



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA**

**MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS
DEL PETRÓLEO AISLADOS DE LA RIZÓSFERA DE MANGLAR
DEL ESTADO DE CAMPECHE Y SU POTENCIAL EN LA
BIORREMEDIACIÓN**

MIGUEL ÁNGEL RAMÍREZ ELÍAS

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO.

2014

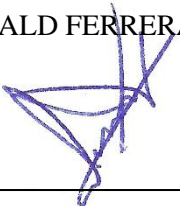
La presente tesis, titulada: **Microorganismos degradadores de hidrocarburos del petróleo aislados de la rizósfera de manglar del estado de Campeche y su potencial en la biorremediación**, realizada por el alumno **Miguel Ángel Ramírez Elías**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:  _____

DR. RONALD FERRERA CERRATO

ASESOR:  _____

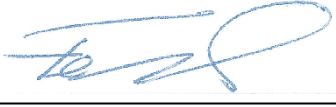
DR. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUÁREZ

ASESORA:  _____

DRA. LUZ ESTELA GONZÁLEZ DE BASHAN

ASESOR:  _____

DR. OSCAR GARCÍA BARRADAS

ASESOR:  _____

DR. FERNANDO JOSÉ ESPARZA GARCÍA

Montecillo, Texcoco, México. Mayo de 2014.

La presente tesis titulada “**Microorganismos degradadores de hidrocarburos del petróleo aislados de la rizósfera de manglar del estado de Campeche y su potencial en la biorremediación**”, formó parte del proyecto SEP-CONACYT 79456: “Simbiosis tripartita *Rhizobium* - Leguminosa - Micorriza arbuscular y su respuesta a los hidrocarburos del petróleo”.

CONACYT

**MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS DEL
PETRÓLEO AISLADOS DE LA RIZÓSFERA DE MANGLAR DEL ESTADO DE
CAMPECHE Y SU POTENCIAL EN LA BIORREMEDIACIÓN**

Miguel Ángel Ramírez Elías, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2014.

Este estudio identificó y seleccionó bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo y diésel aisladas de la rizósfera de cuatro especies de manglar del estado de Campeche y evaluó su potencial en la biorremediación. Este trabajo se dividió en tres fases experimentales. La primera fase describe la identificación de grupos funcionales microbianos cultivables con potencial biotecnológico aislados de la rizósfera de mangle rojo, mangle blanco, mangle negro y mangle botoncillo de la Laguna de Términos del estado de Campeche. La segunda fase seleccionó e identificó las mejores bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo y diésel correspondiendo al género *Pseudomonas* y *Rhodococcus* respectivamente, aisladas de la rizósfera de mangle blanco. La tercera fase describe el efecto de la inoculación de consorcios bacterianos hidrocarbonoclastas del petróleo y diésel en plántulas de *Lolium perenne* en combinación con tres fuentes de nitrógeno (urea, nitrato de amonio y sulfato de amonio) y un testigo sin nitrógeno durante la fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo o diésel. La aplicación de nitrato de amonio y urea en combinación con el consorcio bacteriano generaron mayor biomasa seca, altura de plántulas y longitud de raíz de *L. perenne* principalmente en plántulas sin contaminar, o en presencia de diésel. El consorcio bacteriano aplicado en la fitorremediación de suelo con diésel fue más eficiente en la degradación del contaminante (85.2%) en comparación con la fitorremediación de petróleo crudo (73.6%).

Palabras clave: Biorremediación, Hidrocarburos del petróleo, Manglares, Campeche.

PETROLEUM-DEGRADING MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE RHIZOSPHERE OF MANGROVES OF CAMPECHE STATE, AND THEIR POTENTIAL ON BIOREMEDIATION

Miguel Ángel Ramírez Elías, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2014.

This study identified and selected petroleum- or diesel-hydrocarbonoclastic bacteria isolated from the rhizosphere of four species of mangroves of the Campeche state, and evaluated their potential on bioremediation. Thus, this study was divided in three experimental stages. First stage describes the identification of functional culturable microbial groups with biotechnological purposes isolated from red, white, black or button mangroves of the Terminos Lagoon, Campeche state. Second stage selected and identified the most prominent petroleum- or diesel-hydrocarbonoclastic bacteria which corresponded to *Pseudomonas* or *Rhodococcus*, respectively, both isolated from white mangrove rhizosphere. Third stage describes the effect of inoculating a consortium of either petroleum- or diesel-hydrocarbonoclastic bacteria on *Lolium perenne* plants in combination of three nitrogen sources (urea, ammonium nitrate or ammonium sulfate) or without nitrogen during the phytoremediation of soil contaminated with crude oil or diesel. Combining ammonium nitrate or urea with the bacterial consortia increased the dry mass, height and root length of *L. perenne* at non-contaminated or contaminated soil with diesel. Bacterial consortium improved the phytoremediation performance of diesel contaminated soil (85.2%) when compared to phytoremediation of crude oil (73.6%).

Key words: Bioremediation, petroleum hydrocarbons, mangroves, Campeche.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar la presente etapa de estudios de doctorado, he logrado uno de mis objetivos en mi vida y quiero darles las gracias de manera especial a todas las personas que me apoyaron, colaboraron e hicieron posible la conclusión de este importante logro profesional. Por ello, dedico este triunfo:

A DIOS TODO PODEROSO.

Por sus bendiciones e iluminar mi camino, darme la inteligencia y brindarme la fuerza y salud necesaria, para poder lograr uno de mis grandes propósitos en mi vida profesional.

A LAS INSTITUCIONES

Al finalizar un trabajo tan arduo y lleno de sacrificios como el desarrollo de una tesis doctoral, es inevitable agradecer a las instituciones y su personal que han facilitado las cosas para que este trabajo, llegue a un feliz término. Por ello, expreso mi agradecimiento a la Universidad Autónoma del Carmen y al Colegio de Postgraduados, campus Montecillo.

A PROMEP/103.5/09/4363, por la beca proporcionada durante para mis estudios de doctorado del periodo de Agosto, 2009 – Julio, 2012.

A COMECYT (12BCD0112-II), por la beca continua proporcionada en Agosto, 2012.

Al Jardín Botánico de la Universidad Autónoma del Carmen, por su apoyo durante el trabajo de campo. Al laboratorio de Microbiología del Colegio de Postgraduados por su apoyo durante el trabajo de laboratorio.

A MI ASESOR Y DIRECTOR DE TESIS

Agradezco de manera especial y sincera al Dr. Ronald Ferrera Cerrato, por aceptarme para realizar ésta tesis doctoral bajo su dirección; por su apoyo, confianza, y su capacidad para guiar mis ideas. Su experiencia y amplio conocimiento, ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de la tesis, sino también, en mi formación como investigador. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de la presente tesis.

Quiero expresar también mi agradecimiento al Dr. Alejandro Alarcón, por su importante aporte, disponibilidad, paciencia y participación activa en el desarrollo del presente trabajo de tesis doctoral, y trabajos científicos que se deriven de la misma.

A MI CONSEJO PARTICULAR

Quiero extender un sincero agradecimiento a mi Consejo Particular: Dr. Ronald Ferrera Cerrato, Dra. Luz Estela González de Bashan, Dr. Fernando José Esparza García, Dr. Oscar García Barradas, Dr. Juan José Almaraz Suárez y Dr. Alejandro Alarcón, por su

incondicional atención, pronta respuesta y apoyo para mejorar el trabajo científico, por sus sugerencias y por recomendaciones que enriquecieron el trabajo de investigación y tesis.

A la Dra. Remedios Mendoza López, del SARA de la Universidad Veracruzana por su atención y apoyo en el trabajo de GC-MS.

A las secretarias Rosario Galicia López y María Remedios Sánchez Hernández del área de Edafología, a la Licenciada Padilla y personal de Servicios Académicos, por su apoyo y atención.

A MIS AMIGAS y AMIGOS del Colegio de Postgraduados, gracias por el tiempo compartido y brindarme su amistad: Clau, Vivian, Alejandra, Esmeralda, Yadira, Cristina, Alicia, Rosalba, Yessica, Vicky, Azucena, Claudia, Daysi, Britzania, Francisco, Raúl, Lucio, Apolinar, Faustino, Azael, David, Gilberto y Salvador, por ser excelentes amigos y compañeros.

A la FAMILIA Burgos-Rodríguez, por todo su apoyo y amistad durante mi estancia en Texcoco.

A MI FAMILIA

Dedico mi triunfo profesional a lo más grande que Dios nos ha dado que es la familia, por su apoyo moral y espiritual, que de una u otra forma estuvieron a mi lado apoyando para lograr y alcanzar mi meta. Gracias por su comprensión, apoyo, amor, admiración y orgullo.

DEDICATORIA

Llega el tiempo del galardón, un momento de felicidad donde lo inalcanzable fue alcanzado, y lo imposible fue posible, pero no por mi propia fuerza y esfuerzo; fue porque Dios siempre ha estado conmigo, él es quién facilita las cosas; por ello, Jesús resucitado, gracias por cuidarme, por tu infinito amor y misericordia.

A MI AMADA ESPOSA

Gracias por tu amor, paciencia y comprensión, pero sobre todo, por estar a mi lado. Sin tu apoyo no hubiera sido posible alcanzar esta importante meta. Hoy hemos alcanzado un triunfo más, porque los dos somos uno y mis logros son tuyos, esto nos fortalece para seguir adelante. Lucre. Te amo.

A MIS QUERIDOS HIJOS

Para mis hijos Héctor Miguel y Alejandra Michel, que son el proyecto más grande de mi vida. Los amo más de lo que puedan imaginarse. Hoy estoy compartiendo mis logros con ustedes, pero deseo y espero el día cuando ustedes compartan sus logros conmigo y su mamá. Doy gracias a Dios por darme el privilegio de ser su padre; gracias por su amor, apoyo incondicional y comprensión ante mi ausencia.

A MIS PADRES

Carlos Ramírez Heredia y Margarita Elías Silva. Gracias por darme la vida, por haberme enseñado el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida. Mil palabras no bastarían para agradecerles su gran corazón, amor, comprensión, consejos y apoyo incondicional.

A MIS HERMANOS, PRIMOS, TÍOS Y SOBRINOS para que éste logro, sea una muestra de que con esfuerzo, dedicación y preparación se pueden lograr las metas.

A MI FAMILIA quienes siempre han mostrado un gran orgullo por mis logros.

A MI SUEGRA doña Licha y A MIS CUÑADOS Marco Salvador y Joel Luis, quienes siempre me han apoyado incondicionalmente, por su confianza y hermandad.

Muy Atentamente

Miguel Ángel Ramírez Elías

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xviii
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 OBJETIVOS	3
1.2.1 Objetivo general	3
1.2.2 Objetivos específicos	3
1.3 HIPÓTESIS	4
1.3.1 Hipótesis general	4
1.3.2 Hipótesis específicas	4
CAPÍTULO II	6
CONTAMINACIÓN POR DERRAMES DE PETRÓLEO Y POTENCIAL DE LOS ECOSISTEMAS DE MANGLAR EN LA BIORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO	
2.1 GENERALIDADES DEL PETRÓLEO	6
2.1.1 Definición y características fisicoquímicas del petróleo	6
2.1.2 Clasificación de los hidrocarburos del petróleo	12
2.1.3 Metabolismo de los principales compuestos alifáticos y aromáticos del petróleo	14
2.2 DERRAMES DE PETRÓLEO DE MAYOR TRASCENDENCIA EN EL GOLFO DE MÉXICO	23
2.2.1 Derrame petrolero del Ixtoc I	24
2.2.2 Derrame petrolero de British Petroleum	25
2.3 POTENCIAL DE MANGLARES EN LA BIORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO	29
2.3.1 Importancia ecológica de manglares	29
2.3.2 Efecto de hidrocarburos del petróleo en manglares y su potencial en la biorremediación	33
CAPÍTULO III	38
IDENTIFICACIÓN Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE GRUPOS FUNCIONALES MICROBIANOS AISLADOS DE LA RIZÓSFERA DE CUATRO ESPECIES DE MANGLE	
Resumen	38
Abstract	39
3.1 INTRODUCCIÓN	40

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.2.1 Sitio de estudio y muestreo	43
3.2.2 Análisis microbiológico de microorganismos cultivables	44
3.2.3 Análisis físicos y químicos del suelo rizosférico	46
3.2.4 Análisis estadístico	46
3.3. RESULTADOS	47
3.3.1 Población microbiana	47
3.3.2 Parámetros físicos y químicos del suelo rizosférico	52
3.3.3 Correlaciones entre poblaciones microbianas con parámetros físicos y químicos	58
3.4 DISCUSIÓN	60
3.5 CONCLUSIONES	64
CAPÍTULO IV	65
SELECCIÓN Y FILOGENIA DE BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTAS AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE CUATRO ESPECIES DE MANGLARES DEL ESTADO DE CAMPECHE, MÉXICO	
Resumen	65
Abstract	66
4.1 INTRODUCCIÓN	67
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	70
4.2.1 Selección cualitativa de bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo y diésel	70
4.2.1.1 Preparación del medio mineral líquido y solución bacteriana	70
4.2.1.2 Ensayo de tolerancia y degradación de hidrocarburos	70
4.2.2 Selección cuantitativa de bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo y diésel	71
4.2.2.1 Método de extracción de bacterias hidrocarbonoclastas	71
4.2.2.2 Análisis de hidrocarburos totales mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)	72
4.2.3 Análisis molecular y filogenético de bacterias hidrocarbonoclastas	73
4.3. RESULTADOS	76
4.3.1 Selección cualitativa de bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo y diésel	76
4.3.1.1 Primer muestreo (Temporada de lluvias)	76
4.3.1.2 Segundo muestreo (Temporada de secas)	76
4.3.1.3 Selección final cualitativa de bacterias hidrocarbonoclastas	77
4.3.2 Selección cuantitativa de bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo y diésel	83
4.3.2.1 Primer muestreo (Temporada de lluvias)	83
4.3.2.2 Segundo muestreo (Temporada de secas)	89
4.2.2.3 Selección final cuantitativa de bacterias hidrocarbonoclastas	93
4.3.3 Filogenia de bacterias hidrocarbonoclastas aisladas de la rizósfera de cuatro especies de manglares del estado de Campeche, México	98
4.3.4 Análisis filogenético considerando las cuatro especies de mangle del estado de Campeche	102
4.4 DISCUSIÓN	103
4.5 CONCLUSIONES	107

CAPÍTULO V	
FITORREMEDIACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO CRUDO O DIÉSEL UTILIZANDO <i>Lolium perenne</i>, APLICANDO BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN	108
Resumen	108
Abstract	109
5.1 INTRODUCCIÓN	110
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	113
5.2.1 Preparación de semillas	114
5.2.2 Contaminación del suelo con petróleo o con diésel	114
5.2.3 Preparación de soluciones nutritivas para la aplicación de nitrógeno	114
5.2.3.1. Soluciones nutritivas con diferentes fuentes de nitrógeno	114
5.2.3.2. Solución nutritiva de Jensen	115
5.2.4 Preparación del consorcio bacteriano	115
5.2.5 Determinación de UFC de bacterias totales en el sustrato inoculado	116
5.2.6 Diseño experimental y establecimiento del ensayo	116
5.2.7. Variables evaluadas	117
5.2.8. Método de extracción de hidrocarburos totales de petróleo y diésel	118
5.2.9. Cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo o de diésel (GC-MS)	119
5.3 RESULTADOS	120
5.3.1 Efecto en variables evaluadas en la rizósfera de <i>Lolium perenne</i> durante fitorremediación de petróleo de diésel	120
5.3.1.1. pH	120
5.3.1.2. Conductividad eléctrica	122
5.3.1.3. Materia orgánica	123
5.3.1.4. Carbón orgánico total	125
5.3.1.5. Altura de plántula y longitud de raíz	127
5.3.1.6. Biomasa seca total	132
5.3.1.7. Bacterias totales	134
5.3.1.8. Degradación de petróleo crudo	136
5.3.1.9. Degradación de diésel	137
5.4 DISCUSIÓN	138
5.5 CONCLUSIONES	142
CAPÍTULO VI	143
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	
LITERATURA CITADA	148
ANEXOS	162
ANEXO I	163
ANEXO II	165
ANEXO III	166
ANEXO IV	167

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 2.1	Estructura química de los principales grupos de hidrocarburos del petróleo.	10
Figura 2.2	Hidrocarburos del petróleo crudo.	13
Figura 2.3	Esquema helicoidal de la β -oxidación.	16
Figura 2.4	Mecanismo de degradación anaeróbica de alcanos.	17
Figura 2.5	Mecanismo de degradación aeróbica de cicloalcanos.	17
Figura 2.6	Principales vías de degradación aeróbica de la estructura aromática, por fisión.	19
Figura 2.7	Vía de degradación anaeróbica de hidrocarburos aromáticos.	20
Figura 2.8	Vía principal en el metabolismo microbiano de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.	22
Figura 2.9	Ruta propuesta para la degradación de naftaleno por <i>Streptomyces</i> sp.	23
Figura 2.10	Representación gráfica del derrame de BP en aguas profundas del Golfo de México.	27
Figura 3.1	Localización de los sitios de muestreo en manglares de la Laguna de Términos.	45
Figura 3.2	Poblaciones de bacterias totales (TotB), actinobacterias (ACMY), microorganismos potencialmente solubilizadores de P (PSol) y hongos totales (TotF) cuantificados en el suelo rizosférico de cuatro especies de mangle muestreados en la Laguna de Términos, Campeche (México). Promedio \pm Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). n=6. Abreviaturas: MR, Mangle Rojo; MB, Mangle Blanco; MN, Mangle Negro, y MBt, Mangle Botoncillo.	48
Figura 3.3	Poblaciones de bacterias posiblemente fijadoras de N ₂ de vida libre (NFB), bacterias hidrocarbonoclastas fijadoras de N ₂ (NF-HB) y bacterias hidrocarbonoclastas asimiladoras de N (NA-HB), cuantificadas en el suelo rizosférico de cuatro especies de mangle muestreados en la Laguna de Términos, Campeche (México). Promedio \pm Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). n=6. Abreviaturas: MR, Mangle Rojo; MB, Mangle Blanco; MN, Mangle Negro y MBt, Mangle Botoncillo.	50
Figura 3.4	Poblaciones de microorganismos con actividad fisiológica específica: lipolítica (LIPOL), degradadores de celulosa (CELLUL), almidón (AMYL), pectina (PEC), y proteína (PROT), cuantificadas en el suelo rizosférico de cuatro especies de mangle muestreados en la Laguna de Términos, Campeche (México). Promedio \pm Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). n=6. Abreviaturas: MR, Mangle Rojo; MB, Mangle Blanco; MN, Mangle Negro y MBt, Mangle	51

	Botoncillo.	
Figura 3.5	Gráfica de análisis de componentes principales de parámetros químicos, textura del suelo rizosférico y estacionalidad designada para cuatro especies de mangle de la Laguna de Términos, Campeche, México. Los valores entre paréntesis representan el porcentaje de variación de cada componente. Abreviaturas: MR, Mangle Rojo; MB, Mangle Blanco; MN, Mangle Negro y MBt, Mangle Botoncillo.	56
Figura 3.6	Diagrama de dispersión de CP1 versus CP2 con respecto a las especies de mangle y estacionalidad (lluvias o secas) estimada a partir de muestras colectadas en la Laguna de Términos, Campeche, México. CP1 (Materia Orgánica y Carbono Orgánico Total) y CP2 (Arena y Arcilla). Abreviaturas: MR, Mangle Rojo; MB, Mangle Blanco; MN, Mangle Negro, y MBt, Mangle Botoncillo.	57
Figura 4.1	Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos de hidrocarburos totales de petróleo crudo (5000 $\mu\text{L mL}^{-1}$) después de 21 días de incubación. A) Testigo-Petróleo y, B-F) cepas hidrocarbonoclastas de petróleo del primer muestreo 1M, aisladas de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.	84
Figura 4.2	Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos individuales de hidrocarburos totales de petróleo (5,000 $\mu\text{L mL}^{-1}$), después de 21 días de incubación. A) Testigo-Petróleo, y B) mejor cepa hidrocarbonoclasta de petróleo del primer muestreo 1M, aislada de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.	85
Figura 4.3	Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos de hidrocarburos totales de diésel (20,000 $\mu\text{L mL}^{-1}$) después de 21 días de incubación. A) Testigo-Diésel, y B-F) cepas hidrocarbonoclastas de diésel del primer muestreo 1M, aisladas de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.	87
Figura 4.4	Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos de hidrocarburos totales de diésel (20,000 $\mu\text{L mL}^{-1}$) después de 21 días de incubación. A) Testigo-Diésel, y B) mejor cepa hidrocarbonoclasta de diésel del primer muestreo 1M, aislada de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.	88
Figura 4.5	Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos de Hidrocarburos Totales de Petróleo crudo (5000 $\mu\text{L mL}^{-1}$) después de 21 días de incubación. A) Testigo-Petróleo, y B-E) cepas hidrocarbonoclastas de petróleo del segundo muestreo 2M, aisladas de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.	89
Figura 4.6	Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos individuales de hidrocarburos totales de petróleo (5,000 $\mu\text{L mL}^{-1}$), después de 21 días de incubación. A) Testigo-Petróleo, y B) mejor cepa hidrocarbonoclasta de petróleo del segundo muestreo 2M, aislada de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.	90
Figura 4.7	Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos de hidrocarburos totales de diésel (20,000 $\mu\text{L mL}^{-1}$). A) Testigo-Diésel,	91

	y B-C) cepas hidrocarbonoclastas de diesel del segundo muestreo 2M, aisladas de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.	
Figura 4.8	Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos individuales de hidrocarburos totales de diésel (20,000 $\mu\text{L mL}^{-1}$), después de 21 días de incubación. A) Testigo-Diésel, y B) mejor cepa hidrocarbonoclastas de diesel del segundo muestreo 2M, aisladas de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.	92
Figura 4.9	Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos de hidrocarburos totales de petróleo crudo (5000 $\mu\text{L mL}^{-1}$) después de 21 días de incubación. A) Testigo-Petróleo, y B-F) mejores cepas hidrocarbonoclastas de petróleo en selección final, aisladas de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.	94
Figura 4.10	Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos de hidrocarburos totales de diésel (20,000 $\mu\text{L mL}^{-1}$) después de 21 días de incubación. A) Testigo-Diésel, y B-D) mejores cepas hidrocarbonoclastas de diésel en selección final, aisladas de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.	95
Figura 4.11	Porcentaje de degradación de hidrocarburos. A) Petróleo crudo (5,000 $\mu\text{L L}^{-1}$) y B) Diésel (20,000 $\mu\text{L L}^{-1}$) en medio mineral obtenido por 10 bacterias hidrocarbonoclastas aisladas y seleccionadas de la rizósfera de cuatro especies de mangle del estado de Campeche, después de 21 días de incubación. (LSD Fisher, $\alpha = 0.05$). $n = 3$. Barras con diferentes letras en cada gráfico, indican diferencias significativas. Abreviaturas: MARR, Mangle Rojo; MARW, Mangle Blanco; MARBk, Mangle Negro, MARB; Mangle Botoncillo.	97
Figura 4.12	Árbol filogenético de bacterias hidrocarbonoclastas identificadas en la rizósfera de mangle rojo del estado de Campeche. El número de acceso NR 102878 de <i>Nanoarchaeum equitans</i> , fue asignado como grupo externo. El árbol filogenético se realizó por el método de máxima parsimonia con un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones. La barra indica 50 substituciones por sitio.	100
Figura 4.13	Árbol filogenético de bacterias hidrocarbonoclastas identificadas en la rizósfera de mangle blanco del estado de Campeche. El número de acceso NR 102878 de <i>Nanoarchaeum equitans</i> , fue asignado como grupo externo. El árbol filogenético se realizó por el método de máxima parsimonia con un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones. La barra indica 50 substituciones por sitio.	100
Figura 4.14	Árbol filogenético de bacterias hidrocarbonoclastas identificadas en la rizósfera de mangle negro del estado de Campeche. El número de acceso NR 102878 de <i>Nanoarchaeum equitans</i> , fue asignado como grupo externo. El árbol filogenético se realizó por el método de máxima parsimonia con un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones. La barra indica 50 substituciones por sitio.	101
Figura 4.15	Árbol filogenético de bacterias hidrocarbonoclastas identificadas en la rizósfera de mangle botoncillo del estado de Campeche. El número de acceso NR 102878 de <i>Nanoarchaeum equitans</i> , fue	101

	asignado como grupo externo. El árbol filogenético se realizó por el método de máxima parsimonia con un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones. La barra indica 50 sustituciones por sitio.	
Figura 4.16	Árbol filogenético de bacterias hidrocarbonoclastas identificadas en la rizósfera de cuatro especies mangle del estado de Campeche. El número de acceso NR 102878 de <i>Nanoarchaeum equitans</i> , fue asignado como grupo externo. El árbol filogenético se realizó por el método de máxima parsimonia con un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones. La barra indica 50 sustituciones por sitio. Las 10 mejores cepas hidrocarbonoclastas, se indican entre paréntesis.	106
Figura 5.1	Valores de pH del suelo por efecto de petróleo crudo (5,000 mg kg ⁻¹) al inicio(día 1) y final (día 50) del ensayo de fitorremediación utilizando <i>Lolium perenne</i> con bioestimulación y bioaumentación. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 5P) Consorcio bacteriano con Pasto con petróleo; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 5P) Pasto con Petróleo.	121
Figura 5.2	Valores de pH del suelo por efecto de diésel (10,000 mg kg ⁻¹) al inicio(día 1) y final (día 50) del ensayo de fitorremediación utilizando <i>Lolium perenne</i> con bioestimulación y bioaumentación. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 10D) Consorcio bacteriano con Pasto con diésel; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 10D) Pasto con diésel.	121
Figura 5.3	Conductividad eléctrica del suelo por efecto de petróleo crudo (5,000 mg kg ⁻¹) al inicio(día 1) y final (día 50) del ensayo de fitorremediación utilizando <i>Lolium perenne</i> con bioestimulación y bioaumentación. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 5P) Consorcio bacteriano con Pasto con petróleo; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 5P) Pasto con Petróleo.	122
Figura 5.4	Conductividad eléctrica del suelo por efecto de diésel (10,000 mg kg ⁻¹) al inicio y final del ensayo de fitorremediación utilizando <i>Lolium perenne</i> con bioestimulación y bioaumentación. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 10D) Consorcio bacteriano con Pasto con diésel; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 10D) Pasto con diésel.	123
Figura 5.5	Materia orgánica del suelo por efecto de petróleo crudo (5,000 mg kg ⁻¹) al inicio(día 1) y final (día 50) del ensayo de fitorremediación utilizando <i>Lolium perenne</i> con bioestimulación y bioaumentación. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 5P) Consorcio bacteriano con Pasto con petróleo; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 5P) Pasto con Petróleo.	124
Figura 5.6	Materia orgánica del suelo por efecto de diésel (10,000 mg kg ⁻¹) al inicio y final del ensayo de fitorremediación utilizando <i>Lolium perenne</i> con bioestimulación y bioaumentación. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 10D) Consorcio bacteriano con Pasto con diésel; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 10D) Pasto con diésel.	126
Figura 5.7	Carbón orgánico total del suelo por efecto de petróleo crudo (5,000	126

	mg kg ⁻¹) al inicio(día 1) y final (día 50) del ensayo de fitorremediación utilizando <i>Lolium perenne</i> con bioestimulación y bioaumentación. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 5P) Consorcio bacteriano con Pasto con petróleo; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 5P) Pasto con Petróleo.	
Figura 5.8	Carbón orgánico total del suelo por efecto de diésel (10,000 mg kg ⁻¹) al inicio y final del ensayo de fitorremediación utilizando <i>Lolium perenne</i> con bioestimulación y bioaumentación. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 10D) Consorcio bacteriano con Pasto con diésel; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 10D) Pasto con diésel.	127
Figura 5.9	Altura de plántula (A) y longitud de raíz (B) a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo (5,000 mg kg ⁻¹) utilizando <i>Lolium perenne</i> con bioestimulación y bioaumentación. Promedio ± Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (LSD, α=0.05). n=3. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 5P) Consorcio bacteriano con Pasto con petróleo; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 5P) Pasto con diésel.	129
Figura 5.10	Altura de plántula (A) y longitud de raíz (B) a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con diésel (10,000 mg kg ⁻¹) utilizando <i>Lolium perenne</i> con bioestimulación y bioaumentación. Promedio ± Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (LSD, α=0.05). n=3. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 10D) Consorcio bacteriano con Pasto con diésel; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 10D) Pasto con diésel.	131
Figura 5.11	Biomasa seca total cuantificadas a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo (5,000 mg kg ⁻¹) utilizando <i>Lolium perenne</i> con bioestimulación y bioaumentación. Promedio ± Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (LSD, α=0.05). n=3. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 5P) Consorcio bacteriano con Pasto con petróleo; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 5P) Pasto con diésel.	133
Figura 5.12	Biomasa seca total a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con diésel (10,000 mg kg ⁻¹) utilizando <i>Lolium perenne</i> con bioestimulación y bioaumentación. Promedio ± Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (LSD, α=0.05). n=3. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 10D) Consorcio bacteriano con Pasto con diésel; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 10D) Pasto con diésel.	133
Figura 5.13	Población de bacterias totales cuantificadas a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo (5,000 mg kg ⁻¹) utilizando <i>Lolium perenne</i> con bioestimulación y bioaumentación. Promedio ± Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (LSD, α=0.05). n=3.	135

- Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto con petróleo; C) Consorcio bacteriano con petróleo; Lp) Pasto con petróleo.
- Figura 5.14** Población de bacterias totales cuantificadas a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con diésel (10,000 mg kg⁻¹) utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Promedio ± Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (LSD, α=0.05). n=3. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto con diésel; C) Consorcio bacteriano con diésel; Lp) Pasto con diésel. 136
- Figura 5.15** Porcentaje de degradación de hidrocarburos evaluado a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo (5,000 mg kg⁻¹) utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Promedio ± Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (LSD, α = 0.05). n=3. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto con petróleo; C) Consorcio sin Pasto con petróleo; Lp) Pasto con petróleo. 137
- Figura 5.16** Porcentaje de degradación de hidrocarburos evaluado a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con diésel (10,000 mg kg⁻¹) utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Promedio ± Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (LSD, α = 0.05). n=3. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto con diésel; C) Consorcio sin Pasto con diésel; Lp) Pasto con diésel. 138

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 2.1	Clasificación de hidrocarburos en función de su densidad API.	7
Tabla 2.2	Propiedades fisicoquímicas de los principales alcanos y cicloalcanos.	9
Tabla 2.3	Propiedades fisicoquímicas de algunos compuestos aromáticos.	10
Tabla 2.4	Propiedades fisicoquímicas de 16 contaminantes prioritarios de hidrocarburos aromáticos policíclicos de la EPA de Estados Unidos.	11
Tabla 3.1	Parámetros químicos y textura del suelo rizosférico de cuatro especies de mangle de la Laguna Términos, Campeche.	53
Tabla 3.2	Coefficientes de correlación de Pearson entre poblaciones microbianas, textura y parámetros químicos de suelo rizosférico colectado de cuatro especies de mangle de la Laguna de Términos, Campeche (México).	59
Tabla 4.1	Selección cualitativa de bacterias hidrocarbonoclastas del primer muestreo (temporada de lluvias).	78
Tabla 4.2	Selección cualitativa de bacterias hidrocarbonoclastas del segundo muestreo (temporada de secas).	79
Tabla 4.3	Selección final cualitativa de bacterias hidrocarbonoclastas del primer (1M) y segundo muestreo (2M).	80
Tabla 4.4	Bacterias hidrocarbonoclastas seleccionadas cualitativamente en prueba final de tolerancia a petróleo y diésel.	82
Tabla 4.5	Porcentaje de degradación promedio de bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo y diésel cuantificadas por GC-MS.	96
Tabla 4.6	Relación de bacterias hidrocarbonoclastas enviadas para realizar su extracción, secuenciación e identificación por biología molecular.	99

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 INTRODUCCIÓN

El Golfo de México es una de las regiones petroleras más grandes del mundo y la Sonda de Campeche concentra más del 95% de las reservas de hidrocarburos, así como la producción total de gas y petróleo de México (Guzmán-Vega y Mello, 1999; Ponce-Vélez y Botello, 2005; PEMEX, 2013). La contaminación marina por petróleo y sus derivados en costas mexicanas es el problema de mayor importancia ecológica y ambiental en la actualidad, debido a la intensa actividad de transporte de petróleo, descargas, lavado de buque-tanques, perforación y explotación de pozos petroleros, lo cual también representa un problema grave para la salud humana, ya que varios de sus componentes son carcinogénicos, recalcitrantes y bioacumulables (Cerniglia, 1992; Tolosa et al., 2003).

La Laguna de Términos es un ecosistema lagunar estuarino que se localiza frente a la Sonda de Campeche cerca de la zona de plataformas petroleras marinas, a sólo 80 km de distancia de la estructura de extracción más cercana de Petróleos Mexicanos. Celis et al. (1987) reportaron que el promedio de hidrocarburos dispersos en agua de la laguna de Términos fue de $49 \mu\text{g L}^{-1}$, con un máximo de $319 \mu\text{g L}^{-1}$, concentraciones que rebasan el criterio de calidad ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) establecido por la UNESCO. A partir del derrame del pozo Ixtoc-I en 1979, la región estudiada con mayor interés ha sido la Sonda de Campeche debido a la gran actividad petrolera. Botello et al. (1987) concluyeron que la composición orgánica en sedimentos oceánicos previa al derrame, correspondía a detritus vegetal terrestre y marino como manglares y fitoplancton. Y después del derrame había presencia de hidrocarburos aromáticos, considerando el tiempo de depósito de estos compuestos, es

probable que después del evento aún existan hidrocarburos antropogénicos y la presencia de compuestos aromáticos policíclicos de riesgo ambiental como el benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno y criseno (Botello et al., 1991).

Lo anterior justifica la condición de riesgo en la que se encuentran estos tesoros ecológicos como son los ecosistemas de manglar al ser impactados negativamente por la industria petrolera en zonas costeras en el Golfo de México. La rizósfera de los manglares puede filtrar y acumular contaminantes orgánicos como el petróleo (Kathiresan y Bingham, 2001); sin embargo, no se cuenta con suficientes trabajos de investigación de acerca de la microbiología rizosférica y contaminación de manglares por derrames de hidrocarburos del petróleo en la laguna de Términos.

Por lo anterior, el objetivo general del presente trabajo consistió en caracterizar microbiológicamente la rizósfera de las cuatro especies de mangle que predominan en torno a la laguna de Términos del estado de Campeche, para determinar su aplicación potencial en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Caracterizar microbiológicamente la rizósfera de mangle rojo (*Rhizophora mangle*), mangle negro (*Avicennia germinans*), mangle blanco (*Laguncularia racemosa*) y mangle botoncillo (*Conacarpus erectus*) del estado de Campeche, para determinar su potencial biotecnológico en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo.

1.2.2 Objetivos específicos:

- Caracterizar química y microbiológicamente el suelo rizosférico de las cuatro especies de mangle predominantes en el estado de Campeche durante la temporada de lluvias y secas.
- Aislar y cuantificar bacterias, hongos, actinomicetos y microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos, celulolíticos, amilolíticos, lipolíticos, pectinolíticos y proteolíticos de la rizósfera de las cuatro especies de mangle predominantes en el estado de Campeche.
- Seleccionar cualitativa y cuantitativamente microorganismos rizosféricos hidrocarbonoclastas de cuatro especies de mangle del estado de Campeche con capacidad para tolerar y degradar hidrocarburos del petróleo.
- Evaluar el porcentaje de degradación de hidrocarburos del petróleo en la biorremediación de suelos contaminados, utilizando el método adecuado de extracción y cuantificación por CG-MS (Cromatografía de Gases-Masas).

- Evaluar el potencial de degradación de microorganismos rizosféricos hidrocarbonoclastas aislados y seleccionados de cuatro especies de mangle aplicando bioestimulación y bioaumentación en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo.

1.3 HIPÓTESIS

1.3.1 Hipótesis general

Los microorganismos rizosféricos caracterizados de mangle rojo (*Rhizophora mangle*), mangle negro (*Avicennia germinans*), mangle blanco (*Laguncularia racemosa*) y mangle botoncillo (*Conocarpus erectus*) del estado de Campeche, tienen el potencial para utilizarse en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo.

1.3.2 Hipótesis específicas:

- Las poblaciones microbianas correlacionan significativamente con los parámetros químicos del suelo rizosférico de las cuatro especies de mangle predominantes en el estado de Campeche durante la temporada de lluvias y secas.
- El aislamiento y cuantificación de microorganismos cultivables de la rizósfera del manglar del estado de Campeche, son importantes para definir su potencial de uso en sistemas biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo.

- Los microorganismos rizosféricos hidrocarbonoclastas seleccionados y aislados de cuatro especies de mangle del estado de Campeche, tienen capacidad para tolerar y degradar hidrocarburos del petróleo.
- La cuantificación del porcentaje de degradación de hidrocarburos del petróleo en la biorremediación de suelos contaminados, depende de la correcta selección del método de extracción y del método de cuantificación cromatográfico.
- La degradación de hidrocarburos del petróleo se incrementa con el uso combinado de microorganismos hidrocarbonoclastas aislados del manglar, y aplicando métodos bioestimulación y bioaumentación.

CAPÍTULO II

CONTAMINACIÓN POR DERRAMES DE PETRÓLEO Y POTENCIAL DE LOS ECOSISTEMAS DE MANGLAR EN LA BIORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO

2.1 GENERALIDADES DEL PETRÓLEO

2.1.1 Definición y características fisicoquímicas del petróleo

El petróleo es un compuesto químico formado por carbono (80-87%), hidrógeno (10-15%), azufre (0-10%), nitrógeno (0-1%) y oxígeno (0-5%), además de pequeñas concentraciones de metales como aluminio, cobre, hierro, níquel y vanadio (Ponce-Velez y Botello, 2005). El petróleo crudo está constituido por 17,000 componentes orgánicos, cada uno con su propia volatilidad (tales como los compuestos orgánicos volátiles (VOCs), y Benceno-Tolueno-Etilbenceno-Xileno (BTEX), densidad, solubilidad en agua y diferentes niveles de toxicidad para la biota marina y los humanos (Baars, 2002; Bjorlikke, 2011; Ryerson et al., 2012).

El petróleo crudo posee tres estados de la materia (sólido, líquido y gas), según su composición, presión, volumen y temperatura a la que se encuentra, y su color varía entre ámbar y negro. En estado gaseoso es inodoro, incoloro e insípido; la densidad es menor que la del agua y su peso específico varía entre 0.75 y 1.01 g mL⁻¹. En estado líquido su densidad y peso específico es mayor que la del agua, su viscosidad se expresa en grados API (10 centipoise a 37.8 °C) (PEMEX, 1998). La industria de hidrocarburos líquidos, clasifica al petróleo crudo, de acuerdo con su densidad API (Instituto Americano del Petróleo) con lo que se diferencia la calidad del crudo (Tabla 2.1). Las propiedades físico-químicas de los principales hidrocarburos del petróleo se describen a continuación:

Tabla 2.1. Clasificación de hidrocarburos en función de su densidad API.

Petróleo crudo	Densidad (g cm ⁻³)	Densidad grados API
Extrapesado	>1.0	10
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 – 39.0
Superligero	<0.83	>39.0

Instituto Mexicano del Petróleo, 2013.

Alcanos

En la Tabla 2.2 se enlistan las principales propiedades físicas de los alcanos y cicloalcanos (Figura 2.1). Es notable que los puntos de ebullición y fusión, se incrementan a medida que aumentan los átomos de carbono en la molécula de éstos. Excepto por aquellos más sencillos, el punto de ebullición se incrementa de 20 a 30°C por cada átomo de carbono que se agrega a la cadena y este aumento se mantiene no sólo para los alcanos sino también para sus series homólogas. Por otro lado, el incremento en su punto de fusión no es tan regular, ya que las fuerzas intramoleculares en un cristal no dependen solamente de las moléculas sino también de qué tanto se acoplen éstas a la periodicidad espacial de los cristales (Morrison y Boyd, 1973).

Los primeros cuatro *n*-alcanos son gases (metano, etano, propano y butano), los 13 siguientes (C₅ al C₁₇) son líquidos, y todos aquellos con 18 o más átomos en su molécula son sólidos. Además, son solubles en solventes no polares como el benceno, éter y

cloroformo e insolubles en agua y otros disolventes con alta polaridad, y también actúan como disolventes de compuestos de baja polaridad. La densidad de alcanos se incrementa con el tamaño de la molécula, pero tiende a mantenerse en un nivel de 0.8 g mL^{-1} siendo por lo tanto, menos densos que el agua (Botello, 1996).

Hidrocarburos Aromáticos (HA)

Estos compuestos tienen por lo menos, un anillo de seis átomos de carbono, el cual presenta a su vez un sistema continuo de dobles enlaces conjugados. Las reacciones características de un hidrocarburo aromático son del tipo de sustitución electrofílica (iónicas), lo que marca un contraste con las reacciones de adición electrofílica de los alquenos (Morrison y Boyd, 1973).

El más conocido y mejor estudiado de los HA es el benceno, al cual se le considera como la base de los miembros de la familia de compuestos aromáticos. Todos los HA son líquidos o sólidos a temperatura ambiente y sus puntos de ebullición están cercanos a los de los cicloalcanos correspondientes. Los HA son poco polares o no polares. Los enlaces polares de otras moléculas pueden tener una débil atracción hacia los electrones de los anillos aromáticos; por este motivo, algunos compuestos que no se disuelven en los alcanos son fácilmente solubles en los HA, por lo que son utilizadas como disolventes. En la Tabla 2.3 se anotan las principales propiedades físicas de algunos compuestos aromáticos (Botello, 1996).

La unión de dos anillos bencénicos produce hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) como el naftaleno (2 anillos), antraceno y fenantreno (3 anillos), pireno (4 anillos) y benzopireno (5 anillos). Algunos de estos compuestos se han investigado extensivamente con relación a sus propiedades cancerígenas como es el caso de 3-4 benzopireno (Figura 2.1).

Tabla 2.2. Propiedades fisicoquímicas de los principales alcanos y cicloalcanos

Nombre	Fórmula	Punto de Fusión (°C)	Punto de Ebullición (°C)	Densidad g mL ⁻¹
Alcanos				
Metano	CH ₄	-183	-162	-
Etano	CH ₃ CH ₃	-172	-88.5	-
Propano	CH ₃ CH ₂ CH ₃	-187	-42	-
<i>n</i> -Butano	CH ₃ (CH ₂) ₂ CH ₃	-138	0	-
<i>n</i> -Pentano	CH ₃ (CH ₂) ₃ CH ₃	-130	36	0.626
<i>n</i> -Hexano	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃	-95	69	0.659
<i>n</i> -Decano	CH ₃ (CH ₂) ₈ CH ₃	-30	174	0.73
<i>n</i> -Undecano	CH ₃ (CH ₂) ₉ CH ₃	-26	196	0.74
<i>n</i> -Dodecano	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CH ₃	-10	216	0.749
<i>n</i> -Hexadecano	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CH ₃	18	280	0.775
<i>n</i> -Eicosano	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ CH ₃	36	-	-
Cicloalcanos				
Isobutano	(CH ₃) ₂ CHCH ₃	-159	-12	-
Isopentano	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CH ₃	-160	28	0.62
Isohexano	(CH ₃) ₂ CH(CH ₂) ₂ CH ₃	-154	60	0.654
3-metilpentano	(CH ₃) ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	-118	63	0.676
2,2-Dimetilbutano	(CH ₃) ₃ CCH ₂ CH ₃	-98	50	0.649
2,3-Dimetilbutano	(CH ₃) ₂ CHCH(CH ₃) ₂	-129	58	0.668

Botello, 1996.

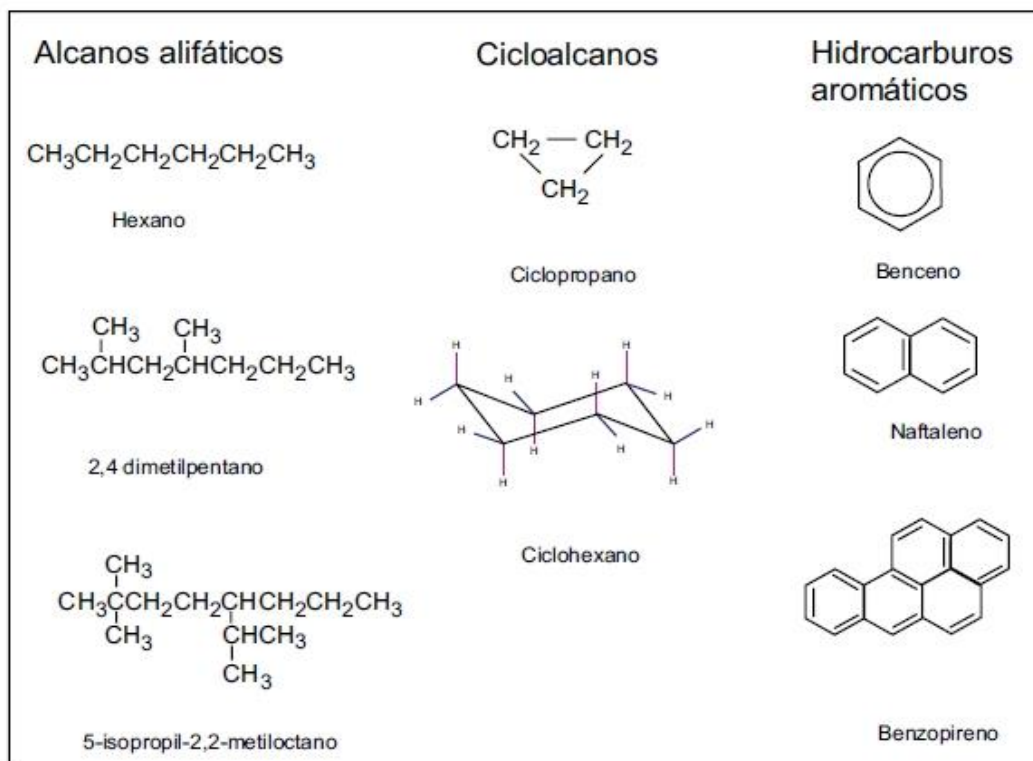


Figura. 2.1. Estructura química de los principales grupos de hidrocarburos del petróleo (Botello, 1996).

Tabla 2.3. Propiedades fisicoquímicas de algunos compuestos aromáticos.

Nombre	Fórmula	Punto de Fusión (°C)	Punto de Ebullición (°C)	Densidad (20°C) g mL ⁻¹
Benceno	C_6H_6	5.5	80	0.874
Tolueno	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$	-95	111	0.862
Etilbenceno	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_3$	-95	136	0.863
Propilbenceno	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	-100	1259	0.858
Isopropilbenceno	$(\text{CH}_3)_2\text{CHC}_6\text{H}_5$	-96	152	0.858
<i>o</i> -Xileno	<i>o</i> - $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4$	-25	144	0.876
<i>m</i> -Xileno	<i>m</i> - $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4$	-48	139	0.86
<i>p</i> -Xileno	<i>p</i> - $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4$	13	138	0.857
1,2,3 Trimetilbenceno	1,2,3- <i>o</i> - $(\text{CH}_3)_3\text{C}_6\text{H}_3$	-25	176	0.89
Bifenilo	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-C}_6\text{H}_5$	-69	253	-
Naftaleno	C_{10}H_8	80	218	0.975

Botello, 1996.

Los hidrocarburos, medidos principalmente como hidrocarburos totales de petróleo (HTP), constituyen la mayoría de los componentes del petróleo crudo y están conformados por cientos de componentes individuales. Los HAP son uno de los componentes de los HTP y son motivo de preocupación porque algunos son cancerígenos y pueden ser tóxicos para el ambiente (Bojes y Pope, 2007). Los HAP también tienen estructuras estables que únicamente les permiten persistir en el ambiente mucho tiempo después que otros componentes se han degradado en los campos petroleros o en sitios contaminados. La Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU. (USEPA) ha clasificado a 16 HAP como principales contaminantes con base en su toxicidad, exposición, frecuencia y persistencia en los sitios de desechos peligrosos y campos petroleros (ATSDR, 2005) (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Propiedades fisicoquímicas de 16 contaminantes prioritarios de hidrocarburos aromáticos policíclicos de la USEPA de Estados Unidos (ATSDR, 2005)

HAP's	Estructura (número de anillos)	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Solubilidad (mg L ⁻¹)	Presión de vapor (mm Hg)
Naftaleno	2	128.17	31	8.89E—02
Acenaftaleno	3	154.21	3.8	3.75E—03
Acenaftileno	3	152.2	16.1	2.90E—02
antraceno	3	178.23	0.045	2.55E—05
Fenantreno	3	178.23	1.1	6.80E—04
Fluoreno	3	166.22	1.9	3.24E—03
Fluorateno	4	202.26	0.26	8.13E—06
<i>Benzoantraceno</i>	4	228.29	0.011	1.54E—07
<i>Criseno</i>	4	228.29	0.0015	7.80E—09
Pireno	4	202.26	0.132	4.25E—06
<i>Benzo(a)pireno</i>	5	252.32	0.0038	4.89E—09
<i>Benzo(b)fluorantreno</i>	5	252.32	0.0015	8.06E—08
<i>Benzo(k)fluorantreno</i>	5	252,32	0.0008	9.59E—11
<i>Dibenzo(a,h)antraceno</i>	6	278.35	0.0005	2.10E—11
Benzo(g, h, i)perileno	6	276.34	0.00026	1.00E—10
<i>Indeno (1, 2, 3-cd)</i>	6	276.34	0.062	1.40E—10

^a Los HAP en letra cursiva, la USEPA los clasifica como probables carcinógenos en humanos.

2.1.2 Clasificación de los hidrocarburos del petróleo

Los hidrocarburos que componen al petróleo crudo se presentan en la Figura 2.2, e incluyen hidrocarburos saturados (alcanos y cicloalcanos), insaturados (aromáticos), y polares (asfaltenos y resinas). Agnello (2000) señala que los hidrocarburos presentes en el petróleo crudo recién extraído de un pozo petrolero, poseen cuatro fracciones: hidrocarburos saturados, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos nafténicos, e hidrocarburos parafínicos.

Hidrocarburos saturados (C_nH_{2n+2})

Los hidrocarburos saturados son alcanos lineales y ramificados (parafinas) y cicloalcanos (naftenos). Los primeros cuatro *n*-alcanos son gases (metano, etano, propano y butano), los trece siguientes son líquidos y tienen en su estructura química de 5 a 17 carbonos, los *n*-alcanos con más de 18 átomos de carbono en su estructura molecular son sólidos. Estos hidrocarburos son solubles en disolventes no polares como el éter y cloroformo; insolubles en agua y en otros disolventes con alta polaridad y actúan también como disolventes de compuestos de baja polaridad (Agnello, 2000).

