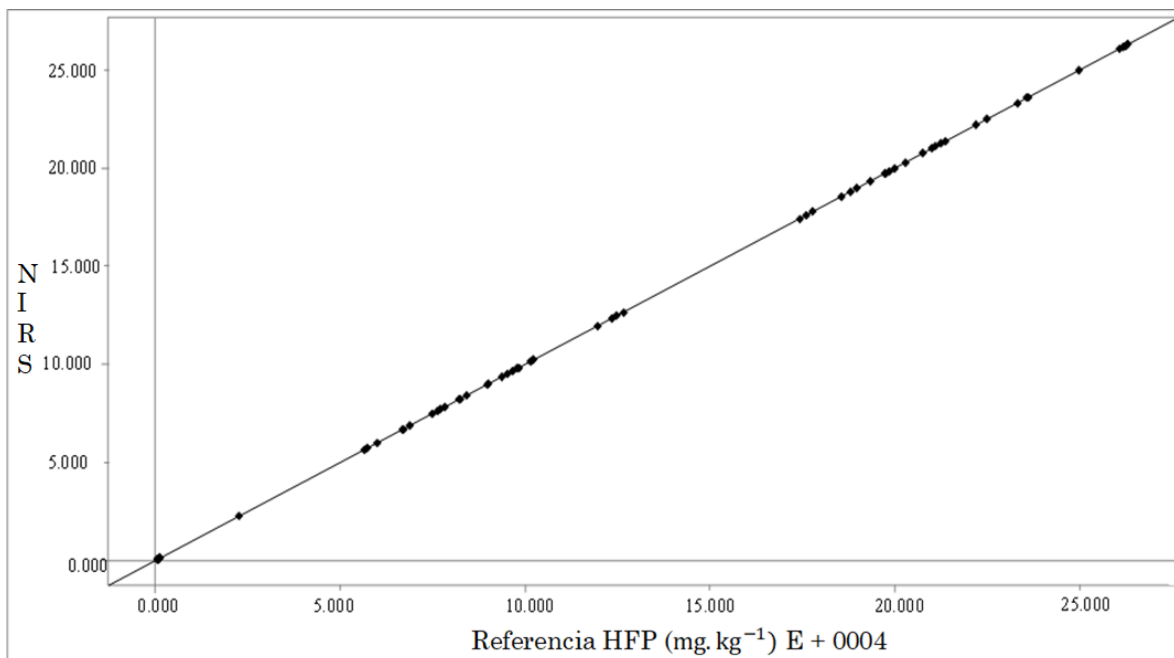
Se utilizó el análisis de PC por ser un método exploratorio multivariado útil para separar la variación sistemática del ruido, conservar la información relevante de los datos originales y permitir la visualización de puntuaciones y variables (Geladi y Linderholm, 2020). Con la técnica no supervisada de PC, las muestras son separadas en tres grandes grupos: 1) el grupo A las muestras que pertenecen a las no contaminadas con petróleo, 2) las del grupo B, y C pertenecen a muestras contaminadas con petróleo. La separación de los grupos B y C se debe principalmente a la concentración de petróleo en cada grupo (Figura 13). Estos resultados evidencian que los espectros generados por espectrometría VIS-NIR-SWIR proporcionan información suficiente para identificar y clasificar muestras de suelo Histosol contaminadas y no contaminadas con petróleo.



**Figura 13** Análisis de componentes principales PCA: grupo A) suelo libre de contaminación, grupos B) y C) suelos contaminados con petróleo.

### 2.7.3 Modelos de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS)

Para construir el modelo PLS se utilizaron las concentraciones de los HFP y los datos espectrales VIS-NIR-SWIR de las 70 muestras de suelo Histosol, el desempeño del modelo PLS se evaluó mediante una validación cruzada, para ello, se dejaron fuera los datos de una muestra cada vez, mientras que, con el resto de los datos de las muestras, se obtuvo el conjunto de entrenamiento. La predicción para los HFP tuvo un coeficiente de determinación en la calibración  $R^2 = 0.9998$  con un porcentaje de error promedio 1.3 %. El error estándar de calibración (SEC) resulto de 1585.34 (Figura 14). Los resultados fueron mejores que los reportados por Douglas *et al.* (2018) en TPH ( $R^2 = 0.83$ ), y similares con los obtenidos por Mejía Ospino *et al.* (2011).

