

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS POR UN CONSORCIO
MICROBIANO DE LA RIZÓSFERA DE UNA PLANTA NATIVA
DE PANTANO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

Q.F.B. ILDEFONSO JESÚS DÍAZ RAMÍREZ

ASESORES:

DR. MARIANO GUTIÉRREZ ROJAS

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

MÉXICO, D. F.

2000

“En el camino que sigo veo pasos que me anteceden y es a sus dueños a quienes debo la oportunidad de estar en él...”

A mis padres

Ildefonso y Adela

y hermanos

José, David y Adelita

A la familia Escalante Espinosa:

Silvia, Luis Felipe, Sheila, Tania y Gerardo

*A Eri, con todo mi corazón, gracias,
por acompañarme en esta aventura...*



AGRADECIMIENTOS

A los compañeros y Doctores de la Planta Piloto 4 quienes siempre me animaron con su aprecio y atención.

Con especial agradecimiento a mis amigos del Laboratorio de Residuos Sólidos, Tania, Chayo, Alex, Angélica y Mayola; por su paciencia y apoyo en todo momento.

A Alex y Tania por su valiosa colaboración durante el trabajo experimental.

A la Dra. Margarita Gallegos Martínez por sus valiosas sugerencias durante la realización del trabajo.

Al Dr. Hugo Ramírez Saad y al Dr. Ronald Ferrera Cerrato por sus valiosos comentarios durante la revisión de la tesis.

Con profundo aprecio, al Dr. Mariano Gutiérrez Rojas y al Dr. Ernesto Favela Torres, por su incondicional apoyo desde el inicio de este trabajo, además de sus invaluable consejos, sugerencias y constante empuje para la terminación del mismo.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** y al **Instituto Mexicano del Petróleo** (proyecto FIES-96F-48-VI) por las becas otorgadas durante la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1. Hidrocarburos	2
1.1. Destino de los hidrocarburos en el suelo	2
1.2. Hidrocarburos alifáticos	3
1.3. Hidrocarburos aromáticos	6
1.4. Hidrocarburos polares o resinas	9
1.5. Asfaltenos	10
1.6. Biodegradación de hidrocarburos	12
2. La rizósfera	15
2.1. El efecto rizósfera	16
2.2. Factores que afectan la microflora de la rizósfera	16
2.3. Efecto de los microorganismos de la rizósfera sobre las plantas	17
3. Degradación de compuestos orgánicos en la rizósfera	17
II. JUSTIFICACIÓN	20
III. OBJETIVOS	22
IV. MÉTODOS Y MATERIALES	24
4.1. Obtención y mantenimiento del consorcio microbiano	26
4.2. Medio de cultivo	27
4.3. Ensayos de biodegradación	27
4.3.1. Ensayo de biodegradación en medio líquido	27
4.3.1.1. Activación y propagación del inóculo	27
4.3.1.2. Ensayo de biodegradación	28
4.3.2. Ensayo de biodegradación con inhibidores de crecimiento	28
4.3.2.1. Activación y propagación del inóculo	28
4.3.2.2. Ensayo de biodegradación	29
4.3.3. Cinética de biodegradación de hidrocarburos	29
4.3.3.1. Activación y propagación del inóculo	29

4.3.3.2. Cinética de biodegradación	30
4.3.3.3. Respirometría	30
4.4. Métodos analíticos	32
4.4.1. Análisis de hidrocarburos totales de petróleo (HTP)	32
4.4.1.1. Extracción y cuantificación de los HTP del suelo	32
4.4.1.2. Precipitación y cuantificación de los asfaltenos	33
4.4.1.3. Fraccionamiento de hidrocarburos sin asfaltenos	33
4.4.1.4. Extracción y cuantificación de los HTP en fase líquida	35
4.4.2. Determinación del pH del suelo	35
4.4.3. Cuenta en placa de microorganismos	35
4.4.4. Análisis del CO ₂ y O ₂ por cromatografía de gases	36
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
5.1. Características del suelo de la zona de colecta de las plantas	39
5.2. Análisis del suelo de la rizósfera	40
5.2.1. Análisis de hidrocarburos	40
5.2.2. Cuenta viable inicial	41
5.3. Ensayos de biodegradación	43
5.3.1. Ensayo en medio líquido	43
5.3.2. Biodegradación de hidrocarburos	44
5.3.3. Producción de CO ₂	44
5.3.4. Mineralización de hidrocarburos	46
5.3.5. Cuenta viable	49
5.4. Ensayo de biodegradación con inhibidores de crecimiento	50
5.4.1. Biodegradación de hidrocarburos	50
5.4.2. Fraccionamiento de los hidrocarburos residuales	51
5.4.3. Producción de CO ₂	53
5.4.4. Mineralización de hidrocarburos	55
5.5. Cinética de biodegradación de hidrocarburos en medio sólido	57
5.5.1. Cinética de biodegradación de hidrocarburos	57

5.5.2. Fraccionamiento de los hidrocarburos durante la prueba de biodegradación	58
5.5.3. Respirimetría	60
5.5.4. Cinética de crecimiento	61
5.6. Viabilidad del consorcio	65
VI. CONCLUSIONES	67
VII. RECOMENDACIONES	69
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la biodegradación de hidrocarburos por un consorcio obtenido de la rizósfera de una planta nativa (*Cyperus laxus* Lam.) de un sitio contaminado con altas concentraciones de hidrocarburos, en medio líquido y sólido. En medio líquido la concentración inicial de los hidrocarburos fue hasta de 30,000 ppm; la biodegradación se determinó a través de la cuantificación de los hidrocarburos residuales en el cultivo y se siguió la producción de CO₂ como consecuencia de la oxidación de los hidrocarburos determinándose la mineralización de éstos, así como las unidades formadoras de colonias finales. La biodegradación máxima en medio líquido fue de 75% en 21 días con una mineralización de 3.5% del carbono inicial de los hidrocarburos. En un experimento similar se evaluó la participación de los diferentes grupos microbianos (hongos, bacterias y el consorcio) en la biodegradación, así como el consumo de las diferentes fracciones (alifáticos, aromáticos y polares) que componen la mezcla de hidrocarburos. La biodegradación para el cultivo del consorcio y de las bacterias fue similar. La producción de CO₂ y la mineralización fue significativamente mayor para el consorcio (7.3%), con respecto a las bacterias (4.8%) y los hongos (1.6%), indicando una mayor biotransformación tanto en el cultivo de las bacterias como en el de los hongos. La fracción preferencialmente biodegradada fue la de alifáticos seguida de los hidrocarburos aromáticos y por último los polares. Durante el cultivo se observó la emulsificación de los hidrocarburos, lo que posiblemente se debió a la producción microbiana de un biosurfactante como consecuencia de la presencia de los hidrocarburos en el medio, este comportamiento favoreció la biodisponibilidad y por tanto la biodegradación de estos compuestos.

En medio sólido durante el cultivo se realizaron cinéticas de: consumo de hidrocarburos y de las fracciones, consumo del O₂ por respirometría, así como la cuenta viable. La tasa específica de biodegradación fue de 0.59 mg de hidrocarburos/mL de reactor/día, siendo al final de 52.1% en 38 días de cultivo. Las fracciones se consumieron de manera similar al medio líquido (alifáticos en mayor cantidad que aromáticos y que polares). Durante el experimento en medio sólido el consumo de oxígeno presentó un

comportamiento lineal con una fase inicial de adaptación. En el mismo ensayo la cuenta viable de microorganismos presentó un máximo a los 21 días de cultivo. Se identificó una bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*) así como tres hongos filamentosos, de los géneros *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.

Los niveles de biodegradación alcanzados por el consorcio aislado de la rizósfera de la planta nativa son indicio de su alta capacidad biodegradadora de hidrocarburos, lo que permite suponer su beneficio potencial aplicado como parte de una estrategia de biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos.

INTRODUCCIÓN

La contaminación de mantos acuíferos y suelos por compuestos orgánicos provoca serios daños al medio ambiente; los métodos tradicionales de remediación de estos sitios están basados en tecnologías de ingeniería química que se han desarrollado en los últimos 20 años. Estos incluyen una amplia variedad de tratamientos físicos, térmicos y químicos así como la manipulación para acelerar o reducir el transporte de masa en la matriz contaminada. En ciertos casos, sin embargo, los procesos biológicos (especialmente microbianos) han demostrado su aplicabilidad (Bouwer y Zehnder 1993; Crowley y col., 1997). La biorremediación es una tecnología que emplea microorganismos o procesos biológicos para transformar y/o eliminar contaminantes del ambiente. Los microorganismos son los principales responsables del cambio geoquímico; su tamaño, amplia distribución, elevada actividad metabólica, capacidad de adaptación fisiológica, maleabilidad genética así como su diversidad enzimática y nutricional son factores que los colocan como agentes recicladores de la biosfera. En el crecimiento microbiano está implícito el metabolismo integral de todos los nutrientes (ej., carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, hidrógeno). Este crecimiento y supervivencia de los microorganismos determina los ciclos geoquímicos de los elementos, favorece la eliminación de muchos contaminantes orgánicos y mantiene las condiciones requeridas por otros habitantes de la biosfera (Madsen, 1998).

El estudio de nuevas estrategias y tecnologías que contribuyan a la solución de problemas tan severos como el de la contaminación por petróleo y sus derivados, es de vital importancia para México. Actualmente, se buscan alternativas que reduzcan los costos de operación y que además consideren las condiciones naturales de los sitios afectados. Una alternativa que se considera favorable en la eliminación de hidrocarburos, como contaminantes de suelos, es la aplicación de microorganismos nativos, capaces de utilizar a los mismos contaminantes como única fuente de carbono y energía (Liu y suflita, 1993).

En el presente trabajo, se analiza la biodegradación de hidrocarburos por un consorcio microbiano de la rizósfera de una planta nativa de un sitio contaminado con hidrocarburos, como parte de una estrategia para la biorremediación del mismo. El primer capítulo contempla aspectos generales de la estructura y composición de los hidrocarburos, con especial énfasis en las rutas de biodegradación por microorganismos. Además, se describen las características de la rizósfera y su relación con la biodegradación de compuestos orgánicos. En el capítulo IV se describen los materiales y métodos empleados en el trabajo experimental, detallándose las condiciones en que se realizaron los ensayos de biodegradación de hidrocarburos, en medio líquido y sólido, el fraccionamiento de los hidrocarburos residuales, la determinación de la mineralización y la estimación de los microorganismos por conteo en placa. Los resultados son analizados y discutidos en el capítulo V; para terminar, se presentan las conclusiones generales y recomendaciones del trabajo.

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Hidrocarburos.

1.1. Destino de los hidrocarburos en el suelo.

La producción, transporte, y almacenamiento del petróleo inevitablemente involucra el riesgo de derrames accidentales, los cuales pueden ser minimizados pero no eliminados completamente, la persistencia de los hidrocarburos en el ambiente depende de su cantidad y calidad así como de las propiedades del ecosistema afectado (Bossert y Bartha, 1984).

La intemperización de hidrocarburos en el suelo se define como su exposición a condiciones tales como evaporación, fotólisis, hidrólisis y biotransformación, durante largos periodos de tiempo; en el ambiente, este fenómeno es controlado por diferentes procesos abióticos y biológicos (Pollard y col., 1994). Algunos procesos físicos como el transporte de aceite o emulsiones por el movimiento del agua, solo desplaza los contaminantes no modificados químicamente en el ecosistema. Muchos de los mecanismos tienen un efecto definitivo sobre la composición química de los contaminantes; procesos degradativos como la fotooxidación y la degradación microbiana afectan la composición molecular de los componentes individuales. Otros mecanismos abióticos modifican la distribución relativa de los compuestos contaminantes sin cambiar su estructura individual; además la evaporación atmosférica así como la disolución en agua permiten la disminución o pérdida total de los componentes más ligeros o solubles (Oudot, 1990).

El petróleo contiene cientos de compuestos individuales, éstos son generalmente agrupados de acuerdo a su solubilidad diferencial en solventes orgánicos en cuatro clases (Sugiura y col., 1997):

Alifáticos: compuestos saturados lineales (alcanos) y cíclicos (cicloparafinas).

Aromáticos: compuestos aromáticos mono, di y polinucleares con cadenas alquílicas y/o fusionadas a anillos de cicloparafinas.

Polares o Resinas: agregados con gran variedad de componentes como piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas.

Asfaltenos: agregados compuestos por sustancias como poliaromáticos, ácidos nafténicos, sulfuros, fenoles polihídricos, ácidos grasos y metaloporfirinas.

1.2. Hidrocarburos alifáticos

Los hidrocarburos **alifáticos** (alcanos de cadena lineal) constituyen uno de los principales componentes del petróleo crudo, de acuerdo a la longitud de la cadena hidrocarbonada pueden clasificarse como (Setti y col., 1993):

- i) *n*-alcanos líquidos, C12-C16
- ii) *n*-alcanos semisólidos, C17-C28
- iii) *n*-alcanos sólidos, >C28

Dentro de los hidrocarburos alifáticos se presentan también en el petróleo las cicloparafinas (cicloalcanos), éstos se encuentran generalmente en menor proporción que los alcanos lineales y que los hidrocarburos aromáticos. En la Tabla 1.1 se muestra la composición de la fracción de gasolina obtenida de diferentes muestras de petróleo crudo; en algunos casos como el del petróleo Baku y Hastings, pueden obtenerse fracciones de gasolina con altos valores de cicloparafinas (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Composición de algunas gasolinas obtenidas de diferentes petróleos crudos.

Origen del petróleo crudo	Volumen (%)		
	Parafinas	Cicloparafinas	Aromáticos
Oklahoma (Ponca)	50	40	10
Pennsylvania	70	22	8
Canadá	51	35	14
México (Altamira)	49	36	14
Rumania (Buesant)	56	32	12
Kuwait	72	20	8
Russia (Baku)	29	63	8
Texas (Hastings)	27	67	6

(Perry, 1984)

Dentro de la fracción alifática del petróleo se presentan también compuestos insaturados como los terpenos.

En la Figura 1.1 se presenta la estrategia general de biodegradación de hidrocarburos alifáticos, tanto para bacterias como para hongos. Esta consiste en convertir la cadena hidrocarbonada del alcano en un ácido graso correspondiente (oxidación del grupo metilo terminal). En presencia de oxígeno la cadena del alcano puede ser atacada por una monooxigenasa o dioxigenasa, la cual introduce uno o dos átomos de oxígeno de la

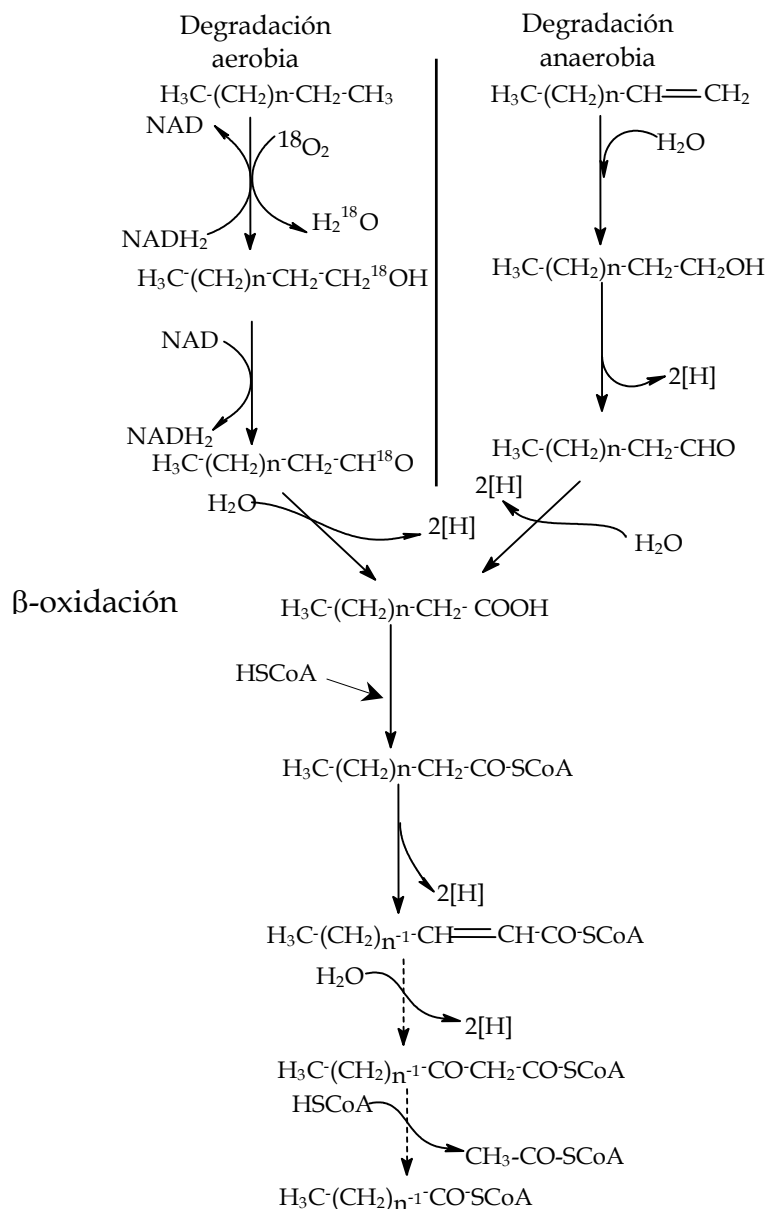


Figura 1.1. Biodegradación bajo condiciones aerobias de alcanos (izquierda) y en anaerobiosis de alquenos, en el caso de los alcanos el oxígeno proviene de oxígeno molecular (marcado), en la oxidación de alquenos el oxígeno proviene de la molécula del agua (Bouwer y Zehnder, 1993).

molécula de oxígeno respectivamente a la cadena, formándose así un alcohol graso. Una vez que el hidrocarburo se encuentra en forma de ácido graso, es empleado en la ruta catabólica de la β -oxidación, donde se remueven unidades de dos carbonos para la formación de acetyl CoA, éste es llevado hasta CO_2 y H_2O por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y cadena respiratoria (Wackett y col., 1989).

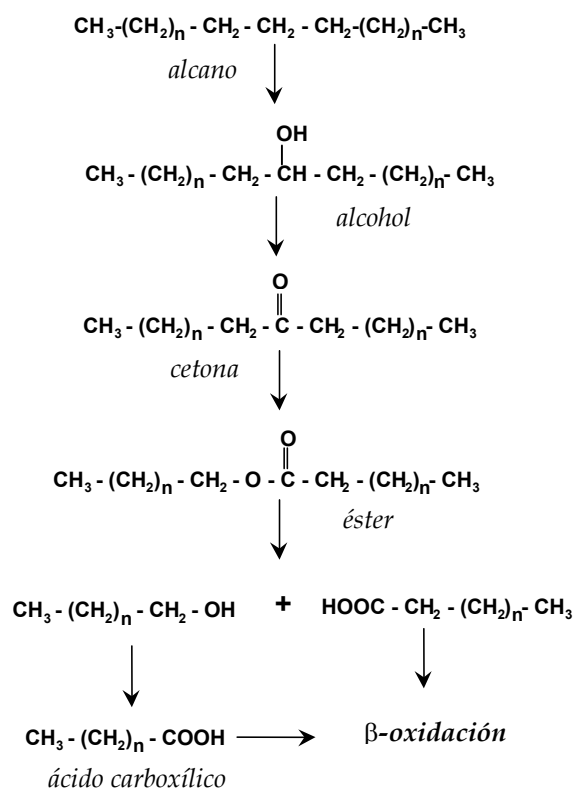


Figura 1.2. Degradación subterminal de hidrocarburos alifáticos lineales (Medina, 1999).