Los VOCs como hexano, heptano, octano, nonano, benceno, tolueno, etilbenceno, y xileno son conocidos por abarcar aproximadamente el 15% del petróleo crudo. Este subconjunto de componentes de bajo peso molecular tiene comparativamente una alta solubilidad en agua (Nelson-Smith, 1972; USGS, 2011).

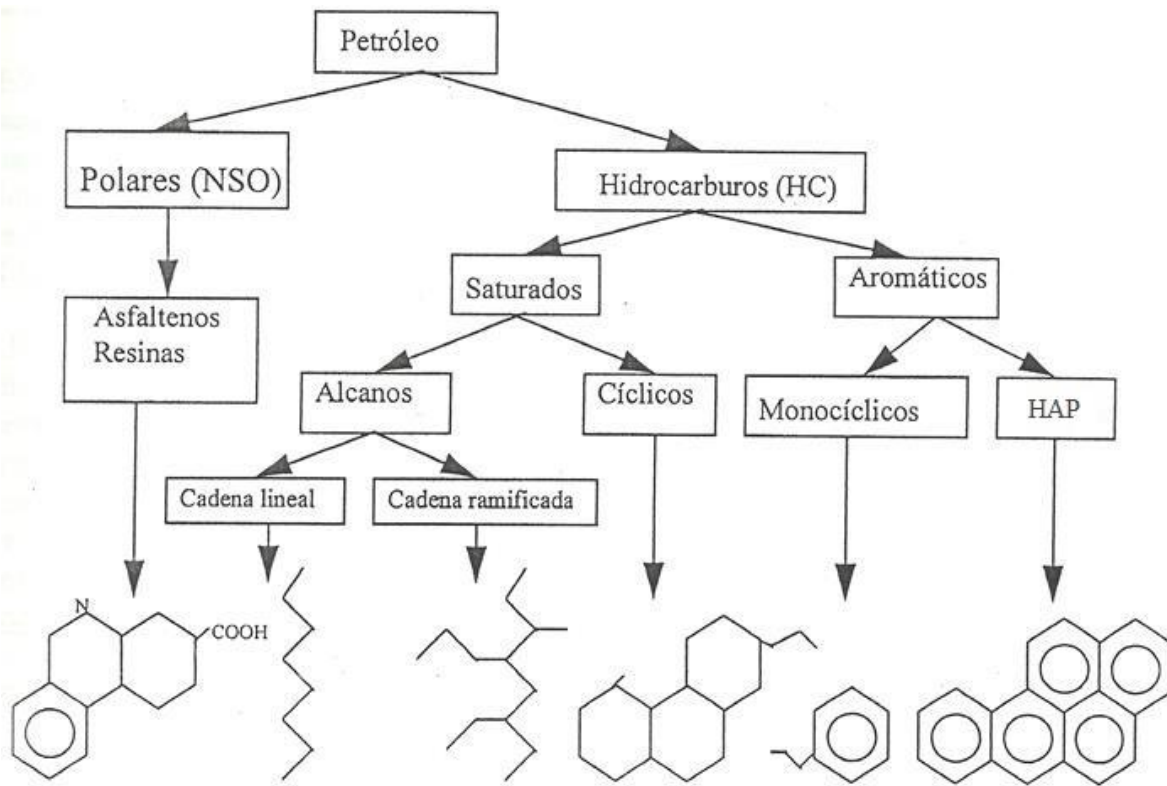


Figura. 2.2. Hidrocarburos del petróleo crudo (Rivera-Cruz, 2001).

Hidrocarburos aromáticos (C_nH_{2n-6})

Los hidrocarburos aromáticos son compuestos cíclicos mono, di y poli núcleo-aromáticos, basados en anillos bencénicos fusionados en arreglos lineales, angulares o agrupados, y contienen al menos 6 átomos de carbono. Algunos hidrógenos pueden ser reemplazados por grupos alquilo. Todos los hidrocarburos aromáticos son líquidos o sólidos a temperatura ambiente y su punto de ebullición es de 80°C , y están cercanos a los de cicloalcanos correspondientes (Agnello, 2000).

Los compuestos aromáticos son contaminantes ambientales comunes en sitios en los que ha ocurrido derrames de petróleo. Los monoaromáticos como el benceno, el tolueno y los xilenos (BTEX), tienen alta solubilidad en agua y se movilizan en el ambiente. Los BTEX son considerados analitos volátiles para los métodos analíticos de la EPA. Los HAP

se encuentran en el petróleo y en algunos de sus derivados pueden ser contaminantes persistentes y tóxicos, particularmente en la matriz del suelo y sedimentos (EPA, 2005). Los HAP representan más del 10% de los componentes orgánicos en el crudo y proporcionan información sobre la distribución general de los hidrocarburos del petróleo en el ambiente asociado a los derrames (Vinas et al., 2010). En los humanos las vías de exposición incluyen contacto con la piel, inhalación, e ingestión (Fingas, 2000). Estos componentes son lipofílicos y fácilmente aceptados por tejidos humanos y pueden ser tóxicos para el sistema nervioso e inmunológico. Los riesgos a largo plazo de la exposición a estos componentes se traducen en problemas de salud como cáncer y leucemia (Schnatter et al., 2005; Cheng et al., 2010).

Hidrocarburos nafténicos (C_nH_{2n})

Los hidrocarburos nafténicos son grupos de hidrocarburos con anillos saturados, de fórmula C_nH_{2n} , dispuestos en forma de anillos cerrados (cíclicos) que se encuentran en todas las fracciones del crudo, excepto en las más ligeras. Predominan los naftenos de un solo anillo (parafinas monocíclicas) con 5 y 6 átomos de carbono, encontrándose los naftenos de dos anillos (parafinas dicíclicas) en los componentes más pesados (Agnello, 2000).

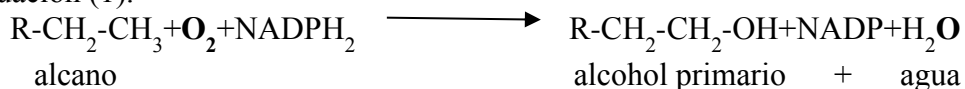
2.1.3 Metabolismo de los principales compuestos alifáticos y aromáticos del petróleo

Una amplia gama de estudios se han ocupado de la biotransformación, la biodegradación y biorremediación de hidrocarburos de petróleo, y el interés en la explotación de petróleo con organismos que degradan y limpian en el ambiente, se ha convertido en el centro de la microbiología del petróleo. La biodegradación de algunos compuestos del petróleo se lleva a cabo por vía aeróbica y anaeróbica para alcanos, cicloalcanos, aromáticos. Ejemplo de ellos se presentan a continuación:

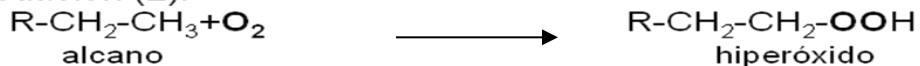
Ruta metabólica de los alcanos

En los alcanos el ataque ocurre por enzimas que tienen estricto requerimiento de oxígeno molecular, como oxigenasa (función de oxidasas) y dioxigenasas. Un átomo de O_2 se incorpora dentro del alcano y se produce un alcohol primario; el otro átomo se reduce a agua, donde la forma reducida de nicotinamida dinucleótido fosfato ($NADPH_2$) sirve como donante de un electrón (Ecuación 1, 2). Al producir un hiperóxido (Ecuación 2) reducido, por $NADPH_2$ produce un alcohol y agua (Ecuación 3). Cuando se forma un ácido graso, un nuevo catabolismo ocurre: La β -oxidación sucesiva. La cadena del ácido graso se convierte a una forma acil-Coenzima A (Ecuación 4) y es accionada por una serie de enzimas. Los productos de la mineralización de los hidrocarburos son CO_2 y H_2O . Ambos grupos metil, se oxidan resultando la formación de ácido dicarboxílico (Figura 2.3) (Hernández et al., 2000).

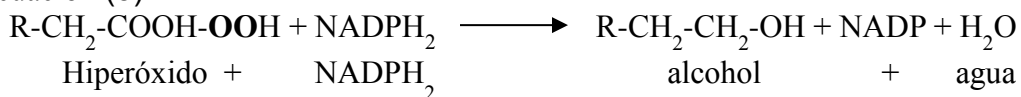
Ecuación (1).



Ecuación (2).



Ecuación (3).



Ecuación (4) $R - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COOH$ (ácido graso + CoA)

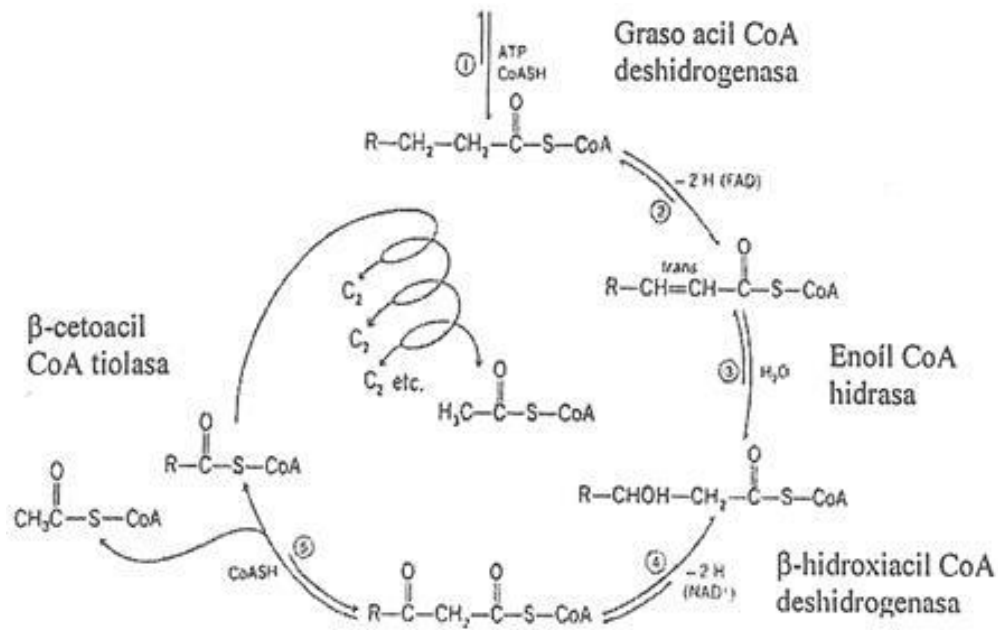


Figura. 2.3. Esquema helicoidal de la β -oxidación (Conn et al., 2000).

Mecanismo de degradación anaeróbica de alcanos

Los microorganismos anaerobios también pueden degradar hidrocarburos alifáticos (HCA). El paso principal de la degradación anaeróbica de alcanos (Figura 2.4) y aromáticos, es la carboxilación de moléculas del sustrato. Varias sustancias pueden actuar como donantes de carbono, incluyendo el grupo carboxilo formado, el fumarato (al degradar tolueno, xileno y alcanos), y el bicarbonato (al degradar naftaleno y alcanos). Los demás productos de descomposición se dan a través de la β -oxidación (Young y Phelps, 2005).

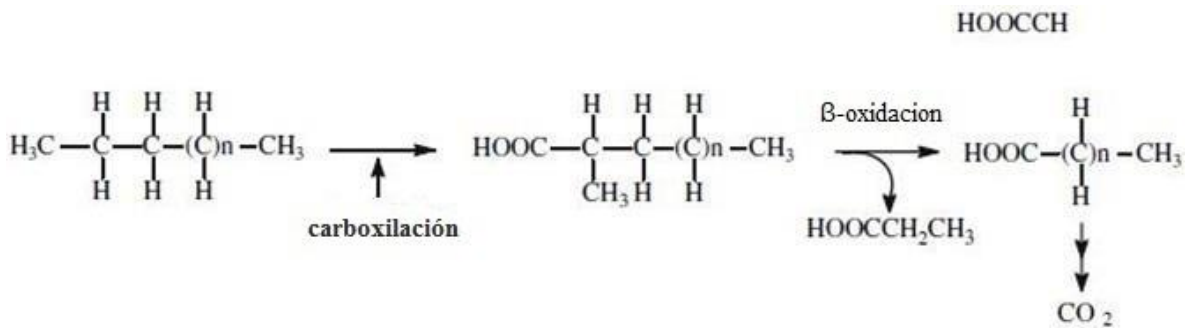


Figura. 2.4 Mecanismo de degradación anaeróbica de alcanos (Young y Phelps 2005).

Mecanismo de degradación aeróbica de cicloalcanos

El mecanismo de biodegradación de cicloalcanos lo realizan cepas bacterianas (*Gordonia*, *Xanthobacter*) capaces de utilizar estos sustratos, dado que tienen sistemas enzimáticos, diferentes a los utilizados por otros microorganismos para la oxidación de alcanos. La vía de la degradación de cicloalcanos es indicado en la Figura 2.5, en la cual, en primera instancia se presenta una primera hidroxilación formando caprolactona y después de una segunda hidroxilación se rompe el anillo, formando como producto final el ácido adípico (Yemashova et al., 2007).

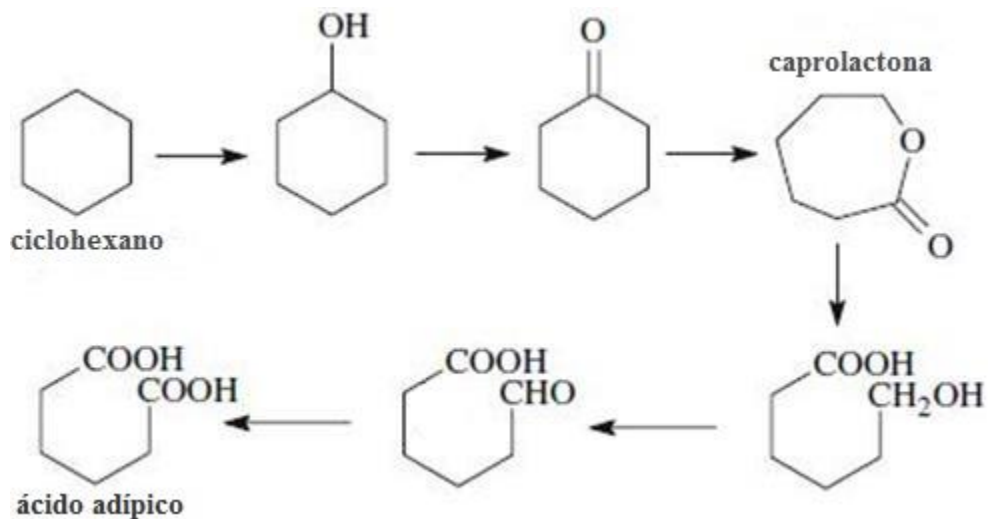


Figura 2.5. Mecanismo de degradación aeróbica de cicloalcanos (Yemashova et al., 2007)

Vías de degradación aeróbica de la estructura aromática, por fisión.

Hay dos estrategias básicas utilizadas por los microorganismos para degradar compuestos aromáticos. La primera estrategia es utilizada por microorganismos aerobios y consiste en la oxidación del aromático en compuestos dihidroxiaromáticos (catecol o intermedios de hidroquinona), con la consiguiente escisión oxidante del anillo aromático (Figura. 2.6a). La escisión del anillo de catecol intermedio puede ocurrir de dos maneras: intradiol (u orto) para dar un ácido mucónico (Figura 2.6b). Exradiol (o meta) que consiste en formar el derivado de hidróxi-muconaldehídico del ácido (Figura 2.6c). El sustituto alifático de compuestos aromáticos se descompone por β -oxidación de los más cortos y los intermedios formados se someten a degradación del anillo aromático por uno de los mecanismos descritos previamente. La segunda estrategia es utilizada por microorganismos anaeróbicos implicando la reducción del anillo aromático y la desfragmentación posterior del cicloalcano (Young y Phelps, 2005).

Degradación anaeróbica de hidrocarburos aromáticos.

La biodegradación anaeróbica de estructuras aromáticas se presenta en la Figura. 2.7. La Figura 2.7a muestra la degradación de etilbenceno utilizando bicarbonato como donante de carbono. La Figura 2.7b muestra la degradación de tolueno utilizando fumarato como donante de carbono para el grupo carboxílico en formación. Por ejemplo, algunas cepas desnitrificantes transforman sustratos aromáticos de ácido benzoico y a continuación, a benzoil-CoA reductasa. Este último es más reducido a ciclohexenilo-CoA derivados que a continuación, se hidroliza y los productos formados se someten a β -oxidación (Young y Phelps, 2005).

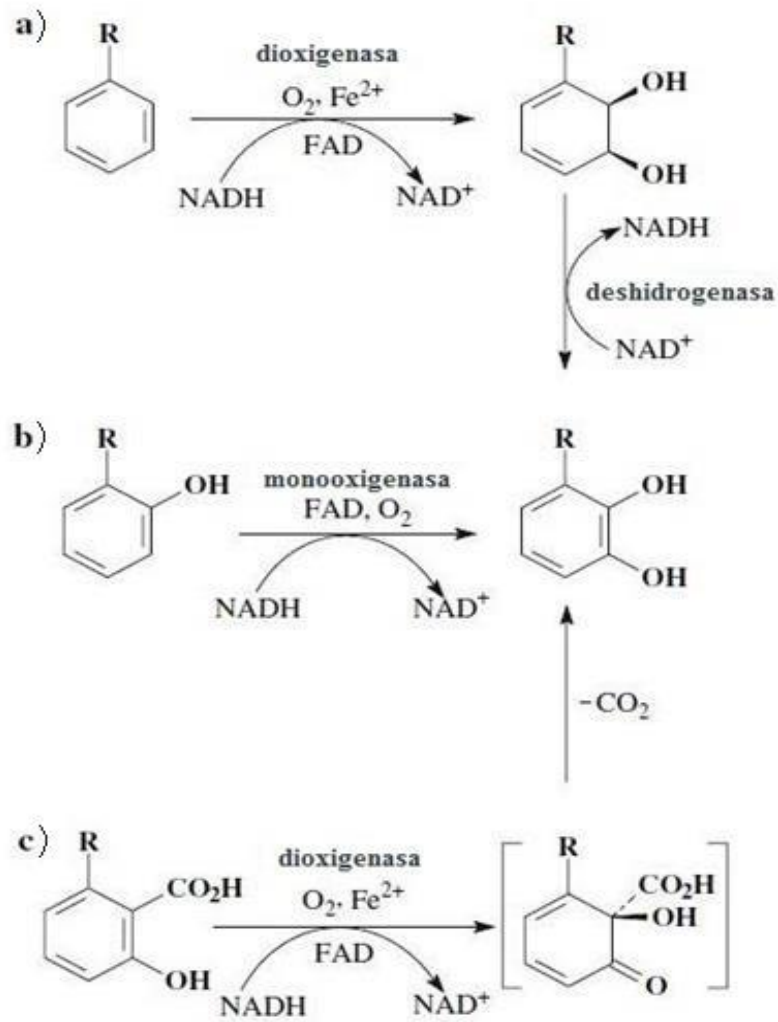


Figura. 2.6. (a, b, c) Principales vías de degradación aeróbica de la estructura aromática, por fisión. (Yemashova et al., 2007)

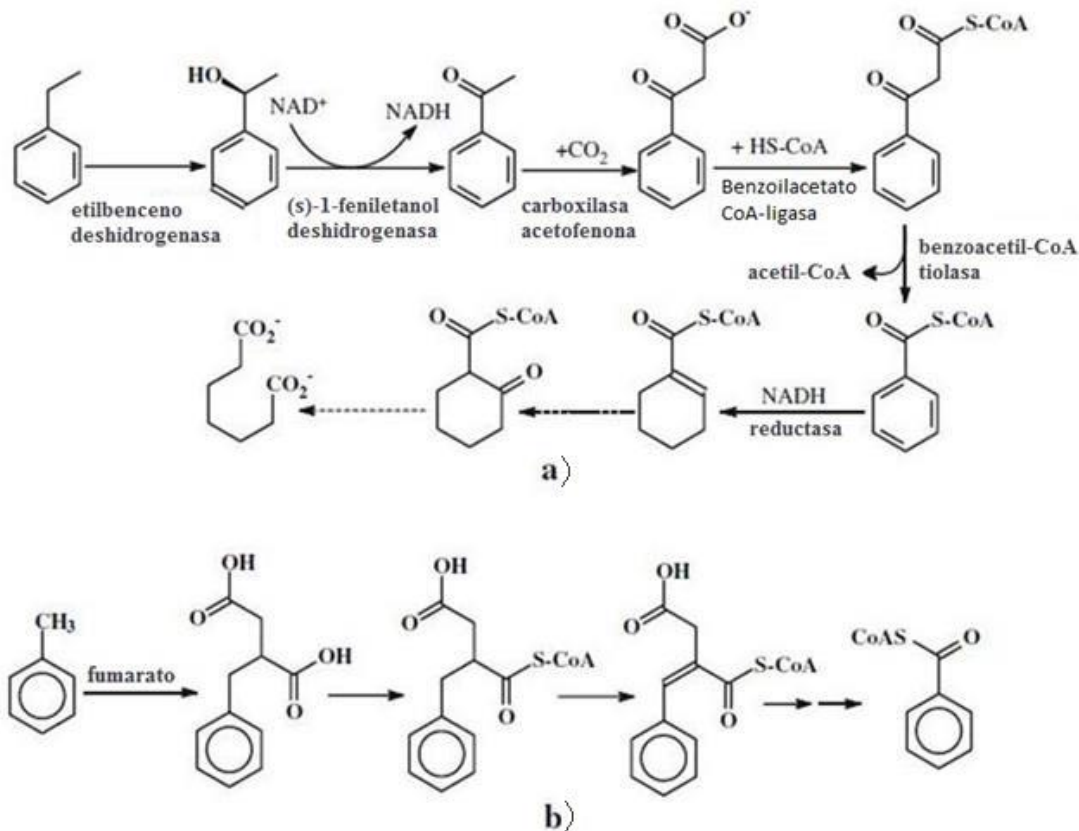


Figura. 2.7. (a, b). Vía de degradación anaeróbica de hidrocarburos aromáticos
(Yemashova et al., 2007)

Vía principal del metabolismo microbiano de los HAP

Las bacterias y algas, inician la oxidación de HAP (naftaleno, antraceno, fenantreno, benzo(a) pireno, etc.) incorporando dos átomos de O_2 mediante la oxidación catalítica de dioxigenasas, dentro del anillo aromático produciendo como compuesto intermediario al *cis*-dihidriol, el cual es deshidrogenado, formando catecol. Posteriormente, el catabolismo de los HAP, involucra la fisión de anillos (orto y meta) realizadas por las enzimas dioxigenasas, dividiendo el anillo aromático, produciendo alifáticos intermedios (Figura 2.8). La biodegradación de HAP es lenta debido a su baja solubilidad y al incremento de

constituyentes alquilo, pero las bacterias y los hongos rizosféricos pueden degradarlos aeróbicamente, usándolos como fuente de carbono y energía por cometabolismo. Muchos hongos, oxidan los HAP por vía citocromo P-450 monooxigenasa, incorporando uno de los átomos de oxígeno molecular dentro del HAP formando un arenóxido, mientras que otro átomo de oxígeno pasa a formar H₂O y por medio de la enzima epóxido hidrolasa propicia la ruptura del anillo formando *trans*-dihidriol. Los arenóxidos al ser inestables, también sufren rearrreglos no enzimáticos produciendo fenol, el cual, puede conjugarse con glucosa, ácido glucorónico, sulfato o xilosa (Figura 2.8). Varios hongos por medio de enzimas como peroxidasas y lacasas tienen la habilidad para oxidar los HAP a quinonas, propiciando la fisión del anillo aromático. Pocos de ellos reducen los HAP hasta CO₂ (Mueller et al., 1996; Yemashova et al., 2007).

Balachandran et al. (2012) propusieron la vía de degradación del naftaleno por *Streptomyces* sp. (Figura 2.9). El naftaleno se convierte en 1,2-dihidroxi-naftaleno por hidroxilación con 1,2 dioxigenasa, seguido de la deshidrogenación, hasta la formación de ácido benzoico el que sufre una hidroxilación para formar ácido protocatéquico, el cual se degrada en catecol, seguido del ácido mucónico, el cuál es oxidado y transformado por el ciclo del ácido tricarbóxico (ATC) en CO₂ y H₂O.

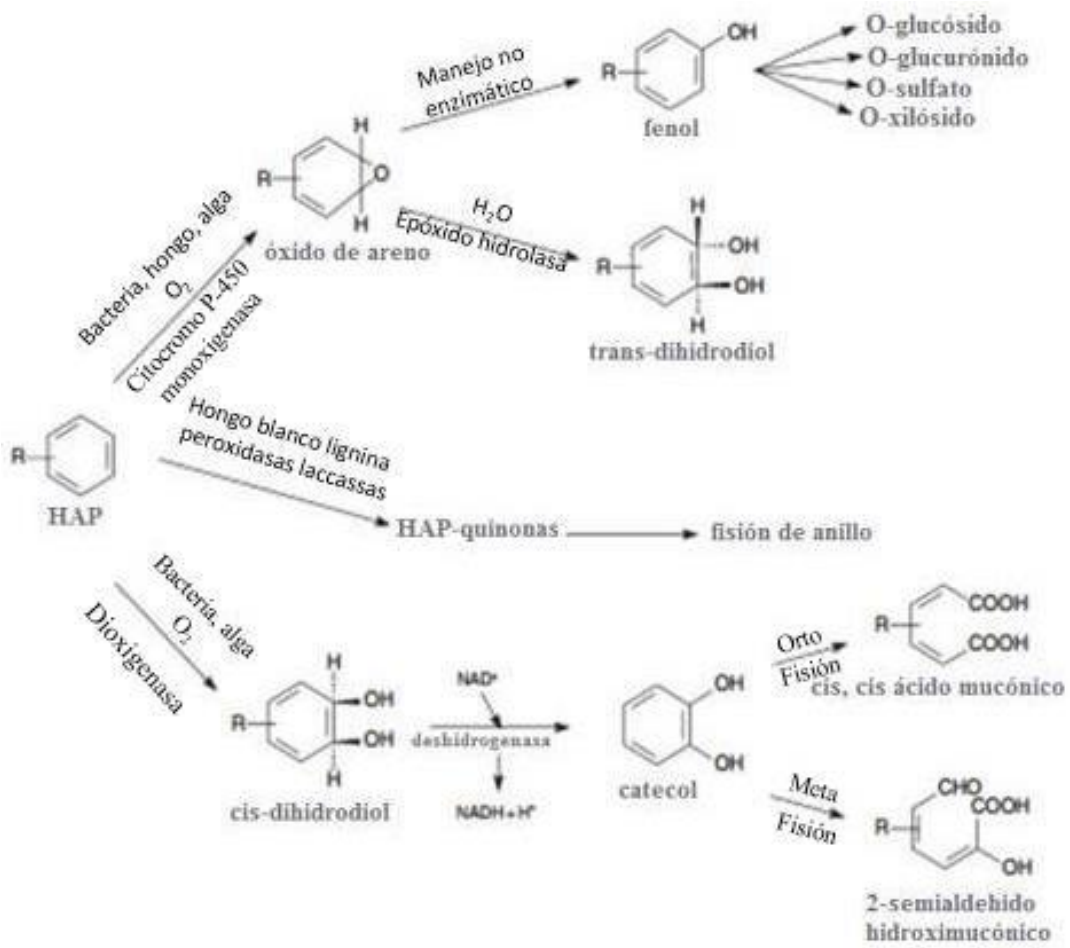


Figura. 2.8. Vía principal en el metabolismo microbiano de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Yemashova et al., 2007)

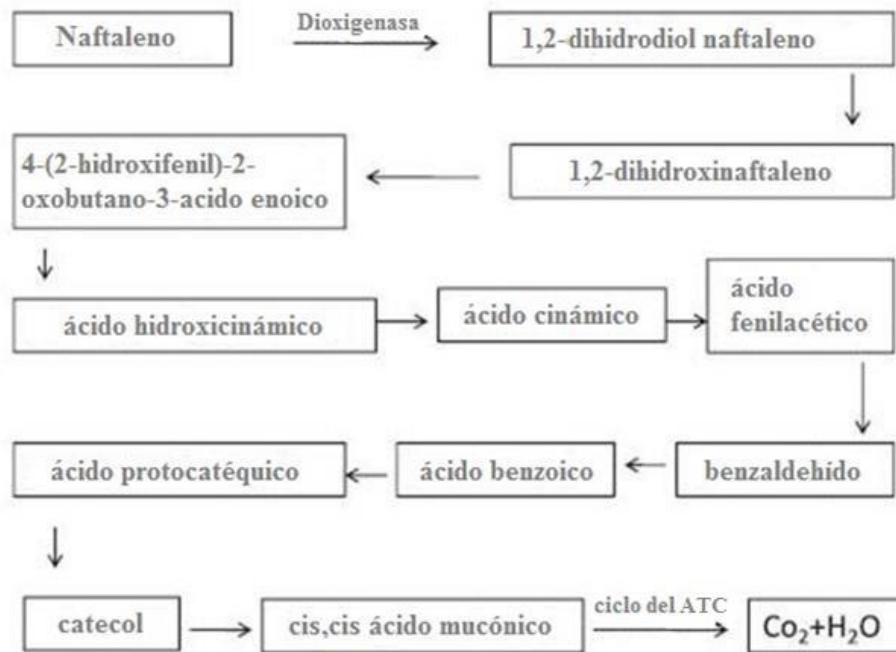


Figura 2.9 Ruta propuesta para la degradación de naftaleno por *Streptomyces* sp.
(Balanchandran et al., 2012)

2.2 DERRAMES DE PETRÓLEO DE MAYOR TRASCENDENCIA EN EL GOLFO DE MÉXICO

Una vía importante de contaminación de petróleo en el Golfo de México son los derrames de hidrocarburos causados por accidentes marítimos, la explotación de gas y las plataformas de petróleo (offshore) en el Golfo de México, como consecuencia de la ruptura de ductos, explosiones e incendios en los pozos marinos, desbordamiento y mal funcionamiento de los equipos instalados y en operación. Entre los principales derrames de petróleo, que destacan por su mayor trascendencia por el tiempo de duración, el volumen derramado y el daño ambiental, se mencionan los siguientes: el derrame del pozo petrolero Ixtoc I, y el derrame de petróleo y gas de mayor impacto en aguas profundas por la

Compañía British Petroleum (BP) frente a las costas de Louisiana y Nuevo Orleans de los Estados Unidos.

2.2.1 Derrame petrolero del Ixtoc I

El derrame de hidrocarburos más conocido en el Mar Caribe fue el ocurrido en el pozo petrolero IXTOC I en 1979 en la Sonda de Campeche, al sureste del Golfo de México durante las operaciones de perforación de gas y petróleo. La explosión del pozo ocasionó la fuga de 30,000 barriles diarios de petróleo crudo ligero durante diez meses sumando un total de 475,000 toneladas métricas (PNUMA, 1994; IOCARIBE, 1997). El petróleo derramado contaminó gran parte del litoral del golfo mexicano y daño severamente su franja costera, constituida principalmente de playas arenosas e islas que protegían a lagunas costeras, estuarios y humedales, ecosistemas que aún no se han estabilizado por completo (Botello, 1996; Beltrán et al., 2005).

En el caso del Ixtoc I, se estimaron los mecanismos de transformación sufridos por el crudo, identificando a la evaporación hacia la atmósfera adyacente y al hundimiento hacia el fondo oceánico como los principales mecanismos de transformación del crudo con 48 y 24% respectivamente. Sin embargo, aunque en menor magnitud existieron depósitos en la playas mexicanas (6%) y norteamericanas (3%), así como una cantidad pequeña que fue biodegradada (12%), quemada *in situ* (3%) y removida mecánicamente (5%), por lo que se generó una controversia importante sobre los alcances y la severidad de la contaminación del litoral y los ecosistemas costeros existentes (Botello y Páez-Osuna, 1986).

La evaluación del reservorio sedimentario realizado durante el evento del Ixtoc I, indicó que los niveles de hidrocarburos alifáticos o parafinas, estuvieron dentro del intervalo establecido para zonas costeras no contaminadas por petróleo ($<70 \mu\text{g g}^{-1}$),

además de presentar un grupo de parafinas biogénicas dominante; la magnitud de las concentraciones fue alta solamente en sitios cercanos al derrame, decreciendo significativamente conforme se incrementaba la distancia del siniestro (Botello, 1996).

2.2.2 Derrame petrolero de British Petroleum en aguas profundas del Golfo de México

Los derrames de petróleo han estado ocurriendo desde que la industria del petróleo empezó a extraerlo del mar y a transportarlo mediante buques oceánicos. Los derrames ocurridos en los pozos petrolíferos se ejemplifican por el ocurrido el 20 de abril del 2010 en el pozo exploratorio MC 252 de la compañía British Petroleum (BP) donde los sistema de control de presión y todo el equipo de emergencia en la boca del pozo fallaron liberaron aceite y gas de alta presión a 1500 m de profundidad, y a 77 km de la costa en Louisiana. En el incendio subsiguiente y explosiones, 11 hombres perdieron la vida trágicamente. La Plataforma de perforación Horizonte se quemó y finalmente se hundió al segundo día. El derrame de petróleo de (20 Abril al 5 Julio del 2010; 28.736667° N, -88.386944° W; Figura 2.10) fue uno de los derrames marinos más grandes en el mundo (McNutt et al., 2011), que duró 84 días y derramó de 7.94×10^8 a 1.11×10^9 L de petróleo crudo ligero (35.2° API) en la superficie marina del norte del Golfo de México, con un flujo máximo estimado de 1.552×10^7 L d⁻¹. La máxima superficie cubierta por el derrame fue de 62,159 km², afectando la columna de agua, los sedimentos, y alimentos marinos de interés comercial (Atlas y Hazen, 2011; Sammarco et al., 2013).

Durante el derrame se aplicaron 2.9×10^6 L de dispersante tanto en la superficie como a la fuga a 1500 metros sobre la superficie del océano en el centro del pozo. Esto disolvió parcialmente el crudo, dispersándolo y previniendo que una porción de éste alcanzara la superficie; sin embargo, se ha indicado que el petróleo se ha encontrado en sedimentos de aguas profundas, y en agua a profundidades de 400 y 1000 m. Bajo

condiciones naturales, los componentes con pesos moleculares medianos y ligeros se quedaron en la superficie y volatilizaron o se degradaron con el tiempo. Los componentes de mayor peso molecular se depositaron en los sedimentos; los cuales pueden retener algunas propiedades tóxicas por años (Atlas y Hazen, 2011).

Los HAP representan uno de los componentes más tóxicos del petróleo crudo ligero, los cuales pueden bioconcentrarse en invertebrados marinos, incluyendo mariscos de interés comercial como camarones, cangrejo azul, y almejas, los cuales representan el 73%, 33%, y 59% del total de desembarques pesqueros de los Estados Unidos de America, y gran cantidad de estos productos derivan del Golfo de México. En este caso, los HAP derramados fueron relativamente bajos, y esta cantidad decreció en la superficie, y en el petróleo que alcanzó la orilla (Vinas et al., 2010; Atlas y Hazen, 2011).

Sammarco et al. (2013) realizaron un estudio para examinar las concentraciones de petróleo en dicho sitio, después haberse controlado el derrame de BP. Los objetivos del estudio fueron definir los patrones de distribución y abundancia de (1) TPH en el norte del Golfo de México (GDM) dentro de los límites del régimen de muestreo; (2) PAHs; (3) C1 benzo(a) antracenos/crisenos; (4 y 5) C-2 y C-4 fenantrenos/antracenos; (6) C3-naftalenos. Las seis clases de componentes fueron evaluados en el siguiente orden: (a) agua de mar; (b) sedimentos; (c) flora y fauna marina; y (d) algunas especies comerciales. Los resultados del estudio de distribución y concentración de hidrocarburos del petróleo asociados con el derrame de crudo por BP en el horizonte de aguas profundas en el GDM fueron los siguientes:

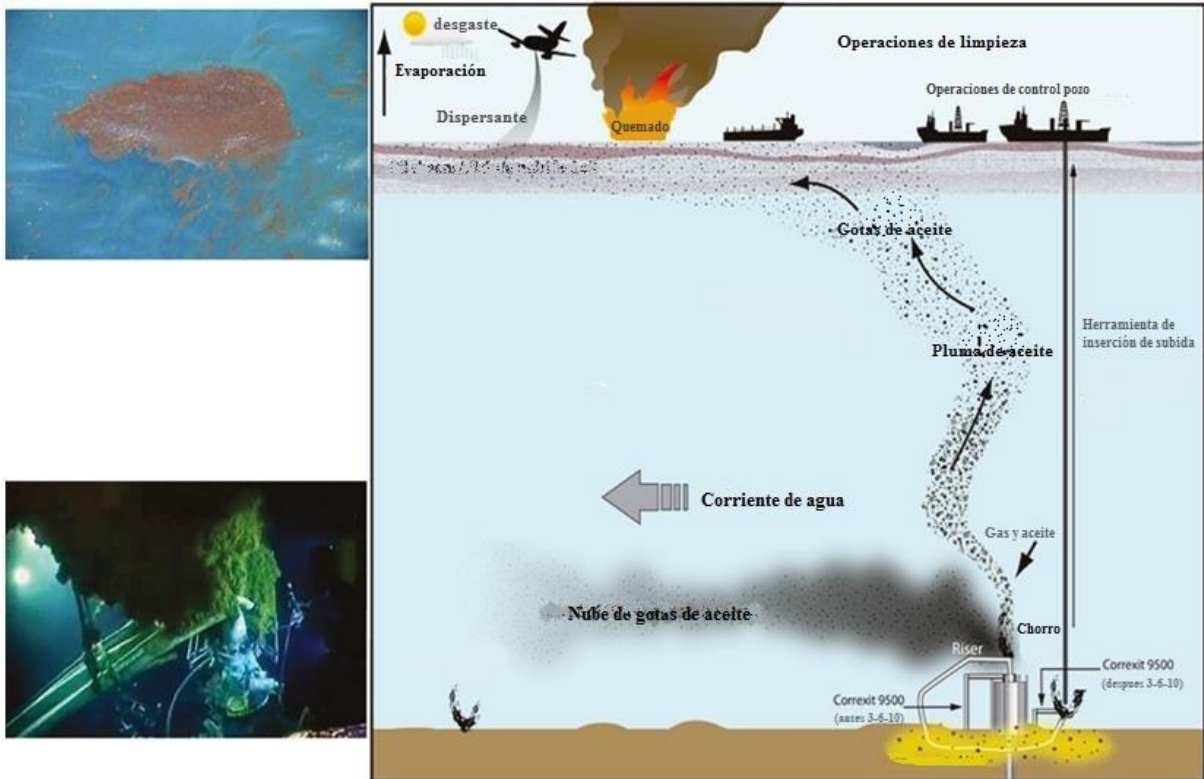


Figura. 2.10. Representación gráfica del derrame de BP en aguas profundas del Golfo de México (Sammarco et al., 2013).

- El estudio demostró que la escala espacial de la distribución del petróleo crudo en cuatro medios diferentes durante y después del derrame, se extendió del oeste de Florida al oeste de Louisiana y al este de Texas.
- Los TPH y PAHs de sedimentos alcanzaron su punto máximo cerca de Pensacola, Florida y Galveston, Texas. Las concentraciones de TPH promediaron 39.4 ppt en las inmediaciones del derrame; el rango total fue de 0.50 ppm a 535 ppt.
- Los TPH en agua de mar alcanzaron su punto máximo en Pensacola, todas las clases anteriores alcanzaron su punto máximo al lado del río Mississippi, Louisiana y Galveston. Las concentraciones de los componentes en agua de mar fueron mayores que los reportados en otros, y particularmente mayores que los datos publicados por

Ylitalo et al. (2012), el cual reportó que todas sus mediciones estaban dentro de los límites aceptables en cuanto a la exposición humana y consumo.

- La NOAA recolectó muestras de agua en la región del derrame, mientras el derrame seguía activo en mayo del 2010. El rango de concentraciones reportadas por todos los componentes en un transecto representativo fue de 1.24 ppb - 4.49 ppt. Las muestras de agua en este estudio se obtuvieron de la zona de derrame, así como de sitios a cientos de kilómetros de distancia, después de que el pozo fue tapado. El rango de todos los compuestos fue debajo de los límites detectables a 530 ppm. La discrepancia en resultados por Sammarco et al. (2013) y la NOAA (2010) puede ser atribuible a la variación espacio-temporal en el muestreo.
- Los HTP y HPA en la biota, alcanzaron su máxima concentración cerca del río Mississippi justo al oeste del sitio del derrame. La biota marina, tales como esponjas, corales, bivalvos marinos y otros organismos epibentónicos presentaron altas concentraciones de hidrocarburos del petróleo a profundidades <18 m., después de que el pozo fuese tapado. Los efectos a largo plazo sobre estos organismos en el GDM aún no se han descrito, por lo cual se recomienda su monitoreo. Las concentraciones de TPH en este conjunto de flora y fauna marina promediaron 3.820 ppt.
- Los HTP e HPA en mariscos, alcanzaron su punto máximo cerca del lugar del derrame en Pensacola, FL. En las muestras de mariscos, el pico de las concentraciones medidas de C1-benzo(a) antraceno/criseno fueron 3.8×10^3 veces mayor que el umbral admitido por USEPA para el consumo humano de productos del mar (1.80×10^{-5} ppm). Las altas concentraciones de TPH afectaron el medio

ambiente y la economía de esta región, debido a sus extensas pesquerías (ostras, camarones, cangrejos azules, peces). Las especies comerciales exhibieron grandes valores de HTP, promediando 3.968 ppt.

La recomendación posterior al derrame de petróleo por BP, en regiones en las que se realiza tanto producción y explotación de gas y petróleo, así como la explotación de la pesca, fue realizar un monitoreo constante de petróleo en la columna de agua, sedimento, biota marina y mariscos, lo cual, es valioso para ayudar a definir y reducir las concentraciones de hidrocarburos de petróleo en el medio ambiente y evitar impactos potenciales en los ecosistemas costeros (humedales y manglares) por contaminación y exposición a COVs y HAPs, los cuales, están vinculados con los puntos en el tiempo y en el espacio donde la pesca pueda ser abierta o vedada y, finalmente, reducir el riesgo de contaminación por petróleo en ecosistemas costeros y playas del Golfo de México (USGS, 2011; Aeppli et al., 2012; Sammarco et al., 2013).

2.3 POTENCIAL DE MANGLARES EN LA BIORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO

2.3.1 Importancia ecológica de manglares

Los manglares son ecosistemas costeros tropicales y subtropicales, conformados por árboles tolerantes a sal que ocupan suelos o sedimentos, sujetos a inundaciones y con muy poco oxígeno. El nombre de manglar es tomado del árbol de mangle y deriva de la palabra guaraní “mangue” que significa “árbol retorcido”. El manglar es uno de los ecosistemas más interesantes e importantes que posee el planeta en regiones ecuatoriales y subtropicales, por los servicios que presta, los atributos que posee y las funciones que realiza (Sanchez-Paéz et al., 2000b).

Los manglares son bosques inundados que se encuentran en la confluencia de aguas dulces y salobres, y están atravesados por canales navegables, llamados esteros, que aumentan y disminuyen su caudal al ritmo de las mareas. Los mangles son árboles que en su proceso evolutivo se adaptaron a las presiones, desarrollando mecanismos para eliminar los excesos de sal, para sostenerse en suelos inestables y para sobrevivir en sustratos sin oxígeno, y lograron semillas flotantes que se desarrollan parcialmente en el mismo árbol como base de sus estrategias de reproducción (CONABIO, 2008).

Los manglares son reconocidos por presentar especies de árboles y plantas con adaptaciones morfológicas y fisiológicas que les permiten tolerar la falta de oxígeno, altos niveles de salinidad y distintos patrones de inundación, y colonizar suelos reducidos, inundados y salinos sujetos a cambios geomorfológicos (Tomlinson, 1986).

La producción neta de los manglares en las zonas donde hay suficiente lavado del suelo, se transfiere casi en su totalidad al mar como material vegetal (hojas y madera en descomposición) o detritos. Los organismos detritívoros de diversos grupos funcionales lo aprovechan, y transfieren la energía a los sistemas marinos a través de la cadena trófica (Sánchez-Páez et al., 2000b)

Los manglares son muy importantes para el hombre por las siguientes razones: a) exportan materia orgánica que es alimento directo de diversos recursos pesqueros o estimulante de la producción primaria en el ecosistema acuático adyacente; b) sustentan importantes pesquerías tropicales en las etapas críticas de los ciclos de vida de muchos peces, crustáceos y moluscos; c) se extraen taninos, madera aserrable, postes, durmientes, leña y carbón; d) en la zona costera, reducen la erosión al atenuar los cambios climático-meteorológicos e hidrodinámicos; e) son refugio de los depredadores y la variada fauna y flora que coexiste en el ecosistema.

Los suelos de las áreas de manglar son pantanosos, saturados de humedad, ligeramente ácidos y compuestos de limo, arcilla, arena y restos de materia orgánica en diversos estados de descomposición; en general, por ser ambientes de baja energía, además los suelos de manglar se caracterizan por un alto contenido de agua, de sal y sulfuro de hidrógeno, un bajo contenido de oxígeno y una elevada proporción de materia orgánica (Lewis, 2005).

La construcción de obras civiles especialmente en cuanto a vías de comunicación como carreteras, canales y vías férreas en la costa Atlántica principalmente, así como la edificación y adecuación de muelles, la ampliación de centros urbanos, han contribuido a la desaparición y degradación de los bosques de manglar (Mastaller, 1996). Cerca de un tercio de los manglares, pastos marinos y zonas pantanosas salinas en todo el mundo se han perdido en las últimas décadas, como resultado de la deforestación, cambio de uso del suelo, extensión de la acuicultura, la ingeniería portuaria, la urbanización y la contaminación con hidrocarburos del petróleo (Alongi, 2002; Feller et al., 2010; Lewis et al., 2011; Peixoto et al., 2011; Penha-Lopes et al., 2011; Bouchez et al., 2013).

En el mundo se conocen alrededor de 73 especies de manglares (Tomlinson, 1986; Spalding et al., 2010). Los manglares de México se distribuyen en el interior de lagunas costeras y sistemas estuarinos del Golfo de México y del Océano Pacífico, y abarcan una área de 655,667 hectáreas (CONABIO, 2008). Campeche es el estado con mayor cobertura de manglar (196,552 ha), y las mayores extensiones en su cobertura se localizan en el Área de Protección de Flora y Fauna Laguna de Términos (APFFLT) y en la Reserva de la Biosfera Los Petenes (RBLP), siendo éstos los más importantes en cobertura de humedales en la zona costera del Golfo de México (CONABIO, 2008). Los bosques de manglar en el estado de Campeche, México están constituidos principalmente por cuatro especies:

Rhizophora mangle L., *Avicennia germinata* L., *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. f., y *Conocarpus erectus* L., las cuales se encuentran bajo protección especial de la NOM-059-SEMARNAT-2001 (Contreras, 1985; Day et al., 1987; CONABIO, 2008).

En las franjas costeras del Caribe y el Pacífico predomina el mangle rojo (*Rhizophora mangle*), denominado así por la abundante tintura de su corteza, y fácilmente reconocible gracias a sus raíces que parecen enormes arañas, lo que ha hecho que al manglar se le conozca localmente como el raicero. El mangle rojo, se reproduce mediante la autofertilización; esta forma cerrada de reproducción propicia poca diversidad genética dentro de cada especie. Como resultado de lo anterior, puede que el mangle rojo sucumba fácilmente ante la presencia de contaminantes u otros agentes ambientales (Rivera-Monroy y Twilley, 1996).

Conocarpus erectus (mangle botoncillo), generalmente no se considera un verdadero mangle, si no una especie perimetral que se encuentra en las partes más elevadas y sobre terrenos arenosos y menos salados. Frecuentemente se desarrolla como arbusto, pero en terrenos favorables se desarrolla como árbol, alcanzando alturas de 5 a 7 m. Es la única especie de mangle con hojas alternas, tiene pecíolos muy cortos con láminas elípticas o elíptico lanceoladas, tienen de 4 a 9 cm de largo y de 2 a 3.5 cm de ancho; posee 2 glándulas en la base de la lámina de la hoja. Las flores son diminutas de 2 mm de ancho, verdes y fragantes, reunidas en inflorescencias globulares de 6 a 12.5 mm de diámetro, que se convierten en una fruta agregada y redonda (Mitra et al., 2008)

Los árboles *Laguncularia racemosa* (Mangle blanco), tienen generalmente una altura de 4 a 6 m, aunque alcanza hasta 20 m. Su tronco tiene una corteza fisurada, característica que lo distingue del mangle negro, que tiene una corteza enteriza. Las hojas son pecioladas, con pecíolos de 1 a 2 cm de largo, rojizos y con 2 glándulas colocadas en

ambos lados de la porción distal; son opuestas, simples, enterizas y oblongas con un ápice redondeado y textura coriácea y succulenta. La superficie superior (haz) es verde grisáceo y el envés más claro (Rivera-Monroy y Twilley, 1996).

Al igual que ocurre en ambientes terrestres, en los suelos de manglares las sustancias alimenticias exudadas por las raíces de los árboles de mangle sirven de alimento y fuente de energía a la comunidad bacteriana presente en los sedimentos y en su rizósfera de mangle (Holguín y Bashan, 2007). El suelo es un factor importante a ser considerado por los servicios ambientales que puede ofrecer, como una fuente de carbono (por microorganismos amilolíticos, celulolíticos y lipolíticos) y nitrógeno (proteolíticos y pectinolíticos), donde los microorganismos tienen una función principal en la estructura y propiedades químicas (pH, nitrógeno y contenido de materia orgánica), y contribuye con la liberación de nutrientes que son aprovechados por las plantas, pero también, en la mineralización y transformación de contaminantes (Schloter et al., 2003).

Las bacterias aisladas de la rizósfera de manglares, se utilizan como un instrumento para mejorar la reforestación y rehabilitación de manglares (Bashan y Holguín, 2002). La inoculación de plántulas de mangle con bacterias puede ayudar a restablecer la vegetación y el ecosistema de manglares afectados por contaminantes (Holguín et al., 2001; de-Bashan et al. 2012).

2.3.2 Efecto de hidrocarburos del petróleo en manglares y su potencial en biorremediación

Los manglares son reconocidos por su gran importancia ecológica y económica, pero también son los ecosistemas más amenazados del mundo por fuentes de contaminación derivadas de la explotación y producción petrolera marina y terrestre (Gomes et al., 2010). Existen diversos trabajos que destacan la importancia de los

microorganismos aislados de suelos y sedimentos de manglares para llevar a cabo procesos de biorremediación de hidrocarburos del petróleo.

En las superficies de ecosistemas de manglares, los microorganismos se organizan en biopelículas microbianas, que consisten principalmente de bacterias heterótrofas conocidas a menudo como los microfitobentos, que se incrustan en una matriz orgánica microbiana (Decho, 2000). Estas comunidades y biopelículas están presentes en las capas superiores de los suelos y sedimentos (Holguin et al., 2001), así como en raíces de los árboles (Toledo et al., 1995; Gomes et al., 2010), donde se llevan a cabo una serie de funciones como la transformación de nutrientes, estabilización de los sedimentos, la promoción del crecimiento vegetal.

