DOI 10.24275/uama.6734.13927

Universidad Autónoma Metropolitana

Maestría en Ciencias e Ingeniería Ambientales

Biodegradación de hidrocarburos en suelo contaminado empleando bacterias del intestino del *Tenebrio molitor*

Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias e Ingeniería Ambientales
Presenta:

Ing. Marco Antonio Buñay Calle

_____

Dra. Mabel Vaca Mier
Directora de tesis

Dra. María Neftalí Rojas Valencia
Codirectora de tesis

Ciudad de Mexico, Julio de 2026

Resumen

En el presente estudio se evaluó la eficiencia de la bioaumentación en la degradación de hidrocarburos fracción pesada en un suelo contaminado, utilizando como tratamientos un control o testigo, bacterias hidrocarbonoclastas y bacterias del tracto digestivo de *Tenebrio molitor (T. molitor)*. Los resultados mostraron una disminución progresiva de la concentración del contaminante en todos los tratamientos a lo largo del tiempo; sin embargo, la magnitud de la remoción fue diferente entre ellos. El tratamiento testigo presentó una degradación limitada, atribuible a procesos de atenuación natural, mientras que los tratamientos bioaumentados evidenciaron una remoción significativamente mayor del contaminante.

El análisis estadístico confirmó diferencias significativas entre tratamientos, entre tiempos de muestreo y en la interacción tratamiento-tiempo, lo que demuestra que la eficiencia de degradación dependió tanto del tipo del inóculo empleado como del tiempo de incubación. La comparación múltiple de medias indicó que todos los tratamientos difirieron significativamente entre sí, destacando el tratamiento con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* como el más eficiente, seguido por el tratamiento con bacterias hidrocarbonoclastas.

Desde el punto de vista cinético, los tratamientos bioaumentados presentaron mayores constantes de degradación y menores tiempos de vida media y de remoción estimada del contaminante en comparación con el control. En particular, el tratamiento con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* mostró la mayor velocidad de biodegradación y el menor tiempo estimado para alcanzar altos niveles de remoción, lo que sugiere un alto potencial de este consorcio microbiano para aplicaciones de biorremediación.

En conjunto, los resultados obtenidos evidencian que la bioaumentación constituye una estrategia efectiva para acelerar la degradación de hidrocarburos fracción pesada en suelo contaminado, y que la microbiota asociada al tracto digestivo de *T. molitor* representa una alternativa particularmente prometedora para este tipo de procesos.

Dedicatoria

A mis padres, por ser el pilar de mi vida y enseñarme el valor del esfuerzo y la perseverancia. Su amor incondicional ha sido mi mayor motivación en cada paso de este camino.

A mis hermanos, por su apoyo constante, sus palabras de ánimo y por recordarme siempre la importancia de la unión.

Y a toda mi familia, por creer en mí y celebrar cada pequeño logro como si fuera un gran triunfo. Esta tesis es una prueba de que juntos, todo es posible.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti) por otorgarme la beca que hizo posible la realización de este proyecto. Su apoyo fue fundamental para alcanzar este logro académico.

A la Doctora Mabel Vaca Mier, por su guía inestimable, su paciencia y su dedicación a lo largo de este camino. Su experiencia y consejos fueron pilares fundamentales en el desarrollo de esta tesis.

A la Doctora María Neftalí Rojas Valencia, por su apoyo constante, su conocimiento y su compromiso para ayudarme a mejorar en cada etapa del trabajo. Su perspectiva enriqueció profundamente este proyecto.

Al equipo del Laboratorio de Calidad de Agua y Residuos, por su colaboración, conocimientos compartidos y por generar un entorno de trabajo tan enriquecedor. Su esfuerzo y compromiso fueron clave para superar los desafíos y avanzar en este proyecto.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento por haber confiado en mí y haber contribuido significativamente a este logro. Este trabajo no habría sido posible sin su valioso apoyo.