Los compuestos alifáticos insaturados (alquenos y alquinos) son degradados vía aerobia por mecanismos similares a los utilizados para los alcanos, sin embargo, los enlaces dobles o triples son más reactivos químicamente y pueden experimentar otro tipo de reacciones tales como epoxidación e hidratación (Bouwer y Zehnder, 1993).

Como puede observarse en la Figura 1.1 el doble enlace presente en los alquenos puede ser hidratado anaeróbicamente para formar un alcohol, el cual posteriormente es degradado como en la ruta aeróbica. En la Figura 1.2 se puede apreciar una ruta alterna

a la oxidación del grupo metilo terminal, ésta es la oxidación subterminal, la cual se presenta en menor medida y también conduce a la β -oxidación.

En el caso de hidrocarburos alicíclicos, por ejemplo el ciclohexano, su biodegradación se basa en la hidroxilación, lo que produce compuestos como el cicloalcohol y posteriormente la cicloalcanona, éstos a su vez son metabolizados hasta ser convertidos en ácidos carboxílicos lineales, los cuales son oxidados a través de la antes mencionada β -oxidación (Trudgill, 1984).

1.3. Hidrocarburos aromáticos.

En este grupo se encuentran hidrocarburos monoaromáticos como el benceno, tolueno, etilbenceno, xileno (isómeros orto, meta, para). Estos hidrocarburos por lo general

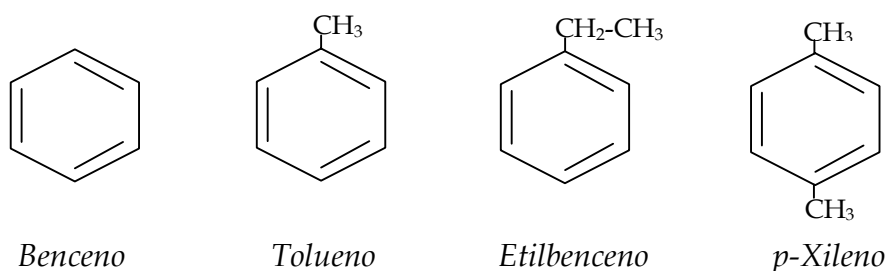


Figura 1.3. Hidrocarburos monoaromáticos más comunes.

son referidos como los compuestos BTEX, presentan una solubilidad en agua relativamente alta (benceno: 1780 mg/L, tolueno: 490-627 mg/L), además tienen valores de gravedad específica menores a uno (benceno: 0.88, tolueno: 0.87), siendo también altamente volátiles (Heath y col., 1993).

Otra clase de hidrocarburos aromáticos que han sido ampliamente estudiados debido a su elevada toxicidad son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), éstos se presentan de manera natural en el ambiente ya que son sintetizados por algunas plantas, pudiendo formarse incluso durante incendios en bosques y praderas. Sin embargo, la mayor fuente de contaminación por este tipo de compuestos se origina de la incineración incompleta de combustibles fósiles y de su exposición al ambiente vía el derrame de petróleo crudo o sus derivados. En la Figura 1.4 se muestran algunos

ejemplos de HAP, éstos comprenden compuestos de dos, tres o más anillos de benceno fusionados en arreglo lineal, angular o de racimo.

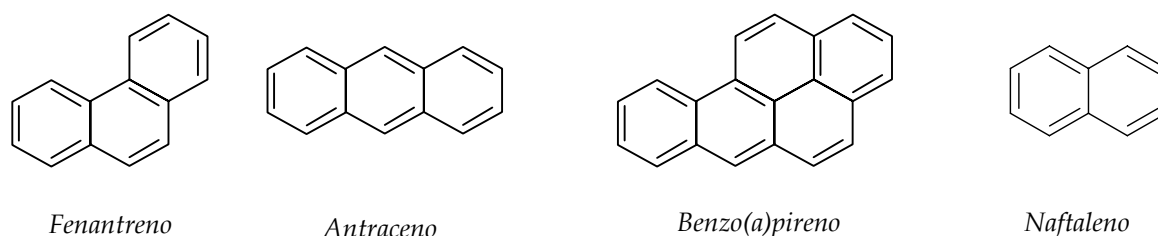


Figura 1.4. Estructura química de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Estos compuestos han sido principalmente estudiados debido a su efecto potencialmente carcinógeno, algunos estudios indican que los HAP y/o algunos de sus metabolitos actúan indirectamente sobre el ADN, uniéndose covalentemente a éste (Lecoq, 1997). La degradación microbiana de compuestos aromáticos por fisión del anillo es un proceso predominantemente aerobio (Wallnöfer y col., 1984), en general ocurre a través de un intermediario clave que es el catecol. En la Figura 1.5 se presenta

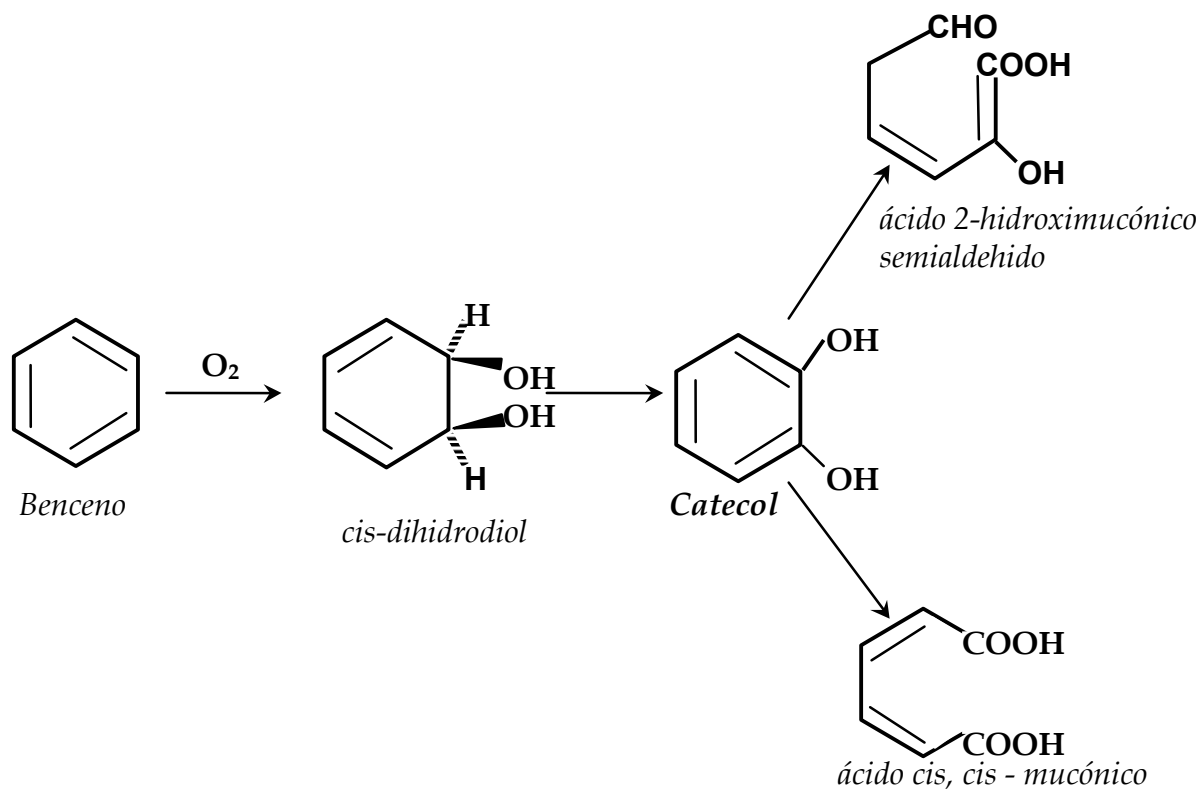


Figura 1.5. Degradación aerobia del benceno a través del catecol como intermediario (Gibson y Subramanian, 1984).

la ruta a través de la cual se oxida el benceno hasta catecol y de ahí a un ácido dicarboxílico (ácido mucónico), (Gibson y Subramanian, 1984). Este mecanismo se presenta generalmente en microorganismos *procariotes*, en donde la adición de la molécula completa de oxígeno es llevada a cabo por una dioxigenasa. En cambio en organismos *eucariotes* ésta reacción es catalizada por la monooxigenasa produciendo un epóxido y posteriormente un *trans*-diol. En ambos grupos de organismos la ruptura posterior de la molécula de catecol es catalizada por una dioxigenasa, la reacción puede transcurrir por una fisión *orto*- o *meta*- (Bouwer y Zehnder, 1993).

En el caso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, a medida que aumenta el número de anillos fusionados y los substituyentes alquílicos, el proceso de degradación se hace más difícil (McKenna, 1976). La degradación de éstos compuestos depende del ó los grupos funcionales que contengan y del aceptor final de electrones presente.

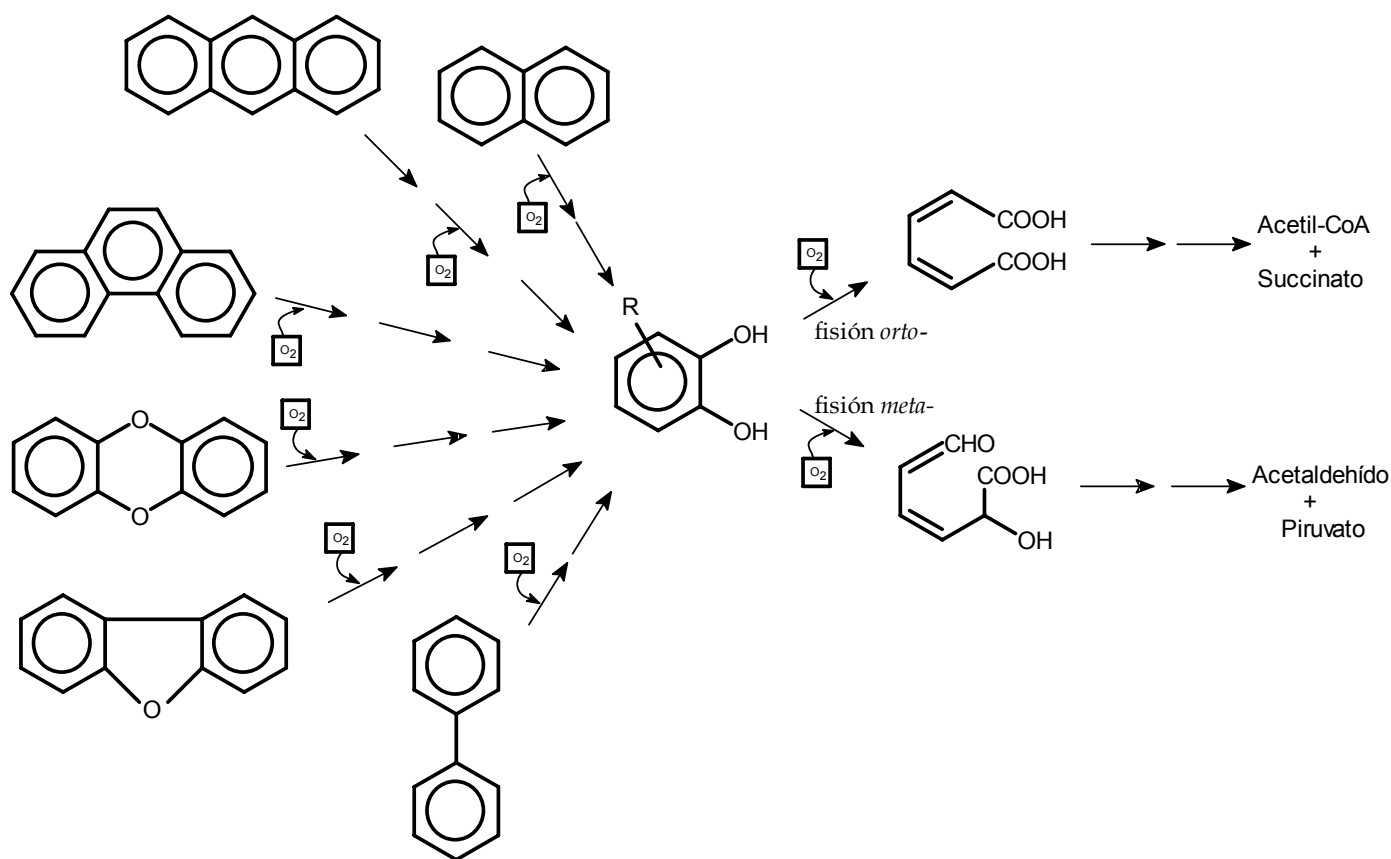


Figura 1.6. Rutas generales de biodegradación de diversos compuestos aromáticos bajo condiciones aerobias, las múltiples flechas indican varias etapas implicadas en la ruptura de los anillos (Bouwer y Zehnder, 1993).

En la figura 1.6 se muestran algunas de las rutas microbianas de degradación de los HAP, generalmente comienzan con la oxidación en los sitios 1,2 de alguno de los anillos fusionados, produciendo compuestos 1,2 dihidro-poliaromáticos. Una vez abierto uno de los anillos, los hidrocarburos son convertidos en ácidos mono o dicarboxílicos, en una reacción generalmente catalizada por una dioxigenasa.

Actualmente se sabe que en condiciones anaerobias algunos compuestos aromáticos como benzoato, fenol y catecol son reducidos. En éste caso el compuesto intermediario común es la ciclohexanona, posteriormente el anillo de éste compuesto es abierto por una reacción de hidratación, formándose compuestos como el adipato o caproato. Compuestos aromáticos halogenados (policlorados) primero pueden ser deshalogenados (en condiciones reductoras) antes de que el anillo sea reducido.

1.4. Hidrocarburos polares o resinas

Esta fracción está constituida por compuestos con diversos grupos funcionales como: alcoholes, fenoles, cetonas, aminas, ácidos carboxílicos, compuestos heterocíclicos, entre otros; generalmente son compuestos de alto peso molecular, elevados puntos de ebullición y baja solubilidad (Wallnöfer y col., 1984). Se sabe que durante la oxidación microbiana de hidrocarburos alifáticos y aromáticos se forman compuestos polares, en la biodegradación de combustibles o lubricantes en suelo pueden formarse ácidos orgánicos con cadenas alifáticas ramificadas o lineales así como cetonas aromáticas (Angehrn y col., 1998).

En la Figura 1.7 se presentan algunas reacciones de biodegradación de compuestos polares.

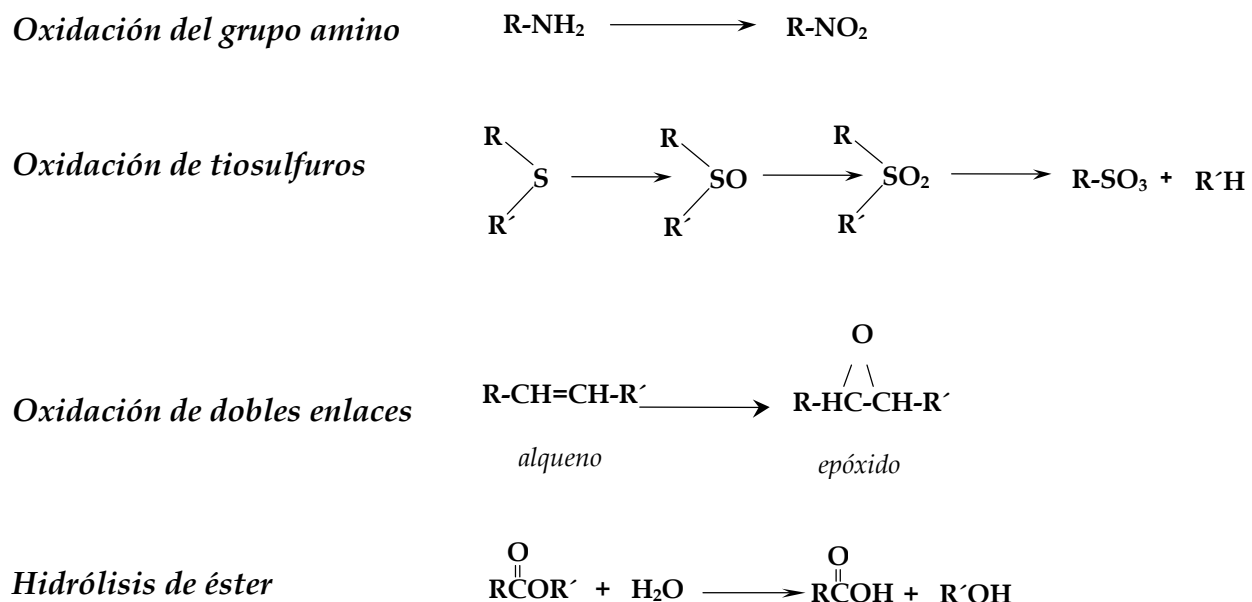


Figura 1.7. Reacciones de biodegradación microbiana de compuestos polares.

1.5. Asfaltenos.

Estos constituyen la fracción más pesada en el petróleo. Recientemente se han definido como compuestos que precipitan en presencia de un alcano de bajo punto de ebullición como el n-pentano. Existe una estrecha relación entre los asfaltenos, resinas y los hidrocarburos policíclicos de alto peso molecular. Es de suponer que los asfaltenos se forman como resultado de la oxidación de resinas naturales. Algunas propiedades químicas de los asfaltenos son: a) la hidrogenación produce hidrocarburos poliheterocíclicos aromáticos (hidrocarburos policíclicos aromáticos con átomos de oxígeno y azufre), b) se descomponen a temperaturas por encima de los 300-400 °C, sin embargo no se funden, c) su reacción con ácido sulfúrico forma ácido sulfónico, lo que se relaciona con su estructura poliaromática (Mansoori, 1998). En la Figura 1.8 se presenta la estructura modelo de los asfaltenos propuesta por Altamirano a través de diferentes métodos físicos y químicos, para petróleo Maya (Mansoori, 1998).

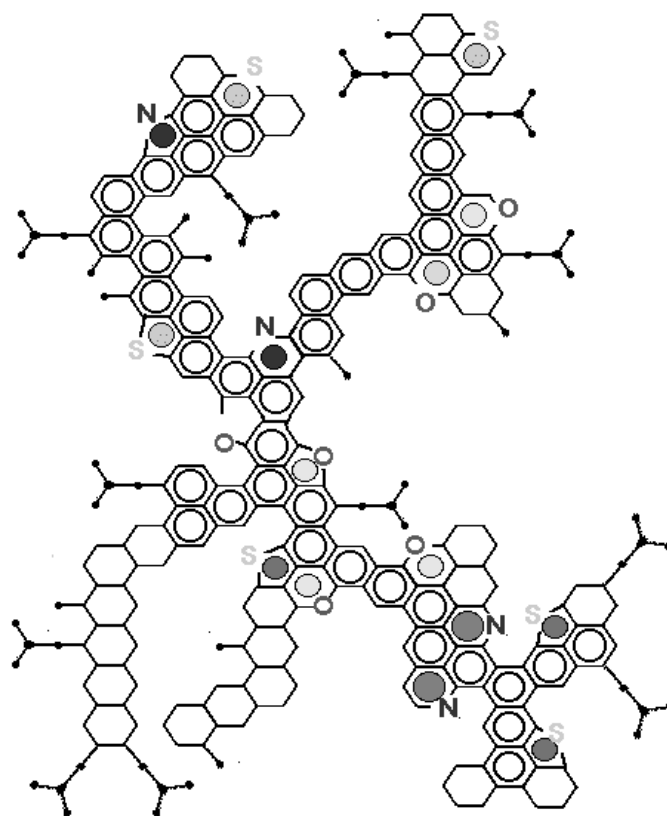


Figura 1.8. Estructura modelo propuesta para los asfaltenos (modelo bidimensional) (Mansoori, 1998).