Los hidrocarburos de petróleo derramados accidentalmente durante la explotación de pozos petroleros marinos o terrestres dañan severamente a los ecosistemas de manglar, y las operaciones de limpieza después del derrame son costosas (Mastaller, 1996). La contaminación de los manglares tiene una serie de consecuencias importantes, la más inmediata y evidente es la defoliación de los árboles (Kathiresan y Bingham, 2001). La toxicidad del aceite puede depender de las condiciones ambientales pero afecta la supervivencia y el crecimiento de *Rhizophora mangle* (Proffitt et al., 1995).

A lo largo de la costa de Sao Paulo, Brasil, un derrame de petróleo causó 25.9% de defoliación de *Rhizophora mangle*, el 43.4% defoliación de *Laguncularia racemosa*, y el 64.5% de defoliación de *Avicennia schaueriana* (Lamparelli et al., 1997). La mortalidad diferencial de los árboles puede potencialmente conducir a los cambios a largo plazo en la estructura de la comunidad.

El petróleo en un hábitat de manglares puede tener otros efectos menos evidentes en los manglares. Por ejemplo, los sedimentos pueden tener la contaminación de hidrocarburos

mucho después de un evento de derrame, incluso cuando no hay evidencia de contaminación de petróleo en los árboles o en muestras de agua circundante (Bernard et al., 1995, 1996). Muñoz et al. (1997) siguieron la descomposición de crudo ligero árabe en Turba de manglares durante ocho años completos, encontrando que los sedimentos contaminados mantenían los residuos de hidrocarburos, incluyendo la tracción de hidrocarburos aromáticos, cinco años después de un derrame (Burns et al., 1994). Los autores sugieren que se requieren al menos 20 años para que la toxicidad pueda desaparecer por completo.

Grant et al. (1993) demostraron que el petróleo en sedimentos puede inhibir el crecimiento y disminuir la supervivencia de las plántulas de mangle durante varios años, misma que puede interferir con los esfuerzos de reforestación de manglares (Zheng et al., 1997). Klekowski et al. (1994) encontraron una correlación positiva entre las concentraciones de HAP en sedimentos de mangle, y la concentración de clorofila deficiente en *Rhizophora mangle* propiciando mutaciones.

La extensión del daño en el mangle dependerá del tipo de petróleo, la magnitud y la frecuencia del derrame. Por ejemplo, aceite nuevo provoca más pérdida de hojas en plántulas de *Avicennia* que con aceite envejecido (Martin et al., 1990; Grant et al., 1993). Dada la sensibilidad de los manglares a las condiciones del suelo, es esencial estudiar los efectos de petróleo en condiciones que reflejan el entorno natural como sea posible. Por ejemplo, la salinidad debe ser contemplada en los niveles de campo y las concentraciones de petróleo reales se deben utilizar para modelar la exposición crónica de plantas en el suelo contaminado con petróleo (Ellison, 1999).

Los efectos residuales pueden hacer a los manglares más vulnerables a daños en el futuro. Los experimentos de laboratorio deben ser a largo plazo, bajo condiciones naturales

para comprender la respuesta de los manglares al petróleo y los daños o alteraciones fisiológicas que puedan ocurrir.

La contaminación por petróleo crudo puede dañar los animales que viven en el manglar, tanto en los sedimentos y en las raíces de mangle sumergidas en agua (Mackey y Hodgkinson, 1996); por ejemplo, reduce en 60% el número de isópodos en raíces adventicias de *Rhizophora mangle*, y 40 a 50% el número de langostas (Levings y Garrity, 1994; Levings et al., 1994), y también la población de ostras en 65%.

Además de matar directamente a la fauna del manglar, el petróleo puede tener indirectamente efectos que modifican el hábitat. Así el petróleo liberado en 1991, durante la Guerra del Golfo dejó una capa de alquitrán negro a lo largo del Golfo de Arabia, creando temperaturas más altas de las normales en el suelo. Las consecuencias ecológicas de las temperaturas altas y el efecto sobre la mesofauna, aún no son conocidas del todo (Boeer, 1996a).

La respuesta general de un bosque de manglar contaminado por el petróleo crudo se puede dividir en cuatro fases: (1) los efectos inmediatos, (2) el daño estructural, (3) la estabilización y (4) la recuperación. La tercera y cuarta fase pueden tardar muchos años en ocurrir, si ocurren en absoluto. En Brasil, una zona de manglares dañados por el petróleo comenzó a recuperarse hasta 10 años después del suceso (Lamparelli et al., 1997). La evaluación de los efectos del petróleo en los manglares requiere el desarrollo de métodos creativos para la medición de impactos y el modelado preciso de la física y química y de eventos asociados con el derrame (Lamparelli et al., 1997). Estos esfuerzos, sin embargo, sólo serán eficaces si están apoyados por un cuidadoso monitoreo y un conjunto de estudios de mediano y largo plazo, así como, de una ardua labor de conciencia ecológica dirigida a la población sobre el valor de dichos ecosistemas.

Por lo anterior, es de suma importancia realizar estudios de investigación en ecosistemas costeros como son los manglares del estado de Campeche; dado que estos por su localización en la Sonda de Campeche y Golfo de México, son un tesoro ecológico y ambiental en riesgo de ser impactados negativamente por actividades de la industria petrolera y principalmente por contaminación a causa de derrames de petróleo.

Los manglares se distinguen de cualquier otro ecosistema boscoso por ser los que concentran más carbono en el suelo, por ello su preservación y estudio actualmente es esencial para mitigar el cambio climático. Además, la microbiota rizosférica de los manglares representa un potencial biotecnológico importante que puede contribuir a resolver problemas de contaminación por hidrocarburos del petróleo causado por derrames de petróleo en la Sonda de Campeche.

Por lo tanto, la propuesta fue desarrollar el presente trabajo de investigación titulado “microorganismos degradadores de hidrocarburos del petróleo, aislados de la rizósfera del manglar del estado de Campeche y su potencial en la biorremediación”.

CAPÍTULO III
IDENTIFICACIÓN Y POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE GRUPOS
FUNCIONALES MICROBIANOS AISLADOS DE LA RIZÓSFERA DE CUATRO
ESPECIES DE MANGLE*¹

Resumen

Este estudio identificó grupos funcionales microbianos cultivables tales como bacterias totales, posibles bacterias fijadoras de N₂ de vida libre, bacterias hidrocarbonoclastas fijadoras de N₂, bacterias hidrocarbonoclastas asimiladoras de N, hongos totales, actinobacterias, microorganismos solubilizadores de fósforo, lipolíticos y celulolíticos. Así, como, microorganismos degradadores de pectina, almidón y proteína, aislados de la rizósfera de cuatro especies de manglares (Rojo, Negro, Blanco y Botoncillo) predominantes en la Laguna de Términos de Campeche, México. Las poblaciones microbianas mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las cuatro especies de mangle. La rizósfera de Mangle Blanco mostró los valores más altos de materia orgánica, nitrógeno total, fósforo total y carbono orgánico total, y la mayor población microbiana en comparación con las especies de manglares restantes. El análisis de componentes principales (ACP) indicó que dos componentes representaron el 85.3% de la variación total. Las propiedades químicas y de textura del suelo fueron los componentes principales más significativos, CP1 (materia orgánica y carbono orgánico total) y CP2 (arena y arcilla). Las poblaciones microbianas de celulolíticos correlacionaron significativamente ($P < 0.05$) con la materia orgánica, nitrógeno total y carbono orgánico total; las bacterias fijadoras de nitrógeno, hongos totales, pectinolíticos y amilolíticos correlacionaron con fósforo total.

Palabras clave: Manglares, *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans*, *Laguncularia racemosa*, *Conocarpus erectus*, poblaciones microbianas.

^{*1}Capítulo aceptado para su publicación en la revista Applied Soil Ecology (Ver Anexo IV).

CHAPTER III

IDENTIFICATION AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF MICROBIAL FUNCTIONAL GROUPS ISOLATED FROM THE RHIZOSPHERE OF FOUR MANGROVE SPECIES

Abstract

This study identified and evaluated the biotechnological potential of functional microbial groups such as total bacteria, potential N-fixing free bacteria, hydrocarbonoclastic N-fixing free bacteria, hydrocarbonoclastic N-assimilating bacteria, total fungi, actinobacteria, P-solubilizing and lipolytic microorganisms, and cellulose, pectin, starch and protein-degrading microorganisms as well, isolated from four dominant mangrove species (red, white, black and button) at the Terminos Lagoon, Campeche (Mexico). Microbial populations showed significant differences ($P < 0.05$) among the four mangrove species. The rhizosphere of white mangrove had higher values of organic matter, and total nitrogen, phosphorus and organic carbon, and microbial populations than the remaining mangrove species. The main component analysis (MCA) indicated that two components represented the 85.3% of the total variation. Chemical and soil textural properties were the more significant components, MC1 (organic matter and total organic carbon) and MC2 (sand and clay). Cellulose-degrading microorganisms significantly correlated ($P < 0.05$) with organic matter, and total nitrogen and organic carbon; whereas potential N-fixing free bacteria, total fungi, and pectin and starch-degrading microorganisms correlated with total phosphorus.

Key words: Mangroves, *Rhizophora mangle*, *Avicennia germinans*, *Laguncularia racemosa*, *Conocarpus erectus*, microbial populations.

3.1 INTRODUCCIÓN

En el mundo se han reportado aproximadamente 73 especies de manglares (Spalding et al., 2010) características de lagunas costeras en los trópicos y subtrópicos. Los manglares son considerados como una de las áreas más productivas en ambientes marinos y estuarinos que sirven de soporte a grandes comunidades de plantas y animales, muchos de los cuales son importantes económica y ecológicamente (Jones, 1992; Toledo et al., 1995). En México los manglares se distribuyen en litorales de lagunas y estuarios en el Golfo de México y el Océano Pacífico, abarcando 655,667 ha. Campeche es el estado mexicano con la mayor cobertura de manglar (196,552 ha), que se encuentra principalmente en el área natural protegida de la Laguna de Términos, y en la reserva de la biosfera de Los Petenes (CONABIO, 2008; Spalding et al., 2010). En Campeche, los manglares se componen de cuatro especies: *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo), *Avicennia germinans* (L.) Stern (mangle negro), *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. f. (mangle blanco) y *Conocarpus erectus* L. (mangle botoncillo) (Day et al., 1987; Day et al., 1996).

Los ecosistemas de manglares se caracterizan por la acumulación de residuos lignocelulósicos que son mineralizados por procesos mediados por microorganismos (Alongi et al., 1989; Holguín et al., 2001). La descomposición de residuos vegetales genera detritus, el cual es la base de la cadena alimenticia para varios organismos que viven en ese ecosistema tales como crustáceos, moluscos, larvas de insectos, nematodos, y especies comerciales de camarones, ostras y peces (Odum y Heald, 1975a; Odum y Heald, 1975b). Los manglares de zonas tropicales constituyen el hábitat idóneo para el desarrollo de crustáceos y peces juveniles, lo cual incrementa el rendimiento de la pesca costera (Aburto-Oropeza et al., 2008; Duke et al., 2007). Sin embargo, el detritus no sólo es importante para las especies que viven en los ecosistemas de manglares, cerca del 25% de este material es

transportado a mar abierto. Por lo tanto, los manglares también son considerados como ecosistemas exportadores de nutrientes (Clough, 1991). Los ecosistemas de manglares son deficientes en nutrientes, especialmente en nitrógeno (N) y fósforo (P) disponible (Holguín et al., 1992; Alongi et al., 1993); paradójicamente, son altamente productivos después de las selvas tropicales y los arrecifes de coral. La actividad microbiana en los manglares es la responsable de hacer disponibles N y P en el ecosistema, y las deficiencias de estos elementos se compensan por bacterias fijadoras de N_2 y solubilizadoras de P (Sengupta y Chaudhuri, 1990; Alongi et al., 1993; Vázquez et al., 2000; Flores-Mireles et al., 2007; Vovides et al., 2011a; Vovides et al., 2011b). En manglares de la Laguna de Términos, Rivera-Monroy y Twilley (1996) encontraron que la pérdida de N debido a procesos de desnitrificación es mínima, lo que sugiere una competencia entre bacterias y plantas por N disponible (NH_4^+) en el ecosistema.

Los procesos microbianos son elementos clave en la productividad de los manglares, donde el N es un nutriente importante. La reducción del área de manglar afecta dichos procesos que se ve reflejada en la pérdida de biodiversidad y función microbiana, debido al aumento de amonio, salinidad y pH, malas condiciones de flujo y nivel del agua, y perturbaciones de origen humano en manglares de zonas áridas y tropicales (Vovides et al., 2011b).

De manera similar a lo que ocurre en las plantas terrestres, las hojas caídas de las especies de mangle alimentan y sirven como fuente de carbono y energía a las comunidades microbianas (Holguín et al., 2001). Por ejemplo, algunos microorganismos desempeñan un papel importante en el ciclo del carbono mediante la degradación de almidón, celulosa, lignina, o lípidos, y otros microorganismos participan en los ciclos de N y P en el suelo (Bouillon et al., 2008). Por lo tanto, la actividad microbiana contribuye de manera

significativa en los cambios de las propiedades químicas del suelo, así como en la nutrición vegetal al facilitar la mineralización de la materia orgánica, y con ello, aumentar la disponibilidad de nutrientes y la absorción por las plantas (Schloter et al., 2003). Algunas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) son elementos biológicos útiles para la reforestación y la rehabilitación de los ecosistemas de manglar, ya que promueven el crecimiento de las plántulas. Esto se puede hacer mediante la inoculación de plantas de semillero con BPCP obtenidas a partir de la rizósfera de mangle que participan en uno o más de los ciclos biogeoquímicos del ecosistema. Así, las BPCV pueden servir como componentes valiosos en la biorremediación de suelos contaminados, y agua, y en la revegetación de tierras degradadas (Bashan y Holguín, 1998; Holguín et al., 2001; Bashan y Holguín, 2002; de-Bashan et al., 2012).

La degradación de hidrocarburos es un proceso natural en todos los ecosistemas; sin embargo, factores tales como el tipo y disponibilidad de contaminante, y la presencia de microorganismos hidrocarbonoclastas están entre las variables más importantes asociadas con los resultados del proceso de degradación (Alexander, 1994; Taketani et al., 2009).

Las nuevas aproximaciones experimentales sugieren la identificación de cepas bacterianas como parte de enfoques biotecnológicos dirigidos a futuros programas de rehabilitación de manglares (Alongi, 1994). Por tanto, las comunidades microbianas tales como fijadores de nitrógeno, solubilizadoras de P y degradadoras de hidrocarburos en los manglares, son una fuente importante de microorganismos con aplicaciones potenciales para diversos fines biotecnológicos tales como producción sostenible de biocombustibles y cultivos, fitorremediación de suelos y aguas contaminadas, o para mejorar la reforestación (Sivaramakrishnan et al., 2006; Lageiro et al., 2007; Salihu et al., 2012; de-Bashan et al., 2012). Por lo anterior, la hipótesis planteada de este trabajo fue que las poblaciones

microbianas identificadas con potencial biotecnológico correlacionan significativamente con los parámetros químicos del suelo rizosférico de las cuatro especies de mangle predominantes en la Laguna de Términos, Campeche (México).

El objetivo de este estudio consistió en identificar grupos funcionales microbianos cultivables, tales como bacterias totales, posibles bacterias fijadoras de N₂ de vida libre, bacterias hidrocarbonoclastas fijadoras de N₂, bacterias hidrocarbonoclastas asimiladoras de N, hongos totales, actinobacterias, microorganismos solubilizadores de P, lipolíticos y celulolíticos. Así, como degradadores de pectina, almidón y proteína, aislados de la rizósfera de las cuatro especies de mangle predominantes en el área natural protegida de la Laguna de Términos.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Sitio de estudio y Muestreo

El suelo rizosférico se colectó de las cuatro especies de mangle predominantes en la Laguna de Términos, Campeche (México); mangle rojo (MRojo), mangle negro (MNegro), mangle blanco (MBlanco) y mangle botoncillo (MBoton), durante la temporada de lluvias (septiembre, 2010) y la temporada de secas (junio, 2011). El sitio de muestreo se encuentra a lo largo de la costa entre el Jardín Botánico de la Universidad Autónoma del Carmen, y Estero Pargo; 18° 38' Norte y 91° 46' Oeste (Figura 3.1). Las muestras de suelo rizosférico se tomaron entre 0 y 20 cm de profundidad entorno a las raíces de las especies de mangle, y se colocaron en frascos de vidrio esterilizados para su posterior análisis microbiológico y determinar sus principales propiedades de textura y químicas del suelo. Las muestras se transportaron y se mantuvieron a 4 °C hasta realizar los análisis correspondientes (Paetz y Wilke, 2005).

Se realizó un muestreo aleatorio con dos réplicas de suelo rizosférico de tres árboles de cada especie de mangle (1 kg de suelo rizosférico por cada árbol). Posteriormente, en el laboratorio para el análisis microbiológico, la primera réplica de cada árbol de mangle muestreado se mezcló homogéneamente, aplicando el método de cuarteo, y se generaron seis muestras compuestas de suelo rizosférico representativo de cada especie de mangle. Con la segunda réplica de suelo rizosférico de cada árbol de mangle, se formaron muestras compuestas para realizar los análisis químicos y de textura.

3.2.2 Análisis microbiológico de microorganismos cultivables

Los microorganismos cultivables fueron cuantificados por la técnica de dilución y conteo en placa ($n=6$), utilizando medios de cultivo específicos ($n=6$). Las bacterias totales (TotB), hongos totales (TotF), y actinobacterias (ACMY) se determinaron utilizando agar nutritivo, agar papa dextrosa y agar de Czapek (pH 8, Merck®), respectivamente. Las bacterias con potencial de solubilizar fosfatos de calcio (PSOL) se cuantificaron utilizando el medio de Pikovskaya (Pikovskaya, 1948), mientras que, las bacterias potencialmente fijadoras de N_2 de vida libre (NFB) se cuantificaron utilizando el medio de carbón combinado libre de nitrógeno (Rennie, 1981). Además, este medio se modificó aplicando petróleo crudo (80 mg L^{-1}) o nitrato de amonio (2 mg L^{-1}) más petróleo crudo para la cuantificación de bacterias hidrocarbonoclastas fijadoras de N_2 (NF-HB) y bacterias hidrocarbonoclastas asimiladoras de N (NA-HB), respectivamente. Las placas de agar se incubaron a $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un periodo de 3 a 5 días, expresando los resultados en unidades formadoras de colonias (UFC g^{-1} suelo seco).

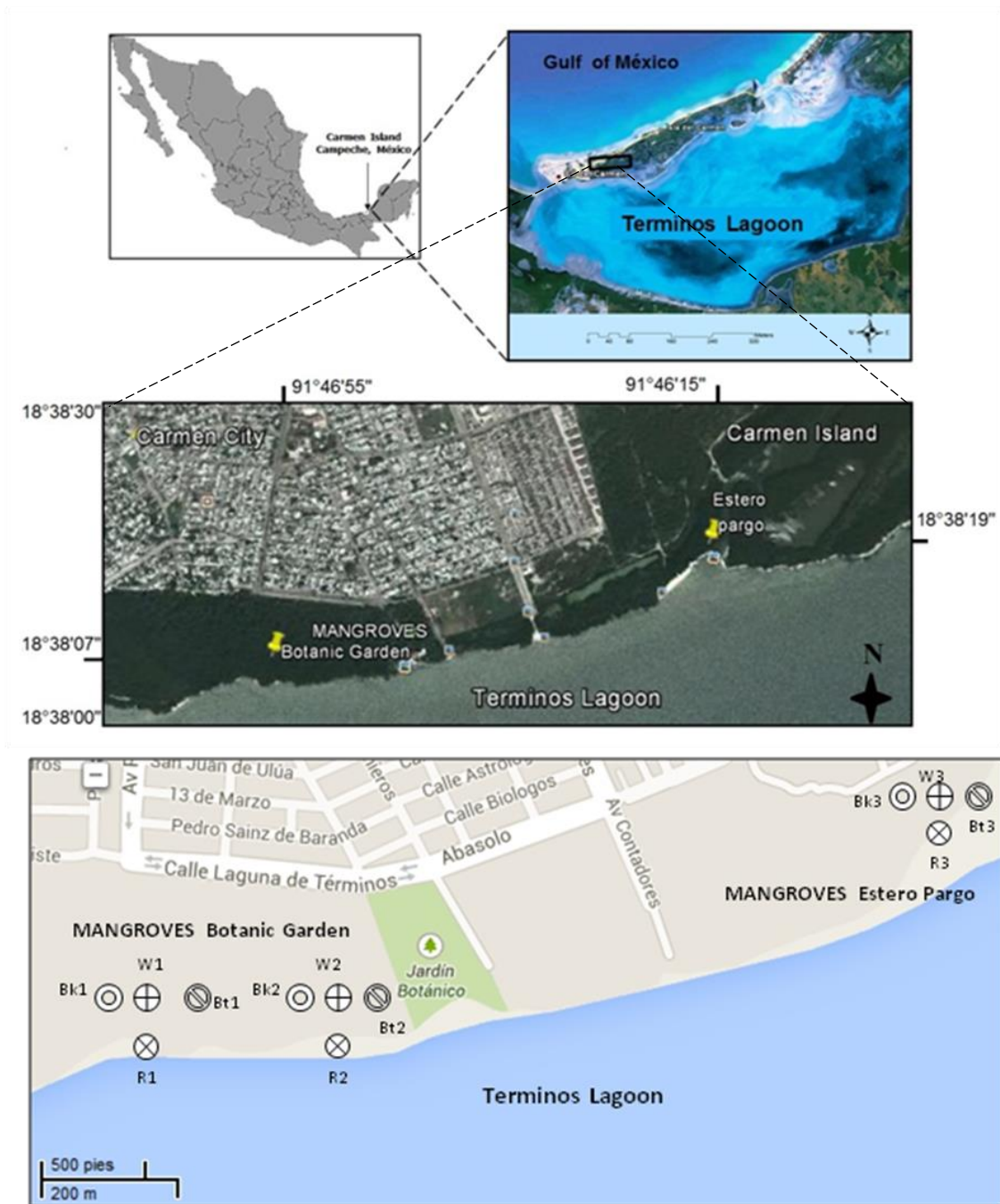


Figura 3.1. Localización de los sitios de muestreo en manglares de la Laguna de Términos.

Las poblaciones de microorganismos celulolíticos (CELLUL), lipolíticos (LIPOL), así como microorganismos degradadores de pectina (PEC), almidón (AMYL) y proteína (PROT) también se cuantificaron (Levine, 1953; Sierra, 1957; Wollum, 1982; Sumaya et al., 1993). Las placas (n=6) se incubaron a 28 ± 1 °C durante un periodo de 3 a 7 días, expresando los resultados en unidades formadoras de colonias (UFC g⁻¹ suelo seco).

3.2.3 Análisis físicos y químicos de suelo rizosférico

Las muestras de suelo de cada especie de mangle fueron secadas y tamizadas (< 2 mm) para determinar: pH (1:2 H₂O) y conductividad eléctrica (CE) (1:5 H₂O) (APHA, 1998), materia orgánica (MO) y contenido de carbón orgánico total (COT) (Walkley y Black, 1934). El contenido total de nitrógeno (N), fósforo (P) por el método de Olsen y carbonato de calcio (CaCO₃) fueron también determinados (Allison y Moodie, 1965; Olsen y Dean, 1965; APHA, 1998), así como la textura del suelo (Bouyoucos, 1962).

3.2.4 Análisis estadístico

Se utilizó el promedio de seis repeticiones para estimar las poblaciones microbianas (UFC g⁻¹ de suelo). Para homogenizar los datos, la media de las poblaciones microbianas se transformó en unidades logarítmicas y se sometió a un análisis de varianza (ANOVA) y a una prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$); sin embargo, los datos en las gráficas se presentan usando datos reales. Las medias de las propiedades químicas del suelo se evaluaron mediante el análisis de componentes principales (ACP) junto con un diagrama de dispersión de los componentes principales CP1 y CP2. Además, se realizó una prueba de correlación de Pearson ($P < 0.05$) con las poblaciones microbianas y las propiedades físicas y químicas del suelo. El análisis estadístico se realizó con el software InfoStat_2013 (Di Rienzo et al., 2013).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Población microbiana

La población de bacterias totales (TotB) fue significativamente mayor en la rizósfera de MBlanco (1513×10^3 UFC g^{-1} suelo) con respecto a las tres especies restantes de mangle, durante la temporada de lluvias. En contraste, en la estación seca, la rizósfera de MBoton y MBlanco mostraron significativamente mayor población de TotB (1040 y 980×10^3 UFC g^{-1} suelo, respectivamente) en comparación con MNegro y MRojo (Figura 3.2A). La población de actinobacterias (ACMY) no fue influenciada significativamente por la estacionalidad (datos no presentados), pero presentó variación por efecto de la especie de manglar. En la temporada de secas, la población de ACMY fue significativamente mayor en la rizósfera de MBlanco y MBoton (20×10^3 UFC g^{-1} suelo en promedio); en contraste, en la temporada de lluvias, la población de ACMY (16.5×10^3 UFC g^{-1} suelo en promedio) fue mayor en MNegro y MBoton. La población de ACMY más baja se observó en la rizósfera de MRojo en la temporada de lluvias (Figura 3.2B). En el caso de microorganismos solubilizadores de P (PSol), las poblaciones más altas se encontraron durante la estación seca, especialmente en la rizósfera de MBoton y MBlanco (198 y 105 UFC g^{-1} de suelo, respectivamente) (Figura 3.2C); mientras que para las restantes especies de manglar la población promedio de PSol fue de 42.5 UFC g^{-1} de suelo, independientemente de la estacionalidad (Figura 3.2C). La población de hongos totales (TotF) fue significativamente mayor durante la temporada de lluvias en las muestras de suelo rizosférico de MBlanco y MNegro cuyas poblaciones fueron 1,500 UFC g^{-1} suelo y 600 UFC g^{-1} suelo, respectivamente (Figura 3.2D).

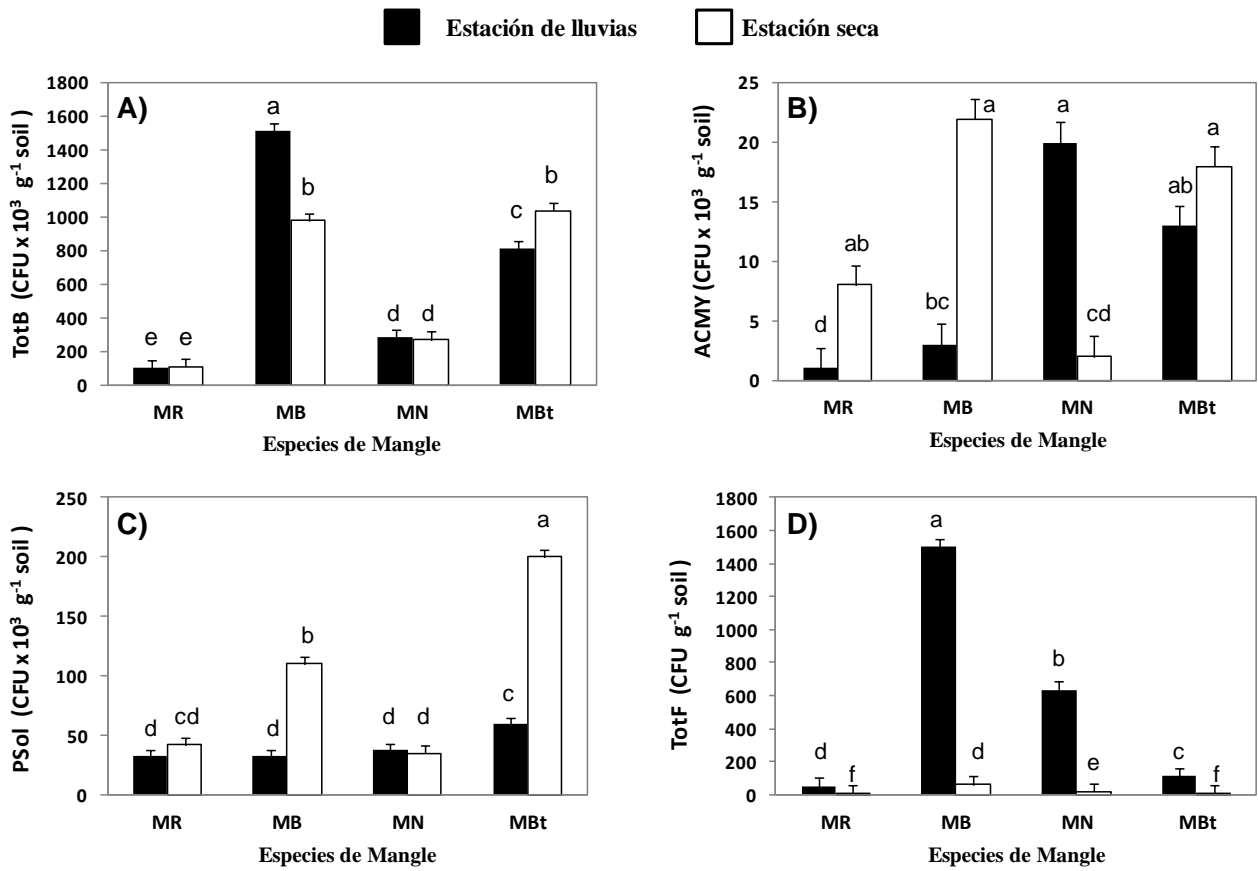


Figura 3.2. Poblaciones de bacterias totales (TotB), actinobacterias (ACMY), microorganismos potencialmente solubilizadores de P (PSol) y hongos totales (TotF) cuantificados en el suelo rizosférico de cuatro especies de mangle muestreados en la Laguna de Términos, Campeche (México). Promedio \pm Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). $n=6$. Abreviaturas: MR, Mangle Rojo; MB, Mangle Blanco; MN, Mangle Negro, y MBt, Mangle Botoncillo.

La población de bacterias diazotrofas (NFB) fue significativamente mayor en la temporada de lluvias en comparación con la temporada seca; mientras que la rizósfera de MBlanco, MBoton y MRojo mostraron mayores poblaciones (1360 , 640 y $448 \times 10^3 \text{ UFC g}^{-1}$ de suelo, respectivamente) que la rizósfera del MNegro con $84 \times 10^3 \text{ UFC g}^{-1}$ de suelo (Figura 3.3A).

La población de bacterias diazotróficas degradadoras de hidrocarburos (NF-HB) fue significativamente mayor en las muestras colectadas durante la temporada de lluvias, en comparación con la temporada de secas, particularmente, en la rizósfera de MBoton y MBlanco cuyas poblaciones de NF-HB fueron 323 y 129×10^3 UFC g^{-1} de suelo, respectivamente (Figura 3.3B). En la temporada de lluvias, la población de bacterias NA-HB fue significativamente mayor en las muestras colectadas de la rizósfera de MBlanco y MBoton (98 y 74×10^3 UFC g^{-1} de suelo, respectivamente) con respecto a la observada para MNegro (Figura 3.3C). Durante la estación seca, la población de NA-HB fue significativamente menor en la rizósfera de MNegro fue de 27×10^3 UFC g^{-1} de suelo (Figura 3.3C).

En la Figura 3.4, se observan diferencias significativas entre las especies de mangle con respecto a la población de microorganismos lipolíticos (LIPOL), celulolíticos (CELLUL), amilolíticos (AMIL), pectinolíticos (PEC), y proteolíticos (PROT). La rizósfera de MBlanco tuvo las poblaciones más altas de CELLUL (38×10^3 UFC g^{-1} de suelo), AMYL (71×10^3 UFC g^{-1} de suelo), PEC (140×10^3 UFC g^{-1} de suelo), y PROT (73×10^3 UFC g^{-1} de suelo) en las muestras colectadas durante la temporada de lluvias (Fig. 3.4 B, C, D y E). La rizósfera de MBoton presentó la mayor población de microorganismos LIPOL, seguido de la rizósfera de MBlanco, en ambas estaciones (Figura 3.4A). Por el contrario, en temporada seca, las poblaciones microbianas más bajas se detectaron en microorganismos lipolíticos, amilolíticos y pectinolíticos en MRojo, así como celulolíticos en MBoton, y proteolíticos en MNegro (Figura 3.4 A-E).

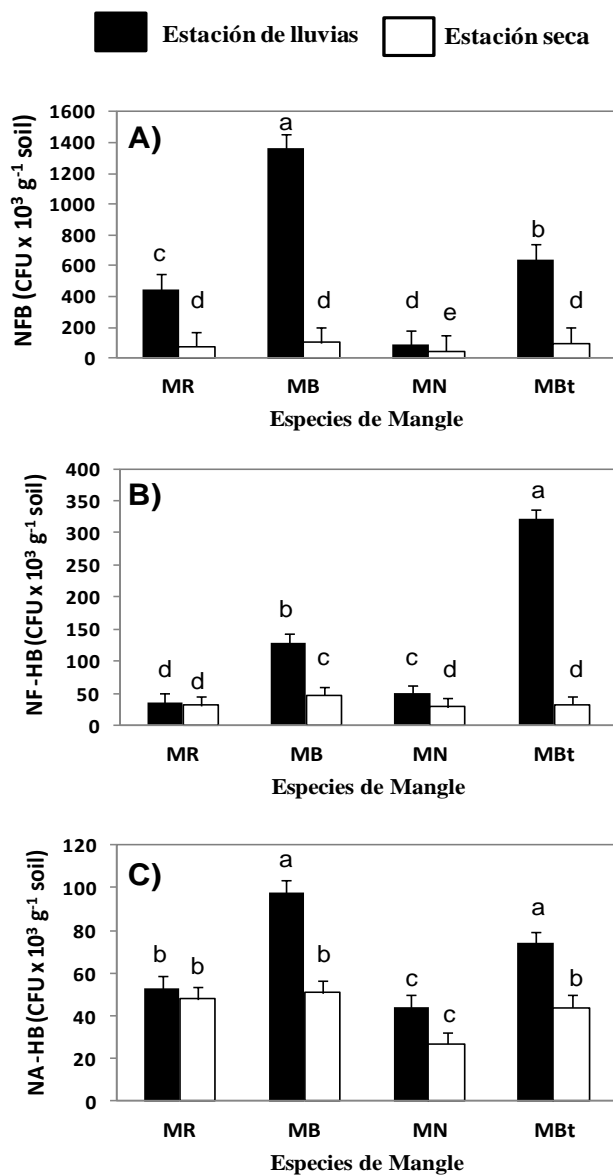


Figura 3.3 Poblaciones de bacterias posiblemente fijadoras de N₂ de vida libre (NFB), bacterias hidrocarbonoclastas fijadoras de N₂ (NF-HB) y bacterias hidrocarbonoclastas asimiladoras de N (NA-HB), cuantificadas en el suelo rizosférico de cuatro especies de mangle muestreados en la Laguna de Términos, Campeche (México). Promedio ± Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). n=6. Abreviaturas: MR, Mangle Rojo; MB, Mangle Blanco; MN, Mangle Negro y MBt, Mangle Botoncillo.

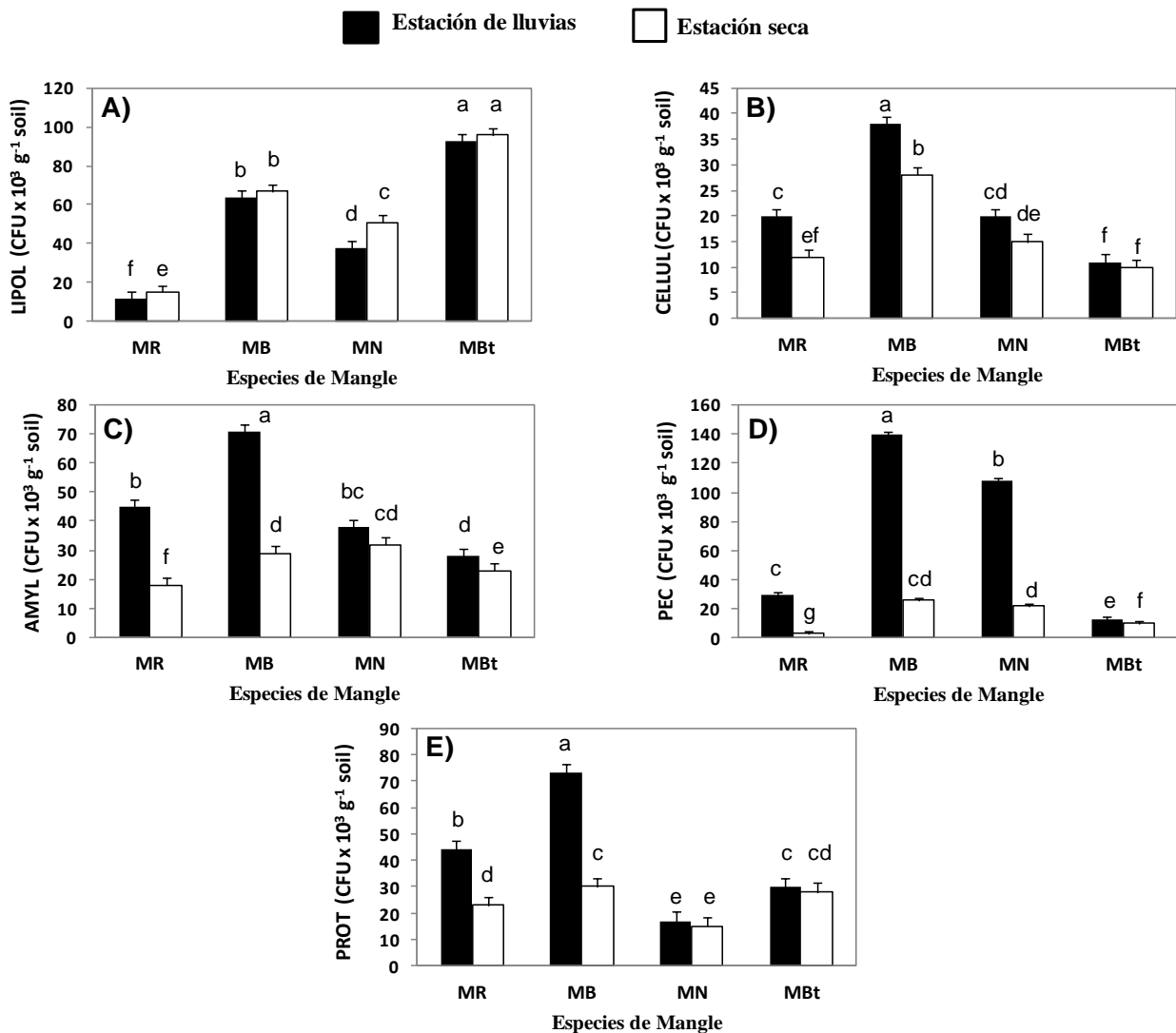


Figura 3.4. Poblaciones de microorganismos con actividad fisiológica específica: lipolítica (LIPOL), degradadores de celulosa (CELLUL), almidón (AMYL), pectina (PEC), y proteína (PROT), cuantificadas en el suelo rizosférico de cuatro especies de mangle muestreados en la Laguna de Términos, Campeche (México). Promedio \pm Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (Tukey, $\alpha=0.05$). n=6. Abreviaturas: MR, Mangle Rojo; MB, Mangle Blanco; MN, Mangle Negro y MBt, Mangle Botoncillo.

3.3.2 Parámetros físicos y químicos del suelo rizosférico

La Tabla 3.1 muestra que los valores de pH oscilaron entre 7.4 y 8.9 en las cuatro especies de mangle, independientemente de la temporada de muestreo. Los valores de conductividad eléctrica (CE) fueron mayores en las muestras colectadas en la temporada de sequía, en comparación con los obtenidos en la estación de lluvias, a excepción de la muestra de suelo rizosférico de MBoton. En el caso de la materia orgánica total (MO), los valores más altos se obtuvieron en la rizósfera de MBlanco, y los valores más bajos se encontraron en la rizósfera de MRojo; para estas dos especies de mangle, los valores más altos de MO se obtuvieron en la temporada de lluvias en comparación con los obtenidos en la estación de sequía (Tabla 3.1).

Un patrón similar se encontró para el N-total, donde el mayor valor se obtuvo en la rizósfera de MBlanco y MNegro tanto en la temporada de lluvias y sequía, en cambio, los valores más bajos se encontraron en la rizósfera de MRojo y MBoton (Tabla 3.1). El contenido de fósforo (P) fue en general más alto durante la temporada de lluvias que en la estación seca. En la temporada de lluvias, los valores más altos se obtuvieron en la rizósfera de MBlanco, MNegro y MBoton; por el contrario, durante la estación seca, los valores más altos correspondieron a la rizósfera de MNegro y MBoton (Tabla 3.1). Independientemente de la especie de mangle, el contenido de carbonato de calcio (CaCO_3) en la temporada seca fue 7 veces mayor que en la temporada de lluvias (Tabla 3.1). La rizósfera de MBlanco mostró los mayores valores de carbono orgánico total (COT) en ambas temporadas; contrario a esto, los valores de COT más bajos se obtuvieron en la rizosfera de MRojo y MBoton, respectivamente (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Parametros químicos y textura del suelo rizosférico de cuatro especies de mangle de la Laguna Términos, Campeche.

Temporada	Especies de Mangle	pH	CE dSm ⁻¹	Materia Orgánica (%)	N-Total (%)	P-Total mgL ⁻¹	CaCO ₃ (%)	Carbono Orgánico Total (%)	Textura del suelo (%)		
									Arena	Limo	Arcilla
Lluvias	MRojo	8.9±0.02	0.89±0.02	1.2±0.1	0.04±0.01	8.0±0.5	9.6±0.06	0.48±0.05	80±2	9±2	11±2
	MBlanco	7.8±0.03	0.51±0.04	13.9±0.1	0.34±0.06	39.0±2	7.7±0.1	7.15±0.05	80±1	9±1	11±1
	MNegro	8.3±0.2	0.76±0.01	3.0±0.5	0.08±0.01	24.0±1	13.5±0.1	1.26±0.04	84±1	5±1	11±1
	MBoton	8.6±0.1	0.79±0.01	2.3±0.1	0.07±0.02	15.0±0.5	8.9±0.1	1.88±0.08	82±1	7±1	11±1
Secas	MRojo	8.6± 0.1	4.27± 0.03	0.1± 0.05	0.04± 0.03	1.0± 0.4	88.3± 0.75	0.20± 0.06	4± 2	3± 2	93± 2
	MBlanco	7.4±0.06	3.20±0.1	11.0±1	0.37±0.02	0.8±0.04	46.4±0.06	6.40±0.1	8±1	9±1	83±1
	MNegro	7.6±0.1	2.67±0.1	6.6±0.1	0.16±0.01	14.8±0.01	56.7±0.03	3.90±0.1	18±1	9±1	73±1
	MBoton	8.8±0.1	0.21±0.01	0.5±0.05	0.04±0.01	13.4±0.1	84.4±0.4	0.30±0.1	7±1	2±1	91±1

Los resultados de la caracterización y agrupación de los parámetros químicos del suelo de la rizósfera de las cuatro especies de mangle se muestran en la Figura 3.5. Basado en el análisis de componentes principales (ACP), se observó que dos componentes principales representan el 85.5% de la variación total: CP1 con un 48.3%, y CP2 con 37.0%. Los parámetros con influencia significativa en el componente principal CP1 fueron materia orgánica y carbono orgánico total. Contrariamente a esto, el componente CP2 está influenciado significativamente por los parámetros relacionados con la textura del suelo: arena y arcilla. Durante la temporada de lluvias, las cuatro especies de mangle mostraron una textura franco-arenosa (CP1), mientras que durante la estación seca, el suelo tenía una textura arcillosa (CP2). La mayor parte del suelo en manglares de la Laguna de Términos y Estero Pargo es arcilloso, con muchas inclusiones de raíces y material leñoso grueso. Por lo anterior, el tipo textura observado en ambas temporadas en el suelo de manglar, posiblemente se deben a la hidrodinámica del sistema fluvio-lagunar de la laguna de Términos, la cual presenta corrientes de flujo y reflujos permanentes de agua marina entrando en la boca de Puerto Real y saliendo por boca del Carmen en temporada de lluvias. Además, la zona de muestreo se mantiene inundada durante la estación de lluvias. La temporada de nortes, ocasiona oleaje y corrientes a lo largo de la costa de tal forma, que el nivel del mar aumenta hasta casi un metro por encima de su nivel normal (Rivera-Monroy y Twilley, 1996; Fuentes-Yaco et al., 2001).

En la textura de la rizósfera de los manglares se obtuvieron correlaciones altamente significativas entre arena x arcilla ($r = -1.0$, $P < 0.0001$), y entre arena x CaCO_3 ($r = -0.93$, $P < 0.0007$) (Tabla 2). Además, las correlaciones de los parámetros asociados a las temporadas de lluvias (arena x fósforo, $r = 0.62$) o la estación seca (Arcilla x CaCO_3 , $r = 0.95$) fueron

altamente significativas (Tabla 3.2). Los valores negativos indican que a mayor porcentaje de arenas se tendrá menor porcentaje de arcillas y/o CaCO_3 .

La Figura 3.5 muestra que a medida que dos vectores están más cerca los valores de r tienden a 1.0, como ocurrió con el coeficiente de correlación para el carbono orgánico total (COT) x materia orgánica (OM), cuyo valor fue $r = 0.99$. Por el contrario, cuando los vectores son opuestos la correlación se vuelve negativa, como se observó para arena x arcilla ($r = -1,0$).

Basándose en el diagrama de dispersión para los componentes principales CP1 y CP2 (Figura 3.6) y en la correlación negativa observada para el ACP, la asociación entre arena x arcilla ($r = -1,0$) es inversamente proporcional entre sí. Por ejemplo, el suelo rizosférico de MRojo, MBoton, MNegro y MBlanco presentó valores altos de arena en la temporada de lluvias, pero valores bajos de arcilla. Por el contrario, durante la estación seca, la rizósfera de las cuatro especies de mangle presentó valores más bajos de arena, pero valores altos de arcilla (Figura 3.6).

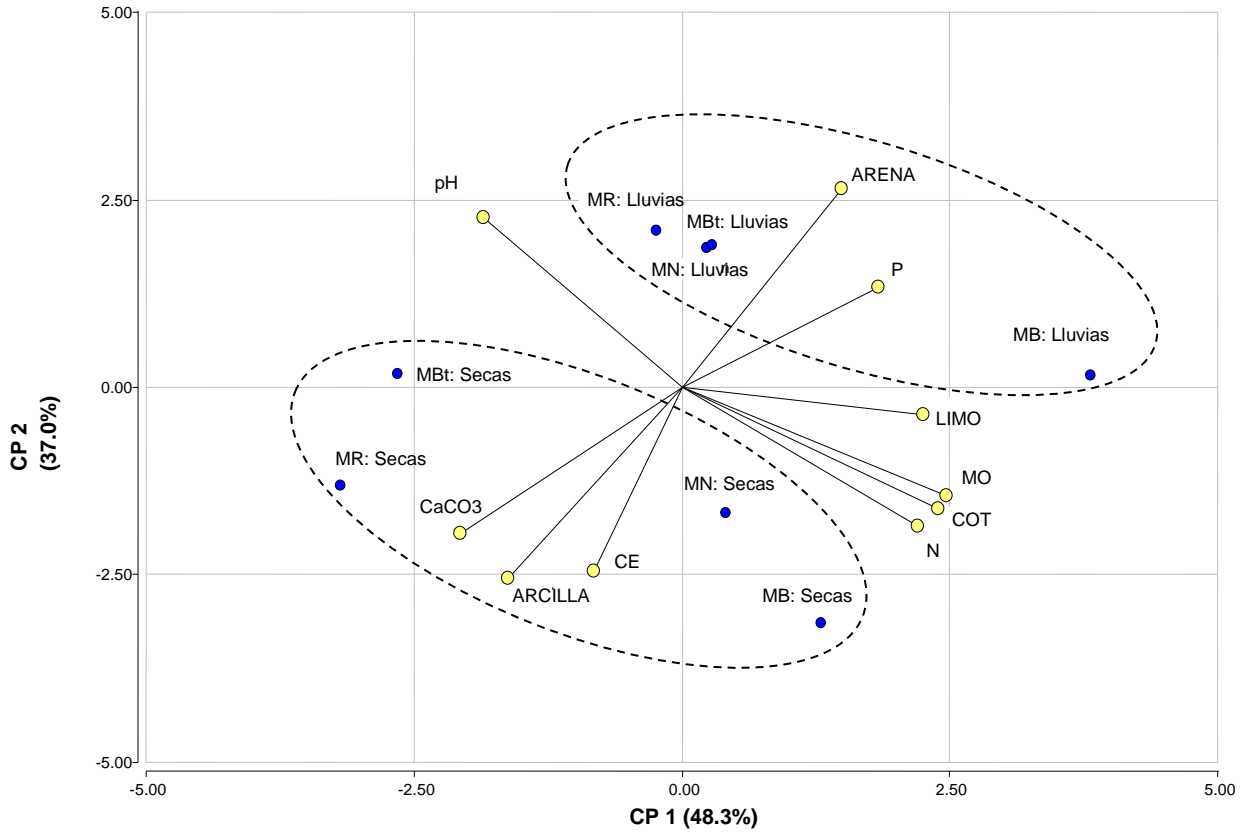


Figura 3.5. Gráfica de análisis de componentes principales de parámetros químicos, textura del suelo rizosférico y estacionalidad designada para cuatro especies de mangle de la Laguna de Términos, Campeche, México. Los valores entre paréntesis representan el porcentaje de variación de cada componente. Abreviaturas: MR, Mangle Rojo; MB, Mangle Blanco; MN, Mangle Negro y MBt, Mangle Botoncillo.

