



Universidad Autónoma Metropolitana



DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

Maestría en Ciencias e Ingeniería Ambientales

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS E INGENIERÍA AMBIENTALES**

“Eficiencia de la bioestimulación en la remediación de un suelo
contaminado con hidrocarburos, mediante el uso de hongos”

Presenta:

Ing. Adalberto Marquez Badillo

Asesor

M. en C. Miguel Ávila Jiménez

Co-asesora

Dra. Marisol Espinoza Castañeda

Febrero 2019



Dedicatoria

*A mi esposa Georgina Ovando por su paciencia, apoyo y sobre todo por
siempre estar al pendiente de nuestra familia.*

*A mi hijo Jorge Adalberto Marquez Ovando. Siempre serás el motor
de mi vida*

Los Amo

Agradecimientos

At la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Atzacotalco por brindarme una segunda casa, en donde me ofreció todas las facilidades para lograr este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología "CONACYT" por el apoyo otorgado a través de la beca, la cual me ayudó a terminar este proyecto.

Al Maestro Miguel Ávila por su ayuda en una meta más en mi vida

At la Doctora Marisol Espinoza Castañeda por su confianza y estar siempre al pendiente de este trabajo...Mil gracias Sol...

At la Doctora María Teresa Castañeda Briones y la Maestra María del Rocío Cruz Colín por su apoyo para la realización de este proyecto.

Al excelente grupo de estudio y amigos, Javier, Maritza, Monserrat y Samanta.

At los ayudantes del Laboratorio de Microbiología.

ÍNDICE

Índice de figuras	I
Índice de tablas	IV
Abreviaturas, acrónimos y fórmulas químicas	VI
RESUMEN	IX
SUMMARY	X
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1 Introducción.....	2
1.1 El suelo	4
1.1.1 Formación del suelo	4
1.1.2 Componentes y características del suelo	5
1.1.3 Contaminación del suelo	6
1.2 Técnicas de biorremediación del suelo.....	8
1.2.1 Bioestimulación y bioaumentación	9
1.2.2 Biolabranza	10
1.2.3 Biorremediación en fase de lodos	10
1.2.4 Biorremediación en fase sólida	11
1.2.5 Biorremediación enzimática	12
1.2.6 Fitorremediación.....	13
1.2.7 Vermirremediación	14
1.3 El petróleo.....	15
1.3.1 Migración del petróleo	15
1.3.2 El petróleo y su composición.....	16
1.3.3 Usos del petróleo	17

1.3.4 Impactos ambientales del petróleo y los hidrocarburos en México	18
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	20
2 Antecedentes	21
2.1 Actividad enzimática y soportes.....	21
2.2 Trabajos de biorremediación	24
2.3 Toxicología	26
2.4 Justificación	28
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	29
3 Objetivos	30
3.1 Objetivo general.....	30
3.2 Objetivo específicos.....	30
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS	31
4 Hipótesis.....	32
CAPÍTULO 5. MARCO TEÓRICO.....	33
5 Marco teórico.....	34
5.1 Los hongos de pudrición blanca	34
5.1.2 La pudrición blanca	35
5.1.3 Enzimas degradadoras de lignina	36
CAPÍTULO 6. METODOLOGÍA.....	41
6 Metodología.....	42
6.1 Materiales y equipos.....	42
6.1.1 Materiales.....	42
6.1.2 Equipos	42
6.2 Reactivos y medios de cultivo.....	43

6.2.1 Reactivos	43
6.3 Origen y selección de las cepas y los soportes lignocelulósicos	43
6.4 Determinación cualitativa de la actividad ligninolítica de lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa.....	44
6.5 Evaluación de los soportes lignocelulósicos	45
6.6 Determinación cuantitativa de la actividad ligninolítica de lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa de las cepas fúngicas	46
6.6.2 Manganeso peroxidasa	47
6.6.3 Lacasa.....	47
6.7 Origen y caracterización fisicoquímica del suelo	47
6.7.1 Humedad.....	48
6.7.2 pH.....	50
6.7.3 Nitrógeno total.....	51
6.7.4 Nitrógeno inorgánico	52
6.7.5 Materia orgánica.....	53
6.7.6 Fósforo	55
6.7.7 Capacidad de retención del agua.....	56
6.7.8 Concentración de hidrocarburos totales de petróleo	57
6.8 Biorremediación del suelo.....	58
6.9 Método de comparación de medias muestrales	61
6.10 Método ANOVA de un factor y Tukey	61
6.11 Evaluación de la toxicidad en el suelo	63
6.11.1 Prueba de viabilidad.....	63
6.11.2 Prueba directa de toxicidad aguda en suelo	64

CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
7 Resultados y discusión.....	67
7.1 Determinación cualitativa de la actividad ligninolítica de lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa.....	67
7.2 Evaluación de los soportes lignocelulósicos	68
7.3 Determinación cuantitativa de la actividad ligninolítica de lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa.....	69
7.3.1 Determinación de la actividad ligninolítica de lacasa	69
7.3.2 Determinación de la actividad ligninolítica de manganeso peroxidasa..	69
7.3.1 Determinación de la actividad ligninolítica de lignina peroxidasa	71
7.4 Caracterización fisicoquímica del suelo	72
7.5 Biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos.....	73
7.6 Evaluación de la toxicidad en el suelo	84
7.6.1 Prueba de viabilidad	84
7.6.2 Prueba directa de toxicidad aguda en el suelo	84
CONCLUSIONES.....	92
REFERENCIAS.....	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Formación de la trampa del petróleo que da lugar a yacimientos (Parra, 2003).....	16
Figura 1.2 Diferentes compuestos del petróleo (Parra, 2003).	17
Figura 5.1 Ciclo de las manganeso peroxidasas.	38
Figura 6.1 Cajas Petri con reactivos para determinar actividad ligninolítica, (A) caja Petri con azul de metileno, (B) caja Petri con ABTS y (C) caja Petri con MnCl ₂ . ..	44
Figura 6.2 Soportes lignocelulósicos. A madera, B olote.	45
Figura 6.3 Espectrofotómetro Epoch2.	46
Figura 6.4 Determinación de la humedad por el método Dean-Starck.	50
Figura 6.5 Determinación de nitrógeno total. (A) Destilación del digestado. (B) Destilado en el punto final de la titulación.	52
Figura 6.6 Determinación de nitrógeno inorgánico (titulación de la muestra destilada).....	53
Figura 6.7 Punto final de la titulación para la determinación de la materia orgánica.	55
Figura 6.8 Extracción de los HTP del suelo.....	58
Figura 6.9 Fotografía para la unidad experimental de la M1H5, (A) Suelo blanco con soporte (olote), (B) cepa M1H5 crecida en soporte (olote).....	59
Figura 6.10 Cepa HBG crecida en soporte (olote) mezclado con el suelo.	59
Figura 6.11 Prueba de toxicidad aguda del suelo, (A) Control negativo, (B) Control positivo, (C) El suelo con la concentración original de HTP y (D) El suelo después del tratamiento con la cepa M1H5.	65
Figura 7.1 Respuesta positiva para la prueba cualitativa de la actividad ligninolítica de. A Lac, halo verde, B LiP decoloración.....	67

Figura 7.2 Reactores con la cepa HBG crecida en los dos soportes madera (A) y olote (B).....	68
Figura 7.3 Actividad relativa de Lac. (A) Micro placa con 96 pozos y la reacción positiva a Lac. (B) Representación de la actividad ligninolítica probando ambos soportes para las 4 cepas.	69
Figura 7.4 Actividad relativa para la MnP, probando las 4 cepas en los dos soportes, respectivamente.	70
Figura 7.5 Actividad relativa para la LiP, probando las 4 cepas en los dos soportes, respectivamente.	71
Figura 7.6 (A) Primera semana del proceso de biorremediación con la cepa HBG en donde se observa el crecimiento de la cepa, (B) 6 semanas después del tratamiento, el crecimiento ya no es evidente.	74
Figura 7.7 Hidrocarburos remanentes en el proceso de remoción de HTP con la cepa HBG.....	74
Figura 7.8 Biorreactor blanco (suelo no estéril con el soporte), (A) en la primera semana de la biorremediación, (B) en la semana 8 del tratamiento.....	76
Figura 7.9 Biorreactores con suelo estéril y la cepa HBG, (A) en la primera semana del tratamiento, (B) en la semana 8 del tratamiento.....	76
Figura 7.10 Hongo blanco crecido en soporte en el biorreactor blanco.....	76
Figura 7.11 Hidrocarburos remanentes en la segunda prueba de remoción de HTP con la cepa HBG.	77
Figura 7.12 Hidrocarburos remanentes en la tercera prueba de remoción de HTP con la cepa HBG.	79
Figura 7.13 Crecimiento de la cepa M1H5 en el soporte (A) y en mezcla con el suelo (B).	81
Figura 7.14 Cepas autóctonas creciendo en el soporte.	81

Figura 7.15 Hidrocarburos remanentes en el proceso de biorremediación con la cepa M1H5.....	82
Figura 7.16 Porcentaje de sorción de los HTP por el soporte para las cepas M1H5 y HBG.....	83
Figura 7.17 Número de plantas germinadas durante 14 días.....	85
Figura 7.18 Crecimiento de tallo del trigo en 14 días.	86
Figura 7.19 Crecimiento de las plántulas del trigo. (A)Suelo limpio, (B) suelo con la concentración inicial de hidrocarburo, (C) suelo con hidrocarburo y el tratamiento de remediación (M1H5), y (D) suelo con hidrocarburo y el tratamiento de remediación (HBG).	86
Figura 7.20 Crecimiento de la raíz del trigo en 14 días.	87
Figura 7.21 Plántulas del trigo sembradas en el suelo, (A) control negativo, (B) suelo con la concentración inicial de HTP, (C) suelo después de la biorremediación con la cepa M1H5 y (D) suelo después de la Biorremediación con la cepa HBG.....	88
Figura 7.22 Producción de biomasa del trigo en 14 días.....	89
Figura 7.23 Fitorremediación del suelo con la semilla del trigo.	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 6.1 Diseño experimental con la cepa HBG y el suelo contaminado.....	58
Tabla 6.2 Diseño experimental con la cepa M1H5 y el suelo problema.....	58
Tabla 6.3 Nuevo diseño experimental con la cepa HBG y el suelo problema.....	60
Tabla 6.4 Nuevo diseño experimental con la cepa M1H5 y el suelo problema.	60
Tabla 6.5 Fórmula para cálculos de ANOVA de un factor	62
Tabla 6.6 Variables para obtener HSD en el test Tukey	62
Tabla 7.1 Resultados de la prueba cualitativa de actividad ligninolítica para cada cepa.	68
Tabla 7.2 Caracterización y clasificación del suelo de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000.	72
Tabla 7.3 Límites máximos permisibles de hidrocarburos en el suelo.	73
Tabla 7.4 Comparación de las medias muestrales para los puntos finales de los tratamientos C/N y S/N de la figura 7.7.	75
Tabla 7.5 Porcentaje de remoción de HTP.	75
Tabla 7.6 Comparación de las medias muestrales para los puntos críticos en la figura 7.11.	78
Tabla 7.7 Porcentaje de remoción de HTP.	78
Tabla 7.8 Comparación de las medias muestrales para los puntos críticos de la figura 7.13.	79
Tabla 7.9 Porcentaje de remoción de HTP.	80
Tabla 7.10 Comparación de las medias muestrales para los puntos críticos de la figura 7.15.	82
Tabla 7.11 Porcentaje de remoción de HTP	83
Tabla 7.12 Prueba ANOVA con un nivel de significancia del 0.05.....	89

Tabla 7.13 Determinación de la HSD.....	90
Tabla 7.14 Resultados de Tukey	90

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y FÓRMULAS QUÍMICAS

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AEM	Agar extracto de malta
AOV	Alcohol oxidasa de veratrilo
AV	Alcohol veratrílico
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CBQ	Celobiosa deshidrogenasa
CDH	Celobiosa deshidrogenasa
CE ₅₀	Concentración efectiva media
CH ₄	Metano
C ₆ H ₅ CH ₃	Tolueno
C ₆ H ₆	Benceno
C ₁₉ H ₁₅ ClN ₄	Cloruro de trifeniltetrazolio
C ₂ H ₃ NaO ₂	Acetato de sodio
COV	Compuestos orgánicos volátiles
CRA	Capacidad de retención de agua
CuSO ₄	Sulfato de cobre
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metilo
DMP	2,6-dimetoxifenol
FeSO ₄	Sulfato ferroso
°API	Grados API, (American Petroleum Institute)
ha	Hectáreas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno

HAP	Hydrocarburos aromáticos policíclicos
H_3BO_3	Ácido bórico
H_3PO_4	Ácido fosfórico
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HTP	Hydrocarburos totales del petróleo
GIOx	glioxalato oxidasa
KCl	Cloruro de potasio
$K_2Cr_2O_7$	Dicromato de potasio
K_2SO_4	Sulfato de potasio
KH_2PO_4	Fosfato monopotásico
Lac	Lacasa
LiP	Lignina peroxidasa
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	Cloruro de magnesio tetrahidratado
MnP	Manganeso peroxidasa
MgO	Óxido de magnesio
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Sulfato de magnesio heptahidratado
$Na_2C_4H_4O_6$	Tartrato de sodio
NaClO	Hipoclorito de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
$(NH_4)_2C_4H_4O_6$	Tartrato de amonio dibásico
nm	nanómetros
PEMEX	Petróleos Mexicanos
PI	Potenciales de ionización
ppm	Partes por millón

rpm	Revoluciones por minuto
TNT	Trinitrotolueno
Ug ⁻¹	Unidades de concentración de enzima
µm	micrómetros

RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados de la evaluación del efecto de la bioestimulación en un suelo, procedente de Poza Rica, Veracruz, para la biodegradación de los hidrocarburos totales del petróleo, utilizando cepas fúngicas. Como primera etapa, se evaluó la actividad ligninolítica de las enzimas lacasa (Lac), manganeso peroxidasa (MnP) y lignina peroxidasa (LiP) de cuatro cepas fúngicas etiquetadas como HBG, HBC7, HBC9 y M1H5, así mismo, se comparó su crecimiento en dos soportes: madera y olote de maíz. Se observó que las cepas inoculadas sobre el olote, tuvieron mejor desarrollo. En cuanto a la actividad enzimática, la cepa HBG presentó actividad de las enzimas Lac y MnP, mientras que la cepa M1H5 mostró actividad de LiP. Con base en estos resultados, las dos cepas anteriores fueron utilizadas en el proceso de biorremediación del suelo, el cual se llevó a cabo durante 8 semanas, ambas cepas fueron capaces de remover los hidrocarburos totales del petróleo en suelo estéril, siendo un valor de 10.4 % para HBG y de 6.3% para M1H5. Para el proceso de biorremoción, se prepararon reactores conteniendo, suelo estéril y no estéril, el olote como soporte y las cepas HBG y M1H5, de los cuales en algunos se realizó la bioestimulación y en otros no. En el reactor que funcionó como blanco y que solo contenía el suelo no estéril y el olote, se observó que los microorganismos nativos presentaron la capacidad de remoción de los hidrocarburos totales del petróleo en un promedio del 8.9 %. Así mismo, se observó que en los biorreactores donde hubo bioestimulación, ambas cepas, removieron la mayor cantidad de hidrocarburos totales del petróleo, en un promedio de 12.6 % para HBG y 12.5 % para M1H5, en comparación con los biorreactores que no fueron bioestimulados, donde se obtuvo una remoción del 8.7 % para HBG y 11.3 % para M1H5. Por otra parte, se observó que el proceso de biorremediación disminuyó el efecto tóxico de los HTP sobre el crecimiento radicular del trigo.

SUMMARY

In this investigation the results of the evaluation of the effect of biostimulation in a soil, from Poza Rica, Veracruz, for the biodegradation of total oil hydrocarbons, using fungal strains was presented. As a first point, the ligninolytic activity of laccase enzymes (Lac), manganese peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP) of four fungal strains labeled HBG, HBC7, HBC9 and M1H5 was evaluated, and their growth was compared in two supports: wood and corncob. It was observed that the strains inoculated on the corncob, had good development. Regarding enzymatic activity, strain HBG showed activity of Lac and MnP enzymes, while strain M1H5 showed LiP activity. Based on these results, the two previous strains were used in the soil bioremediation process, which was carried out for 8 weeks, both strains were able to remove the total oil hydrocarbons from the sterile soil, at a value of 10.4 % for HBG and 6.3 % for M1H5. For the process of bioremediation, the reactors were prepared containing sterile and non-sterile soil, the corncob as support and the strains HBG and M1H5, in some reactors the biostimulation was performed and in others not. In the reactor that worked as a control and that only contained the non-sterile soil and the corncob, it was observed that the native microorganisms showed the capacity to remove the total oil hydrocarbons from the soil by an average of 8.9 %. Likewise, it was observed that in the bioreactors where there was biostimulation, both strains, removed the greater amount of total oil hydrocarbons from the soil, in an average of 12.6 % for HBG and 12.5 % for M1H5, in comparison with bioreactors that were not biostimulated, where a removal of 8.7 % for HBG and 11.3 % for M1H5 was obtained. On the other way, was that the bioremediation process diminished the toxic effect of the total oil hydrocarbons on root growth of wheat.

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

En México, la actividad económica más importante es la petrolera, sin embargo, la contaminación por este tipo de sustancia es cada vez mayor, ya que esta actividad genera más hectáreas (ha) contaminadas cada año. En 2015 Petróleos Mexicanos (PEMEX), reportó, un incremento de 144.58 ha con respecto al cierre del 2014 para finalizar con un total de 1,056.14 ha contaminadas con hidrocarburos al cierre del 2015. Esto representó un aumento del 9 % con relación al 2014 (Petróleos Mexicanos, 2016), debido al alto índice de fugas y derrames de hidrocarburos que ha sufrido la infraestructura de la empresa. En 2015 PEMEX reportó un incremento del 31 % de fugas y derrames con respecto al 2014. Donde el 52 % de este incremento corresponde a los ductos de recolección debido a la corrosión interior de dichos tubos, y un 34 % corresponde a los tubos de transporte asociados con la integridad, corrosión y las acciones de vandalismo contra las instalaciones (Petróleos Mexicanos, 2016).

Como consecuencia, el constante aumento de las zonas contaminadas con hidrocarburos y la interacción de éstos con el ecosistema, ponen en riesgo la integridad y la salud de la población, ya que estos contaminantes presentan alta volatilidad, baja viscosidad y baja tensión superficial, por lo que penetran en las vías aéreas y se extienden en gran parte del tejido pulmonar afectando el sistema respiratorio, además de lesionar los pulmones; también se han relacionado afectaciones gastrointestinales, náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea atribuidas a la irritación de las mucosas (Lifshitz et al., 2003).

Es por esto, que se han buscado nuevas metodologías viables para remediar zonas contaminadas por hidrocarburos, siendo la biodegradación una técnica prometedora para ser aplicada en suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Para lo cual se deben tener en cuenta las propiedades del suelo y la cantidad de materia orgánica presente, ya que son factores clave para la biodegradación de los HAP. Un alto contenido de materia orgánica en un sistema de suelo puede influir negativamente en la tasa de descontaminación de los HAP, en algunos de los

trabajos reportados previamente acerca de la degradación de los HAP, se basan principalmente en el uso de bacterias como agentes biodegradadores. Sin embargo, se ha demostrado que las bacterias no siempre tienen éxito para eliminar los HAP, una razón es que no pueden competir eficazmente con las especies presentes en el suelo de la región, mostrando incompatibilidad con el mínimo de humedad y con los nutrientes presentes. Otras razones son: la baja biodisponibilidad de los HAP por su alta hidrofobicidad, baja solubilidad en agua y fuerte tendencia a adsorberse en la matriz de los suelos y sedimentos (Wang et al., 2009).

Por otro lado, existe otra alternativa al uso de bacterias en un proceso de biodegradación, que son los hongos de pudrición blanca, los cuales tienen mayor capacidad de colonizar el suelo y competir con la microfauna que se encuentra en el mismo. Lo anterior es debido a que los hongos de pudrición blanca tienen la capacidad de degradar los contaminantes a medida que descomponen la materia orgánica macromolecular, con la cual se han combinado. Las hifas fúngicas pueden alcanzar a los contaminantes penetrando el suelo y esto aunado a la producción de oxidasas extracelulares las cuales son las encargadas de oxidar los contaminantes, da a los hongos una ventaja significativa sobre las bacterias (Wang et al., 2009).

Por lo anterior para la realización de este proyecto, se emplearon dos cepas de hongos de pudrición blanca para dar tratamiento a un suelo procedente de Poza Rica Veracruz, México, contaminado HTP.

1.1 El suelo

El suelo es la combinación de la meteorización física, química y biológica que se produce en la superficie de la tierra, el suelo tiene entre cincuenta centímetros a un metro de espesor y en su interior coexisten cientos de especies animales, bacterias y hongos. Cuenta con características específicas, lo que lo hace útil como sustrato para la vegetación, además de ser el ambiente donde ocurren diversos procesos fisicoquímicos. Un suelo evolucionado está compuesto por tres capas denominadas horizontes. A nivel superficial se encuentra el horizonte A o eluvial, el cual es rico en materia orgánica semi-descompuesta y de característica porosa. Debajo del horizonte A se encuentra el horizonte B o iluvial el cual se caracteriza por la acumulación de sales, arcillas y humus que fueron arrastrados desde el horizonte A, es más denso y menos poroso que el anterior. Finalmente, debajo del horizonte B se encuentra el horizonte C o regolito formado por el material original parcialmente alterado. Cuando el material original es una roca se le denomina roca madre (Iriondo, 2014).

1.1.1 Formación del suelo

La formación del suelo está relacionada con la meteorización de la roca, la cual, es un proceso de disgregación y alteración que sufren las rocas y los minerales cuando quedan expuestos a la atmósfera (Iriondo, 2014).

El proceso de meteorización puede ser de cuatro tipos como se describe a continuación:

- Meteorización física: consiste en la disgregación de la roca y los minerales por la dilatación y contracción de los materiales debido a los cambios naturales de temperatura, sin que se modifique su composición química.
- Meteorización química: es la alteración de los minerales que pierden algunos elementos y se enriquecen con otros elementos, debido a la acción de la lluvia cargada con sales disueltas.
- Meteorización biológica: es causada por la acción de los seres vivos tanto vegetales como animales sobre el suelo, los efectos producidos son de tipo

físico, como el crecimiento de raíces de árboles las cuales liberan anhídrido carbónico favoreciendo la carbonatación. La actividad metabólica de las bacterias, que puede ser oxidante o reductiva, va a ejercer una acción química sobre el suelo. Por otra parte, los organismos como las lombrices, airean el suelo y los sedimentos, favoreciendo así la oxidación de los sustratos.

- Meteorización antrópica: es producida por efecto de las actividades humanas, tales como la actividad agrícola donde se sustraen del suelo varias toneladas de fósforo, nitrógeno y potasio en cada cosecha.

Estos tipos de meteorización traen como consecuencia que los productos tales como las sales disueltas, minerales arcillosos que son los silicatos laminares y granos de cuarzo, lleguen a los ríos, lagos y aguas subterráneas (Iriondo, 2014).

1.1.2 Componentes y características del suelo

El suelo posee muchos componentes uno de los cuales es el sustrato natural, en el cual se desarrolla la vida en la superficie de los continentes; estos componentes se agrupan en dos clases: fracción sólida y fracción fluida (Silgado y Tardón, 2011).

La fracción sólida, está compuesta por minerales, principalmente silicatos, arcillas, óxidos e hidróxidos de hierro, clastos de composición variada y componentes orgánicos formados por materia orgánica muerta (humus). El humus se clasifica como humus joven o bruto, integrado por restos de hojas, ramas y restos de animales, mientras que el humus elaborado está formado por sustancias orgánicas como resultado de la descomposición total del humus joven, además, presenta un color oscuro por los derivados nitrogenados (Silgado y Tardón, 2011).

De manera similar, la fracción fluida, es la responsable de la translocación de sustancias químicas de una capa de suelo a otra, llevando sustancias disueltas o en suspensión a la matriz sólida (Silgado y Tardón, 2011). Está formada por la dilución de sales de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Cl^- , NO^{-3} y además, de sustancias orgánicas y de gases, principalmente O_2 , y CO_2 , estando presente el oxígeno en menor

concentración que en la atmósfera y el bióxido de carbono en mayor concentración que en la atmósfera.

En algunos tipos de suelo con drenaje deficiente se pueden encontrar gases como el metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O) (Silgado y Tardón, 2011).

Además de su composición química, los suelos presentan determinadas características como las que se mencionan a continuación:

- ❖ Profundidad: la cual puede ser variable, pero condiciona el desarrollo radicular de las plantas.
- ❖ Textura: es la proporción relativa de las fracciones de arena limo y arcilla, además que condiciona el grado de aireación y humedad del suelo, así como la disponibilidad de los nutrientes y la resistencia a la penetración de las raíces.
- ❖ Estructura: es la forma en que se agrupan las partículas de arena limo y arcillas.
- ❖ Porosidad: es el porcentaje de huecos en relación al volumen total del suelo. Tanto la estructura como la porosidad determinarán la permeabilidad del suelo y a afectarán el abastecimiento del agua, el aire, la disponibilidad de los nutrientes y el grado de penetración de las raíces.
- ❖ Densidad del suelo: es la relación de la masa de las partículas del suelo seco dividida por el volumen combinado de las partículas y los poros (Silgado y Tardón, 2011).