En suelos intemperizados se ha observado el incremento en la concentración de esta fracción, lo que sugiere la transformación de otras fracciones de hidrocarburos en asfaltenos. Tales cambios ocurren aparentemente debido a que la oxidación de los hidrocarburos por las oxigenasas produce radicales libres, y otros intermediarios reactivos que pueden iniciar polimerizaciones que producen residuos de alto peso molecular (Pollard y col., 1994). Esta fracción es considerada como la menos susceptible al ataque microbiano (Bossert y Bartha, 1984).

1.6. Biodegradación de hidrocarburos.

La *biodegradación* puede ser definida como el cambio, catalizado biológicamente, en la estructura química de un compuesto. En el caso de compuestos orgánicos, la biodegradación frecuentemente, permite la conversión de la mayor parte del C, N, P, S y otros elementos del compuesto original a productos inorgánicos. Esta conversión de un sustrato orgánico a productos inorgánicos es conocida como *mineralización*. Así, en la mineralización de C, N, O, S, y otros elementos orgánicos los microorganismos liberan el CO₂ o formas inorgánicas de N, P, S. La respiración de plantas y animales es un proceso de mineralización a través del que son degradadas numerosas moléculas orgánicas presentes en los seres vivos. En el medio ambiente la mineralización de compuestos sintéticos o naturales por procesos biológicos, aparentemente es producto de la actividad microbiana. Pocas reacciones no biológicas en la naturaleza brindan cambios similares. Es por esta capacidad para mineralizar compuestos antropogénicos, que los microorganismos juegan un papel muy importante en suelo, agua y sedimentos (Alexander, 1994).

Uno de los factores que afecta la biodegradación de hidrocarburos es la percolación de éstos a través del suelo, porque reduce la aireación y altera el balance de nutrientes (C/N) para las poblaciones microbianas nativas. El estado físico de los hidrocarburos también tiene un efecto marcado sobre su degradación. El grado de dispersión de éstos determina en parte el área superficial disponible para la colonización de los microorganismos degradadores (Atlas, 1991). Otro factor ambiental que tiene un marcado efecto sobre la biodegradación de hidrocarburos es la temperatura, ésta influye sobre la naturaleza física, composición química y velocidad de biodegradación de los hidrocarburos. Se ha observado la disminución de las velocidades de biodegradación al disminuir la temperatura, lo que se atribuye principalmente a la disminución en la actividad enzimática. Altas temperaturas incrementan la velocidad del metabolismo de los hidrocarburos hasta un máximo, típicamente en el rango de 30°C a 40°C. Por otra parte a bajas temperaturas la viscosidad del petróleo se incrementa, por lo que la

volatilización de los alcanos tóxicos de cadena corta se reduce favoreciendo su presencia en la fase acuosa, disminuyendo así la biodegradación (Atlas, 1991).

Los componentes tóxicos del petróleo pueden inhibir selectivamente a algunos microorganismos, produciendo cambios en el tamaño de la microbiota y diversidad de especies dentro del suelo (Atlas, 1984). La presencia en suelos de poblaciones nativas de microorganismos capaces de biodegradar hidrocarburos representa uno de los mecanismos primarios por los cuales el petróleo y otros contaminantes son eliminados del ambiente. La velocidad de biodegradación de hidrocarburos está determinada por la presencia de microorganismos nativos, sus capacidades fisiológicas, y varios factores abióticos que influyen sobre las velocidades de crecimiento de dichas poblaciones microbianas (Atlas, 1984). En ambientes libres de contaminación, los microorganismos degradadores generalmente constituyen el 1% de la comunidad microbiana, mientras que en ecosistemas contaminados, por ejemplo con petróleo, representa del 1 al 10% (Atlas, 1991).

La capacidad microbiana para degradar hidrocarburos no está restringida a unos cuantos géneros. En la Tabla 1.2 se presentan algunos ejemplos de microorganismos aislados de sitios contaminados con hidrocarburos. Al parecer aunque las bacterias inician la degradación de una mezcla sintética de derivados del petróleo, la degradación se duplica cuando bacterias, hongos y levaduras están presentes. Este sinergismo entre microorganismos puede provocar un incremento en la velocidad y concentración de los hidrocarburos que son degradados. Sugiura y col. (1997) reportan la biodegradación de cuatro diferentes tipos de petróleo (Arabe ligero, Dubai, Maya y Shengli) por una cepa pura de *Acinetobacter* sp T4 y por un consorcio microbiano (llamado SM8) aislado de un suelo contaminado; el grado de biodegradación obtenido con el consorcio (SM8) fue 1.7 veces mayor al obtenido con *Acinetobacter* sp T4 para los cuatro tipos de petróleo. Las pruebas de biodegradación se realizaron en medio líquido con una concentración de hidrocarburos de 5000 ppm. La biodegradación del petróleo crudo varió con respecto a su composición, los compuestos saturados de bajo peso molecular fueron degradados preferentemente empleando ambos cultivos. *Acinetobacter* no fue capaz de degradar

compuestos aromáticos policíclicos tales como (alquil) naftalenos, (alquil) fenantrenos, (alquil) fluorenos, y (alquil) dibenzotiofenos. Sin embargo, esta cepa fue capaz de

Tabla 1.2. Géneros de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) degradadores de hidrocarburos

Género	
Bacterias	Hongos y levaduras
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acreminium</i>
<i>Achromobacter</i>	<i>Beauveria</i>
<i>Arthobacter</i>	<i>Candida</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Cunninghamella</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Chrysosporium</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Gliocladium</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Graphium</i>
<i>Vibrio</i>	<i>Mortierella</i>
	<i>Nocardia</i>
Atlas (1981)	<i>Paecilomyces</i>
(aislados de ambientes marinos)	<i>Penicillium</i>
	<i>Phoma</i>
	<i>Rhodotorula</i>
	<i>Scolecobasidium</i>
	<i>Sphaeropsidales</i>
	<i>Sporobolomyces</i>
	<i>Trichoderma</i>
	<i>Verticillium</i>
	Atlas (1981)
	Davies y Westlake (1979),
	(aislados de diferentes sitios
	de producción de petróleo en
	Canadá)

degradar más del 10% de las moléculas presentes en la fracción aromática del petróleo Arabe ligero. Bosecker y col. (1991) reportan el 10% de biodegradación de hidrocarburos alifáticos en medio líquido, utilizando como inóculo un cultivo mixto de bacterias y levaduras aislado de un depósito de petróleo, en un estudio similar no se encontró biodegradación de hidrocarburos aromáticos. Oudot y col. (1987) reportaron el aislamiento de bacterias y hongos degradadores de hidrocarburos a partir de suelo contaminado. Entre los géneros de bacterias y levaduras, que presentaron los mayores índices de biodegradación destacaron *Corynebacterium sp*, *Nocardia sp* y *Pseudomonas sp*, y hongos del género *Penicillium sp* y *Aspergillus sp*. Entre el 50 y 80% de la población total de bacterias y más del 70% de los hongos aislados del suelo contaminado, fueron

capaces de crecer con hidrocarburos como única fuente de carbono. En experimentos de biodegradación con hidrocarburos (aproximadamente 1200 ppm) en medio líquido, se encontró un nivel de biodegradación similar para los cultivos con las cepas puras de *Corynebacterium sp*, y *Nocardia sp* y un cultivo mixto compuesto por ambos microorganismos. Sin embargo, se observó un aumento en la biodegradación de los hidrocarburos aromáticos del 10% (cultivos axénicos) hasta el 19% (cultivo mixto). En los cultivos axénicos con algunas de las cepas de hongos aislados se alcanzó una biodegradación final del 25% de los hidrocarburos, y hasta un 19% de biodegradación de los hidrocarburos aromáticos con la cepa de *Paecilomyces lilacinus*. Con el cultivo mixto de hongos se presentaron niveles más bajos de biodegradación de la fracción de hidrocarburos aromáticos que con las cepas puras.

Se ha reportado la biodegradación de compuestos orgánicos (herbicidas, pesticidas e hidrocarburos) por microorganismos asociados a las raíces de las plantas (Anderson, y col. 1993). La explicación más común para la influencia de las plantas sobre la biodegradación de contaminantes orgánicos, es el incremento en el número de microorganismos y su actividad, con respecto al suelo sin plantas, como consecuencia de la utilización de fuentes de carbono provistas por las raíces (Crowley y col., 1997). A continuación se aborda la importancia de las raíces de las plantas y los microorganismos asociados así como su relación con la biodegradación de compuestos orgánicos.

2. La rizósfera.

La *rizósfera* se define como una zona de incremento de actividad microbiana y biomasa en la interfase de la raíz - suelo que está bajo la influencia de las raíces (Anderson y col. 1993). El término proviene de la palabra griega *rhizo* o *rhiza* (raíz) y *esfera* (el área de influencia y la localización física alrededor de las raíces). La ecología de los microorganismos en la rizósfera abarca el estudio de su estructura y función, la comprensión de los principios básicos de la ecología microbiana en la rizósfera incluye la función y diversidad de los microorganismos que ahí habitan (Metting, 1993). El entendimiento del efecto rizósfera sobre el crecimiento de los microorganismos

participantes en el proceso de biodegradación, es necesario en la predicción de la eliminación de compuestos contaminantes.

2.1. El efecto rizósfera.

De manera general, el *efecto rizósfera* es un término utilizado para definir la estimulación del crecimiento microbiano alrededor de la raíz debido a la liberación de compuestos orgánicos (Metting, 1993). Algunos de los compuestos orgánicos liberados (exudados) incluyen compuestos de bajo peso molecular (azúcares, aminoácidos); también se ha observado la secreción de material gelatinoso sobre la superficie de la raíz (mucílagos, células bacterianas, productos metabólicos) (Harley, 1979). El efecto global de la interacción planta - microorganismo es un incremento en la biomasa comparado con la población microbiana en el suelo no perteneciente a la rizósfera. Factores como el tipo de raíz y los exudados que éstas secretan, la especie y edad de la planta, además de la exposición a los contaminantes, influyen sobre la población y diversidad microbiana de la rizósfera (Anderson y col., 1993).

2.2. Factores que afectan a los microorganismos de la rizósfera.

Además de la disponibilidad de carbono en la rizósfera, existen otros factores físicos y químicos inducidos por la planta, que afectan la composición y actividades de los microorganismos de la rizósfera. El ambiente de la rizósfera tiene una influencia directa sobre el tipo y número de microorganismos que pueden colonizar las raíces, sobrevivir, crecer y afectar el crecimiento de la planta (Metting, 1993). Entre los factores físicos que influyen en la rizósfera se encuentran: a) la compactación del suelo por desplazamiento debido al propio crecimiento de la raíz, b) la tortuosidad o ruta que siguen el agua y los nutrientes para llegar a la raíz y c) el flujo de agua del suelo hacia las raíces (Metting, 1993).

Las células de las raíces de las plantas secretan compuestos orgánicos e inorgánicos, que pueden afectar el ambiente químico de la rizósfera influyendo indirectamente en la microbiota. Las raíces pueden absorber y transportar iones selectivamente alterando la

composición química del suelo en la rizósfera. Por otra parte, el pH, potencial eléctrico (E_h), la concentración de nutrientes y el carbono soluble es distinto en la rizósfera con respecto a los valores en la porción del suelo no perteneciente a la rizósfera (Metting, 1993).

2.3. Efecto de los microorganismos de la rizósfera sobre las plantas.

Los microorganismos de la rizósfera son de interés tanto por sus efectos benéficos (fijación de nitrógeno, micorrizoides, biocontrol de plantas patógenas, producción de sustancias promotoras del crecimiento), como perjudiciales (enfermedades, rizobacterias dañinas, inmovilización de nutrientes) sobre el crecimiento de la planta. Una vez que se establecen en la rizósfera de las plantas, las poblaciones microbianas pueden nutrirse pasivamente con exudados de las raíces y descomposición de la materia orgánica de las plantas; la presencia de microorganismos puede inducir la liberación de ciertos nutrientes orgánicos por señales bioquímicas co-desarrolladas. *Pseudomonas putida* y *Azospirillum spp.* son ejemplos de bacterias capaces de inducir liberación de nutrientes de las raíces. En ausencia de bacterias la producción de exudados de la planta disminuye, subsecuentemente se proveen pocos sustratos orgánicos para sostener el crecimiento microbiano. Es necesario entender los mecanismos por los cuales los microorganismos de la rizósfera influyen sobre el crecimiento de las plantas para desarrollar tecnologías que favorezcan sus actividades benéficas y reduzcan sus actividades perjudiciales para el cultivo de éstas (Anderson y col., 1993). Sin duda, actualmente uno de los principales beneficios de plantas y microorganismos es su participación en la eliminación de contaminantes orgánicos.

3. Degradación de compuestos orgánicos en la rizósfera.

Como se mencionó anteriormente la rizósfera favorece el aumento en el número y actividad de microorganismos potencialmente degradadores de contaminantes en el suelo, además facilita la transferencia de plásmidos, o en ocasiones el cometabolismo de compuestos que no pueden utilizarse directamente como sustratos para el crecimiento

microbiano (Crowley y col., 1997). En cuanto a las transformaciones de compuestos orgánicos en la rizósfera, las investigaciones se han enfocado principalmente a compuestos de uso agrícola como insecticidas y herbicidas, registrándose un incremento en la degradación de éstos en la rizósfera de gran variedad de especies de plantas. El amplio rango de compuestos y tipo de plantas reportados sugieren la participación de múltiples especies de microorganismos, esto es, el consorcio microbiano más que una sola especie (Anderson y col., 1993).

Reddy y Sethunathan (1983) reportan la conversión a CO₂ del 5.5% del paration (insecticida organofosforado) marcado con ¹⁴C en suelo sin vegetación, 9.2% en suelo de la rizósfera de arroz bajo condiciones no sumergidas en agua y 22.6% bajo condiciones de inundación. Hsu y Bartha (1979) reportan que en presencia de plantas o en suelo irrigado con exudados de raíces, aumenta la velocidad de mineralización del paration con respecto al suelo sin plantas. Walton y Anderson (1990) observaron que la biodegradación de tricloroetileno (TCE) fue mayor en el suelo de la rizósfera, comparado con el suelo no perteneciente a la rizósfera. El suelo fue colectado de un depósito de TCE y se tomó la rizósfera de cuatro especies dominantes del lugar, el suelo no perteneciente a la rizósfera fue tomado de áreas sin vegetación. La desaparición del TCE fue más rápida en el suelo de la rizósfera, teniendo de cuatro a siete veces mayor cantidad de biomasa microbiana que en el suelo sin rizósfera. Los autores señalan que el incremento en la biomasa facilitó la mineralización del TCE.

Günther y col. (1996) reportan la biodegradación de una mezcla de hidrocarburos alifáticos lineales y ramificados, alquenos e HAP, adicionada al suelo (5000 ppm). En el suelo con vegetación obtuvieron hasta un 97 % de biodegradación de los hidrocarburos totales. En el suelo sin plantas (control) se alcanzó el 84% de desaparición de los contaminantes. La cuenta viable inicial presente en el suelo fue de alrededor de 1x10⁶ UFC/g de suelo, alcanzando valores de 5x10⁹ y 3x10⁸ UFC/g de suelo para el suelo con plantas y el control respectivamente; este aumento en la cuenta viable coincidió con un aumento en el CO₂ producido con el suelo contaminado.

Nichols y col. (1997) reportan un aumento en el número de microorganismos degradadores en suelo contaminado artificialmente con hidrocarburos (2000 ppm), de la rizósfera de alfalfa (4×10^7 UFC/g) con respecto a suelo no contaminado (6×10^6 UFC/g), lo que indica un probable enriquecimiento selectivo de poblaciones microbianas degradadoras en suelo contaminado de la rizósfera.

II. JUSTIFICACIÓN

En México, uno de los principales problemas de índole ambiental se debe a la contaminación por petróleo y sus derivados de amplias zonas de suelo, ecosistemas costeros y mantos acuíferos, ésto afecta principalmente a los estados del sureste (Veracruz, Tabasco, Campeche y Chiapas), en los cuales se encuentra la mayor parte de las actividades, infraestructura y recursos relacionados con esta industria. Diversos factores, entre los que destacan la ubicación geográfica de los sitios contaminados, su extensión, así como la edad de los contaminantes en los suelos, dificultan la remoción de los mismos a través de tecnologías convencionales de remediación (físicoquímicas). Ante ésta problemática, una alternativa tecnológica es la aplicación de sistemas, plantas - microorganismos, ésta puede ser benéfica particularmente sobre la biodegradación de compuestos orgánicos antropogénicos.

Se ha observado que la participación de múltiples microorganismos dentro de una comunidad (consorcio), más que una especie en particular, provoca una biodegradación más completa de los hidrocarburos, ya que sus capacidades metabólicas son mayores que las obtenidas con una cepa pura. Además, las condiciones presentes en la rizósfera estimulan la presencia de microorganismos, que en el caso de plantas nativas expuestas a los contaminantes durante un largo tiempo, son potencialmente degradadores de hidrocarburos. La evaluación de la capacidad potencial de biodegradación de dichos microorganismos nativos, así como el estudio de su relación con el tipo de hidrocarburos y condiciones de cultivo, son fundamentales para el planteamiento de estrategias de biorremediación que utilicen los recursos bióticos del propio sitio.

III. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad degradadora de hidrocarburos de un consorcio microbiano aislado de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam., planta nativa de un sitio contaminado.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener un consorcio microbiano potencialmente degradador de hidrocarburos de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam. y determinar la proporción de los diferentes grupos microbianos (hongos y bacterias).
- Evaluar la biodegradación de hidrocarburos en medio líquido por un consorcio obtenido de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam.
- Evaluar la capacidad de biodegradación de hidrocarburos por hongos y bacterias presentes en el consorcio.
- Determinar la cinética de biodegradación de cada fracción de hidrocarburos por el consorcio, así como evaluar la distribución de poblaciones de hongos y bacterias durante la biodegradación en medio sólido.

IV. MÉTODOS Y MATERIALES

En la Figura 4.1 se presenta de manera general el desarrollo experimental realizado en el trabajo. A continuación se describen las condiciones utilizadas para cada experimento así como los métodos analíticos empleados.