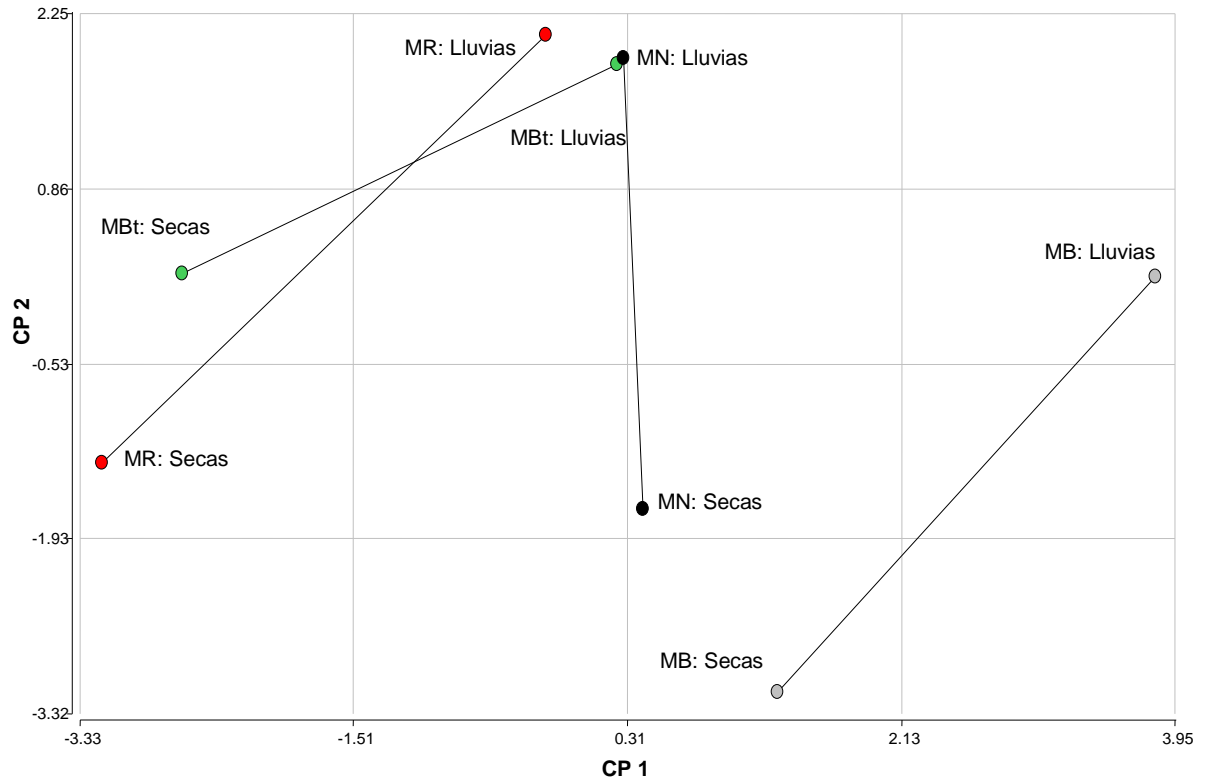


Figura 3.6. Diagrama de dispersión de CP1 versus CP2 con respecto a las especies de mangle y estacionalidad (lluvias o secas) estimada a partir de muestras colectadas en la Laguna de Términos, Campeche, México. CP1 (Materia Orgánica y Carbono Orgánico Total) y CP2 (Arena y Arcilla). Abreviaturas: MR, Mangle Rojo; MB, Mangle Blanco; MN, Mangle Negro, y MBt, Mangle Botoncillo.

3.3.3 Correlaciones entre poblaciones microbianas con parámetros físicos y químicos.

La Tabla 3.2 muestra los coeficientes de correlación de Pearson ($P < 0.05$) más significativos entre las poblaciones microbianas y parámetros químicos en la rizósfera de manglares.

Los parámetros con correlaciones altamente significativas fueron: bacterias diazotróficas (NFB), degradadoras de hidrocarburos (NA-HB), hongos totales, celulolíticos, amilolíticos, pectinolíticos, proteolíticos, pH, materia orgánica, nitrógeno, fósforo, carbonato de calcio (CaCO_3), arena, arcilla y carbono orgánico total. En contraste, los parámetros sin correlaciones significativas fueron: bacterias diazotróficas degradadoras de hidrocarburos (NF-HB), solubilizadores de fosfatos, conductividad eléctrica y limo. De este modo, el coeficiente de correlación de Pearson más bajo se observó entre fósforo x bacterias diazotróficas ($r = 0.72$), mientras que las correlaciones significativas ($P < 0.0007$) más altas fueron las siguientes: arena x CaCO_3 ($r = -0.93$), degradadoras de hidrocarburos x bacterias diazotróficas ($r = 0.94$), hongos totales x pectinolíticos ($r = 0.95$), arcilla x CaCO_3 ($r = 0.95$), nitrógeno x materia orgánica ($r = 0.97$), carbono orgánico total x nitrógeno ($r = 0.98$), carbono orgánico total x materia orgánica ($r = 0.99$), y arcilla x arena ($r = -1.00$). Con base en los coeficientes de correlación observados entre los parámetros químicos y microbianos, es posible aceptar nuestra hipótesis ya que las poblaciones microbianas correlacionaron significativamente con los parámetros químicos en el suelo rizosférico colectado de las especies de mangle Rojo, Negro, Blanco y Botoncillo, evaluados en la Laguna de Términos.

Tabla 3.2. Coeficientes de correlación de Pearson entre poblaciones microbianas, textura y parámetros químicos de suelo rizosférico colectado de cuatro especies de mangle de la Laguna de Términos, Campeche (México).

Parámetro	Pearson correlation (r)	Valor <i>P</i> (<0.05)	Parámetro	Pearson correlation (r)	Valor <i>P</i> (<0.05)
NAHB x NFB	0.94	0.0005	TotF x NFB	0.79	0.0201
TotF x NAHB	0.73	0.0397	LIPOL x TotB	0.75	0.0337
CELLUL x TotF	0.79	0.0206	PEC x TotF	0.95	0.0003
PEC x CELLUL	0.77	0.0262	AMYL x NFB	0.84	0.0099
AMYL x TotF	0.88	0.0042	AMYL x CELLUL	0.83	0.01
AMYL x PEC	0.85	0.0081	PROT x NFB	0.92	0.0013
PROT x NAHB	0.87	0.0055	PROT x CELLUL	0.74	0.0343
PROT x AMYL	0.84	0.0088	MO x CELLUL	0.88	0.0041
MO x pH	-0.86	0.0058	N x CELLUL	0.84	0.0092
N x pH	-0.87	0.005	N x MO	0.97	0.0001
P x NFB	0.72	0.0442	P x TotF	0.89	0.0028
P x PEC	0.86	0.0056	P x AMYL	0.80	0.0174
Arena x CaCO ₃	-0.93	0.0007	Arcilla x CaCO ₃	0.95	0.0002
Arcilla x Arena	-1.00	< 0.0001	COT x CELLUL	0.82	0.0125
COT x pH	-0.89	0.0031	COT x MO	0.99	< 0.0001
COT x N	0.98	< 0.0001			

Abreviaciones:

NAHB = Bacterias hidrocarbonoclastas fijadoras de nitrógeno
LIPOL = Lipolíticos
AMYL = Amilolíticos
N = Nitrógeno total

NFB = Bacterias fijadoras de nitrógeno
CELLUL = Celulolíticos
PROT = Proteolíticos
P = Fósforo total

TotB = Bacterias totales
TotF = Hongos totales
PEC = Pectinolíticos
MO = Materia orgánica
COT = Carbono orgánico total

3.4 DISCUSIÓN

Las poblaciones microbianas fueron influenciadas significativamente por las especies de mangle. La rizósfera de MBlanco albergó la más alta población microbiana en comparación con las otras tres especies de manglares de la Laguna de Términos. Sin embargo, poblaciones de bacterias totales, actinobacterias, y de los microorganismos con potencial en la solubilización de P y en la fijación del N₂ fueron más bajas que los reportados para otros suelos de ecosistemas de manglares en los que existe mayor aporte de nitrógeno a las plantas por la presencia de diazótrofos (Toledo et al., 1995; Bashan et al., 1998; González-Acosta et al., 2006; Mitra et al., 2008).

La mayor población de hongos se obtuvo en la temporada de lluvias en la rizósfera de las cuatro especies de mangle (Figura 3.2B), lo cual coincide con un estudio, realizado en Belice, respecto a la distribución de los hongos que colonizan a las cuatro especies de mangle evaluadas en esta investigación (Kohlmeyer et al., 1995; Holguin et al., 2001). El presente trabajo, contribuye con información relativa a la cuantificación y abundancia de hongos totales en las cuatro especies de mangle predominantes (*R. mangle*, *A. germinans*, *L. racemosa* y *Conacarpus erectus*) en el Área Natural Protegida Laguna de Términos.

La cuantificación de grupos funcionales microbianos específicos tales como lipolíticos (LIPOL), amilolíticos (AMYL), pectinolíticos (PEC) y proteolíticos (PROT) no se ha llevado a cabo previamente en los ecosistemas de manglar. En general, las poblaciones de estos cuatro grupos funcionales de microorganismos fueron altas en la rizósfera de MBlanco en ambas estaciones, y la población de LIPOL fue mayor en la rizósfera de MBoton. Ambas especies de manglares se establecen cerca de la tierra o en la parte interior de los bosques de mangle, por lo que la acumulación de materia orgánica (MO) permite mayores depósitos orgánicos de N y P. Lo anterior, coincide con los datos

proporcionados por Srinivasan et al. (2008) y Dias et al. (2009) quienes indican que los valores altos de MO y la disponibilidad de nutrientes son determinantes para el crecimiento microbiano y para la proliferación de microorganismos con actividad fisiológica específica como degradadores de celulosa, pectina, o almidón, entre otros compuestos orgánicos que están presentes en la hojarasca. En el presente estudio, la rizósfera de MBlanco tuvo mejores propiedades químicas (contenido de N y de P, pH y MO, por ejemplo, Tabla 3.1) por las cuales se estimularon las poblaciones de microorganismos. Por lo tanto, al parecer la rizósfera de MBlanco posee condiciones químicas del suelo más óptimas para albergar microorganismos con fisiología funcional más diversa, como se indicó por Dias et al. (2009).

Con base en las poblaciones microbianas evaluadas en el presente estudio, se sugiere que los ecosistemas de manglares albergan diversos grupos microbianos funcionales que potencialmente pueden ser dirigidas a enfoques biotecnológicos para la restauración ecológica o para fines agrícolas (Toledo et al., 1995; Vázquez et al., 2000; Bashan y Holguín, 2002; Rueda-Puente et al., 2003; Kathiresan y Selvam, 2006; Sundararaman et al., 2007; El-Tarabily y Youssef, 2010; de-Bashan et al., 2012). En este sentido, la rizosfera de MBlanco posee la mayor población de microorganismos benéficos que juegan un papel importante en los ciclos de C, N o P en el manglar.

Las poblaciones microbianas obtenidas en MBlanco y MNegro pueden explicarse también en parte, por el período de inundaciones durante la temporada de lluvias, lo que permite la proliferación de microorganismos, además de la disponibilidad de nutrientes, agua, y de mejores condiciones de pH (Dias et al., 2009). Sin embargo, las poblaciones microbianas de MBlanco y MBoton también fueron estimulados durante la estación seca, y ese efecto se debe a que las arcillas y humus predominaron según ha explicado Stotzky

(1993), características que pueden haber favorecido la adhesión microbiana en las partículas y en la acumulación de nutrientes.

Tanto actinobacterias como los hongos son componentes biológicos importantes para la descomposición de la materia orgánica por medio de la liberación de varias enzimas que permiten la degradación de la lignina, celulosa, y otros componentes de la planta como pectina, proteínas, y almidón (Raghukumar et al., 1994). En este sentido, los hongos pueden crecer tanto en condiciones de alta humedad o bien, extremadamente secas (Waksman, 1950; Abramson et al., 1999), como se observa en nuestros datos. Particularmente, las actinobacterias son abundantes en los suelos alcalinos, con alto contenido de materia orgánica y contenido de CaCO_3 (Waksman, 1950), lo que concuerda con las propiedades químicas obtenidas a partir de muestras colectadas en la Laguna de Términos. Los microorganismos solubilizadores de P, juegan un papel significativo en la disponibilidad de este nutrimento para otros microorganismos y plantas, a partir de fuentes de P orgánico o inorgánico, que deben ser objeto de procesos de mineralización o solubilización (Holguín et al., 2001; Sahoo y Dhal, 2009). En este trabajo se muestra la capacidad solubilizadora de fosfatos de microorganismos de la rizósfera de MBoton, ya que esta fue la especie de mangle que tuvo la mayor población de microorganismos solubilizadores de P, presentes en ambas temporadas de muestreo (lluvias y secas). Lo anterior sugiere, que a mayor población microbiana de solubilizadores, sugiere una mayor producción de ácidos orgánicos que potenciar la disponibilidad de fosfatos solubles. (Vázquez et al., 2000; Holguín et al., 2001).

Es importante destacar que de acuerdo con la revisión de literatura, se recomienda evaluar a las bacterias fijadoras de N_2 aplicando el ensayo de reducción de acetileno como un método sencillo (Holguin et al., 1992), y para evaluar bacterias solubilizadoras de P, se

sugiere la propuesta realizada por Bashan et al. (2013), quienes proponen utilizar principalmente tres fuentes diferentes de fosfato tales como Fe-P, Al-P y varios Ca-P, menos solubles en comparación del trifosfato de calcio, como parte de un nuevo procedimiento alternativo; descartando con ello, el método tradicionalmente utilizado de Pikovskaya (1948).

La alta proliferación de bacterias posiblemente fijadoras de N_2 (diazotróficas, NFB), bacterias hidrocarbonoclastas fijadoras de N_2 (NF-HB) y bacterias hidrocarbonoclastas asimiladoras de N (NA-HB) en la rizosfera de MBlanco y MBoton representa una fuente importante de nitrógeno para los manglares. Estos grupos funcionales bacterianos además de contribuir a la reducción de N_2 atmosférico a formas fácilmente asimilables de nitrógeno, también pueden contribuir en la degradación de compuestos orgánicos, cuyos efectos tóxicos pueden afectar a la estabilidad de los ecosistemas de manglar. La interacción de las bacterias fijadoras de N_2 con otras bacterias pueden inhibir o promover su actividad diazotrófica, lo cual, es común entre las comunidades bacterianas y grupos funcionales de los manglares (Holguín y Bashan, 1996; Rojas et al., 2001).

La presencia de bacterias potencialmente hidrocarbonoclastas se ha tenido en cuenta en los estudios ecológicos realizados con sedimentos de los ecosistemas costeros de estuarios, observado reducción de hidrocarburos, incremento de materia orgánica y valores pH menos alcalinos (Dias et al., 2009). En cuanto a las poblaciones de CELLUL, AMYL y LIPOL, o PROT y PEC, estas contribuyen a la degradación de residuos vegetales y liberación de nutrientes que pueden ser absorbidos por las plantas (Schloter et al., 2003). Así como en la posible reducción de los hidrocarburos del petróleo que son depositados en los ecosistemas de manglar.

Todos los grupos funcionales microbianos identificados en el presente estudio, indican que la Laguna de Términos es una fuente importante de microorganismos que pueden ser utilizados con fines biotecnológicos dirigidos a procesos de restauración ambiental (mejorar la reforestación de suelos erosionados o favorecer la descontaminación). Así como en la agricultura (mejorar el rendimiento y control de enfermedades en cultivos) o la industria (de grasas y aceites, solventes y detergentes) como lo proponen Sivaramakrishnan et al. (2006), Lageiro et al. (2007), Salihu et al., 2012 y de-Bashan et al. (2012).

3.5 CONCLUSIONES

Las poblaciones microbianas de las cuatro especies de mangle (MRojo, MBlanco, MNegro y MBoton) mostraron diferencias significativas en ambas temporadas, lluvias y secas. Las mayores poblaciones microbianas y los valores óptimos de los parámetros químicos se obtuvieron en el suelo rizosférico de mangle blanco (*L. racemosa*), mientras que las poblaciones microbianas más bajas y los valores más altos de los parámetros químicos del suelo se obtuvieron en la rizósfera de mangle rojo (*R. mangle*). La contribución científica de esta investigación es importante por la identificación realizada de los grupos funcionales de microorganismos cultivables que podrían ser utilizados en otros estudios con enfoques biotecnológicos para remediar suelos contaminados. Por otra parte, las poblaciones microbianas correlacionaron significativamente con los parámetros químicos del suelo rizosférico de la Laguna de Términos, Campeche (México).

CAPÍTULO IV

SELECCIÓN Y FILOGENIA DE BACTERIAS HIDROCARBONOCLASTAS AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DE CUATRO ESPECIES DE MANGLARES DEL ESTADO DE CAMPECHE, MÉXICO

Resumen

El presente estudio seleccionó cualitativa y cuantitativamente e identificó filogenéticamente bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo y diésel de cuatro especies de manglar del estado de Campeche. La selección cualitativa se realizó por medio de ensayos de tolerancia de hidrocarburos de petróleo crudo y diésel, utilizando como variable principal la turbidez de la escala de Macfarland mientras que la selección cuantitativa se realizó utilizando cromatografía de gases-masas (GC-MS). De un total de 86 bacterias hidrocarbonoclastas identificadas filogenéticamente, se seleccionaron las diez mejores que sobresalieron por su porcentaje de degradación de petróleo crudo y diésel, destacando bacterias del tipo *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Providencia* y *Acinetobacter*. En la selección cualitativa, las bacterias hidrocarbonoclastas de petróleo y diésel presentaron diferencias con respecto a la turbidez de sus testigos de petróleo (T_P) y diésel (T_D), respectivamente. El mayor porcentaje de bacterias hidrocarbonoclastas fue obtenido a partir de aislamientos de la rizósfera de mangle blanco en comparación con las especies de manglares restantes. La mejor bacteria hidrocarbonoclasta de petróleo crudo fue la cepa MARW 27 (*Pseudomonas* sp.), mientras que la mejor bacteria hidrocarbonoclasta de diésel fue MARW 25 (*Rhodococcus erythropolis*). Estas bacterias pertenecieron al grupo de bacterias hidrocarbonoclastas fijadoras de nitrógeno aisladas de la rizósfera de mangle blanco.

Palabras clave: Degradación de hidrocarburos; GC-MS; *Pseudomonas*; *Rhodococcus*

CHAPTER IV

**SCREENING AND PHYLOGENETIC IDENTIFICATION OF
HYDROCARBONOCLASTIC BACTERIA ISOLATED FROM FOUR
MANGROVE SPECIES AT THE CAMPECHE STATE, MEXICO**

Abstract

This study screened and phylogenetically identified petroleum or diesel-hydrocarbonoclastic bacteria isolated from four mangrove species of Campeche State. Bacteria were qualitatively and quantitatively selected by means of performing assays of tolerance to crude oil or diesel, using either MacFarland scale of turbidity and the Gas Chromatography coupled to Mass Spectroscopy (GC-MS). From 86 phylogenetically identified hydrocarbonoclastic bacteria, 10 strains were selected based on their percentage of crude oil or diesel degradation, from which *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Providencia* and *Acinetobacter* were the most prominent bacteria. The qualitative analysis of crude oil or diesel hydrocarbonoclastic bacteria showed differences in respect to turbidity observed in controls for both contaminants. The higher percentage of hydrocarbonoclastic bacteria was achieved from isolates of the white mangrove rhizosphere when compared to the remaining mangrove species. The best crude oil-hydrocarbonoclastic bacterium was the strain MARW 27 (*Pseudomonas* sp.), whereas the best diesel-hydrocarbonoclastic bacterium was the strain MARW 25 (*Rhodococcus erythropolis*). Both bacterial strains corresponded to potential N-fixing free bacteria isolated from the rhizosphere of white mangrove.

Key words: petroleum degradation; GC-MS; *Pseudomonas*; *Rhodococcus*

4.1 INTRODUCCIÓN

En México los manglares se distribuyen en litorales de lagunas y estuarios en el Golfo de México y el Océano Pacífico, los cuales cubren una extensión de 655,667 ha. Campeche es el estado mexicano con mayor cobertura de manglar (196,552 ha), distribuida principalmente en el área natural protegida de la Laguna de Términos, y en la reserva de la biosfera de Los Petenes, sitios en los que predominan las siguientes especies de manglares: *Rhizophora mangle* L. (mangle rojo), *Avicennia germinans* (L.) Stern (mangle negro), *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. f. (mangle blanco) y *Conocarpus erectus* L. (mangle botoncillo) (Day et al., 1987; Day et al., 1996; CONABIO, 2008).

Las condiciones particulares de productividad, detritus y alto contenido de materia orgánica de los manglares favorecen a las poblaciones microbianas presentes en dichos ecosistemas, las cuales representan un recurso con potencial biotecnológico para ser explotado (Sivaramakrishnan et al., 2006). Dicho potencial biotecnológico incluye también la caracterización de microorganismos hidrocarbonoclastas, los cuales podrían ser útiles en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo (Lageiro et al., 2007; Aniszewski et al., 2010).

El petróleo crudo y el diésel se componen de una mezcla compleja de hidrocarburos, incluyendo alifáticos (*n*-alquenos), alicíclicos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Los HAP son dañinos al medio ambiente y representan un riesgo para la salud humana, debido a su persistencia, toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad (Cerniglia, 1992). El proceso principal para la eliminación exitosa de los HAP de sedimentos contaminados, es vía degradación microbiana. El uso de la microflora nativa en procesos de biorremediación es de gran interés ya que a menudo es más útil y benéfica en

comparación con un inóculo comercial conformado por microorganismos ajenos al ecosistema (Yuan et al., 2000; Guo et al., 2005).

Los manglares son ecosistemas costeros que se encuentran entre los principales lugares donde convergen los derrames de petróleo. A diferencia de las costas rocosas donde las mareas ayudan a lavar la contaminación, los manglares funcionan como depósito de petróleo debido a que la circulación de las mareas favorece la deposición del petróleo en los sistemas de raíces aéreas y sedimentos (Zhu et al., 2001).

Cuando el petróleo y sus derivados alcanzan a los manglares, su impacto negativo está relacionado con el tipo de contaminante, cantidad derramada, la toxicidad, el patrón de deposición y tiempo de acumulación. Los efectos físicos y toxicológicos del petróleo, puede ser agudos (por ejemplo, la defoliación de hojas y la muerte de animales) o bien, crónicos (por ejemplo, reducción de plántulas, inhibición de semillas y la supervivencia o reproducción de cangrejos) (NOAA, 2002).

El éxito de la biodegradación de los contaminantes derivados del petróleo depende de la presencia de microorganismos específicos y de las condiciones ambientales adecuadas. En muchos casos, estos microorganismos son miembros de la microflora local. De hecho, diversos grupos de bacterias hidrocarbonoclastas presentes en sedimentos y rizósfera de manglares, tienen capacidad para degradar los hidrocarburos del petróleo, destacando géneros como: *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Acidovorax*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Paracoccus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Dietzia* y *Gordonia* (Guo et al., 2005; Brito et al., 2006).

Los avances recientes en técnicas moleculares para el estudio de la diversidad y la función de las comunidades microbianas, conducen y contribuyen a una mejor comprensión de la ecología microbiana, razón por la cual, actualmente los investigadores están aplicando

este conocimiento en procesos biotecnológicos, tales como la biorremediación (Santos et al., 2009; Santos et al., 2011).

Actualmente, el uso del gen 16S rRNA como herramienta molecular en ecología microbiana es esencial para realizar estudios filogenéticos, lo que permite una evaluación más exhaustiva de la diversidad microbiana en muestras ambientales. Por lo anterior, la microbiología clásica y molecular, ya no son consideradas ciencias separadas (Muyzer et al., 1993; Peixoto et al., 2008).

La selección cualitativa de bacterias hidrocarbonoclastas se sugiere llevar a cabo por medio de ensayos de tolerancia y degradación de hidrocarburos de petróleo, o bien, utilizando como variable las unidades formadoras de colonias (UFC) por medio de la técnica de dilución y conteo en placa. Para la selección cuantitativa se sugiere la aplicación de análisis instrumentales como por ejemplo, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Además, para determinar la concentración de hidrocarburos del petróleo en suelos contaminados o para evaluar el porcentaje de degradación después aplicar biotecnologías de remediación, se recomienda aplicar de manera estricta los criterios establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003.

El objetivo del presente estudio fue seleccionar cualitativa y cuantitativamente por medio de ensayos de tolerancia y degradación, bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo crudo y diésel, aisladas de la rizósfera de cuatro especies de mangle del estado de Campeche, así como llevar a cabo su identificación filogenética.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Selección cualitativa de bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo y diésel

La selección cualitativa se realizó con la finalidad de seleccionar las mejores bacterias tolerantes e hidrocarbonoclastas de petróleo y diésel en condiciones *in vitro*, respectivamente, a partir del primer (temporada de lluvias) y segundo muestreo (temporada de secas), así como la selección de las diez mejores bacterias en una prueba final de degradación de los hidrocarburos.

4.2.1.1. Preparación del medio mineral líquido y solución bacteriana

El medio mineral (MM) se preparó a partir de dos soluciones. La solución A, se preparó pesando y disolviendo los siguientes reactivos en 900 mL de agua destilada: 0.8 g K_2HPO_4 ; 0.2 g KH_2PO_4 ; 0.1g NaCl; 0.025 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$. La solución B, se preparó con los siguientes reactivos en 100 mL de agua destilada: 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.06 g $CaCl_2$ anhidro. El pH de las dos soluciones se ajustó a 7.0 y se esterilizaron por separado durante 15 min a 121°C, se enfriaron y mezclaron, bajo condiciones de esterilidad.

La solución bacteriana (SB), se preparó tomando una asada de cada bacteria hidrocarbonoclasta aislada previamente (Capítulo III), y se dispersó en un tubo de ensayo con 5 mL de agua estéril, de la cual, se tomó 1 mL de cada muestra, para realizar las pruebas de tolerancia y degradación de petróleo y diésel, respectivamente.

4.2.1.2. Ensayo de tolerancia y degradación de hidrocarburos

Se realizaron dos pruebas de tolerancia y degradación: la primera con petróleo crudo ligero y la segunda con diésel.

La prueba de selección de bacterias hidrocarbonoclastas de petróleo crudo, se llevó a cabo en frascos de vidrio previamente preparados (colocando dentro del frasco perlas de vidrio, y un tubo de vidrio con tapón de algodón en la parte central de la tapa, y forrada con

papel aluminio), se colocaron 49 mL de medio mineral y 250 μ L de petróleo crudo ligero y, se esterilizaron durante 15 min a 121 °C. Posteriormente, bajo condiciones estériles, se les inoculó 1 mL de la solución bacteriana correspondiente.

La prueba de selección de bacterias hidrocarbonoclastas de diésel, se realizó de forma similar a la prueba anterior, en frascos de vidrio con 49 mL de medio mineral y 1 mL de diesel previamente esterilizados, y bajo condiciones estériles, se les inoculó 1 mL de solución bacteriana de cada cepa previamente seleccionada.

Los frascos ya preparados con MM, SB y contaminados con petróleo crudo o con diésel, respectivamente; se incubaron durante 21 días a 28 °C \pm 1 °C y 180 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la selección cualitativa de bacterias determinando la turbidez con el apoyo de la escala de Macfarland, y con base a observaciones directas de cada muestra. Se determinó el grado de turbidez y el número de bacterias mL⁻¹ de cada muestra, y la capacidad de tolerar, reducir o emulsionar el contaminante (petróleo o diésel) reportando la tolerancia como regular, buena o excelente. Con ello, se seleccionaron cualitativamente las mejores bacterias tolerantes y potencialmente hidrocarbonoclastas de petróleo y diésel, respectivamente; del primero y segundo muestreo, así como la selección de las 10 mejores bacterias en una prueba final.

4.2.2 Selección cuantitativa de bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo y diésel

La selección cuantitativa se realizó con las 10 mejores bacterias tolerantes seleccionadas de las pruebas anteriores.

4.2.2.1 Método de extracción en el ensayo de bacterias hidrocarbonoclastas

El método de extracción de hidrocarburos aplicado a bacterias hidrocarbonoclastas consistió en una extracción líquido-líquido utilizando diclorometano grado cromatográfico

(Sigma-Aldrich[®]) como disolvente principal. Las cepas hidrocarbonoclastas se depositaron en un embudo de separación y se sometieron a tres procesos de extracción con 40 mL de diclorometano agitando durante 3 min y dejando reposar 10 min después de cada extracción (Carmo et al., 2011). La fase orgánica se purificó en una columna empacada con 4 g de Na₂SO₄ anhidro y lana de vidrio, colectando los extractos en matraz balón. Los extractos se reconcentraron por medio de baño maría hasta un volumen de 5 mL, el cual, se depositó y conservó en viales color ámbar, para su posterior, cuantificación por cromatografía de gases-masas (GC-MS).

4.2.2.2. Análisis de hidrocarburos totales mediante cromatografía de gases-acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)

Previo al análisis de hidrocarburos totales de los extractos contenidos en viales, todas las muestras se resuspendieron en 1 mL de diclorometano grado cromatográfico. Para el análisis se utilizó un cromatógrafo de gases modelo 6890N (Net Work GC system), marca Agilent Technologies, equipado con una columna DB-5, 5%-fenil-metilpolisiloxano (Agilent Technologies) de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película. La temperatura de inicio fue 50 °C, la cual se mantuvo durante 5 min, posteriormente la temperatura se elevó hasta 280 °C usando una rampa de calentamiento de 20 °C min⁻¹ durante 20 min, utilizando helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL min⁻¹, la temperatura del inyector fue de 250 °C, con inyección Split y una relación de split de 50:1.

Una vez obtenido el cromatograma, la identificación de cada uno de los picos se llevó a cabo mediante espectrometría de masas empleando un espectrómetro de masas modelo 5975 inert XL, marca Agilent Technologies. Los espectros de masas se obtuvieron mediante ionización por impacto electrónico a 70 eV, para la identificación se compararon

los espectros de masas obtenidos para cada compuesto, con una base de datos (HP Chemstation-NIST 05 Mass Spectral search program, versión 2.0d), además de la comparación con un estándar externo (Saturated alkanes, C7-C30, No. de catálogo 49451-U, Sigma-Aldrich) analizado bajo las mismas condiciones, para utilizarlo en la cuantificación de los hidrocarburos totales.

4.2.3 Análisis molecular y filogenético de bacterias hidrocarbonoclastas

El análisis molecular y filogenético se realizó en 86 bacterias aisladas de los medios de cultivo con hidrocarburos y seleccionadas de la rizósfera de cuatro especies de mangle del estado de Campeche (ver capítulo III). Las etapas a las que se sometieron las cepas bacterianas fueron: extracción de ADN, amplificación del ribosoma 16S ADN_r y análisis filogenético de bacterias para su identificación.

La extracción de ADN se realizó con el método de CTAB 2% (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0; EDTA 2H₂O mM, CTAB 2%; NaCl 1.4 M). El extracto se colocó en tubos Eppendorf con el buffer precalentado a 60 °C. Se agregó una asada de cada bacteria crecida en agar nutritivo, se mezcló vigorosamente y se incubó a 60 °C por 1 h, mezclando con vortex cada 10 min. Posteriormente, a cada tubo se le agregó 500 µL de cloroformo–alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se mezcló por inversión durante 10 min a temperatura ambiente. Cada tubo se centrifugó a 10,000 x g por 10 min, para formar la fase acuosa y la fase orgánica. A partir de la fase acuosa se recuperaron aproximadamente 600 µL y se colocaron en un nuevo tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL.

Posteriormente, en cada tubo nuevo se colocaron 500 µL de isopropanol frío, se mezcló suavemente para favorecer la precipitación, y se incubó a -20 °C por toda la noche. A continuación se le agregó a cada tubo 500 µL de etanol al 70% para lavar la pastilla; se centrifugó a 10,000 x g por 10 min, se eliminó el sobrenadante y los tubos se secaron a

temperatura ambiente por 2 h. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 50 μ L de agua libre de nucleasas. La calidad y la concentración del ADN se verificaron mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, USA), los valores de las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} estuvieron en un rango de 1.8 a 2.0.

Para amplificar el fragmento ribosomal 16S ADN_r se usaron los iniciadores 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). La mezcla de reacción consistió en: buffer 5X, dNTP's 2.5 mM, iniciadores (8F-1492R) 10 pm, *go Taq* ADN polimerasa (5U), ADN 100 ng. La PCR se llevó a cabo en un termociclador C100 Touch (Bio-Rad, USA) con las siguientes condiciones de amplificación: una desnaturalización inicial de 95 °C por 2 min; seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 min, alineamiento a 59 °C por 30 s y la extensión a 72 °C por 2 min, y finalmente una extensión de un ciclo a 72 °C por 10 min.

El fragmento amplificado se verificó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed™ (Biotium, USA). El producto final de PCR se purificó con ExoSAP-IT (Affymetrix, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó en ambas direcciones con el Genetic Analyzer modelo 3130 (Applied Biosystem, USA).

Las secuencias correspondientes a la región 16S ADN_r, se ensamblaron y editaron con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit v7.0.9.1 (Hall, 1999) para la creación de las secuencias consenso de cada uno de los aislamientos. Con base en que Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) encuentra regiones de similitud local entre secuencias con alineamientos significantes, las secuencias consenso de cada aislamiento obtenido para la región 16S ADN_r se compararon con la opción BLAST_nucleotide 2.2.19 (Zhang et al.,

2000). Las secuencias de las bacterias se depositaron en la base de datos de GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Para el análisis de la evolución, todas las secuencias consenso fueron guardadas en un archivo (formato FASTA) para construir una alineación de secuencia de nucleótidos con el modo de perfil de ClustalW 1.8.1 (Thompson et al., 1994). La reconstrucción filogenética se realizó con secuencias parciales del 16S DNAr utilizando el método estadístico de máxima parsimonia (MP), incluido en el software MEGA 5.2 (Tamura et al., 2011). Para determinar los valores de confianza para los clados dentro del árbol resultante, se realizó un análisis con el método bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). Con el subconjunto de datos se realizó el intercambio cercano próximo (CNI) en árboles al azar, con la opción de búsqueda de MP (nivel = 1) y el árbol inicial por adición al azar (10 repeticiones), los datos faltantes y vacíos, fueron eliminados completamente. De la base de datos del GenBank-NCBI se descargó el número de acceso NR102878 de *Nanoarchaeum equitans*, y se incluyó como secuencia fuera del gráfico en cada árbol filogenético.

4.3. RESULTADOS

4.3.1 Selección cualitativa de bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo y diésel

4.3.1.1 Primer muestreo (Temporada de lluvias)

De un total 10 bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo seleccionadas en el primer muestreo, las cepas P₄ (MARW 23), P₅ (MARW 25), y P₉ (MARW 29), se caracterizaron por ser bacterias con buena capacidad de tolerar petróleo crudo, teniendo en común una turbidez promedio de 5 en la escala de Macfarland, lo que equivale a un promedio 1500×10^6 bacterias mL⁻¹. La cepa que destacó por ser una excelente bacteria tolerante de petróleo crudo fue la cepa P₇ (MARW 27) presentando una turbidez media de 6 y el mayor número de bacterias $\times 10^6$ mL⁻¹ (Tabla 4.1).

Las cepas que presentaron buena capacidad para tolerar diésel fueron: D₂, D₉, D₄ y D₇ con promedio de turbidez de 5.5 en la escala de Macfarland y, una media de 1650×10^6 bacterias mL⁻¹. La cepa D₅ (MARW 25) presentó excelente capacidad para tolerar diésel al mostrar la mayor turbidez promedio de 8 y el mayor número de bacterias $\times 10^6$ mL⁻¹ (Tabla 4.1).

Tanto las cepas tolerantes al petróleo como al diesel del primer muestreo (temporada de lluvias), presentaron diferencias con respecto a la turbidez de sus respectivos testigos (TP y TD), como se aprecia en la Tabla 4.1.

4.3.1.2 Segundo muestreo (Temporada de secas)

Las cepas hidrocarbonoclastas del petróleo e hidrocarbonoclastas de diésel aisladas del segundo muestreo representativo de la temporada de secas, también presentaron diferencias respecto a la turbidez de sus respectivos testigos (Tabla 4.2).

Las cepas del segundo muestreo P₁ (MARR1), P₃ (MARR3), P₈ (MARR82) y P₉ (MARB85) se caracterizaron por ser bacterias con regular capacidad para tolerar petróleo

crudo, presentando una turbidez de 3 (900 bacterias bacterias $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$). Las cepas P₂ (MARR62), P₄ (MARR49) y P₆ (MARBk51) destacaron por tener buena capacidad de tolerar petróleo crudo, presentando una turbidez promedio de 5 y el mayor número de bacterias $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ (Tabla 4.2).

Las cepas bacterianas que presentaron regular capacidad para tolerar diesel fueron: D₄ (MARR49), D₆ (MARBk51) y D₉ (MARB85) las cuales presentaron un promedio de turbidez de 4 (1200 bacterias $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$). La cepa D₂ (MARR62) y D₈ (MARR82) presentaron una buena capacidad para tolerar diesel y obtuvieron la mayor turbidez media de 6 y el mayor número de bacterias $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ (Tabla 4.2).

4.3.1.3 Selección final cualitativa de bacterias hidrocarbonoclastas

Las cepas tolerantes al petróleo P_{4F} (MARW23) y P_{8F} (MARR49) destacaron, por presentar una turbidez media de 6 y el mayor número de bacterias $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$. Sin embargo, la mejor cepa fue: P_{1F} (MARW 27), la cual presentó excelente capacidad de tolerar petróleo (Tabla 4.3).

En presencia de diesel, las cepas que presentaron buena capacidad para tolerar este contaminante fueron: D_{1F} (MARW27), D_{4F} (MARW23), D_{6F} (MARBk51) y D_{8F} (MARR49). La mejor cepa fue: D_{2F} (MARW 25), la cual presentó una excelente capacidad para tolerar diesel (Tabla 4.3).

Tabla 4.1. Selección cualitativa de bacterias hidrocarbonoclastas del primer muestreo (temporada de lluvias)

Etiqueta de frasco	Tipo de muestra	Escala Macfarland		
		Turbidez	Número de Bacterias x10 ⁶ mL ⁻¹	
T_P	1M	Testigo	1	300
		MM + Petróleo crudo		
P₂ =MARW22		Cepa 2	(+) 4	1200
		MM + Petróleo crudo		
P₄ =MARW23		Cepa 4	(++) 5	1500
		MM + Petróleo crudo		
P₅ =MARW25		Cepa 5	(++) 5	1500
		MM + Petróleo crudo		
P₇ =MARW27		Cepa 7	(+++) 6	1800
		MM + Petróleo crudo		
P₉ =MARW29		Cepa 9	(++) 5	1500
		MM + Petróleo crudo		
T_D	1M	Testigo	1	300
		MM + Diésel		
D₅ =MARW25		Cepa 5	(+++) 8	2400
		MM + Diésel		
D₇ =MARW27		Cepa 7	(++) 5	1500
		MM + Diésel		
D₉ =MARW29		Cepa 9	(++) 6	1800
		MM + Diésel		
To₅ =MARW25		Cepa 5	7	2100
		Sólo MM		
D₄ =MARW23		Cepa 4	(++) 5	1500
		MM + Diésel		
D₂ =MARW22		Cepa 2	(++) 6	1800
		MM + Diésel		

Nomenclatura:

Petróleo crudo (**P**), Diésel (**D**), Testigo-Petróleo (**T_P**), Testigo-Diésel (**T_D**), Testigo orgánico (**To**), Medio Mineral (**MM**), Muestreo No.1 en temporada de lluvias (1M), Volumen de muestra = 50 mL.

(+): Regular capacidad de la bacteria para tolerar y degradar P o D

(++): Buena capacidad de la bacteria para tolerar y degradar P o D

(+++): Excelente capacidad de la bacteria para tolerar y degradar P o D

Tabla 4.2. Selección cualitativa de bacterias hidrocarbonoclastas del segundo muestreo
(temporada de secas)

Etiqueta de frasco	Tipo de muestra	Escala Macfarland		
		Turbidez	Número de Bacterias $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$	
T_P	2M	Testigo	2	600
		MM + Petróleo		
P₁ =MARR1		Cepa 1	(+)	3
		MM + Petróleo		900
P₂ =MARR62		Cepa 2	(++)	5
		MM + Petróleo		1500
P₃ =MARR3		Cepa 3	(+)	3
		MM + Petróleo		900
P₄ =MARR49		Cepa 4	(++)	5
		MM + Petróleo		1500
P₆ =MARBk51		Cepa 6	(++)	5
		MM + Petróleo		1500
P₈ =MARR82		Cepa 8	(+)	3
		MM + Petróleo		900
P₉ =MARB85		Cepa 9	(+)	4
		MM + Petróleo		1200
T_D	2M	Testigo	2	600
		MM + Diésel		
D₂ =MARR62		Cepa 2	(++)	6
		MM + Diésel		1800
D₄ =MARR49		Cepa 4	(+)	4
		MM + Diésel		1200
D₆ =MARBk51		Cepa 6	(+)	4
		MM + Diésel		1200
D₈ =MARR82		Cepa 8	(++)	6
		MM + Diésel		1800
D₉ =MARB85		Cepa 9	(+)	5
		MM + Diésel		1500

Nomenclatura:

Petróleo crudo (**P**), Diésel (**D**), Testigo-Petróleo (**T_P**), Testigo-Diésel (**T_D**),

Medio Mineral (**MM**), Muestreo No.2 en temporada de secas (2M), Volumen de muestra = 50 mL.

(+): Regular capacidad de la bacteria para tolerar y degradar P o D

(++): Buena capacidad de la bacteria para degradar P o D

(+++): Excelente capacidad de la bacteria para degradar P o D

Tabla 4.3. Selección final cualitativa de bacterias hidrocarbonoclastas del primer (1M) y segundo muestreo (2M).

Etiqueta de frasco	Tipo de muestra	Escala Macfarland	
		Turbidez	Número de Bacterias x10 ⁶ mL ⁻¹
D _{1 F} =MARW27	Cepa 1 + MM + Diésel	(++) 6	1800
D _{2 F} =MARW25	Cepa 2 + MM + Diésel	(+++) 6	1800
D _{4 F} =MARW23	Cepa 4 + MM + Diésel	(++) 5	1500
D _{5 F} =MARR62	Cepa 5 + MM + Diésel	(+) 4	1200
D _{6 F} =MARBk 51	Cepa 6 + MM + Diésel	(++) 6	1800
D _{8 F} =MARR49	Cepa 8 + MM + Diésel	(++) 6	1800
D _{10 F} =MARR82	Cepa 10 +MM + Diésel	(+) 4	1200
P _{1 F} =MARW27	Cepa 1 + MM + Petróleo	(+++) 6	1800
P _{2 F} =MARW25	Cepa 2 + MM + Petróleo	(++) 5	1500
P ₄ =MARW23	Cepa 4 + MM + Petróleo	(++) 6	1800
P _{5 F} =MARR62	Cepa 5 + MM + Petróleo	(++) 5	1500
P _{6 F} =MARBK51	Cepa 6 + MM + Petróleo	(++) 5	1500
P _{8 F} =MARR49	Cepa 8 + MM + Petróleo	(++) 6	1800
P _{10 F} =MARR82	Cepa 10 +MM + Petróleo	(++) 5	1500

Nomenclatura:

Petróleo crudo (**P**), Diésel (**D**), Medio Mineral (**MM**).

Volumen de muestra = 50 mL.

(+): Regular capacidad de la bacteria para tolerar y degradar P o D

(++): Buena capacidad de la bacteria para tolerar y degradar P o D

(+++): Excelente capacidad de la bacteria para tolerar y degradar P o D

Las 10 bacterias hidrocarbonoclastas seleccionadas cualitativamente, se indican en la Tabla 4.4. Dichas bacterias, se seleccionaron después de realizar las pruebas de tolerancia del primero y segundo muestreo, así como la selección final, con petróleo crudo ligero y diésel, respectivamente.

En la Tabla 4.4, se puede observar que la cepa bacteriana que presenta excelente capacidad de tolerancia al petróleo es la cepa MARW 27, la cual, tiene su origen de la rizósfera de mangle blanco y, es una bacteria hidrocarbonoclasta asimiladora de nitrógeno

(NA-HB). Por otra parte, la cepa bacteriana que presenta una excelente tolerancia al diésel es la cepa MARW 25, también con origen rizosférico de mangle blanco y bacteria hidrocarbonoclasta asimiladora de nitrógeno (NA-HB). También se observa que el 50% de cepas tolerantes a petróleo y diésel proceden de la rizósfera de mangle blanco, el 30% tiene su origen en mangle rojo (Hidrocarbonoclasta Fijadoras y Asimiladoras de Nitrógeno), y el 10% tienen su origen de la rizósfera de mangle negro (Hidrocarbonoclasta Fijadora de Nitrógeno; NF-HB) y de mangle botoncillo (Asimiladora de Nitrógeno; NA-HB), respectivamente.

Tabla 4.4. Bacterias hidrocarbonoclastas seleccionadas cualitativamente en prueba final de tolerancia a petróleo y diésel.

Clave de la cepa	Origen de la cepa	Capacidad de tolerancia		Grupo funcional
		Petróleo	Diésel	Bacterias Hidrocarbonoclastas (HB)
MARW 27	Mangle Blanco	Excelente	Buena	Asimiladoras de Nitrógeno (NA-HB)
MARW 25	Mangle Blanco	Buena	Excelente	Asimiladoras de Nitrógeno (NA-HB)
MARW 29	Mangle Blanco	Regular	Regular	Asimiladoras de Nitrógeno (NA-HB)
MARW 23	Mangle Blanco	Buena	Buena	Asimiladoras de Nitrógeno (NA-HB)
MARR 62	Mangle Rojo	Buena	Regular	Fijadoras de Nitrógeno (NF-HB)
MARBk 51	Mangle Negro	Buena	Buena	Fijadoras de Nitrógeno (NF-HB)
MARW 22	Mangle Blanco	Regular	Buena	Fijadoras de Nitrógeno (NF-HB)
MARR 49	Mangle Rojo	Buena	Buena	Fijadoras de Nitrógeno (NF-HB)
MARB 85	Mangle Botoncillo	Regular	Buena	Asimiladoras de Nitrógeno (NA-HB)
MARR 82	Mangle Rojo	Regular	Buena	Asimiladoras de Nitrógeno (NA-HB)

4.3.2 Selección cuantitativa de bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo y diésel

4.3.2.1 Primer muestreo (Temporada de lluvias)

Las bacterias hidrocarbonoclastas de petróleo y diesel ya seleccionadas en las pruebas anteriores de tolerancia, se sometieron a un proceso de extracción con diclorometano (Carmo et al., 2011) y posteriormente, sus extractos puros, se cuantificaron por medio de cromatografía de gases acoplado de masas (GC-MS).

Los resultados de la cuantificación de las bacterias hidrocarbonoclastas, evaluadas por GC-MS, se expresaron gráficamente por medio de cromatogramas, en los cuales, se representa la abundancia de picos de concentración de hidrocarburos totales del petróleo y diésel respectivamente, con respecto al tiempo de retención.

En la Figura 4.1, se presentan los cromatogramas correspondientes a la abundancia de hidrocarburos totales del petróleo crudo ($5000 \mu\text{L mL}^{-1}$) del primer muestreo (1M), observando que las cepas P₂ (MARW22), P₄ (MARW23), P₅ (MARW25), P₇ (MARW27) y P₉ (MARW29) con respecto al testigo de petróleo (T_P), presentan una reducción importante con respecto al área bajo la curva y respecto a la degradación de hidrocarburos del petróleo crudo. En orden jerárquico la capacidad de degradación de hidrocarburos del petróleo de cada cepa con respecto al T_P es la siguiente: P₇ (*Pseudomonas* sp.) > P₉ (*Pseudomonas fluorescens*) > P₄ (*Stenotrophomonas nitritireducens*) > P₅ (*Rhodococcus erythropolis*) > P₂ (*Stenotrophomonas* sp.) > T_P.

De las cinco cepas hidrocarbonoclastas del petróleo, la cepa P₇ (MARW 27) identificada filogenéticamente como *Pseudomonas* sp., presentó el mayor porcentaje de degradación (92%) de hidrocarburos de petróleo crudo ligero, y por lo tanto, la menor abundancia de picos totales e individuales, lo cual se confirma y observa en la Figura 4.2.

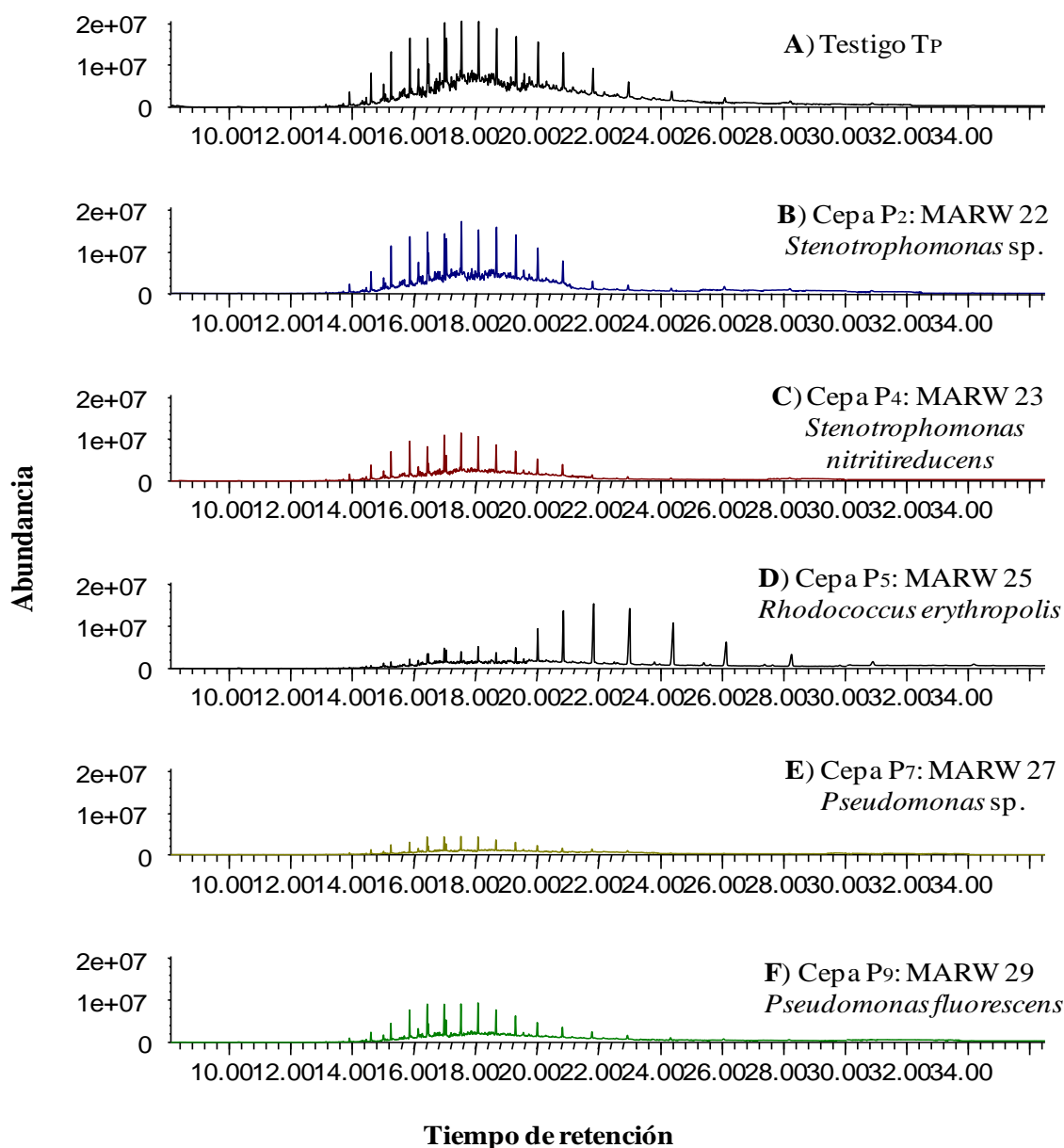


Figura 4.1. Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos de hidrocarburos totales de petróleo crudo ($5000 \mu\text{L mL}^{-1}$) después de 21 días de incubación. **A)** Testigo-Petróleo y **B-F)** cepas hidrocarbonoclastas de petróleo del primer muestreo 1M, aisladas de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.