1.1.3 Contaminación del suelo

Ésta se define como el incremento o la introducción de sustancias ajenas que puedan ejercer un efecto dañino sobre los organismos nativos presentes en el suelo, donde algunas de estas sustancias pueden ser degradadas o no por los organismos autóctonos. Por lo general, la contaminación, está relacionada con la actividad antropogénica, siendo algunos ejemplos de contaminantes del suelo los fertilizantes, plaguicidas, lodos residuales e hidrocarburos.

Dado que los contaminantes presentes en la lluvia y el aire también se depositan en el suelo, incrementan el problema de contaminación, y eso se debe a que el tiempo de residencia de los contaminantes, en general, suele ser prolongado (Bautista, 1999).

Los contaminantes degradarán el suelo de acuerdo a sus características físicas, químicas y biológicas. A continuación se mencionan algunos ejemplos de contaminantes.

- Fertilizantes, nitrogenados, fosfatados y potásicos usados en el suelo agrícola suelen ser muy efectivos para la producción de cultivos, pero al llegar a los cuerpos de agua propician la eutroficación y acumulación de materia orgánica, transformándolos en pantanos.
 - Plaguicidas, en algunos casos interactúan con la materia edáfica del suelo logrando desactivar o cambiar su estructura convirtiéndose en biodegradables, disminuyendo así el impacto hacia el suelo (Bautista, 1999). La forma en que llegan los plaguicidas al suelo es mediante la aplicación directa y la deposición cuando éstos son aplicados a las partes aéreas de las plantas, también pueden llegar por medio de los restos vegetales que quedan en el suelo al recolectar los cultivos. Una vez en el suelo los plaguicidas sufren una serie de procesos que determinan su dinámica, uno de éstos procesos es la transferencia, en la cual el plaguicida se mueve de una fase a otra del suelo o dentro de una misma fase sin presentar cambios químicos y por lo tanto conservan su toxicidad. Otro proceso es la transformación (degradación) del plaguicida a otros compuestos que pueden ser de mayor, igual o menor toxicidad (Guzmán, 2007).
 - Lodos residuales, por la cantidad de materia orgánica suelen ser beneficiosos, sin embargo, se debe tener en cuenta la cantidad de metales pesados y demás constituyentes para realizar una evaluación de sus posibles efectos negativos, como la exposición a los metales pesados (Bautista, 1999).
-

- Hidrocarburos, en el suelo, en concentraciones bajas, propician el crecimiento de la actividad microbiológica y vegetal, lo cual genera una mayor producción de sustancias húmicas que benefician en gran medida al suelo. Sin embargo, en concentraciones elevadas se observa una disminución de la biota en general, pero a medida que pasa el tiempo, se incrementará la actividad microbiana, en especial los microorganismos que son capaces de descomponer a los hidrocarburos, lo cual aumentará la materia orgánica y el nitrógeno total en el suelo (Bautista, 1999).

1.2 Técnicas de biorremediación del suelo

La biorremediación consiste en el uso de organismos vivos como plantas, hongos, bacterias, para degradar, transformar o remover los compuestos orgánicos tóxicos a productos menos tóxicos o incluso inocuos, dependiendo de las características catabólicas de los organismos utilizados, de tal manera que las rutas de biodegradación de los contaminantes orgánicos dependerán de la estructura química del contaminante y de la especie microbiana degradadora. Los procesos de biorremediación incluyen reacciones de óxido-reducción, procesos de sorción, intercambio iónico, reacciones de acomplejamiento y quelación (Volke y Velasco, 2002).

Para remediar un suelo contaminado con HAP, es importante entender su comportamiento en este medio, ya que en el suelo son degradados o removidos por una serie de procesos fisicoquímicos y biológicos como la volatilización, fotooxidación, lixiviación en las aguas subterráneas, pérdida abiótica, absorción por plantas o degradación microbiana (Okere y Semple, 2011).

La velocidad de estos procesos y el grado de degradación o remoción de los HAP, se controla mediante una serie de factores, como por ejemplo: las propiedades del suelo, el tipo de suelo, humedad, temperatura, potencial redox, disponibilidad de nutrientes, presencia y actividad de microorganismos degradantes, además de las propiedades fisicoquímicas de los HAP (Kuppusamy et al., 2017).

De las tecnologías existentes para remediar los suelos, ya sea, analizando el fenómeno exactamente en el lugar (*in situ*) o transportando el material a un lugar diferente al sitio de muestreo (*ex situ*), la biorremediación ha obtenido una amplia aprobación para el tratamiento de suelos contaminados con HAP, y esto es porque se considera segura, respetuosa con el ambiente y económica. En particular, las técnicas de biorremediación para suelos contaminados con HAP incluyen opciones de tratamiento *in situ* como el cultivo terrestre, la bioestimulación, la bioaumentación, el compostaje y la fitorremediación además de tratamientos *ex situ* como los biorreactores tales como el tanque agitado, columnas de burbujeo, air lift y reactores de lecho (Gan et al., 2009).

1.2.1 Bioestimulación y bioaumentación

Con estas técnicas, la actividad de los microorganismos es estimulada a través de la circulación de soluciones acuosas que contengan nutrientes y oxígeno, de tal forma que mejora la biodegradación de los contaminantes orgánicos o la inmovilización de los mismos (Volke y Velasco, 2002).

Por lo general la bioestimulación se utiliza en suelos carentes de nutrientes, ya que acelera los procesos de tratamiento como la bioaumentación, la cual consiste en agregar organismos degradadores cultivados en el laboratorio (en su mayoría, bacterias y hongos) al suelo, que por lo regular contiene una baja población de organismos degradadores de HAP, sobre todo de organismos especializados aerobios autóctonos (Kuppusamy et al., 2017).

Por otra parte, la bioestimulación no es recomendable para suelos arcillosos o demasiado heterogéneos, ya que hay poca transferencia de oxígeno. Además, existen otros factores que limitan a la bioestimulación como:

- Obstrucción en los pozos de inyección provocada por el crecimiento microbiano.
- Incremento en la movilidad de los contaminantes.
- La naturaleza y profundidad del contaminante en el suelo.

Estos factores en conjunto pueden aumentar el costo de la técnica de bioestimulación (Volke y Velasco, 2002).

1.2.2 Biolabranza

En esta técnica se aplican métodos de agricultura como la labranza, el abonado, el aumento de la humedad del suelo a través del riego o mediante la aplicación de fertilizantes. Algunas ventajas de éste método es que proporcionan aireación y homogenizan el suelo para la biodegradación, a su vez, nutren a los microorganismos presentes en el suelo que favorecen la remediación del mismo (Kuppusamy et al., 2017).

En general, el suelo contaminado se mezcla con agentes de volumen, como el desecho de poda, forraje, bagazo de caña, etc., que controlan las condiciones de pH y temperatura para optimizar la velocidad de degradación, posteriormente se incorporan métodos para el control de lixiviados. Los contaminantes tratados con la biolabranza incluyen al diésel, gasolinas, lodos aceitosos, creosota, coque, algunos pesticidas e hidrocarburos totales del petróleo (HTP). Algunas limitaciones que presenta esta tecnología es la generación de lixiviados de los contaminantes, que pueden migrar hacia el suelo o cuerpos de agua cercanos, además de generar grandes volúmenes de material contaminado (Volke y Velasco, 2002).

1.2.3 Biorremediación en fase de lodos

Es una técnica *ex situ* que utiliza como principal herramienta los biorreactores, como el tanque agitado. Se aplica en suelos heterogéneos, poco permeables o cuando se necesita disminuir el tiempo de tratamiento, debido a que se pueden controlar algunos procesos físicos y biológicos que mejoran y aceleran la biodegradación de los contaminantes. Con los biorreactores, el suelo contaminado se mezcla constantemente con líquidos, esto se debe a que la degradación se lleva a cabo en la fase acuosa por los microorganismos que se encuentran en suspensión o inmovilizados en la fase sólida, además los biorreactores pueden ser empleados para tratar HTP, compuestos orgánicos sólidos y volátiles (Volke y Velasco, 2002).

Una de las principales ventajas de los biorreactores es que ofrecen un mejor control de la temperatura y presión para mejorar el proceso de degradación de los HAP, ya que *in situ*, la actividad de los microorganismos encargados de degradar a los hidrocarburos está relacionada con las condiciones meteorológicas del lugar (Gan et al., 2009).

Esta técnica no es recomendable para ser aplicada en suelos arcillosos, ya que pueden ser difíciles de manipular y se puede presentar el caso en que los productos intermedios de la biorremediación sean más tóxicos que el contaminante original, como es el caso de algunos agentes clorados o explosivos. Además, los residuos de la biorremediación pueden requerir tratamiento o en su defecto ser llevados a confinamiento (Volke y Velasco, 2002).

1.2.4 Biorremediación en fase sólida

También se le conoce como composteo, es un proceso biológico controlado en el cual se pueden tratar suelos y sedimentos contaminados con compuestos orgánicos biodegradables. Esto se logra mezclando el material contaminado con agentes de volumen como paja, aserrín, estiércol y/o desechos agrícolas, la función de los agentes de volumen es mejorar el balance de nutrientes, asegurar una mejor aireación y la generación de calor durante el proceso. Los sistemas de composteo suelen ser tambores rotatorios, tanques circulares, recipientes abiertos o biopilas, siendo estas últimas un composteo en el cual se adicionan además de los agentes de volumen, agua y nutrientes, los cuales se colocan en áreas que tengan alguna forma de aireación y sistemas para colectar los lixiviados, la evaporación y la volatilización de contaminantes. Esta técnica se ha utilizado para remediar suelos contaminados con gasolinas, HTP, HAP y explosivos como el trinitrotolueno (TNT) (Volke y Velasco, 2002).

Un ejemplo de este método lo realizó Guérin en el 2000, quien, en su investigación, usó materia orgánica fresca manteniendo la humedad constante en la mezcla de suelo y composta, logrando compostar eficazmente los HAP. Bajo estas condiciones

logró remover el 50 % de los HAP en un lapso de 210 días logrando reducir 500 ppm a 120 ppm del HAP (Guérin, 2000).

Algunas limitaciones de esta técnica son, la necesidad de espacio, la necesidad de excavar el suelo contaminado lo que puede liberar compuestos orgánicos volátiles (COV), además de un aumento en el volumen de material a tratar (Volke y Velasco, 2002).

1.2.5 Biorremediación enzimática.

Actualmente existen nuevos métodos que se han aplicado recientemente en el tratamiento de suelos contaminados con HAP, como la biorremediación enzimática, la cual ha demostrado ser extremadamente eficiente y selectiva en comparación con los catalizadores químicos, debido a un número menor de condiciones de reacción, mayores velocidades de reacción, mayor estereoespecificidad, amplio rango de pH y la capacidad de catalizar reacciones a temperaturas relativamente bajas. Sin embargo, una de las principales limitaciones de la biorremediación enzimática, es su alto costo de operación (Kuppusamy et al., 2017).

Se han reportado diversos trabajos exitosos como es el caso de Kuppusamy y colaboradores (2017), quienes, utilizaron un biocatalizador para aplicar la enzima lacasa (Lac) de un hongo del género *Trametes sp.*, para evaluar el potencial de oxidación en 15 suelos de campo contaminados con HAP en presencia de sulfonato de 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina como mediador. Durante la oxidación enzimática de los HAP se formaron intermedios menos tóxicos, como el antraceno y la antraquinona. El experimento se llevó a cabo con 3 concentraciones de la enzima Lac 1, 3 y 10 Ug^{-1} en macetas con 500 gramos de suelo contaminado con HAP. Utilizando 1 Ug^{-1} se degradó 10 % de los HAP, utilizando 3 Ug^{-1} el porcentaje de degradación fue del 19 %, cuando se modificó la concentración de la enzima a 10 Ug^{-1} la degradación de los HAP fue del 24 %; el tiempo de tratamiento fue durante 15 días (Kuppusamy et al., 2017).

1.2.6 Fitorremediación

Esta técnica puede aplicarse *in situ* y *ex situ*, ya que utiliza a las especies vegetales para remover, transferir, estabilizar y/o concentrar contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en suelos, lodos y sedimentos. Algunos mecanismos de procesos de fitorremediación son, rizodegradación, fitoextracción, fitodegradación y fitoestabilización (Volke y Velasco, 2002).

La rizodegradación ocurre en el suelo que rodea a las raíces de las plantas, ya que secretan nutrientes que aprovechan los microorganismos, mejorando su actividad metabólica. En la fitoextracción las raíces captan a los contaminantes y son acumulados en los tallos y hojas. En el caso de la fitoestabilización los contaminantes son inmovilizados debido a compuestos químicos que se producen en las raíces formando complejos con los contaminantes, inmovilizándolos en la interfase suelo-raíz.

Por otra parte, en la fitodegradación los contaminantes son metabolizados dentro de los tejidos de la planta, a través de enzimas que catalizan su degradación (Volke y Velasco, 2002).

En general, la fitorremediación puede aplicarse en la degradación de hidrocarburos a una escala de campo. Normalmente, se utilizan plantas altamente adaptables con superficies radiculares profundas y grandes ya que requieren menos mantenimiento (Kuppusamy et al., 2017).

Una característica muy importante de la fitorremediación es que puede combinarse con dos o más tecnologías de biorremediación, como la volatilización, fotooxidación, y la colaboración con consorcios microbianos, éstas técnicas se acoplan para mejorar la degradabilidad de los HAP y reducir el tiempo de tratamiento, ya que se ha comprobado que en un lapso de 120 días este sistema de remediación multiprocesos es capaz de degradar más del 40 o 50 % de HAP con una concentración inicial de 546 ppm, en comparación con las técnicas aplicadas individualmente, de acuerdo a lo reportado por Kuppusamy y colaboradores (Kuppusamy et al., 2017).

Existen varias limitantes que se deben considerar, como el tipo de planta y la profundidad de suelo a tratar, además de la alta concentración del contaminante ya que puede resultar tóxico para la planta.

La fitorremediación no es eficiente para contaminantes que se encuentren fuertemente sorbidos en el suelo, la toxicidad y biodisponibilidad de los productos de la degradación no siempre se conocen y pueden mobilizarse o bioacumularse en los animales (Volke y Velasco, 2002).

1.2.7 Vermirremediación

En la vermirremediación se emplean lombrices, las cuales juegan un papel importante al ampliar los poros del suelo a través de acciones de excavación permitiendo que los microorganismos entren en los poros y actúen sobre los HAP, ya que en la mayoría de los suelos los poros son demasiado pequeños (≤ 20 nm), como para permitir que las bacterias con un tamaño aproximado de $1 \mu\text{m}$, protozoos de $10 \mu\text{m}$ o pelos radiculares de las plantas con un tamaño de $7 \mu\text{m}$ penetren y ataquen los productos químicos. Además, las lombrices de tierra, ya sea por difusión pasiva a través de la membrana externa o intestinal, absorben los HAP presentes en el suelo transformándolos o biodegradándolos, haciéndolos inofensivos. Paralelamente a la degradación de los HAP, las lombrices mejoran la calidad del suelo en términos de propiedades físicas, químicas y biológicas. A medida que las lombrices dispersan el suelo, ingieren grandes volúmenes del mismo y excretan materiales nutritivos, propiciando la proliferación de microorganismos beneficiosos para el suelo, tales como los fijadores del nitrógeno. Con el paso del tiempo, la degradación puede intensificarse a medida que las lombrices se reproducen, ya que, posiblemente podrían lograr así una mayor degradación de los HAP.

En general, la vermirremediación es autosuficiente, requiere poca o ninguna energía, es fácil de construir, explotar y mantenerla, puede resultar una técnica *in situ* económica y ambientalmente sostenible para remediar los sitios contaminados con HAP, en menos de un año (Kuppusamy et al., 2017).

1.3 El petróleo

El petróleo (Del latín *petrolĕum*, aceite de roca), es un combustible fósil, al igual que el carbón y el gas. Se le considera combustible fósil porque su formación comenzó hace miles de millones de años, cuando los restos de la vida marina microscópica se depositaron en el fondo del mar y quedaron enterrados en estratos de arcillas, limo y arena, formando diferentes capas, cada vez a mayor profundidad, debido a que la presión y temperatura que soportaban iba en aumento, y es justo esto lo que provocó la formación de compuestos de carbono e hidrógeno a partir de la materia orgánica original (Parra, 2003).

1.3.1 Migración del petróleo

El petróleo junto con el gas, una vez formados, tienden a subir a la superficie moviéndose de zonas de alta presión a zonas de baja presión. Además, si se presentan las condiciones apropiadas pueden aflorar en la superficie, sin embargo, en la mayoría de los casos, el petróleo durante su migración suele encontrar rocas impermeables que impiden que su movimiento prosiga, formando así yacimientos. Un yacimiento de petróleo no es un enorme lago subterráneo, en realidad parece una roca sólida que contienen miles de espacios diminutos llamados poros, el petróleo se mueve a través de dichos poros o fracturas en la roca hasta toparse con una capa impermeable, por lo que se queda atrapado en los poros formándose una acumulación, (Figura 1.1). Para que el yacimiento pueda concentrar grandes cantidades de petróleo, es necesario que el hidrocarburo encuentre una trampa que impida su dispersión. El petróleo siempre estará acompañado de gas, el cual está constituido fundamentalmente por metano, que es el hidrocarburo más ligero. A la temperatura y presión de los yacimientos, el metano se encuentra en estado gaseoso (Parra, 2003).

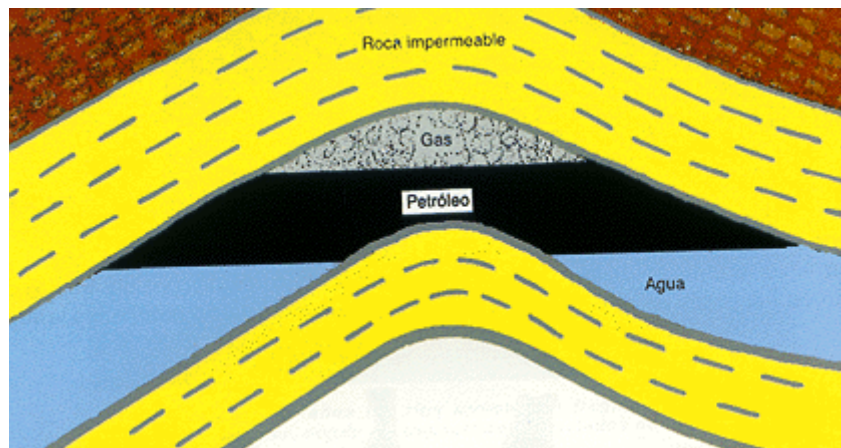


Figura 1.1 Formación de la trampa del petróleo que da lugar a yacimientos (Parra, 2003).

1.3.2 El petróleo y su composición

La composición del petróleo es muy variable: 83-87 % de carbono, 11-16 % de hidrógeno y 0-4 % de azufre, siendo el metano el hidrocarburo más sencillo, está formado por un átomo de carbono enlazando a cuatro átomos de hidrógeno (CH_4). Por otra parte, la mayoría de los componentes del petróleo contienen entre 5 y 20 átomos de carbono, la mayoría de estos componentes consisten en cadenas lineales de átomos de carbono rodeadas de átomos de hidrógeno, también están presentes compuestos con cadenas ramificadas o anillos de átomos de carbono.

Los compuestos formados por cadenas de carbono lineales o ramificados se llaman parafinas y tienen fórmula molecular $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$, como por ejemplo el octano; las parafinas con menos de cinco átomos de carbono son gases a temperatura ambiente, las parafinas entre cinco y quince átomos de carbono son líquidos a la misma temperatura. Con más de quince átomos de carbono las parafinas se van haciendo más viscosas y a medida que van subiendo el número de carbonos, las parafinas se van solidificando.

Otra clase de moléculas que se encuentran en el petróleo son los compuestos aromáticos (Figura 1.2). Los cuales, tienen una estructura de anillo y dobles enlaces. Se derivan del benceno (C_6H_6), tienen un aroma característico y son compuestos peligrosos, por lo que su uso está regulado. En conclusión, las moléculas presentes

en el petróleo más importantes son las isoparafinas, olefinas naftenos, y aromáticos como se pueden ver en la figura 1.2 (Parra, 2003).

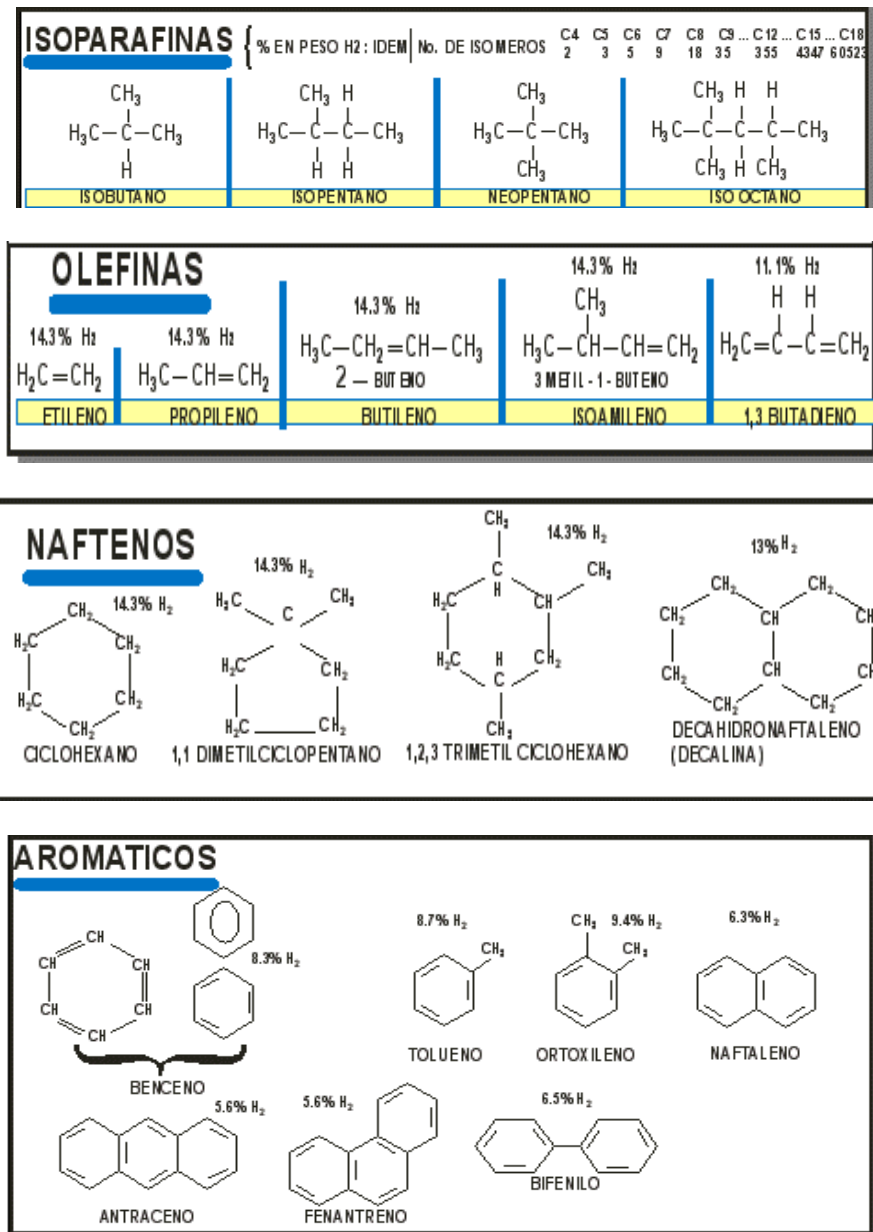


Figura 1.2 Diferentes compuestos del petróleo (Parra, 2003).

1.3.3 Usos del petróleo

El petróleo en su estado natural tiene muy poca utilidad, por lo que es necesario separarlo y refinarlo para hacerlo útil. Es por esto, que cuando se habla del uso del

petróleo, se refiere a los derivados del petróleo del cual se obtienen los siguientes productos:

- Gas de refinería: se utiliza como combustible en las refinerías.
- Gases licuados: propano y butano, los cuales se utilizan como combustibles industriales y domésticos.
- Gasolinas: se utilizan como combustibles para los motores de combustión interna.
- Naftas: son usadas en la industria petroquímica, convenientemente tratadas dan lugar a anillos bencénicos, que son pilar en la industria petroquímica. La parte que no se utiliza de las naftas es usada en la elaboración de las gasolinas.
- Querosenos: son empleados como combustibles de los aviones modernos a reacción.
- Gasóleos: se emplean como combustibles de los motores diésel usados en camiones y trenes, además, como combustible de calefacción doméstica e industrial.
- Fuelóleos: usados como combustibles de barcos, en la generación de electricidad en centrales térmicas y para la producción de calor en algunas industrias.
- Lubricantes: se utilizan para lubricar todas las máquinas con partes móviles.
- Asfaltos: usados en la pavimentación de carreteras y como impermeabilizantes (Parra, 2003).