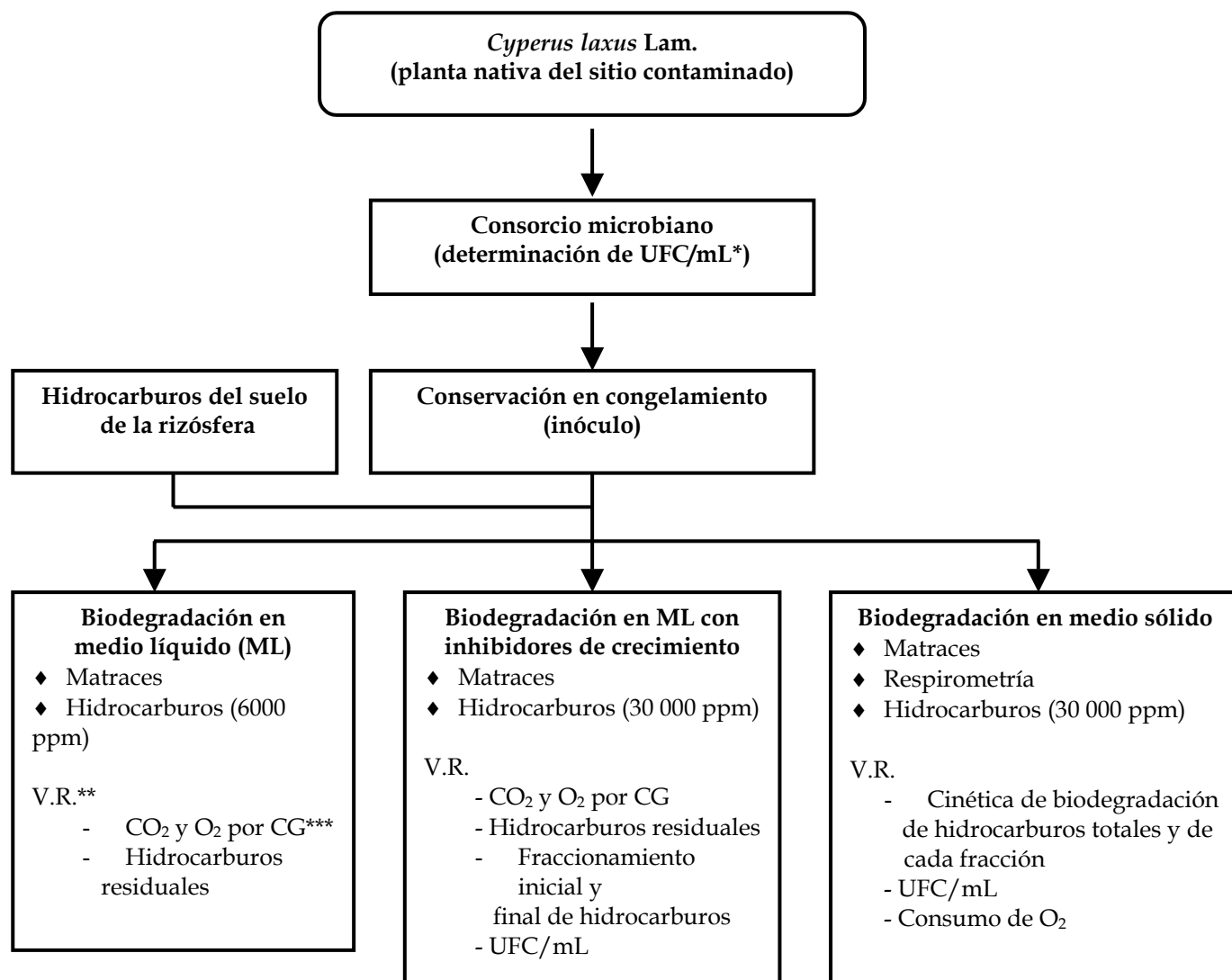


Figura 4.1. Esquema general del desarrollo experimental.

*Unidades formadoras de colonias por mililitro, **Variables de respuesta.

***Cromatografía de gases.

El sitio contaminado de interés se localiza en las cercanías de la refinería Lázaro Cárdenas en Minatitlán, Veracruz. Para la obtención del consorcio microbiano se eligió la rizósfera de una planta nativa (*Cyperus laxus* Lam.) de esta zona pantanosa por su predominancia y resistencia apreciable a altas concentraciones de hidrocarburos. Esta planta pertenece a la familia Cyperaceae la cual está constituida por 4000 a 5000 especies ordenadas en 102 a 123 géneros, en general son hierbas con tallos triangulares y con hojas lineales largas en forma de navaja parecidas a las que presentan algunos pastos, sus inflorescencias son diversas aunque comúnmente aparecen como floretes agrupados en espigas presentándose cada flor en el centro; presentan sistema de raíces fibroso y crecimiento modular. Algunas especies tienen propiedades medicinales mientras otras tienen uso en el control de la erosión y estabilización del suelo. Se encuentran en las selvas e incluso en la tundra ártica, sin embargo, su presencia es mayor en ecosistemas pantanosos. Debido a que son sensibles a los cambios nutricionales del sitio en que se desarrollan, su aparición o desaparición puede tomarse como un indicador del daño hacia su ecosistema (Correll y Correll, 1975).

4.1. Obtención y conservación del consorcio microbiano.

En el sitio contaminado, se colectaron plantas nativas (*Cyperus laxus* Lam.) con una porción de suelo en las raíces. Estas fueron transportadas a temperatura ambiente en bolsas de plástico. Para la toma de muestra, la raíz se sacudió cuidadosamente para retirar el exceso de suelo. Posteriormente se cortó una porción de 5 cm de la raíz y se colocó en un matraz Erlenmeyer (250 mL) con 100 mL de solución isotónica estéril, (cloruro de sodio al 0.85%). El matraz se agitó durante 20 minutos a 200 r.p.m., y la suspensión obtenida se filtró a través de un trozo de gasa estéril, colectando el filtrado y guardando el material retenido (suelo) (Leander, 1972).

La suspensión filtrada se mantuvo en agitación e inmediatamente se procedió a su conservación, para lo cual se llenaron tubos Eppendorf estériles con un mL del filtrado, se centrifugaron durante 14 minutos a 14 000 r.p.m. descartándose al final el sobrenadante. A cada tubo se le adicionaron 0.5 mL de glicerol al 30% (estéril), y se conservaron

a -20°C. A partir de estos tubos Ependorf se obtuvo el inóculo para los posteriores experimentos de biodegradación.

4.2. Medio de cultivo.

En la Tabla 4.1 se muestra el medio mineral utilizado en las pruebas de biodegradación que se describirán más adelante.

Tabla 4.1. Medio mineral utilizado en las pruebas de biodegradación.

Componente	Concentración (g/L)
NaNO ₃	3.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.25
K ₂ HPO ₄	1.0
KCl	0.5

El pH del medio fue ajustado, de acuerdo a las condiciones de cada experimento, con ácido clorhídrico 0.1N. Antes de cada prueba el medio se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

4.3. Ensayos de biodegradación.

Se llevaron a cabo tres experimentos de biodegradación, el primero se realizó en medio líquido evaluándose el consumo final de hidrocarburos. En el segundo se fijaron condiciones selectivas de cultivo en medio líquido, para evaluar la participación de los diferentes grupos microbianos: bacterias, hongos y el consorcio sobre la biodegradación. En el tercero se determinó la cinética de biodegradación de las diferentes fracciones en medio sólido. A continuación se describe la metodología usada en cada ensayo.

4.3.1. Ensayo de biodegradación en medio líquido.

4.3.1.1. Activación y propagación del inóculo.

Para la activación del inóculo se utilizó el medio de cultivo descrito en la Tabla 4.1, ésta se llevó a cabo en dos etapas:

Etapa I. En un tubo de ensaye con tapón de algodón se colocaron 0.5 mL del consorcio de los tubos Ependorf mantenidos en refrigeración y 4.5 mL de medio mineral con glucosa (0.5 %). Los tubos se incubaron a 30°C con agitación a 150 r.p.m. durante 24 h.

Etapa II. Se adicionaron 5.0 mL de inóculo (*Etapa I*) a un matraz Erlenmeyer (tapón de algodón) con 45 mL de medio mineral con glucosa (0.5%) y se incubaron a 30°C con agitación a 150 r.p.m. durante 24 h.

4.3.1.2. Ensayo de biodegradación.

Se prepararon seis matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapa de rosca y septo para la toma de muestras, a cada uno se le adicionó 47.5 mL de medio de cultivo a pH 7 y 2.5 mL de inóculo (*Etapa II*). A cuatro matraces se les añadieron 0.3 g de hidrocarburos sin asfaltenos (la eliminación de los asfaltenos se describe en la sección 4.4.1.2) como única fuente de carbono, los matraces restantes se tomaron como control sin hidrocarburos. Los matraces se incubaron a 30°C con agitación a 150 r.p.m. durante 21 días. Al final de la prueba se determinaron los hidrocarburos residuales de acuerdo al método descrito en la sección 4.4.1.4. El CO₂ producido y el O₂ consumido se cuantificaron cada 48 horas por cromatografía de gases (sección 4.4.4). Los recipientes se airearon en condiciones asépticas durante 45 minutos al final de cada análisis, para mantener las condiciones aerobias.

4.3.2. Ensayo de biodegradación con inhibidores de crecimiento.

4.3.2.1. Activación y propagación del inóculo.

En la Tabla 4.2 se describen las condiciones en las que se realizó la activación y propagación del inóculo, se prepararon cinco matraces para los cultivos de hongos, bacterias y el consorcio respectivamente.

Tabla 4.2. Activación y propagación del inóculo para el ensayo de biodegradación con inhibidores.

Condiciones	Hongos	Bacterias	Consortio
pH	5	7	6
Inhibidor	cloramfenicol (100 mg/L)	nistatina (100 mg/L)	-----
Matraces	Erlenmeyer (250 mL) bafleados, con tapa de rosca y septo para la toma de muestras		
Medio de cultivo:	4.9 mL/matraz		
Inóculo*	0.1 mL del consorcio		
Hidrocarburos sin asfaltenos**	0.03 g a cada matraz, excepto uno utilizado como control		
Tiempo de incubación	5 días (30°C, 150 r.p.m.)		

* proveniente de un tubo Ependorf mantenido en refrigeración (sección 4.1).

**se adicionaron hidrocarburos como única fuente de carbono y energía

4.3.2.2. Ensayo de biodegradación.

A cada matraz de la etapa de activación propagación (Tabla 4.2) se le adicionaron 1.5 g de hidrocarburos sin asfaltenos más 45 mL de medio mineral con el inhibidor y pH correspondientes a cada cultivo. Durante el experimento se midió el CO₂ producido por cromatografía de gases, se determinaron las UFC/mL finales, se cuantificaron los hidrocarburos residuales por medio de extracción en fase líquida (sección 4.4.1.4) y se realizó el fraccionamiento final como se describe en la sección 4.4.1.3.

Con los resultados del fraccionamiento se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el paquete estadístico SPSS® para *Windows*.

4.3.3. Cinética de biodegradación de hidrocarburos.

4.3.3.1. Activación y propagación del inóculo.

La activación y propagación del inóculo para este experimento se realizó de manera similar a la descrita en la sección 4.3.1.1, con la diferencia de que no se adicionó glucosa como fuente de carbono en el medio de cultivo y que además de las dos etapas iniciales se llevó a cabo una *tercera*, llevando el inóculo a un volumen final de 250 mL, en las tres etapas solo se adicionaron hidrocarburos sin asfaltenos como única fuente de carbono y

energía (6000 ppm), la incubación para cada etapa fue a 30°C en agitación a 150 r.p.m. por cinco días.

En este caso, el inóculo utilizado en los experimentos anteriores, fue enriquecido con tres hongos aislados del mismo consorcio. Las tres cepas se inocularon en matraces Erlenmeyer (250 mL) con 30 mL de medio PDA y se incubaron a 30°C hasta observar un crecimiento abundante para la obtención de las esporas. Las esporas de cada cepa se cosecharon adicionando a cada matraz 10 mL de Tween 80 (0.01%, v/v) en agitación (10 min). El matraz de la *tercera etapa*, se inoculó con la cantidad necesaria de la suspensión de esporas para lograr una concentración final de 1×10^6 esporas/mL de cada hongo filamentoso.

4.3.3.2. Cinética de biodegradación.

En la Tabla 4.3 se describen detalladamente las condiciones establecidas para el experimento de biodegradación (cinética de fraccionamiento) en medio sólido, el inóculo fue el consorcio obtenido en la *tercera etapa*. Se prepararon 15 matraces con hidrocarburos como fuente de carbono y se incubaron a 30°C.

Tratamiento de las muestras y análisis realizados.

A cada tiempo de muestreo de los 15 matraces se tomaron tres al azar, a cada uno se le adicionó 20 mL de solución isotónica (0.85 %, p/v), se agitaron durante 10 minutos, y se determinó el número de UFC/mL siguiendo el método descrito en la sección 4.4.3. Se cuantificaron los hidrocarburos residuales y se fraccionaron de acuerdo a los métodos descritos en las secciones 4.4.1.4 y 4.4.1.3 respectivamente.

4.3.3.3. Respirimetría.

Para evaluar el consumo de O₂ durante el crecimiento del consorcio a partir de HTP, se utilizó un respirómetro N-CON (*Comput-OX 244*). El principio de operación del respirómetro, se basa en la caída de presión generada durante la respiración, en presencia de KOH. Debido a la respiración llevada a cabo por los microorganismos, el

Tabla 4.3. Condiciones para la prueba en medio sólido.

Condiciones	Medio sólido
Soporte:	Vermiculita (8.0 g/matraz)
Medio de cultivo:	Medio mineral (Tabla 4.1)* 15.0 mL/matraz
Sustrato:	Hidrocarburos sin asfaltenos
Inóculo:	Consorcio (2.5 mL/matraz)
Temperatura:	30°C
pH:	6
Humedad (i):	65 %
Volumen ocupado	25 mL
Matraces	125 mL
Hidrocarburos /matraz	0.75 g**
Hidrocarburos (ppm)	30, 000***
Tiempo de incubación	38 días

*El medio mineral se preparó con la concentración de las sales elevadas al triple.

** Hidrocarburos sin asfaltenos.

*** Considerando el volumen útil en el reactor (25 mL).

oxígeno en una atmósfera cerrada se agota. Simultáneamente, el CO₂ que se produce es removido de la atmósfera por la trampa para CO₂ (KOH). La caída de presión resultante es detectada por un sensor de presión. Con la activación del sensor de presión, el sistema suministra un “pulso” de O₂ en el reactor. El sistema registra este evento y el tiempo en el que ocurre (Manual de operación del *Comput-OX 244*).

Las condiciones utilizadas para el cultivo en medio sólido (respirómetro) fueron las mismas que las usadas en la prueba en matraces (Tabla 4.3). En este caso, únicamente se ajustaron las cantidades necesarias (de medio de cultivo, vermiculita, inóculo y concentración de hidrocarburos) para obtener 50 mL ocupados en el reactor. Se prepararon dos repeticiones con hidrocarburos, así como dos controles sin hidrocarburos, con el objetivo de cuantificar la demanda de oxígeno debida al metabolismo endógeno de los microorganismos presentes; finalmente se realizó el cálculo de la demanda de oxígeno para el cultivo.

4.4. Métodos analíticos.

4.4.1. Análisis de hidrocarburos totales de petróleo (HTP).

4.4.1.1. Extracción y cuantificación de los HTP del suelo.

Los hidrocarburos totales de petróleo (HTP) se extrajeron a partir del suelo adherido a la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam. El suelo se secó al aire y posteriormente se molió, se le determinó la humedad por medio de una termobalanza (Ohaus). La determinación de HTP se realizó usando el método 3540 de la Environmental Protection Agency (EPA).



Figura 4.2. Equipo utilizado en la extracción de los hidrocarburos totales de petróleo (HTP).

Este es un procedimiento para extracción de compuestos orgánicos no volátiles y semivolátiles a partir de sólidos tales como lodos y desechos. La extracción Soxhlet es un proceso que asegura el contacto de la muestra con el solvente de extracción, ésta se realizó por reflujo en el sistema que se muestra en la Figura 4.2, que consta de un matraz de bola con fondo plano seguido del Soxhlet y un refrigerante, este sistema se conectó a un recirculador con líquido refrigerante. Se pesaron entre 10 y 15 gramos de suelo (por triplicado) en cartuchos de celulosa (Wahntman 33 x 80 mm), con la finalidad de eliminar el agua presente en la muestra, ésta se mezcló con sulfato de sodio anhidro (1:1 p/p). El cartucho se colocó dentro del Soxhlet y por la parte superior se adicionaron 160 mL de

una mezcla acetona:hexano como solvente de extracción, se mantuvo el reflujo entre 18 y 20 h. El solvente se evaporó en charolas de aluminio (hasta peso constante) y posteriormente se colocaron en un desecador. La cuantificación de los hidrocarburos se realizó por diferencia de pesos (USEPA, 1995).

4.4.1.2. Precipitación y cuantificación de los asfaltenos.

La cuantificación de asfaltenos se realizó por precipitación utilizando n-pentano, solvente en el que ésta fracción es insoluble. Aproximadamente 1g de los HTP extraídos del suelo, como se describe en la sección 4.4.1.1, fueron colocados en un vaso de precipitados (previamente tarado) y adicionados con 20 mL de pentano a temperatura ambiente. Con ayuda de una espátula se homogeneizó la muestra, filtrándose posteriormente a vacío (papel Whatman 41 a peso constante) y colectando el filtrado en un matraz Kitazato. Se realizaron de 3 a 5 lavados cada uno con 10 mL de pentano caliente. Posteriormente el solvente se eliminó por evaporación (ASTM, 1991). Para obtener una mayor precisión en la cuantificación se pesó el precipitado de los asfaltenos adherido en: a) el papel filtro, b) el vaso de precipitados y c) en la espátula. El análisis se realizó por triplicado.

4.4.1.3. Fraccionamiento de hidrocarburos sin asfaltenos.

Este método se basa en la separación de los hidrocarburos por cromatografía en columna utilizando sílica gel (mallas 60-200) como fase estacionaria, y solventes orgánicos como agentes de elución (Wang y col., 1994). La determinación se realiza gravimétricamente. Para el análisis se emplearon columnas de vidrio con llave de paso así como viales previamente pesados; la sílica gel se activó secándose en una estufa a 105 °C durante 24 h. El procedimiento se detalla a continuación:

Empacado de las columnas.

En el fondo de las columnas se colocó un trozo de fibra de vidrio, se adicionaron aproximadamente 2 g de sílica gel previamente activada y se compactó ligeramente, encima de la sílica se colocó otro trozo de fibra de vidrio. En la parte superior se adicionaron 0.5 g de sulfato de sodio anhidro.

Formación del gel e incorporación de la muestra.

Se agregaron 25 mL de hexano en la columna y se permitió su elución, el hexano se recirculó en la columna hasta que la sílica se observó transparente. En un vaso de precipitados previamente pesado se solubilizaron 0.2 g de hidrocarburos sin asfaltenos en 15 mL de hexano.

Elución.

La separación de las diferentes fracciones de hidrocarburos se basa en su solubilidad diferencial en distintos solventes, las eluciones se realizaron en el orden siguiente.

- a) **Hexano:** se colocó la muestra en la parte superior de la columna, se colectaron las fracciones (eluciones de 15 mL) hasta que la mancha amarilla observada alcanzara la parte inferior de la columna.
- b) **Hexano - Benceno:** se realizó una elución de 15 mL (1:1) con la mezcla.
- c) **Benceno:** Se adicionaron volúmenes de 15 mL hasta que la mancha amarilla abandonara por completo la columna.
- d) **Benceno - Acetona:** se realizó una elución con 15 mL (1:1) con la mezcla.
- e) **Acetona - Metanol:** una elución con 15 mL (1:1).

La primera fracción (hexano) corresponde a los hidrocarburos alifáticos. Las fracciones con la mezcla hexano-benceno y benceno, se consideraron como los hidrocarburos aromáticos. Las dos últimas fracciones con las mezclas de benceno-acetona y acetona-metanol contienen a los hidrocarburos polares.

Los viales se evaporaron bajo campana de extracción y se colocaron en desecador por 24 h, posteriormente se pesaron para el cálculo de cada fracción.