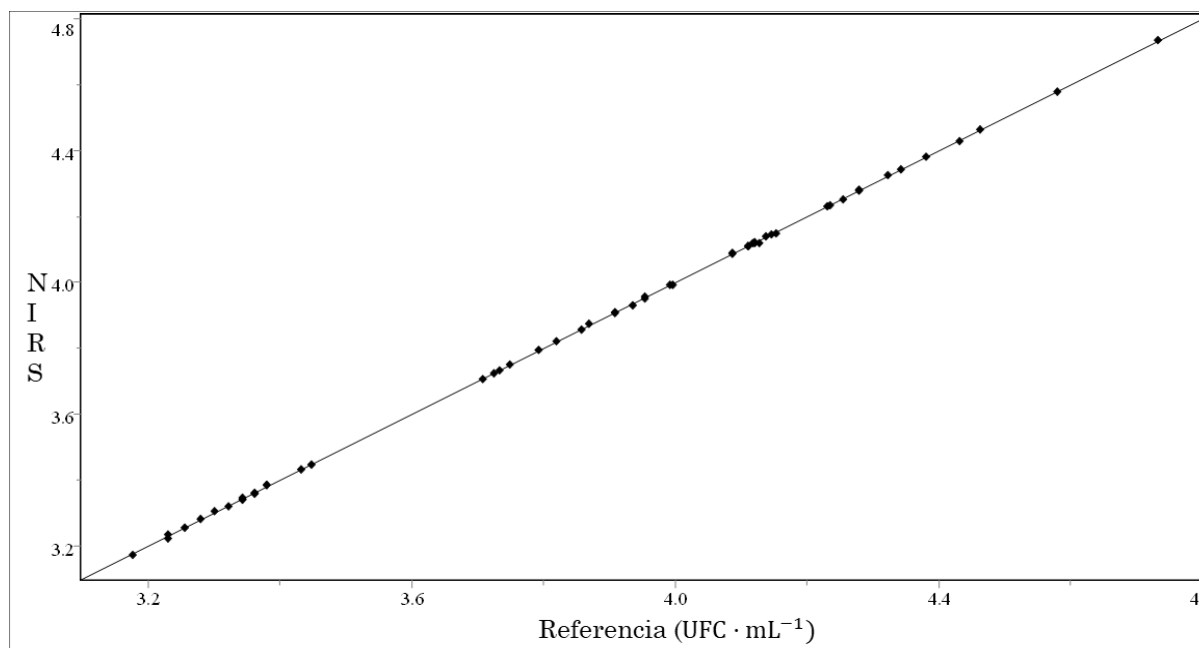


**Figura 14** Modelos de predicción de los hidrocarburos fracción pesada en un Histosol mediante modelación de espectros VIS-NIR-SWIR.

En este estudio se propuso realizar el mejor modelo calibración VIS-NIR-SWIR para determinar las concentraciones microbianas presentes en suelos Histosoles contaminados con petróleo. La Figura 15 representa un modo lineal PLS con validación



cruzada para estimar las UFC en los espectros VIS-NIR, el coeficiente  $R^2 = 0.9998$  con porcentaje de error 1.8 %, el error estándar de calibración SEC fue 0.0078. Hasta la fecha no existen estudios donde hayan realizado espectros VIS-NIR-SWIR de muestras de suelo Histosol contaminado con petróleo crudo para predecir las concentraciones microbianas. Sin embargo, se pueden establecer algunas comparaciones en el infrarrojo medio y lejano. Como por ejemplo los resultados reportados por Jaureguiberry *et al.* (2016) quienes utilizaron espectrometría de infrarrojo con transformada de fourier (FTIR) para identificar bacterias patógenas en *vacas lecheras*. En otro estudio, Cuéllar-Gil *et al.* (2011) utilizaron la espectrometría de infrarrojo para diferenciar especies bacterianas mediante un análisis exploratorio de componentes principales, y demostró que puede utilizarse en análisis microbiológicos para construir modelos que estimen las concentraciones microbianas.