1.3.4 Impactos ambientales del petróleo y los hidrocarburos en México

Existen riesgos en la exploración del terreno y aguas en busca del petróleo, como son, los derrames en aguas marinas, el descontrol del pozo petrolero, entre otros. Un ejemplo de accidentes ambientales es lo ocurrido en el estallido del pozo petrolero Ixtoc en 1979, en el Golfo de México, el cual tomó un tiempo considerable para poder recuperar y controlar el pozo, ocasionando graves daños al ambiente, fue causante de la muerte de aves y organismos marinos que habitaban en las

zonas de mareas y cerca de las costas, así mismo, la industria pesquera sufrió un gran impacto (Henry y Heinke, 1999).

Al igual que en aguas marinas, en el suelo existen riesgos de derrame durante la producción y recolección del petróleo antes de su traslado a la refinería; existen emisiones de óxidos de azufre que causan acidificaciones de lagos y problemas respiratorios en humanos; ácido sulfúrico que es muy tóxico y maloliente; dióxido de carbono que pertenece al grupo de gases de efecto invernadero; óxidos de nitrógeno que causan esmog fotoquímico y acidificación. También existen riesgos de contaminación en las refinerías, ya que generan efluentes líquidos que pueden contener hidrocarburos, fenoles, amoníaco y otras sustancias tóxicas. Además la obtención del petróleo, por separación física, genera lodos compuestos por mezclas de hidrocarburos y organismos contaminados con metales como níquel y vanadio, que están presentes en el petróleo crudo (Henry y Heinke, 1999).

Actualmente en México, la cantidad de suelos contaminados por hidrocarburos ha ido en aumento con respecto al 2016, ya que al cierre de este periodo el inventario de sitios contaminados fue de 1,283.8 ha, lo que representa un incremento del 10.5 % con respecto al 2015. Este incremento de sitios impactados por hidrocarburos puede explicarse por el aumento en el número de tomas clandestinas no herméticas, en ductos de PEMEX, así como la pérdida de contención en ductos de transporte y en ductos de recolección (Petróleos Mexicanos, 2017).

En esta tesis se analizaron las actividades de las enzimas lacasa (Lac), manganeso peroxidasa (MnP) y lignina peroxidasa (LiP) de cuatro cepas pertenecientes al laboratorio de microbiología ambiental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, que intervienen en la degradación de los HTP, así como los métodos más utilizados para determinar su actividad.

CAPÍTULO 2.

ANTECEDENTES

2 ANTECEDENTES

2.1 Actividad enzimática y soportes

Arora y Gill en 2001, analizaron la actividad enzimática de los hongos de pudrición blanca (*Trametes versicolor* (MTCC 138), *Daedalea flavida* (MTCC 145), *Irpex flavus* (MTCC 168), *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767) y *Poly-porus sanguineus* (MTCC 137)) y determinaron que el método más preciso para la cuantificación de la actividad enzimática de la LiP está basado en la oxidación del alcohol veratrílico (AV) a veratraldehído, el cual se determina a una longitud de onda de 310 nm. En dicho trabajo, analizaron la producción de LiP por los hongos de podredumbre blanca ya mencionados con diferentes condiciones nutricionales. Compararon el método basado en la oxidación del colorante azul B, el cual demostró ser mucho más ventajoso con respecto al método con AV, en medios suplementados con extracto de malta, preparaciones con lignina y residuos agrícolas. Los suplementos dieron una respuesta variada en diferentes medios donde, el AV estimuló la producción de la enzima en caldo extracto de malta y en caldo extracto de malta con minerales. En las preparaciones con indulina AT se presentaron efectos estimulantes sobre la producción lignina peroxidasa en diferentes hongos, como en el caso de *P. chrysosporium* e *I. flavus*. De la misma manera, la paja de trigo suplementada con caldo de sales minerales y caldo de extracto de malta, estimuló fuertemente la producción de LiP (Arora y Gill, 2001).

Arora y Gill (2001) concluyeron que, uno de los factores más importantes para determinar la producción de las enzimas fúngicas son los sustratos, ya que los sustratos pueden condicionar a las cepas fúngicas en la producción de las enzimas ligninocelulósicas.

Kapich y colaboradores en 2003, estudiaron diversos sustratos para la producción de LiP y MnP producidas por la cepa silvestre *P. chrysosporium*, demostrando que el hongo, puede producir las enzimas en condiciones no limitantes de nitrógeno y carbono, siempre y cuando se adicione un sustrato ligninocelulósico al medio. Cuando el hongo fue cultivado en un medio con glucosa-peptona-maíz no se

detectaron las actividades enzimáticas de las enzimas LiP y MnP. Solo con la adición de los sustratos que contenían lignocelulosa, como paja de trigo o bagazo de caña, se hizo posible la inducción de las enzimas. Esto indicó, que algunos compuestos derivados de los sustratos lignocelulósicos pueden funcionar como estimuladores para la producción de las peroxidasas ligninolíticas. También observaron que a altas concentraciones de nitrógeno orgánico (peptona; 3-4 g/L) no favorecen la producción de las peroxidasas ligninolíticas (Kapich et al., 2003).

La utilización de los sustratos lignocelulósicos juega un papel importante en la producción de enzimas lignocelulósicas. Se han realizado investigaciones analizando distintos sustratos para la producción de las enzimas, como lo reportado por García-Oduardo y colaboradores (2007), donde estudiaron la producción de Lac por el hongo comestible-medicinal *Pleurotus*. En su trabajo, presentaron los resultados de la producción de la enzima Lac en inóculos preparados con sorgo, maíz y pulpa de café, para lo cual utilizaron las cepas de *P. ostreatus* CCEBI 3021 y *P. ostreatus* CCEBI 3024. El periodo de incubación fue de 7 a 21 días, midiendo la actividad cada 7 días. La extracción de la enzima fue en medio acuoso y utilizando como sustrato el guayacol para la determinación de la actividad enzimática de Lac. Con la cepa *P. ostreatus* CCEBI 3024 se alcanzaron los valores más altos de la actividad enzimática utilizando la pulpa de café, proceso que se llevó a cabo en 21 días con $12.28 \times 10^{-2} \text{ Ug}^{-1}$, le siguió el sorgo con $8.73 \times 10^{-2} \text{ Ug}^{-1}$ y el de menor valor fue el maíz con $4.95 \times 10^{-2} \text{ Ug}^{-1}$. Con la cepa *Pleurotus ostreatus* CCEBI 3021 los mayores valores los alcanzaron con el sorgo con $21.77 \times 10^{-2} \text{ Ug}^{-1}$, le sigue la pulpa de café con $14.35 \times 10^{-2} \text{ Ug}^{-1}$, siendo el del menor valor el maíz con $5.01 \times 10^{-2} \text{ Ug}^{-1}$ (García-Oduardo et al., 2017).

Un ejemplo del uso de los hongos de pudrición blanca es el trabajo que realizaron Zafra y colaboradores en 2015, ellos probaron la cepa *Trichoderma asperellum* H15 para degradar fenantreno, pireno y benzo- α -pireno junto con un tratamiento de bioestimulación con bagazo de caña de azúcar. La cepa *T. asperellum* H15 rápidamente se adaptó al suelo contaminado solo con fenantreno, logrando una remoción del 78 % después de 14 días y en un suelo contaminado con la mezcla de

fenantreno, pireno y benzo- α -pireno se demostró que la cepa *T. asperellum* H15 degradó el 74 % del fenantreno, el 63 % del pireno y el 81 % del benzo- α -pireno con una concentración inicial de la mezcla de 1,000 ppm. Se observó que las actividades de las enzimas 1,2 dioxigenasa, Lac, MnP y LiP estaban relacionadas en la degradación de los HAP (Zafra et al., 2015).

Con base a lo anterior, para la realización de este proyecto, se optó por trabajar con olote (mazorca de maíz desgranada) y madera (residuo de poda) como soportes lignocelulósicos para las cepas HBC7, HBC9, HBG y M1H5, ya que, al investigar las propiedades de ambos soportes, se encontró que Córdoba y colaboradores (2013), analizaron la composición química del olote, quienes demostraron que éste contiene 45% de celulosa, 15.8 % de lignina, 33.6 % de hemicelulosa y 2 % de ceniza. La composición de azúcares en el producto de la hidrólisis ácida de holocelulosa (total de carbohidratos poliméricos que hay en el material, es decir la suma de celulosa y hemicelulosa) arrojó contenidos de glucosa del 41 %, 35 % de xilosa y en menor proporción arabinosa. Se destaca la aparición del 5 % de celobiosa como indicador de una hidrólisis no completa, también determinaron que los grupos hidroxilo de las hemicelulosas y lignina se oxidan a aldehídos y carboxilos de cadena corta formando parte de la fracción soluble después del tratamiento hidrotérmico. Estos resultados confirmaron que el olote es un material lignocelulósico con un alto contenido de hemicelulosas, particularmente de xilosa (Córdoba et al., 2013).

En el caso de la madera, Bernabé-Santiago y colaboradores (2013), analizaron la composición química de la madera de cinco especies de pino del municipio de Morelia. Las especies estudiadas fueron *Pinus leiophylla*, *Pinus michoacana*; variante *cornuta*, *Pinus montezumae*, *Pinus oocarpa* y *Pinus teocote*. El valor de pH para las cinco especies estudiadas fue moderadamente ácido de entre 4.0 y 4.4, 0.3 % de ceniza en todas las especies con mayor presencia de calcio, potasio y magnesio. La solubilidad con respecto a la sosa fue de 17.9 a 25.4 %, los extraíbles totales entre 7.6 y 8.2 %, donde la mayor solubilidad se presentó con agua caliente.

Finalmente, el contenido de holocelulosa fue de 68.1 a 74.7 % y de 24.0 a 28.5 % de lignina (Bernabé-Santiago et al., 2013).

Así mismo, es importante conocer la composición química de la madera en cuanto a los componentes ligninocelulósicos para la producción de las enzimas, un ejemplo, es el trabajo de Bárcenas-Pazos y colaboradores (2008). Ellos analizaron la composición química de dos encinos blancos *Quercus sebifera* y *Quercus tinkhami*. Evaluaron los contenidos relativos de lignina, extractos y cenizas, así como el contenido de celulosa. El compuesto estructural más abundante de la madera fue la celulosa con 43.3 % para *Q. tinkhami* y 45.72 % para *Q. sebifera*. Seguido por la lignina con 21.02 % y 21.74 % respectivamente, en cambio, el contenido de ceniza de *Q. tinkhami* de 2.67 %, fue estadísticamente menor que el de *Q. sebifera* con 3.22 %. Los contenidos de celulosa y lignina de *Q. tinkhami* y *Q. sebifera* son comparables con los publicados para la madera de otras especies de encinos blancos mexicanos (Bárcenas-Pazos et al.2008).

2.2 Trabajos de biorremediación

Diversos investigadores han realizado distintos trabajos analizando cepas de diversos tipos de hongos. Acevedo y colaboradores (2011), evaluaron la degradación de los HAP con el hongo de pudrición blanca *Anthracophyllum discolor*, aislado del bosque del sur de Chile. Se evaluó la eficacia de eliminación de los HAP en suelo con presencia y ausencia de microorganismos endémicos. También determinaron la producción de enzimas degradadoras de lignina. Como resultado se determinó que el *A. discolor* fue capaz de degradar los HAP, además que se observó una capacidad alta de remoción de fenantreno (62 %), antraceno (73 %), fluoranteno (54 %), pireno (60 %) y benzo- α -pireno (75 %), la concentración inicial de cada uno de los HAP fue de 50 ppm. Esta degradación está asociada con la producción de MnP (Acevedo et al., 2011).

Jacques y colaboradores en 2008, comprobaron que los hongos pueden funcionar en consorcios con los microorganismos autóctonos para la degradación del contaminante. En su trabajo degradaron el antraceno, fenantreno y pireno utilizando

un consorcio con las siguientes bacterias: *Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium sp.*, *Gordonia polyisoprenivorans* y de la familia de las *Microbacteriaceae*, siendo estas últimas las que utilizan el naftaleno en consorcio con un hongo identificado como *Fusarium oxysporum*, utilizaron tres diferentes concentraciones de hidrocarburos: 250, 500, y 1,000 ppm. El consorcio microbiano degradó en promedio 99 %, 99 % y 96 % de las diferentes concentraciones de antraceno, fenantreno y pireno, respectivamente, en un periodo de 70 días (Jacques et al., 2008).

Es importante mencionar que, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, se han realizado varios trabajos de investigación sobre la degradación de hidrocarburos en suelo utilizando hongos ligninolíticos, los cuales se describen a continuación.

En 2011 se reportó el aislamiento de 23 cepas de hongos de nueve biopilas utilizadas para el composteo de un suelo contaminado con hidrocarburos procedente de una refinería del Estado de Veracruz, México (Cruz et al., 2011).

Briseño-Meneses en 2012, utilizó dos cepas de hongos; HBG y F durante un periodo de 34 días para tratar un suelo con 30,400 ppm de HTP, los porcentajes de remoción fueron 4.9 % y 7.7 % respectivamente (Briseño-Meneses, 2012). Castaños-Núñez en 2013, evaluó tres soportes lignocelulósicos para el crecimiento de 5 cepas etiquetadas como F, HBG, HBC9, HBC12 y M1H5 de las cuales, la cepa HBG presentó el mejor desarrollo y fue utilizada para tratar un suelo contaminado con 103,066 ppm de HTP, obteniendo un porcentaje de remoción del 15.8 % (Castaños-Núñez, 2013).

Juárez-Díaz en 2014, evaluó el efecto que ejerce el pH del suelo en el crecimiento de 6 cepas de hongos. El mejor desarrollo de las cepas fue a un pH de 5 (Juárez-Díaz, 2014).

En 2015 Marquez-Badillo determinó la capacidad de seis hongos filamentosos para degradar hidrocarburos, donde obtuvo un porcentaje de remoción del 38 % (Marquez-Badillo, 2015).

Por último, Briseño-Vega en 2016, evaluó dos técnicas de estimulación del crecimiento de dos cepas fúngicas durante el proceso de biorremediación de un suelo contaminado con hidrocarburos, obteniendo un porcentaje de remoción del 68.6 % (Briseño-Vega, 2016).

2.3 Toxicología

San Sebastián y colaboradores (2001), realizaron un estudio en el nordeste de Ecuador, donde seleccionaron dos grupos de comunidades que estaban localizadas dentro de un perímetro de 5 kilómetros con respecto a un pozo o estación de petróleo, las cuales fueron consideradas como comunidades expuestas, de esta muestra fueron seleccionadas mujeres entre los 17 y 45 años de edad que hubieran residido por lo menos tres años en esas comunidades. Participaron 368 mujeres, quienes presentaron síntomas como hongos en la piel, irritación de nariz y garganta, cansancio, dolor de cabeza, irritación ocular, dolor de oídos, diarrea y gastritis, los cuales concuerdan con los síntomas de toxicidad causados por el petróleo (San Sebastián et al., 2001).

Por otra parte, los peces sufren afecciones por los hidrocarburos vertidos en ríos y mares, cómo lo demostrado por Salamanca y colaboradores (2008), donde evaluaron la toxicidad del petróleo en el pez *Solea senegalensis* (lenguado), en donde se expusieron especies jóvenes durante 21 días a distintas diluciones, preparadas a partir del hidrocarburo extraído del buque Prestigie y un sedimento procedente de una zona limpia de la Bahía de Cádiz. Las diluciones utilizadas fueron del 0.5 %, 2 %, 8 %, 16 % y el sedimento control (sedimento limpio o sin contaminante). En general, los daños histopatológicos como los biomarcadores mostraron una inducción significativa respecto al control negativo, con una tendencia creciente conforme aumenta la concentración del hidrocarburo. Los organismos analizados el día cero no presentaron en ningún caso daños histopatológicos y fueron tomados como organismos control. Las lesiones más frecuentes observadas en branquias fueron la descamación de las células

epiteliales de las laminillas secundarias, hipertrofia e hiperplasia, extravasación sanguínea en las laminillas secundarias y acortamientos en dichas laminillas. Las lesiones más frecuentes observadas en hígado fueron la alteración y vacuolización de los hepatocitos. Los índices de lesión calculada en la histopatología no fueron tan altos debido a que gran parte de la mortandad se produjo por contacto directo del hidrocarburo con las branquias de los peces. Sin embargo, se observaron alteraciones en el hígado similares a las encontradas en estudios realizados con individuos de diferentes especies de peces muestreados en la misma zona afectada por el vertido del Prestigio. Este estudio demostró que altas concentraciones de hidrocarburos no solo afectan a organismos de tamaño pequeño como los anfípodos o al éxito de la embriogénesis de distintos organismos acuáticos como equinodermos y bivalvos, sino que también, producen efectos negativos en organismos de mayor tamaño como los peces, quienes además bioacumulan en sus tejidos parte de los contaminantes presentes en el hidrocarburo (Salamanca et al., 2008).

De la misma forma que los seres humanos y los animales, los forrajes sembrados en el suelo contaminado con hidrocarburos pueden ser afectados. Tal y como lo demostraron Hernández-Valencia y colaboradores (2017), en su trabajo sobre el impacto de la contaminación petrolera sobre la germinación de pastos forrajeros (*Megathyrus maximus* y *Urochloa brizantha*), quienes realizaron bioensayos de toxicidad a corto plazo en donde se expusieron durante ocho días las semillas de ambos pastos en suelos contaminados con concentraciones crecientes de cuatro crudos de diferentes °API (unidad para medir la pureza del petróleo). Los crudos utilizados fueron: un crudo extra pesado (9.3 °API), un crudo pesado (12.1 °API), un crudo mediano (27.0 °API) y un crudo liviano (30 °API). Al término del bioensayo se evaluó el porcentaje de semillas germinadas, la elongación de la radícula, el índice de germinación y la concentración efectiva media (CE₅₀.) Los resultados mostraron que con el aumento de la concentración del crudo disminuyó el número de semillas germinadas, así como la elongación de la radícula y el índice de germinación. Con la disminución de los °API, las semillas lograron germinar en concentraciones más

altas de crudo, esto se debió a que los crudos livianos contienen mayor proporción de componentes volátiles capaces de entrar fácilmente a través de las paredes celulares de las plantas y afectar las membranas celulares. Estas pequeñas moléculas de hidrocarburos que penetran en la semilla pueden ser tóxicas para el embrión y afectar la germinación. Este trabajo concluye, que los crudos menos tóxicos para los pastos fueron los crudos extra pesado y pesado con una concentración CE_{50} para la germinación que varió entre 14 y 28 %, siendo los más tóxicos los crudos liviano y mediano cuya CE_{50} para la germinación estuvo entre 1 y 3 % (Hernández-Valencia et al., 2017).

2.4 Justificación

Debido al constante incremento en el número de hectáreas de suelos contaminados con hidrocarburos en México, y el riesgo que representa para la población la exposición a estos sitios contaminados, es importante desarrollar metodologías viables para la solución del problema. Por lo anterior, en este proyecto se propuso la utilización de la bioestimulación como estrategia para aumentar la eficiencia de dos hongos ligninolíticos en la degradación de hidrocarburos en el suelo.

CAPÍTULO 3.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Estimar el efecto de la bioestimulación en la degradación fúngica de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) en suelo.

3.2 Objetivo específicos

- ❖ Evaluar dos soportes lignocelulósicos para el crecimiento de las cepas fúngicas, midiendo la actividad ligninolítica.
 - ❖ Determinar la eficiencia de remoción de HTP en suelo de dos cepas fúngicas.
 - ❖ Evaluar el efecto de la bioestimulación durante el tratamiento sobre la capacidad de remoción de los HTP.
 - ❖ Evaluar la toxicidad del suelo contaminado con hidrocarburos antes y después del proceso de biorremediación con semillas de trigo.
-

CAPÍTULO 4.

HIPÓTESIS

4 HIPÓTESIS

La cepa fúngica con mejor desarrollo en el sustrato y mayor actividad ligninolítica, será capaz de degradar más eficientemente los HTP que se encuentran presentes en suelo. Los efectos toxicológicos del contaminante sobre semillas vegetales disminuirán como resultado del tratamiento de biorremediación.

CAPÍTULO 5.

MARCO TEÓRICO

5 MARCO TEÓRICO

5.1 Los hongos de pudrición blanca

También conocidos como hongos multicelulares, son capaces de degradar hasta cierto punto la lignocelulosa, utilizando diferentes mecanismos que los distinguen por la forma en que hacen que las celulosas y hemicelulosas sean accesibles para la degradación por las enzimas involucradas y su comportamiento en la degradación de madera. Estos mecanismos se clasifican generalmente como podredumbre blanca, pudrición parda y pudrición blanda. En particular, la pudrición blanca es el único mecanismo que puede degradar completamente la estructura de la madera y despolimerizar la lignina. La pudrición blanca se asocia típicamente con la desintegración de la madera dura, produciendo un material con un aspecto uniformemente blanco, áreas de decaimiento y/o bolsas de pudrición blanca (Kubicek, 2012).

Un ejemplo de este tipo de hongos son los basidiomicetos, los cuales poseen un sistema enzimático oxidativo extracelular que es utilizado en las primeras etapas en el ataque a la lignina poliaromática. Las reacciones enzimáticas extracelulares incluyen la despolimerización de la lignina, así como la desmetoxilación, la descarboxilación, la hidroxilación y la apertura del anillo aromático. Muchas de las reacciones dan como resultado la activación del oxígeno, creando radicales libres que permiten el continuo ataque oxidativo (Harvey y Christopher, 2001).

En la degradación de la lignina y los HAP, la despolimerización extracelular inicial o las reacciones de apertura del anillo aromático extracelular deben tener lugar antes que los anillos constituyentes puedan metabolizarse. Mientras que los anillos de los HAP son bencenos fusionados, la lignina es un polímero mucho más grande, más heterogéneo y amorfo formado de propilbenceno con un alto contenido de enlaces éter y cadenas laterales de carbono. Por lo tanto, los problemas que enfrentan los microorganismos para degradar los HAP son diferentes, en comparación con la degradación de la lignina, sin embargo, tanto la lignina como los HAP son hidrófobos e insolubles y plantean problemas similares para la catálisis por enzimas que

tienden a ser solubles en agua. Los hongos de la pudrición blanca degradan la lignina con agentes oxidantes generados por sus enzimas extracelulares, lo mismo sucede en la degradación de los HAP (Harvey y Christopher, 2001).

5.1.2 La pudrición blanca

También es conocida como el proceso de podredumbre de la madera, además de ser muy frecuente, ésta actúa tanto en maderas blandas, como duras y es una característica de los basidiomicetos. Se ha informado que algunos ascomicetos miembros de las *Diatrypaceae* y *Xylariaceae* producen pudrición blanca en maderas duras. Aunque la pudrición blanca se clasifica por la morfología que surge del ataque a la madera como moteado blanco o bolsitas blancas, hay dos patrones mecánicamente diferentes, la deslignificación simultánea y deslignificación selectiva (Kubicek, 2012).

- **Deslignificación simultánea:** actúa principalmente sobre la madera dura degradando la celulosa, la lignina y las hemicelulosas al mismo tiempo, los hongos lignificantes comienzan el ataque desde la pared celular y luego avanzan hacia la lámina central. Las enzimas que catalizan esta degradación permanecen unidas a las hifas de los hongos debido a que necesitan metabolitos para proporcionar peróxido de hidrógeno, el cual utilizan como sustrato. Por lo tanto, la descomposición se limita a pequeñas áreas alrededor de las hifas de los hongos.
- **Deslignificación selectiva:** degrada la lignina y las hemicelulosas antes de atacar la celulosa, éste modo de degradación ocurre tanto en madera dura como en madera blanda y la degradación comienza desde la lámina central y se extiende hasta la pared celular de la planta.

Es por esto que la lignina es químicamente difícil de degradar debido a que el mecanismo responsable de su biosíntesis implica reacciones de acoplamiento de radicales libres de alcoholes cinámicos fenólicos, ya que, como resultado, se forma un polímero interconectado a través de diversos enlaces carbono-carbono y éter que no son hidrolizables. Por lo tanto, la deslignificación biológica debe hacer uso

de mecanismos oxidativos por lo que las enzimas oxidativas extracelulares están implicadas en la despolimerización de lignina, ya que las enzimas incluyen una serie de oxidasas y peroxidasas que son responsables de generar radicales libres altamente reactivos que pueden atacar la lignina (Kubicek, 2012).

5.1.3 Enzimas degradadoras de lignina

Las principales enzimas oxidativas secretadas por los hongos de pudrición blanca, responsables de la oxidación de la lignina y de compuestos análogos a la lignina son; LiP, MnP y Lac (Wan y Li, 2012). Algunas otras enzimas como la celobiosa quinona oxidorreductasa (CBQ), celobiosa deshidrogenasa (CDH), glioxalato oxidasa (GIOx), alcohol oxidasa de veratrilo (AOV) y algunas estereras también pueden desempeñar un papel en el complejo proceso de decaimiento de la madera (Call y Mücke, 1997).