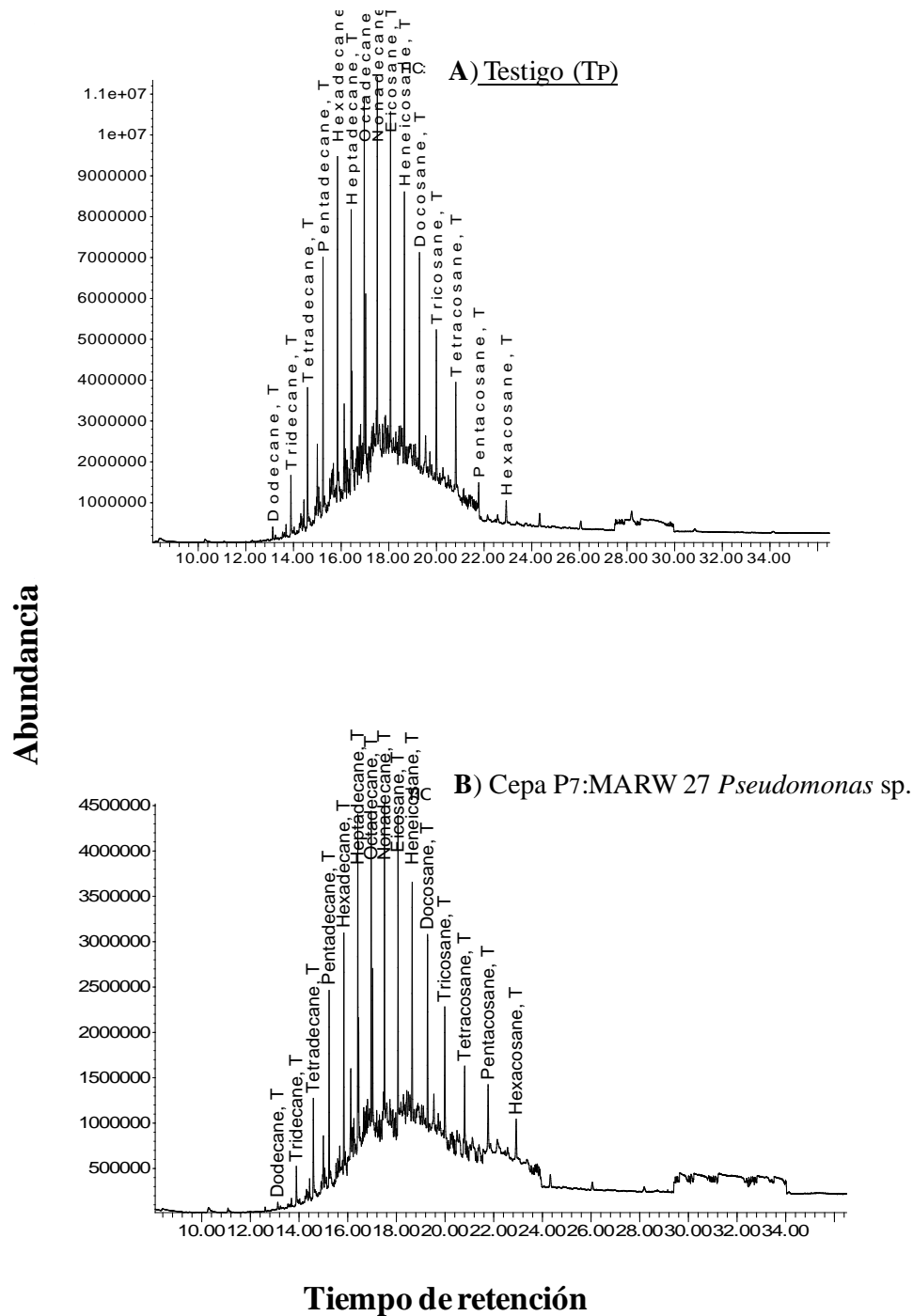


Figura 4.2. Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos individuales de hidrocarburos totales de petróleo ($5,000 \mu\text{L mL}^{-1}$), después de 21 días de incubación. **A)** Testigo-Petróleo, y **B)** mejor cepa hidrocarbonoclasta de petróleo del primer muestreo 1M, aislada de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.

En la Figura 4.3, se presentan los cromatogramas correspondientes a la abundancia de hidrocarburos totales de diésel ($20,000 \mu\text{L mL}^{-1}$) del primer muestreo (1M), observando que las cepas D₄ (MARW23), D₇ (MARW27), D₅ (MARW25), D₂ (MARW22) y D₉ (MARW29) con respecto al testigo T_D, presentan una reducción importante con respecto al área bajo la curva y respecto a la degradación de hidrocarburos del diésel. De las 5 cepas hidrocarbonoclastas de diésel, la cepa D₅ (MARW 25) identificada filogenéticamente como *Rhodococcus erythropolis*, presenta el mayor porcentaje de degradación (98.6%) de hidrocarburos de diésel, y por lo tanto, la menor abundancia de picos totales e individuales, lo cual se confirma en la Figura 4.4.

En la Figura 4.5, se presentan los cromatogramas correspondientes a la abundancia de hidrocarburos totales del petróleo crudo ($5,000 \mu\text{L mL}^{-1}$) del segundo muestreo (2M). En orden jerárquico la capacidad de degradación de hidrocarburos del petróleo de cada cepa con respecto al testigo (T_P) es la siguiente: P₄ (*Serratia marcescens*) > P₆ (*Providencia* sp.) > P₂ (*Acinetobacter* sp.) > P₉ (*Enterobacter* sp.) > T_P. De las 4 cepas hidrocarbonoclastas del petróleo, la cepa P₄ (MARR 49) identificada filogenéticamente como *Serratia marcescens*, presenta el mayor porcentaje de degradación (75%) de hidrocarburos de petróleo crudo ligero, y por lo tanto, la menor abundancia de picos totales e individuales (ver Figura 4.6).

En la Figura 4.7, se presentan los cromatogramas correspondientes a la abundancia de hidrocarburos totales de diésel ($20,000 \mu\text{L mL}^{-1}$) del segundo muestreo (2M), observando que las cepas D₈ (MARR82) y D₂ (MARR62) con respecto al testigo de diesel (T_D), presentan una reducción importante con respecto al área bajo la curva y respecto a la degradación de hidrocarburos del diésel. La cepa D₈ (MARR82) identificada filogenéticamente como *Microbacterium nematophilum*, presenta el mayor porcentaje de

degradación (59%) de hidrocarburos de diesel, y por lo tanto, la menor abundancia de picos totales e individuales (ver Figura 4.8).

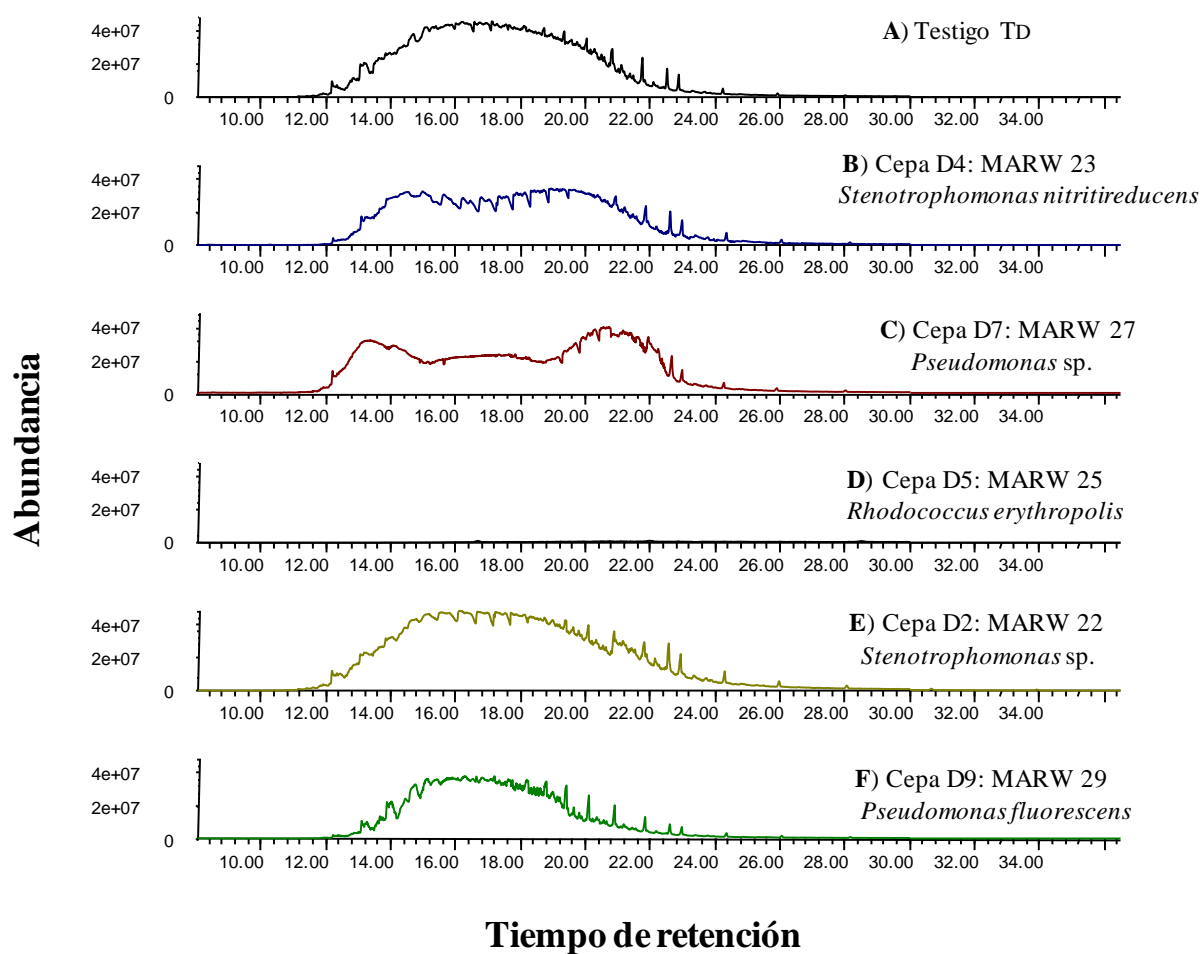


Figura 4.3. Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos de hidrocarburos totales de diésel ($20,000 \mu\text{L mL}^{-1}$) después de 21 días de incubación. **A)** Testigo-Diésel, y **B-F)** cepas hidrocarbonoclastas de diésel del primer muestreo 1M, aisladas de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.

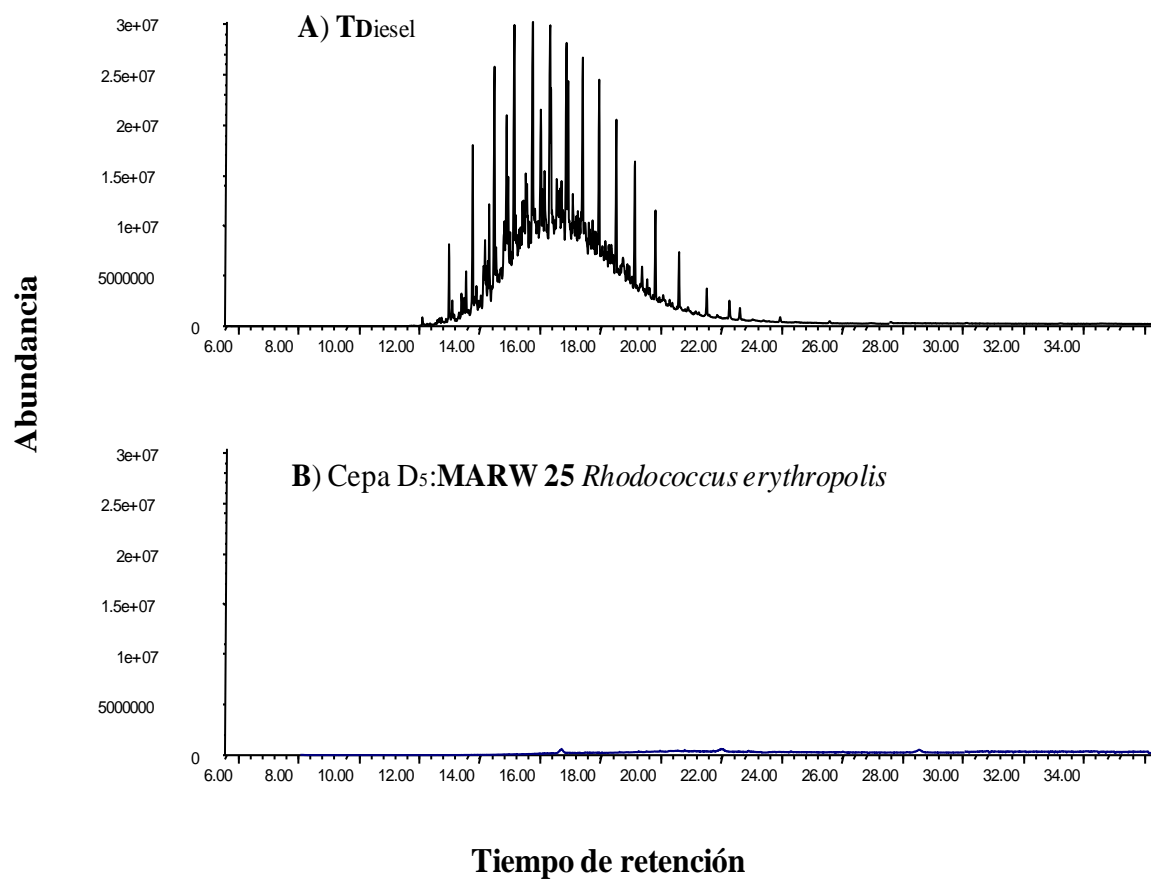


Figura 4.4. Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos de hidrocarburos totales de diésel ($20,000 \mu\text{L mL}^{-1}$) después de 21 días de incubación. **A)** Testigo-Diésel, y **B)** mejor cepa hidrocarbonoclasta de diésel del primer muestreo 1M, aislada de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.

4.3.2.2 Segundo muestreo (Temporada de secas)

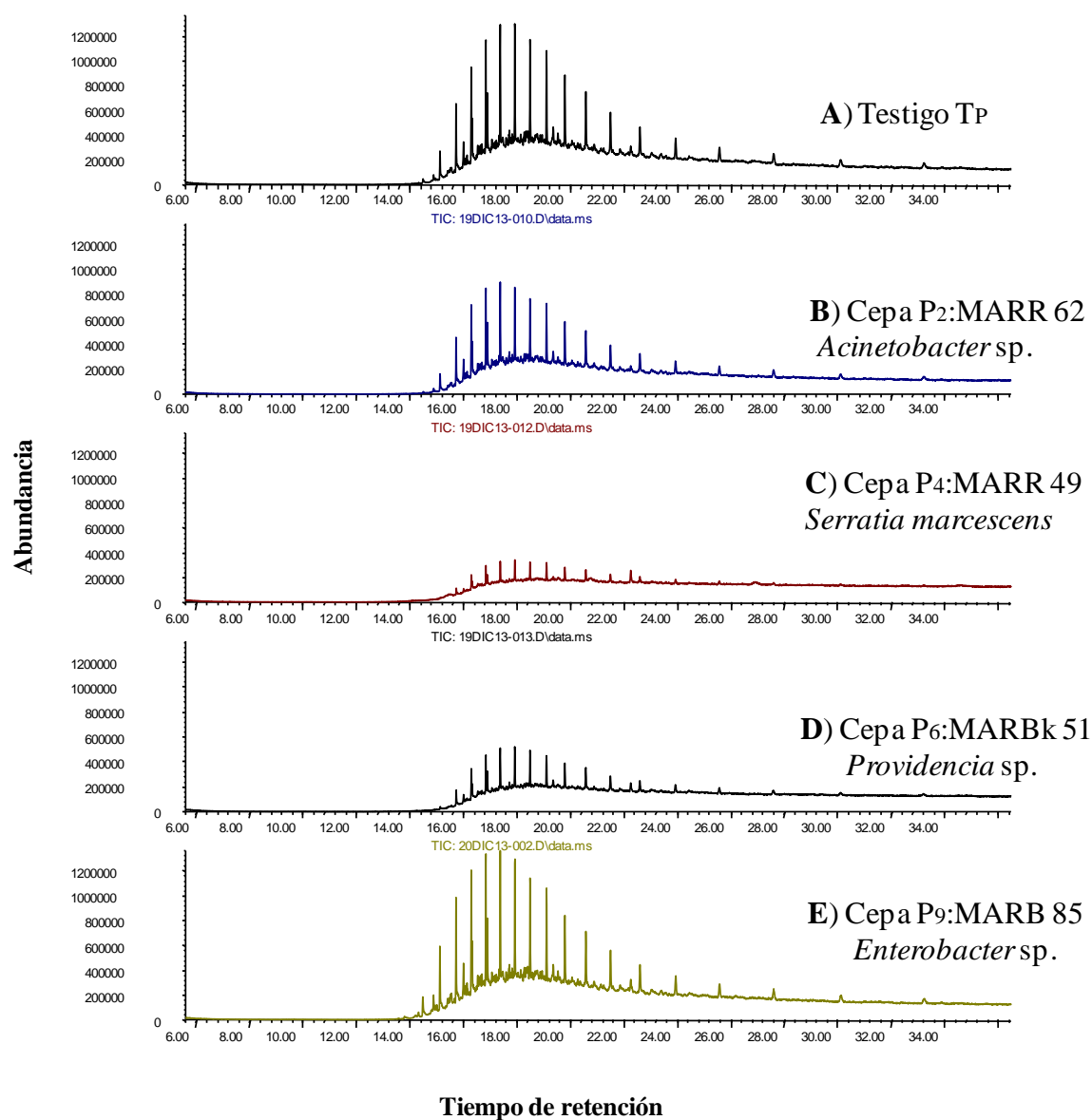


Figura 4.5. Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos de Hidrocarburos Totales de Petróleo crudo ($5000 \mu\text{L mL}^{-1}$) después de 21 días de incubación. **A)** Testigo-Petróleo, y **B-E)** cepas hidrocarbonoclastas de petróleo del segundo muestreo 2M, aisladas de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.

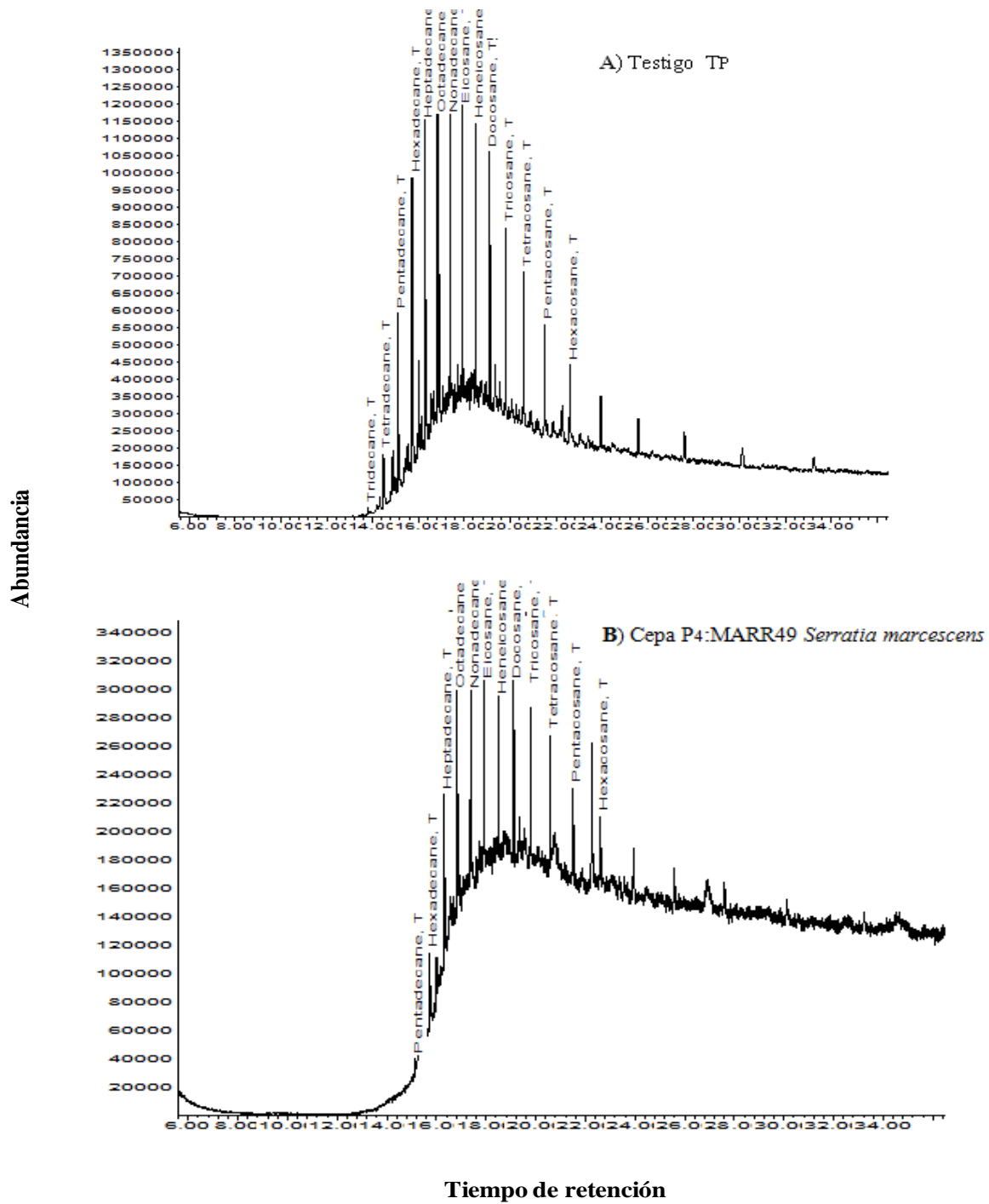


Figura 4.6. Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos individuales de hidrocarburos totales de petróleo ($5,000 \mu\text{L mL}^{-1}$), después de 21 días de incubación. **A)** Testigo-Petróleo, y **B)** mejor cepa hidrocarbonoclasta de petróleo del segundo muestreo 2M, aislada de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.

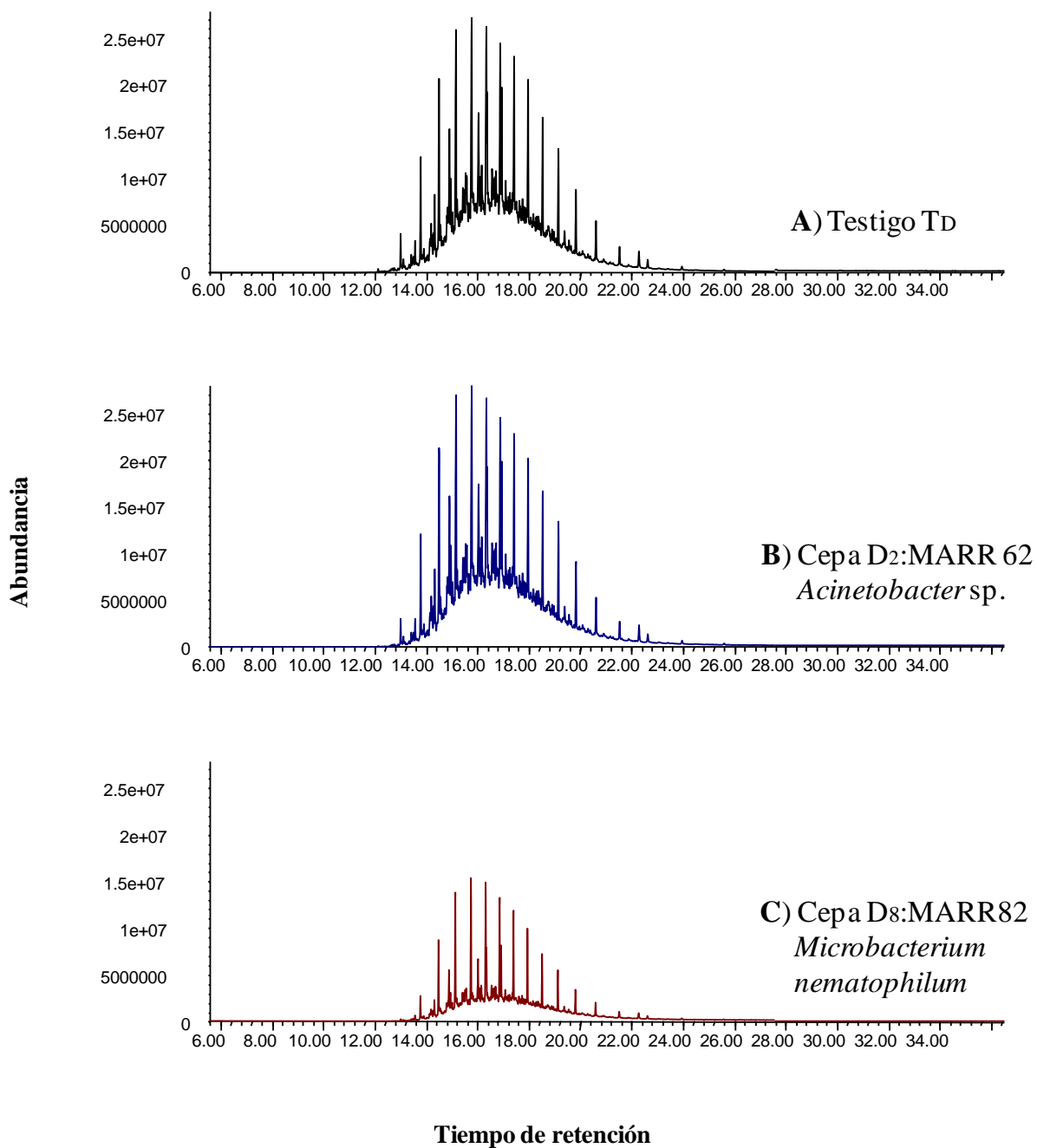


Figura 4.7. Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos de hidrocarburos totales de diésel ($20,000 \mu\text{L mL}^{-1}$). **A)** Testigo-Diésel, y **B-C)** cepas hidrocarbonoclastas de diesel del segundo muestreo 2M, aisladas de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.

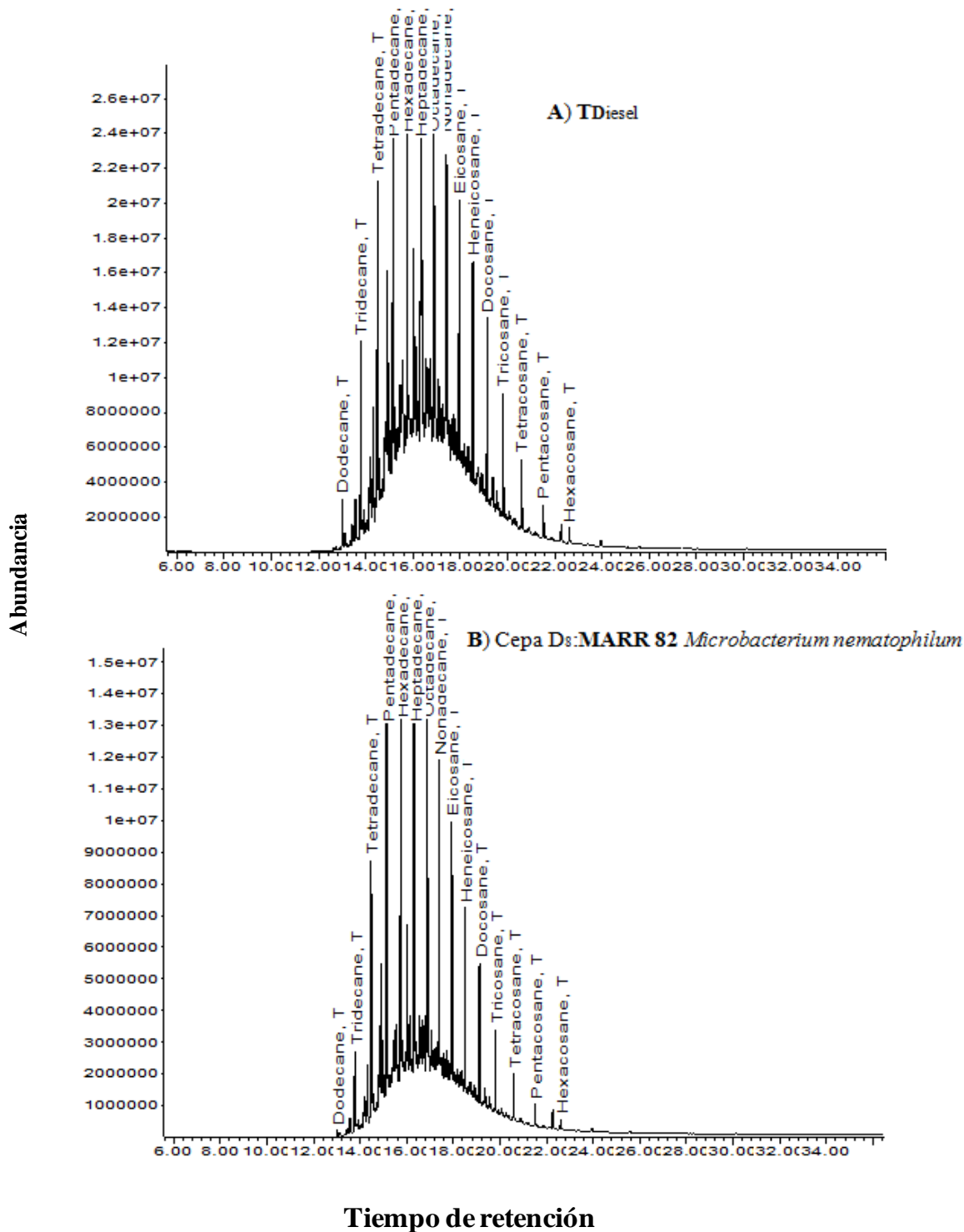


Figura 4.8. Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos individuales de hidrocarburos totales de diésel ($20,000 \mu\text{L mL}^{-1}$), después de 21 días de incubación. **A)** Testigo-Diésel, y **B)** mejor cepa hidrocarbonoclastas de diésel del segundo muestreo 2M, aisladas de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.

4.2.2.3 Selección final cuantitativa de bacterias hidrocarbonoclastas

En la Figura 4.9, se presentan los cromatogramas correspondientes a la abundancia de hidrocarburos totales del petróleo crudo ($5,000 \mu\text{L mL}^{-1}$) en la selección final. En orden jerárquico la capacidad de degradación de hidrocarburos del petróleo de cada cepa con respecto al T_{PF} es la siguiente: P_{1F} (*Pseudomonas* sp.) > P_{4F} (*Stenotrophomonas nitritireducens*) > P_{5F} (*Acinetobacter* sp.) > P_{2F} (*Rhodococcus erythropolis*) > P_{6F} (*Providencia* sp.) > T_{PF} . De las 5 cepas hidrocarbonoclastas del petróleo, la cepa P_{1F} (MARW 27) identificada filogenéticamente como *Pseudomonas* sp., presenta el mayor porcentaje de degradación (92%) de hidrocarburos de petróleo crudo ligero, y por lo tanto, la menor abundancia de picos totales.

En la Figura 4.10, se presentan los cromatogramas correspondientes a la abundancia de hidrocarburos totales de diésel ($20,000 \mu\text{L mL}^{-1}$) en la selección final. En orden jerárquico la capacidad de degradación de hidrocarburos de diésel de cada cepa con respecto al T_{DF} es la siguiente: D_{2F} (*Rhodococcus erythropolis*) > D_{1F} (*Pseudomonas* sp.) > D_{5F} (*Serratia marcescens*) > T_{DF} . De las tres cepas hidrocarbonoclastas de diésel, la cepa D_{2F} (MARW 25) identificada filogenéticamente como *Rhodococcus erythropolis*, presenta el mayor porcentaje de degradación (94%) de hidrocarburos de diésel, y por lo tanto, la menor abundancia de picos totales.

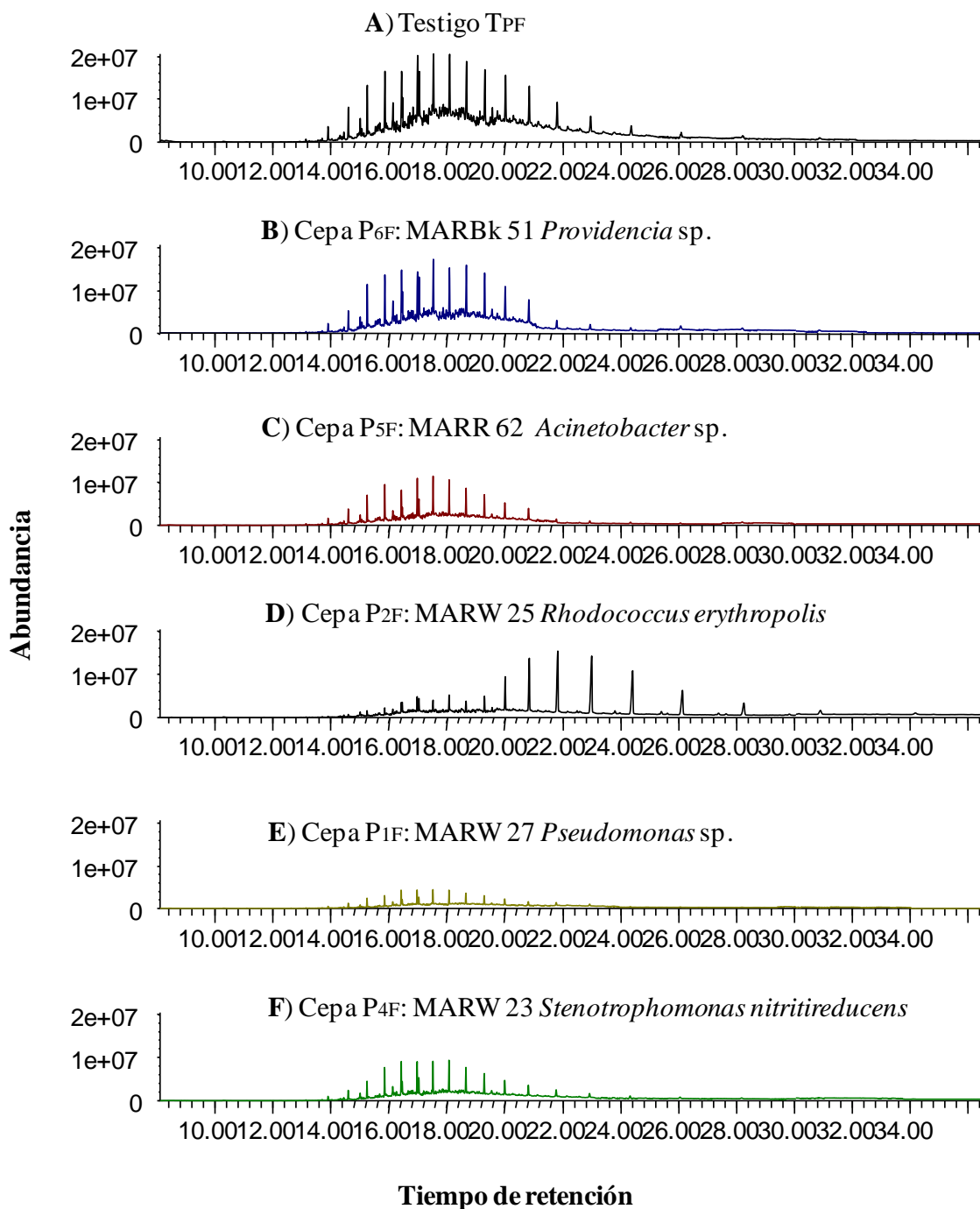


Figura 4.9. Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos de hidrocarburos totales de petróleo crudo ($5000 \mu\text{L mL}^{-1}$) después de 21 días de incubación. **A)** Testigo-Petróleo, y **B-F)** mejores cepas hidrocarbonoclastas de petróleo en selección final, aisladas de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.

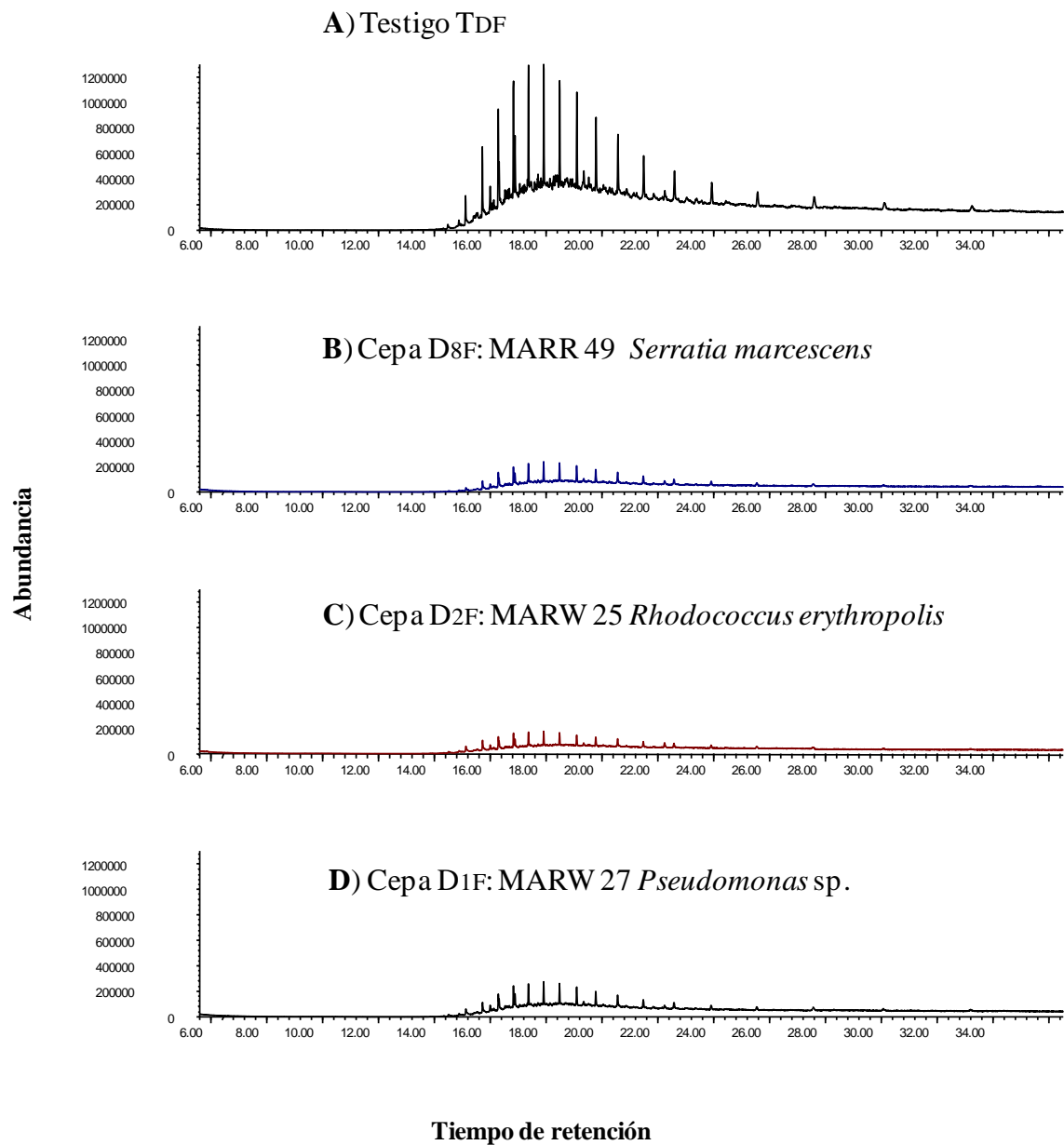
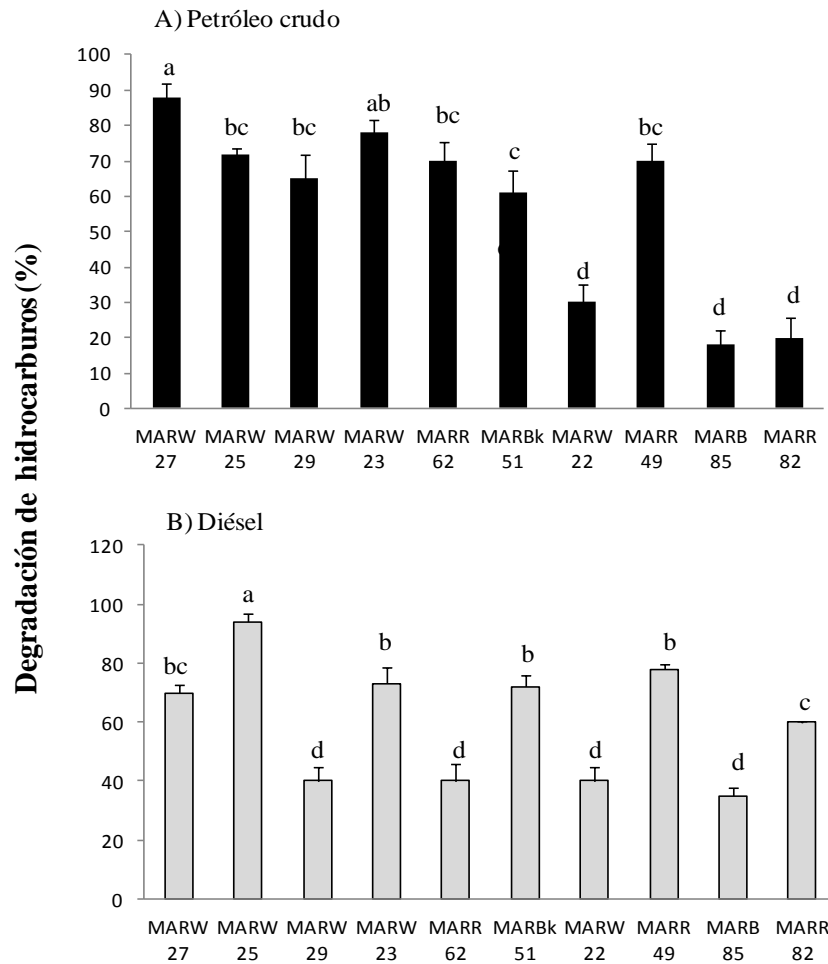


Figura 4.10. Cromatogramas de GC-MS que muestran la abundancia de picos de hidrocarburos totales de diésel ($20,000 \mu\text{L mL}^{-1}$) después de 21 días de incubación. **A)** Testigo-Diésel, y **B-D)** mejores cepas hidrocarbonoclastas de diésel en selección final, aisladas de la rizósfera del manglar del estado de Campeche.

Los porcentajes de degradación promedio de las bacterias hidrocarbonoclastas de petróleo y diésel cuantificados por GC-MS, se indican en la Tabla 4.5. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los promedios de las mejores de cepas degradadoras de petróleo crudo y diésel, respectivamente (Figura 4.11A y 4.11B). La rizósfera de mangle blanco mostró los mayores porcentajes promedio de degradación de bacterias hidrocarbonoclastas seleccionadas en comparación con las especies de mangle restantes. La mejor bacteria hidrocarbonoclasta de petróleo crudo fue la cepa MARW27, *Pseudomonas* sp., y la mejor bacteria hidrocarbonoclasta de diésel fue la cepa MARW25, *Rhodococcus erythropolis* (Tabla 4.5; Figura 4.11).

Tabla 4.5. Porcentaje de degradación promedio de bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo y diésel cuantificadas por GC-MS.

Clave de cepa	Nombre de la cepa	Origen de la cepa	Degradación %	
			Petróleo	Diésel
MARW 27	<i>Pseudomonas</i> sp.	Mangle Blanco	88±4.00	70±2.89
MARW 25	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Mangle Blanco	72±1.53	94±2.89
MARW 29	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Mangle Blanco	65±7.00	40±5.00
MARW 23	<i>Stenotrophomonas nitritireducens</i>	Mangle Blanco	78±3.61	73±5.86
MARR 62	<i>Acinetobacter</i> sp.	Mangle Rojo	70±5.29	40±5.77
MARBk 51	<i>Providencia</i> sp.	Mangle Negro	61±6.35	72±4.04
MARW 22	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Mangle Blanco	30±5.00	40±5.00
MARR 49	<i>Serratia marcescens</i>	Mangle Rojo	70±5.00	78±1.73
MARB 85	<i>Enterobacter</i> sp.	Mangle Botoncillo	18±4.04	35±2.89
MARR 82	<i>Microbacterium nematophilum</i>	Mangle Rojo	20±5.77	60±0.58



Bacterias hidrocarbonoclastas

Figura 4.11. Porcentaje de degradación de hidrocarburos. A) Petróleo crudo ($5,000 \mu\text{L L}^{-1}$) y B) Diésel ($20,000 \mu\text{L L}^{-1}$) en medio mineral obtenido por 10 bacterias hidrocarbonoclastas aisladas y seleccionadas de la rizósfera de cuatro especies de mangle del estado de Campeche, después de 21 días de incubación. (LSD Fisher, $\alpha = 0.05$). $n = 3$. Barras con diferentes letras en cada gráfico, indican diferencias significativas. Abreviaturas: MARR, Mangle Rojo; MARW, Mangle Blanco; MARBk, Mangle Negro, MARB; Mangle Botoncillo.

4.3.3 Filogenia de bacterias hidrocarbonoclastas aisladas de la rizósfera de cuatro especies de mangle del estado de Campeche, México.

La relación de bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo y diésel secuenciadas e identificadas se presenta en la Tabla 4.6. De ellas, sólo el 56% fueron identificadas filogenéticamente. Los resultados obtenidos de la identificación filogenética de bacterias hidrocarbonoclastas aisladas de la rizósfera de mangle rojo, blanco, negro y botoncillo, se presentan en las Figuras 4.12, 4.13, 4.14 y 4.15, respectivamente.

En la rizósfera de mangle rojo (*Rhizophora mangle*) se obtuvieron los siguientes porcentajes de abundancia y especies de bacterias hidrocarbonoclastas: 36.4% de *Pseudomonas* (*P. fragi*, *P. fluorescens*, *P. gesardii* y *Pseudomonas* sp.), 18.2% de *Bacillus* (*Bacillus* sp. y *B. thuringiensis*), 18.2% de *Delftia tsuruhatensis*, 9.9% de *Acinetobacter* sp. y *Alcaligenes faecalis*, respectivamente (Figura 4.12).

En la rizósfera de mangle blanco (*Laguncularia racemosa*) se obtuvieron los siguientes porcentajes de abundancia y especies de bacterias hidrocarbonoclastas: 45.5% de *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. putida* y *Pseudomonas* sp.), 27.3% de *Stenotrophomonas* (*S. nitritireducens*, *maltophilia* y *Stenotrophomonas* sp.), 18.2% de *Bacillus* (*Bacillus* sp. y *B. cereus*), y 9.9% de *Rhodococcus erythropolis* (Figura 4.13).

En la rizósfera de mangle negro (*Avicennia germinans*) se obtuvieron los siguientes porcentajes de abundancia y especies de bacterias hidrocarbonoclastas: 27.3% de *Pseudomonas* (*P. rhodesiae*, *P. fragi* y *Pseudomonas* sp.), 27.3 % de *Bacillus* (*B. cereus*, *B. thuringiensis* y *Bacillus* sp.), y 9.9% de *Acinetobacter guillouiae*, *Providencia* sp., *Proteus penneri*, *Microbacterium ketosireducens* y *Staphylococcus saprophyticus*, respectivamente (Figura 4.14).

En la rizósfera de mangle botoncillo (*Conacarpus erectus*) se obtuvieron los siguientes porcentajes de abundancia y especies de bacterias hidrocarbonoclastas: 27.3% de *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. putida* y *Pseudomonas* sp.), y 9.9% de *Serratia* sp., *Enterobacter* sp., *Acinetobacter* sp., *Acidovorax* sp., *Xanthomonas* sp., *Brevundimonas bullata*, *Paenibacillus pabuli* y *Bacillus cereus*, respectivamente (Figura 4.15).

Tabla 4.6 Relación de bacterias hidrocarbonoclastas enviadas para realizar su extracción, secuenciación e identificación por biología molecular

MARR 1	MARW 16	MARBk 32	MARR 49	<u>MARBk 66</u>
MARR 2	MARW 16.5	MARBk 33	MARB 50	<u>MARBk 67</u>
MARR 3	MARW 17	MARBk 34	MARBk 51	MARBk 68
MARR 4	MARW 18	MARBk 35	MARB 52	<u>MARB 69</u>
MARR 5	MARW 19	MARBk 36	MARR 53	<u>MARB 70</u>
MARR 6	MARW 20	MARBk 37	MARW 54	MARW 73
MARR 7	MARW 21	MARBk 38	<u>MARR 55</u>	MARBk 74
MARR 8	MARW 22	MARB 39	<u>MARR 56</u>	MARBk 75
MARR 9	MARW 23	MARB 40	MARR 57	MARBk 76
MARR 10	MARW 24	MARB 41	MARR 58	MARB 78
MARR 10.1	MARW 25	MARB 42	MARR 59	<u>MARR 80</u>
MARR 10.2	MARW 26	MARB 43	MARR 60	<u>MARR 81</u>
MARR 11	MARW 27	MARB 44	MARR 61	<u>MARR 82</u>
MARR 12	MARW 28	MARB 45	MARR 62	<u>MARR 83</u>
MARR 13	MARW 29	MARR 46	MARB 63	<u>MARBk 84</u>
MARR 14	MARW 30	MARR 47	MARB 64	<u>MARB 85</u>
MARR 15	MARW 31	MARR 48	<u>MARW 65</u>	<u>MARB 86</u>

NOMENCLATURA DE LA RIZÓSFERA DE MANGLE POR ESPECIE:

- **SUELO DE MANGLE ROJO (MARR)**
- SUELO DE MANGLE BLANCO (MARW)
- **SUELO DE MANGLE NEGRO (MARBk)**
- **SUELO DE MANGLE BOTONCILLO (MARB)**

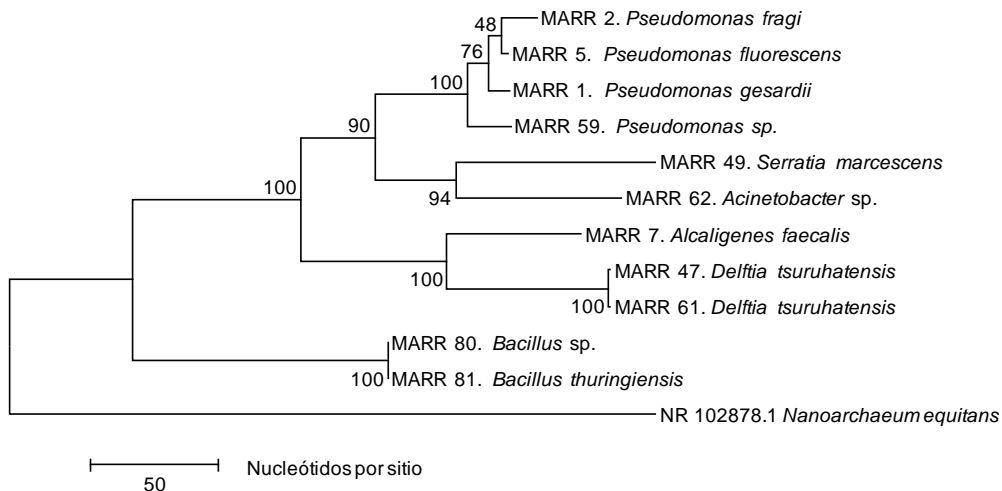


Figura 4.12 Árbol filogenético de bacterias hidrocarbonoclastas identificadas en la rizósfera de mangle rojo del estado de Campeche. El número de acceso NR 102878 de *Nanoarchaeum equitans*, fue asignado como grupo externo. El árbol filogenético se realizó por el método de máxima parsimonia con un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones. La barra indica 50 sustituciones por sitio.