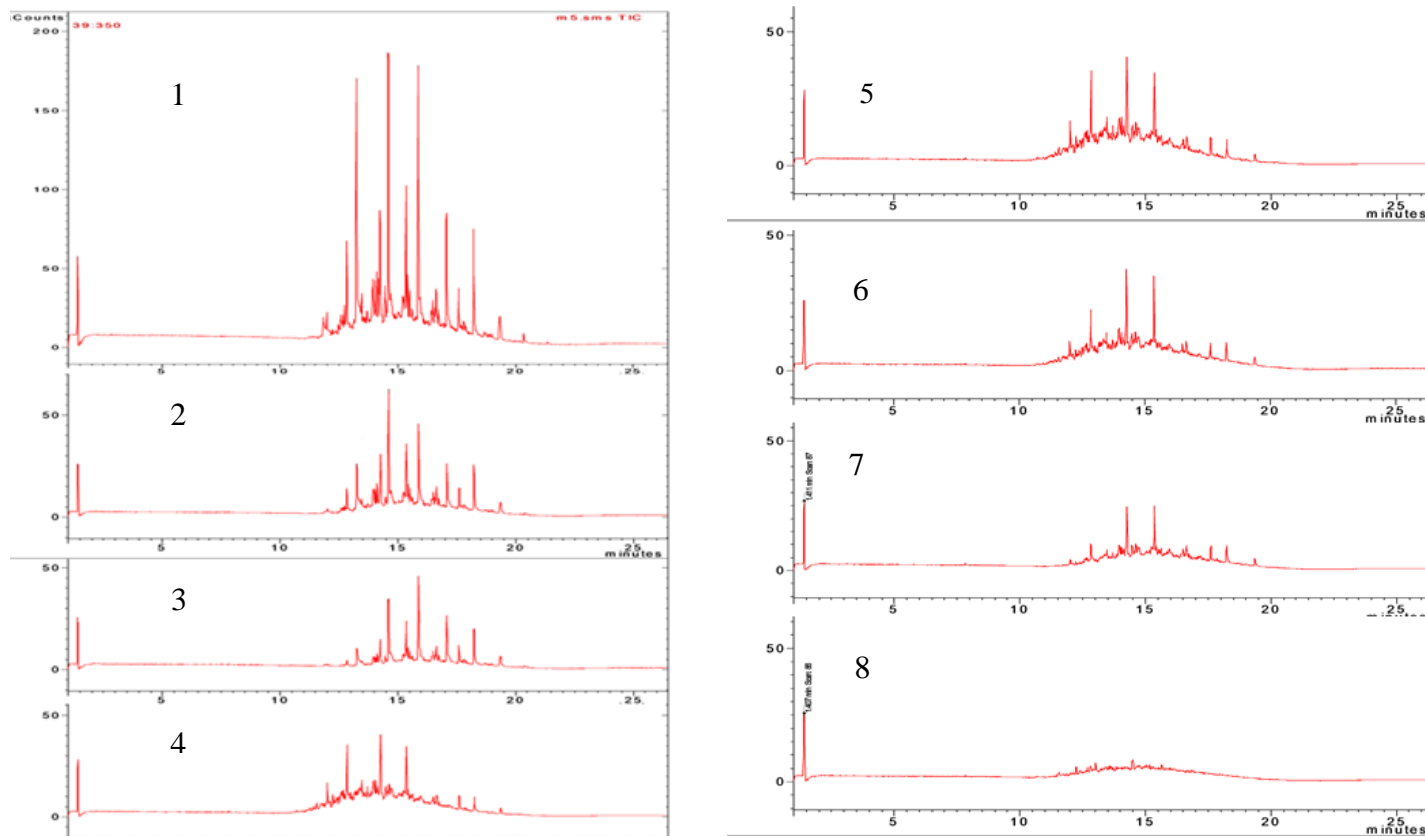


**Figura 15.** Modelo de regresión PLS para UFC de las muestras de suelo contaminadas con petróleo con coeficiente de Variación  $R^2 = 0.9998$

#### **2.7.4 Cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas y generador de espacio de cabeza (HS-GC-MS)**

Los resultados de la HS-GC-MS permitió la identificación de los alcanos lineales tetradecano, nonadecano, heptadecano y alcanos ramificados como: dodecano y dimetildecano. En la Figura 16 se muestran los cromatogramas obtenidos con el HS-GC-MS durante el proceso de biorremediación en suelo Histosol contaminado con petróleo crudo, donde, se puede visualizar la degradación de ciertos compuestos derivados del petróleo, lo que demuestra la eficiencia de la técnica de HS-GC-MS para identificar hidrocarburos del petróleo en suelos complejos como los Histosoles. El cromatograma 1 representa la concentración inicial de los contaminantes, mientras que el cromatograma 8 la fase final de la biorremediación.

Estudios realizados por Pérez-Pavón *et al.* (2004), Serenjeh *et al.* (2004) y Wei *et al.* (2007) han demostrado que el método es una alternativa para la cuantificación de hidrocarburos, la técnica posee alta sensibilidad y selectividad; además de que se elimina: 1) el proceso de extracción, 2) el uso de solventes para la extracción y 3) el tiempo de análisis (Christensen, 2002; Tomasi y Christensen, 2009).



**Figura 16** Degradación de los compuestos derivados del petróleo representados por cromatografía con generación de espacio de cabeza

## 2.8 CONCLUSIÓN

La tecnología NIR genera información útil y suficiente para obtener modelos de regresión PLS con altos coeficientes de correlación entre el valor de referencia y el valor estimado por el modelo, la predicción de los HFP tuvo una  $R^2 = 0.9998$  con un porcentaje de error promedio 1.3 %, la predicción de la carga microbiana expresada en UFC.mL<sup>-1</sup> tuvo un coeficiente  $R^2 = 0.9998$  con porcentaje de error 1.8 %. El análisis cualitativo de los compuestos derivados del petróleo durante la biorremediación se realizó mediante HS-GC-MS, los resultados demostraron la presencia de alcanos lineales como: tetradecano, nonadecano, heptadecano y alcanos ramificados como: dodecano y dimetildecano. Las analíticas pueden utilizarse como procedimiento para el estudio de muestras problema en análisis de rutina de los laboratorios, para la detección y cuantificación rápida de petróleo en suelos. La espectrometría VIS-NIR-SWIR y la técnica de HS-GC-MS son métodos que presentan sensibilidad, selectividad y son amigables con el ambiente, en comparación con las técnicas convencionales, la espectrometría VIS-NIR-SWIR y la técnica de HS-GC-MS tienen la ventaja de no requerir solventes químicos para extraer compuestos derivados del petróleo, además de que se reducen los tiempos de operación, costos analíticos y manipulación de las muestras, y por lo tanto el error analítico y el uso de infraestructura y personal de laboratorio.