5.1.3.1 Enzima Lacasa

Las lacasas (bencenodiol oxidorreductasa EC 1.10.3.2) son enzimas múltiples, las cuales contienen cobre; estas enzimas catalizan la reducción de cuatro electrones de O_2 a H_2O , simultáneamente realizan la oxidación de un electrón de diversos sustratos donadores de hidrógeno tales como los difenoles, monofenoles, metoxi sustituidos, aminas aromáticas y alifáticas. La Lac cuenta con un grupo de cuatro átomos de cobre (1 átomo de cobre tipo 1, 1 átomo de cobre tipo 2 y 2 átomos de cobre tipo 3), el cobre tipo 1 es el responsable de otorgar el color azul típico de la enzima, esto se debe a la absorción electrónica de los enlaces de cobre-cisteína covalentes, en este lugar es donde se presenta la oxidación monoelectrónica del sustrato. Los átomos de cobre tipo 2 y 3 construyen un conglomerado de tres núcleos donde se transfieren los electrones y el oxígeno molecular se reduce a H_2O . Al final se tiene la oxidación de cuatro moléculas de sustrato para producir cuatro radicales, mientras se reduce una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua. Las Lac se han encontrado en plantas, procariontas, e insectos, además que están muy extendidas en los hongos (Kudanga et al, 2011).

Los cosustratos juegan un papel importante en la actividad de la enzima Lac ya que ésta, dependiendo del cosustrato, puede catalizar una gama muy extendida de reacciones, como por ejemplo la Lac de *Trametes versicolor*, puede oxidar ciertos sustratos no fenólicos y despolimerizar la lignina si se le suministra 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato), conocido como ABTS, quien funge como cosustrato. El mecanismo de degradación del complejo Lac-ABTS implica la abstracción del átomo de hidrógeno en lugar de la oxidación de un solo electrón. El AV tiene un potencial redox estándar, lo que lo sitúa fuera del rango de sustrato para la oxidación únicamente por Lac. Sin embargo, cuando la Lac y el ABTS están presentes en la mezcla de reacción, el AV se oxida a veratraldehído. El ácido 3,4-hidroxiantranílico, que actúa como cosustrato, permite la división de un rango de compuestos no fenólicos y la despolimerización de la lignina. Las reacciones enzimáticas que producen pequeños agentes oxidantes son capaces de penetrar en la matriz del sustrato, que de otro modo no serían permeables para las enzimas, estas proporcionan una ruta para aumentar la disponibilidad de HAP para el metabolismo de los microorganismos y están implicadas en muchas de las reacciones catalizadas tanto por LiP como por MnP. Las reacciones asistidas por cosustratos de la Lac pueden extender su potencial en la degradación de los HAP, como lo demuestra la oxidación acoplada de la Lac-ABTS de antraceno a la antraquinona y la oxidación del benzo- α -pireno (Harvey y Christopher, 2001).

5.1.3.2 Enzima manganeso peroxidasa

Las MnP (EC 1.11.1.13) son enzimas del grupo glicoproteínas que actúan a través del manganeso (Mn); cuando éstas se encuentran en presencia de peróxido de hidrógeno cambian el estado de oxidación del Mn, de Mn^{2+} a Mn^{3+} , este último estado permite a las MnP actuar indirectamente sobre los sustratos que se encuentren alejados de su centro activo, como lo demuestra la figura 5.1. La estabilidad de estos cationes se debe a la formación de quelatos con diferentes hidroxiácidos que producen los hongos, por ejemplo: oxalatos, malatos, malonatos o tartratos.

Estos ácidos incrementan el poder oxidante del complejo enzimático y favorecen la reacción con la MnP. Los ácidos grasos también se pueden obtener en la degradación enzimática de triglicéridos presentes en la matriz ligninocelulósica, y en presencia de ácidos grasos insaturados o tiocompuestos, las MnP muestran capacidad para actuar sobre fracciones no fenólicas de la lignina (Pascual et al., 2015).

Los ácidos catalíticos de las enzimas MnP en su reacción con el peróxido de hidrógeno forman los radicales libres, estos radicales son sustancias altamente oxidantes que se difunden y penetran en matrices en donde las enzimas no lo pueden hacer, es por esto, que los radicales libres aumentan la biodisponibilidad del sustrato. El mecanismo oxidativo de las enzimas ligninolíticas cataliza la degradación de una gran cantidad de xenobióticos, incluyendo a los HAP, cloroaromáticos, dioxinas, y pigmentos entre otros, que presenten potenciales de ionización (PI) ≤ 7.55 eV, con este planteamiento y sabiendo de antemano el PI de los contaminantes orgánicos de interés, se permitiría saber si las enzimas ligninolíticas de los hongos son o no útiles para su biodegradación (Quintero, 2011).

Algunos compuestos orgánicos sulfurados, así como ciertos ácidos grasos insaturados y sus derivados, son oxidados por las enzimas MnP formando radicales tiol y peroxil, altamente reactivos, los cuales atacan compuestos recalcitrantes que normalmente no son atacados directamente por las MnP, como los HAP de entre tres y seis anillos. A esto se le conoce como peroxidación, mecanismo que eleva la capacidad oxidativa del sistema ligninolítico a compuestos con un PI hasta 8.1 eV (Quintero, 2011).

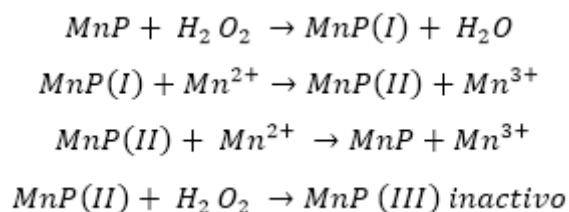


Figura 5.1 Ciclo de las manganeso peroxidasas.

De igual forma que con la Lac, la cantidad de sustratos que pueden ser atacados por la MnP se puede aumentar utilizando cosustratos. Por ejemplo, en presencia del glutatión, que normalmente no es oxidado por el sistema quelato de MnP, se puede oxidar a veratraldehído por medio de radicales tiol, generados por la oxidación del glutatión inducida por el quelato del Mn. De forma similar sucede con la degradación de la lignina no fenólica en presencia de lípidos, la peroxidación por los quelatos de Mn^{3+} crea radicales lípidos de peroxilo y alcoxilo, que inician la degradación ya sea a través de cationes radicales o vía oxi radicales a los anillos aromáticos (Harvey y Christopher, 2001).

5.1.3.3 Enzima lignina peroxidasa

Se puede describir como un grupo de hemoproteínas extracelulares denominadas enzimas peroxidasa, productoras de peróxido de hidrógeno. Las LiP (EC 1.11.1.14) ejercen por si mismas la acción oxidativa o también pueden formar radicales libres a partir de compuestos orgánicos como el AV o el dimetoxibenceno (Quintero, 2011).

Las LiP tienen la capacidad para actuar sobre compuestos fenólicos y no fenólicos, los radicales formados en condiciones aerobias reaccionan con otros compuestos provocando la ruptura del anillo en los compuestos fenólicos, aunque también se pueden formar procesos de polimerización. Las enzimas LiP también tienen la capacidad de actuar sobre los grupos metilo de la lignina, además de otros sustratos que a través de compuestos intermediarios como el AV, pueden ser oxidados por las LiP. Las enzimas se encuentran implicadas en la ruptura de enlaces C-C en los compuestos diméricos presentes en la lignina y enlaces tipo éster, así como en la oxidación de alcoholes benzil, en la hidroxilación de grupos metilos asociados a formas benzílicas, en enlaces olefínicos y en la apertura de anillos aromáticos (Pascual et al., 2015).

La LiP cuenta con el mismo grupo hemo que la MnP y el mismo ciclo catalítico. La oxidación inicial del peróxido de hidrógeno produce la enzima oxidada de dos electrones (compuesto I) con Fe^{4+} y un radical catión de porfirina. Con la reducción

de un solo electrón restauran la enzima al estado nativo. El compuesto II ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}[\text{P}]$) puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno para formar al compuesto III ($\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^-$ [P]) que puede ser intermedio o inerte, dependiendo de la concentración del peróxido de hidrógeno para reducir el sustrato. El compuesto III reaccionará con más peróxido de hidrógeno para descomponerlo por completo, o se descompondrá lentamente al estado nativo. Por otra parte, el potencial redox determinará si un núcleo aromático es un sustrato para la LiP. Los grupos de extracción de electrones como los α -carbonilo o grupos nitro en el anillo de benceno tienden a desactivar los núcleos aromáticos, a diferencia de los grupos alcoxi que tienden a activarlos.

De la misma manera que, para la MnP, el AV sirve como sustrato esencial para la LiP, ya que, el AV es un metabolito fúngico producido al mismo tiempo que la LiP. Debido a que la reactividad de la LiP con los sustratos depende del potencial redox, los compuestos fenólicos también pueden ser oxidados por la LiP. Sin embargo, en ausencia de AV, la reducción del compuesto I por sustratos fenólicos produce un radical fenoxi asociado enzimáticamente con el compuesto II. Como resultado, se produce una reacción con el peróxido de hidrógeno que forma el compuesto intermedio III catalíticamente inactivo de LiP. Sin embargo, para que una tecnología basada en enzimas (que trata con materiales que contiene fenoles y que requiere un sistema enzimático activo de LiP) sea eficiente, se debe garantizar que el mediador redox se oxide en lugar de los compuestos fenólicos. Una solución radica en la compartimentación del sistema mediador enzimático-redox alejado de los contaminantes fenólicos. Esto tendría la ventaja adicional de minimizar el riesgo de disipar la capacidad única de oxidación del sistema mediador LiP-redox con peróxido de hidrógeno hacia compuestos no fenólicos (Harvey y Christopher, 2001).

CAPÍTULO 6.

METODOLOGÍA

6 METODOLOGÍA

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco.

6.1 Materiales y equipos

6.1.1 Materiales

Cajas Petri, charolas de aluminio, desecador, matraces para micro Kjeldahl, matraces Erlenmeyer de 125, 250 y 500 mL, reactores de cristal, filtros Whatman #42, tubos de ensayo de 15 mL, matraz bola de 50 mL, vaso de precipitado de 50 mL, matraz aforado de 50 mL, probeta graduada de 100 mL, tamiz # 10, viales de 10 mL.

6.1.2 Equipos

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en el espectrofotómetro Biotek modelo EPOCH2; el potenciómetro HANNA instruments modelo HI 221 se utilizó para medir pH; el aparato Micro Kjeldahl para destilación, se usó en la determinación de nitrógeno total; la estufa de secado Lab-Line instrument a 40 °C se utilizó para evaporar el diclorometano de los viales donde se depositaron los HTP; la balanza analítica y el agitador rotatorio Orbit Shaker se utilizaron en la determinación de nitrógeno inorgánico; la estufa de cultivo E-33 a 28 °C se utilizó para la incubación de las cepas; el autoclave Labtech se utilizó para la esterilización de los medios de cultivo; la trampa de humedad Dean-Strack, se utilizó para determinar la humedad en el suelo y el equipo Soxhlet se usó para la determinación de la concentración de los HTP en el suelo.

6.2 Reactivos y medios de cultivo

6.2.1 Reactivos

Fosfato monopotásico 99 % (KH_2PO_4), Sulfato de magnesio heptahidratado 98 % ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Cloruro de calcio 97 % (CaCl_2), Tartrato de amonio dibásico 98 % ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$), tween 80, ABTS, Cloruro de magnesio tetrahidratado 98 % ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Azul de metileno, Alcohol veratrílico, Peróxido de hidrógeno (H_2O_2), Tartrato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$), 2,6-dimetoxifenol (DMP), Sulfato de manganeso (MnSO_4), Tolueno 99.9 % ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$), Ácido sulfúrico concentrado 95-97 % (H_2SO_4), Sulfato de potasio 99 % (K_2SO_4), Sulfato de cobre 99 % (CuSO_4), Cloruro de potasio 99 % (KCl), Óxido de magnesio 99 % (MgO), Hidróxido de sodio 98 % (NaOH), Ácido bórico 99.5 % (H_3BO_3), Ácido fosfórico 85 % (H_3PO_4), Dicromato de potasio 99.5 % ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), Sulfato ferroso 99 % (FeSO_4), Cloruro de trifeniltetrazolio 98 % ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{ClN}_4$), Hipoclorito de sodio 5 % (NaClO), Acetato de sodio 99 % ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) Cloruro de metilo 99.8 % (CH_2Cl_2).

Todos los reactivos fueron adquiridos en (Comercializadora de materiales y reactivos químicos) “Tomasa Hernández”, con pureza de grado reactivo.

6.3 Origen y selección de las cepas y los soportes lignocelulósicos

Las cepas fúngicas que se utilizaron pertenecen al cepario del mismo laboratorio, las cuales se denominaron como: HBG, M1H5, HBC7 y HBC9. Las cepas fúngicas fueron evaluadas en función de su actividad enzimática, lo cual permitió seleccionar a las dos cepas que presentaron la mayor actividad ligninolítica. De forma paralela se evaluaron dos soportes lignocelulósicos (madera y olote) para determinar el soporte que proporcione la base necesaria para obtener el mejor desarrollo de las cepas, los cuales se utilizaron en el proceso de tratamiento del suelo procedente de Poza Rica, Veracruz.

6.4 Determinación cualitativa de la actividad ligninolítica de lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa

Las cepas fueron sembradas en placa de agar extracto de malta (AEM), adicionado de 10 g de glucosa, 2 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g de CaCl_2 , 0.5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$, por litro de AEM. Particularmente, para la prueba de Lac se agregaron 250 mg/L de 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS). Al medio para MnP se le añadió 0.1 g/L de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Steffen et al., 2000), finalmente para la prueba de LiP se utilizaron 10 ppm de azul de metileno, todo esto con el fin de determinar visualmente la actividad de estas enzimas, para Lac, se debe apreciar la formación de anillos verde oscuro alrededor del micelio fúngico, indicando la presencia de enzimas generadoras de radicales extracelulares (lacasas, peroxidasa), para MnP se debe observar la formación de manchas negras y de color marrón oscuro de óxido de manganeso (MnO_2) causadas por la acción de la MnP, Finalmente para la prueba para LiP se debe observar la degradación del azul de metileno por la actividad de la enzima (Figura 6.1).

Como controles negativos se utilizaron un juego de cajas Petri con la misma composición para la determinación de la actividad ligninolítica para cada enzima sin inocular las cepas.

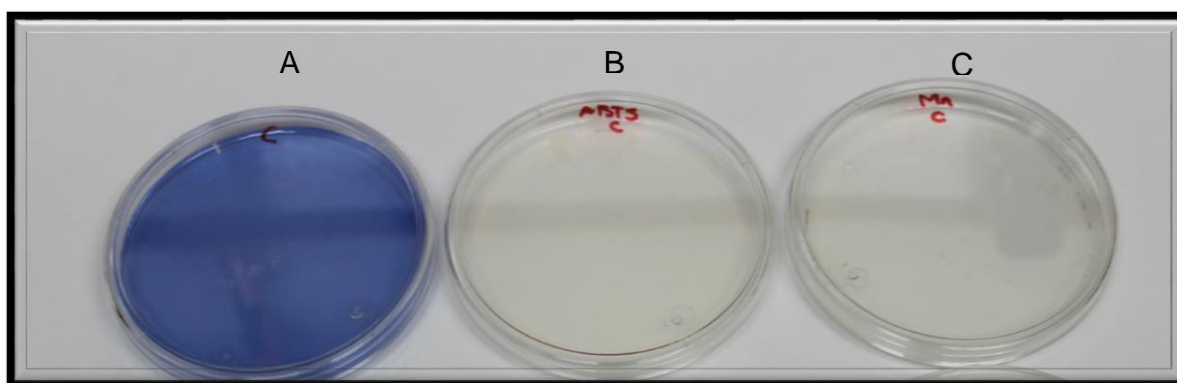


Figura 6.1 Cajas Petri con reactivos para determinar actividad ligninolítica, (A) caja Petri con azul de metileno, (B) caja Petri con ABTS y (C) caja Petri con MnCl_2 .

6.5 Evaluación de los soportes lignocelulósicos

Se evaluaron dos soportes, olote (parte central de la mazorca de maíz una vez que ha perdido los granos) o madera (residuo de un árbol talado) con el objetivo de seleccionar uno de ellos para utilizarlos como base para el crecimiento de las cepas que se utilizaran en el proceso de biorremediación del suelo. Para lo cual, se preparó una suspensión de esporas de cada cepa a partir de un cultivo desarrollado en agar extracto de malta durante 4 semanas utilizando 400 mL de medio salino estéril. La composición del medio salino por litro fue: 5 g de glucosa, 2 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g de CaCl_2 , 0.5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ y tween 80 al 0.05 %. Esta suspensión se sembró en biorreactores de cristal (frascos de vidrio de 500 mL) que contenían 10 g de soporte en base seca, junto con 20 mL de medio salino previamente esterilizado en autoclave. Los soportes suministraron a los hongos los nutrientes necesarios para su crecimiento (Figura 6.2). Todos los ensayos se hicieron a temperatura ambiente y por triplicado. La evaluación de los soportes se llevó a cabo mediante la observación del crecimiento de las cepas en los mismos.

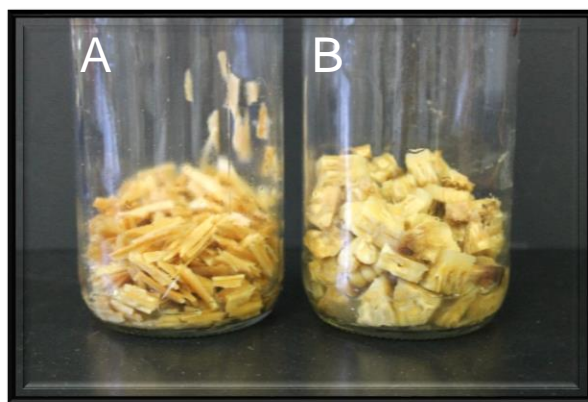


Figura 6.2 Soportes lignocelulósicos. A madera, B olote.

6.6 Determinación cuantitativa de la actividad ligninolítica de lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa de las cepas fúngicas

A partir de los cultivos desarrollados en los soportes lignocelulósicos, se tomaron tres biorreactores de cada soporte y se prepararon extractos enzimáticos agregando 50 mL de solución salina estéril al 0.8 % y colocándolos en agitación durante 1 hora. Todo el contenido de los biorreactores fue filtrado y almacenado en tubos de ensayo. Posteriormente, se tomaron 2 mL del extracto y se centrifugaron a 10,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente para separar la biomasa. Las determinaciones de la actividad ligninolítica se realizaron con el sobrenadante a temperatura ambiente (Juárez, 2014). Finalmente se midió la actividad ligninolítica en el espectrofotómetro de ultravioleta visible (UV-vis) EPOCH2 (Figura 6.3), la actividad ligninolítica se midió cada siete días durante cuatro semanas. Todos los ensayos de actividad ligninolítica se hicieron por triplicado.



Figura 6.3 Espectrofotómetro Epoch2.

6.6.1 Lignina peroxidasa

La enzima LiP se determinó por el método basado en la oxidación del AV por H_2O_2 , midiendo el cambio de la absorbancia a 310 nm (Tien y Kirk, 1988).

Procedimiento:

La reacción se llevó a cabo con 150 μL del extracto enzimático, 130 μL de AV 2 mM en un buffer de tartrato de sodio 50 mM a pH 3.0, se inició la reacción agregando 20 μL de H_2O_2 0.2 mM, teniendo un volumen final 300 μL de solución donde se lleva a cabo la reacción, finalmente se midió la absorbancia cada minuto durante 10 minutos.

6.6.2 Manganese peroxidasa

La actividad enzimática de MnP se determinó por el método basado en la oxidación del 2,6-dimetoxifenol (DMP) a 3,3',5,5'-tetrametoxidifenolquinona midiendo el incremento de la absorbancia a 469 nm (Kapich et al., 2003).

Procedimiento:

La reacción se realizó con 150 μL del extracto enzimático, 130 μL de DMP 0.5 mM más sulfato de manganeso (MnSO_4) 1 mM en un buffer de tartrato de sodio 50 mM a pH 4.5, se inició la reacción agregando 20 μL de H_2O_2 0.1 mM, teniendo un volumen final 300 μL de solución donde se lleva a cabo la reacción, finalmente se registró la absorbancia cada minuto durante 10 minutos.

6.6.3 Lacasa

La enzima Lac se determinó por el método colorimétrico, mediante la oxidación del ABTS al catión ABTS^+ midiendo el incremento de la absorbancia a 436 nm (Wolfenden y Wilson, 1982).

Procedimiento:

La reacción se llevó a cabo con 150 μL del extracto enzimático y se inició agregando 150 μL del ABTS 1 mM contenido en un buffer de acetato de sodio 10 mM a pH 4.5, teniendo un volumen final 300 μL de solución donde se lleva a cabo la reacción, finalmente se midió la absorbancia cada minuto durante 10 minutos.

6.7 Origen y caracterización fisicoquímica del suelo

El suelo que se utilizó provino de la zona petrolera de Poza Rica, Veracruz. El propósito de la caracterización fue conocer el contenido de nutrientes y el grado de

contaminación del suelo. Los parámetros que se determinaron para la caracterización fueron: el contenido de humedad, pH, materia orgánica, porcentaje de nitrógeno inorgánico, nitrógeno total y fósforo. Las metodologías usadas fueron las descritas en la norma NOM-021-SEMARNAT-2000 (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003). Para determinar los HTP en el suelo se realizó la prueba por gravimetría descrita por Fernández-Linares y colaboradores (2006).

Antes de la caracterización, el suelo fue secado a temperatura ambiente, triturado, homogeneizado y pasado por un tamiz # 10 para así realizar las pruebas en base seca, a excepción de la determinación de la humedad.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

6.7.1 Humedad

Para la determinación de la humedad en el suelo se utilizaron 2 métodos, el primero fue por gravimetría utilizando el método AS-05 de la NOM-021-SEMARNAT-2000, el cual se basa en la determinación de la cantidad de agua expresada en gramos que contiene la muestra de suelo. La determinación de la masa de agua se realizó por la diferencia de peso entre el suelo húmedo y el suelo seco.

Para lo cual, se pesaron 20 g de muestra de suelo y fueron colocados en charolas de aluminio a peso constante. Las charolas con la muestra se colocaron en una estufa a 105 °C, durante 12 horas, transcurrido este tiempo, se sacaron las charolas y se llevaron a un desecador y cuando alcanzaron la temperatura ambiente, fueron pesadas, repitiendo el secado durante 1 hora y siendo pesada hasta obtener un peso constante, es decir, hasta que dos pesadas consecutivas fueron iguales.

Se aplicó la ecuación 1 para determinar la humedad en suelo.

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{(pB+psh)-(pB+pss)}{(pB+pss)-pB} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

% de Humedad = Contenido de humedad gravimétrica expresado en porcentaje.

pB = Peso de la charola de aluminio (g).

psh = Peso del suelo húmedo (g).

pss = Peso del suelo seco (g).

Con este método, los suelos orgánicos al ser secados a 105 °C pueden tener pérdida de masa por oxidación y/o volatilización de componentes orgánicos (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003). Con base a lo anterior, se utilizó un segundo método (Dean-Starck), con el cual se determinó en una trampa la humedad en la muestra formando una mezcla con tolueno y llevada a destilación y condensación (Dirección General de Sanidad y Protección Agropecuaria y Forestal, 1988).

Para esta determinación, se pesaron 10 g de suelo y fueron colocados en un matraz bola con 50 mL de tolueno ($C_6H_5CH_3$), posteriormente se colocó la trampa de Dean-Starck (Figura 6.4) al sistema del condensador y se destiló la muestra hasta observar que el volumen final acumulado en la trampa no tiene variación. Finalmente se leyó el volumen de agua en el tubo graduado del equipo.

Para determinar la humedad en suelo, se aplicó la ecuación 2.

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{v \rho}{p} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

v = Volumen leído en el aparato de Dean-Starck (mL).

p = Peso de la muestra (g).

ρ = Densidad del agua a temperatura ambiente (m/v).



Figura 6.4 Determinación de la humedad por el método Dean-Starck.

6.7.2 pH

El pH en el suelo puede ser afectado por varios factores como el tipo y la cantidad de constituyentes orgánicos e inorgánicos que determinan la acidez del suelo, la presión parcial de bióxido de carbono y la temperatura (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003).

Para esta determinación, se utilizó el método AS-02 de la NOM-021-SEMARNAT-2000, donde la evaluación electrométrica del pH en el suelo se basa en la determinación del ion H^+ mediante el uso de un potenciómetro. En este caso el pH se midió en la suspensión sobrenadante de una mezcla 1:2 de suelo y agua.

Para la medición del pH, se pesaron 10 g de suelo, los cuales fueron colocados en un vaso de precipitado, posteriormente se le agregaron 20 mL de agua desionizada. La mezcla fue agitada manualmente a intervalos de 5 minutos durante 30 minutos. Después, se dejó reposar durante 15 minutos más, a continuación, se agitó y se introdujo el electrodo en la suspensión, el valor registrado fue el que se obtuvo una vez estabilizada la lectura del potenciómetro.