4.4.1.4. Extracción y cuantificación de los HTP en fase líquida.

Para la cuantificación de los hidrocarburos residuales en el medio líquido se realizó una extracción empleando una mezcla de hexano - acetato de etilo (1:1). Se adicionaron 20 mL de la mezcla al matraz, posteriormente se transfirieron ambas fases a un embudo de separación y se realizaron de 3 a 5 extracciones con 20 mL de la mezcla. La fase orgánica se colocó en un vaso de precipitados (previamente pesado) y se evaporó en la campana de extracción. La cantidad de hidrocarburos se calculó por diferencia de pesos. La eficiencia de extracción se determinó adicionando una cantidad conocida de hidrocarburos utilizando el mismo procedimiento que para las muestras, calculándose así los hidrocarburos recuperados.

4.4.2. Determinación del pH del suelo.

Para determinar el pH del suelo, se pesaron 5 g del suelo (previamente secado al aire) en un vaso de precipitados, se agregaron 15 mL de agua destilada y se agitó durante 10 minutos (Aguilar, 1987). El pH fue determinado en un potenciómetro (Conductronic modelo pH 130) previamente calibrado. La determinación se realizó por triplicado.

4.4.3. Cuenta en placa de microorganismos.

La cuenta en placa de los microorganismos se refiere al número de células viables o fragmentos miceliales en una muestra capaces de crecer sobre agar. El procedimiento se realiza por dilución en serie y subsecuente plaqueo (Alef y Nannipieri, 1995). Se reportó el número de microorganismos, como *unidades formadoras de colonias* (UFC) por mililitro o gramo de suelo. Los medios de cultivo utilizados para la cuenta fueron: Agar Sabouraud (AS, Bioxon®), Agar soya y tripticaseína (AST, Bioxon®) y Agar papa dextrosa (PDA, Bioxon®).

Antes de cada experimento de biodegradación se estimaron las UFC /mL presentes en los tubos Ependorf con el consorcio. La *técnica de diluciones seriadas* se describe a continuación: en tubos de ensayo estériles se colocaron 9 mL de solución isotónica, adicionándose al primer tubo una alícuota de 1 mL de la muestra (tubo Ependorf con el

consorcio), de éste se realizaron sucesivamente diluciones 1 en 10. Se prepararon cajas Petri de cada medio por triplicado y se inocularon con 100 µL de las diluciones seriadas. Con ayuda de una varilla de vidrio (en forma de "L") se distribuyó el inóculo sobre la superficie del medio. Las cajas Petri se incubaron a 30°C, cada 24 h se observó el crecimiento, y se contó el número de colonias hasta las 72 h.

Las UFC/mL se calcularon de acuerdo a la Ecuación 1, considerando el factor de dilución correspondiente, así como cualquier dilución realizada a la muestra (Alef y Nannipieri, 1995; Leander, 1972).

$$\text{UFC} / \text{mL} = \frac{\# \text{ de colonias}}{0.1 \text{ mL de inóculo}} \times \text{factor de dilución} \quad (1)$$

4.4.4. Análisis del CO₂ y O₂ por cromatografía de gases.

El CO₂ producido en los experimentos de biodegradación de hidrocarburos (única fuente de carbono y energía), es una medida de su mineralización como consecuencia del metabolismo microbiano. El CO₂ producido así como el O₂ consumido se cuantificaron por cromatografía de gases, en un cromatógrafo (Gow-Mac 580) con un detector de conductividad térmica y con una columna CTR1, bajo las condiciones de operación que se detallan en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Condiciones de operación para el análisis del CO₂ y O₂ por cromatografía de gases.

Condición	Valor
❖ Volumen de inyección	50 µL
❖ Temperatura de la columna	45°C
❖ Temperatura del detector	48°C
❖ Temperatura del inyector	45°C
❖ Corriente del detector	150mA
❖ Gas acarreador	Helio
❖ Flujo del gas acarreador	40 mL/ min.

Se inyectaron al cromatógrafo tres mezclas estándar de composición conocida, (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Composición de las mezclas estándar utilizadas.

Mezcla	Composición (%)		
	CO ₂	O ₂	N ₂
A	----	10.0	90.0
B	5.0	14.1	80.9
C	6.0	18.0	76.0

Con las mezclas de gases (Tabla 4.5) se obtuvieron las curvas estándar, graficando el área bajo la curva (ABC) contra la composición de los gases analizados (CO₂ y O₂). Del análisis de regresión de estos datos se obtuvo la ecuación con la que se calculó el contenido (%) de CO₂ y O₂ en el aire de las muestras problema. Los valores obtenidos en porcentaje de CO₂ y O₂ se transformaron a milimoles (mmoles) utilizando la siguiente relación (Ecuación 2):

$$\text{mmoles (x)} = \left[(V_{\text{aire}}) \left(\frac{\% x}{100} \right) \right] * 0.0317 \quad (2)$$

x: se refiere a la fracción de CO₂ u O₂ medida

V_{aire}: espacio vacío en el reactor

El factor de corrección 0.0317 se calcula considerando el volumen (22.4 mL) ocupado por un mmol de un gas ideal.

$$0.0317 = \left(\frac{1 \text{ mmol}}{22.4 \text{ mL}} \right) \left(\frac{0.776 \text{ atm}}{1 \text{ atm}} \right) \left(\frac{273 \text{ K}}{298 \text{ K}} \right) \quad (3)$$

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Este capítulo se divide en dos partes, en la primera se presentan los resultados de los análisis del suelo de la rizósfera de *Cyperus latus* Lam., la composición de los hidrocarburos utilizados y la cuenta viable inicial del consorcio; en la segunda parte se presentan los ensayos de biodegradación de hidrocarburos utilizando como inóculo el consorcio aislado de la rizósfera.

5.1. Características del suelo de la zona de colecta de las plantas.

En la Tabla 5.1 se presenta la composición y características del suelo cercano a donde se colectaron las plantas de estudio, el análisis fue realizado por el Departamento de Suelos de la Universidad Autónoma de Chapingo.

Tabla 5.1. Composición del suelo no rizosférico de la zona de estudio.

Composición								
ppm								
	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
	22.6	7.6	168	55.4	100	5	4.16	12.8
Características								
Materia orgánica (%)	32.8							
HTP* (ppm)	270, 000							
pH	4.8							
Arena (%)	81							
Limo (%)	11.1							
Arcilla (%)	7.2							
Clasificación textural	Arenoso-franco							

*HTP: Hidrocarburos totales de petróleo

El alto valor de materia orgánica se debe a que el análisis considera el carbono correspondiente a los hidrocarburos. El nivel de arcilla encontrado en el suelo es bajo, lo que teóricamente favorece la disponibilidad de los contaminantes orgánicos ya que este componente del suelo se relaciona a la elevada sorción de compuestos orgánicos. En suelos arenosos la velocidad de infiltración de agua así como la tortuosidad son mayores que en suelos arcillosos. Sin embargo, los suelos con plantas o de cultivo tienden a compactarse lo que reduce algunas de las características del suelo como la porosidad (Narro, 1994).

5.2. Análisis del suelo de la rizósfera.

A partir del suelo adherido a las raíces de las plantas colectadas en el sitio contaminado se determinó el contenido de hidrocarburos totales de petróleo (HTP), siendo este de $23.7\% \pm 0.5$ en base seca, (237,000 ppm de HTP). Este resultado indica la resistencia de esta planta a elevados índices de contaminación por hidrocarburos. En suelo no rizosférico la concentración de hidrocarburos fue mayor (Tabla 5.1), lo que hace suponer la posible disminución de éstos debido a las plantas y sus microorganismos asociados. El pH determinado en el suelo de la rizósfera es ligeramente ácido (5.49 ± 0.05), este valor de pH es una unidad superior al encontrado en suelo (sin raíces) cercano a donde se colectó *Cyperus laxus* Lam. (Tabla 5.1). Este aumento en el pH ya se ha reportado para la rizósfera de un suelo arenoso (Metting, 1993).

5.2.1. Análisis de hidrocarburos.

En la Tabla 5.2 se presenta la composición de los hidrocarburos extraídos del suelo de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam., y del suelo no rizosférico. Además se muestra la composición de los hidrocarburos después de la eliminación de los asfaltenos.

Tabla 5.2. Composición de los hidrocarburos extraídos del suelo de la rizósfera, del suelo no rizosférico y de los hidrocarburos sin asfaltenos.

Fracción	Composición de los HTP (%)*		Composición de los hidrocarburos sin asfaltenos (%)*
	Suelo de la rizósfera	Suelo no rizosférico	
Alifáticos	33 ± 1.08	$30 \pm 1.3^{**}$	58
Aromáticos	16 ± 0.22	24 ± 6.3	28
Polares	8 ± 0.65	13 ± 2.82	14
Asfaltenos	43 ± 1.15	33 ± 0.9	-----

*Promedio de tres determinaciones. **desviación estándar.

Entre el suelo de la rizósfera y el no rizosférico se puede observar que en cuanto a la concentración de la fracción alifática no existe una diferencia apreciable, en cambio tanto la fracción de hidrocarburos aromáticos como polares se presentan en menor concentración en el suelo de la rizósfera que en el suelo no rizosférico, es posible que

esto sea consecuencia de una mayor actividad microbiana y biotransformación de los contaminantes en la rizósfera que en el suelo sin plantas. La concentración de asfaltenos en el suelo de la rizósfera (43%) es mas elevada que en suelo sin raíces (33%), esto puede deberse a que la biodegradación de las otras fracciones provoca que la proporción en el suelo de los asfaltenos aumente. Por otro lado, la alta concentración de asfaltenos puede considerarse como un indicador del grado de intemperización del suelo contaminado, debido a que posiblemente la transformación de otras fracciones da origen a compuestos como radicales libres, los cuales a través de reacciones de polimerización, pueden formar moléculas de asfaltenos (Pollard y col., 1994). Estos compuestos (agregados de hidrocarburos poliaromáticos, ácidos nafténicos, sulfuros, fenoles polihídricos, ácidos grasos, y metaloporfirinas) constituyen la fracción de los hidrocarburos menos susceptible al ataque por parte de los microorganismos (Sugiura y col., 1997). Chaîneau y col. (1995) reportan una mezcla de hidrocarburos obtenida de desechos de un sitio de perforación, constituida por 60% alifáticos, 30% aromáticos y 10% de hidrocarburos polares, la mezcla utilizada no presentó asfaltenos. En este caso se trata de un suelo no intemperizado, por lo que se presenta un elevado valor de la fracción de alifáticos (la más fácilmente biodegradable), lo que contrasta con el 33.24 % de hidrocarburos alifáticos encontrado en el suelo intemperizado de la rizósfera de la planta nativa.

5.2.2. Cuenta viable inicial.

En la Tabla 5.3 se presenta el número de unidades formadoras de colonias encontrado en el suelo de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam.; esta determinación se realizó después de la toma de muestra del suelo de rizósfera. El número de UFC/g de suelo de la rizósfera muestra que la población de microorganismos que crecieron sobre agar soya y tripticaseína (bacterias) es tres veces mayor que la de los microorganismos capaces de crecer en agar Sabouraud (hongos). A pesar de que las bacterias se encuentran en mayor proporción, los hongos presentan la misma o mayor importancia en el suelo considerando su íntima asociación con las raíces y su papel como microorganismos saprofíticos (Metting, 1993). Para la rizósfera de plantas como el trigo (bajo

condiciones normales de crecimiento), se han reportado valores de hasta 12×10^8 y 12×10^5 UFC/g de suelo, para las bacterias y hongos respectivamente (Rouatt y Katznelson, 1960).

Tabla 5.3. Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam.

Medio de cultivo	UFC/g de suelo*
Agar Sabouraud	$30.1 \times 10^6 \pm 1.2$
Agar soya y tripticaseína	$92.4 \times 10^6 \pm 0.75$

* base seca

Günther y col. (1996) reportan en suelo contaminado con hidrocarburos (5000 ppm), cuentas viables iniciales de alrededor de 5×10^6 UFC/g de suelo de la rizósfera, en cambio en suelo sin vegetación se encontraron 3×10^5 UFC/g de suelo. El número de microorganismos encontrado para la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam. coincide con los valores anteriores. Sin embargo, existen diversos factores microambientales como la exposición a los contaminantes orgánicos que definen la composición de la microbiota de la rizósfera,

Aunque la cuenta en placa es una técnica que permite determinar los microorganismos viables en la muestra, la cual puede ser suelo o agua (Alef y Nannipieri, 1995), es importante considerar que el número de microorganismos que pueden aislarse está entre el 0.1 - 10% del total de microorganismos presentes en el suelo; lo anterior se debe a varias razones, entre las que destacan: los requerimientos de factores de crecimiento específicos, nutrientes o condiciones ambientales particulares tales como presión parcial de oxígeno, pH o temperatura (Curl, 1986).

5.3. Ensayos de biodegradación.

A continuación se presentan los resultados de cada uno de los ensayos de biodegradación de hidrocarburos realizados utilizando el consorcio extraído de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam. como inóculo. En todos los ensayos se adicionaron hidrocarburos sin asfaltenos como única fuente de carbono y energía, se decidió eliminar la fracción de los asfaltenos dado que son considerados compuestos no biodegradables, siendo el interés principal la biodegradación de las fracciones que se sabe presentan la mayor toxicidad (aromáticos y polares) y biodegradación (alifáticos). La evaluación de la capacidad de biodegradación de hidrocarburos por el consorcio se realizó, en ausencia de exudados de las raíces, bajo la hipótesis de que éstos no son necesarios para la biodegradación *in vitro*. La biodegradación se evaluó a través de la cuantificación de los hidrocarburos al final de los ensayos, además se midió el CO₂ producido a partir de hidrocarburos como única fuente de carbono y energía (mineralización). En el siguiente ensayo se analizó la contribución de los diferentes grupos microbianos (bacterias, hongos y el consorcio) en la biodegradación de hidrocarburos a una concentración más elevada y se evaluó el consumo de las diferentes fracciones de hidrocarburos. Finalmente se analizó la biodegradación en medio sólido determinándose la cinética de consumo de hidrocarburos y de cada una las fracciones, también se midieron las UFC/mL durante el ensayo así como la asimilación de oxígeno por el cultivo (respirometría).

5.3.1. Ensayo en medio líquido.

Este experimento se diseñó con la finalidad de evaluar si los microorganismos presentes en el consorcio son capaces de utilizar a los hidrocarburos como única fuente de carbono y energía, además de conocer el consumo total de éstos mediante la cinética de producción de CO₂ y la cuantificación de los hidrocarburos consumidos.

5.3.2. Biodegradación de hidrocarburos.

En la Tabla 5.4 se presentan los niveles de biodegradación medidos después de 21 días de incubación en matraces con medio líquido.

Tabla 5.4. Biodegradación total de hidrocarburos sin asfaltenos obtenida en 21 días con el consorcio.

Hidrocarburos sin asfaltenos	(g/matraz)*
Iniciales	0.31
Residuales	0.07 $\pm$ 0.05
Biodegradación (%)	75 $\pm$ 15

*promedio de tres determinaciones

La biodegradación obtenida con el consorcio de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam., representa un consumo de 0.24 g de los hidrocarburos iniciales, este valor es elevado comparado con otros encontrados en la literatura. Sugiura y col. (1997) reportan 19% de biodegradación con un consorcio (SM8) en medio líquido para petróleo crudo Maya; en un estudio similar con la bacteria *Acinetobacter* sp. la biodegradación fue del 12% después de 28 días a 20°C. Al utilizar petróleo ligero Árabe se presentaron mayores porcentajes de biodegradación (34% con el consorcio, 20% con *Acinetobacter* sp.). Oudot y col. (1987) destacan el aislamiento de microorganismos nativos de un suelo con tres años de contaminación por petróleo, éstos fueron capaces de biodegradar entre 5% y 25% de los hidrocarburos totales. Morales y col. (1999) reportan una biodegradación del 25.48% en un estudio utilizando crudo Maya en medio líquido, para un consorcio aislado de un suelo contaminado y 22.37% para un consorcio aislado de una composta. Es importante señalar que la biodegradación de hidrocarburos depende de varios factores entre los que se encuentran la composición de éstos y el tipo de microorganismos presentes en el cultivo, lo que puede explicar la diferencia entre los resultados encontrados con el consorcio de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam. y algunos datos reportados en la literatura.

5.3.3. Producción de CO₂.

En la Figura 5.1.a se presenta la cinética de producción de CO₂ a partir de hidrocarburos (6000 ppm) y en el control (sin hidrocarburos). Los resultados graficados son promedios

de tres determinaciones, se observa que durante los primeros 9 días el CO₂ producido en ambos cultivos aumenta rápidamente, con una velocidad de producción de 0.37 y 0.32 mmoles de CO₂/día para los matraces con hidrocarburos y el control respectivamente; esta elevada velocidad de producción de CO₂ puede atribuirse a la presencia de glucosa residual de la etapa de activación del inóculo. Posteriormente, entre el día 9 y 21 del cultivo, la velocidad de producción de CO₂ disminuye. En los matraces con hidrocarburos la velocidad de producción es ligeramente mayor (0.09 mmoles de CO₂/día) con respecto al control, debido a la utilización de los hidrocarburos como fuente de carbono. Para el control la disminución en la producción de CO₂ es más notoria (0.06 mmoles de CO₂/día) y probablemente se debe al agotamiento de la fuente de carbono, donde el CO₂ producido podría ser el resultado de la autólisis celular o de la utilización de subproductos acumulados en el medio de cultivo durante la primera etapa de crecimiento.

En la Figura 5.1.b se presenta la cinética de producción de CO₂ corregido, estos valores corregidos se calcularon restando el CO₂ producido en el control al CO₂ producido en los matraces con hidrocarburos, por lo que se considera como el CO₂ proveniente solo de la oxidación de los hidrocarburos. A partir de estos valores se determinó la velocidad global de producción de CO₂ debida a la mineralización de los hidrocarburos siendo de 0.04 mmoles de CO₂/día. La forma lineal de esta respuesta hace suponer que el CO₂ se

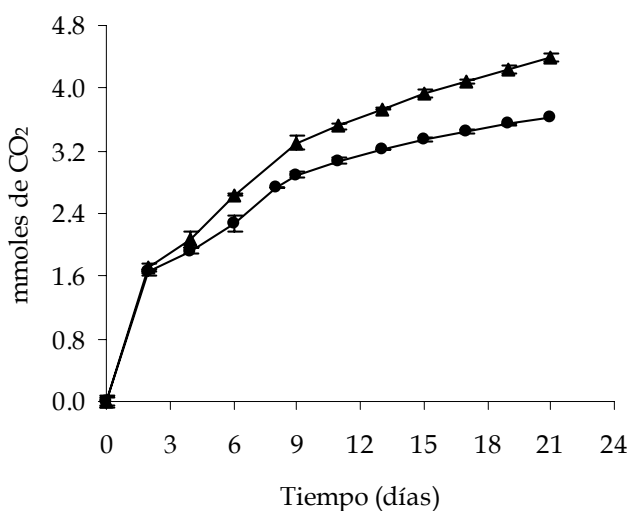


Figura 5.1.a. Cinética de producción de CO₂ con hidrocarburos como fuente de carbono (▲), control (●).