## CONCLUSIONES GENERALES

El fertilizante triple 17 puede ser utilizado como alternativa de medio de cultivo para la reproducción microbiana. Es una fuente alta en nitrógeno que puede ser utilizada para estimulante de las poblaciones microbianas en suelos contaminados con petróleo. El consorcio microbiano inoculado en el triple 17 como fuente de nitrógeno resulto tener la capacidad de degradar el petróleo en suelo Histosol.

La espectrometría VIS-NIR demostró que los suelos Histoles contaminados con petróleo crudo tienen una firma espectral entre 2000 y 2300 nanómetros característica de los enlaces C-H atribuidos a los hidrocarburos del petróleo. La técnica de HS-GC-MS resulto ser efectiva para detectar compuestos específicos de los hidrocarburos del petróleo como alcanos lineales y ramificados, además, en comparación con los métodos gravimétricos se redujo completamente la utilización de solventes químicos y por lo tanto resultan ser mucho más económicos.

El modelo de calibración PLS para correlacionar los hidrocarburos fracción pesada con los espectros NIR, resulto ser muy bueno para estimar las concentraciones de petróleo en suelos Histosol.

## LITERATURA CITADA

- Abdeli F., Rigane G., Ben Salem R., El Arbi M., Aifa S., Cherif S. (2019). Use of surfactants and biosurfactants in oil recovery processing and cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol. Mycol.*, 6, 1114.
- Adipah S. (2019). Introduction of petroleum hydrocarbons contaminants and its human effects. *Journal of Environmental Science and Public Health*, 3(1), 1-9.
- Almazán V., Gonzáles J., Pérez J., Dieguez F., Villaverde M., Pérez G., Joseph N., Gan R., (2000) Purificación e indentificación de la naturaleza química de un tensioactivo producido por *Pseudomonas aeruginosa*. Cepa Ido.330. *Revista Biología* 14 (2), 172-177.
- Alomar, D., Fuchslocher R. (1998). Fundamentos de la espectroscopia de reflectancia en el infrarojo cercano (NIRS) como método de análisis de forrajes. *Agro sur*, 26(1), 88-104. <https://doi.org/10.4206/agrosur.1998.v26n1-11>
- Aparicio S. A. (2015). Impulso y difusión de la Ciencia del Suelo en el 2015. Año Internacional de los Suelos (AIS2015). *Enseñanza de las Ciencias de la Tierra*, 23(3), 330-330.
- Arenas-Piza D. (2018). Proceso de biodegradación para el tratamiento de derrames de petróleo por medio de pseudomonas (Bachelor's thesis) 133 pp
- Basile T., Marsico, A. D., & Perniola, R. (2021). NIR analysis of intact grape berries: chemical and physical properties prediction using multivariate analysis. *Foods*, 10(1), 113. [doi.org/10.3390/foods10010113](https://doi.org/10.3390/foods10010113)
- Boopathy R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource technology*, 74(1), 63-67.
- Bravo E. (2007) Los impactos de la explotación petrolera en ecosistemas tropicales y la biodiversidad. *Acción Ecológica*. pp. 40-41.

- Buendía H. (2012). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el compost de aserrín y estiércol. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*. 15(30):123-130.
- Buol, S.W., Southard, R.J., Graham, R.C. and McDaniel, P.A. (2011). *Soil Genesis and Classification*. Sixth Edition. John Wiley & Sons, Chichester, 543 p
- Butnariu, M. y Butu, M. (2020). Biorremediación: un enfoque viable para la degradación de hidrocarburos de petróleo. En *Bioremediation and Biotechnology*, Vol 4 (págs. 195-223). Springer, Cham.
- Cavado-Osorio A., Comesaña-García Y., Fernández, R. F., & Dago-Morales, Á. (2014). Técnicas quimiométricas de reconocimiento de patrones para el control de calidad de turbocombustibles Jet A-1 a partir de sus propiedades físico químicas. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 45, 18-26.
- Christensen J. H., Tomasi G. (2007). Practical aspects of chemometrics for oil spill fingerprinting. *Journal of Chromatography* 1169(1-2):1-22.
- Cuellar Gil, J. A., Coronado Rios, S. M., & ARRUBLA QCO, R. C. (2011). Differentiation of Mycobacterial Species by FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy). *Acta Biológica Colombiana*, 16(2), 109-120.
- De Mesa J. B. L., Quintero, G., Vizcaíno, A. L. G., Cáceres, D. C. J., Riaño, S. M. G., García, J. M. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), 82-90. doi.org/10.22490/24629448.351
- DOF. (2006). Norma Mexicana NMX-AA-134-SCFI-2006. suelos-hidrocarburos fracción pesada por extracción y gravimetría-método de prueba. *Diario Oficial de la Federación*, 12 de octubre de 2006. México.
- DOF. (2008). Norma Oficial Mexicana NMX-AA-145-SCFI-2008. Para la determinación de hidrocarburos fracción media por cromatografía de gases con detector de