El equipo fue calibrado previamente con soluciones de pH 4.00 y 7.00, enjuagando los electrodos con agua desionizada antes y después de realizar las lecturas.

6.7.3 Nitrógeno total

Se determinó por el método AS-25 de la NOM-021-SEMARNAT-2000. La muestra fue sometida a una digestión para convertir el nitrógeno a NH_4^+ . La digestión de la muestra se desarrolló por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) y sulfato de potasio (K_2SO_4) que oxidan la materia orgánica y pasan del nitrógeno orgánico a amonio. Para aumentar la velocidad de la oxidación de la materia orgánica por el H_2SO_4 se emplearon catalizadores como el cobre (Cu) y el selenio (Se), (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003).

Para realizar la prueba se tomaron 3 muestras de suelo con aproximadamente 5 g cada una, se prepararon 3 blancos y se colocaron en matraces micro Kjeldahl, en cada matraz se agregaron 1.1 g de la mezcla de catalizadores K_2SO_4 , CuSO_4 y 3 mL de H_2SO_4 concentrado, se colocaron en la unidad de digestión micro Kjeldahl de 6 unidades, hasta que la digestión se tornó clara dejándola en ebullición durante una hora, una vez completada esta fase se dejó enfriar a temperatura ambiente, finalmente se agregaron 20 mL de agua destilada para colocar en suspensión, mediante agitación, el digestado.

A continuación, el digestado fue colocado en el destilador micro Kjeldahl (Figura 6.5), donde se agregaron 10 mL de NaOH 10 N, posteriormente se procedió a hacer la destilación. Una vez terminado el destilado se tituló con H_2SO_4 0.01 N. El cambio de color de la mezcla de indicadores en el punto final de la titulación, fue de color verde a rosado fuerte, lo que indica que el ácido ha reaccionado con todo el amonio presente en la muestra.

Para calcular el % de nitrógeno total se utilizó la ecuación 3.

$$\% \text{ N total} = (\text{Vm} - \text{Vb}) * \text{N} * \left(\frac{14}{\text{p}}\right) * 10 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

Vm = Volumen de ácido sulfúrico empleado en titular la muestra (mL).

Vb = Volumen de ácido sulfúrico empleado en titular blanco (mL).

N = Normalidad exacta del ácido sulfúrico (N).

14 = Peso equivalente del nitrógeno.

10 = Factor de conversión a porcentaje.

p = Peso de la muestra de suelo (g).



Figura 6.5 Determinación de nitrógeno total. (A) Destilación del digestado. (B) Destilado en el punto final de la titulación.

6.7.4 Nitrógeno inorgánico

El nitrógeno inorgánico se determinó por el método micro Kjeldahl, AS-08 de la NOM-021-SEMARNAT-2000. Se basa en la extracción del amonio intercambiable por equilibrio de la muestra de suelo y el cloruro de potasio (KCl) 2 N y su posterior determinación por destilación mediante arrastre de vapor en presencia del óxido de magnesio (MgO), (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003).

Para realizar la prueba de nitrógeno inorgánico se tomaron tres muestras del suelo de 5 g cada una, además se prepararon tres blancos en los cuales solo se agregaron 125 ml de la solución KCl 2 N. Las muestras fueron colocadas en matraces Erlenmeyer de 125 mL, respectivamente, después se agregaron 50 mL de la solución de KCl 2 N, para ser agitados durante una hora en un agitador rotatorio a 180 rpm, transcurrido este tiempo el sobrenadante fue removido por decantación. Posteriormente se tomó una alícuota de 10 mL del extracto del suelo, el cual fue

colocado en el matraz del equipo micro Kjeldahl para su destilación, a éste se le agregaron 0.2 g de MgO calcinado a 600 °C y 0.2 g de aleación de Devarda, se destiló la muestra hasta obtener 30 mL del destilado en un matraz Erlenmeyer de 125 mL que contenía 10 mL de solución de ácido bórico (H_3BO_3) con indicador. Las muestras junto con los blancos fueron tituladas con ácido sulfúrico 0.005 N. En el punto final el color cambió de verde a rosa tenue como se muestra en la figura 6.6.

El nitrógeno se determinó con la ecuación 4.

$$N \text{ (ppm)} = (M - B) * N * 14 * \left(\frac{V_i}{a}\right) * \left(\frac{1}{p}\right) * 1000 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

M y B= mililitros de ácido sulfúrico usados en la titulación de muestra y el blanco, respectivamente (mL).

N= normalidad del ácido (N).

V_i = volumen del extractante (mL).

a= alícuota destilada (mL).

p= peso de la muestra (g).



Figura 6.6 Determinación de nitrógeno inorgánico (titulación de la muestra destilada).

6.7.5 Materia orgánica

Ésta fue determinada por el método Walkley y Black, AS-07 de la NOM-021-SEMARNAT-2000. El cual se basa en la oxidación del carbono orgánico del suelo

a través de una mezcla de dicromato de potasio, ácido sulfúrico concentrado y ácido fosfórico, este último es para evitar la interferencia de Fe^{3+} , por otra parte, el dicromato de potasio final residual es valorado con sulfato ferroso. Con este procedimiento se detecta entre un 70 y 80 % del carbón orgánico total por lo que se introduce un factor de corrección por humedad que en el caso del suelo de México es de 1.298. En la mayoría de los laboratorios se sigue usando el factor de Van Benmelen de 1.724 para estimar la M.O. a partir de C orgánico, el cual resulta de la suposición de que la M.O. contiene un 58 % de C, (Secretaría del Medio Ambiente, 2003).

Para realizar la prueba se colocaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL, 3 muestras de suelo (0.5 g), y se prepararon 3 blancos, a cada uno de los 6 matraces se agregaron 10 mL de dicromato de potasio 1 N, 20 mL de ácido sulfúrico concentrado y se dejaron reposar durante 30 minutos, después de este tiempo se agregaron 200 mL de agua destilada, 5 mL de ácido fosfórico y 5 gotas del indicador de difenilamina. Para la titulación se utilizó una disolución de sulfato ferroso hasta un punto final con coloración verde claro (Figura 6.7). La solución de sulfato ferroso fue valorada por separado al momento de analizar las muestras.

La materia orgánica se determinó con las ecuaciones 5 y 6.

$$\% \text{ C Orgánico} = \left(\frac{B-T}{g} \right) * N * 0.39 * mcf \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

B = Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar el blanco de reactivos (mL).

T = Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar la muestra (mL).

N = Normalidad exacta del sulfato ferroso (N).

g = Peso de la muestra empleada (g).

mcf = factor de corrección de humedad.

$$\% \text{ Materia orgánica} = \% \text{ C Orgánico} * 1.724 \quad \text{Ecuación 6}$$



Figura 6.7 Punto final de la titulación para la determinación de la materia orgánica.

6.7.6 Fósforo

El fósforo (P) se determinó por el método Olsen, AS-10 de la NOM-021-SEMARNAT-2000. Donde se extrae el P del suelo con una solución de NaHCO_3 0.5 M a pH 8.5, el extractante disminuye la concentración de Ca en solución a través de la precipitación del CaCO_3 por lo que la concentración de P en solución se incrementa. El extractante evita reacciones secundarias en suelos ácidos y alcalinos ya que mantiene muy bajos los niveles de Al, Ca y Fe en la solución.

Para realizar la prueba se tomaron 3 muestras del suelo, de 2.5 g cada una, y se prepararon 3 blancos. El suelo fue colocado en matraces Erlenmeyer de 250 mL respectivamente, después se adicionaron 50 mL de la solución extractante, y fueron colocados en un agitador rotatorio durante 30 min a 180 rpm, después se filtró el sobrenadante con papel filtro Whatman No. 42 y se tomó una alícuota de 5 mL del filtrado, la cual fue colocada en matraces aforados de 50 mL y se le adicionaron 5 mL de la solución reductora, para posteriormente agitar y leer resultados después de 30 minutos en el espectrofotómetro de UV-vis a 882 nm, al mismo tiempo se preparó una curva de calibración con patrones de 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 ppm de P. Para lo cual se tomaron 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, y 10 mL de una solución de $\frac{\text{mg}}{\text{L}}$ de P y fueron colocados en matraces aforados de 50 mL con 5 mL de solución extractante y 5 mL de la solución reductora, posteriormente se aforaron con agua

destilada con agitación constante. Finalmente se determinaron los máximos de absorbancia después de 30 minutos a 882 nm.

El P se determinó con la ecuación 7.

$$P \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ de suelo} \right) = CC * \left(\frac{v_i}{p} \right) * \left(\frac{v_f}{a} \right) \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde:

CC = mg/L de P en la solución. Se obtiene graficando la curva de calibración (absorbancia contra mg/L) mediante una regresión simple.

Vf = volumen final de la solución colorimétrica (mL).

a = alícuota del extracto usado colorimetría (mL).

Vi = volumen de la solución empleada para hacer el extracto (mL).

p = peso de la muestra (g).

6.7.7 Capacidad de retención del agua

La capacidad de retención del agua (CRA), está relacionada con el volumen de huecos que hay en todo el suelo, a este volumen se le conoce como porosidad. Es en estos poros donde el agua es retenida durante periodos prolongados de tiempo permitiendo que las plantas absorban los nutrientes que el agua transporta. Dependiendo del tamaño y la forma de los poros, el suelo tendrá mayor o menor retención de agua (Instituto de Ciencias Agrarias).

Para realizar la prueba se tomaron 3 muestras del suelo de 50 g y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL, a los cuales se agregaron 100 mL de agua destilada y fueron agitados manualmente asegurándose de homogeneizar toda la muestra. Después, se dejó reposar durante 24 horas, terminado el tiempo de reposo, se filtró el agua en una probeta con papel filtro Whatman No. 42, finalmente se determinó el volumen del agua directamente en la probeta.

La capacidad de retención del agua se determinó con la ecuación 8.

$$CRA = \frac{V_i - V_f}{p} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde:

V_i = Volumen inicial del agua (mL).

V_f = volumen final del agua (mL).

p = peso del suelo (g).

6.7.8 Concentración de hidrocarburos totales de petróleo

La determinación se realizó haciendo la extracción de los HTP del suelo por el método de reflujo con un equipo Soxhlet, con este método se extraen los hidrocarburos contenidos en el suelo mediante la acción de un solvente orgánico volátil (Diclorometano), el cual tuvo una gran afinidad por los HTP y baja afinidad por la muestra, manteniéndose en reflujo durante 4 horas, de tal manera que se liberan los hidrocarburos de la muestra. El extracto orgánico es concentrado y colocado en un vial a peso constante. La cuantificación se realizó mediante gravimetría (Fernández-Linares et al., 2006).

Para la prueba se pesaron 10 g de suelo junto con 1 g de sulfato de sodio anhidro (las pruebas se hicieron por triplicado), para eliminar cualquier rastro de humedad en el suelo, ambos fueron colocados en un cartucho de papel filtro y fueron depositados en la columna de extracción del equipo Soxhlet, el cual se conectó con un matraz bola con perlas de ebullición y se le agregaron 60 mL de diclorometano grado HPLC, posteriormente se calentó a baño María aproximadamente a 50 °C, manteniendo el reflujo durante 4 horas. El extracto (Figura 6.8) fue destilado para separar la mayor cantidad del disolvente, los HTP fueron transferidos a viales de vidrio previamente puestos a peso constante y se colocaron en una estufa a 40 °C para evaporar el exceso de disolvente durante 12 horas, finalmente se pesaron los viales para determinar la concentración de los hidrocarburos.



Figura 6.8 Extracción de los HTP del suelo.

6.8 Biorremediación del suelo

Las cepas seleccionadas (HBG y M1H5) para ser utilizadas en la biorremediación fueron las que obtuvieron la mejor actividad enzimática, las cuales se inocularon previamente en olote con 50 mL de solución de sales durante 2 semanas para su desarrollo, ya que este fue el soporte elegido en la evaluación del soporte de crecimiento. Posteriormente se adicionaron y mezclaron en el suelo contaminado con hidrocarburos y se dio inicio al proceso de biorremediación. Se consideró el siguiente arreglo para dicho tratamiento, ver tablas 6.1 y 6.2:

Tabla 6.1 Diseño experimental con la cepa HBG y el suelo contaminado.

Característica del suelo	Etiqueta de la cepa	Tipo de ensayo	Nomenclatura
No estéril	HBG	Con Bioestimulación (C/N)	HBG-C/N
No estéril	HBG	Sin Bioestimulación (S/N)	HBG-S/N
No estéril	HBG	Mezcla de soportes (S/N)	HBG-Mezcla

C/N = Con nutrientes, S/N = Sin nutrientes

Tabla 6.2 Diseño experimental con la cepa M1H5 y el suelo problema.

Característica del suelo	Etiqueta de la cepa	Tipo de ensayo	Nomenclatura
No estéril	M1H5	Con Bioestimulación (C/N)	M1H5-C/N
No estéril	M1H5	Sin Bioestimulación (S/N)	M1H5-S/N
No estéril	M1H5	Mezcla de soportes (S/N)	M1H5-Mezcla

C/N = Con nutrientes, S/N = Sin nutrientes

Se modificó el arreglo para la prueba de biorremediación con la cepa HBG, la cual se aplicó el mismo diseño que para la cepa M1H5. Con este cambio se determinó el efecto que tiene el suelo sobre las cepas y la capacidad de las mismas para degradar el contaminante, de manera paralela se comprobó la capacidad que tienen los microorganismos autóctonos para degradar los HTP presentes en el suelo. Se omitió el reactor marcado como mezcla para agregar dos reactores más, uno de ellos marcado como: blanco (Figura 6.9A), en el cual solo se agregó al suelo no estéril el olote esterilizado, el otro biorreactor se etiquetó como estéril en el cual se esterilizó el suelo y se mezcló con la cepa M1H5 (Figura 6.9B) y HBG crecida en el soporte (Figura 6.10), además de los biorreactores C/N y S/N descritos anteriormente.

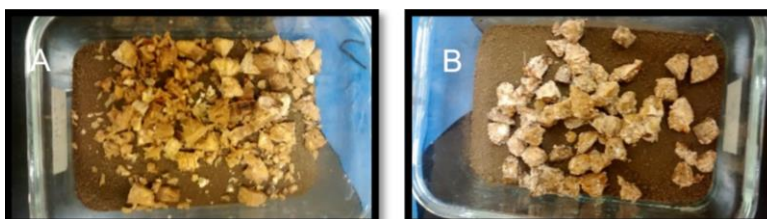


Figura 6.9 Fotografía para la unidad experimental de la M1H5, (A) Suelo blanco con soporte (olote), (B) cepa M1H5 crecida en soporte (olote).



Figura 6.10 Cepa HBG crecida en soporte (olote) mezclado con el suelo.

Por consiguiente, el diseño experimental se elaboró de la siguiente manera, ver tablas 6.3 y 6.4:

Tabla 6.3 Nuevo diseño experimental con la cepa HBG y el suelo problema.

Característica del suelo	Etiqueta de la cepa	Tipo de ensayo	Nomenclatura
No estéril	HBG	Con Bioestimulación (C/N)	HBG-C/N
No estéril	HBG	Sin Bioestimulación (S/N)	HBG-S/N
No estéril	Sin Cepa (Blanco)	Sin Bioestimulación (S/N)	Blanco
Estéril	HBG	Sin Bioestimulación (S/N)	HBG-Estéril

C/N = Con nutrientes, S/N = Sin nutrientes

De igual forma:

Tabla 6.4 Nuevo diseño experimental con la cepa M1H5 y el suelo problema.

Característica del suelo	Etiqueta de la cepa	Tipo de ensayo	Nomenclatura
No estéril	M1H5	Con Bioestimulación (C/N)	M1H5-C/N
No estéril	M1H5	Sin Bioestimulación (S/N)	M1H5-S/N
No estéril	Sin Cepa (Blanco)	Sin Bioestimulación (S/N)	Blanco
Estéril	M1H5	Sin Bioestimulación (S/N)	M1H5-Estéril

C/N = Con nutrientes, S/N = Sin nutrientes

En cada experimento se evaluó el efecto de la adición de nutrientes durante el tratamiento, agregando 150 mL del medio salino cada 2 semanas al reactor C/N, durante todo el tiempo del tratamiento y 150 mL de agua estéril al resto de los biorreactores.

Para lo cual, se prepararon 4 biorreactores (recipientes de vidrio de forma rectangular, con una altura de 7 cm aproximadamente, marca PYREX), conteniendo 600 g de suelo según lo descrito en el diseño experimental para las 2 cepas seleccionadas y se les adicionó medio salino al inicio del tratamiento cuando se mezcló con la cepa crecida en el soporte. La composición del medio salino fue de 5.0 g de glucosa, 2.0 g KH_2PO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g CaCl_2 y 0.5 g de tartrato de amonio por litro, cada experimento se realizó por triplicado.

Se dio continuidad al tratamiento durante 8 semanas a temperatura ambiente y se determinó por triplicado la capacidad de remoción de los HTP cada dos semanas.

Se comparó la eficiencia en la remoción de los HTP entre las dos cepas y los diferentes tratamientos aplicados.

6.9 Método de comparación de medias muestrales

Se analizaron las concentraciones de HTP en las semanas 2, 4, 6 y 8, para comparar su consistencia. Utilizando el método de comparación de medias muestrales con una $P=0.05$ y un intervalo de confianza del 95 %, con una $t=2.78$. En donde la hipótesis nula es cuando las medias son iguales.

Para esto, se calculó una estimación conjunta de la desviación estándar a partir de las desviaciones estándar individuales S_1 y S_2 utilizando las ecuaciones 10 y 11 (Miller y Miller, 1993).

$$S^2 = \{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2\} / (n_1 + n_2 - 2) \quad \text{Ecuación 10}$$

$$t = (x_1 - x_2) / s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}} \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde:

S = desviación estándar.

t = t de Student, y tiene $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad.

n_1 y n_2 = número de muestras.

x_1 y x_2 = medias muestrales.

6.10 Método ANOVA de un factor y Tukey

En la prueba ANOVA (Tabla 6.5) de un factor se pone a prueba la hipótesis nula sobre las medias poblacionales, en donde se determina si estas son iguales, y la

hipótesis alternativa donde por lo menos una de las poblaciones es diferente a las demás poblaciones en su valor esperado (Miller y Miller, 1993).

Tabla 6.5 Fórmula para cálculos de ANOVA de un factor

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad
Entre muestras	$\sum_i \frac{T_i^2}{n} - \frac{T^2}{N}$	h-1
Dentro de las muestras	Por diferencia	Por diferencia
Total	$\sum_i \sum_j X_{ij}^2 - \frac{T^2}{N}$	N-1

Donde:

N = nh = número total de medias.

T_i = suma de las medias en la i-ésima muestra.

T = suma de todas las medias.

El test Tukey (Tabla 6.6) compara las medias de los t niveles de un factor después de haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias con la técnica ANOVA y se basa en la distribución que sigue la diferencia del máximo y el mínimo de las diferencias entre la media muestral y la media poblacional de t variables normales independientes e idénticamente distribuidas.

Tabla 6.6 Variables para obtener HSD en el test Tukey

DIFERENCIA HONESTAMENTE SIGNIFICATIVA	HSD
MULTIPLICADOR	Q_α
CUADRADO DEL ERROR MEDIO	MSe
TAMAÑO DE LA MUESTRA DE CADA UNO DE LOS GRUPOS	n

Donde:

$$\text{HSD} = Q \propto \sqrt{\frac{\text{Mse}}{n}}$$

Multiplicador $Q\alpha$ = se obtiene de tablas Tukey.

$\text{MSe} = \frac{\text{Suma de cuadrados dentro de los grupos}}{\text{Grados de libertad dentro de los grupos}}$ obtenidos en la prueba ANOVA.

6.11 Evaluación de la toxicidad en el suelo

Se realizó la prueba de toxicidad al inicio y al final de los tratamientos, utilizando semilla de trigo (*Triticum aestivum*). Para lo cual, se evaluaron los efectos de los contaminantes en la plántula determinando: la inhibición en la germinación de las semillas, el efecto sobre el crecimiento temprano de las plántulas así como de las raíces y finalmente la producción de la biomasa. El tiempo de exposición fue de 14 días (Cuevas et al., 2012).

6.11.1 Prueba de viabilidad

Esta prueba consistió en probar en un periodo de 24 a 48 h la capacidad de germinación de un lote de 50 semillas tomadas al azar. Esta prueba se basa en la actividad de las enzimas deshidrogenasas del ácido málico que reduce la sal de tetrazolio en los tejidos vivos de las semillas. Las semillas fueron sumergidas en solución de cloruro de trifeniltetrazolio, para dar pie a la reacción de reducción en las células vivas, formando así un compuesto de color rojo (trifenilformazán) que indica la presencia de la actividad respiratoria en las mitocondrias, por consecuencia, el tejido es viable. Los tejidos muertos (no viables) no reaccionan con la solución y conservan su color natural (Cuevas et al., 2012).

Se desinfectaron 50 semillas sumergiéndolas en solución de hipoclorito de sodio al 5 % durante 15 minutos, después se lavaron con agua destilada y se colocaron en un matraz con agua destilada durante 15 minutos, para eliminar los residuos de hipoclorito. Posteriormente, las semillas fueron colocadas en papel filtro

humedecido con agua destilada durante 8 h a temperatura ambiente, pasado este tiempo las semillas se colocaron en un matraz con 100 mL de la solución de cloruro de trifeniltetrazolio al 1 % durante 8 h a 30 °C y protegidas de la luz. Finalmente, las semillas fueron lavadas con agua corriente bajo un flujo reducido, posteriormente se observó si hubo o no un cambio de coloración en el embrión de la semilla; una vez determinada la cantidad de semillas con cambio de coloración se determinó el porcentaje de semillas viables con respecto a las semillas que no presentaron coloración (Cuevas et al., 2012).

6.11.2 Prueba directa de toxicidad aguda en suelo

La prueba consistió en un bioensayo, en el que se expusieron directamente, durante 14 días, semillas de trigo al suelo contaminado, determinando si éste inhibía o no la germinación de dichas semillas, registrando el crecimiento de la plántula, para lo cual se utilizó una regla, midiendo la longitud del hipocótilo, la radícula y la producción de biomasa utilizando una balanza analítica, finalmente los datos registrados fueron comparados con las semillas sembradas en el control negativo (suelo limpio) (Cuevas et al., 2012). Para esto, se elaboraron 5 ensayos con diferentes características, como se muestra a continuación:

- I. Suelo problema con la concentración original de hidrocarburos (sin tratamiento).
- II. Suelo contaminado después del tratamiento de biorremediación, tratado con la cepa M1H5.
- III. Suelo contaminado después del tratamiento de biorremediación, tratado con la cepa HBG.
- IV. Suelo no contaminado (control negativo).
- V. Suelo limpio con ácido bórico (control positivo).

En la figura 6.11, se pueden observar 4 de los 5 ensayos ya descritos, los cuales son el control negativo, el control positivo, el suelo con la concentración original de HTP y el suelo después del tratamiento con la cepa M1H5.

Para cada uno de los ensayos el suelo fue previamente secado a temperatura ambiente, triturado en mortero y tamizado utilizando un tamiz # 10, para después preparar 15 bolsas de plástico, en las cuales se agregaron: 7 gramos del suelo, 1 semilla de trigo y 3 mL de agua destilada. Este diseño se aplicó a los 5 ensayos ya mencionados, llevándose a cabo por triplicado. Posteriormente, los ensayos se colocaron en una cámara oscura a una temperatura de 22 ± 2 °C hasta que el 65 % de las semillas del control negativo germinaron. Después de este periodo las plántulas se mantuvieron bajo un régimen de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, agregando 1 mL de agua destilada cada tercer día a cada ensayo, hasta completar el experimento. Una vez alcanzado el porcentaje de crecimiento del control negativo, se determinaron los parámetros de producción de biomasa pesando las plántulas del trigo y la elongación midiendo el tallo y la raíz.

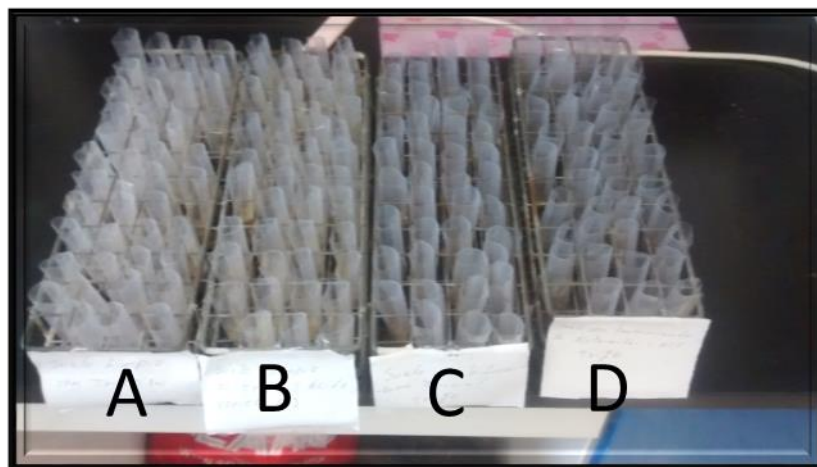


Figura 6.11 Prueba de toxicidad aguda del suelo, (A) Control negativo, (B) Control positivo, (C) El suelo con la concentración original de HTP y (D) El suelo después del tratamiento con la cepa M1H5.