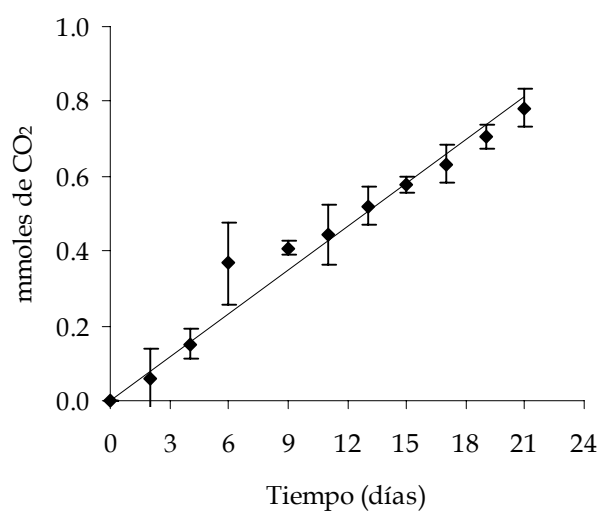


Figura 5.1.b. Cinética de producción de CO₂ corregido (♦).

produce lentamente debido posiblemente a que el carbono, no soluble de los hidrocarburos, es el factor limitante del crecimiento. Durante el ensayo se observó la emulsificación de los hidrocarburos en el medio, lo que puede explicar el aumento continuo del CO₂ producido. En otras palabras, posiblemente la biodisponibilidad se favorece durante el curso del cultivo, debido a la presencia de un **biosurfactante**, el cual a través de la emulsificación de los hidrocarburos facilita su biodegradación.

Con estos resultados se demuestra que el consorcio microbiano obtenido de la rizósfera de una planta nativa expuesta a elevados niveles de hidrocarburos, presenta capacidad para utilizar hidrocarburos sin asfaltenos como única fuente de carbono y energía. Atlas y Cerniglia (1995) mencionan que los microorganismos degradadores de hidrocarburos se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo y ambientes acuáticos, estas poblaciones normalmente constituyen menos del 1% del total de los microorganismos del suelo. Sin embargo, cuando los contaminantes están presentes dichas poblaciones llegan a representar hasta 10% del total de los microorganismos. La microbiota expuesta a los hidrocarburos se adapta presentándose un proceso de selección así como cambios genéticos que producen un incremento de la proporción de microorganismos degradadores de hidrocarburos (Atlas, 1991). Davies y Westlake (1979) reportan el aislamiento de 34 hongos degradadores de hidrocarburos de la región petrolera del norte de Canadá, destacan la capacidad de los hongos aislados para crecer en las condiciones imperantes en la zona (bajos valores de pH y bajas concentraciones de nutrientes).

A partir de los valores de CO₂ medidos y discutidos en esta sección se calculó la fracción de carbono de los hidrocarburos que fue mineralizado, a continuación se muestran los resultados.

5.3.4. Mineralización de hidrocarburos.

Con el propósito de evaluar la cantidad de carbono oxidado de los hidrocarburos hasta CO₂ se calculó la fracción mineralizada. De acuerdo con Alexander (1994), la mineralización se define como la conversión de un compuesto orgánico en compuestos

minerales como CO₂ y otros como el agua, la mineralización puede estimarse por la evolución en la producción de CO₂ (Grady, 1985). Para el cálculo de la mineralización, es imprescindible la realización de un balance de carbono. En éste trabajo se consideró que el contenido de carbono en los hidrocarburos es de 0.85 g de C/g hidrocarburos. La mineralización (m%) se definió considerando la relación siguiente (Ecuación 4):

$$m(\%) = \frac{\text{mg C en el CO}_2}{\text{mg de C inicial}} \times 100 \quad (4)$$

Considerando lo anterior, los 0.782 mmoles de CO₂ (9.3 mg de C) producidos en 21 días de incubación, con respecto a los hidrocarburos iniciales (263 mg de C) representan una mineralización de 3.5%. Considerando el alto grado de biodegradación así como el nivel de mineralización obtenidos con el consorcio, es posible inferir que la mayor parte del carbono de los hidrocarburos consumidos se biotransformó dirigiéndose hacia la producción de biomasa, o de metabolitos, tales como exopolisacáridos (biosurfactantes). Sharabi y Bartha (1993) reportan hasta un 83.7% de mineralización de *n*-hexadecano en 30 días de incubación, señalan que la producción de CO₂ depende fuertemente del contenido de carbono así como de la naturaleza química del compuesto estudiado, el *n*-hexadecano es un compuesto relativamente fácil de biodegradar. Kanaly y Bartha (1999) reportan hasta un 60% de mineralización para benzo[a]pireno marcado con [¹⁴C], este compuesto fue adicionado al suelo a una concentración de 80 ppm, además se adicionaron mezclas definidas de hidrocarburos para favorecer el desarrollo de microorganismos degradadores del compuesto; Carmichael y Pfaender (1997) analizaron la mineralización de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en diferentes suelos, encontrando un 30-60% de mineralización para [¹⁴C] fenantreno, 10-55% con [¹⁴C] pireno, y 5-40% de [¹⁴C] benzo[a]antraceno, cabe mencionar que la concentración de hidrocarburos en los suelos varió entre 1500 y 260 ppm.

En la Figura 5.2 se presenta el comportamiento del *coeficiente respiratorio* (Cr) durante el ensayo, definido como la relación entre el CO₂ producido y el O₂ consumido, para la oxidación de un sustrato en un proceso aerobio. Este parámetro varía de acuerdo al sustrato degradado y a la estequiometría de la reacción de oxidación. Por ejemplo, la

degradación aerobia de la glucosa tiene un valor teórico de $Cr=1$ y para hidrocarburos un valor de 0.7 (Beaudin y col., 1996).

En la Figura 5.2 se observa que durante los primeros 6 días de cultivo los valores del Cr fueron superiores a uno (1.5-1), lo que indica que el CO_2 producido es superior al O_2 consumido, por lo que en esta etapa posiblemente se presentó el consumo de compuestos oxidados como algunos hidrocarburos polares además de la glucosa residual presente en el cultivo. Posteriormente entre el día 6 y 21 de cultivo el Cr se mantiene casi constante (0.8), este cambio en el valor del Cr puede deberse a que en esta etapa del cultivo, se llevó a cabo la oxidación de la fracción de hidrocarburos más reducida (hidrocarburos alifáticos y aromáticos) por lo que el oxígeno consumido aumentó con respecto al CO_2 producido, lo que sugiere que se requiere una mayor cantidad de O_2 para la oxidación de éste tipo de compuestos; los valores del Cr en esta etapa son ligeramente superiores al reportado por Beaudin (0.7) para hidrocarburos.

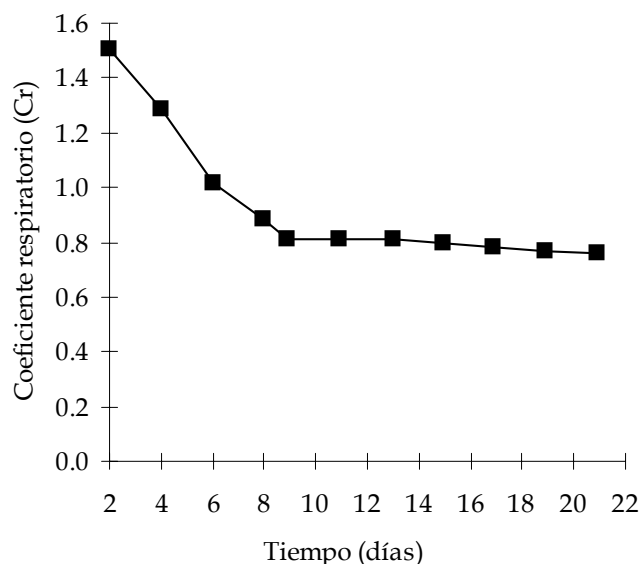


Figura 5.2. Coeficiente respiratorio calculado en el ensayo con el consorcio.

Se considera que las variaciones en el valor de este parámetro son indicativas de los cambios en el metabolismo. Considerando el valor reportado para hidrocarburos, $Cr=0.7$, éste corresponde a un equilibrio entre anabolismo y catabolismo, un valor menor indica un desacoplamiento en el que predomina el anabolismo, lo que significa que una menor cantidad del sustrato es oxidada, dirigiéndose principalmente el carbono

a la formación de biomasa. En el caso contrario ($Cr > 0.7$) se origina un desacoplamiento predominando el catabolismo sobre el anabolismo, por lo que se oxida una mayor cantidad del sustrato, siendo utilizado principalmente como fuente de energía (Medina, 1999). Los valores del Cr obtenidos a partir del día 6 del cultivo sugieren un equilibrio entre el catabolismo y el anabolismo en el cultivo.

5.3.5. Cuenta viable

En la Tabla 5.5 se presentan los valores de UFC/mL presentes en el inóculo y al final de la prueba de biodegradación con hidrocarburos como única fuente de carbono y energía, el número de microorganismos viables que crecieron sobre AST y PDA, aumentó considerablemente con respecto al valor inicial.

Tabla 5.5. Valores normalizados para la cuenta viable al inicio y final de la prueba de biodegradación

	UFC/mL	
	AST	PDA
Inóculo*	4.15×10^{11}	4.23×10^9
Final (con hidrocarburos)	4.35×10^{12}	2.60×10^{10}

*microorganismos viables al final de la etapa de activación y propagación.

El aumento en la cuenta viable fue del 90% para las bacterias (microorganismos que crecieron en AST) y de 84% para los hongos (microorganismos capaces de crecer en PDA). El aumento en el número de microorganismos, confirma la utilización de los hidrocarburos como fuente de carbono y energía.

En resumen, de los resultados anteriores se concluye que en cultivo sumergido el consorcio fue capaz de biodegradar hasta el 75% de los hidrocarburos sin asfaltenos en 21 días de incubación, lo que corresponde a un 3.5% de mineralización de la fuente de carbono. Durante el cultivo se observó la emulsificación de los hidrocarburos, lo que posiblemente favoreció su biodisponibilidad. Ya que la producción de CO_2 fue casi lineal se planteó realizar los siguientes experimentos durante un período de incubación

más prolongado. El objetivo del siguiente experimento fue evaluar la participación en la biodegradación de los diferentes grupos microbianos del consorcio.

5.4. Ensayo de biodegradación con inhibidores de crecimiento.

Con el fin de analizar la contribución de los grupos microbianos presentes en el consorcio (hongos y bacterias) sobre la biodegradación, se impusieron condiciones selectivas para cada grupo (hongos, bacterias y consorcio) cuantificándose la producción de CO₂, el grado de mineralización, los hidrocarburos residuales y el consumo de las diferentes fracciones que componen la mezcla de hidrocarburos sin asfaltenos. Por otra parte, se decidió elevar la concentración de hidrocarburos cambiando así la relación C/N de 10 (experimento anterior) a 50, lo anterior, para favorecer la presencia del biosurfactante, dado que éstos generalmente se producen bajo condiciones de cultivo como altas relaciones carbono/nitrógeno (C/N) (Guerra-Santos y col., 1984).

5.4.1. Biodegradación de hidrocarburos.

En la Tabla 5.6 se presentan los niveles de biodegradación de hidrocarburos sin asfaltenos para cada cultivo. No se aprecian diferencias significativas en los valores

Tabla 5.6. Biodegradación de los hidrocarburos obtenida con los hongos (34 días), bacterias y el consorcio (36 días).

Cultivo	Hidrocarburos iniciales (g/matraz)	Biodegradación (%)
Hongos	1.547	45 ±14
Bacterias	1.538	69 ±8
Consorcio	1.534	62 ±9

de biodegradación entre las bacterias y el consorcio; este comportamiento difiere al observado en la producción de CO₂ (Figura 5.3) donde el mayor valor se obtiene para el consorcio, esto indica que el consorcio lleva a cabo una mayor oxidación de la fuente de carbono; este fenómeno es más evidente si se considera la mineralización de los tres cultivos la cual se discute mas adelante. El valor de biodegradación para los hongos fue

menor que el obtenido en los otros dos cultivos, aunque la diferencia es significativa solo con respecto a las bacterias. En el caso de los hongos, durante el experimento no se observó la emulsificación de los hidrocarburos, posiblemente debido a la ausencia de alguno de los microorganismos (bacteria) responsable de la producción del biosurfactante.

El valor de biodegradación de los hidrocarburos iniciales (30 000 ppm) cercano al 70%, coincide con el encontrado en el experimento anterior (75%). Ambos valores son superiores a los obtenidos por Davies y Westlake (1979) que reportan 17% y 30% de biodegradación de hidrocarburos totales con una cepa de levadura y un hongo respectivamente, en medio líquido durante 30 días de incubación. Sugiura y col. (1997) utilizando petróleo árabe ligero reportan un consumo del 34% en 21 días, con un consorcio microbiano. Foght y col. (1999) reportan una biodegradación de 22% en 28 días para petróleo crudo, con un consorcio de bacterias en medio líquido.

5.4.2. Fraccionamiento de los hidrocarburos residuales.

Con la finalidad de conocer la biodegradación de la fracción de alifáticos, aromáticos y polares, se fraccionaron los hidrocarburos residuales del ensayo de biodegradación. En la Tabla 5.7 se presenta el consumo de las diferentes fracciones en la mezcla de hidrocarburos sin asfaltenos, estos valores se determinaron por medio del fraccionamiento en columna (sección 4.4.1.3).

Tabla 5.7. Consumo de las fracciones presentes en la mezcla de hidrocarburos.

Cultivo	Alifáticos (%)	Aromáticos(%)	Polares(%)
Hongos	59.9 ±0.6	55.9 ±4.4	26.0 ±1.5
Bacterias	72.3 ±9.1	77.5 ±3.8 a	39.0 ±19
Consorcio	69.7 ±10.5	59.0 ±7.6	38.0 ±19

^a valores que son significativamente diferentes entre los cultivos para cada fracción (p<0.05).

De manera general se observa que los niveles de biodegradación de los hidrocarburos *alifáticos* son similares en los tres cultivos, en cuanto a los *hidrocarburos aromáticos* se

obtuvo un nivel de biodegradación significativamente mayor con el cultivo de bacterias, en cambio entre el cultivo del consorcio y los hongos no se observaron diferencias significativas. En la utilización de los *hidrocarburos polares* no se presentaron diferencias significativas, siendo la fracción menos degradada en los tres cultivos.

Venkateswaran y Harayama (1995) detectaron entre 45% y 70% de biodegradación de hidrocarburos alifáticos con un inóculo mixto de bacterias y levaduras, el cual se cultivó hasta 6 veces consecutivas con los hidrocarburos (5000 ppm) residuales de cada etapa. Sugiura y col. (1997) utilizando crudo Maya (5000 ppm) determinaron hasta un 50% de biodegradación de los hidrocarburos alifáticos empleando un consorcio en medio líquido. Por otro lado, Setti y col. (1993) utilizando un cultivo puro de *Pseudomonas* sp. en medio líquido analizan la biodegradación de hidrocarburos alifáticos y su relación con la longitud de la cadena hidrocarbonada. Reportan que hidrocarburos con cadenas de hasta 16 átomos de carbono son fácilmente biodegradados, siendo los hidrocarburos alifáticos de 16 a 27 átomos de carbono degradados de manera independiente al número de átomos de carbono, en cambio los alifáticos con más de 28 átomos de carbono presentaron valores de biodegradación menores (<65%), lo que indica que éstos posiblemente componen los hidrocarburos residuales al término de la biodegradación.

Se ha observado que después de los hidrocarburos alifáticos el ataque microbiano se da sobre la fracción de hidrocarburos aromáticos principalmente de bajo peso molecular (Leahy y Colwell, 1990). Oudot y col. (1987) reportan un consumo del 85 % de la fracción aromática (naftalenos) de petróleo Árabe ligero utilizando un cultivo de bacterias (*Nocardia* sp.) como inóculo, empleando un cultivo bacteriano mixto la degradación de los naftalenos fue de 63% después de 30 días de incubación. Sugiura y col. (1997) determinaron un consumo del 18% de hidrocarburos aromáticos en petróleo Maya. Valladares y col. (1999) utilizando un consorcio microbiano en medio líquido reportan el 13% de biodegradación de hidrocarburos aromáticos en petróleo Maya.

Los hidrocarburos polares constituidos por resinas de estructuras complejas y compuestos heterocíclicos se consideran junto con los asfaltenos, las fracciones más persistentes del petróleo (Wrenn y Venosa, 1996; Bossert y Bartha, 1984). Existen pocos

reportes sobre la biodegradación de estos compuestos, sin embargo, se ha observado que durante la oxidación microbiana de hidrocarburos alifáticos y aromáticos se forman compuestos polares (Singer y Finnerty, 1984). Langbehn y Steinhart (1995) observaron que durante la biodegradación de estos compuestos se forman principalmente ácidos orgánicos alifáticos ramificados y lineales, así como cetonas aromáticas. Chaîneau y col. (1995) observaron que la fracción polar fue resistente a la biodegradación manteniéndose en su nivel inicial del 10% en el petróleo después de 270 días de incubación.

5.4.3. Producción de CO₂.

En la Figura 5.3 se presenta la cinética de producción de CO₂ (corregido considerando el control sin hidrocarburos) en cada uno de los cultivos. La velocidad máxima de producción de CO₂ fue: 0.149, 0.097 y 0.026 mmoles de CO₂/día para el consorcio, bacterias y los hongos respectivamente. La velocidad de producción de CO₂ para los tres cultivos se mantiene constante, esto es similar a lo observado en el experimento anterior, como se mencionó probablemente refleja una limitación de carbono biodisponible en el cultivo.

En este caso la concentración de hidrocarburos fue de 30 000 ppm, produciéndose con

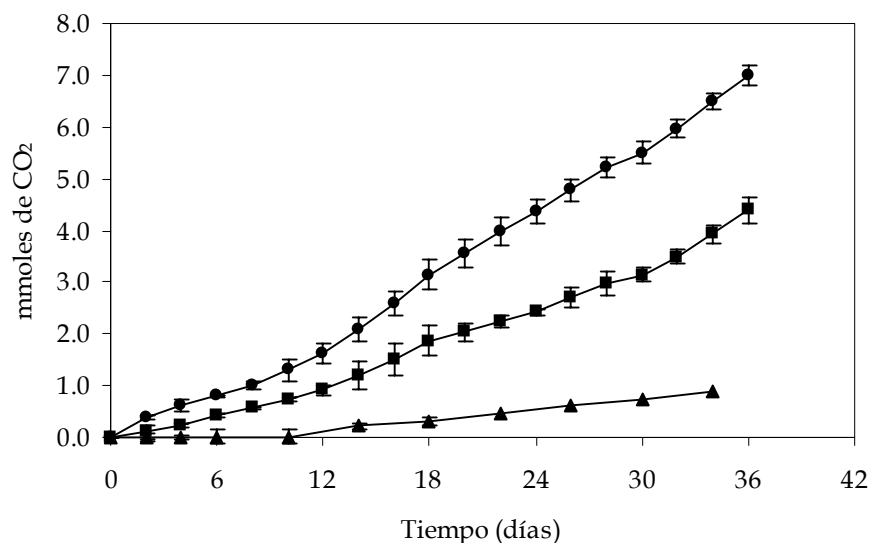


Figura 5.3. Producción de CO₂ (corregido considerando el control) por el consorcio (●), las bacterias (■) y los hongos (▲) durante la prueba de biodegradación de HTP.

el consorcio cerca de 8 mmoles de CO₂ en 36 días de cultivo, a diferencia del experimento anterior (6000 ppm) donde el CO₂ producido fue inferior a un mmol en 21 días. Este aumento en la producción de CO₂ puede deberse al aumento de la relación C/N en el cultivo, lo cual posiblemente favoreció la producción del biosurfactante, y de este modo el aumento en la biodisponibilidad de los hidrocarburos. El CO₂ producido por el consorcio es 1.6 veces mayor que el generado por las bacterias y 8 veces más que con los hongos. La baja producción de CO₂ obtenida con los hongos (1.8 mmoles) con respecto al nivel de biodegradación de 45% (Tabla 5.6) para este cultivo, sugiere una elevada biotransformación de los hidrocarburos, relacionada posiblemente a la ausencia de otros microorganismos (bacterias) capaces de llevar a cabo la oxidación completa de éstos. La suma del CO₂ producido en el cultivo de bacterias y hongos es inferior al total obtenido con el consorcio (Tabla 5.8). Esto puede deberse a la existencia de interacciones positivas entre los grupos microbianos que se reflejan en una mayor producción de CO₂ en el consorcio. Se ha observado que dichas interacciones son comunes principalmente entre poblaciones microbianas nativas (Atlas, 1991). Es probable que estas interacciones entre los microorganismos presentes en el consorcio sean de tipo sinérgico, en cuyo caso las poblaciones se benefician mutuamente de manera no obligatoria. Por otra parte, entre tales poblaciones la relación puede ser simbiótica lo que obliga la presencia de ambas para su propia supervivencia, en cualquier caso, uno de los beneficios puede ser la complementación de una ruta metabólica que permita la oxidación de una fuente de carbono compleja (Liu y Suflita, 1993). Anderson y col. (1993) señalan que en la rizósfera los consorcios microbianos son los principales responsables de la degradación de compuestos orgánicos más que especies individuales.