ionización de flama- Método de prueba. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Diario Oficial de la Federación. 26 de marzo 2009. 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.

Douglas R. K., Nawar, S., Cipullo, S., Alamar, M. C., Coulon, F., & Mouazen, A. M. (2017). Evaluation of VIS-NIR reflectance spectroscopy sensitivity to weathering for enhanced assessment of oil contaminated soils. *Science of the Total Environment*. 626. 1108-1120.

Douglas, R. K., Nawar, S., Alamar, M. C., Mouazen, A. M., & Coulon, F. (2018). Rapid prediction of total petroleum hydrocarbons concentration in contaminated soil using vis-NIR spectroscopy and regression techniques. *Science of the Total Environment*, 616, 147-155. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.323

Fantroussi S. y Agathos S. (2005). Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology*, 8(3): 268-275.

Figueroa M. D. L., Martínez-Menez M. R., Ortiz-Solorio C. A. y Fernández Reynoso D. (2018). Influencia de los factores formadores en las propiedades de los suelos en la Mixteca, Oaxaca, México. *Terra Latinoamericana*, 36(3), 287-299.

Fingas M. (2020). Introduction to Oil Chemistry and Properties Related to Oil Spills. In: Wilkes H (eds). *Hydrocarbons, Oils and Lipids: Diversity, Origin, Chemistry and Fate. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Cham. pp:44-79.

Fitz-Mendoza R. (2016). Impacto socio ambiental de la industria energética en Tabasco. Secretaria de Energía. Recursos Naturales y Protección Ambiental. 44pp

García R. y Valera Y. (2014). Módulo de Visualización para análisis petrofísico a pozos de petróleo. *Revista cubana de ciencias e informática*. 8 (3): 85-99.



- Garthwaite P. H. (1994). An interpretation of partial least squares. *Journal of the American Statistical Association*. 89 (425): 122-127.
- Geladi P., Linderholm J. (2020). Principal Component Analysis. In: Brown s., Roma T. and Walczak B. (eds). in *comprehensive Chemometrics (Second Edition)*. pp. 17-37.
- Guerrero-Peña A. (2006). Estudio de la Contaminación en Suelos por Petróleo Crudo Mediante Generación de Espacio de Cabeza-Espectrometría de Masas. Salamanca, España. 167 pp.
- Halmilton R., Halmiton S. (1992). *Lipid Analysis, IRL Press, the practical Approach Series, USA*. 65-93.
- Hernández, B. A., Torres-Sánchez, S. A., & de J Alor-Chávez, M. (2019). EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS EN LAS CONCENTRACIONES DE HIDROCARBUROS TOTALES DEL PETRÓLEO EN DOS TIPOS DE SUELOS. *Journal of Energy, Engineering Optimization and Sustainability*. 3(2), 19-32.
- Ibañez A, S., Gisbert Blanquer, J. M., & Moreno Ramón, H. (2014). *Histosoles. Producción Vegetal. Universidad politécnica de valencia*. 7p
- Ibrar, M., & Zhang, H. (2020). Construction of a hydrocarbon-degrading consortium and characterization of two new lipopeptides biosurfactants. *Science of the Total Environment*, 714, 136400. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136400
- Jaén-González, L., Aliaño-González, M. J., Ferreiro-González, M., Barbero, G. F., & Palma, M. (2021). A Novel Method Based on Headspace-Ion Mobility Spectrometry for the Detection and Discrimination of Different Petroleum Derived Products in Seawater. *Sensors*, 21(6), 2151. doi.org/10.3390/s21062151.
- Jarquín-Sánchez, A., Salgado-Garcia, S., Palma-López, D.J., Camacho-Chiu, W., Guerrero-Peña, A. (2011). Análisis de nitrógeno total en suelos tropicales por

espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) y Quimiometría. *Agrociencia*. 45: 653-622.

Jaureguiberry, M., Madoz, L. V., Giuliadori, M. J., Drillich, M., & de la Sota, R. L. (2016). Espectrofotometría infrarroja transformada de Fourier para identificar bacterias uterinas patógenas en vacas lecheras. *Revista veterinaria*, 27(2), 75-79.

Jia, X., O'Connor, D., Shi, Z., & Hou, D. (2021). VIRS based detection in combination with machine learning for mapping soil pollution. *Environmental Pollution*, 268, 115845.