CAPÍTULO 7.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Determinación cualitativa de la actividad ligninolítica de lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa

En las pruebas cualitativas en cajas Petri, la cepa HBG tuvo una respuesta positiva para las enzimas MnP y Lac, en la prueba de MnP se presentaron pequeños puntos negros en el medio sólido, lo cual confirma la actividad de esta enzima, en la prueba de Lac la característica principal es la formación de un halo verde alrededor de la cepa debido a la reacción del ABTS con la enzima, como se puede ver en la figura 7.1A, Las dos respuestas positivas las reporta Steffen y colaboradores (2000).

Las cepas HBC9, HBC7 y M1H5 dieron positivo para la enzima LiP, esto se puede comprobar en la figura 7.1B, donde se puede observar un halo producto de la decoloración del azul de metileno alrededor de la cepa, como resultado de la degradación del colorante azul de metileno debido a la actividad de esta enzima.

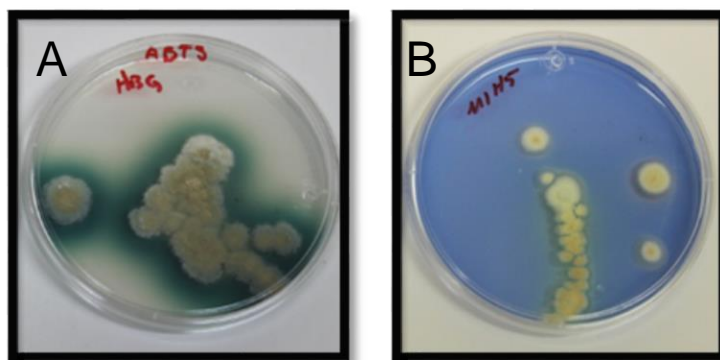


Figura 7.1 Respuesta positiva para la prueba cualitativa de la actividad ligninolítica de. A Lac, halo verde, B LiP decoloración.

En la prueba de LiP los resultados fueron negativos con la cepa HBG. Las cepas HBC9, HBC7 y M1H5 no mostraron resultados positivos para la actividad de Lac y MnP (Tabla 7.1).

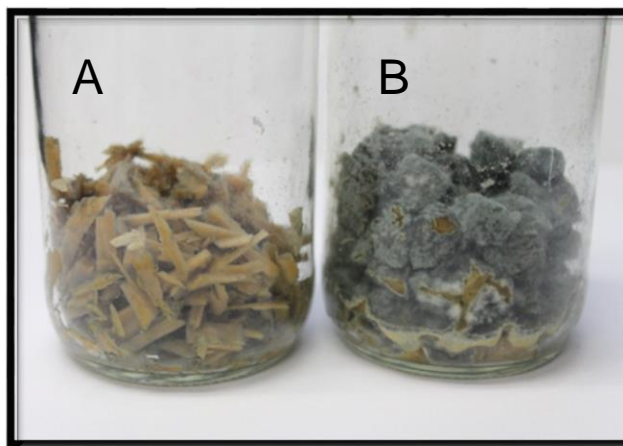
Tabla 7.1 Resultados de la prueba cualitativa de actividad ligninolítica para cada cepa.

CEPA	Lac	MnP	LiP
HBC7	-	-	+
HBC9	-	-	+
HBG	+	+	-
M1H5	-	-	+

(+) Positivo, (-) Negativo

7.2 Evaluación de los soportes lignocelulósicos

Se observó que las cepas tuvieron un mayor crecimiento, en menor tiempo usando al olote como soporte. Como se puede observar en la figura 7.2, la cepa HBG invadió por completo el olote, lo que representa una mayor cantidad de biomasa al momento de iniciar la biorremediación del suelo. No obstante que, aunque también hubo crecimiento de las cepas crecidas en la madera, éste no fue comparable con el desarrollado observado en el olote.

**Figura 7.2** Reactores con la cepa HBG crecida en los dos soportes madera (A) y olote (B).

De acuerdo a los resultados anteriores, se seleccionó al olote como soporte, debido al buen desarrollo de los hongos sobre él.

7.3 Determinación cuantitativa de la actividad ligninolítica de lacasa, manganeso peroxidasa y lignina peroxidasa

7.3.1 Determinación de la actividad ligninolítica de lacasa

La cepa HBG fue la única que presentó actividad enzimática de Lac, confirmando la prueba cualitativa utilizando el olote como soporte, como se muestra en la figura 7.3A, donde se puede observar la coloración verde en algunos de los pocillos de la placa, los cuales corresponden a la reacción de la enzima con el ABTS. Las cepas HBC9, HBC7 y M1H5 no mostraron actividad ligninolítica para la enzima Lac en ninguno de los soportes. La actividad ligninolítica se reporta como actividad relativa entre las cuatro cepas fúngicas, es decir se comparan con la cepa que presente mayor actividad para cada enzima, como se muestra en la figura 7.3B donde se parecía que la cepa HBG es la única que presenta una respuesta significativa, la cual es producto de la actividad de la enzima.

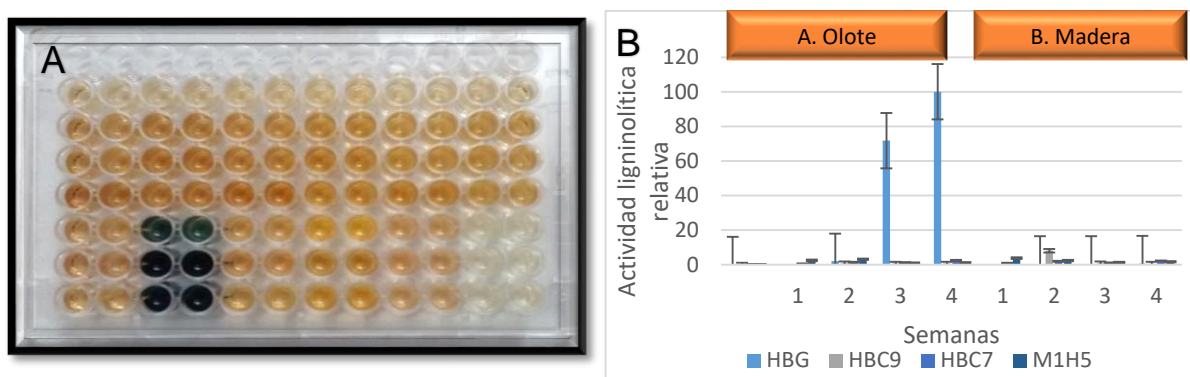


Figura 7.3 Actividad relativa de Lac. (A) Micro placa con 96 pozos y la reacción positiva a Lac. (B) Representación de la actividad ligninolítica probando ambos soportes para las 4 cepas.

7.3.2 Determinación de la actividad ligninolítica de manganeso peroxidasa

En la prueba para MnP la cepa HBG crecida en madera como soporte, presentó la mejor actividad de esta enzima en la segunda semana de incubación, sin embargo, no fue así en la tercera y cuarta semana. En comparación con la misma cepa crecida en olote, se observó un aumento de la actividad ligninolítica entre la segunda y

tercera semana del 38 %, y en la 4 semana de incubación el aumento fue del 11.8 % con respecto a la tercera semana de incubación.

La cepa HBC9, presentó actividad ligninolítica para esta enzima con ambos soportes en la segunda semana de haber sido incubados. Sin embargo, en la tercera y cuarta semana la actividad ligninolítica disminuyó un 52 % de la actividad total de la enzima. Con la cepa M1H5 sólo se observó actividad ligninolítica en el olote en la tercera semana de inoculación, con la madera se observó actividad ligninolítica a partir de la segunda a la cuarta semana de haber sido inoculada. Sin embargo, esta actividad no es comparable con la actividad de la cepa HBG.

Por último, la cepa HBC7 tuvo actividad ligninolítica con el olote en la segunda semana de desarrollo, en la tercera disminuyó un 19 %. Con la madera se observó el incremento de la actividad ligninolítica, a partir de la segunda a la cuarta semana de crecimiento. Actividad que no es comparable con la cepa HBG (Figura 7.4).

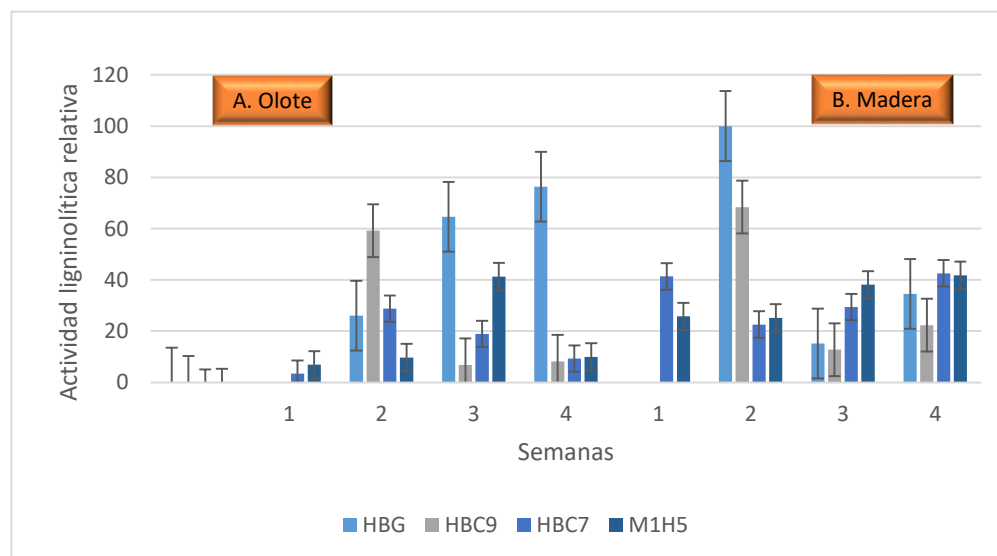


Figura 7.4 Actividad relativa para la MnP, probando las 4 cepas en los dos soportes, respectivamente.

Como se observa en la figura 7.4 se hace una comparación de la actividad relativa, donde la cepa HBG, teniendo al olote como soporte, muestra un aumento de la actividad durante el periodo de incubación.

7.3.1 Determinación de la actividad ligninolítica de lignina peroxidasa

Las cepas que presentaron actividad ligninolítica de LiP fueron HBC7, HBC9 y M1H5, confirmando la prueba cualitativa. La cepa HBG no presentó actividad para esta enzima con ninguno de los soportes.

Se observó que la cepa HBC7 mostró la mayor actividad en la última semana de incubación con olote, sin embargo, su comportamiento durante todo el periodo de muestreo no fue constante ya que se observó actividad en la segunda semana de crecimiento, pero disminuyó un 17 % en la tercera semana.

Con la madera, se observó una actividad ligninolítica menor en comparación con el olote. La cepa M1H5 mostró un aumento de la actividad ligninolítica con el olote del 50 % desde la primera hasta la tercera semana de crecimiento y en la cuarta semana se aprecia una disminución del 21 % de la actividad enzimática. Con la madera se observó el 72 % de la actividad ligninolítica en la tercera semana de crecimiento. No obstante, en la primera, segunda y cuarta semana solo se observó el 19 % de la actividad como máximo, (Figura 7.5).

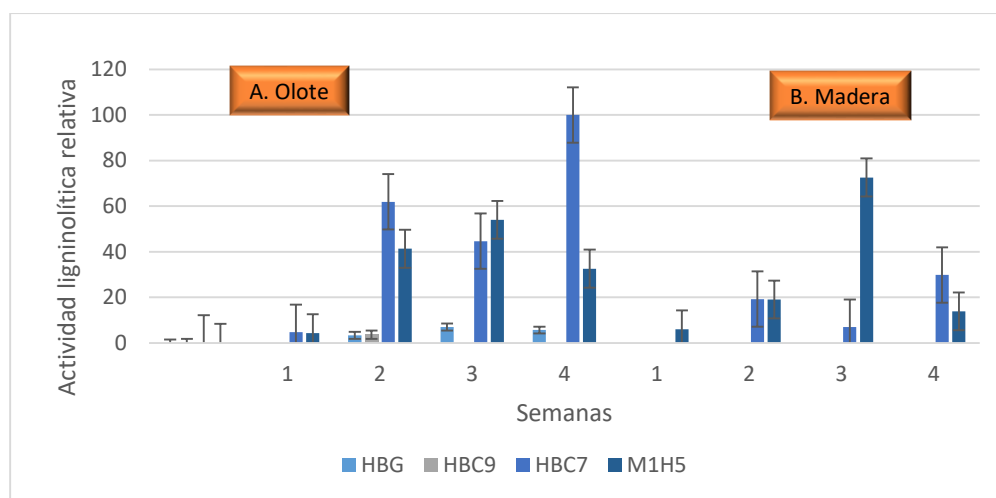


Figura 7.5 Actividad relativa para la LiP, probando las 4 cepas en los dos soportes, respectivamente.

Con base a los resultados obtenidos se eligieron las cepas HBG y M1H5 para ser usadas en el proceso de biorremediación.

7.4 Caracterización fisicoquímica del suelo

Con base en la norma NOM-021-SEMARNAT-2000 se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica del suelo, ver tabla 7.2. De igual forma, se reporta el contenido de humedad por el método Dean–Stark descrito en la metodología. La concentración de hidrocarburos fue determinada por gravimetría.

Tabla 7.2 Caracterización y clasificación del suelo de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000.

Características fisicoquímicas	Método	Resultado	Clasificación
Humedad (%)	AS-05	7.0 ± 0.6	
Humedad (%)	Dean-Stark	6.0 ± 0.1	
pH	AS-02	8.1 ± 0.05	Medianamente alcalino
Nitrógeno total (%)	AS-25	1.8 ± 0.6	Muy alto
Nitrógeno inorgánico (ppm)	AS-08	5.2 ± 0.4	Muy bajo
Materia orgánica (%)	AS-07	1.0 ± 0.02	Bajo
Fósforo $\frac{\text{mg P}}{\text{Kg de suelo}}$	AS-10	8.5 ± 0.04	Medio
Capacidad de retención del agua $\frac{\text{ml}}{\text{g}}$		0.6 ± 0.04	
Concentración de hidrocarburos (ppm)		59605 ± 54	

El suelo presentó un pH medianamente alcalino, la humedad se determinó por dos métodos ya que en el método por secado (AS-05) quedan involucrados los hidrocarburos presentes en el suelo, por lo que también se determinó por el método Dean–Stark.

Se cuantificó un porcentaje muy alto en nitrógeno total y en cuanto al nitrógeno inorgánico se clasificó como muy bajo, el contenido de fósforo en el suelo se reporta como una concentración media, además se clasificó con un contenido bajo en materia orgánica.

La capacidad de retención del agua fue utilizada para determinar la cantidad de agua agregada en los tratamientos de bioestimulación.

La concentración de hidrocarburos totales en el suelo se ajustó a 59,605 ppm con el propósito de obtener una mayor concentración debido a que la concentración original era muy baja. La norma NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en el suelo, (Tabla 7.3), (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2012).

Tabla 7.3 Límites máximos permisibles de hidrocarburos en el suelo.

Fracción de hidrocarburos	Uso de suelo predominante (mg/kg base seca)		
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación	Residencial y recreativo	Industrial y comercial
Ligera	200	200	500
Media	1,200	1,200	5,000
Pesada	3,000	3,000	6,000

Con esta información se determinó que el suelo con la concentración ajustada es casi 12 veces mayor que el límite máximo permisible en la fracción media de hidrocarburos, correspondiente a un suelo de uso industrial.

7.5 Biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos

Las cepas HBG y M1H5 fueron seleccionadas para el proceso de biorremediación junto con el olote.

La cepa HBG tuvo un buen crecimiento en el soporte antes de ser utilizada en el tratamiento, cuando ésta se agregó al suelo, fue mezclada hasta estar totalmente homogénea, posteriormente se monitoreó visualmente el crecimiento, durante las dos primeras semanas, después de este tiempo ya no se observó más desarrollo de la cepa en el suelo, ver las imágenes A y B de la figura 7.6, en donde se puede observar el crecimiento de la cepa en la primera semana del tratamiento (A), y después de 6 semanas no se puede observar el mismo crecimiento que en la primera semana (B).

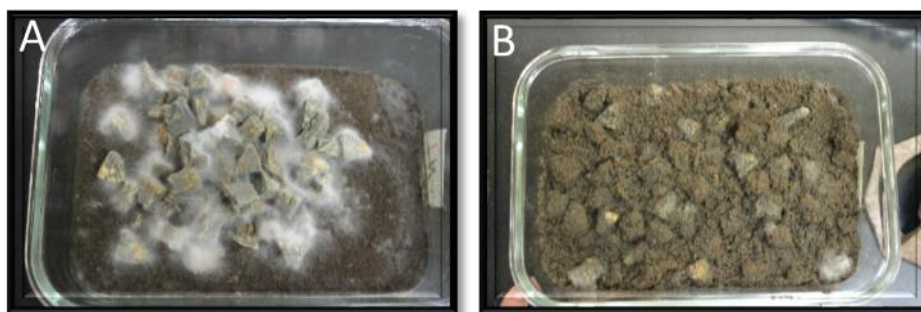


Figura 7.6 (A) Primera semana del proceso de biorremediación con la cepa HBG en donde se observa el crecimiento de la cepa, (B) 6 semanas después del tratamiento, el crecimiento ya no es evidente.

En la figura 7.7 se muestran los resultados del proceso de biorremediación utilizando la cepa HBG durante 6 semanas. Los tratamientos marcados como HBG-C/N, HBG-S/N y HBG-mezcla, tuvieron la mayor remoción durante las dos primeras semanas de tratamiento. Se tomó la decisión de terminar con el proceso de biorremediación en la sexta semana debido a que ya no se pudo observar crecimiento de la cepa en el suelo y la concentración de HTP permaneció constante, por lo que se repitió el experimento.

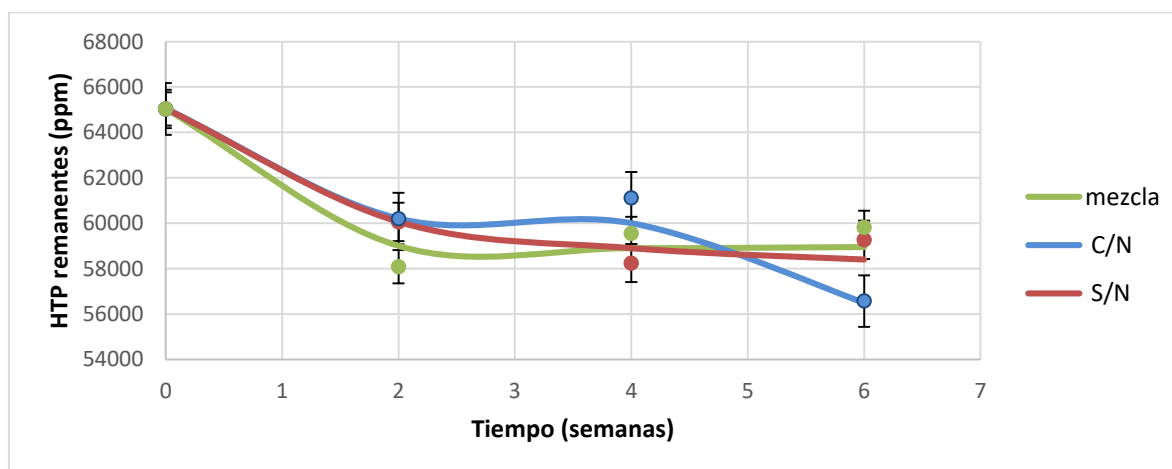


Figura 7.7 Hidrocarburos remanentes en el proceso de remoción de HTP con la cepa HBG.

Se analizaron los puntos de la gráfica de remoción final entre los distintos tratamientos, para determinar si los puntos son estadísticamente iguales entre ellos, utilizando el método de comparación de medias muestrales descritas en la metodología con $P = 0.05$, 4 grados de libertad y un valor crítico $t = 2.78$ (Tabla 7.4).

Tabla 7.4 Comparación de las medias muestrales para los puntos finales de los tratamientos C/N y S/N de la figura 7.7.

	Medias	DS	S ²	s	t	Interpretación
HBG-C/N	56,572	343	294,122	542	6.094	Estadísticamente diferentes
HBG-S/N	59,270	686				

En la tabla 7.4 se observa que el efecto de la bioestimulación si aumentó el porcentaje de degradación, ya que las concentraciones finales de los reactores HBG-C/N y HBG-S/N son estadísticamente diferentes.

Los porcentajes de remoción de hidrocarburo se pueden observar en la tabla 7.5, donde el reactor con el tratamiento HBG-C/N obtuvo el mayor porcentaje de remoción con el 13 ± 0.5 %, seguido por el reactor HBG-S/N con 8.9 ± 1.3 % y finalmente el reactor HBG-mezcla con 8 ± 1 %.

Tabla 7.5 Porcentaje de remoción de HTP.

	HBG-C/N	HBG-S/N	HBG-mezcla
Porcentaje de remoción (%)	13 ± 0.5	8.9 ± 1.3	8.0 ± 1

Como se mencionó en la metodología con respecto al cambio en el diseño experimental en la segunda prueba, los dos nuevos biorreactores que se prepararon fueron el blanco (Figura 7.8) y el estéril (Figura 7.9). El crecimiento de la cepa, al igual que en la primera prueba, fue poco evidente en todos los tratamientos.

En el tratamiento blanco se observó el crecimiento de un hongo sobre el soporte y el suelo como se observa en las figuras 7.8 y 7.10. Esto nos indica la presencia de microorganismos nativos en el suelo capaces de desarrollarse en presencia de los HTP, estos microorganismos también son capaces de remover dicho contaminante, como se demostrará más adelante.

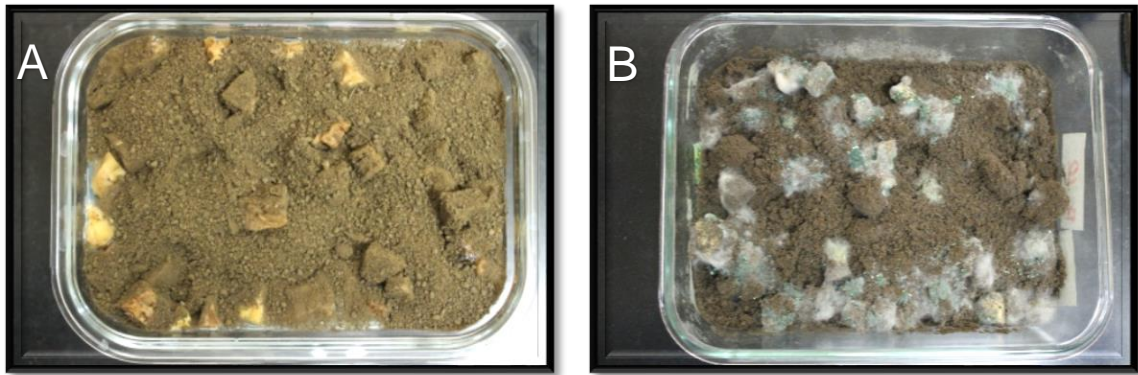


Figura 7.8 Biorreactor blanco (suelo no estéril con el soporte), (A) en la primera semana de la biorremediación, (B) en la semana 8 del tratamiento.

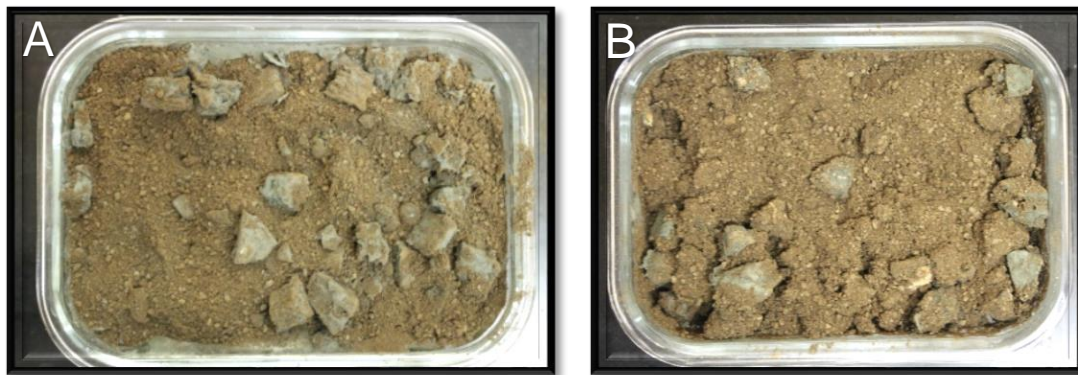


Figura 7.9 Biorreactores con suelo estéril y la cepa HBG, (A) en la primera semana del tratamiento, (B) en la semana 8 del tratamiento.



Figura 7.10 Hongo blanco crecido en soporte en el biorreactor blanco.