Las bacterias y los hongos son los principales agentes en la biodegradación del petróleo en el suelo, sin embargo, la contribución relativa de cada grupo no se conoce con claridad (Atlas, 1984). Bouwer y Zehnder (1993) señalan que la mayoría de las rutas metabólicas propuestas para la oxidación de los hidrocarburos se han investigado en bacterias, pero existen pocos estudios sobre degradación de contaminantes orgánicos

por hongos. Aparentemente, las bacterias son capaces de biodegradar un amplio espectro de compuestos orgánicos, sin embargo, se ha aislado un gran número de hongos de diversos géneros capaces de biodegradar hidrocarburos (Davies y Westlake, 1979), éstos se adaptan más fácilmente a condiciones ambientales adversas tales como concentraciones limitadas de nutrientes, bajos valores de humedad y pH (Atlas, 1984). Por otro lado, se sabe que durante la biodegradación de hidrocarburos utilizando cepas puras pueden formarse intermediarios tóxicos, lo que puede solucionarse utilizando cultivos mixtos o consorcios microbianos capaces de degradar estos intermediarios favoreciendo la mineralización completa de los contaminantes (Singleton, 1994).

5.4.4. Mineralización de hidrocarburos.

En la Tabla 5.8 se presenta la mineralización calculada de la misma manera que en el experimento anterior (Ecuación 4), para cada uno de los cultivos. El mayor grado de mineralización se obtuvo con el consorcio. En los niveles de biodegradación del

Tabla 5.8. Mineralización de hidrocarburos por el consorcio, bacterias y hongos.

Cultivo	CO ₂ (mmoles) exp.	Mineralización (%)*
Hongos	1.8 ±0.294	1.6
Bacterias	5.3 ±1.001	4.8
Consorcio	8.0 ±3.026	7.3

*Calculado considerando: 0.85 g de C/g hidrocarburos

consorcio y las bacterias (Tabla 5.6) no se aprecia la diferencia observada en la mineralización, lo que revela la posibilidad de que en el cultivo de bacterias una mayor parte del carbono presente en los hidrocarburos se acumule en forma de compuestos intermediarios, es decir, se presenta principalmente la biotransformación de los hidrocarburos.

Como se mencionó anteriormente en el cultivo del consorcio y las bacterias se observó la emulsificación de los hidrocarburos después de 5 días de incubación (Figura 5.4). La producción de surfactantes de origen microbiano (biosurfactantes) recientemente ha cobrado importancia por su potencial aplicación en la remoción de hidrocarburos. La

síntesis de estos compuestos se ha relacionado a la asimilación de hidrocarburos, por lo que posiblemente, su liberación sea inducida cuando éstos están presentes como sustratos y en condiciones de crecimiento limitantes (C/N elevadas y bajas concentraciones de hierro). Entre los compuestos con actividad biosurfactante se encuentran glicolípidos, ácidos grasos, fosfolípidos y lipopéptidos (Guerra-Santos y col., 1984).



Figura 5.4. Matraces durante la prueba de biodegradación, a) consorcio inicial, b) consorcio final, c) bacterias final, en b) y c) se aprecia la emulsificación de los hidrocarburos

Singer y Finnerty (1990) reportan la biosíntesis de un biosurfactante por *Rhodococcus* (H13-A) teniendo como sustratos *n*-alcanos y alcoholes grasos, el incremento en la cantidad extracelular de glicolípidos se correlacionó con la disminución de la tensión superficial en el medio de cultivo, no se detectaron niveles significativos del biosurfactante extracelular, determinado en el cultivo por extracción con solventes, cuando se utilizaron sustratos como triglicéridos, ácidos grasos, etanol, ácidos orgánicos o carbohidratos.

En general, el consorcio microbiano presentó el mayor grado de mineralización (7.3%), seguido de las bacterias y los hongos (4.8% y 1.6% respectivamente); considerando lo anterior y de acuerdo a los resultados de biodegradación para los tres cultivos, se infiere que tanto en el cultivo de las bacterias y los hongos se da principalmente la biotransformación de los hidrocarburos. Para el consorcio y las bacterias la producción del biosurfactante favoreció la biodisponibilidad de los hidrocarburos, lo que no ocurrió

en el caso de los hongos. En los tres cultivos el consumo de la fracción de alifáticos fue mayor que la de aromáticos, siendo los polares la fracción menos consumida. Conociendo ya el patrón de consumo de las diferentes fracciones, se planteó evaluar en el siguiente experimento su biodegradación a través del tiempo de incubación, así como el cambio en la distribución microbiana del consorcio durante la biodegradación en medio sólido.

5.5. Cinética de biodegradación de hidrocarburos en medio sólido.

Este experimento se diseñó con la finalidad de evaluar el grado de consumo de las distintas fracciones durante la biodegradación en medio sólido, así como analizar el cambio en las proporciones de hongos y bacterias presentes en el consorcio. Se planteó realizar el experimento en medio sólido, por las siguientes razones: a) el reducido nivel de humedad en este tipo de cultivo favorece el crecimiento de los hongos, b) las condiciones de disponibilidad de nutrientes y pH pueden relacionarse a las encontradas en el suelo. Considerando el bajo nivel de biodegradación obtenido en el experimento anterior por los hongos, se decidió enriquecer el inóculo con esporas de hongos aislados del propio consorcio. Paralelamente se evaluó el consumo de oxígeno por el consorcio utilizando un respirómetro (*Comput-ox*®), bajo las condiciones definidas en la sección 4.3.3.3.

5.5.1. Cinética de biodegradación de hidrocarburos.

En la Figura 5.5 se presenta la cinética de degradación de hidrocarburos en medio sólido, la concentración de hidrocarburos se expresa en g/mL de volumen ocupado de reactor. La concentración de los hidrocarburos desciende rápidamente hasta los 21 días de cultivo, lo que representa una velocidad de consumo de 0.59 mg de hidrocarburos/mL/día, posteriormente, entre el día 21 y 40 de cultivo, se presenta solo una ligera disminución de los hidrocarburos. La biodegradación total final fue de 52.1 ± 0.9 %. Este valor de biodegradación de los hidrocarburos (medio sólido) es menor a la encontrada en los experimentos anteriores en medio líquido, esto posiblemente se

debe a que en medio sólido la baja humedad restringe el desarrollo de algunos de los microorganismos que constituyen el consorcio y que participan en la biodegradación.

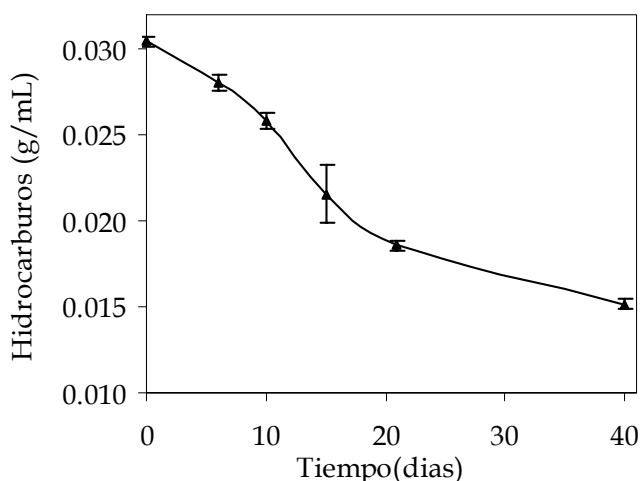


Figura 5.5. Cinética de biodegradación de hidrocarburos en medio sólido (▲).

Chaineau y col. (1995) reportan un consumo del 75% (de 2190 a 547 ppm) de los hidrocarburos totales (sin asfaltenos) en 270 días con suelo contaminado, utilizando como inóculo los microorganismos del suelo usado en la prueba; Ortiz y col. (1999) encontraron una desaparición del 9.35% de hidrocarburos totales con un consorcio microbiano en columnas empacadas con suelo, además reportan un aumento en la biodegradación (25%) probando el mismo consorcio con bagazo de caña como soporte en 20 días.

5.5.2. Fraccionamiento de los hidrocarburos durante la prueba de biodegradación.

La cinética de biodegradación de las diferentes fracciones en cultivo sólido se presenta en la Figura 5.6. La mayor biodegradación corresponde a los hidrocarburos alifáticos; durante los primeros 21 días de cultivo se presentó un rápido descenso en la concentración de éstos, alcanzando el 78% de biodegradación en 38 días de incubación; en cambio, los hidrocarburos aromáticos y polares presentaron una biodegradación del 12% y 10% respectivamente en 38 días de cultivo; entre los 15 y 38 días de cultivo se presentó la mayor biodegradación de la fracción aromática. En cuanto a los hidrocarburos polares, su aumento durante el cultivo probablemente se debe a que

durante la oxidación de otras fracciones (alifáticos), se forman compuestos como alcoholes o ácidos carboxílicos medidos como polares. Bossert y Bartha (1984) reportan una desaparición del 60% de los hidrocarburos aromáticos en un período de 22 meses de tratamiento de un suelo contaminado, en cambio encontraron solo el 1% de desaparición de la fracción de hidrocarburos polares. Por otra parte, la baja biodegradación de la fracción aromática y polar puede atribuirse a que los microorganismos (bacterias) capaces de utilizar este tipo de compuestos no se adaptaron al bajo nivel de humedad, del sistema en medio sólido.

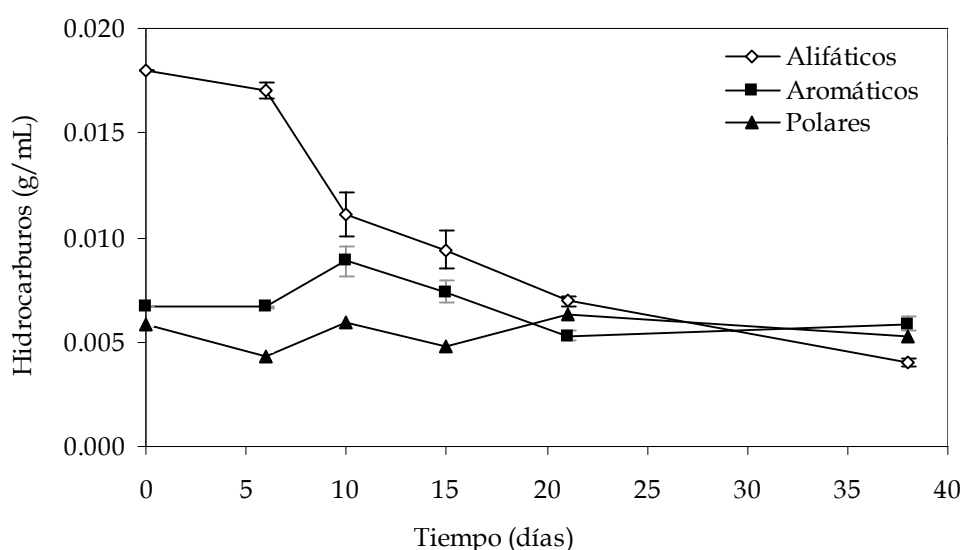


Figura 5.6. Biodegradación de alifáticos, aromáticos y polares en medio sólido.

Tanto en medio líquido (Tabla 5.7) como en sólido la fracción mayormente biodegradada fue la de los alifáticos; en cuanto a la fracción aromática y polar la biodegradación fue significativamente menor con respecto a su consumo en medio líquido. Una razón para este comportamiento puede relacionarse a la alteración en el balance natural de los microorganismos del consorcio, debido al enriquecimiento del inóculo con hongos. Por otro lado, estos resultados posiblemente reflejan la heterogeneidad que generalmente se presenta cuando se utiliza este tipo de consorcios como inóculo.

5.5.3. Respirometría.

La biodegradación aerobia de un compuesto puede estimarse cuantificando la actividad metabólica microbiana por medio del consumo de O_2 . El principio de las técnicas respirométricas está relacionado con el consumo de O_2 , por parte de los microorganismos aerobios, durante la descomposición de compuestos orgánicos (Starnecker y Menner, 1996).

En la Figura 5.7 se muestra el consumo de oxígeno durante la prueba de biodegradación en medio sólido, durante los primeros diez días de incubación se presenta una fase de adaptación del cultivo después de la cual el consumo de oxígeno aumenta hasta alcanzar los $10,064.5 \pm 142.6 \text{ mg } O_2/\text{L}$ ($10.064 \text{ mg de } O_2/\text{mL}$) a los 33 días de cultivo.

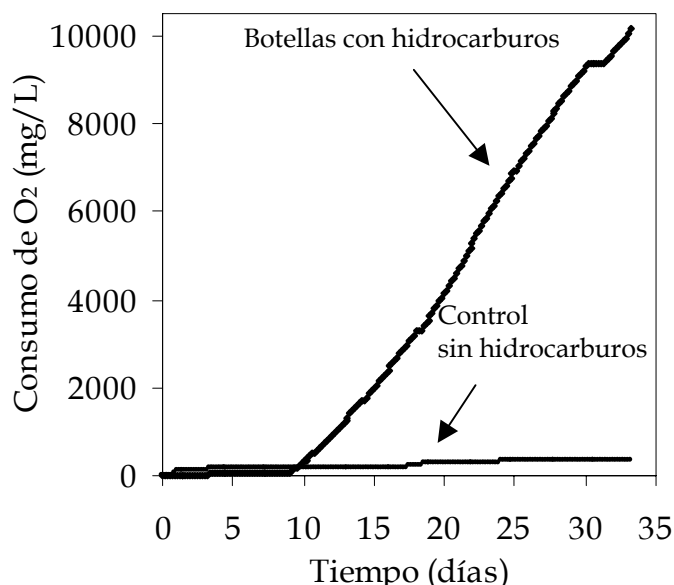


Figura 5.7. Consumo de oxígeno obtenido del cultivo en medio sólido.

Entre el décimo día de cultivo y el final se presentó un ascenso casi constante en el consumo de oxígeno siendo la velocidad de consumo de $0.44 \text{ mg de } O_2/\text{mL}/\text{día}$ (± 0.02). Thouand y col. (1999) reportan valores de velocidad de consumo de O_2 de 45 a 244 $\text{mg } O_2/\text{L}/\text{día}$ ($0.045 - 0.244 \text{ mg } O_2/\text{mL}/\text{día}$), durante la biodegradación de petróleo crudo (1000 ppm) BAL 250 el cual corresponde a petróleo árabe ligero; a manera de comparación adicionaron 12 diferentes inóculos, 8 comerciales y 4 naturales.

La biodegradación máxima obtenida fue de 25% durante 28 días de incubación, siendo los inóculos naturales más activos que los comerciales. Como puede verse la velocidad de consumo de oxígeno obtenida con el consorcio utilizado en este caso, fue casi del doble a la encontrada por Thouand y col. Lo anterior puede atribuirse a que ellos utilizaron inóculos comerciales y naturales aislados de zonas en donde no se encontraban hidrocarburos, en nuestro caso, se trata de microorganismos de la rizósfera adaptados a la presencia de los hidrocarburos en el suelo.

La biodegradación fue de $38.8 \pm 2.4\%$, siendo el consumo de hidrocarburos de 11.7 mg de hidrocarburos/cm³ (los cálculos se realizaron en base al volumen ocupado de reactor); relacionando el consumo de oxígeno medido (10.064 mg de O₂/mL) con este último valor, se obtiene una demanda de oxígeno de 0.860 mg de O₂ por mg de hidrocarburos. Atlas (1981), reporta una demanda teórica de oxígeno (condiciones bióticas) para la oxidación de petróleo crudo de 3.5 g de petróleo por g de O₂, (0.286 mg de O₂ por mg de HTP oxidados). La demanda de oxígeno obtenida con el consorcio fue mayor a la reportada por Atlas (1981), lo que señala que la eficiencia del consorcio fue menor, en otras palabras, se requiere de una mayor cantidad de O₂ para oxidar un gramo de HTP, por cada g de O₂, se oxidan 1.16 g de TPH. Sin embargo, el consumo de oxígeno por gramo de hidrocarburos, depende del grado de oxidación de éstos.

5.5.4. Cinética de crecimiento.

Con la finalidad de evaluar el crecimiento de los microorganismos durante la prueba de biodegradación en medio sólido se determinaron las UFC/mL. En la Figura 5.8 se presenta la cinética de crecimiento (UFC/mL) de los microorganismos capaces de crecer sobre AST (bacterias) y PDA (hongos), inicialmente el número de bacterias fue superior (dos ordenes de magnitud) al de hongos, a partir del sexto día de cultivo el número de hongos aumenta, alcanzando un nivel similar al de bacterias, probablemente esto refleja la adaptación de los hongos a las condiciones (principalmente a la baja humedad) del cultivo en medio sólido.

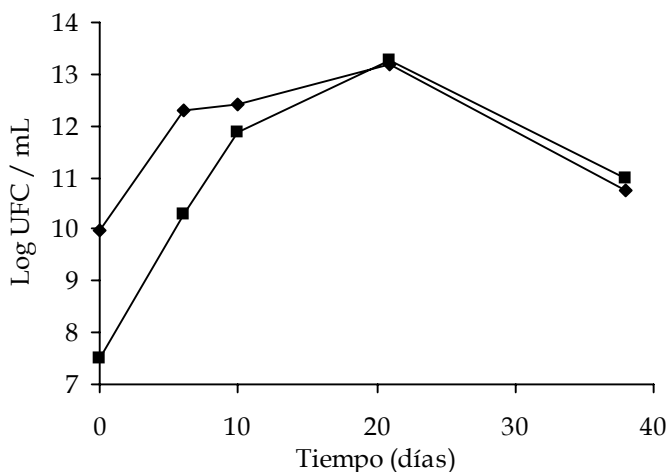


Figura 5.8. Cinética de crecimiento durante la prueba de biodegradación en medio sólido para los hongos (■) y las bacterias (◆).