Contenido

..... 1

Resumen I

Dedicatoria..... II

Agradecimientos III

1. Introducción. 1

2. Marco teórico. 3

2.1. Contaminación por hidrocarburos. 3

2.2. Hidrocarburos en México. 4

2.3. Hidrocarburos en el ambiente. 7

2.3.1. Problemas a la salud de residuos aceitosos. 8

2.4. Tecnologías de remediación para suelos contaminados por TPH. 9

2.4.1. Biorremediación. 11

2.4.2. Mecanismos de biodegradación. 15

2.4.3. Factores para la degradación del contaminante. 15

2.5. *Tenebrio molitor*. 17

2.5.1 El ciclo de vida. 17

2.5.2. Temperatura y humedad ambiental. 19

2.5.3. Intensidad de la luz. 19

2.5.4. Alimentación o medio de crecimiento. 19

2.5.5. Enfermedades. 20

2.5.6. Mudas de piel. 20

3. Revisión del estado del arte. 20

3.1. La biodegradación. 23

4. Justificación. 25

5. Hipótesis. 25

6. Objetivos. 26

6.1. Objetivo general. 26

6.2. Objetivos específicos. 26

7. Desarrollo experimental. 26

7.1. Caracterización del suelo. 27

7.2. Inóculo de bacterias para la bioaumentación. 28

7.2.1. Adaptación al contaminante de las larvas de *T. molitor*. 28

7.2.2. Selección de larvas. 29

7.2.3. Aislamiento de bacterias del intestino de *T. molitor*. 29

7.2.4. Inoculo y bioaumentación con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor*. 29

7.3.1. Aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas del suelo contaminado. 31

7.3.2. Inoculo y bioaumentación con bacterias hidrocarbonoclastas del suelo contaminado. 31

8. Análisis y resultados. 33

8.1. caracterización del suelo. 33

8.2. Adaptación del *T. molitor*. 34

8.3. Cinética de crecimiento bacteriano para la bioaumentación. 38

8.4. Degradación de Hidrocarburos Fracción Pesada. 43

8.4.1. Degradación por atenuación natural. 43

8.4.2. Degradación por bioaumentación con bacterias Hidrocarbonoclastas. 44

9. Conclusiones. 50

10. Recomendaciones. 51

11. Referencias. 52

Anexo 1 63

Análisis estadístico 63

Concentración de HFP 63

Porcentaje de remoción 64

ANOVA entre tratamientos 65

Comparación de tratamientos (Prueba Tukey HSD) 67

Modelo cinético 69
Cálculo de la vida media de degradación 70
Comparación de velocidades de degradación 71
Tiempo para degradar el 90 % del contaminante (t_{90}) 73
Apéndice A 74
Tiempo de duplicación 75
Apéndice B 75
Aislamiento de Bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* 75
Apéndice C 77

Índice de figuras

Figura 01. Hidrocarburos totales de petróleo, persistencia y normatividad 6
Figura 02. Rutas de contaminación del suelo por TPH (Adaptada de Ambaye *et al*., 2022) . 8
Figura 03. Porcentaje de afinidad de TPH en gas, agua y suelo (Tomada de Ambaye *et al*., 2022) 9
Figura 04. Contaminante, insecto, mecanismo de degradación, producto final (Adaptado de Gwenzi *et al*., 2024) 13
Figura 05. Mecanismos de biodegradación y fases del proceso. 16
Figura 06. Ciclo de vida de *T. molitor*. 18
Figura 07. Biodegradación microbiana de contaminantes orgánicos 24
Figura 08. Obtención del inoculo de *T. molitor* 30
Figura 09. Obtención del inóculo hidrocarbonoclastas 32
Figura 10. Experimentación A 35
Figura 11. Hongos sobre *T. molitor*. en la experimentación A 35
Figura 12. Experimentación B, C y D 37

Figura 13. Crecimiento de hongos sobre *T. molitor* en la experimentación C y D 37
Figura 14. Disección de *T. molitor* 38
Figura 15. Cinética de crecimiento de bacterias hidrocarbonoclastas del suelo. A) se observó una línea oscura que es el hidrocarburo, B) Turbiedad al final de la experimentación..... 39
Figura 16. Cinética de crecimiento de bacterias del tracto digestivo del *T. molitor* A) se observó una línea oscura que es el hidrocarburo, B) Línea del hidrocarburo a los 14 días . 40
Figura 17. La imagen corresponde al *T. molitor*, A) Intestinos, B) crecimiento de bacterias C) Tinción de Gram 41
Figura 18. A) Suelo contaminado, B) Crecimiento de bacterias, C) Tinción de Gram 42
Figura 19. Tratamiento testigo, degradación del contaminante..... 43
Figura 20. Tratamiento con bacterias hidrocarbonoclastas, degradación de contaminante . 45
Figura 21. Tratamiento con bacterias del intestino de *T. molitor*, degradación contaminante 46
Figura 22. Concentración del contaminante en los tratamientos..... **¡Error! Marcador no definido.**
Figura 23. Eficiencia de remoción en cada tratamiento 48

Índice de Tablas

Tabla 01.- Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo (SEMARNAT) 7

Tabla 02. Métodos para la descontaminación de suelos con hidrocarburos 10

Tabla 03. Estudios relacionados con la biodegradación de contaminantes 21

Tabla 04. Caracterización inicial del suelo 27

Tabla 05. Resultado de la caracterización de las muestras de suelo 33

Tabla 06. Número de larvas vivas y muertas a t=0 días, t=24 días y % de mortalidad al final del ensayo 34