Joshi, S. J., Al-Wahaibi, Y. M., Al-Bahry, S. N., Elshafie, A. E., Al-Bemani, A. S., Al-Bahri, A., & Al-Mandhari, M. S. (2016). Production, characterization, and application of *Bacillus licheniformis* W16 biosurfactant in enhancing oil recovery. *Frontiers in microbiology*, 7, 1853. doi.org/10.22490/24629448.398

Kim H., Jon L., Ok L., Don L. (200). Purification and characterization of biosurfactans from *Nocardia* sp. L. 147. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31: 249-253.

Kim, H., Jong, L., Ok, L., Dong, L (200). Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L.-417. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31: 249-253. doi.org/10.1042/BA19990111

Kumar V., Shahi S. K., y Singh, S. (2018). Bioremediation: an eco-sustainable approach for restoration of contaminated sites. In *Microbial bioprospecting for sustainable development*. Springer, Singapore. pp. 115-136.

Lavine, B. y Workman, J. (2008). Quimiometría. *Química Analítica*, 80 (12), 4519-4531.

Leys N. M., Bastiaens L., Verstraete W. y Springael D. (2005). Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Applied microbiology and biotechnology*. 66(6): 726-736.

- Lin, T. C., Pan, P. T., & Cheng, S. S. (2010). Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1-3), 27-34. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.080
- Mackiewicz A. y Ratajczak, W. (1993). Principal components analysis (PCA). *Computers & Geosciences*, 19(3), 303-342.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., Stahl, D. (2017). Brock, *Biología de los microorganismos*, 17ª edición. España. Pearson educación.
- Manley, M. (2014). Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: non-destructive analysis of biological materials. *Chemical Society Reviews*, 43(24), 8200-8214.
- Mejía-Ospino E., C. Lamus, A. Guzmán, B. Murcia, y R. Cabanzo. 2011. Uso de análisis multivariado en la determinación SARA de crudos por espectroscopia NIR. *Revista Colombiana de Física* 43(3): 637-642.
- Montaño, N. M., Ayala, F., Bullock, S. H., Briones, O., García Oliva, F., García-Sánchez, R., y Yépez, E. (2016). Almacenes y flujos de carbono en ecosistemas áridos y semiáridos de México: Síntesis y perspectivas. *Terra Latinoamericana*, 34(1), 39-59.
- Morales A. L. L., Martínez-López S., Hernández S. L y Ramos-Arcos. S. A. (2020). Impactos asociados a actividades petroleras en zonas aledañas al complejo procesador PEMEX gas-Macuspana. *Journal of Basic Sciences*, 5 (15): 12.
- Moro, M. K., dos Santos, F. D., Folli, G. S., Romão, W., & Filgueiras, P. R. (2021). A review of chemometrics models to predict crude oil properties from nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy. *Fuel*, 303, 121283. doi.org/10.1016/j.fuel.2021.121283.
- Mulligan C., Mahmoudides B., Gibbs. (1989). The influence of phosphate meta bolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotechnol.* 12: 199-210.

- Nasser-AlKaabi., Mohammad, A., Al-Ghouti., Samir-Jaoua., Nabil-Zouari. (2020). Potential for native hydrocarbon-degrading bacteria to remediate highly weathered oil-polluted soils in Qatar through self-purification and bioaugmentation in biopiles. *Biotechnology Reports*, Volumen 28, e00543. doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00543
- Ojeda-Morales, M. E., y Juárez-Palacios, I. E. (2019). Biorremediación mejorada con preoxidación química de suelos arcillosos contaminados con petróleo. *Journal of Basic Sciences*, 5(15). <https://doi.org/10.19136/jobs.a5n15.3570>
- Okparanma RN, F Coulon & AM Mouazen. 2014. Analysis of petroleum-contaminated soils by diffuse reflectance spectroscopy and sequential ultra-Sonic solvent extraction-gas chromatography *Environment Pollution*. 184, 711-721.
- Ozdemir D., Ozturk B. (2007). Near infrared spectroscopic determination of olive oil adulteration with sunflower and corn oil. *Journal of food and drug analysis*. 15 (1), 40- 47.
- Palma-López D. J., Cisneros D. J., Moreno, C. E., Rincón-Ramírez J. A. (2007). Suelos de Tabasco: su uso y manejo sustentable. Colegio de Postgraduados- ISPROTAB-FUPROTAB. Villahermosa, Tabasco, México, 195.
- Palma-López D. J., R. Jiménez R., J. Zavala-Cruz, F. Bautista-Zuñiga, F. Gavi R, y D. Y. Palma-Cancino. 2017. Actualización de la clasificación de suelos de Tabasco, México. *Agroproductividad* 10(12): 29-35.
- PEMEX. (2013). Provincia Petrolera del Seste (Salina del Istmo, Refoma-Akal y Macuspana. Pemex exploración y producción 57 pp
- PEMEX. (2019). Informe anual 2019. Petróleos mexicanos. [https://www.pemex.com/acerca/informes\\_publicaciones/Documents/Informe-Anual/Informe%20Anual%202019.pdf](https://www.pemex.com/acerca/informes_publicaciones/Documents/Informe-Anual/Informe%20Anual%202019.pdf). consultado el 06/agosto/2020.
- Pérez-Muñoz, Y., López-Martínez, S., Rodríguez-Luna, A. R., Ramos-Arcos, S. A. (2019). Evaluación de impacto socioambiental, por derrame de petróleo de un