Analizando los resultados del proceso de biorremediación durante las 8 semanas de tratamiento (Figura 7.11), el biorreactor HBG-C/N presentó la mayor remoción de HTP en las primeras dos semanas del tratamiento, siendo éste el tratamiento que logró la mayor remoción del contaminante.

El biorreactor HBG-S/N al igual que el anterior obtuvo la mayor remoción de HTP en las primeras dos semanas de tratamiento, después de este periodo la concentración del HTP permaneció constante. El blanco removió la mayor concentración del contaminante hasta la cuarta semana, después de este tiempo la concentración permaneció constante. Esto confirmó que los organismos autóctonos son capaces de remover a los HTP.

El biorreactor marcado como HBG-estéril no mostró remoción en las ocho semanas de tratamiento, por lo que se decidió repetir una vez más el experimento para corroborar los dos resultados anteriores.

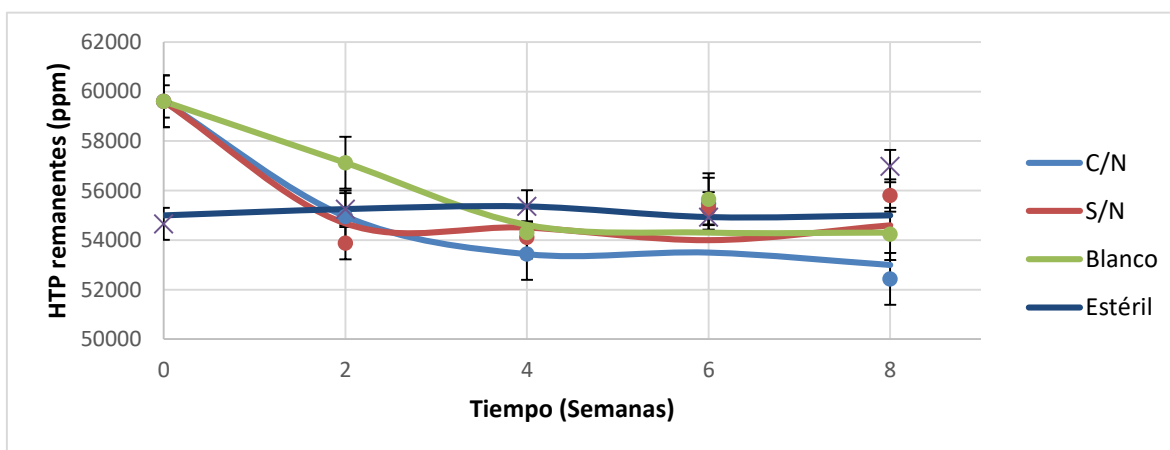


Figura 7.11 Hidrocarburos remanentes en la segunda prueba de remoción de HTP con la cepa HBG.

De la misma manera que el ensayo anterior, se analizaron los puntos finales de los distintos tratamientos de remoción mostrados en la tabla 7.6, para determinar si los puntos son estadísticamente iguales entre ellos, utilizando el método de comparación de medias muestrales con una $P=0.05$, 4 grados de libertad y un valor crítico $t = 2.78$.

Tabla 7.6 Comparación de las medias muestrales para los puntos críticos en la figura 7.11.

	Medias	DS	S ²	s	t	Interpretación
HBG-C/N Blanco	52,433	1,511	1,163,731	1,079	2.060	Estadísticamente iguales
	54,248	213				
HBG-C/N S/N	52,433	1511	1,279,828	1,131	3.647	Estadísticamente diferentes
	55,802	527				
Blanco S/N	54,248	213	161,631	402	4.735	Estadísticamente diferentes
	55,802	527				

En la tabla anterior se puede observar que el tratamiento HBG-C/N y blanco en la última semana del tratamiento, estadísticamente las concentraciones son iguales, esto nos indica que el tratamiento con bioestimulación y el blanco degradaron el hidrocarburo con la misma eficiencia. Comparando el tratamiento HBG-C/N y HBG-S/N la adición de nutrientes si mejoró la eficiencia en la degradación del contaminante con respecto al ensayo, donde no se agregaron nutrientes.

Los porcentajes de remoción se pueden observar en la tabla 7.7. El reactor HBG-C/N obtuvo el mayor porcentaje de remoción del contaminante con el $12 \pm 2.5 \%$, el reactor blanco obtuvo el $9 \pm 0.3 \%$ de remoción, es importante mencionar que se debe tener en cuenta el análisis estadístico de la tabla 7.6, el reactor HBG-S/N fue capaz de remover el $6.4 \pm 0.8 \%$ del contaminante, finalmente el reactor HBG-estéril no removió los HTP.

Tabla 7.7 Porcentaje de remoción de HTP.

	HBG-C/N	HBG-S/N	Blanco	HBG-Estéril
Porcentaje de remoción (%)	12.0 ± 2.5	6.4 ± 0.8	9.0 ± 0.3	0.0 ± 0.9

En esta tercera prueba con la cepa HBG se observa una vez más que durante las dos primeras semanas el crecimiento de la cepa es evidente, después de este tiempo el crecimiento de la cepa disminuye, lo cual dificulta que se pueda observar.

En los resultados mostrados en la figura 7.12 se observa que los biorreactores HBG-C/N, HBG-S/N y blanco tienen la mayor remoción del contaminante en las primeras

dos semanas de tratamiento, después de este tiempo la concentración de HTP se mantuvo constante hasta la octava semana. En el caso de los biorreactores marcados como HBG-estéril, se demostró que la cepa HBG si remueve los HTP ya que en las primeras dos semanas obtuvo la mayor remoción del contaminante, después de este tiempo las concentraciones de los HTP permanecieron constantes.

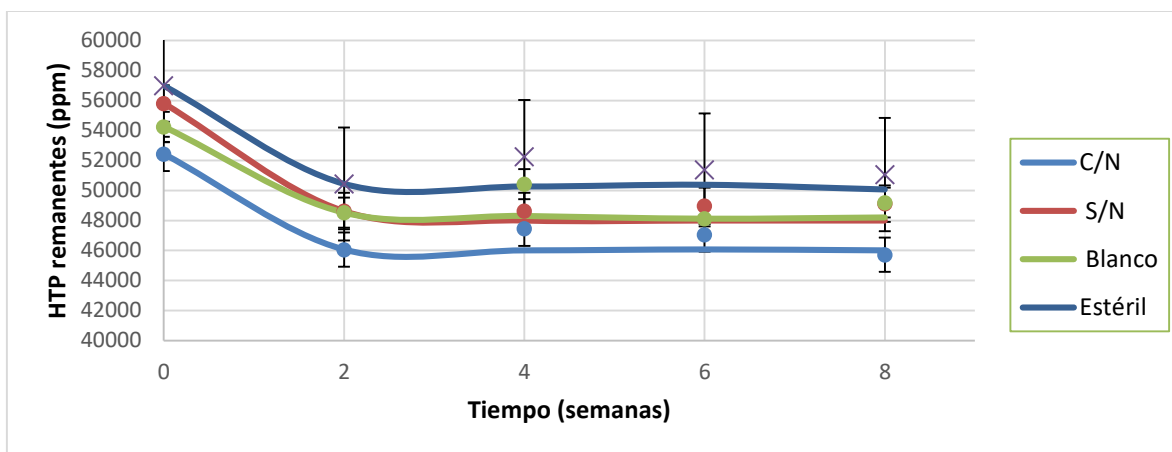


Figura 7.12 Hidrocarburos remanentes en la tercera prueba de remoción de HTP con la cepa HBG.

Se analizaron los puntos de remoción mostrados en la figura 7.12, para determinar si los puntos son estadísticamente iguales entre ellos, para lo cual se utilizó el método de comparación de medias muestrales con una $P = 0.05$, 4 grados de libertad y un valor crítico $t = 2.78$.

Tabla 7.8 Comparación de las medias muestrales para los puntos críticos de la figura 7.13.

	Medias	DS	S ²	s	t	Interpretación
HBG-C/N	45,708	1,636	1,340,311	1,158	3.619	Estadísticamente diferentes
HBG-S/N	49,129	56				

En la tabla 7.8 se comparan las concentraciones finales de los tratamientos HBG-C/N y HBG-S/N, en donde las concentraciones finales de ambos tratamientos son estadísticamente diferentes, por lo que la adición de nutrientes si influyó en la eficiencia de remoción de los HTP.

En la tabla 7.9 se confirma que el tratamiento HBG-C/N removió la mayor cantidad del contaminante siendo de 12.8 ± 3 %, el tratamiento HBG-S/N removió el 12 ± 0.09 % del contaminante, el reactor marcado como blanco removió un 9.3 ± 3 % de HTP por parte de los microorganismos autóctonos del suelo, ya por último el reactor marcado como HBG-estéril removió el 10.4 ± 0.9 % de HTP lo que confirma la remoción del contaminante por la cepa HBG.

Tabla 7.9 Porcentaje de remoción de HTP.

	HBG-C/N	HBG-S/N	Blanco	HBG-Estéril
Porcentaje de remoción (%)	12.8 ± 3	12.0 ± 0.09	9.3 ± 3	10.4 ± 0.9

Los resultados de los tres ensayos indicaron que la cepa HBG no pudo adaptarse en su totalidad al suelo, suponemos que se debió a la competencia entre los organismos nativos y la cepa HBG, sin embargo, si hubo remoción del contaminante. Los cuatro tipos de biorreactores presentaron el mismo comportamiento en las tres pruebas, la mayor degradación de hidrocarburos se presenta en las dos primeras semanas del tratamiento de biorremediación, después de este tiempo la concentración del contaminante permanece constante. También se observó que la adición de nutrientes si influye en la eficiencia de remoción de los HTP.

De forma paralela se evaluó la cepa M1H5, donde de acuerdo a la figura 7.13A se puede observar un buen crecimiento de la cepa en el soporte. Una vez mezclado con el suelo, aparentemente no se observó un buen desarrollo fenotípico en el mismo, figura 7.13B, sin embargo, se pudo constatar la colonización de la cepa sobre el suelo.

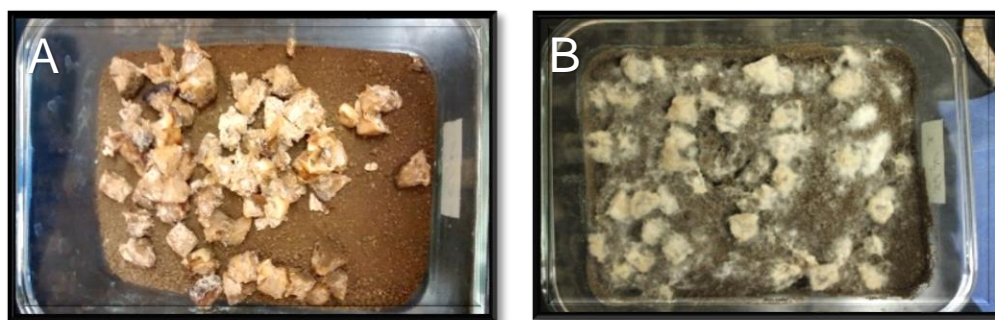


Figura 7.13 Crecimiento de la cepa M1H5 en el soporte (A) y en mezcla con el suelo (B).

Cabe resaltar, que se pudo observar el crecimiento de cepas autóctonas del suelo sobre el soporte en el reactor etiquetado como blanco, además que se comprobó que estos microorganismos también pueden remover los hidrocarburos presentes en el suelo, (Figura 7.14).



Figura 7.14 Cepas autóctonas creciendo en el soporte.

En la figura 7.15 se pueden observar los resultados del proceso de biorremediación con la cepa M1H5 durante las 8 semanas de remoción. Los tratamientos marcados M1H5-C/N y M1H5-S/N tuvieron la mayor remoción durante las dos primeras semanas de tratamiento, en las siguientes seis semanas la remoción de hidrocarburo disminuyó, sin embargo, se demostró que en la octava semana las cepas seguían removiendo hidrocarburo.

Un aspecto importante a observar, es la muestra marcada como blanco (suelo con el soporte), ya que evidencia la remoción del hidrocarburo por los microorganismos autóctonos del suelo. Ya por último la unidad marcada como M1H5-estéril (suelo

estéril con la cepa M1H5) tuvo la mayor remoción entre la segunda y la cuarta semana del tratamiento.

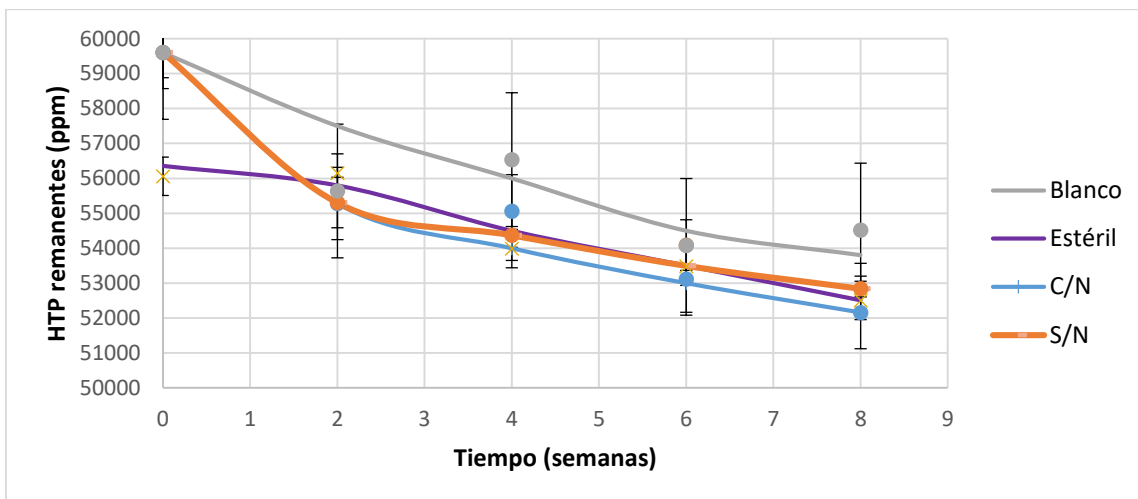


Figura 7.15 Hidrocarburos remanentes en el proceso de biorremediación con la cepa M1H5.

Con la tabla 7.10, se comprueba en el caso de la cepa M1H5, que al final del tratamiento de biorremediación las concentraciones finales son estadísticamente iguales, por lo tanto, la bioestimulación no influyó en la eficiencia de la degradación de los HTP.

Tabla 7.10 Comparación de las medias muestrales para los puntos críticos de la figura 7.15.

	Medias	DS	S ²	s	t	Interpretación
M1H5-C/N	52,161	1,547	1,844,573	1,358	0.615	Estadísticamente iguales
M1H5-S/N	52,843	1,139				
M1H5-C/N	52,161	1,547	1,246,804	1,117	2.590	Estadísticamente iguales
Blanco	54,522	319				

Los porcentajes de remoción de hidrocarburo se pueden ver en la tabla 7.11, donde el tratamiento M1H5-C/N obtuvo el mayor porcentaje de remoción con el 12.5 ± 2.5 % seguido por el tratamiento M1H5-S/N con 11.3 ± 1.9 %, el blanco con 8.5 ± 0.5 % y finalmente el ensayo M1H5-estéril con 6.3 ± 1.1 % de remoción.

Tabla 7.11 Porcentaje de remoción de HTP

	M1H5-C/N	M1H5-S/N	Blanco	M1H5-Estéril
Porcentaje de remoción (%)	12.5 ± 2.5	11.3 ± 1.9	8.5 ± 0.5	6.3 ± 1.1

De igual manera se analizó el olate para determinar la cantidad de HTP que pudo quedar retenido en el soporte debido a algún proceso de sorción (Figura 7.16). Se encontró que en la prueba con la cepa M1H5 el soporte sorbió 155.8 mg de HTP, lo que representa el 0.54 % de la concentración original presente en el suelo, en la prueba con la cepa HBG el soporte sorbió 106.7 mg de HTP, esto representa el 0.49% de la concentración original presente en el suelo. Este resultado indica que la sorción del soporte es mínima, por lo que la mayoría del hidrocarburo removido en las dos pruebas fue por las cepas y los microorganismos presentes en el suelo.

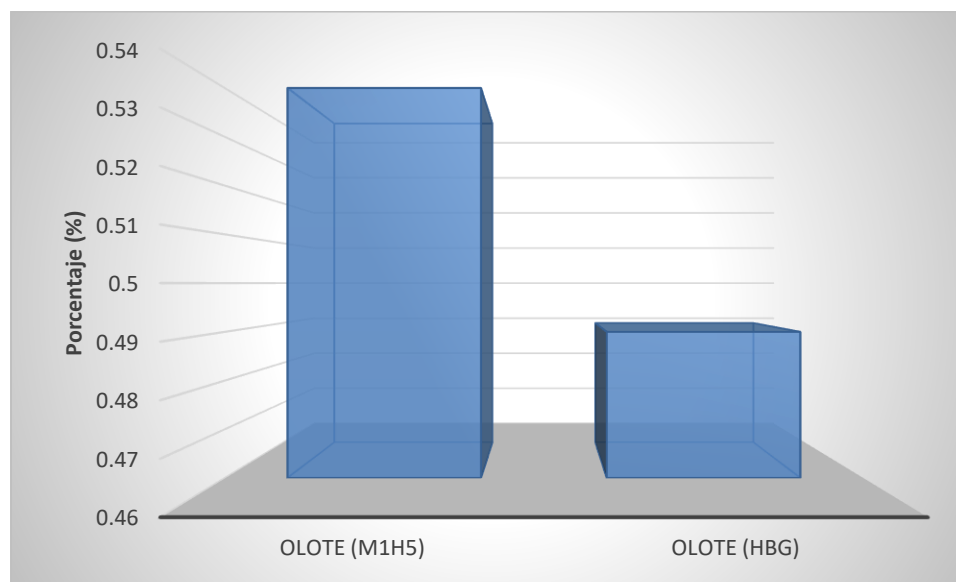


Figura 7.16 Porcentaje de sorción de los HTP por el soporte para las cepas M1H5 y HBG.

7.6 Evaluación de la toxicidad en el suelo

7.6.1 Prueba de viabilidad

La prueba de viabilidad se aplicó a semillas del trigo, donde se observó la coloración de las semillas con un color rojo tenue. Donde el porcentaje de viabilidad fue del 86 %, este porcentaje fue válido para iniciar la prueba de toxicidad aguda en el suelo (Cuevas et al., 2012).

7.6.2 Prueba directa de toxicidad aguda en el suelo

Las semillas se sembraron y se mantuvieron a 22 °C en obscuridad, hasta que el 65 % de las semillas germinaron en el control negativo, esto ocurrió al tercer día de haber sido sembradas. Se observó un efecto de inhibición de la germinación en el suelo con la concentración de inicial de HTP, ya que las semillas de trigo germinaron hasta el quinto día, en comparación con el suelo negativo, ya que estas semillas germinaron al tercer día de ser plantadas (Figura 7.17). Los suelos que fueron tratados con las cepas M1H5 y HBG disminuyeron el efecto tóxico de los HTP en la germinación, ya que se observaron las plántulas al tercer día de haber sido sembradas. Sin embargo, al término del tiempo de valoración se observó que existió un mayor número de semillas germinadas en el suelo con la concentración original de HTP y con el tratamiento de la cepa HBG. El porcentaje de germinación es el siguiente:

- ✓ Suelo control negativo 57.8 ± 10.1 % de semillas germinadas.
- ✓ Suelo con la concentración original de HTP 88.9 ± 3.8 % de semillas germinadas.
- ✓ Suelo con HTP después del tratamiento con la cepa M1H5 55.6 ± 13 % de semillas germinadas.
- ✓ Suelo con HTP después del tratamiento con la cepa HBG 95.6 ± 7.7 % de semillas germinadas.

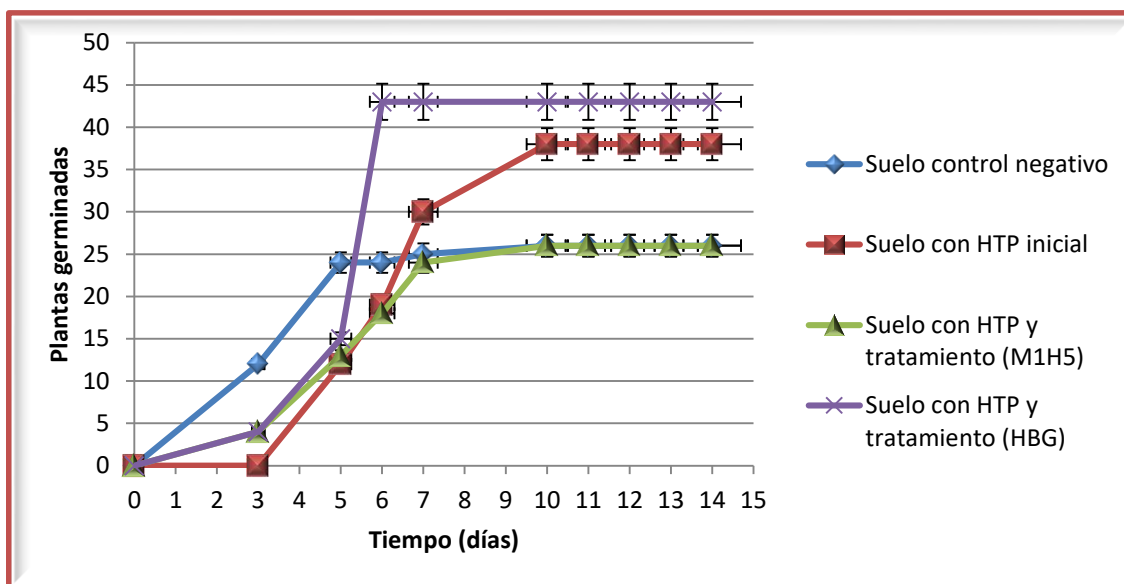


Figura 7.17 Número de plantas germinadas durante 14 días.

Durante el crecimiento de las plántulas, se observó un color amarillento en los tallos durante el periodo de crecimiento en la obscuridad, después de este periodo se colocaron en un régimen de dieciséis horas de luz y ocho horas de obscuridad, como lo indica la metodología durante un periodo de 11 días, en este tiempo el color del tallo cambio de amarillo a verde, además que no se observó ningún tipo de necrosis u otro efecto negativo en los tallos a excepción del crecimiento.

Se determinó que hubo un efecto de inhibición sobre el crecimiento del tallo sembrado en el suelo con la concentración inicial de HTP (Figura 7.18), ya que trascurrido el periodo de crecimiento, las plántulas fueron medidas y se observó una diferencia en la longitud de las mismas. De la misma forma se observó que el tratamiento al que fue sometido el suelo contaminado con ambas cepas disminuyó al efecto de inhibición del crecimiento de la plántula como se puede ver en la figura 7.19, ya que estas presentaron un mayor crecimiento.

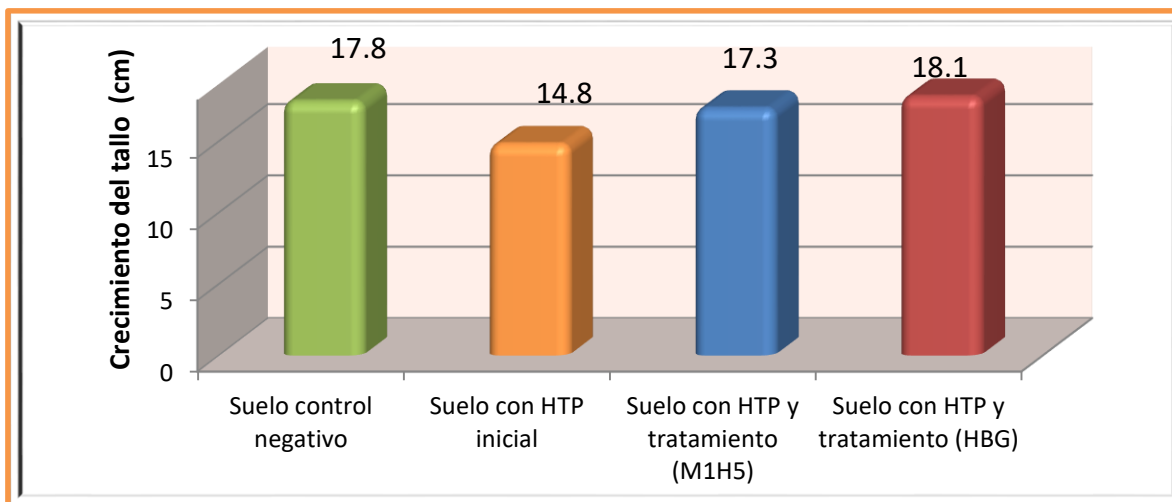


Figura 7.18 Crecimiento de tallo del trigo en 14 días.