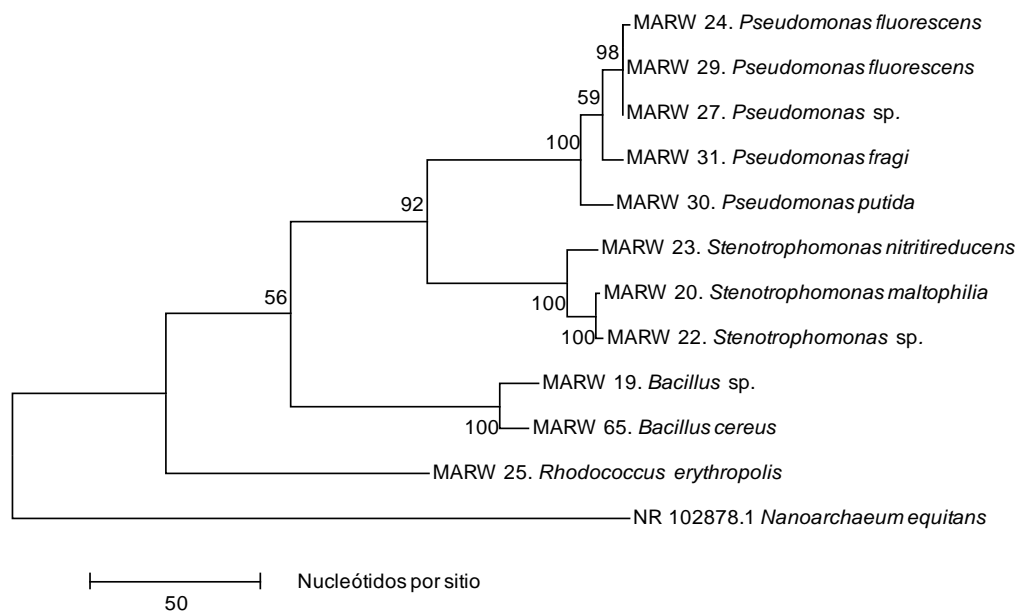


Figura 4.13 Árbol filogenético de bacterias hidrocarbonoclastas identificadas en la rizósfera de mangle blanco del estado de Campeche. El número de acceso NR 102878 de *Nanoarchaeum equitans*, fue asignado como grupo externo. El árbol filogenético se realizó por el método de máxima parsimonia con un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones. La barra indica 50 sustituciones por sitio.

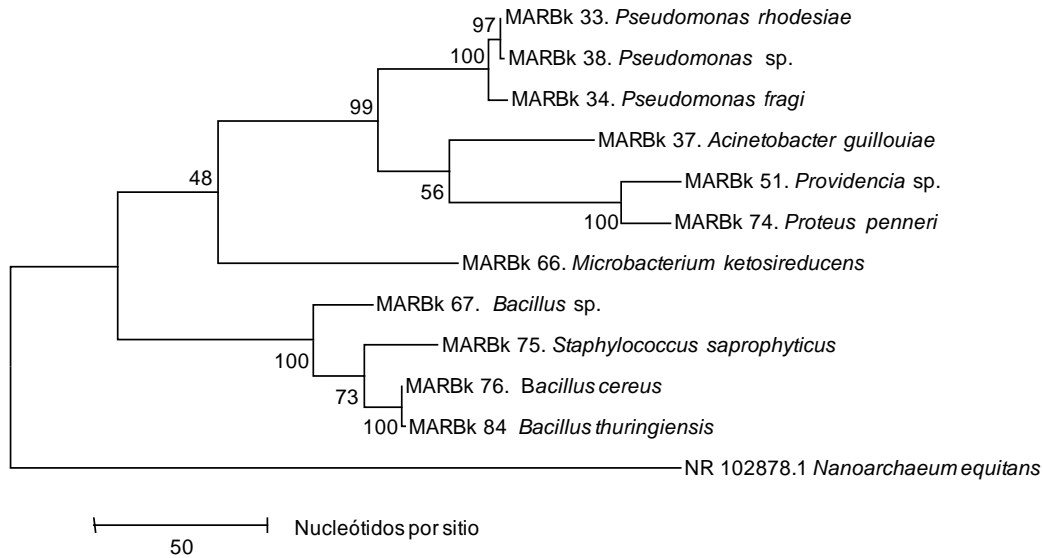


Figura 4.14 Árbol filogenético de bacterias hidrocarbonoclastas identificadas en la rizósfera de mangle negro del estado de Campeche. El número de acceso NR 102878 de *Nanoarchaeum equitans*, fue asignado como grupo externo. El árbol filogenético se realizó por el método de máxima parsimonia con un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones. La barra indica 50 sustituciones por sitio.

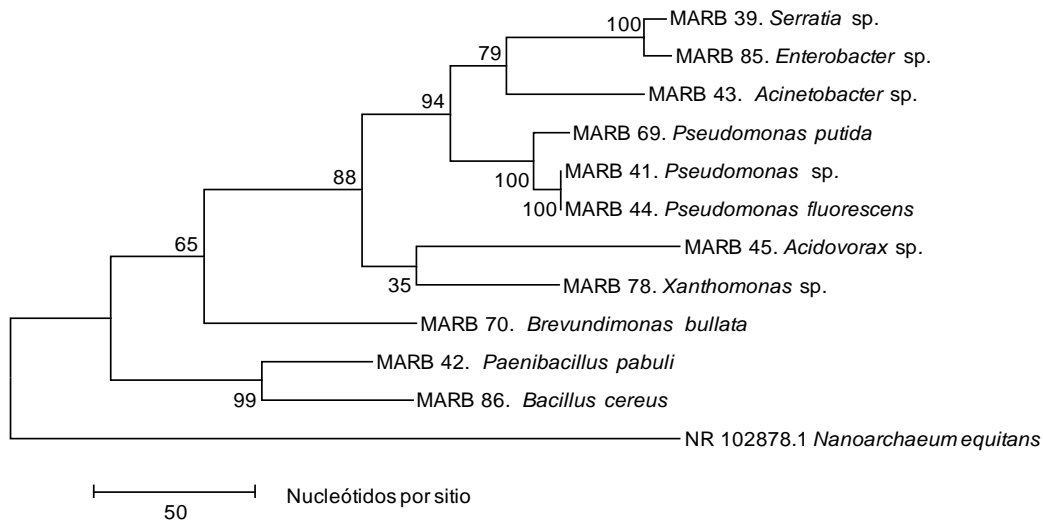


Figura 4.15. Árbol filogenético de bacterias hidrocarbonoclastas identificadas en la rizósfera de mangle botoncillo del estado de Campeche. El número de acceso NR 102878 de *Nanoarchaeum equitans*, fue asignado como grupo externo. El árbol filogenético se realizó por el método de máxima parsimonia con un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones. La barra indica 50 sustituciones por sitio.

4.3.4 Análisis filogenético considerando las cuatro especies de mangle del estado de Campeche

En la rizósfera de las cuatro especies de mangle predominantes en el estado de Campeche, se obtuvieron los siguientes porcentajes de abundancia y especies de bacterias hidrocarbonoclastas: 15 bacterias hidrocarbonoclastas (HB) representaron el 31.25% de *Pseudomonas* (*P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. gessardii*, *P. putida*, *P. rhodesiae* y *Pseudomonas* sp.), 10 HB representaron el 20.83% de *Bacillus* (*B. cereus*, *B. thuringiensis* y *Bacillus* sp.), 5 HB representaron el 10.42% de *Stenotrophomonas* (*S. nitritireducens*, *S. maltophilia* y *Stenotrophomonas* sp.), 3 HB representaron el 6.25% de *Acinetobacter* (*A. guillouiae* y *Acinetobacter* sp.), 2 HB representaron el 4.16% de *Serratia* (*S. marcescens* y *Serratia* sp.), 2 HB representaron el 4.16% de *Microbacterium* (*M. nematophilum* y *M. ketosireducens*), y 11 HB representaron el 22.92% de otras especies individuales de bacterias tales como: *Enterobacter* sp., *Providencia* sp., *Proteus penneri*, *Xanthomonas* sp., *Alcaligenes faecalis*, *Acidovorax* sp., *Delftia tsuruhatensis*, *Rhodococcus erythropolis*, *Brevundimonas bullata*, *Paenibacillus pabuli* y *Staphylococcus saprophyticus*. Por lo anterior, el árbol filogenético de la rizósfera de las cuatro especies de mangle del estado de Campeche quedó conformado por tres phyla: 1) Proteobacteria, 2) Firmicutes y 3) Actinobacteria (Figura 4.16). El registro de las cepas hidrocarbonoclastas en GenBank, se indican en el Anexo I.

En el phylum Proteobacteria, representado por bacterias Gram negativas, se alojaron clados grandes del género *Pseudomonas*, clados menores de los géneros *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* y *Serratia*, y clados individuales de los géneros: *Enterobacter*, *Providencia*, *Proteus*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Acidovorax*, *Delftia* y *Brevundimonas*. El phylum Firmicutes representado por bacterias Gram positivas, presentó

un clado grande correspondiente al género *Bacillus*, y dos clados individuales de los géneros *Paenibacillus* y *Staphylococcus*, respectivamente. El phylum Actinobacteria, conformado por actinobacterias Gram positivas, presentó clados menores e individuales de los géneros *Microbacterium* y *Rhodococcus*, respectivamente.

4.4 DISCUSIÓN

De 86 bacterias hidrocarbonoclastas identificadas filogenéticamente de la rizósfera de cuatro especies de manglar (rojo, blanco, negro y botoncillo) del estado de Campeche, se seleccionaron las 10 mejores bacterias hidrocarbonoclastas, de acuerdo a su capacidad para tolerar, modificar o degradar hidrocarburos del petróleo y diésel (Alexander, 1994).

Brito et al. (2006) caracterizaron comunidades de bacterias hidrocarbonoclastas de sedimento de manglar de la Bahía de Guanabara, Brazil, identificando grupos de *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Dietzia* y *Gordonia* (Santos et al., 2011). En nuestro estudio, las cepas hidrocarbonoclastas que se seleccionaron por su capacidad para tolerar hidrocarburos de petróleo y diésel fueron las siguientes: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Providencia* y *Acinetobacter*. De estos grupos, el 50% fueron aislados de la rizósfera de mangle blanco, el 30% de mangle rojo, el 10% de mangle negro y el 10% de mangle botoncillo.

La mejor bacteria hidrocarbonoclasta de petróleo crudo seleccionada fue *Pseudomonas* sp. y la mejor bacteria hidrocarbonoclasta de diésel seleccionada fue una cepa de la especie *Rhodococcus erythropolis*; ambas especies aisladas del mangle blanco y

clasificadas dentro del grupo de bacterias hidrocarbonoclastas asimiladoras de nitrógeno (NA-HB).

Es importante señalar que después de realizar el análisis filogenético, la rizósfera de las cuatro especies de mangle del estado de Campeche quedó conformado por tres phyla: Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria.

En este estudio el análisis filogenético indicó que el phylum Proteobacteria presentó el mayor porcentaje de bacterias hidrocarbonoclastas (68.76%) en la rizósfera de manglares del estado de Campeche, lo cual coincide con lo reportado por Taketani et al. (2009) quienes reportaron que la mayoría de sus secuencias estaban relacionadas a Proteobacterias (alpha y Gamma), las cuales son conocidas por dominar ambientes marinos aeróbicos, así como en sedimentos superficiales de manglares.

El phylum Proteobacteria se caracterizó por agrupar géneros tales como *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia* y otras especies individuales, e incluyó a la mejor especie tolerante de petróleo (*Pseudomonas* sp). El phylum Firmicutes quedó definido por los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus* con el 25% de bacterias hidrocarbonoclastas. Respecto a este phylum, el género *Bacillus* (o Bacillales de acuerdo a su orden) han sido previamente reportados en ambientes estuarios y manglares por Holguín y Bashan, (1996). El phylum Actinobacteria agrupó a los géneros *Rhodococcus* y *Microbacterium* (6.24%), incluyendo aquí a la mejor especie tolerante de diésel (*Rhodococcus erythropolis*).

Por otra parte, es necesario señalar que los porcentajes de degradación alcanzados por bacterias hidrocarbonoclastas del petróleo y diésel fueron significativos, y se cuantificaron a partir de la abundancia de picos indicados en los cromatogramas generados a partir de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. El porcentaje de

degradación de hidrocarburos del petróleo fue de 88% y el porcentaje de degradación de hidrocarburos del diésel fue de 94%.

Los resultados del presente estudio confirman la relación que existe entre la fijación de nitrógeno a través de bacterias hidrocarbonoclastas asimiladoras o de fijadoras de N_2 y la degradación de hidrocarburos en ecosistemas naturales como los manglares (Head et al., 2006).

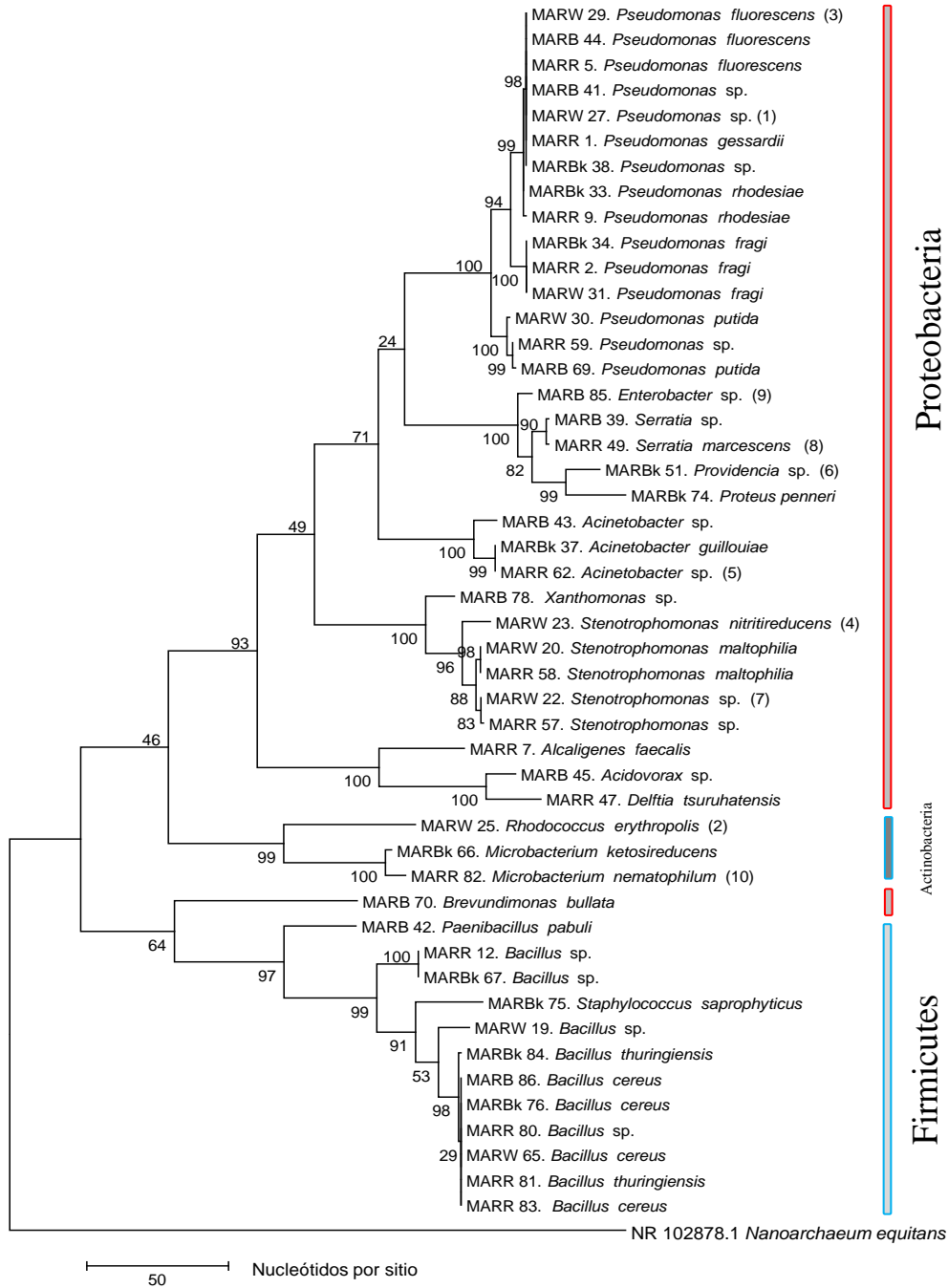


Figura 4.16. Árbol filogenético de bacterias hidrocarbonoclastas identificadas en la rizósfera de cuatro especies mangle del estado de Campeche. El número de acceso NR 102878 de *Nanoarchaeum equitans*, fue asignado como grupo externo. El árbol filogenético se realizó por el método de máxima parsimonia con un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones. La barra indica 50 sustituciones por sitio. Las 10 mejores cepas hidrocarbonoclastas, se indican entre paréntesis.

4.5 CONCLUSIONES

De un total de 86 bacterias hidrocarbonoclastas identificadas filogenéticamente de la rizósfera de cuatro especies de manglares (rojo, blanco, negro y botoncillo) del estado de Campeche, se seleccionaron las 10 mejores con base en su tolerancia a petróleo y diésel. Las cepas sobresalientes por su porcentaje de degradación fueron las siguientes: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Providencia* y *Acinetobacter*.

La rizósfera de mangle blanco mostró mayor porcentaje de bacterias hidrocarbonoclastas seleccionadas en comparación con las especies de mangle restantes. La mejor cepa bacteriana hidrocarbonoclasta de petróleo crudo fue la MARW 27 (*Pseudomonas* sp.) y la mejor cepa bacteriana hidrocarbonoclasta de diésel fue la MARW 25 (*Rhodococcus erythropolis*); ambas bacterias corresponden al grupo de hidrocarbonoclastas asimiladoras de nitrógeno (NA-HB). El porcentaje de degradación de hidrocarburos del petróleo fue de 88% y el porcentaje de degradación de hidrocarburos del diésel fue de 94%.

El árbol filogenético de la rizósfera de las cuatro especies de mangle del estado de Campeche quedó conformado por tres phyla: Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria. El phylum Proteobacteria presentó el mayor porcentaje de cepas de bacterias hidrocarbonoclastas (68.76%) de los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Serratia* y otras especies individuales, e incluyó a la mejor especie tolerante de petróleo (*Pseudomonas* sp.). El phylum Firmicutes quedó definido por los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus* con el 25% de cepas de bacterias hidrocarbonoclastas. El phylum Actinobacteria agrupó a los géneros *Rhodococcus* y *Microbacterium* (6.24%), incluyendo a la mejor especie degradadora de diésel (*Rhodococcus erythropolis*).

CAPÍTULO V

FITORREMEDIACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO CRUDO O DIÉSEL UTILIZANDO *Lolium perenne*, APLICANDO BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN

Resumen

Este estudio evaluó los efectos de la inoculación de consorcios bacterianos hidrocarbonoclastas en plántulas de *Lolium perenne* en combinación con cuatro fuentes de nitrógeno (urea, nitrato de amonio, sulfato de amonio y testigo sin nitrógeno) durante la fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo (5,000 mg kg¹) o con diésel (10,000 mg kg¹). El experimento tuvo un arreglo factorial de 3 x 4 x 3, con 36 tratamientos distribuidos en un diseño experimental completamente al azar bajo condiciones de cámara de crecimiento. La aplicación de urea, nitrato de amonio y sulfato de amonio redujo el pH, CE, MO, COT, pero aumentó la altura de planta, biomasa seca total, bacterias totales y porcentaje de degradación de petróleo y diésel a los 50 días. El nitrato de amonio y urea en combinación con el consorcio bacteriano, generaron mayor biomasa seca, altura de plántulas y longitud de raíz de *L. perenne* principalmente en plántulas sin contaminar y plántulas contaminadas con diésel. El consorcio bacteriano (integrado por cinco bacterias seleccionadas para cada contaminante) mejoró la eficiencia de fitorremediación de suelo con diésel (85.2%) en comparación con la fitorremediación de petróleo crudo (73.6%). El menor porcentaje de degradación de diésel (36.6%) o de petróleo (22%) se presentó en pasto sin aplicación de nitrógeno. La bioaumentación y la bioestimulación mejoraron la fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo y diésel.

Palabras clave: Consorcios bacterianos, urea, nitrato de amonio, sulfato de amonio, petróleo, diésel.

CHAPTER V

**PHYTOREMEDIATION OF SOIL CONTAMINATED WITH CRUDE OIL OR
DIESEL USING *Lolium perenne*, APPLYING BIOSTIMULATION AND
BIOAUGMENTATION**

Abstract

This study evaluated the effects of inoculating hydrocarbonoclastic bacterial consortia on plants of *Lolium perenne* combined with four sources of nitrogen (urea, ammonium nitrate, ammonium sulfate, and a control without nitrogen) during the phytoremediation of contaminated soil with crude oil (5,000 mg kg⁻¹) or diesel (10,000 mg kg⁻¹). The experiment had a factorial arrangement 3x4x3, yielding 36 treatments distributed in a completely randomized design, at plant growth chamber conditions. Urea, ammonium nitrate or ammonium sulfate application decreased pH, CE, MO, COT, but increased plant height, total dry mass, total bacterial population, and petroleum hydrocarbon degradation of crude oil or diesel, after 50 days. Combining ammonium nitrate or urea with the bacterial consortia resulted in high plant dry mass, height and root length in uncontaminated or diesel-contaminated treatments. Bacterial consortia (composed by five selected bacteria for each contaminant) improved the phytoremediation efficiency of diesel (85.2%) when compared to crude oil (73.6%). The lowest degradation percentages of diesel (36.6%) or crude oil (22%) was achieved in treatments with *L. perenne* without nitrogen application. Both bioaugmentation and biostimulation enhanced the phytoremediation of contaminated soil with either crude oil or diesel.

Key words: Microbial consortia, urea, ammonium nitrate, ammonium sulfate, crude oil, diesel.

5.1 INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la industria petrolera produce, distribuye y consume grandes cantidades de petróleo y sus derivados, los cuales representan la mayor fuente de energía para industrias de proceso y transporte. Por ejemplo, Estados Unidos, en el 2011, consumió 18.83 millones de barriles de petróleo y subproductos de su refinación, comprendiendo el 22% del consumo total mundial; en tanto, que importó 11.4 millones de barriles diarios de petróleo (mbd) (USEIA, 2013).

El petróleo es un producto estratégico para México ya que representa la base fundamental de su economía; el 90% de la energía primaria que se consume proviene de los hidrocarburos del petróleo crudo. En el 2013, la producción de petróleo fue de 418.7 mbd, mientras que la producción de diésel fue de 392.9 mbd (PEMEX, 2013). Paralelamente, el crecimiento constante de la industria petrolera también ha generado daños al ambiente, ya que los constantes derrames en el suelo forman capas que disminuyen su capacidad para retener agua disponible para las plantas (Gutiérrez y Zavala, 2002). Además, los hidrocarburos del petróleo (HP) tienen efectos negativos en la textura, la materia orgánica, la densidad real y la porosidad del suelo (Martínez y López, 2001).

Los problemas de contaminación del suelo por HP se deben principalmente a la falta de mantenimiento de las instalaciones petroleras, explosiones en plataformas, fugas y robo de combustible en las líneas de transporte (Jiménez, 2002). Así, la contaminación también afecta la salud de la población y en muchos casos, impacta negativamente los recursos naturales y fundamentales para el desarrollo de la sociedad (SEMARNAT, 2010).

Uno de los métodos biológicos utilizados en la remediación de suelos que muestra ventajas con respecto a los métodos físicos y químicos, debido a su bajo costo y beneficio

en el ambiente es la biorremediación (Volke y Velasco, 2002). La biorremediación se centra en la explotación de la diversidad genética y versatilidad metabólica que caracteriza a los microorganismos para transformar los contaminantes e integrarlos a los ciclos biogeoquímicos naturales (Garbisu et al., 2002). Una alternativa de la biorremediación, es la fitorremediación, que consiste en el uso de plantas para remover, estabilizar, volatilizar, acumular y/o degradar contaminantes orgánicos, la cual, está siendo utilizada para limpiar suelos contaminados con HP (Davis et al., 2002). Así, la actividad asociada al sistema radical de las plantas está frecuentemente relacionada con el mejoramiento de la habilidad para disipar o degradar contaminantes orgánicos, proceso al cual se denomina rizodegradación (Newman y Reynolds, 2004; Ferrera-Cerrato et al., 2006). Tanto la biorremediación como la fitorremediación de suelos contaminados con HP puede ser incrementada significativamente mediante la introducción de especies de microorganismos específicos (bioaumentación) con características fisiológicas y bioquímicas ideales para oxidar o para degradar de contaminantes orgánicos. La inoculación de este tipo de microorganismos se recomienda, cuando los microorganismos nativos muestran baja efectividad en degradar contaminantes. A su vez, los suelos contaminados con HP presentan limitaciones en la disponibilidad de nutrientes, particularmente N y P, debido al incremento en las relaciones C:N y C:P, lo cual resulta en la inmovilización de estos dos nutrientes por los microorganismos del suelo, agotando así su disponibilidad. Por lo anterior, la adición de nutrimentos tanto orgánicos como inorgánicos, incrementa y optimiza la relación C:N:P y con ello, mejora la remediación de los suelos contaminados (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2013).

Algunos estudios han demostrado que la aplicación de fertilizantes orgánicos e inorgánicos contribuyen en la degradación de los HP en el suelo hasta 90% (Pardo et al.,

2004). El uso de diferentes dosis de fertilización con N-P-K en el suelo contaminado con petróleo es un factor importante en la bioestimulación de la actividad microbiana y en el crecimiento de las plantas. Así la aplicación de 60 g kg^{-1} de fertilizante N-P-K (15-15-15) contribuyó en la degradación de 55% de petróleo crudo, mientras que el suelo que no fue fertilizado degradó solo 29% (Ubochi et al., 2006).

Existen bacterias que utilizan el petróleo crudo y sus derivados como fuente de alimento y de energía, oxidándolo hasta dióxido de carbono y agua, y liberando energía (Gómez, 2004). Bacterias de vida libre como *Bacillus cereus*, *B. fusiformis*, *Acinetobacter junii*, *Pseudomonas* sp., y *Pseudomonas putida*, tienen la capacidad de tolerar y degradar tolueno y xileno (Bento et al., 2005; Purushothaman et al., 2010). Algunos géneros bacterianos utilizados con éxito en procesos de la bioaumentación son *Flavobacterium*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Paracoccus* y *Achromobacter* (Singh et al., 2004; Keum et al., 2006; Teng et al., 2010).

Existen diversas especies de plantas herbáceas que estimulan la proliferación de microorganismos en su rizósfera en presencia de contaminantes orgánicos (Singh et al., 2004). Las gramíneas son menos susceptibles de sufrir daños severos por exposición a los HP en el suelo en comparación con leguminosas y herbáceas en general (Kirk et al., 2002; Merkl et al., 2005a; Sangrabriel et al., 2006), algunas de éstas pueden ser utilizadas como indicadores de la toxicidad inducida por los HP (Malallah et al., 1996; Ferrera-Cerrato et al., 2007). La selección de plantas para ser utilizadas en sistemas de fitorremediación se basa en su habilidad de tolerar y crecer en suelos contaminados, así como en su habilidad para favorecer la degradación de los hidrocarburos directamente mediante la secreción o exudación de enzimas oxidativas o indirectamente al estimular las poblaciones de

microorganismos hidrocarbonoclastas en la rizósfera (Siciliano et al., 2001; Susarla et al., 2002; Pilon-Smits, 2005; Ferrera-Cerrato et al., 2006).

Existen plantas tolerantes que presentan modificaciones en su morfología radical como es el caso de *Lolium perenne*, las cuales se caracterizan por tener raíces menos densas cortas y gruesas, características que están relacionadas aparentemente con una mayor degradación de los contaminantes (Merkl et al., 2005a) y con el mejoramiento de la absorción de agua y nutrientes para mantener el crecimiento de las plantas bajo este tipo de contaminación. Más aún, los efectos negativos de los HP sobre la fisiología de las plantas y en la morfología de la raíz, varían dependiendo de las especies de plantas, propiedades del suelo, composición de la población microbiana y el tipo, concentración y composición de los hidrocarburos (Salanitro et al., 1997; Wiltse et al., 1998; Siciliano et al., 2001).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta del pasto *Lolium perenne* a la aplicación de tres fuentes de nitrógeno y un testigo (bioestimulación), y a la inoculación de consorcios bacterianos hidrocarbonoclastas (bioaumentación) durante la fitorremediación de un suelo contaminado con petróleo o con diésel, bajo condiciones de cámara de crecimiento.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

El suelo utilizado se colectó en San Diego municipio de Texcoco, estado de México. Este posee una textura como franco arenosa y un pH de 7.2. El suelo se tamizó (malla 0.5 mm) y esterilizó en autoclave (en dos periodos a 121 °C durante 4 h) y posteriormente bajo condiciones estériles, se pasó a bolsas estériles de papel de un 1 kg de capacidad y se secaron a 110 °C por 48 h.

5.2.1 Preparación de semillas

Las semillas de pasto *Lolium perenne* L. (rye-grass inglés) fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2.5% durante 10 minutos y después enjuagadas con agua destilada hasta eliminar el exceso del desinfectante. Las semillas no sembradas al instante en el ensayo, se preservaron secas y estériles en frascos de vidrio hasta su uso.

5.2.2 Contaminación del suelo con petróleo o con diésel

En un refractario de vidrio estéril, por separado, se colocó un kilogramo de suelo seco estéril para contaminarlo con petróleo crudo, y un kilogramo de suelo seco para contaminarlo con diésel. También por separado, se preparó una suspensión del contaminante (petróleo crudo o diésel, respectivamente) con 150 mL de diclorometano (Sigma-Aldrich®) como disolvente, para impregnar el contaminante de forma homogénea con el suelo.

El suelo una vez contaminado se dejó reposar en una campana de extracción durante un día para permitir la evaporación del disolvente. La dosis de contaminación de suelo con petróleo crudo ligero fue de 5,000 mg kg⁻¹, y la dosis de contaminación de suelo con diésel fue de 10,000 mg kg⁻¹.

5.2.3 Preparación de soluciones nutritivas para la aplicación de nitrógeno

5.2.3.1. Soluciones nutritivas con diferentes fuentes de nitrógeno.

Las tres soluciones nutritivas de nitrógeno, que se prepararon fueron las siguientes:

- 1) La solución de urea (46%, N), se preparó a partir de 15.47 mg N disueltos en 0.5 L de agua destilada para obtener una solución con una concentración de 30.9 mg N L⁻¹, representando una dosis de 219 kg N ha⁻¹.

- 2) La solución de nitrato de amonio (NH_4NO_3 al 33%), se preparó con 15.46 mg N disueltos en 0.5 L de agua destilada para obtener una solución con una concentración de $30.9 \text{ mg N}\cdot\text{L}^{-1}$, representando una dosis de 157 kg N ha^{-1} .
- 3) La solución de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 21%), se preparó con 15.47 mg N disueltos en 0.5 L de agua destilada para obtener una solución con una concentración de $30.9 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ N representando una dosis de 100 kg N ha^{-1} .

Las tres soluciones preparadas, se esterilizaron a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos, se enfriaron y se aplicaron 20 mL, como única e inicial fuente de nitrógeno en las unidades experimentales correspondientes, de acuerdo con los tratamientos del experimento.

5.2.3.2. Solución nutritiva de Jensen.

La solución testigo de Jensen es una solución nutritiva de fósforo, libre de nitrógeno (Vincent, 1970), (Ver Anexo III). La solución nutritiva se esterilizó a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos, se enfrió y se aplicó un volumen aproximado de 20 mL a cada unidad experimental a lo largo del tiempo que duró el experimento.

5.2.4 Preparación del consorcio bacteriano

El consorcio bacteriano utilizado para el ensayo de la fitorremediación de petróleo crudo se formó con las siguientes cepas hidrocarbonoclastas: **P₁ (MARW27)** + P₅ (MARR 62) + P₄ (MARW 23) + P₂ (MARW 25) + P₆ (MARBk 51) (ver Capítulo IV).

El consorcio bacteriano utilizado para el ensayo de la fitorremediación de diésel se conformó con las siguientes cepas hidrocarbonoclastas: **D₂ (MARW 25)** + D₁ (MARW 27) + D₈ (MARR 49) + D₄ (MARW 23) + D₆ (MARBk 51) (ver Capítulo IV).

Cada uno de los consorcios-bacterianos se formaron a partir del volumen de tres tubos estériles con 9 mL de agua destilada, los cuales previamente fueron inoculados con cada una de las bacterias hidrocarbonoclastas seleccionadas. Para el conteo de las unidades

formadoras de colonias (UFC) se tomó un mL de la suspensión bacteriana y se realizaron diluciones de 10^{-1} a 10^{-8} . Posteriormente, se tomó una alícuota de 0.1 mL de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y se distribuyó en cajas de Petri con agar nutritivo (Merck®), con tres repeticiones por dilución. Inmediatamente, las cajas se incubaron a 28 °C por 72 h, y después de este tiempo, se cuantificaron las UFC. La carga bacteriana promedio del cultivo del consorcio-bacteriano usado en los tratamientos con petróleo fue de 4.5×10^{-8} UFC mL⁻¹, y de 7.2×10^{-8} UFC mL⁻¹ para el consorcio-bacteriano usado en los tratamientos con diésel.

5.2.5 Determinación de UFC de bacterias totales en el sustrato inoculado

Para el conteo de UFC en el suelo inoculado, se colocó un gramo de suelo de cada uno de los tratamientos, en tubos de dilución con 9 mL de agua destilada estéril, agitándolos vigorosamente en un vortex. Posteriormente, se tomó 1.0 mL de la solución y se realizaron diluciones decimales (10^{-1} a 10^{-8}). Enseguida de las disoluciones 10^{-5} a la 10^{-8} se tomó 0.1 mL, y distribuyó en cajas de Petri con agar nutritivo, para cuantificar bacterias totales en el ensayo de fitorremediación. Todas las diluciones se realizaron por triplicado en cada tratamiento. Finalmente, las cajas se incubaron a 28 °C durante 48 h, y se cuantificó el número de UFC de cada tratamiento.

5.2.6 Diseño experimental y establecimiento del ensayo

El experimento se estableció usando un arreglo factorial 3 x 4 x 3, cuyos factores fueron: tres fuentes de inoculación (consorcios con pasto; CLp, consorcio sin pasto; C, sin consorcio con pasto; Lp), cuatro fuentes de nitrógeno (Urea, nitrato de amonio, sulfato de amonio, y testigo sin nitrógeno), y tres dosis de contaminantes ($5,000 \text{ mg kg}^{-1}$ de petróleo crudo ó $10,000 \text{ mg kg}^{-1}$ de diésel, y sin contaminante). La combinación de estos factores dio un total de 36 tratamientos, distribuidos en un diseño experimental completamente al

azar bajo condiciones de cámara de crecimiento (ver Anexo II). Los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD, $\alpha=0.05$) usando el software InfoStat_2013, Córdoba, Argentina.

El experimento se estableció en una cámara de crecimiento de ambiente controlado con 12 h de fotoperiodo a una temperatura de 24 a 26 °C y con una humedad relativa de 65 a 70% (Data logger Hobo serie H8), en el área de Botánica del Colegio de Postgraduados.

Se utilizaron tubos Falcon que se llenaron con 65 g de sustrato arenoso, después se sembraron tres semillas desinfectadas de *Lolium perenne* y se adicionaron 20 mL de solución nutritiva de nitrógeno como riego inicial, de acuerdo con el tratamiento experimental correspondiente (ver Anexo II). Posteriormente, el riego se aplicó de forma diaria en todas las unidades experimentales (UE), sólo con la solución testigo libre de nitrógeno.

La inoculación de los consorcios-bacterianos en sus respectivos tratamientos, se realizó a los ocho días de iniciado el experimento, con la intención de confirmar que las semillas sembradas germinaran, y observar la emergencia de las primeras plántulas en cada tratamiento. Finalmente, se inocularon 2 mL del consorcio-bacteriano correspondiente a cada UE, aplicándolos en la base del tallo de las plántulas de *Lolium perenne*.

5.2.7 Variables evaluadas

Las variables evaluadas al inicio del experimento en cada unidad experimental (UE) fueron las siguientes: pH, conductividad eléctrica (CE), materia orgánica (MO), carbono orgánico total (COT), Hidrocarburos totales de petróleo (HTP) e Hidrocarburos totales de diésel (HTD) en suelo contaminado con petróleo crudo ligero o con diésel, respectivamente. Las variables evaluadas al final (50 días) del experimento fueron las

siguientes: pH, CE, MO, COT, altura de la plántula, longitud de raíz, biomasa seca total, bacterias totales, así como el contenido de HTP o de HTD.

5.2.8. Método de extracción de hidrocarburos totales del petróleo y diésel

Las muestras de suelo arenoso recién contaminadas se almacenaron a -20 °C para después determinar la concentración inicial de petróleo o de diésel (tiempo cero). Además, las muestras de suelo obtenidas a los 50 días que duró el experimento se almacenaron a -20 °C durante 30 días, para posteriormente realizar su extracción y cuantificación por GC-MS.

El método de extracción de hidrocarburos totales aplicado fue el método soxhlet, que consistió en una extracción sólido-líquido utilizando diclorometano grado cromatográfico (Sigma-Aldrich®) como disolvente, durante 6 h. Después de iniciado y finalizado el ensayo de fitorremediación de petróleo o de diésel. A partir de muestras de cada unidad experimental (por triplicado), se tomaron 10 g de suelo seco y se depositaron en dedales de celulosa previamente tratados con diclorometano, se colocaron en el equipo soxhlet y se realizó la extracción con 170 mL de diclorometano.

Los extractos se depositaron en embudos de separación y se sometieron a tres procesos de extracción con 40 mL de diclorometano agitando durante 3 minutos y dejando reposar 10 minutos después de cada extracción (Carmo et al., 2011). La fase orgánica se purificó en una columna empacada con 4 g de Na₂SO₄ anhidro y lana de vidrio, colectando los extractos en matraz balón. Los extractos se reconcentraron por medio de baño maría hasta un volumen de 5 mL, el cual se depositó y conservó en viales color ámbar de 5 mL, para su posterior cuantificación por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS).

5.2.9. Cuantificación de hidrocarburos totales del petróleo o de diésel (GC-MS)

Previo al análisis cuantitativo de hidrocarburos totales de petróleo o de diésel contenidas en viales, todas las muestras se resuspendieron en 1 mL de diclorometano grado cromatográfico. Para el análisis se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies, modelo 6890N (Net Work GC system), equipado con una columna DB-5, 5%-fenil-metilpolisiloxano (Agilent Technologies) de 60 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de película. La temperatura de inicio fue 50 °C, la cual se mantuvo durante 5 min, posteriormente la temperatura se elevó hasta 280 °C usando una rampa de calentamiento de 20 °C min^{-1} , durante 20 min. Se usó helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL min^{-1} , la temperatura del inyector fue 250 °C, inyección split, con una relación de split de 50:1. Una vez obtenido el cromatograma, la identificación de cada uno de los picos se llevó a cabo mediante espectrometría de masas empleando un espectrómetro de masas marca Agilent Technologies modelo 5975 inert XL. Los espectros de masas se obtuvieron mediante ionización por impacto electrónico a 70 eV, para la identificación se compararon los espectros de masas obtenidos para cada compuesto, con una base de datos (HP Chemstation-NIST 05 Mass Spectral search program, versión 2.0d), además de la comparación con un estándar (Saturated alkanes, C7-C30, número de catálogo 49451-U, Sigma-Aldrich) analizado bajo las mismas condiciones, el cual fue utilizado como estándar externo para la cuantificación tanto de los hidrocarburos totales de petróleo como los de diésel.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Efecto en variables evaluadas en la rizósfera de *Lolium perenne* durante la fitorremediación de petróleo o diésel.

5.3.1.1. pH

En la Figura 5.1 se presentan los valores de pH medidos al inicio y final del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo. En los tratamientos con las tres fuentes de nitrógeno urea, nitrato de amonio (NH_4NO_3) y sulfato de amonio (NH_4)₂SO₄) y en el testigo, se observó una reducción del pH a los 50 días de establecido el ensayo, en comparación con los valores iniciales. No obstante, el rango observado de pH fue de 7.86 a 8.87; el menor valor de pH se presentó en NH_4NO_3 al día 50 en el tratamiento con pasto sin contaminar (Lp), mientras que el mayor valor se obtuvo con urea en el consorcio con pasto sin contaminar (CLp). En los tratamientos contaminados, la mayor reducción de pH se observó en el tratamiento consorcio con pasto con petróleo (CLp 5P) con urea o en el testigo.

En el caso del diésel, la Figura 5.2 presenta los valores de pH medidos al inicio y final del ensayo. Al igual que en el caso de petróleo, tanto en las tres fuentes de nitrógeno como en el testigo, el pH disminuyó a los 50 días del ensayo, en comparación con los valores del día 1. El rango observado de pH fue de 7.85 a 8.9; el menor valor de pH se observó en el testigo en el tratamiento con el consorcio con pasto con diésel al día 50, en tanto que el mayor se obtuvo con (NH_4)₂SO₄ en el tratamiento con pasto sin contaminar en el día 1. El mayor decremento de pH se observó con urea en el tratamiento con el consorcio con pasto sin contaminar (CLp) y en el testigo y con (NH_4)₂SO₄ en el tratamiento consorcio con pasto con diésel (CLp 10D).

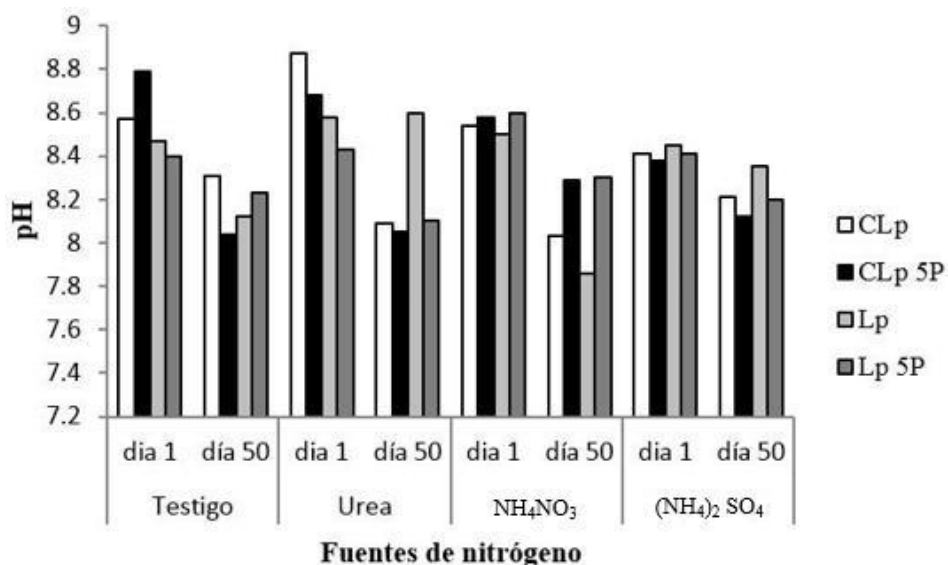


Figura 5.1. Valores de pH del suelo por efecto de petróleo crudo (5,000 mg kg⁻¹) al inicio(día 1) y final (día 50) del ensayo de fitorremediación utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 5P) Consorcio bacteriano con Pasto con petróleo; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 5P) Pasto con Petróleo.

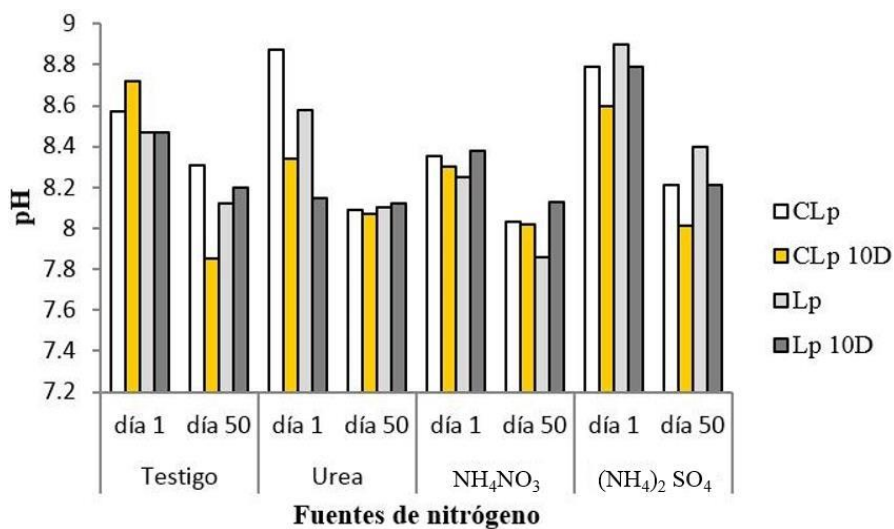


Figura 5.2. Valores de pH del suelo por efecto de diésel (10,000 mg kg⁻¹) al inicio (día 1) y final (día 50) del ensayo de fitorremediación utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 10D) Consorcio bacteriano con Pasto con diésel; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 10D) Pasto con diésel.

5.3.1.2. Conductividad eléctrica.

La Figura 5.3 presenta los valores de conductividad eléctrica (CE) medidos al inicio y final del ensayo, por efecto de la contaminación con petróleo crudo. En general, se observó una reducción de la CE en pasto sin petróleo (Lp) a los 50 días del ensayo fitorremediación en comparación con los valores iniciales; la variación de la CE fue de 0.1 a 0.16 dS m⁻¹, en todos los tratamientos. De manera similar, la contaminación con diésel produjo variaciones e incrementos de CE en los tratamientos; así, el rango observado de CE en los tratamientos fue de 0.1 a 0.16 dS m⁻¹ (Figura 5.4).

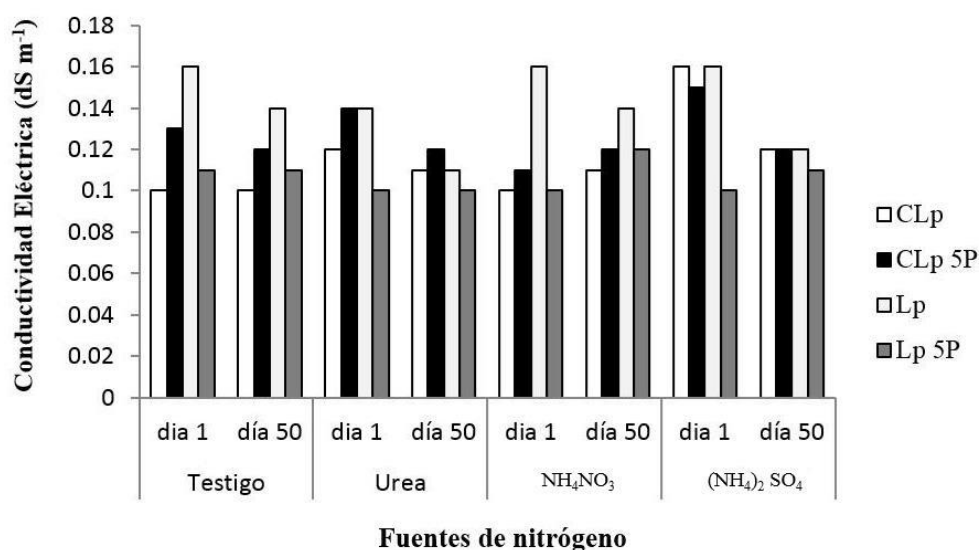


Figura 5.3. Conductividad eléctrica del suelo por efecto de petróleo crudo (5,000 mg kg⁻¹) al inicio (día 1) y final (día 50) del ensayo de fitorremediación utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 5P) Consorcio bacteriano con Pasto con petróleo; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 5P) Pasto con Petróleo.

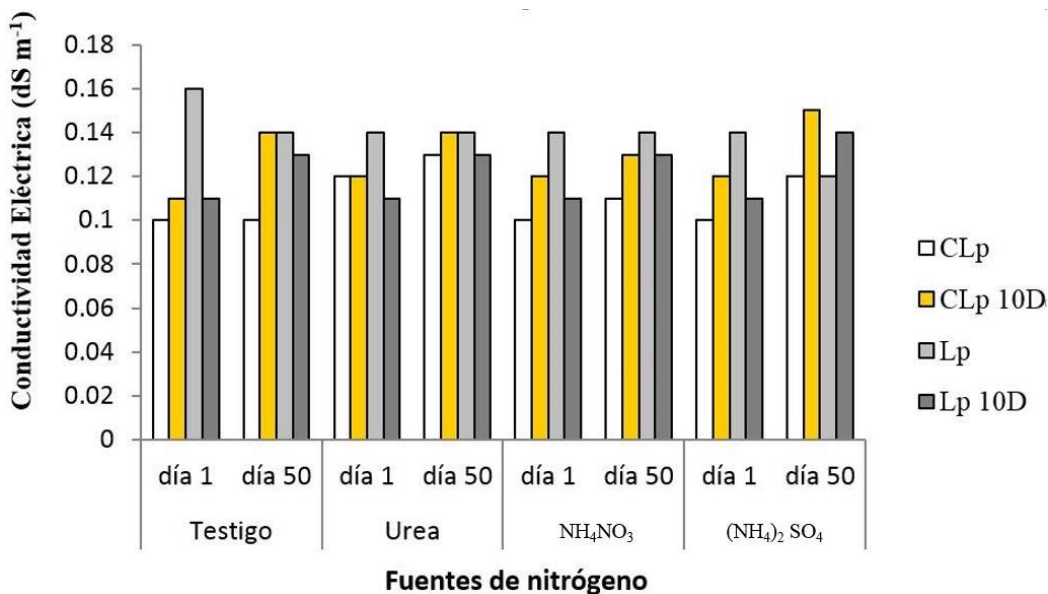


Figura 5.4. Conductividad eléctrica del suelo por efecto de diésel ($10,000 \text{ mg kg}^{-1}$) al inicio y final del ensayo de fitorremediación utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 10D) Consorcio bacteriano con Pasto con diésel; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 10D) Pasto con diésel.