ducto en Comalcalco, Tabasco. *Journal of Basic Sciences*, 5(15).  
doi.org/10.19136/jobs.a5n15.3574

Pérez-Pavón J. L. ., Peña A. G., Pinto, C. G. and Cordero B. M. (2004). Detection of soil pollution by hydrocarbons using headspace–mass spectrometry and identification of compounds by headspace–fast gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 1047 (1): 101-109.

Pikovskii, Y. I., Korotkov, L. A., Smirnova, M. A., & Kovach, R. G. (2017). Laboratory analytical methods for the determination of the hydrocarbon status of soils (a review). *Eurasian Soil Science*, 50(10), 1125-1137.

Pollo, B. J., Alexandrino, G. L., Augusto, F., & Hantao, L. W. (2018). The impact of comprehensive two-dimensional gas chromatography on oil & gas analysis: Recent advances and applications in petroleum industry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 105, 202-217. doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.007

Pons-Jiménez, M., Guerrero-Peña, A., Zavala-Cruz, J., & Alarcón, A. (2011). Extracción de hidrocarburos y compuestos derivados del petróleo en suelos con características físicas y químicas diferentes. *Universidad y ciencia*, 27(1), 1-15.

Porcel-García M. (2001). Aplicación de Técnicas químio métricas para el desarrollo de nuevos métodos científicos-espectrofotométricos de análisis. Bellaterra. Barcelona. 85 pp

Ramírez, R., Luna, B., Velázquez O., Vierna, L., Mejia, A., Tsukuzi, Hernández L, Muggenburg, I., Camacho, A., Urzúa, M. (2015). Manual de Prácticas de microbiología General. Facultad de química, UNAM. México, D.F. 309 pp.

Rayu, S., Karpouzas, DG y Singh, BK (2012). Tecnologías emergentes en biorremediación: limitaciones y oportunidades. *Biodegradación*. 23(6), 917-926.

Rodríguez W., García P. A., Fajardo A. (2016). Aplicaciones de técnicas espectroscópicas para el análisis de suelos. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 228-251.

- Roggo, Y., Chalus, P., Maurer, L., Lema-Martinez, C., Edmond, A., & Jent, N. (2007). A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 44(3), 683-700.
- Romero, S. E. G., Bustos, D. C. G., Marín, A. M. H., Rodríguez, C. Z. H., Casallas, M. L., & Vargas, P. C. M. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *Nova*, 6(9), 76-84.
- Rosales, A. M., Tapia, M. T., & Fuentes, E. R. (2020). Crecimiento y metabolismo de *Fischerella* TB22 en medio de cultivo BG11. *Boletín Micológico*, 35(1). doi.org/10.3389/fmicb.2016.01853
- SEMARNAT. (2012). Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT-2012. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y sus especificaciones para su caracterización y remediación. *Diario Oficial de la Federación*, 10 de septiembre de 2013. México.
- SEMARNAT. 2000. Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreo y análisis. *Diario Oficial de la Federación*, 31 de diciembre de 2002. México.
- Sena, M.M., Almeida, MR, Braga, JW y Poppi, RJ (2017). Análisis estadístico multivariante y quimiometría. En *Métodos espectroscópicos en el análisis de alimentos* (págs. 273-314). Prensa CRC.
- SENER. (2019). Producción de petróleo crudo por entidad federativa 2019. Secretaría de Energía. <http://sie.energia.gob.mx/bdiController.do?action=cuadro&cveca=PMXB1C02>. consultado el 06/agosto/2019.
- Serenjeh F. N., Hashemi P., Ghiasvand A. R., Rasolzadeh F., Heydari N., and Badiei, A. (2020). Cooling assisted headspace microextraction by packed sorbent

coupled to HPLC for the determination of volatile polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Analytica Chimica* 1125. 128-134.

Shariati-Feizabadi S., Yamini Y. and Bahramifar, N (2003). Headspace solvent microextraction and gas chromatographic determination of some polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Analytica Chimica*. 489 (1): 21-31.

Shinde, A. y Ormond, RB (2020). Desarrollo de un método de muestreo de espacio de cabeza, cromatografía de gases y espectrometría de masas para el análisis de contaminantes de incendios en materiales de bomberos. *Salud y seguridad química de ACS*, 27 (6), 352-361.