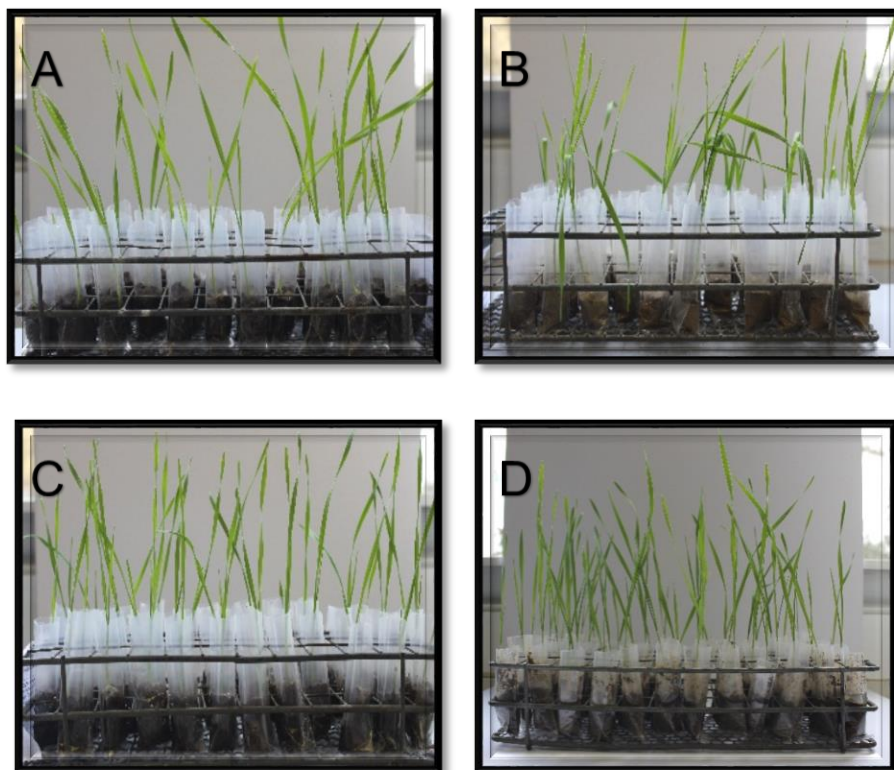


Figura 7.19 Crecimiento de las plántulas del trigo. (A) Suelo limpio, (B) suelo con la concentración inicial de hidrocarburo, (C) suelo con hidrocarburo y el tratamiento de remediación (M1H5), y (D) suelo con hidrocarburo y el tratamiento de remediación (HBG).

De igual manera las características de la raíz cambiaron significativamente en el suelo con HTP. Al observar las raíces del trigo en el control negativo, éstas eran delgadas y cortas, caso contrario a las raíces del suelo con hidrocarburo, ya que eran más largas y mucho más gruesas como se puede ver en las figuras 7.20 y 7.21. Esto se puede relacionar con la degradación de los hidrocarburos por parte de la planta, la cual pudo aprovechar el carbono contenido en el hidrocarburo como fuente de energía y como consecuencia sus raíces crecieron más grandes y fuertes.

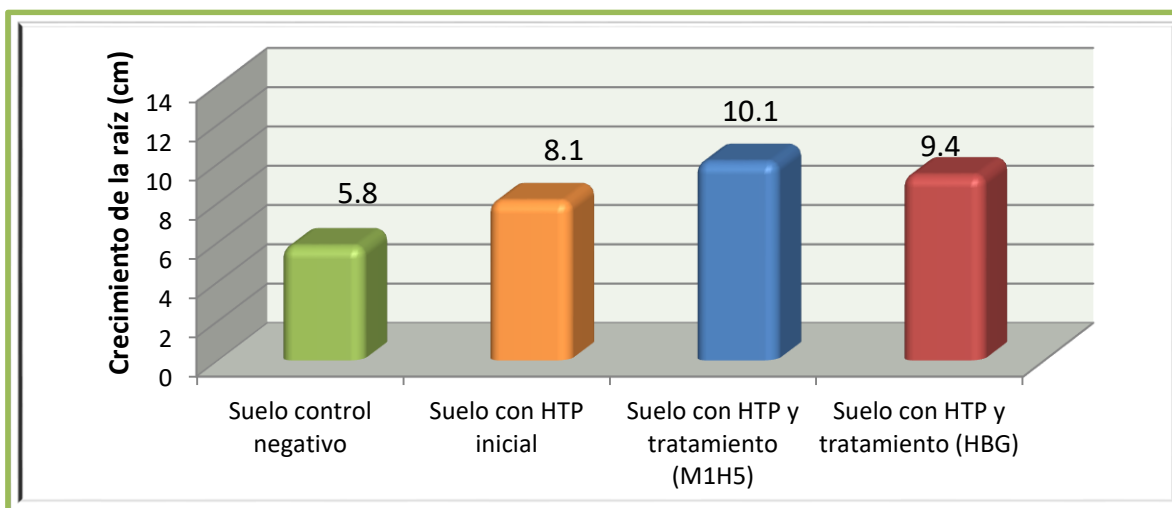


Figura 7.20 Crecimiento de la raíz del trigo en 14 días.

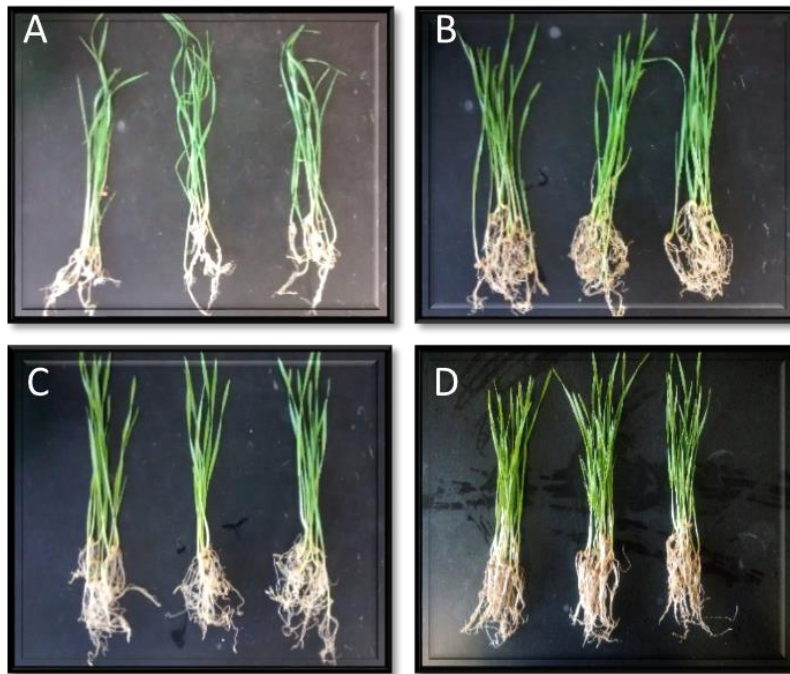


Figura 7.21 Plántulas del trigo sembradas en el suelo, (A) control negativo, (B) suelo con la concentración inicial de HTP, (C) suelo después de la biorremediación con la cepa M1H5 y (D) suelo después de la Biorremediación con la cepa HBG.

En la figura 7.22 se observa la producción de biomasa generada por la plántula de trigo. Aparentemente la mayor producción de biomasa se presentó con el tratamiento de biorremediación, sin embargo se aplica la prueba estadística de ANOVA de un factor y Tukey, para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre la producción de biomosas.

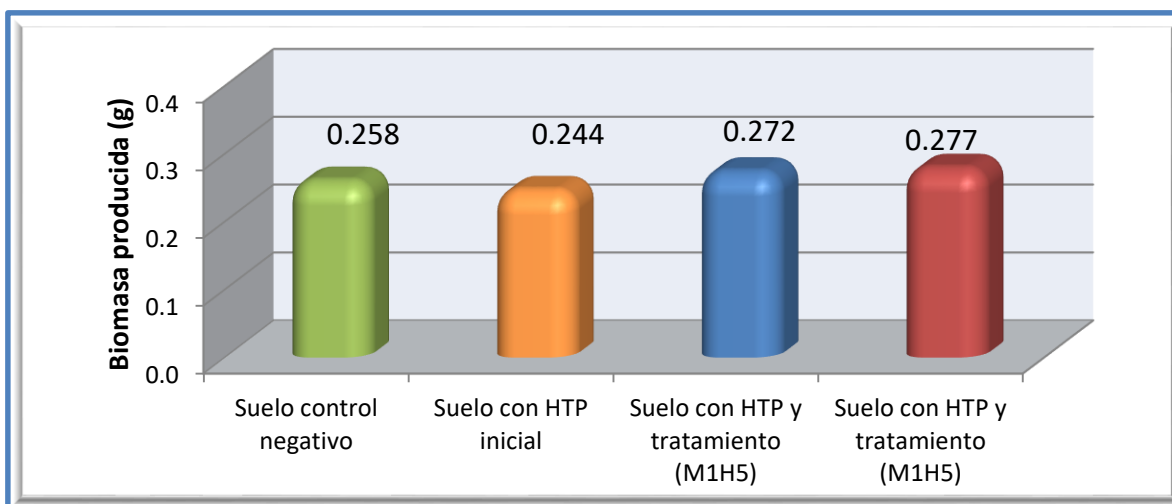


Figura 7.22 Producción de biomasa del trigo en 14 días.

Se realizó la prueba de ANOVA con un factor y un nivel de significancia del 0.05. Se propone la hipótesis nula como, H_0 = las producciones de biomasa en los 4 grupos son estadísticamente iguales con un 95 % de confiabilidad. Y la hipótesis alternativa como H_i = la producción de biomasa en al menos un grupo es diferente con un 95 % de confiabilidad (Tabla 7.12).

Tabla 7.12 Prueba ANOVA con un nivel de significancia del 0.05

ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0693	11	0.0063	1.88	0.0470	1.86
Dentro de los grupos	0.4036	121	0.0033			
Total	0.4730	132				

Tabla 7.13 Determinación de la HSD

Diferencia honestamente significativa (HSD)	0.063
Multiplicador (de tablas Tukey) ($Q\alpha$)	3.63
Cuadrado del error medio (MSe)	0.003
Tamaño de la muestra de cada uno de los grupos	11

Tabla 7.14 Resultados de Tukey

	Suelo limpio	Suelo con HTP	Suelo con tratamiento M1H5	Suelo con tratamiento HBG
Suelo limpio	0.0	0.014	0.014	0.019
Suelo con HTP	0.014	0.0	0.027	0.033
Suelo con tratamiento M1H5	0.014	0.027	0.0	0.005
Suelo con tratamiento HBG	0.019	0.33	0.005	0.0

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 7.13 para la determinación de la HSD, se construyó la tabla 7.14 donde se muestran los resultados de Tukey. La diferencia entre los 4 grupos no fue mayor a la diferencia honestamente significativa de 0.063, por lo que se acepta la hipótesis nula, la producción de biomasa en los 4 grupos son estadísticamente iguales.

Los resultados de la evaluación de la toxicidad en el suelo dieron la información necesaria para suponer que hubo una remoción de los hidrocarburos derivado de un proceso de fitorremediación al sembrar las semillas de trigo, por lo que se determinó la concentración de hidrocarburos en los suelos donde crecieron las plántulas, como se aprecia en la figura 7.23. El trigo removió 7.2 ± 0.6 % de los HTP en el suelo con la concentración inicial, 11 ± 0.3 % en el suelo con tratamiento de biorremediación y la cepa M1H5 y 2.7 ± 0.3 % en el suelo con tratamiento y la cepa HBG.

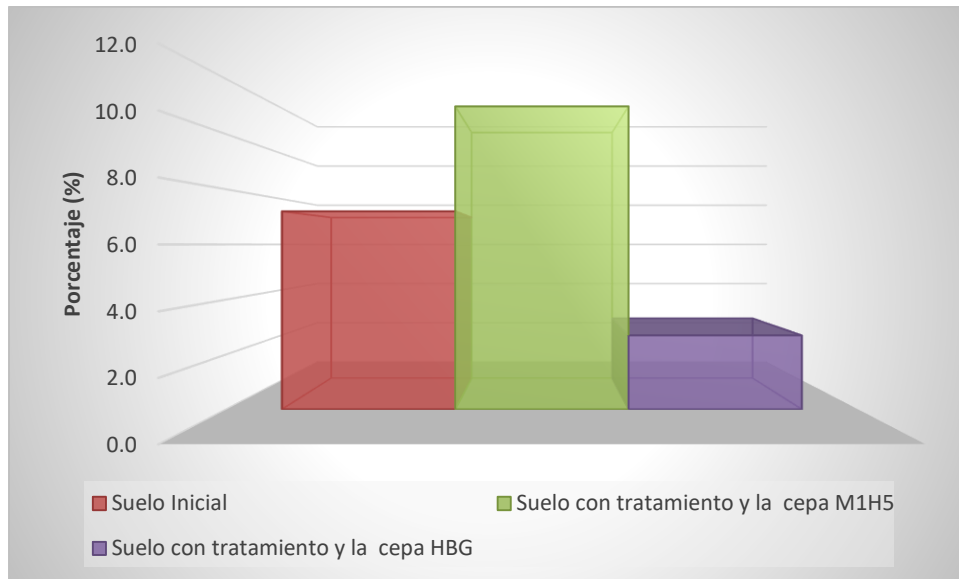


Figura 7.23 Fitorremediación del suelo con la semilla del trigo.

Con este último resultado se da por terminada toda la parte experimental de esta tesis.

CONCLUSIONES

Se observó que utilizando olote como soporte, hubo un mejor desarrollo de las cuatro cepas evaluadas, por lo que éste fue utilizado en el proceso de biorremediación.

En cuanto a las pruebas cualitativas de la actividad enzimática se observó que la cepa HBG puede producir las enzimas Lac y MnP. Por otra parte, las cepas HBC9, HBC7 y M1H5 demostraron que pueden producir de la enzima LiP.

En cuanto a los reactores marcados como blanco, se observó el crecimiento de cepas fúngicas nativas capaces de remover una fracción de los HTP. En los reactores con tratamiento se encontró que: la cepa HBG en el reactor con suelo estéril fue capaz de remover el hidrocarburo, cabe resaltar que sólo se desarrolló en las primeras dos semanas de haber sido inoculada, de manera similar se observó que la cepa M1H5 fue capaz de colonizar el suelo contaminado, la mayor remoción de HTP sucedió durante las dos primeras semanas del tratamiento, además que fue capaz de remover los hidrocarburos presentes en el suelo estéril.

Así mismo, en los biorreactores con la adición de nutrientes ambas cepas HBG y M1H5 removieron la mayor cantidad de HTP en comparación con los biorreactores que no se bioestimularon. Un factor común que se observó en todos los ensayos fue que la mayor degradación de HTP se realizó en las primeras 2 semanas del tratamiento, esto se puede deber a que las cepas al ser especies no nativas del suelo, no pudieron acoplarse en su totalidad a las características fisicoquímicas y biológicas del suelo.

Por otra parte, al realizar la prueba de viabilidad, el lote de semillas de trigo tuvo una viabilidad del 86 %. Las semillas sembradas en el suelo con concentración inicial de HTP, fueron inhibidas en su germinación durante 1 día.

El mayor porcentaje de semillas germinadas fue en el suelo con tratamiento de biorremediación con la cepa HBG. Sin embargo, el tallo del trigo presentó inhibición en su crecimiento en el suelo con la concentración inicial de hidrocarburos. Esta inhibición disminuyó con el tratamiento de biorremediación con las cepas M1H5 y HBG.

El proceso de biorremediación disminuyó el efecto tóxico de los HTP sobre el crecimiento radicular del trigo. Cabe resaltar que, el mayor crecimiento de la raíz se presentó con el suelo sometido al tratamiento de biorremediación y el suelo con la concentración inicial del hidrocarburo, las raíces más pequeñas se observaron en el suelo limpio, esto se debe a que las plántulas fueron capaces de aprovechar la fuente de carbono del hidrocarburo, lo que provocó que las raíces crecieran más fuertes y grandes.

La generación de biomasa fue estadísticamente idéntica en los 4 casos. Mientras que las plantas de trigo fueron capaces de remover una fracción de los hidrocarburos presentes en el suelo.

REFERENCIAS

- Acevedo F., Pizzul L., Castillo M. P., Cuevas R., Diez M. C. (2011). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracophyllum discolor*. *Journal of Hazardous Materials*. 185: 212-219.
- Adam G., H. Duncan. (2002). Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ. Pollution*. 120: 363-370.
- Arora D. S., Gill P. K. (2001). Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme and microbial technology*. 28: 602-605.
- Bautista Zúñiga F. (1999) Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados vol. 1. Universidad Autónoma de Yucatán Mérida, Yucatán México, p. 22-29.
- Bárcenas Pazos G. M., Ríos-Villa R., Aguirre-Rivera J. R., Juárez-Flores B. I., Honorato-Salazar J. A. (2008). Composición química y densidad básica relativa de la madera de dos especies arbustivas de encino blanco de la Sierra de Álvarez, SLP, México. *Madera y Bosques*. 14: 81-94.
- Bernabé Santiago R., Ávila-Calderón L. E. A., Rutiaga-Quiñones J. G. (2013). Componentes químicos de la madera de cinco especies de pino del municipio de Morelia, Michoacán. *Madera y Bosques*. 19: 21-35.
- Briseño Meneses, M. (2012). Aplicación de hongos degradadores de madera para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Proyecto Terminal en Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, México.
- Briseño Vega V. (2016). Estimulación del crecimiento microbiano durante la remediación de un suelo contaminado con hidrocarburos. Proyecto Terminal en Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, México.
- Castaños Núñez A. (2013). Remediación de un suelo contaminado con hidrocarburos mediante la técnica de bioaumentación. Proyecto Terminal en
-

Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, México.

Call H.P., Mücke I. (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems. *Journal of Biotechnology*. 53: 163-202.

Córdoba J. A., Salcedo E., Rodríguez R., Zamora J. F., Manríquez R., Contreras H., Robledo J., Delgado E. (2013). Caracterización y valoración química del olote: degradación hidrotérmica bajo condiciones subcríticas. *Revista latinoamericana de química*. 41: 171-184.

Cruz Colín M. R., Cuevas-Díaz M. C., Sánchez-Díaz L. F., Rodríguez-Sena J., Alamina-Neyra G., Castañeda-Briones M. T., Ávila-Jiménez M., García-Franco F. (2011). Perfil microbiano durante el proceso de composteo de hidrocarburos adicionando residuos de caña de azúcar. 20 Conferencia de Química. Cuba.

Cuevas Díaz M. C., Espinosa-Reyes G., Llizaliturri-Hernández C. A., Mendoza Cantú A. (2012). Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos. 1ª Ed. INE-Semarnat, p. 87-102.

Dirección general de sanidad y protección agropecuaria y forestal (SARH) (1988). Manual de métodos analíticos de formulaciones de plaguicidas. 1ª Ed. Misceláneas.

Fernández Linares L. C., Rojas-Avelizapa N. G., Roldán-Carrillo T. G., Ramírez-Islas M. E., Zegarra-Martínez H. G., Uribe-Hernández R., Reyes-Ávila R. J., Flores-Hernández D, Arce-Ortega J. M (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados, 1ª Ed. Instituto Mexicano del Petróleo, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, p. 88-112.

Gan S., Lau E.V., Ng H.K. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*, 172: 532-549.

- García Oduardo N., Bermúdez-Savón R. C., Téllez-Suarez I., Chávez-Toledano M., Perraud Gaime I. (2017). Enzimas lacasa en inóculos de *Pleurotus spp.* Tecnología Química, 37: 33-39.
- Guérin T. F. (2000). The differential removal of aged polycyclic aromatic hydrocarbons from soil during bioremediation. Environmental science and pollution research, 7: 19-26.
- Guzmán A. M. C. (2007). La contaminación de suelos y aguas. su prevención con nuevas sustancias naturales. 1ª Ed: Secretariado de publicaciones de la Universidad de Sevilla, p. 22-45.
- Harvey J. P., Christopher T. F. (2001). The biochemistry of ligninolytic fungi. 1ª Ed. G.M.Gadd, p. 27-51.
- Henry J. G., Heinke G. W. (1999). Ingeniería Ambiental. 2ª Ed. Pearson Education, p 70-78.
- Hernández Valencia I., Lárez L.M., García J. V. (2017). Evaluación de la toxicidad de un suelo contaminado con diferentes tipos de crudos sobre la germinación de dos pastos tropicales. Bioagro. 29. 73-82.
- Instituto de Ciencias Agrarias. Propiedades físicas del suelo: la capacidad de retención de agua. España. Recuperado el 5 de marzo de 2017, de www.ciudadciencia.es/doc/files/agricultura%20sostenible%20en%20el%20aula/FICHA_PROPIEDADES_CC.pdf.
- Iriondo M. H. (2014). Introducción a la Geología 3ª Ed. Brujas, p 57-70
- Jacques R. J. S., Okeke B. C., Bento F. M., Teixeira A. S., Peralba M. C. R., Camargo F. A. O. (2008). Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. Bioresource Technology, 99: 2637-2643.
- Juárez Díaz O. G. (2014). Estudio del efecto del pH en la degradación de hidrocarburos en suelos con hongos. Proyecto Terminal en Ingeniería

- Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, México.
- Kapich A. N., Prior B.A., Botha A., Galkin S., Lundell T., Hatakka A. (2003). Effect of lignocellulose-containing substrates on production of *ligninolytic peroxidases* in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. *Enzyme and microbial technology*, 34: 187-195.
- Kubicek C. P. (2012). *Fungi and Lignocellulosic Biomass*. 1ª Ed. Wiley-Blackwell, 30-45.
- Kudanga T., Nyanhongo G. S., Guebitz G.M., Burton S. (2011). Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 48: 195-208.
- Kuppusamy S., Thavamani P., Venkateswarlu K., Lee Y. B., Naidu R., Megharaj M. (2017). Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere*, 168: 944-968.
- Lifshitz M., Sofer S., Gorodischer R. (2003). Hydrocarbon Poisoning in Children: A 5-Year Retrospective Study. *Wilderness & Environmental Medicine*, 14: 78-82.
- Marquez Badillo A. (2015). Estudio comparativo de la degradación de hidrocarburos en suelos realizada por microorganismos nativos. Proyecto Terminal en Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Azcapotzalco, México.
- Miller J. C., Miller J. N. (1993). *Estadística para química analítica*. 2ª Ed. Addison-Wesley Iberoamerica. p 40.
- Okere U. V., Semple K.T. (2011). Biodegradation of PAHs in 'Pristine' soils from different climatic regions *J. Bioremed. Biodegrad*, 1: 1-11.
- Parra Iglesias E. (2003). *Petróleo y gas natural: Industria, Mercados y Precios*. 1ª Ed. Akal, p 13-46.
-

- Pascual Valero J. A., Moreno-Casco J., Ros-Muños M., Vargas-García M. del C. (2015). De Residuo a Recurso, El Camino hacia la Sostenibilidad (Aspectos biológicos de la estabilización aeróbica II). 1ª Ed. Mundi-Prensa, p 51-112.
- Petróleos Mexicanos. (2016). Informe Anual 2015. México. 89-93.
- Petróleos Mexicanos. (2017). Informe Anual 2016. México. 82-83.
- Quintero Días, J. C. (2011). Degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. Facultad Nacional de Agronomía, 64: 5867-5882.
- Rivera Cruz, M. C., Trujillo-Narcía, A. (2004). Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. Interciencias, 29: 369-376.
- Salamanca M. J., Jiménez Tenorio N., Gonzáles de Canales M. L., DelValls T.A. (2008). Determinación de la toxicidad de un vertido de petróleo mediante el uso de bioensayos con el pez *Solea senegalensis*. Ciencias Marinas, 34: 339-348.
- San Sebastián M., Armstrong B., Stephens C. (2001). La salud de mujeres que viven cerca de pozos y estaciones de petróleo en la Amazonía Ecuatoriana. Rev. Panam salud pública, 9: 375-383.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. México D.F. Diario oficial de la Federación.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2012). Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012-2000. México D.F. Diario oficial de la Federación.
- Silgado H. A., Tardón, D. A. (2011). Biología y Geología. Madrid, 1ª Ed, Secretaría General Técnica, p. 46-65.
- Soleimani M., Afyuni M., Hajabbasi M., Nourbakhsh F., Sabzalian M., Christensen J. H. (2010). Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. Chemosphere, 81: 1084-1090.

- Steffen K. T., Hofrichter M., Hatakka A. (2000). Mineralisation of ^{14}C -labelled synthetic lignin and ligninolytic enzyme activities of litter-decomposing *basidiomycetous fungi*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 54: 819-825.
- Tien M., Kirk T. K. (1988). Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology*, 161: 238-248.
- Volke S. T., Velasco T. J. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. 1ª Ed. Instituto Nacional de Ecología, p. 27-51.
- Wan C., Li Y. (2012). Fungal Pretreatment lignocellulosic biomass. *Biotechnology Advances*, 30: 1447-1457.
- Wang C., Sun H., Li J., Li Y., Zhang Q. (2009). Actividad enzimática durante la degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos por el hongo de la pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* en suelos. *Chemosphere*, 77: 733-738.
- Wolfenden B. S., Wilson R. L. (1982). Radical cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline- 6 - sulphonate). *J. Chem. Soc*, 2: 805-812.
- Zafra G., Moreno-Montaña A., Absalón Á. E., Cortés Espinosa D. V. (2015). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environment Science and Pollution Research*, 22: 1034-1042.
-