5.3.1.3. Materia orgánica

En la Figura 5.5 se presentan los valores de materia orgánica (MO) por efecto de la contaminación con petróleo crudo en el suelo. Con la aplicación de las tres fuentes de nitrógeno y el testigo, se observó una reducción de MO en el tratamiento consorcio con pasto con petróleo (CLp 5P) y un incremento en el tratamiento con pasto con petróleo (Lp 5P) a los 50 días de establecido el ensayo, observando mayor reducción en el testigo. No obstante, el rango observado de MO con petróleo fue de 0.13 a 1.21%; el menor porcentaje de MO observó con NH_4NO_3 al día 50 en el tratamiento pasto sin contaminar (Lp), mientras que el mayor porcentaje se obtuvo con el testigo el día 1 en el tratamiento consorcio con pasto con petróleo (CLp 5P).

En el caso del diésel, la Figura 5.6 presenta los valores de materia orgánica (MO) obtenidos en el ensayo de fitorremediación. Al igual que en el caso de petróleo, tanto en las tres fuentes de nitrógeno como en el testigo, la MO disminuyó en el Consorcio con Pasto con diésel (CLp 10D), y aumentó en el tratamiento pasto con diésel (Lp 10D) a los 50 días de establecido el ensayo. El rango observado de MO con diésel fue de 0.13 a 0.84%; el menor porcentaje de MO observó al día 50 en NH_4NO_3 en el tratamiento Lp, en tanto que el mayor porcentaje se obtuvo con el testigo el día 50 en el tratamiento Lp 10D.

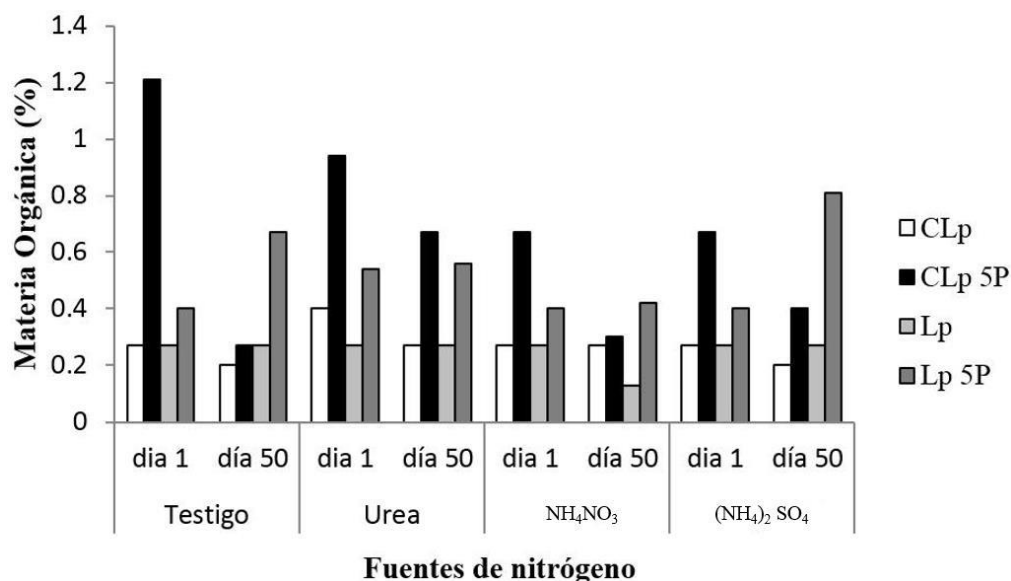


Figura 5.5. Materia orgánica del suelo por efecto de petróleo crudo ($5,000 \text{ mg kg}^{-1}$) al inicio(día 1) y final (día 50) del ensayo de fitorremediación utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 5P) Consorcio bacteriano con Pasto con petróleo; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 5P) Pasto con Petróleo.

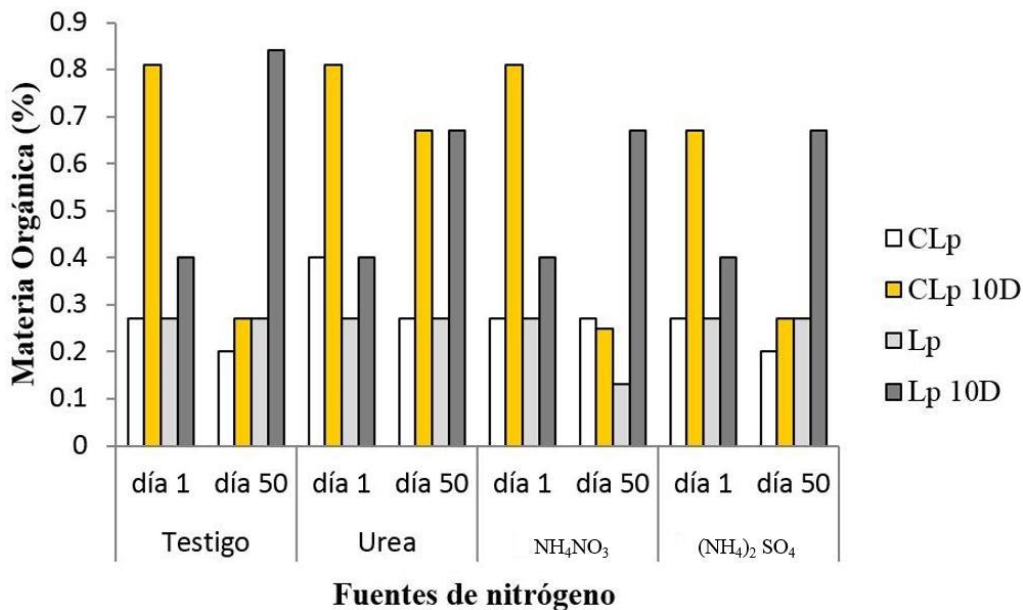


Figura 5.6. Materia orgánica del suelo por efecto de diésel (10,000 mg kg⁻¹) al inicio y final del ensayo de fitorremediación utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 10D) Consorcio bacteriano con Pasto con diésel; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 10D) Pasto con diésel.

5.3.1.4. Carbón orgánico total

En la Figura 5.7 se presentan los valores de carbón orgánico total (COT) por efecto de la contaminación con petróleo crudo en el suelo. Al igual que la MO con la aplicación de las tres fuentes de nitrógeno y el testigo, se observó la misma variación de COT. No obstante, el rango observado de COT con petróleo fue de 0.08 a 0.7%; el menor porcentaje de MO observó con NH₄NO₃ al día 50 en el tratamiento pasto sin contaminar (Lp), mientras que el mayor porcentaje se obtuvo con el testigo el día 1 en el tratamiento consorcio con pasto con petróleo (CLp 5P).

De manera similar a la MO, la contaminación con diésel produjo variaciones de COT idénticos en todos los tratamientos; así el rango observado de COT con diésel fue de 0.08 a 0.55% (Figura 5.8)

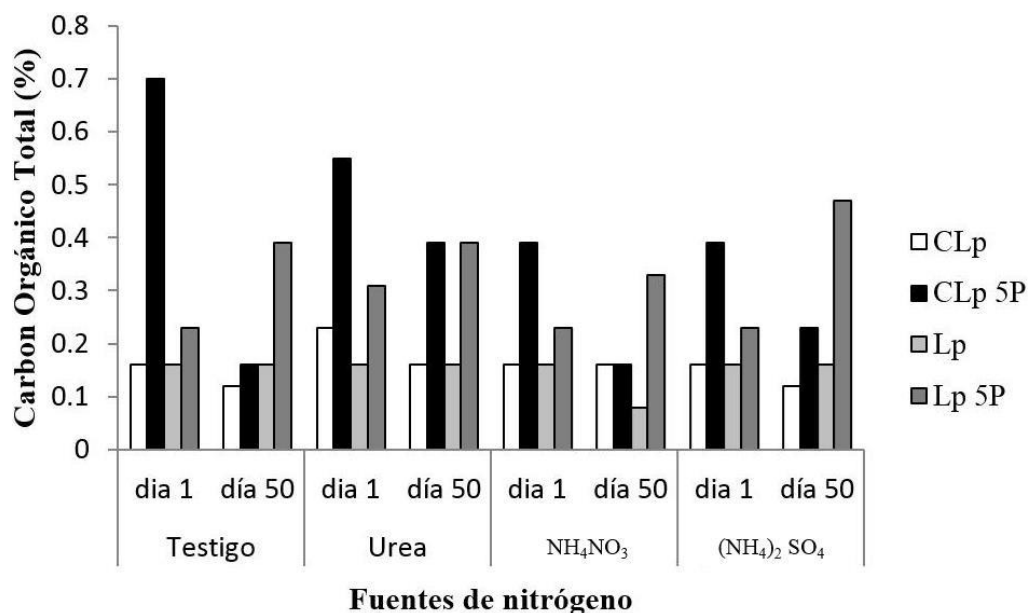


Figura 5.7. Carbón orgánico total del suelo por efecto de petróleo crudo ($5,000 \text{ mg kg}^{-1}$) al inicio (día 1) y final (día 50) del ensayo de fitorremediación utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 5P) Consorcio bacteriano con Pasto con petróleo; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 5P) Pasto con Petróleo.

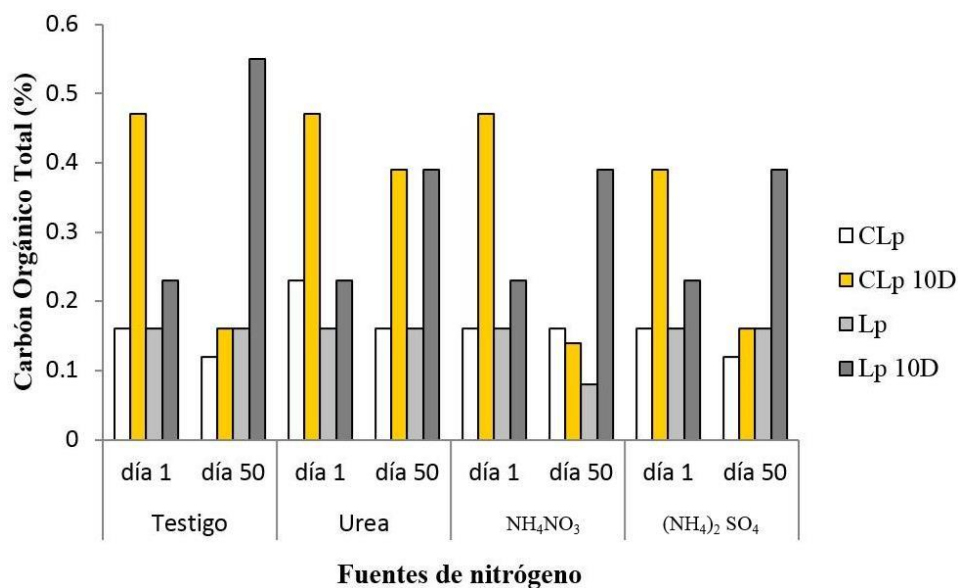


Figura 5.8. Carbono orgánico total del suelo por efecto de diésel ($10,000 \text{ mg kg}^{-1}$) al inicio y final del ensayo de fitorremediación utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 10D) Consorcio bacteriano con Pasto con diésel; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 10D) Pasto con diésel.

5.3.1.5. Altura de plántula y longitud de raíz

En la Figura 5.9A, se presentan los valores de altura de plántulas (AP) a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo. Con la aplicación de las tres fuentes de nitrógeno (urea, nitrato de amonio (NH_4NO_3) y sulfato de amonio ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y en el testigo, se observó que la mayor AP se presentó en el consorcio con pasto sin contaminar (CLp), seguido del tratamiento de pasto sin contaminar (Lp) y las menores alturas, se presentaron en los tratamientos: consorcio con pasto con petróleo (CLp 5P) y pasto con petróleo (Lp 5P). Por lo anterior, presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos sin contaminar (CLp y Lp) y los tratamientos contaminados con petróleo (CLp 5P y Lp 5P). No obstante, el rango observado en la AP contaminadas con petróleo fue de 8 a 16 cm; la menor altura se presentó en el testigo y ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el tratamiento

pasto con petróleo (Lp 5P), mientras que la mayor altura de plántulas se presentó en urea en el tratamiento consorcio con pasto sin contaminar (CLp).

En la Figura 5.9B se presentan los valores de longitud de raíz (LR) a 50 días del ensayo de fitorremediación en suelo contaminado con petróleo. Con la aplicación de las tres fuentes de nitrógeno (urea, nitrato de amonio (NH_4NO_3) y sulfato de amonio ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y en el testigo, se observó que la mayor LR se presentó en el consorcio con pasto sin contaminar (CLp), seguido del tratamiento de pasto sin contaminar (Lp) y las menores LR, se presentó en el tratamiento pasto con petróleo (Lp 5P) y Pasto con petróleo (Lp 5P). Por lo anterior, se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos sin contaminar (CLp y Lp) y el tratamiento contaminado con petróleo (Lp 5P). No obstante, el rango observado en la LR contaminadas con petróleo fue de 6 a 11 cm; la menor LR se presentó en el testigo en el tratamiento pasto con petróleo (Lp 5P), mientras que la mayor longitud de raíz se presentó en urea y NH_4NO_3 en el tratamiento consorcio con pasto sin contaminar (CLp).

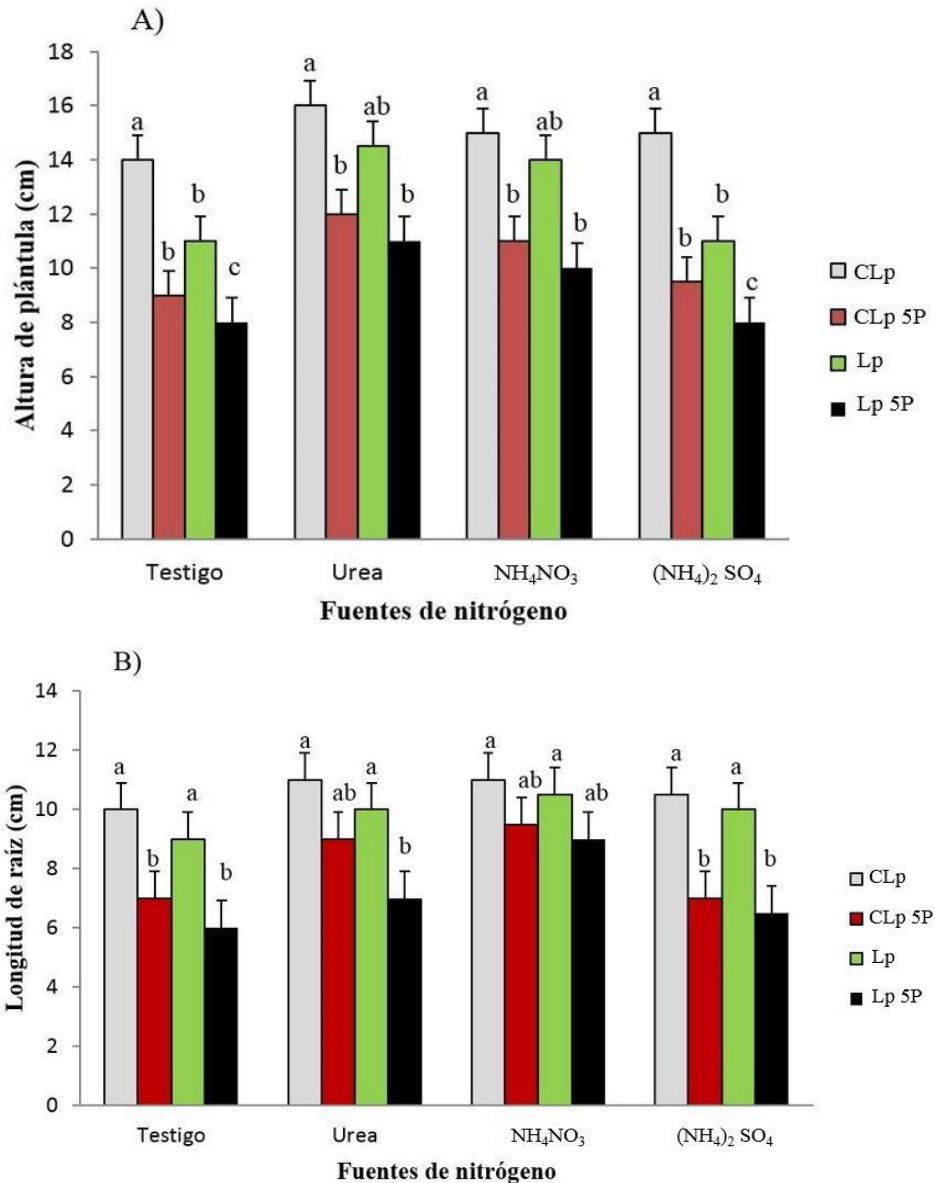


Figura 5.9 Altura de plántula (A) y longitud de raíz (B) a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo (5,000 mg kg⁻¹) utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Promedio ± Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$). n=3. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 5P) Consorcio bacteriano con Pasto con petróleo; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 5P) Pasto con diésel.

En la Figura 5.10A, se presentan los valores de altura de plántulas (AP) a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con diésel. Al igual que con petróleo, se presentaron las mismas variaciones y diferencias significativas entre tratamientos sin contaminar (CLp y Lp) y los tratamientos contaminados con diésel (CLp 10D y Lp 10D). No obstante, el rango observado en la AP contaminadas con diésel fue de 10 a 23 cm; la menor altura se presentó en el testigo y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el tratamiento pasto con diésel (Lp 10D), mientras que la mayor altura de plántulas se presentó en urea en el tratamiento consorcio con pasto sin contaminar (CLp).

La Figura 5.10B, presenta los valores de longitud de raíz (LR) a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con diésel. Al igual que con petróleo, se presentaron las mismas variaciones y diferencias significativas entre tratamientos sin contaminar (CLp y Lp) y el tratamiento contaminado con diésel (Lp 10D). No obstante, el rango observado en la LR contaminadas con diésel fue de 8 a 15 cm; la menor longitud se presentó en el testigo y las tres fuentes de nitrógeno en el tratamiento pasto con diésel (Lp 10D), mientras que la mayor longitud de raíz se presentó en NH_4NO_3 en el tratamiento consorcio con pasto sin contaminar (CLp).

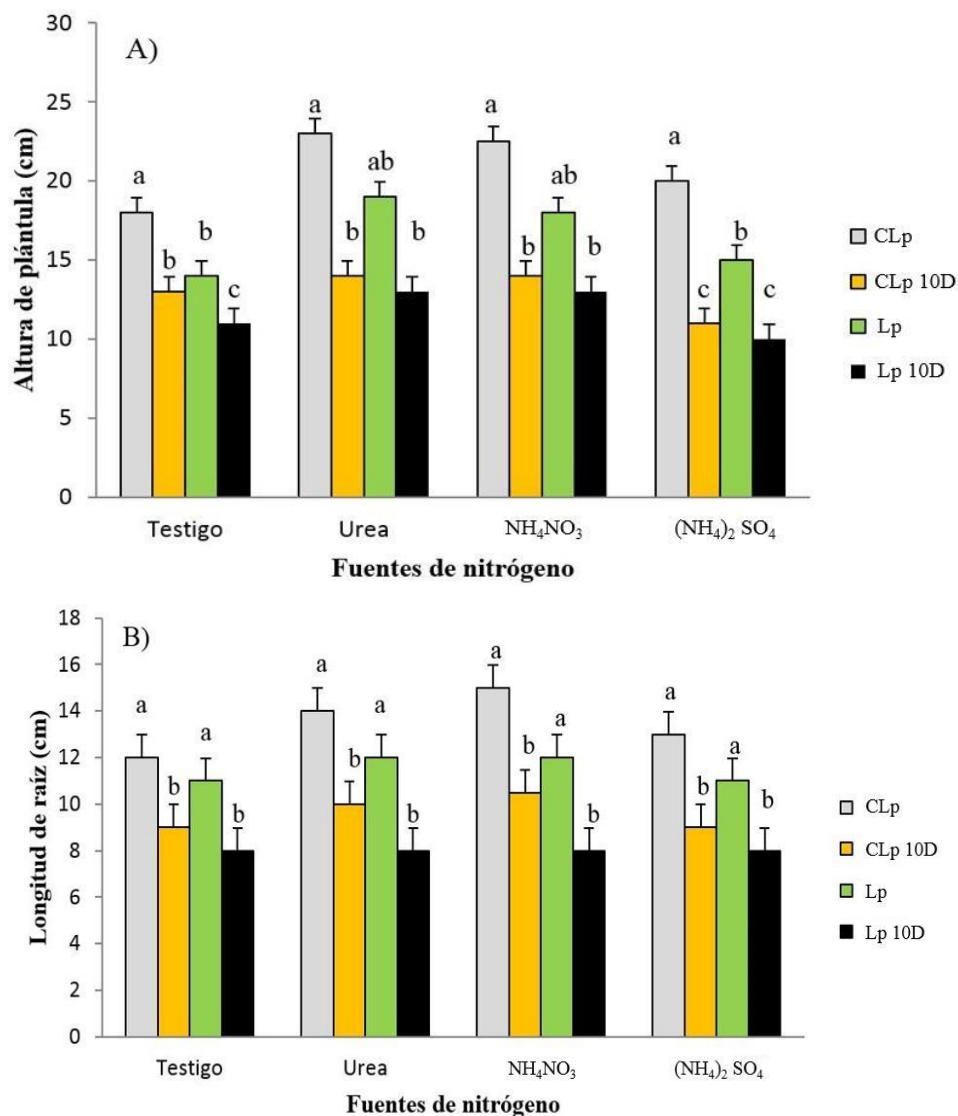


Figura 5.10. Altura de plántula (A) y longitud de raíz (B) a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con diésel (10,000 mg kg⁻¹) utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Promedio ± Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$). n=3. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 10D) Consorcio bacteriano con Pasto con diésel; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 10D) Pasto con diésel.

5.3.1.6. Biomasa seca total

En la Figura 5.11 se presentan los valores de biomasa seca total (BST) a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo. Con la aplicación de las tres fuentes de nitrógeno (urea, nitrato de amonio (NH_4NO_3) y sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y en el testigo, se observó que la mayor BST se presentó en el consorcio con pasto sin contaminar (CLp), seguido del tratamiento pasto sin contaminar (Lp) y las menores biomazas, se presentaron en los tratamientos: consorcio con pasto con petróleo (CLp 5P) y pasto con petróleo (Lp 5P). Por tanto, se presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos sin contaminar (CLp y Lp) y los tratamientos contaminados con petróleo (CLp 5P y Lp 5P). No obstante, el rango observado de BST en petróleo fue de 0.0528 a 2.8822 g; la menor BST se presentó en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el tratamiento pasto con petróleo (Lp 5P), mientras que la mayor BST se presentó en urea en el tratamiento consorcio con pasto sin contaminar (CLp).

En la Figura 5.12, se presentan los valores de biomasa seca total (BST) a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con diésel. Al igual que con petróleo, con la aplicación de las las tres fuentes de nitrógeno (urea, nitrato de amonio (NH_4NO_3) y sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y en el testigo se presentaron las mismas variaciones. No obstante, no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos sin contaminar (CLp y Lp) y los tratamientos contaminados con diésel (CLp 10D y Lp 10D). El rango observado de BST en diésel fue de 2.7594 a 2.9275 g; la menor BST se presentó en el testigo en el tratamiento pasto con diésel (Lp 10D), mientras que la mayor BST se presentó en NH_4NO_3 en el tratamiento consorcio con pasto sin contaminar (CLp).

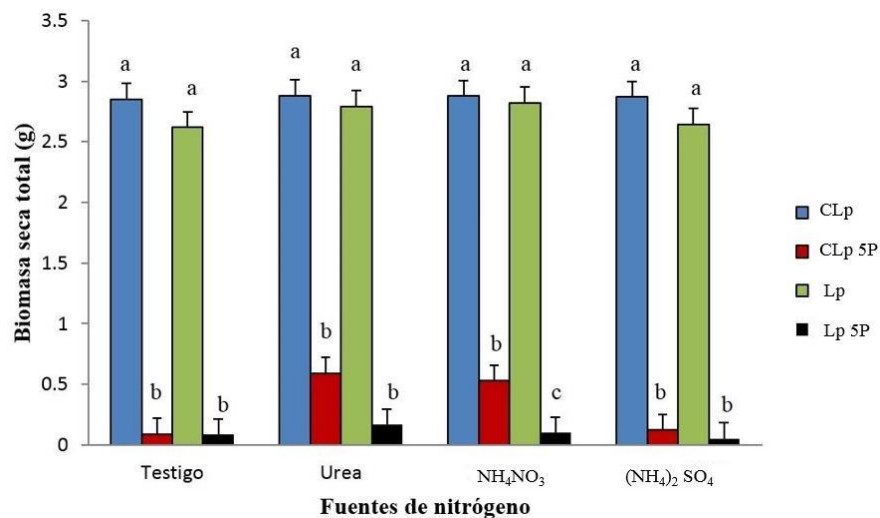


Figura 5.11. Biomasa seca total cuantificadas a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo ($5,000 \text{ mg kg}^{-1}$) utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Promedio \pm Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$). $n=3$. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 5P) Consorcio bacteriano con Pasto con petróleo; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 5P) Pasto con diésel.

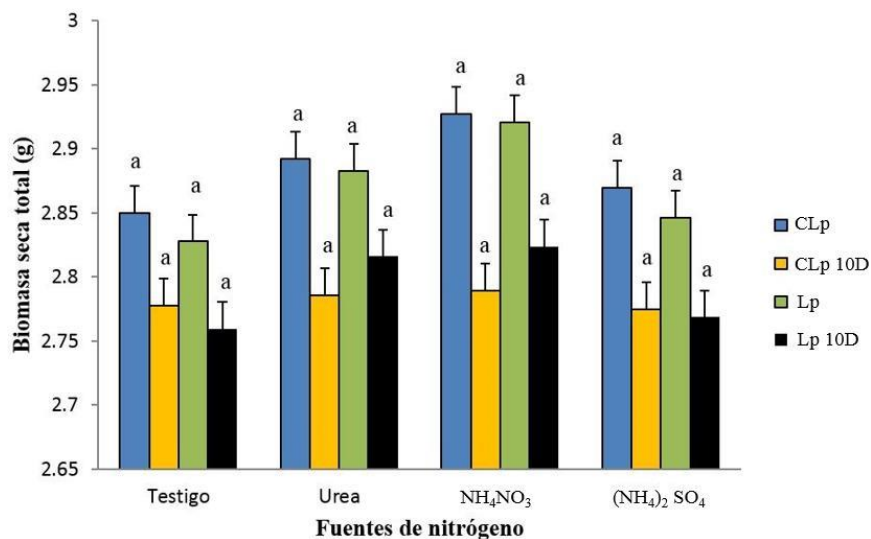


Figura 5.12. Biomasa seca total a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con diésel ($10,000 \text{ mg kg}^{-1}$) utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Promedio \pm Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$). $n=3$. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto sin contaminar; CLp 10D) Consorcio bacteriano con Pasto con diésel; Lp) Pasto sin contaminar; Lp 10D) Pasto con diésel.

5.3.1.7. Bacterias totales

En la Figura 5.13 se presentan las UFC g^{-1} de suelo seco de bacterias totales (BT) a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo. Con la aplicación de las tres fuentes de nitrógeno (urea, nitrato de amonio (NH_4NO_3) y sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) y en el testigo, se observó que la mayor población de BT se obtuvo en el tratamiento sin petróleo, seguido del consorcio con pasto con petróleo (CLp 5P) y los menores poblaciones de BT, se presentaron en los tratamientos: consorcio con petróleo (C 5P) y pasto con petróleo (Lp 5P). Por lo que se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos contaminados con petróleo (C 5P y Lp 5P) y el tratamiento sin petróleo y el tratamiento CLp 5P. No obstante, el rango observado de BT en petróleo fue de 12×10^6 a 55×10^6 UFC g^{-1} de suelo seco; la menor población de BT se presentó en el testigo y urea en el tratamiento pasto contaminado, mientras que la mayor población de BT se presentó en urea en el tratamiento sin petróleo.

La Figura 5.14 presenta los valores de bacterias totales (BT) a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con diésel. También, con la aplicación de las tres fuentes de nitrógeno (urea, nitrato de amonio (NH_4NO_3) y sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) y en el testigo, se observó que la mayor población de BT se obtuvo en el tratamiento de consorcio con pasto con diésel (CLp 10D), seguido del consorcio con diésel (C 10D) y pasto con diésel (Lp 10D); la menor población de BT, se obtuvo en el tratamiento sin diésel. Por lo tanto, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos con diésel y el tratamiento sin diésel. No obstante, el rango de BT con diésel (40×10^6 a 130×10^6 UFC g^{-1}) fue mayor en comparación a las BT con petróleo (Figura 5.15). La menor población de BT en diésel se observó en el testigo en el tratamiento sin diésel y mientras que la mayor población se presentó en urea en el CLp 10D.

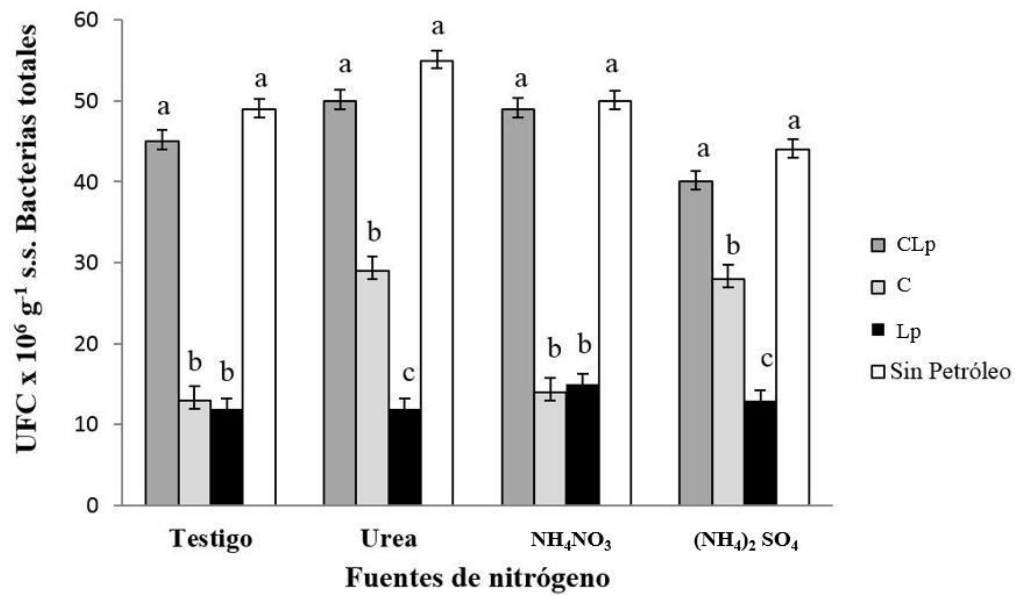


Figura 5.13. Población de bacterias totales cuantificadas a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo ($5,000 \text{ mg kg}^{-1}$) utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Promedio \pm Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$). $n=3$. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto con petróleo; C) Consorcio bacteriano con petróleo; Lp) Pasto con petróleo.

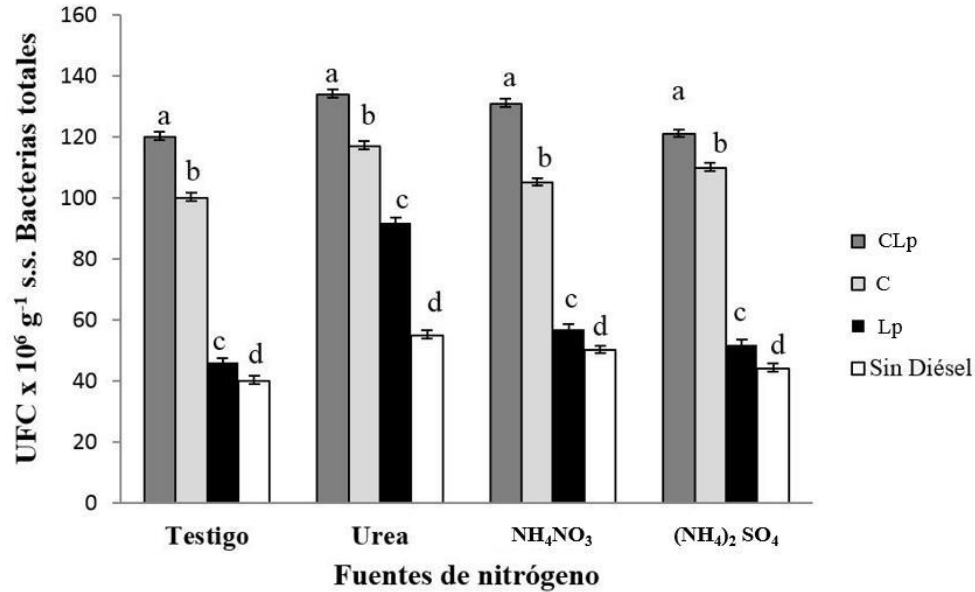


Figura 5.14. Población de bacterias totales cuantificadas a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con diésel (10,000 mg kg⁻¹) utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Promedio \pm Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$). n=3. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto con diésel; C) Consorcio bacteriano con diésel; Lp) Pasto con diésel.

5.3.1.8. Degradación de petróleo crudo

En la Figura 5.15 se presentan los porcentajes de degradación de hidrocarburos (DH) derivados de la contaminación con petróleo crudo a 50 días. Con la aplicación de las tres fuentes de nitrógeno (urea, nitrato de amonio (NH₄NO₃) y sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄) y en el testigo, se observó que el mayor porcentaje de DH se presentó en el consorcio con pasto contaminado (CLp), seguido del consorcio sin pasto contaminado (C), y los menores porcentajes de DH, se presentaron en pasto contaminado (Lp). Por lo tanto, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tres tratamientos contaminados (CLp, C y Lp) con las diferentes fuentes de nitrógeno. No obstante, el rango de degradación

de hidrocarburos en petróleo fue de 22 a 73.6%. El menor porcentaje de degradación se observó en el testigo en el tratamiento pasto contaminado con petróleo (Lp); mientras que el mayor porcentaje de degradación se presentó en NH_4NO_3 en el consorcio con pasto contaminado con petróleo (CLp).

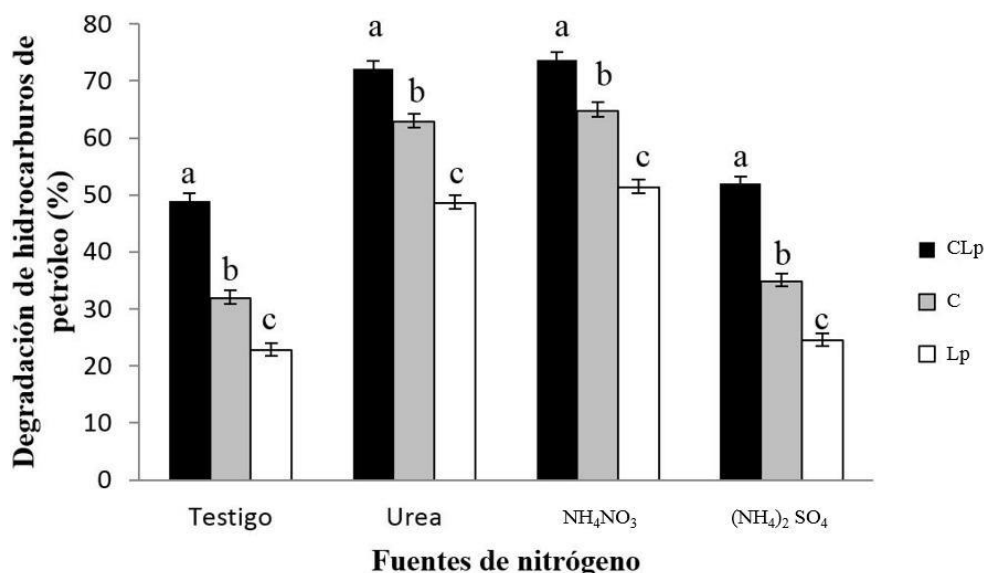


Figura 5.15. Porcentaje de degradación de hidrocarburos evaluado a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo ($5,000 \text{ mg kg}^{-1}$) utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Promedio \pm Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha = 0.05$). $n=3$. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto con petróleo; C) Consorcio sin Pasto con petróleo; Lp) Pasto con petróleo.

5.3.1.9. Degradación de diésel

La Figura 5.16 presenta los porcentajes de degradación de hidrocarburos (DH) a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con diésel. De manera similar al petróleo, se presentaron variaciones en el porcentaje de DH así como diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tres tratamientos contaminados con diésel con las tres fuentes de nitrógeno y el testigo. El rango observado de degradación de hidrocarburos en

diésel fue de 36.6 a 85.2%. El menor porcentaje de degradación se observó en el testigo en el tratamiento de pasto con diésel (Lp); mientras que el mayor porcentaje de degradación se presentó en NH_4NO_3 en el tratamiento de consorcio con pasto contaminado con diésel; (CLp).

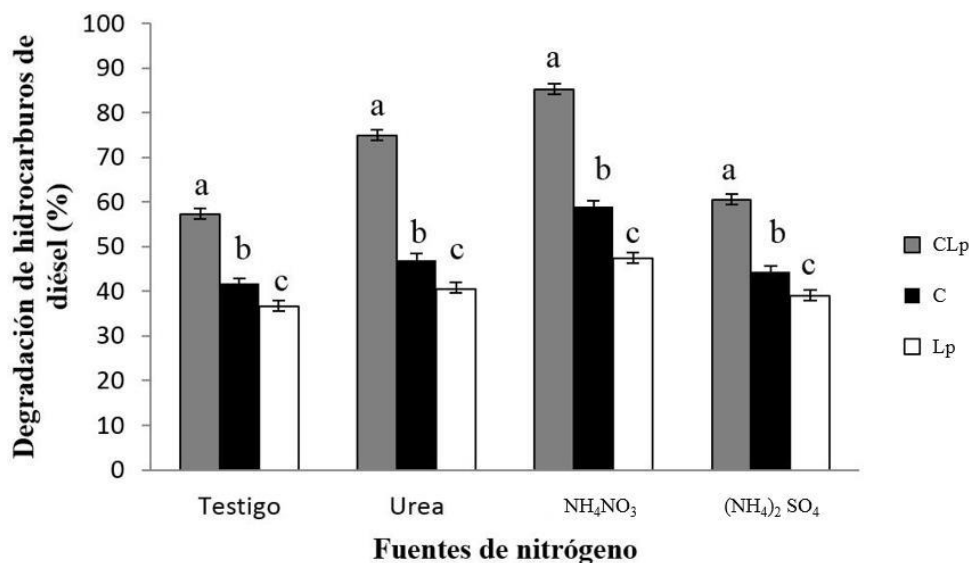


Figura 5.16. Porcentaje de degradación de hidrocarburos evaluado a 50 días del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con diésel ($10,000 \text{ mg kg}^{-1}$) utilizando *Lolium perenne* con bioestimulación y bioaumentación. Promedio \pm Error Estándar. Letras similares sobre las barras no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha = 0.05$). $n=3$. Abreviaturas: CLp) Consorcio bacteriano con Pasto con diésel; C) Consorcio sin Pasto con diésel; Lp) Pasto con diésel.

5.4 DISCUSIÓN

La bioaumentación y bioestimulación mejoran la fitorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo o con diésel, y con ello se puede reducir o eliminar el riesgo, su toxicidad y persistencia en los suelos y en el manto freático, además de reducir riesgos ambientales (Hernández y Mager, 2003; Latha et al., 2011).

El rango de pH observado para petróleo y diesel, fue de 7.86 a 8.87 y 7.85 a 8.9, respectivamente, lo cual, representó a un suelo alcalino (Castellanos et al., 2000). Por ello

la reducción observada de pH al final del ensayo de fitorremediación propició condiciones moderadamente alcalinas, favoreciendo el crecimiento de bacterias hidrocarbonoclastas inoculadas a través de los consorcios bacterianos aplicados. Tanto en suelo contaminado con petróleo o con diésel, la mayor reducción de pH se observó en urea y solución testigo en el tratamiento de consorcio con pasto sin contaminar (CLp) y en el consorcio con pasto contaminado con petróleo o con diésel (CLp 5P y CLp 10D), respectivamente. Lo cual, muestra el efecto benéfico de la aplicación de fertilizantes o fuentes de nitrógeno en plantas sometidas a estrés por efecto de hidrocarburos del petróleo (Hutchinson et al., 2001).

El rango de conductividad eléctrica (CE) varió entre 0.1 y 0.16 dS m⁻¹ al inicio y final del ensayo de fitorremediación, y a pesar de que la CE se redujo en las tres fuentes de nitrógeno y en el testigo en el tratamiento de Pasto sin contaminar (Lp) e incrementó ligeramente en los tratamientos contaminados con diésel, al final no influyó en la degradación de hidrocarburos. La reducción e incremento observado en el estudio, coincide con la variación irregular de la CE reportada por Martínez y López (2001).

El mayor porcentaje de materia orgánica (MO) observado en suelo contaminado con petróleo y diésel fue de 1.21% y 0.84%, respectivamente, lo cual confirma que el porcentaje de MO es proporcional al tipo y concentración de hidrocarburos (Martínez y López, 2001). Por otra parte, al final del ensayo de fitorremediación se observó una reducción de MO en las fuentes de nitrógeno y el testigo, en consorcios bacterianos con pasto contaminados con petróleo (CLp 5P) y diésel (CLp 10D), resultando mayor la reducción en el testigo y en NH₄NO₃. Por el contrario, el pasto sin consorcio contaminado con petróleo y diésel (Lp 5P y Lp 10D) presentó un incremento de MO en las cuatro fuentes de nitrógeno. Lo anterior, confirma el efecto benéfico de la aplicación de la

bioaumentación y bioestimulación en plantas sometidas a estrés por efecto de hidrocarburos del petróleo (Hutchinson et al., 2001).

El rango en la altura de plántulas de *Lolium perenne* fue mayor en la fitorremediación de suelo contaminado con diésel (10 a 23 cm) que con petróleo. De igual forma, el rango en la longitud de raíces de *L. perenne* fue mayor en la fitorremediación de suelo contaminado con diésel (8 a 15 cm) que con petróleo. Por tanto, la fitorremediación de suelo contaminado con diésel resulta ser más eficiente que con petróleo, lo cual se traduce en un mayor porcentaje de degradación de hidrocarburos de diesel, tal como lo observamos en nuestros resultados.

La biomasa seca total (BST) en la fitorremediación de suelo contaminado con petróleo presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos sin contaminar y los tratamientos contaminados con petróleo, por el contrario en la fitorremediación de suelo contaminado con diésel, no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$). La razón de ello, se debe a los rangos obtenidos de BST en suelo contaminado con petróleo (0.0528 a 2.8822 g) y con diésel (2.7594 a 2.9275 g). En ambos casos, el menor valor de BST observó en Pasto contaminado con petróleo o diésel y el mayor valor se presentó en el Consorcio con Pasto sin contaminar. La reducción de la biomasa seca en pasto contaminado, es debido a un efecto severo del contaminante como el diésel sobre la biomasa radicular debido a que éste se encuentra en contacto directo con la raíz (Kapustka y Reporter, 1998; Rentz et al., 2003).

El rango de bacterias totales (BT) con diésel (40×10^6 a 130×10^6 UFC g^{-1}) fue mayor en comparación a las BT con petróleo (12×10^6 a 55×10^6 UFC g^{-1}). Lo cual se tradujo en los mayores porcentaje de degradación de hidrocarburos de diésel en nuestro ensayo de fitorremediación. Por otra parte, se presentó una relación inversa con respecto al menor y

mayor número de BT en la fitorremediación de petróleo y diésel. Específicamente, la mayor población de BT en petróleo se presentó en los tratamientos sin petróleo, como era de esperarse, pero la mayor población BT en diésel se presentó en el Consorcio con Pasto contaminado con diesel. Lo cual, indica que el diésel no afectó el crecimiento de las unidades formadoras de colonias (UFC) del consorcio inoculado, lo cual sugiere fue utilizando como fuente de carbono y energía y/o aumentó la actividad de enzimas (peroxidasa, oxidasa, catecol oxidasa, entre otras) responsables de la degradación de hidrocarburos del diesel, induciendo a la vez resistencia al estrés provocado por el contaminante orgánico (Liu et al., 2004; Debiane et al., 2008; Tang et al., 2009).

El presente trabajo mostró resultados importantes en cuanto al porcentaje de degradación de hidrocarburos de petróleo y de diésel. El rango de degradación de hidrocarburos en diésel (36.6 a 85.2%) fue mayor en comparación con el petróleo (22 a 73.6%). En ambos casos, el menor porcentaje de degradación se observó en el testigo en el tratamiento pasto contaminado con petróleo o diésel (Lp) y el mayor porcentaje de degradación se presentó en NH_4NO_3 en el tratamiento consorcio con pasto contaminado con petróleo o diésel; CLp 5P o CLp 10D).

5.5 CONCLUSIONES

En el ensayo de fitorremediación de suelos contaminados con petróleo y diésel, el pH presentó una reducción en las tres fuentes de nitrógeno y el testigo. El mejor factor como fuente de nitrógeno se presentó al aplicar nitrato de amonio, el cual, combinado con el tratamiento consorcio bacteriano con pasto, produjo mayor longitud de raíz de plántulas en presencia de petróleo crudo o de diésel, mayor biomasa seca en plántulas sin contaminar, y mayor porcentaje de degradación de hidrocarburos del petróleo y diésel.

La altura y la longitud de raíces de las plantas presentaron diferencias significativas entre los tratamientos sin contaminar y los tratamientos contaminados con petróleo y diésel, respectivamente. El rango de la altura de plántulas fue mayor en el suelo contaminado con diésel (10 a 23 cm) en comparación con petróleo. El rango en la longitud de raíces fue mayor en el suelo contaminado con diésel (8 a 15 cm) que con petróleo.

El rango de bacterias totales (BT) con diésel (40×10^6 a 130×10^6 UFC g^{-1}) fue mayor en comparación al suelo con petróleo (12×10^6 a 55×10^6 UFC g^{-1}). Lo cual se tradujo en mayores porcentajes de degradación de hidrocarburos de diésel. El mayor porcentaje de degradación de diésel (85.2%) se obtuvo con NH_4NO_3 en el consorcio con pasto (CLp); el menor porcentaje degradación de diésel se presentó en pasto contaminado con diésel (36.6%) sin nitrógeno. El mayor porcentaje de degradación de petróleo 73.6% se presentó con NH_4NO_3 en el Consorcio con pasto (CLp), el menor porcentaje degradación de petróleo se presentó en Pasto contaminado con petróleo (22%) sin nitrógeno. El rango de degradación de hidrocarburos de diésel (36.6 a 85.2%) fue mayor en comparación con el porcentaje de degradación de petróleo (22 a 73.6%).

La bioaumentación y bioestimulación son alternativas importantes para mejorar la fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo y diésel, respectivamente.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

La Laguna de Términos es un ecosistema lagunar estuarino que se localiza frente a la Sonda de Campeche cerca de la zona de plataformas petroleras marinas, a sólo 80 km de distancia con la estructura de extracción más cercana de PEMEX. Lo anterior, justifica la condición de riesgo en la que se encuentran los ecosistemas de manglar en el estado de Campeche, por la industria petrolera.

Con base en que no se cuenta con suficientes trabajos de investigación de acerca de microbiología rizosférica y contaminación de manglares por derrames de hidrocarburos del petróleo en la laguna de Términos. El presente estudio tuvo como objetivo general, caracterizar microbiológicamente la rizósfera de las cuatro especies de mangle que predominan entorno a la laguna de Términos, para determinar su potencial biotecnológico dirigido a la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. La hipótesis probada en este trabajo se aceptó, al confirmar que los microorganismos rizosféricos del mangle rojo (*Rhizophora mangle*), mangle negro (*Avicennia germinans*), mangle blanco (*Laguncularia racemosa*) y mangle botoncillo (*Conacarpus erectus*) del estado de Campeche, tienen el potencial para utilizarse en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Lo anterior se fundamenta de acuerdo con las conclusiones obtenidas en el desarrollo del presente trabajo de investigación:

- a) Las poblaciones microbianas de las cuatro especies de mangle del estado de Campeche, mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$, ANOVA) entre ambas temporadas de lluvias y secas, presentando la estación de lluvias la mayor cantidad de UFC g^{-1} de suelo seco.

- b) La rizósfera de Mangle Blanco (*Laguncularia racemosa*) mostró valores altos en variables químicas del suelo, además de presentar la mayor población microbiana en comparación con las especies de manglares restantes.
- c) El análisis de componentes principales (ACP) indicó que las propiedades químicas como la materia orgánica y carbono orgánico total (CP1) y las propiedades de textura como arena y arcilla (CP2) fueron los componentes principales más significativos, representando el 85.3% de la variación total.
- d) Las poblaciones de microorganismos celulolíticos correlacionaron significativamente con la materia orgánica, nitrógeno total y carbono orgánico total; mientras que las bacterias fijadoras de nitrógeno, hongos totales, pectinolíticos y amilolíticos correlacionaron con fósforo total.
- e) La contribución científica de esta investigación está relacionada con la estimación de la presencia de grupos funcionales de microorganismos cultivables que pueden ser utilizados en otros enfoques biotecnológicos como producción de alimentos, detergentes, fármacos y en la recuperación de sitios contaminados con hidrocarburos.
- f) De un total de 86 bacterias hidrocarbonoclastas identificadas filogenéticamente de la rizósfera de cuatro especies de manglares del estado de Campeche, se seleccionaron las diez mejores cepas tolerantes en petróleo y diésel, de las cuales sobresalen por su porcentaje de degradación las siguientes especies: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Serratia*, *Providencia* y *Acinetobacter*.
- g) La rizósfera de mangle blanco mostró el mayor porcentaje de bacterias hidrocarbonoclastas seleccionadas en comparación con las especies de manglares restantes. La mejor bacteria hidrocarbonoclasta de petróleo crudo fue la cepa

MARW 27 (*Pseudomonas* sp.) y la mejor bacteria hidrocarbonoclasta de diésel fue la cepa MARW 25 (*Rhodococcus erythropolis*), bacterias que fueron catalogadas como hidrocarbonoclastas asimiladoras de nitrógeno (NA-HB).