Silva J., Rocha M., Rufino D., Luna M, Silva y OSarubbo A. (2014). Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CC6659 in the mesocosms. *Plan and Soil* 328: 471-481.

Singh, S. K., & Haritash, A. K. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons: soil pollution and remediation. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(10), 6489-6512. doi.org/10.1007/s13762-019-02414-3

Soil Survey Staff. (2003). *Keys to Soil Taxonomy*. 9th ed. US Department of Agriculture-Natural Resources Conservation Service. Washington, DC, USA.

Soong, J. L., Fuchslueger, L., Marañón- Jimenez, S., Torn, M. S., Janssens, I. A., Penuelas, J., y Richter, A. (2020). Microbial carbon limitation: the need for integrating microorganisms into our understanding of ecosystem carbon cycling. *Global change biology*, 26(4), 1953-1961. <https://doi.org/10.1111/gcb.14962>

Sparkman, D., Penton, Z. y Kitson, F. (2011). *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. Academic Press. San Diego. United States. 74 pp.

Speight, J. G. (2017). Sources and types of inorganic pollutants. *Environmental Inorganic Chemistry for Engineers*. 231-282.

- Sun, D. W. (Ed.). (2009). *Infrared spectroscopy for food quality analysis and control*. Academic press. 427 pp.
- Szulc A, Ambrozewicz D, Sydow M, Ławniczak Ł, Cyplik AP, Marecik R, Chrzanowski L (2014) The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: feasibility during field studies. *J Environ Manag* 132:121–128. doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.11.006
- Tanaka, G. T., de Oliveira Ferreira, F., Ferreira da Silva, C. E., Flumignan, D. L., & de Oliveira, J. E. (2011). Chemometrics in fuel science: demonstration of the feasibility of chemometrics analyses applied to physicochemical parameters to screen solvent tracers in Brazilian commercial gasoline. *chemometrics*, 25(9), 487-495.
- Tirado-Torres, D., Acevedo-Sandoval, O., Romo-Gómez, C., Marmolejo-Santillán, Y., & Gayosso-Canales, M. (2015). Participación de consorcios microbianos en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 2, 77-86.
- Tomasi G., J.H. Christensen. 2009. A Tucker model based approach for analysis of complex oil biodegradation data. *Journal of Chromatography*. 1216 (45):7865-7872.
- Tyagi, M., da Fonseca, MMR y de Carvalho, CC (2011). Estrategias de bioaumentación y bioestimulación para mejorar la efectividad de los procesos de biorremediación. *Biodegradación*, 22(2), 231-241.
- Valdéz-Zegarra R. A. (2008). Tópicos sobre la industria petrolera en bolivia. *Perspectivas*. 21: 93-122.
- Wartini N. G., Minasny B., Montazerolghaem M., Padarian J., Ferguson R., Bailey, S., McBratney A. B. (2019). Convolutional neural network for simultaneous prediction of several soil properties using visible/near-infrared, mid-infrared, and their combined spectra. *Geoderma*, 352, 251-267.



- Wei M. C., and Jen, J. F. (2007). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples by microwave assisted headspace solid-phase microextraction and gas chromatography / flame ionization detection. *Talanta*. 72 (4): 1269-1274.
- Yong, R. N., & Mulligan, C. N. (2003). *Natural attenuation of contaminants in soils*. CRC Press. 319 pp.
- Zavala CJ, Palma-López DJ, Morales GMA (2012) Clasificación de suelos de la cuenca baja del río Tonalá, Tabasco. En: Zavala CJ, García LE. (Eds) *Suelo y vegetación de la cuenca baja del río Tonalá, Tabasco*. Colegio de Posgraduados. H. Cárdenas, Tabasco. México. pp: 31-58.
- Zavala-Cruz J., Gavi-Reyes, F., Adams-Schroeder, R., Ferrera-Cerrato, R., Palma-López, D., Vaquera-Huerta, H., Domínguez-Ezquivel, J.M. (2005). Derrames de petróleo en suelos y adaptación de pastos tropicales en el activo cinco presidentes, Tabasco, México. *Terra Latinoamericana*, vol. 23, núm. 3. pp. 293-302.
- Zavala-Cruz J., Jiménez Ramírez R., Palma-López D. J., Bautista Zúñiga F., Gavi Reyes F. (2016). Paisajes geomorfológicos: base para el levantamiento de suelos en Tabasco, México. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 3(8), 161-171
- Zhang, X., Bao, D., Li, M., Tang, Q., Wu, M., Zhou, H., ... & Qu, Y. (2021). Bioremediation of petroleum hydrocarbons by alkali-salt-tolerant microbial consortia and their community profiles. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96(3), 809-817.
- Upadhyay A. K., Bhattacharyya B. y Ray, L. (2020). Value Added Secondary Metabolites from Microorganism. In *Journal of Advanced Microbiology*.