A los 21 días de cultivo se presentó el máximo de crecimiento de ambos grupos microbianos, es importante destacar que a medida que el número de microorganismos, tanto de bacterias como de hongos, aumenta (0 - 21 días) se presenta el consumo más acelerado de los hidrocarburos alifáticos (Figura 5.6). Al final del cultivo (día 38) la cuenta viable para bacterias y hongos disminuye, manteniendo valores superiores a los determinados al inicio del cultivo.

En cuanto a las proporciones de los microorganismos capaces de crecer sobre AST (bacterias) y PDA (hongos), el número de éstos últimos aumentó con respecto al de las bacterias hasta alcanzar el 63% al final del cultivo; a los 21 días se presentó el crecimiento más elevado para ambos grupos microbianos siendo la proporción de los hongos y bacterias de 54.3% y 45.6% respectivamente; el aumento de la proporción de hongos sugiere una mejor adaptación de este grupo microbiano a las condiciones del cultivo.

En las determinaciones de las UFC/mL en los matraces provenientes del cultivo en medio sólido se observó la presencia mayoritaria de dos bacterias, una de las cuales fue identificada previamente como *Pseudomonas aeruginosa* (70-80%). Se ha reportado la producción de biosurfactantes (ramnolípidos) por esta bacteria, uno de ellos compuesto por dos moléculas de ramnosa y dos moléculas de ácido-β-hidroxidecanoico, los

ramnolípidos fueron producidos cuando se utilizaron hidrocarburos, glicerol, glucosa o peptona como sustrato (Guerra-Santos y col., 1984).

Características morfológicas del consorcio.

A partir del conteo en placa realizado para el cultivo en medio sólido se aislaron los microorganismos que crecieron sobre AST y PDA, además se obtuvo la composición porcentual de cada microorganismo del consorcio.

En las Tablas 5.9.a. y 5.9.b se pueden observar las proporciones de los microorganismos aislados del consorcio al inicio y final de la prueba de biodegradación.

Tabla 5.9.a. Características de los microorganismos presentes en el consorcio capaces de crecer en AST (bacterias).

Colonia	Color		Composición del consorcio (inicio) (%)	Composición del consorcio (final) (%)
	Haz*	Envez**		
1	Verde	Verde oscuro	50	80
2	Café claro	Café	30	17
3	Amarillo fuerte	Amarillo	<5	Na***
4	Naranja	Amarillo a naranja	<5	Na
5	Rojo claro	Rojizo	<7	Na
6	Rojo fuerte	Rojizo	<3	3

*Se refiere a la apariencia superior, e ** inferior de la colonia

*** Na: No se observó su crecimiento

Tabla 5.9.b. Características de los microorganismos que crecieron sobre PDA (hongos).

Colonia	Color		Composición del consorcio (inicio) (%)	Composición del consorcio (final) (%)
	Haz*	Envez**		
A	Hongo filamentosos café	Amarillo	20	20
B	Hongo filamentosos verde	Rojizo	30	10
C	Hongo filamentosos café (algodonoso)	Café (produce un vire de color a amarillo fuerte)	40	65
D	Colonias amarillas	Amarillas	10	<5

*Se refiere a la apariencia superior, e ** inferior de la colonia

*** Na: No se observó su crecimiento

Los tres hongos filamentosos (A, B, C) adicionados al inóculo se observaron al final del cultivo encontrándose en mayor proporción (65%) el hongo café con apariencia algodonosa (C) y que como característica principal produce un vire de color en el medio PDA. En este medio también se observó el crecimiento de colonias de color amarillo brillantes (D), posiblemente éstas corresponden a una levadura.

Al final del cultivo solo se observaron microorganismos (bacterias) con tres morfologías distintas, encontrándose en mayor proporción la bacteria "verde". Durante su crecimiento sobre medio AST, esta bacteria produce una coloración verdosa, y fue observada al microscopio como un bacilo Gram (-). Se utilizó el sistema API 20 NE para identificar esta bacteria. Los resultados obtenidos corresponden a la bacteria Gram (-) *Pseudomonas aeruginosa*.

Se realizaron microcultivos con el fin de observar las características principales de los hongos filamentosos aislados, se encontró que los tres hongos presentan hifas septadas. El hongo "verde" (B) presenta estructuras de reproducción (esporangio) semejantes a los observados en el género *Penicillium* sp, los dos hongos cafés (A y C) cuya diferencia morfológica principal es el cambio en el color del medio PDA que produce uno de ellos (C), presentan estructuras reproductivas semejantes a los hongos filamentosos pertenecientes al género *Aspergillus*.

5.6. Viabilidad del consorcio.

Antes de cada experimento de biodegradación se determinó la viabilidad del inóculo, como el número de UFC/mL a partir de los tubos Ependorf que se mantuvieron en refrigeración. En la Tabla 5.10 se presentan los valores de viabilidad del consorcio durante su almacenamiento a -20°C.

Tabla 5.10. Viabilidad del inóculo durante el trabajo experimental.

Medio de cultivo	Viabilidad (%)		
	4 meses	8 meses	12 meses
AST	60	74	5.7
PDA	40	8	2.4

Para el caso de los microorganismos capaces de crecer sobre AST (bacterias) puede observarse que existe un aumento en la cuenta viable entre los 4 y 8 meses, esto refleja la heterogeneidad entre los viales almacenados. Esta heterogeneidad del consorcio posiblemente influyó sobre la reproducibilidad de la biodegradación observada entre los experimentos. Además se observó una elevada variabilidad en la medición del número de UFC/mL tanto para los hongos como para las bacterias, posiblemente debido a la dificultad para tomar una muestra homogénea, principalmente en el experimento en medio sólido. La pérdida de la viabilidad es mayor en el caso de los microorganismos capaces de crecer sobre PDA (hongos). Es importante notar que la viabilidad a los 12 meses de mantenimiento, corresponde a 5.6×10^5 UFC/mL y 2.4×10^5 UFC/mL para las bacterias y los hongos respectivamente, esto representa una disminución en el número de microorganismos cercana a un orden de magnitud.

Es importante recalcar que debido a la capacidad de biodegradación mostrada por el consorcio es recomendable establecer condiciones de mantenimiento que garanticen un nivel de biodegradación reproducible.

VI. CONCLUSIONES

Conclusiones

- ◆ A partir de la rizósfera de una planta nativa (*Cyperus laxus* Lam) de un sitio contaminado se obtuvo un consorcio microbiano formado por 92.4×10^6 UFC/g de suelo de bacterias y 30.1×10^6 UFC/g de suelo en el caso de los hongos.
- ◆ El consorcio fue capaz de degradar altas concentraciones de hidrocarburos sin asfaltenos, siendo la biodegradación del $62 \pm 9\%$ en medio líquido y $52 \pm 0.9\%$ en medio sólido.
- ◆ El mayor grado de mineralización se obtuvo con el consorcio microbiano seguido de las bacterias y los hongos. En el cultivo del consorcio y las bacterias se presentó la emulsificación de los hidrocarburos lo que favoreció su biodisponibilidad y por lo tanto la biodegradación.
- ◆ La biodegradación de las fracciones en medio líquido fue: alifáticos (70%), aromáticos (60%) y polares 38%. En medio sólido fue: alifáticos (78%), aromáticos (12%) y polares (10%).
- ◆ Del consorcio aislado de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam. se aislaron siete especies que crecieron sobre AST y cuatro sobre PDA, solo se identificó *Pseudomonas aeruginosa*, dos hongos del género *Aspergillus* sp. y uno del género *Penicillium* sp.

VII. RECOMENDACIONES

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo se recomienda para estudios posteriores lo siguiente:

Para una mejor comprensión de la biodegradación de los hidrocarburos por el consorcio se sugiere identificar las cepas aisladas (hongos y bacterias) que lo constituyen y evaluar su capacidad individual de biodegradación así como las posibles interacciones entre éstas.

Para favorecer la biodegradación de los hidrocarburos se recomienda establecer las condiciones de cultivo (relación C/N) que estimulen la producción de biosurfactantes.

Evaluar la presencia de exudados de la planta durante la biodegradación con el consorcio.

Determinar la biodegradación de los hidrocarburos por el consorcio en suelo intemperizado.

Evaluar métodos alternativos para la cuantificación de microorganismos (número más probable y métodos de biología molecular) y para su conservación durante los experimentos de biodegradación.

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, A. 1987. *Análisis químico para evaluar la fertilidad del suelo*, Ed. Sociedad Mexicana de la ciencia del suelo, México, pp.25-30.

Alef, K. y Nannipieri, P. 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*, Ed. Academic Press, U.S.A.

Alexander, M. 1994. *Biodegradation and Bioremediation*, Ed. Academic Press, Reino Unido, pp. 1-7.

Anderson, T. A., Guthrie, E. A. y Walton, B. T. 1993. Bioremediation in the Rizosphere, *Environ. Sci. Technol.*, 27:13:2630-2636.

Angehrn, D., Gälli, R. y Zeyer, J. 1998. Physicochemical characterization of residual mineral oil contaminants in bioremediated soil, *Environ. Toxicicol. Chem.*, 17:11, pp. 2168-2175.

Annual Book of ASTM Standards.1991. D2007-91: Standard test method for characteristic groups in rubber extender and processing oils and other petroleum-derived oils by the clay-gel absorption chromatographic method. pp: 693-699.

Atlas, R. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an enviromental perspective, *Microbiol. Rev.*, 45:180-209.

Atlas, R. 1984. *Petroleum Microbiology*, Ed. Macmillan Publishing Co., New york, pp. 446-448.

Atlas , R. 1991. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills, *J. Chem. Technol: Biotechnol.*, 52:149-156.

Atlas, R. y Cerniglia, C. E. 1995. Bioremediation of petroleum pollutants, *BioScience*, 45:332-338.

Beaudin, R. F., Legros, R., Ramsay, J., Lawlor, L. y Ramsay, B. 1996. Composting of weathered hydrocarbon-contaminated soil, *Compost Sciense and utilization*, 4:37-45.

Bosecker, K., Teschner, M. y Wehner, H. 1991. Biodegradation of crude oil, *Berthelin J.*, 195-213.

Bossert, I. y Bartha, R. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystem. En *Petroleum Microbiology*, Atlas, R., Ed. Macmillan Publishing Com., pp. 436-455.

Bouwer, E. J. y Zehnder, A. J. B. 1993. Bioremediation of organic compounds - putting microbial metabolism to work, *Trends in Biotechnol.*, 11: 360-367.

- Carmichael, L. M. y Pfaender, F. K. 1997. Polynuclear aromatic hydrocarbon metabolism in soils: Relationship to soil characteristics and preexposure, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16:4, pp. 666-675.
- Cerniglia, C. E. 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons : past, present and future applications in bioremediation, *J. Ind. Microbiol. Biotech.*, 19: 324-333.
- Correl, D. y Correl, H. 1975. *Aquatic and wetland plants of south western United States*, Vol. I, Ed. Stanford University Press, California, pp. 6-23.
- Crowley, D., Alvey, S. y Gilbert, E. 1997. Rhizosphere ecology of xenobiotic-degrading microorganisms. En *Phytoremediation of soil and water contaminants*, Kruger, E., Anderson, T. A. y Coats, J. R., Ed. American Chemical Society, U.S.A., pp.20-35.
- Curl, E. 1986. *The Rhizosphere*, Ed. Springer-verlog Berlin Heidelberg, Germany, pp. 93-99.
- Chaineau, C. H., Morel, J. L. y Oudot, J. 1995. Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings, *Environ. Sci. Technol.*, 29:1615-1621.
- Davies, J. y Westlake, D. W. S. 1979. Crude oil utilization by fungi, *Can. J. Microbiol.*, 25:146-156.
- Foght, J., Semple, K., Gauthier, C., Westlake, D. W. S., Blenkinsopp, S., Sergy, G., Wang, Z. y Fingas, M. 1999. Effect of nitrogen source on biodegradation of crude oil by a defined bacterial consortium incubated under cold, marine conditions, *Environ. Technol.*, 20:839-849.
- Gibson, S. A. y Subramanian, V. 1984. *Microbial degradation of aromatic hydrocarbons*. En *Microbial degradation of Organic Compounds*, Ed. Marcel Dekker, Nueva York, pp. 181-252.
- Guerra-Santos, L., Käppeli, O. y Fiechter, A. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source, *Appl. Env. Microbiol.*, 48:2: 301-305.
- Günther, T., Dornberger, U. y Fritsche, W. 1996. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil, *Chemosphere*, 33:2:203-215.
- Grady, L. C. P. 1985. Biodegradation: Its measurement and microbiological basis, *Biotechnol. And Bioeng.*, 27:660-674.

- Harley, J. 1979. *The Soil-Root Interface*, Ed. Academic Press., London, pp. 1-4.
- Heath, J., Koblis, K. y Sager, S. 1993. Review of chemical, physical and toxicologic properties of componentes of total petroleum hydrocarbons, *J. Soil. Cont.*, 2:1:1-25
- Hsu, T. S. y Bartha, R. 1979. Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides in the rhizosphere, *Appl. Env. Microbiol*, 37: 36-71.
- Kanally, R. A. y Bartha, R. 1999. Cometabolic mineralization of benzo[a]pyrene caused by hydrocarbon additions to soil, *Env. Toxicol. Chem.*, 18:10:2186-2190.
- Langbehn, A. y Steinhart, H. 1995. Biodegradation studies of hydrocarbons in soils by analyzing metabolites formed, *Chemosphere*, 30:855-868.
- Leahy, J. G. y Colwell, R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, *Microbiol. Rev.*, 54:305-315.
- Leander, J. 1972. *Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens*, Ed. Burgess Publishing, USA, p.p. 37-57.
- Lecoq, S. 1997. Cáncer: Los sinuosos caminos de los hidrocarburos, *Mundo científico*, 14:143:174-175.
- Liu, S. y Suflita, J. M. 1993. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation, *Trends in Biotechnology*, 11: 344-352.
- Madsen, E. L. 1998. Epistemology of environmental microbiology, *Environ. Sci. Technol.* 32:4:429-439.
- Mansoori, G. A. 1998. *Arterial blockage in the petroleum and natural gas industries-heavy organics deposition from petroleum fluids*. Publicado en internet, http://www.uic.edu/~mansoori/HOD_html
- McKenna, E. 1976. Biodegradation of polynuclear aromatic hydrocarbon pollutants by soil and water microorganisms, Water Resources Center, University of Illinois.
- Medina, S. A. 1999. Lavado y composteo ex-situ de un suelo intemperizado con hidrocarburos, Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Metting, B. 1993. *Soil Microbial Ecology*, Ed. Marcel Dekker Inc., New York, p.p. 27-39.

Morales, D., Machín, C. y Trejo, M. R. 1999. Biodegradación de petróleo crudo tipo Maya en medio acuoso, en Memorias del 8vo Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, México, pp. 410.

Narro, F. E. 1994. Física de suelos, Ed. Trillas, México, p.p. 15-57.

Nichols, T. D., Wolf, D. C., Rogers, H. B., Beyrouty, C. A. y Reynolds, C. M. 1997. Rhizosphere microbial populations in contaminated soils, *Water Air and Soil Pollution*, 95:165-178.

Ortiz, A., Quintero, R. y Trejo, M. R. 1999. Biodegradación de petróleo crudo Maya en fase sólida, en Memorias del 8vo Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, México, pp. 412.

Oudot, J., Fusey, P., Abdelouahid, D. E., Haloui, S. y Roquebert, M. F. 1987. Capacités dégradatives de bactéries et de champignons isolés d' un sol contaminé par un fuel, *Can. J. Microbiol.*, 33:232-243.

Oudot, J. 1990. Selective migration of low and medium molecular weight hydrocarbons in petroleum-contaminated terrestrial environments, *Oil and Chemical Pollution*, 6:251-261.

Perry, J. J. 1984. Microbial metabolism of cyclic alkanes. En *Petroleum Microbiology*, Atlas, R., Ed. Macmillan Publishing Com., pp. 436-455.

Pollard, S. J. T., Hruday, S. E. y Fedorak, P. M. 1994. Bioremediation of petroleum- and creosote - contaminated soils: A review of constraints, *Waste Management & Research*, 12:173-194.

Reddy, B. R. y Sethunathan, N. 1983. Mineralization of parathion in the rice rhizosphere, *Appl. Env. Microbiol.*, 45: 826-829.

Rouatt, J. W. y Katznelson, H. 1960. A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere effect, *Soil. Sci. Soc. Am. Proc.*, 24:271-273.

Setti, L., Lanzarini, G., Pifferi, P. G. y Spagna, G. 1993. Further research into aerobic degradation of n-alkanes in a heavy oil by a pure culture of a *Pseudomonas* SP., *Chemosphere*, 26:6, pp. 1151-1157.

Sharabi, N. y Bartha, R. 1993. Testing of some assumptions about biodegradability in soil as measured by carbon dioxide evolution, *Appl. Env. Microbiol.*, 59: 4: 1201-1205.

- Singer, M. E. y Finnerty, W. R. 1984. Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes, en *Petroleum Microbiology*, Editor Atlas, R., Ed. Macmillan Publishing Com., pp. 1-60.
- Singer, M. E. y Finnerty, W. R. 1990. Physiology of biosurfactant synthesis by *Rhodococcus* species H13-A, *Can. J. Microbiol.*, 36:741-745.
- Singleton, I. 1994. Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and applied research, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 59:9-23.
- Starnecker, A. y Menner, M. 1996. Assessment of biodegradability of plastics under simulated composting conditions in a laboratory test system. *International Biodeterioration & Biodegradation*: 85-92.
- Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T. y Harayama, S. 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil, *Environ. Sci. Technol.*, 31:45-51.
- Trudgill, P. W. 1984. Microbial degradation of alicyclic ring: Structural relationship and metabolic pathways, En *Microbial Degradation of Organic Compounds*, Gibson, D.T., Nueva York, pp. 131-180.
- Thouand, G., Bauda, P., Oudot, J., Kirsch, G., Sutton, C. y Vidalie, J. F. 1999. Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula. *Can. J. Microbiol.*, 45: 106-115.
- USEPA, 1995. Method SW-846, Test Methods for evaluating solid waste.
- Valladares, M. G., Trejo, M. R. y Quintero R. 1999. Biodegradación de la fracción recalcitrante del petróleo crudo tipo Maya, en *Memorias del 8vo Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, México, pp. 413.
- Venkateswaran, K. y Harayama, S. 1995. Secuential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil, *Can. J. Microbiol.*, 41: 767-775.
- Wackett, L. P., Brusseau, G. A., Hueseholder, S. R. y Hansen., R. S. 1989. Survey of microbial oxygenase: Trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:2960-2964
- Walton, D. y Anderson, T. 1990. Microbial degradation of Trichloroethylene in the rhizosphere: Potential application to biological remediation of waste sites, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56:1012-1016.
- Wallnöfer, P. R., Hutzinger, O. y Engelhardt, G. 1984. *Handbook of Microbiology*, Laskin, A. J., Vol. VIb, CRC Press, Cleveland.

Wang, Z., Fingas, M. y Li, K. 1994 a. Fractionation of a light crude oil and identification and cuantitation of aliphatic, aromatic , and biomarker compounds by GC-FDI and GC-MS, Part I, *J. Chrom. Sci.*, 32: 361-365.

Wang, Z., Fingas, M. y Li, K. 1994 b. Fractionation of a light crude oil and identification and cuantitation of aliphatic, aromatic , and biomarker compounds by GC-FDI and GC-MS, Part II, *J. Chrom. Sci.*, 32: 367-382.

Wrenn, B. A. y Venosa, A. D. 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure, *Can. J. Microbiol.* 42:252-258.