- h) El porcentaje de degradación máximo de hidrocarburos del petróleo de la cepa MARW 27 (*Pseudomonas* sp.) fue del 88%, y el porcentaje de degradación máximo de diésel por la cepa MARW 25 (*Rhodococcus erythropolis*) fue del 94%.
- i) El árbol filogenético de la rizósfera de las cuatro especies de mangle del estado de Campeche quedó conformado por tres phyla. El phylum Proteobacteria con el mayor porcentaje de bacterias hidrocarbonoclastas (68.76%) de los géneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* *Serratia* y otras especies individuales; además de incluir a la mejor bacteria degradadora de petróleo (*Pseudomonas* sp). El phylum Firmicutes quedó definido por los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus* con el 25% de bacterias hidrocarbonoclastas. Finalmente, el phylum Actinobacteria quedo integrado por los géneros *Rhodococcus* y *Microbacterium* (6.24%), el cual incluyó a la mejor bacteria degradadora de diésel (*Rhodococcus erythropolis*).
- j) El mayor porcentaje de degradación de diésel (85.2%) se obtuvo con NH_4NO_3 en el consorcio con pasto (CLp); el menor porcentaje degradación de diésel se presentó en Pasto contaminado con diésel (36.6%) sin nitrógeno. El mayor porcentaje de degradación de petróleo 73.6% se presentó con NH_4NO_3 en el consorcio con pasto (CLp), y el menor porcentaje degradación de petróleo se presentó en pasto contaminado con petróleo (22%) sin nitrógeno. Por lo tanto, el rango de degradación de hidrocarburos de diésel (36.6 a 85.2%) fue mayor en comparación con el porcentaje de degradación de petróleo (22 a 73.6%).

- k) La bioaumentación y bioestimulación son alternativas importantes para mejorar la fitorremediación de suelo contaminado con petróleo crudo y diésel, respectivamente.

A partir de las conclusiones mencionadas se plantean las siguientes perspectivas. Con respecto a los grupos de microorganismos funcionales cultivables y aislados de la rizósfera del manglar se sugiere explotar su potencial biotecnológico en el sector industrial, agrícola y ambiental, y de manera puntual la capacidad de las cepas hidrocarbonoclastas para tolerar petróleo y diesel. Lo anterior permitirá desarrollar investigación relacionada con la biorremediación y fitorremediación de hidrocarburos del petróleo no sólo a pequeña escala en laboratorios, sino aprovechar el “laboratorio natural” disponible en los ecosistemas de manglar como lo es Laguna de Términos del estado de Campeche.

- Con base en el potencial biotecnológico del manglar del estado de Campeche, se sugiere concretar la identificación molecular de microorganismos con actividad funcional específica, y determinar su potencial para la extracción de enzimas de aplicación en la industria de los alimentos y farmacéutica, y para uso ambiental.
- Realizar estudios en el suelo y sedimento rizosférico de las cuatro especies de mangle para aislar e identificar bacterias sulfato reductoras y metanogénicas como una alternativa para la búsqueda de microorganismos hidrocarbonoclastas anaeróbicos.
- Determinar algunas funciones enzimáticas adicionales de los microorganismos rizosféricos aislados del manglar de Campeche.
- Probar la capacidad de las bacterias hidrocarbonoclastas seleccionadas en ensayos de biorremediación y fitorremediación *in situ* asociadas con plantas de mangle.

- Probar la capacidad de las bacterias hidrocarbonoclastas seleccionadas en ensayos de biorremediación y fitorremediación de otros compuestos orgánicos (fluidos de perforación, plaguicidas, bifenilos policlorados, explosivos, etc.), y de elementos potencialmente tóxicos que se puedan encontrar depositados en ecosistemas de manglar.
- Probar la capacidad de consorcios mixtos de bacterias aisladas del manglar con hongos filamentosos y hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en ensayos de biorremediación y fitorremediación.
- Con base en los ensayos anteriores contribuir en la creación y evaluación de formulaciones de inoculantes agrícolas e industriales.

LITERATURA CITADA

- Abramson, D., Hulasare, R., White, D.G., Jayas, D.S., Marquard, R.R., 1999. Mycotoxin formation in hulless barley during granatary storage at 15 and 19% moisture content. *J. Stored. Prod. Res.* 35, 297-305.
- Aburto-Oropeza, O., Ezcurra, E., Danemann, G., Valdez, V., Murray, J., Sala, E., 2008. Mangroves in the Gulf of California increase fishery yields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 10456-10459.
- Aeppli, C., Carmichael, C.A., Nelson, R.K., Lemkau, K.L., Graham, W.M., Redmond, M.C., Valentine, D., Reddy, C.M., 2012. Oil weathering after the Deepwater Horizon disaster led to the formation of oxygenated residues. *Environ. Sci. Technol.* 46, 87-99.
- Agnello, M.A., 2000. Petroleum derive spray soils: Chemistry, history, refining and formulation. Cornell edition. Cornell University. New York state. USA. p 15
- Alexander, M., 1994. Biodegradation and bioremediation. Academic Press, San Diego.
- Allison, L.E., Moodie, C.D., 1965. Carbonate, in: Black, C.A., Evans, D.D., White, J.J., Ensminger, I.E., Clark, F.E. (eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2, Agron.* 9, 1379-1396, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.
- Alongi, D.M., Boto, K.G., Tirendi, F., 1989. Effect of exported mangrove litter on bacterial productivity and dissolved organic carbon fluxes in adjacent tropical nearshore sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 56, 133-144.
- Alongi, D.M., Christoffersen. P., Tirendi, F., 1993. The influence of forest type on microbial-nutrient relationships in tropical mangrove sediments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 171, 201-223.
- Alongi, D.M., 1994. The role of bacteria in nutrient recycling in tropical mangrove and other coastal benthic ecosystems. *Hydrobiology.* 285, 19-32.
- Alongi, D.M., 2002. Present state and future of the world's mangrove forests. *Environ. Conserv.* 29, 331-349.
- APHA, American Public Health Association, 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th Edn. in: Franson, M.A.H., Clesceri, L.S., Greenberg, A., Eaton, A.D., (Eds.) APHA, Washington, D.C., USA.
- Aniszewski, E., Peixito, R.S., Mota, F.F., Leite, S.G.F., Rosado, A.S., 2010. Bioemulsifier production by *Microbacterium* sp. strains isolated from mangrove and their application to remove cadmium and zinc from hazardous industrial residue. *Brasilian J. Microbiol.* 41, 235-245.
- ATSDR, 2005. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): Department of Health Human Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Atlas, R.M., Hazen, T.C., 2011. Oil biodegradation and Bioremediation; A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. *Environ. Sci. Technol.* 45, 6709 - 6715.

- Baars, B.J., 2002. The wreckage of the oil tanker “Erika”- Human health risk assessment of beach cleaning, sunbathing, and swimming. *Toxicol. Lett.* 128, 55-68.
- Balanchandran, C., Duraipandiyar, V., Balakrishna, K., Ignacimuthu, S., 2012. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Biores. Technol.* 112, 83 – 90.
- Bashan, Y., Holguin, G., 1998. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria in to two classification: biocontrol – PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1225-1228.
- Bashan, Y., Puente, M.E., Myrold, D.D., Toledo, G., 1998. In vitro transfer of fixed nitrogen from diazotrophic filamentous cyanobacteria to black mangrove seedlings. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 165-170.
- Bashan, Y., Holguin, G., 2002. Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. *Trees-Struct. Funct.* 16, 159-166.
- Bashan, Y., Kamnev, A.A., de-Bashan, L.E., 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biol. Fertil. Soils.* 49, 465-479.
- Beltran, J., Villasol, A., Botello, A.V., Palacios, F., 2005. Condición actual del ambiente marino-costero de la región del gran Caribe. In: Botello, A.V., Rendon-von Osten, J., Gold-Bouchot, G., Agraz-Hernandez, C., (Eds.). *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias.* 2^a. Edición. Universidad Autónoma de Campeche. 696p.
- Bento, F.M., Camargo, F.O., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T., 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour. Technol.* 96, 1049-1055.
- Bernard, D., Jeremie, J.J., Pascaline, H., 1995. First assessment of hydrocarbon pollution in a mangrove estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 146-150.
- Bernard, D., Pascaline, H., Jeremie, J.J., 1996. Distribution and origin of hydrocarbons in sediments from lagoons with fringing mangrove communities. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 734-739.
- Bjorlykke, K., 2011. *Petroleum Geoscience: From Sedimentary Environments to Rock Physics.* Springer, New York. 517 pp.
- Boer, B., 1996a. Increased soil temperatures in salt marshes and mangroves after the 1991 Gulf War Oil Spill. *Fresen. Environ. Bull.* 5, 442-447.
- Bojes, H.K., Pope, P.G., 2007. Characterization of EPA’s 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. *Regul. Toxicol. Pharm.* 47, 288-295.

- Botello, A. V., C. González, C., Díaz, G., 1991. Pollution by petroleum hydrocarbons in sediment from continental shelf of Tabasco state, México. *B. Environ. Contam. Tox.* 47, 565-571.
- Botello, A. V., Villanueva, S., Mendelewicz, M., 1987. Programa de vigilancia de los hidrocarburos fósiles en sedimentos del Golfo de México y Caribe Mexicano, 1978-1984. *Caribbean J. Sci.* 23, 29-40.
- Botello, A. V., 1996. Características composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo, p. 203-210. In: A. V. Botello, J. L. Rojas-Galaviz, J. A. Benítez y D. Zarate-Lomelí (Eds.) *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnostico y Tendencias*. EPOMEX Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche, México, 666 p.
- Botello, A.V., Paez-Osuna, F., 1986. *El Problema Crucial: La Contaminación*. Serie Medio Ambiente en Coatzacoalcos Centro de Ecodesarrollo. México. 180 p.
- Bouchez, A., Pascault N., Chardon N., Bouvy C., Cecch M., Lambs P., Herteman L., Fromard M., Got, P. F., Leboulanger, C., 2013. Mangrove microbial diversity and the impact of trophic contamination. *Mar. Pollut. Bull.* 66, 39–46
- Bouillon, S., Borges, A.V., Diele, K., Dittmar, T., Duke, N.C., Kristensen, E., Lee, S.Y., Marchand, C., Middelburg, J.J., Rivera-Monroy, V.H., Smith-III, T.J., Twilley, R.R., Cataneda-Moya, E., 2008. Mangrove production and fate: a revision of budget estimates. *Global. Biogeochem. Cycles.* 22, GB2013, doi: 10.1029/2007GB003052.
- Bouyoucos, G.J., 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soil. *Agron. J.* 54, 464-465.
- Brito, E.M., Guyoneaut, R., Goñi-Urriza, M., Ranchou-Peyruse, A., Verbaere, A., Crapez, M.A.C., 2006. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Res. Microbiol.* 157, 752-762.
- Burns, K. A., Garrity, S. D., Jorissen, D., MacPherson, J., Stoelting, M., Tierney, J. and Yelle-Simmons, L., 1994. The Galeta oil spill II. Unexpected persistence of oil trapped in mangrove sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 38, 349-364.
- Castellanos, J.Z., Uvalle, J.X., Aguilar, A., 2000. *Manual de interpretación de análisis de suelo y agua*. 2ª. edición. Instituto Nacional de Capacitación (INCAPA). Celaya, Guanajuato, México. 200 p.
- Carmo, F.L., Fragoso dos Santos, H., Ferreira Martins, E., Van Elsas, J. D., Soares Rosado, A., Silva Peixoto, R., 2011. Bacterial structure and characterization of plant growth promoting and oil degrading bacteria from the rhizospheres of mangrove plants. *J. Microbiol.* 49, 535-543.
- Celis, L., Botello, A.V., Mendlewicz, M., Díaz, G., 1987. Actividades del proyecto CARIPOL en la zona costera de México: I. Hidrocarburos disueltos. *Caribbean J. Sci.* 23, 11-18.
- Cerniglia, C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 3, 351-368.

- Cheng, E.H., Lin, P.H., Su, P.R., 2010. The effects of salts and grease on BTEXs gas/sweat equilibrium partition: the effects on human BTEX dermal exposures. *Human Ecol. Riks Assess.* 16, 199-209.
- CONABIO, 2008. Manglares de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 1-35p.
- Conn, E. E., Stumpf, P.K., Bruening, G., Doi, R.H., 2000. *Bioquímica fundamental*. Quinta edición en inglés. Limusa. México, D. F.
- Contreras, F., 1985. *Las lagunas costeras mexicana*. México D.F.: Centro de Ecodesarrollo y Secretaria de Pesca, pp. 253.
- Clough, B.F., 1991. Primary productivity and growth of mangrove forests, in: *Coastal and Estuarine studies. Tropical Mangrove ecosystems*. (Eds.), Robertson, A.I., Alongi, D.M., American Geophysical Union. 225 – 249 pp. Washington DC, USA.
- Davis, L.C., Castro-Diaz, S., Zhang, Q., Erickson, L.E., 2002. Benefits of vegetation for soils with organic contaminants. *Critical Rev. Plant Sc.* 21, 457-491.
- Decho, A.W., 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Con. Shelf. Res.* 20, 1257–1273
- Dias, A.C.F., Andreote, F.D., Dini Andreote, F., Lacava, P.T., Sá, A.L., Melo, I.S., Azevedo, J.L., Araújo, W.L., 2009. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. *World J. Microb. Biot.* 25, 1305-1311.
- Day Jr, J.W., Conner, W., Ley-Lou, F., Day, R., Navarro, A.M., 1987. The productivity and composition of mangrove forests in Terminos Lagoon, México. *Aquat. Bot.* 27, 267-284.
- Day Jr, J.W., Coronado-Molina, C., Vera-Herrera, F.R., Twilley, R., Rivera-Monroy, V.H., Alvarez-Guillen, H., Day, R., Conner, W., 1996. A 7 year record of above-ground net primary production in a southeastern Mexican mangrove forest. *Aquat. Bot.* 55, 39-60.
- de-Bashan, L.E., Hernández J.P., Bashan Y., 2012. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. *App Soil. Ecol.* 61, 171-189.
- Debiane, D., Gracon, G., Verdin, A., Fontaine, J., Duand, R., Grandmougin-Ferjani, A., Shirali, P., Sahraoui, A.L., 2008. In vitro evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environ. Exp. Bot.* 64, 120-127.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2013. *InfoStat*, versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Duke, N.C., Meynecke, J.O., Dittman, S., Ellison, A.M., Anger, K., Berger, U., Cannicci, S., Diele, K., Ewel, K.C., Field, C.D., Koedam, N., Lee, S.Y., Marchand, C., Nordhaus, I., Dahdouh-Guebas, F., 2007. A world without mangroves?. *Science.* 317, 41-42.

- El-Tarabily, K.A., Youssef, T., 2010. Enhancement of morphological, anatomical and physiological characteristics of seedlings of the mangrove *Avicennia marina* inoculated with a native phosphate-solubilizing isolate of *Oceanobacillus picturata* under greenhouse conditions. *Plant. Soil.* 332, 147-162.
- Ellison, A. M., Farnsworth, E. J., Meritt, R. E., 1999. Origins of mangrove ecosystems and the mangrove biodiversity anomaly. *Global Ecol. Biogeography* 8, 95-115.
- EPA, 2005. Agencia de Protección ambiental de Estados Unidos. <http://www.epa.gov/>
- Felsenstein, F., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39, 783-791.
- Feller, I.C., Lovelock, C.E., Berger, U., McKee, K.L., Joye, S.B., Ball, M.C., 2010. Biocomplexity in mangrove ecosystems. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 395–417.
- Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Mendoza-López M. R., Sangabriel W., Trejo-Aguilar D., Cruz-Sánchez J. S., López-Ortiz C., Delgadillo-Martínez J., 2007. “Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica”. *Agrociencia*, 41, 817-826.
- Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., 2013. Microorganismos rizosféricos durante la fitorremediación de hidrocarburos del petróleo en suelos. In: Alarcón, A., (Ed.). *Biorremediación de suelos y aguas*. Editorial Trillas, Mexico. pp. 15-30.
- Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa N. G., Poggi-Varaldo H. M., Alarcón A., Cañizares-Villanueva R. O., 2006. “Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos de petróleo y otros compuestos orgánicos”. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48, 179-187.
- Fingas, M., 2000. *Basics of Oil Spill Cleanup*. 2a. ed. CRC Press LLC. Boca Raton, Florida, USA.
- Flores-Mireles, A.L., Winans, S.C., Holguin, G., 2007. Molecular characterization of diazotrophic and denitrifying bacteria associated with mangrove roots. *App. Environ. Microbiol.* 73, 7308-7321.
- Fuentes-Yaco, C., de León, D.S., Monreal-Gomez, M.A., Vera-Herrera, F., 2001. Environmental forcing in tropical estuarine ecosystem: the Palizada river in the southern Gulf of México. *Mar. Freshwat. Res.* 52, 735-744.
- Garbisu, C., Amézaga, L., Alkorta, I., 2002, *Biorremediación y Ecología*. *Rev. Ecosist.*, 11, 3-10.
- González-Acosta, B., Bashan, Y., Hernández-Saavedra, N.Y., Ascencio, F., De la Cruz-Agüero, G., 2006. Seasonal seawater temperature as the major determinant for populations of culturable bacteria in the sediments of an intact mangrove in an arid region. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55, 311-321.
- Gomes, N.C.M., Cleary, D.F.R., Pinto, F.N., Egas, C., Almeida, A., 2010. Taking Root: Enduring Effect of Rhizosphere Bacterial Colonization in Mangroves. *PLoS ONE* 5, 4065-4070.
- Gómez, G., 2004. *Recuperación de espacios degradados*. Editorial Mundi Prensa. Barcelona, España. 191-241p.

- Grant, D. L., Clarke, E. J. and Allaway, W. G., 1993. The response of grey mangrove, *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. seedlings to spills of crude oil. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 71, 273-295.
- Gutiérrez, C.C., Zavala C.J., 2002. Rasgos hidromórficos de suelos tropicales contaminados con hidrocarburos. *Terra Latinoam.* 20, 101-111.
- Guo, C.L., Zhou, H.W., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2005. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 1054-1061.
- Guzmán-Vega, M., Mello, M.R., 1999. Origin of oil in the southeast Basin, México. *The American Association of Petroleum Geologists Bulletin.* 83, 1068-1095.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 410, pp.95-98.
- Head, I.M., Jones, D.M., Rosling, W.F.M., 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 163-182.
- Hernández, A. E., Ferrera-Cerrato, R., Fernández L., Rodríguez V.R., 2000. Nitrogen-fixing free bacteria and fungi-hidrocarbonoclast from the rhizosphere of *Chamaecrista nictitans* and *Panicum* sp. Under petroleum pollution. pp. 21-25. In: L. Sylvie B., N. Rojas and R. Quintero (eds.). *First International Conference on Petroleum Biotechnology state of the art and perspectives.* Instituto Mexicano del Petróleo. México, D. F.
- Hernández, V.I., Mager, D., 2003. Uso de *Panicum máximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con petróleo crudo ligero. *Bioagro.* 15, 149-155.
- Holguin, G., Guzman, M.A., Bashan, Y., 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: Their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 101, 207-216.
- Holguin, G., Bashan, Y., 1996. Nitrogen-fixing by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.) *Soil. Biol. Biochem.* 28, 1651-1660.
- Holguin, G., Vazquez, P., Bashan, Y., 2001. The role of sediments microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biol. Fert. Soils.* 33, 265-278.
- Holguin, G., Bashan, Y., 2007. La importancia de los manglares y su microbiología para el sostenimiento de las pesquerías costeras. In: *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo.* (Eds.), Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Chapter 10. Published by: Editorial Trillas, México City, México. pp. 239-253.
- Hutchinson, S.L, Banks, M.K., Schwab, A.P., 2001. Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effect of inorganic fertilizer. *J. Environ. Qual.* 30, 395-403.
- IMP, 2013. Instituto Mexicano del Petróleo. Clasificación del petróleo. <http://www.imp.mx/petroleo/?imp=tipos>

- IOCARIBE, 1997. Regional Marine Pollution Emergency. Information and training center wide Caribbean. COI/REMPEITC/Caribbean. 43 p.
- Jiménez, B.E., 2002. Contaminación ambiental en México. Editorial Limusa S.A. de C.V. 1ª. Edición. pp 641-650.
- Jones, K. 1992. Diurnal nitrogen fixation in tropical marine cyanobacteria: a comparison between adjacent communities of nonheterocystous *Lyngbya* sp. and heterocystous *Calothrix* sp. Br. Phycol. J. 27,107-118.
- Kapustka, L., Reporter, M., 1998. Terrestrial primary producer. In: Handbook of ecotoxicology. P. Calow (Ed.). Blackwell Science, Oxford. 1, 280-294 p .
- Kathiresan, K., Bingham, B.L., 2001. Biology of Mangroves and Mangrove Ecosystems. Adv. Mar. Biol. 40, 84-193.
- Kathiresan, K., Masilamani Selvam, M., 2006. Evaluation of beneficial bacteria from mangrove soil. Bot. Mar. 49, 86-88.
- Keum, Y.S., Seo, J.S., Hu, Y., Li, Q.X., 2006 Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C.4. App. Microbiol. Biotechnol. 71, 930-941.
- Kirk, J. L., J. N. Klironomos, H. Lee y J. T Trevors,. 2002. "Phytotoxicity assay to assess plant species for phytoremediation of petroleum-contaminated soil". J. Bioremed. 6, 57-63.
- Klekowski, E. J., Lowenfeld, R., Hepler, P. K., 1994a. Mangrove genetics: II. Outcrossing and lower spontaneous mutation rates in Puerto Rican *Rhizophora*. Int. J. Plant Sci. 155, 373-381.
- Kohlmeyer, J., Bebout, B., Volkmann-Kohlmeyer, B., 1995. Decomposition of mangrove wood by marine fungi and teredinids in Belize. Mar. Ecol. 16, 27-39.
- Lageiro, M.M., Moura, M.J., Reis, A., Ferreira, M.J.C., 2007. Microbial proteases application in leather industry. J. Biotechnol. 131, S239–S240.
- Lamparelli, C. C., Rodrigues, E O. and de Moura, D. O., 1997. A long-term assessment of an oil spill in a mangrove forest in Sao Paulo, Brazil. In "Mangrove Ecosystem Studies in Latin America and Africa" (B. Kjerfve, L. D. Lacerda and S. Diop, eds), pp. 191-203. UNESCO, Paris.
- Latha, P., Anand, T., Prakasam, V., Jonathan, E.I., Paramathma, M., Samiyappan, R., 2011. Combining *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Trichoderma* strain with organic amendments and micronutrient to enhance suppression of collar and root rot disease in physic nut. App. Soil. Ecol. 49, 215-223.
- Levine, M., 1953. An introduction to laboratory technique in bacteriology, 3rd ed. The Macmillan Company, New York, N.Y., USA.
- Levings, S. C. and Garrity, S. D., 1994. Effects of oil spills on fringing red mangroves (*Rhizophora mangle*): Losses of mobile species associated with submerged prop roots. Bull. Mar. Sci. 54, 782-794.
- Levings, S. C., Garrity, S. D. and Burns, K. A., 1994. The Galeta oil spill. 3. Chronic reoiling, long-term toxicity of hydrocarbon residues and effects on epibiota in the mangrove fringe. Estuar. Coast. Shelf. Sci. 38, 365-395.

- Lewis, R.R., 2005. Ecological engineering for successful management and restoration of mangrove forest. *Ecol. Eng.* 24, 403-418.
- Lewis, M., Pryor, R., Wilking, L., 2011. Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: a review. *Environ. Pollut.* 159, 2328–2346.
- Liu, S.L., Luo, Y.M., Cao, Z.H., Wu, L.H., Ding, K.Q., Cristie, P., 2004. Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mucorrhizal alfalfa. *Env. Geochem. Hlth.* 26, 285-293.
- Mackey, A. P. and Hodgkinson, M., 1996. Assessment of the impact of naphthalene contamination on mangrove fauna using behavioral bioassays. *Bull. Environ. Cont Toxicol.* 56, 279-286.
- Malallah, G., M. Afzal, S. Gulshan, D. Abraham, M. Kurgan y M. s. I. Dhabi., 1996. “*Vicia faba* as a bioindicator of oil pollution”. *Environ. Pollut.* 92, 213-217.
- Martin, E, Dutriex, E. and Debry, A., 1990. Natural recolonization of achronically oil-polluted mangrove soil after a depollution process. *Oceanogr. Shorel. Manage.* 14, 173-190.
- Martínez, M.V., López, F.S., 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra Latinam.* 19, 9-17.
- Mastaller, M., 1996. Destruction of mangrove wetlands - causes and consequences. *Natl Res.Dev.* 43, 37-57.
- Merkl, N., R. Schultze-Kraft y C. Infante., 2005a. “Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils”. *Water. Air. Soil. Pollut.* 165, 195-209.
- McNutt, M.K., Camilli, R., Crone, T.J., Guthrie, G.D., Hsieh, P.A., Ryerson, T.B., Savas, O., Shaffer, F., 2011. Review of flow rate estimates of the Deepwater Horizon oli spill. *Proc.Natl.Acad.Sci.*
<http://www.pnas.org/content/early/2011/12/19/1112139108.full.pdf+html>
- Muñoz, D., Guiliano, M., Doumenq, E, Jacquot, F., Scherrer, E., Mille, G., 1997. Long term evolution of petroleum biomarkers in mangrove soil (Guadeloupe). *Mar. Pollut. Bull.* 34, 868-874.
- Mitra, A., Chandra Santra, S., Mukherjee, J., 2008. Distribution of actinomycetes, their antagonistic behavior and the physico-chemical characteristics of the world’s largest tidal mangrove forest. *Appl. Microbiol. Biot.* 80, 685-695.
- Morrison, T.R., Boyd, R.N., 1973. *Organic Chemistry*. 3rd edition. Allyn and bacon (Eds.). Boston, Mass, USA. pp 1258.
- Mueller, J.G., Cerniglia, C.E., Pritchard, P.H., 1996. Biodegradation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. pp 125-194. In: Crawford. R.L., Crawford. D.L (eds.). *Bioremediation principles and applications*. Biotechnology Research. Serie:6. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Muyzer, G., Dewaal, E. C., Uitterlinden, A. G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *App. Env. Microbiol.* 59, 695-700.

- Nelson-Smith, A., 1972. Oil Pollution and Marine Ecology. Elek. Sci. London.
- Newman, L.A., Reynolds, C.M., 2004. Phytoremediation of organic compounds. *Curr. Opin. Biotech.* 15, 225-230.
- NOAA. 2002. Oil Spills in Mangroves: Planning and response considerations. Washington, DC.
- NOAA. 2010. National Oceanic and Atmospheric Administration. Deepwater Horizon /BP Oil Spill, Brooks McCall Cruise 5 – May 30, 2010. NOAA Science Missions and Data, U.S. <<http://www.noaa.gov/sciencemissions/bpoilspill.html>>
- Odum, W.E., Heald, E.J., 1975a. Mangrove forests and aquatic productivity, in: Hasler A.D., (Ed.), *Coupling of land and water systems; Ecological studies*. New York, Springer Verlag, pp. 129-136.
- Odum, W.E., Heald, E.J., 1975b. The detritus-based food web of an estuarine mangrove community, in: Ronin, L.T., (Ed.), *Estuarine Research*, New York, Academic Press, pp. 265-286.
- Olsen, S.R., Dean, L.A., 1965. Phosphorus, in: Black, C.A., (ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 2*, Agron. 9, 1035-1049, American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.
- Paetz, A., Wilke, B.M., 2005. Soil Sampling and Storage, *Soil Biology* 5, 1-45, in: Margesin, R., Schinner, F., (Eds.), *Manual of soil analysis- Monitoring and Assessing soil bioremediation*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 366.
- Pardo, C.J., Perdomo, R.C., Benavides, L.M., 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Nova*. 2, 44-49.
- Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Taketani, R. G., 2008. Brioprospeccao da diversidade microbiana cultivável e nao cultivável. In: I.S. de Melo and J. L. de Azevedo (Eds.), *Microbiología Ambiental*. pp. 83-106. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente.
- Peixoto, R., Chaer, G.M., Carmo, F.L., Araujo, F.V., Paes, J.E., Volpon, A., Santiago, G.A., Rosado, A.S., 2011. Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangrove sediment. *Antonie Van Leeuwenhoek. Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 99, 341–354.
- PEMEX, (Petróleos Mexicanos), 1998. El petróleo. Edición editada por H. Covantes. México, D.F. 176 p.
- PEMEX, (Petróleos Mexicanos), 2013. Comisión Nacional de Hidrocarburos. Consultado 17 de marzo de 2014. www.cnh.gob.mx/portal/default.aspx?id=5100
- Penha-Lopes, G., Torres, P., Cannicci, S., Narciso, L., Paula, J., 2011. Monitoring anthropogenic sewage pollution on mangrove creeks in southern Mozambique: a test of *Palaemon concinnus* Dana, 1852 (Palaemonidae) as a biological indicator. *Environ. Pollut.* 159, 636–645.
- Pikovskaya, R.I., 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiol.* 17, 362-370. [This publication is in Russian].

- PNUMA, 1994. Perspectiva regional sobre las fuentes de contaminación de origen terrestre en la región del gran Caribe. Informe Técnico del PAC No. 33. Programa del Caribe. pp. 61.
- Pilon-Smits, E., 2005. "Phytoremediation". *Annu. Rev. Plant. Biol.* 56, 15-39.
- Ponce-Vélez, G., Botello, A.V., 2005. Niveles de hidrocarburos en el Golfo de México, p. 269-298. *In: A.V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 p.*
- Proffitt, C. E., Devlin, D. J., Lindsey, M., 1995. Effects of oil on mangrove seedlings grown under different environmental conditions. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 788-793.
- Purushothaman, A., Meenatchi, P., Saravanan, N., 2010. Biodegradation of some aromatic hydrocarbons (Toluene and Xylene) by a bacterial strain isolated from petroleum contaminated site in Chennai. *Asian J. Biol. Sci.* 5, 206-210.
- Raghukumar, S., Sharma, S., Raghukumar, C., Sathe-Pathak, V., Chandramohan D., 1994. Thraustochytrid and fungal component of marine detritus, IV, Laboratory studies on decomposition of leaves of the mangrove *Rhizophora apiculata* Blume. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 183, 113-131.
- Rennie, R.J., 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can. J. Microbiol.* 27, 8-14.
- Rentz, A.J., Chapman, B., Álvarez, P.J., Schnoor, J.L., 2003. Stimulation of hybridolopular growth in petroleum contaminated soils through oxygen addition and soil nutrient amendments. *Int. J. Phytorem.* 5, 57-72.
- Ryerson, T.B., Camilli, R., Kessler, J.D., Kujawinski, E.B., Valentine, D.L., Atlas, E., Blake, D.R., de Gouw, J., Meinardi, S., Peischl, J., Seewald, J.S., Warneke, C., 2012. Chemical data quantify Deepwater Horizon Hydrocarbon flow rate and environmental distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 10.1073/pnas.1110564109.
- Rivera-Cruz, M.C., 2001. Microorganismos rizosféricos de los pastos alemán y cabezón en la degradación de petróleo crudo y benzo(a)pireno. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados Ciencias Agrícolas. Montecillo estado de México. 348 pag.
- Rivera-Monroy, V.H., Twilley, R.R., 1996. The relative role of denitrification and immobilization in the fate of inorganic nitrogen in mangrove sediments (Términos Lagoon, Mexico). *Limnol. Oceanogr.* 41, 284-296.
- Rojas, A., Holguin, G., Glick, B.R., Bashan, Y., 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N₂-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 181-187.
- Rueda-Puente, E., Castellanos, T., Troyo-Dieguez, E., Díaz de Leon-Alvarez, J.L., Murillo-Amador, B., 2003. Effects of a nitrogen-fixing indigenous bacterium (*Klebsiella pneumoniae*) on the growth and development of the halophyte *Salicornia bigelovii* as new crop for saline environments. *J. Agron. Crop. Sci.* 189, 323-332.

- Sahoo, K., Dhal, N.K., 2009. Potential microbial diversity in mangrove ecosystem: A review. *Indian. J. Mar. Sci.* 38, 249-256.
- Salanitro, J. P., Dorn, P. B., Huesemann, M. H., Moore, K. O., Rhodes, I. A., Jackson, L. M. R., Vipond, T. E., Western, M. M., Wisniewski, H. L., 1997. "Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment". *Environ. Sci. Technol.* 31, 1769-1776.
- Salihi A., Alam M.Z., Abdulkarim M.I., Salleh, H.M., 2012. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resour. Conserv. Recy.* 58, 36-44.
- Sammarco, P.L., Kolian, S.R., Warby, R.A.F., Bouldin, J.L., Subra, W.A., Porter, S.A., 2013. Distribution and concentration of petroleum hydrocarbons associated with the BP/Deepwater Horizon Oil Spill, Gulf of Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 73, 129-143.
- Sánchez-Páez, H., Ulloa-Delgado, G., Álvarez-León, R., 2000b. Hacia la recuperación de los manglares del Caribe de Colombia. Ministerio del Medio Ambiente, ACOFORE, OIMT. Bogotá D.C. 290 p.
- Sangabriel, W., Ferrera-Cerrato, R., Trejo-Aguilar, D., Mendoza-Lopez, M.R., Cruz-Sanchez, J. S., Lopez-Ortiz C., Delgadillo-Martinez J., Alarcon A., 2006. "Tolerancia y fitorremediación de suelo contaminado con combustóleo por seis especies vegetales". *Rev. Inter. Contam. Amb.* 22, 63-73.
- Santos, A.L., Peixoto, R., Rosado, A., 2009. New approaches to understanding microbial diversity in wastewater, landfills and leachate treatment. *Oecologia Brasilensis.* 13, 631-648.
- Santos, H. F., Carmo, F. L., Paes, J. E. S., Rosado, A. S., Peixoto, R. S., 2011. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. *Water. Air. Soil. Pollut.* 216, 329-350.
- Schlöter, M., Dilly, O., Much, J., 2003. Indicators for evaluating soil quality. *Agr. Ecosyst. Environ.* 98, 255-262.
- Schnatter, A.R., Rosamilia, K., Wojcik, N.D., 2005. Review of the literature on benzene exposure and leukemia subtypes. *Chem. Biol. Interact.* 2005, 153-154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2005.03.039>.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Programa Nacional de Remediación de Sitios Contaminados. Consultado en diciembre, 2013; <http://www.semarnat.gob.mx>
- Sengupta, A., Chaudhuri, S., 1990. Halotolerant rhizobium strains from mangrove swamps of the Ganges River Delta. *Indian J. Microbiol.* 30, 483-884.
- Siciliano, S. D., Fortin, N., Mihoc, A., Wisse, G., Labelle, S., Beaumier, D., Oullette D., Roy, R., White, L. G., Banks, M. K., Schwab, P., Lee, K., Greer, C. W., 2001. "Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination". *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2469-2475.

- Sierra, G.A., 1957. A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* 23, 15-22.
- Singh, A., Kuhad, R.C., Shareefdeen, Z., Ward, O.P., 2004. Methods for monitoring and assessment of bioremediation processes. In: *Biodegradation and Bioremediation*. Singh, A. and Ward, O.P (eds.), Germany, pp. 279-304.
- Sivaramakrishnan, S., Gangdharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, K.M., Pandey, C.R.A., 2006. α -Amylases from microbial sources—an overview on recent developments. *Food. Technol. Biotech.* 44, 173–184.
- Spalding, M., Kainuma, M., Collins, L., 2010. *World Atlas of Mangroves*. Earthscan, London, Washington, DC. pp.319.
- Srinivasan Bharathkumar, N., Rameshkumar, D.P., Prabavathy, V.R., Sudha, N., 2008. Characterization of the predominant bacterial population of different mangrove rhizosphere soils using 16S rRNA gene-based single-strand confirmation polymorphism (SSCP). *World. J. Microbi. Biot.* 24, 387-394.
- Stotzky, G., 1993. Soil as environment for microbial life. In: van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H., (Eds.), *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, New York, pp 1-20.
- Sumaya, K., Yamamoto, H., Naganawa, T., Iwata, T., Komada, H., 1993. A plate count method for aerobic cellulose decomposers in soil by congo red staining. *Soil. Sci. Plant. Nutr.* 39, 361-365.
- Sundararaman, M., Boopathi, T. Gopinath, S., 2007. Status of mangrove ecosystem: exploring the potential role of cyanobacteria in restoration and afforestation. In: Seckbach, J. (Ed.), *Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments: Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Springer Heidelberg, Berlin. 11, pp. 209-224.
- Susarla, S., Medina, V. F., McCutcheon, S. C., 2002. “Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination” *Ecol. Engineer.*, 18, pp. 647-658.
- Taketani, R.G., dos Santos, H.F., van Elsas, J.D., Rosado, A.S., 2009. Characterisation of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. *Antonie van Leeuwenhoek.* 96, 343-354.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.
- Tang, M., Chen, H., Huang, J.C., Tian, Z.Q., 2009. AM fungi effect on the growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. *Soil. Biol. Biochem.* 41, 936-940.
- Teng, Y., Luo, Y., Sun, M., Liu, Z., Li, Z., Christie, P., 2010. Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresour Technol.* 10, 3437-3443.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 2, 4673-4680.
- Toledo, G., Bashan, Y., Soeldner, A., 1995. Cyanobacteria and black mangroves in Northwestern México: colonization, and diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots. *Can. J. Microbiol.* 41, 999-1011.
- Tolosa, I.S., de Mora, S.M., Reza, J.P., Villanueva, J., Cattini B., Cattini, Ch., 2003. Aliphatic and Aromatic hydrocarbons in Coastal Caspian, Sea Sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 44-60.
- Tomlinson, P.B., 1986. The botany of mangroves, en Ashton P.S., Hubbel, S.P., Janzen, D.H., Raven, P.H., Tomlinson, P.B. (Eds.). Cambridge University Press, Nueva York, pp. 40-62.
- Ubochi, K.C., Ibekwe, V.I., Ezeji, E.U., 2006. Effect of inorganic fertilizer on microbial utilization of hycarbons on oil contaminated soil. *African J. Biotechnol.* 5, 1584-1587.
- USEIA (United States Energy Information Administration), 2013. How much oil does the United State consume per year?; How much petroleum does the United State import and from where?. <http://www.eia.gov/tools/faqs/>
- USGS (U.S. Geological Survey), 2011. Volatile organic compounds (VOCs). Toxic Substances Hydrology Program. U.S. Geological Survey. <http://toxics.usgs.gov7deinitions/vocshtml>.
- Vázquez, P., Holguin, G., Puente, M.E., López-Cortes, A., Bashan, Y., 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves growing in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils.* 30, 460-468.
- Vincent, J.M., 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Biological Programme Handbook N°15. Oxford. Blackwell Scientific Publications. 164 p.
- Vinas, L., Franco, M.A., Soriano, J.A., Gonzalez, J.J., Pon, J., Albaiges, J., 2010. Sources and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments form the Spanish northern continental shelf. Assessment of spatial and temporal trends. *Environ. Pollut.* 158, 1551-1560.
- Volke, S.T., Velazco, T., 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Editorial-Instituto de Ecología, México, D.F. pp. 121-147.
- Vovides, A.G., Bashan, Y., López-Portillo, J.A., Guevara, R., 2011a. Nitrogen fixation in preserved, reforested, naturally regenerated and impaired mangroves as an indicator of functional restoration in mangroves in an arid region of México. *Restor. Ecol.* 19, 236-244.
- Vovides, A.G., López-Portillo, J., Bashan, Y 2011b. N₂ fixation along a gradient of long-term disturbance in tropical mangroves bordering the Gulf of México. *Biol. Fertil. Soils.* 47, 567-576.

- Waksman, S.A., 1950. The Actinomycetes, Their nature, occurrence, activities and importance. *Chronica Botánica Waltham Mass.* pp 230.
- Walkley, A., Black, I.A., 1934. An examination method of Degtjareff, method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37, 29-38.
- Wiltse, C.C., Rooney, W.L., Chen, Z., Schwab, A. P., Bank, M. K., 1998. "Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes". *J. Environ. Qual.* 27, 169-173.
- Wollum, II A.G., 1982. Cultural methods for soil microorganisms. In: Page, A.L., (Ed.), *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, Soil Science Society of America, 2a. ed., Madison, Wisconsin, pp.781-802.
- Young, L.Y., Phelps, C.D., 2005. Metabolic biomarkers for monitoring in situ anaerobic hydrocarbon degradation. *Environ. Health. Perspect.* 113, 62–71.
- Yemashova, N.A., Murygina, V.P., Zhukov, D.V., Zakharyantz, A. A., Gladchenko, M.A., Appanna, V., Kalyuzhnyi, S.V., 2007. Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 6, 315–337.
- Yuan, S.Y., Wei, S.H., Chang, B.V, 2000. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere.* 41, 1463-1468.
- Ylitalo, G.M., Krahn, M.M., Dickhoff, W.W., Stein, J.E., Walker, C.C., Lassitter, C.L., Garret, E.S., Desfosse, L.L., Mitchell, K.M., Noblec, B.T., Wilson, S., Becke, N.B., Bennerf, R.A., Koufopoulosg, P.N., Dickey, R.W., 2012. Federal seafood safety response to the Deepwater Horizon oil spill. *Proc. Natl. Acad. Sci.* <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1108886109>.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput Biol.* 7, 203-214.
- Zheng, S., Zheng, D., Liao, B., Li, Y., 1997. Tideland pollution in Guangdong Province of China and mangrove afforestation. *Forest. Resear.* 10, 639-646.
- Zhu, X., Venosa, A.D., Suidan, M. T., Lee, K., 2001. Guidelines for the bioremediation of marine shoreline and freshwater wetlands. Cincinnati: U.S. Environmental protection agency.

A N E X O S

ANEXO I

Lista de cepas hidrocarbonoclastas aisladas de la rizósfera de cuatro especies de mangle del estado de Campeche registradas en Genbank

Clave	Cepa	Número de acceso en Genbank	
CPO 4. 0055	MARR 1	Bankit 1679891	Seq 1 KF 921602
CPO 4. 0056	MARR 2	Bankit 1679910	Seq 1 KF 921603
CPO 4. 0057	MARR 5	Bankit 1679911	Seq 1 KF 921604
CPO 4. 0058	MARR 7	Bankit 1679913	Seq 1 KF 921605
CPO 4. 0059	MARR 8	Bankit 1679914	Seq 1 KF 921606
CPO 4. 0060	MARR 9	Bankit 1679915	Seq 1 KF 921607
CPO 4. 0061	MARR 12	Bankit 1679916	Seq 1 KF 921608
CPO 4. 0062	MARR 14	Bankit 1679917	Seq 1 KF 921609
CPO 4. 0063	MARR 47	Bankit 1679918	Seq 1 KF 921610
CPO 4. 0064	MARR 49	Bankit 1679919	Seq 1 KF 921611
CPO 4. 0065	MARR 57	Bankit 1679920	Seq 1 KF 921612
CPO 4. 0066	MARR 58	Bankit 1679921	Seq 1 KF 921613
CPO 4. 0067	MARR 59	Bankit 1679922	Seq 1 KF 921614
CPO 4. 0068	MARR 61	Bankit 1679923	Seq 1 KF 921615
CPO 4. 0069	MARR 62	Bankit 1679924	Seq 1 KF 921616
CPO 4. 0070	MARR 80	Bankit 1679925	Seq 1 KF 921617
CPO 4. 0071	MARR 81	Bankit 1679926	Seq 1 KF 921618
CPO 4. 0072	MARR 82	Bankit 1679927	Seq 1 KF 921619
CPO 4. 0073	MARR 83	Bankit 1679928	Seq 1 KF 921620
CPO 4. 0074	MARW 19	Bankit 1680429	Seq 1 KF 923811
CPO 4. 0075	MARW 20	Bankit 1680430	Seq 1 KF 923812
CPO 4. 0076	MARW 22	Bankit 1680431	Seq 1 KF 923813
CPO 4. 0077	MARW 23	Bankit 1680433	Seq 1 KF 923814
CPO 4. 0078	MARW 24	Bankit 1680435	Seq 1 KF 923815
CPO 4. 0079	MARW 25	Bankit 1680438	Seq 1 KF 923816
CPO 4. 0080	MARW 27	Bankit 1680440	Seq 1 KF 923817
CPO 4. 0081	MARW 29	Bankit 1680442	Seq 1 KF 923818
CPO 4. 0082	MARW 30	Bankit 1680443	Seq 1 KF 923819
CPO 4. 0083	MARW 31	Bankit 1680447	Seq 1 KF 923820
CPO 4. 0084	MARW 65	Bankit 1680449	Seq 1 KF 923821
CPO 4. 0085	MARBK 33	Bankit 1680465	Seq 1 KF 923822

ANEXO I

Continuación

Clave	Cepa	Número de acceso en Genbank	
CPO 4. 0086	MARBK 34	Bankit 1680466	Seq 1 KF 923823
CPO 4. 0087	MARBK 37	Bankit 1680468	Seq 1 KF 923824
CPO 4. 0088	MARBK 38	Bankit 1680471	Seq 1 KF 923825
CPO 4. 0089	MARBK 51	Bankit 1680473	Seq 1 KF 923826
CPO 4. 0090	MARBK 66	Bankit 1680476	Seq 1 KF 923827
CPO 4. 0091	MARBK 67	Bankit 1680478	Seq 1 KF 923828
CPO 4. 0092	MARBK 74	Bankit 1680480	Seq 1 KF 923829
CPO 4. 0093	MARBK 75	Bankit 1680483	Seq 1 KF 923830
CPO 4. 0094	MARBK 76	Bankit 1680485	Seq 1 KF 923831
CPO 4. 0095	MARBK 84	Bankit 1680491	Seq 1 KF 923832
CPO 4. 0096	MARB 39	Bankit 1680496	Seq 1 KF 923833
CPO 4. 0097	MARB 41	Bankit 1680498	Seq 1 KF 923834
CPO 4. 0098	MARB 42	Bankit 1680503	Seq 1 KF 923835
CPO 4. 0099	MARB 43	Bankit 1680507	Seq 1 KF 923836
CPO 4. 0100	MARB 44	Bankit 1680508	Seq 1 KF 923837
CPO 4. 0101	MARB 45	Bankit 1680511	Seq 1 KF 923838
CPO 4. 0102	MARB 69	Bankit 1680512	Seq 1 KF 923839
CPO 4. 0103	MARB 70	Bankit 1680517	Seq 1 KF 923840
CPO 4. 0104	MARB 78	Bankit 1680522	Seq 1 KF 923841
CPO 4. 0105	MARB 85	Bankit 1680523	Seq 1 KF 923842
CPO 4. 0106	MARB 86	Bankit 1682034	Seq 1 KF 923843

ANEXO II

Diseño del ensayo de fitorremediación de suelo contaminado con petróleo y diesel utilizando *Lolium perenne*

CEPAS	CONTAMINADO PETROLEO CRUDO [5,000 mg Kg ⁻¹] X sextuplicado (+3 UE)				SIN CONTAMINAR X quintuplicado (+3 UE)			
	Urea + Sol. Jensen	NH ₄ NO ₃ + Sol. Jensen	NH ₄ SO ₄ + Sol. Jensen	Testigo Sol. Jensen	Urea + Sol. Jensen	NH ₄ NO ₃ + Sol. Jensen	NH ₄ SO ₄ + Sol. Jensen	Testigo Sol. Jensen
<u>Con Consorcio Bacteriano</u>	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto
<u>Con Consorcio Bacteriano</u>	Sin pasto	Sin pasto	Sin pasto	Sin pasto				
<u>Sin Consorcio Bacteriano</u>	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto
CEPAS	CONTAMINADO DIESEL [10,000 mg Kg ⁻¹] X sextuplicado (+3 UE)				SIN CONTAMINAR X quintuplicado (+3 UE)			
	Urea + Sol. Jensen	NH ₄ NO ₃ + Sol. Jensen	NH ₄ SO ₄ + Sol. Jensen	Testigo Sol. Jensen	Urea + Sol. Jensen	NH ₄ NO ₃ + Sol. Jensen	NH ₄ SO ₄ + Sol. Jensen	Testigo Sol. Jensen
<u>Con Consorcio Bacteriano</u>	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto
<u>Con Consorcio Bacteriano</u>	Sin pasto	Sin pasto	Sin pasto	Sin pasto				
<u>Sin Consorcio Bacteriano</u>	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto	Pasto

ANEXO III

Solución de Jensen (Vincent, 1970)

Nombre reactivo	Nombre	Peso (g)
CaHPO ₄	Fosfato de calcio	1
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potasio dibásico	0.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de Magnesio. Heptahidratado	0.2
NaCl	Cloruro de sodio	0.2
FeCl ₃	Cloruro férrico	0.1
	Solución de oligoelementos	1.0 mL
Solución de oligoelementos		
Agua destilada		1000 mL
H ₃ BO ₃	Acido bórico	0.5
ZnSO ₄	Sulfato de zinc	0.05
MnSO ₄ ·H ₂ O	Sulfato de manganeso	0.5
CuSO ₄ ·5H ₂ O	Sulfato cúprico	0.05
Na ₂ MoO ₄	Molibdato de sodio	0.05
Agua destilada	Ajustar pH a 7.0	

Este es un medio libre de nitrógeno.

Nota: 1 L de solución se diluye en 10 L, sólo si los recipientes a emplear están cerrados, por la acumulación de sales. En caso contrario, usar la solución de Jensen directamente, si los recipientes tienen orificios en la base.

ANEXO IV

19/5/2014

Elsevier.com - Authors - Track your accepted article

ELSEVIER

- [Home](#)
- [Products](#)
- [User Resources](#)
- [About Us](#)
- [Support & Contact](#)
- [Elsevier Websites](#)

[Advanced Product Search](#)

[Author's Home](#) > [Track your accepted article](#)

TRACK YOUR ACCEPTED ARTICLE

Welcome! [Login](#) to get personalized options. New user? [Register](#) | [Why register?](#)

[Help](#)

Your article's details and status are shown in the following table:

Article status

Article title:	Identification of culturable microbial functional groups isolated from the rhizosphere of four species of mangroves and their biotechnological potential
Reference:	APSOIL2033
Journal title:	Applied Soil Ecology
Corresponding author:	Dr. Alejandro Alarcon
First author:	Dr. Miguel Angel Ramirez-Elias
Received at Editorial Office:	11 Nov 2013
Article revised:	7 Apr 2014
Article accepted for publication:	8 May 2014
Received at Elsevier:	13 May 2014
Journal publishing agreement sent to author:	19 May 2014
Offprint order form sent to author:	19 May 2014
PDF offprint:	Yes
Expected dispatch of proofs:	26 May 2014
DOI information:	10.1016/j.apsoil.2014.05.001
Status comment:	Please note the date for expected dispatch of proofs is only provided as a guide: it may change due to delays in the production process.

Please return your journal publishing agreement and offprint order form, if you have not already done so. If the journal publishing agreement is not returned before publication of your paper, we will proceed with publication on the explicit understanding that we have all the rights customarily included in a licence, including the exclusive right to publish and use the article in all media.

[Track another article](#)



[Home](#) | [Elsevier Sites](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms and Conditions](#) | [Feedback](#) | [Site Map](#) | [A Reed Elsevier Company](#)

Cookies are set by this site. To decline them or learn more, visit our [Cookies](#) page.

Copyright © 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.