Tabla 07. Concentración de HFP (mg/kg) por tratamiento y muestreo 63

Tabla 08. Porcentaje de remoción de HFP respecto a concentración inicial 64

Tabla 09. ANOVA para la degradación de HFP 66

Tabla 10. Comparación múltiple entre tratamientos 68

Tabla11. Medias de concentración de HFP por tratamiento 68

Tabla 12. Parámetros cinéticos de biodegradación 70

Tabla 13 vida media 70

Tabla 14. Velocidad de degradación para cada tratamiento 72

Tabla 15. velocidad relativa de degradación 72

Tabla 16. Tiempo para degradar el 90 % del contaminante 73

Acrónimos

ANOVA	Análisis de Varianza
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
ASF	Auditoría Superior de la Federación
BTEX	Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xilenos
CL50	Concentración Letal Media
CESOP	Centro de Estudios Sociales y de Opinión Pública.
DL50	Dosis Letal Media
DL100	Dosis Letal 100
DOF	Diario Oficial de la Federación
EPA	Environmental Protection Agency
HAP	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
HFP	Hidrocarburos Fracción Pesada
NOM	Norma Oficial Mexicana
NOEL	Nivel Sin Efecto Observable
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
PEMEX	Petróleos Mexicanos
PROFEPA	Procuraduría Federal de Protección al Ambiente
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SSA	Secretaría de Salud
TPH	Total Petroleum Hydrocarbons
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

1. Introducción.

México se ubica entre los 19 países con mayores reservas de petróleo en el mundo en zonas terrestres, tanto en aguas profundas como en zonas someras de acuerdo con Petróleos Mexicanos (2024a). Las reservas probadas con base en la Comisión Nacional de Hidrocarburos (CNH, 2024) fue de 8,382.6 Miles de Millones de barriles. La producción de petróleo terrestre y marino a nivel nacional se concentra en los estados de Veracruz, Tamaulipas, Tabasco, San Luis Potosí, Puebla, Chiapas y Campeche. En el último reporte, la producción total de crudo alcanzó 1,646 Mbd (Miles de barriles por día), de los cuales 1,046 Mbd provienen de aguas territoriales. Campeche continúa siendo el estado con mayor producción marina, mientras que Tabasco registra 374 Mbd de producción terrestre, lo que la consolida como la región más productiva en este rubro. Veracruz aporta 169 Mbd, Chiapas 44 Mbd, Tamaulipas 5.8 Mbd, Puebla 3.7 Mbd y San Luis Potosí 0.16 Mbd. Estos datos confirman que las zonas con mayor extracción principalmente Campeche y Tabasco son también las más expuestas a procesos de contaminación por hidrocarburos en suelo (Petróleos Mexicanos, 2024b).

Los hidrocarburos son compuestos que alteran el equilibrio ecológico, su complejidad radica en su estructura química. Cuando un compuesto como el petróleo o alguno de sus derivados se derrama en el suelo, pueden darse distintos escenarios respecto a su destino. Por una parte, puede permanecer durante largos periodos sin sufrir modificaciones y, por otra, puede transformarse mediante procesos de fotooxidación, evaporación o acción microbiana, por mencionar algunos. Una de las formas de mitigar los daños es mediante el aprovechamiento de los microorganismos, que tienen la capacidad de degradar completamente las moléculas orgánicas en otras sustancias menos tóxicas, como gases, ácidos grasos y dióxido de carbono (Berzhanova *et al*., 2021). La biorremediación es un método biológico empleado en la biodegradación de hidrocarburos. Este método se basa en estimular la actividad degradativa de los microorganismos con el propósito de mineralizar los contaminantes o transformarlos

en compuestos químicos menos tóxicos. Entre las principales técnicas de biorremediación destacan:

Atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación. La última se realiza mediante la incorporación de microorganismos con capacidad para degradar el contaminante en el sistema (Berzhanova *et al*., 2021). Estos microorganismos se pueden aislar del área contaminada o de especies con capacidad para degradarlo, como los insectos.

Los insectos representan el conjunto de organismos con mayor diversidad en el planeta, dado que han conseguido ocupar prácticamente la totalidad de los nichos ecológicos. Para sobrevivir en hábitats variados y, en muchos casos, extremos, han desarrollado complejos sistemas biológicos y químicos cuyos componentes clave les permiten aprovechar una amplia gama de fuentes de nutrientes; los escarabajos de la corteza, la ambrosía y termitas, son capaces de alimentarse de madera o el *T. molitor* es capaz de degradar materiales derivados de los hidrocarburos como el plástico (Mika *et al*., 2013).

En la presente investigación se evaluó el proceso de bioaumentación en suelos afectados por hidrocarburos de fracción pesada (HFP), mediante la aplicación de bacterias hidrocarbonoclastas aisladas tanto del mismo suelo contaminado como de un consorcio bacteriano derivado del intestino de *T. molitor*. La eficacia de la bioaumentación se evaluó de acuerdo con los criterios establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales & Secretaría de Salud, 2013), además de considerar las tasas de remoción de los contaminantes. Antes de llevar a cabo la bioaumentación, se evaluó la influencia del hidrocarburo sobre las larvas. Posteriormente, se aisló el consorcio bacteriano presente en su tracto digestivo para emplearlo en el tratamiento; simultáneamente, se realizó el aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas aisladas a partir del suelo contaminado. Asimismo, mediante el uso de herramientas estadísticas, se desarrolló un modelo de crecimiento de las bacterias aisladas y se examinaron las diferencias significativas entre los diversos tratamientos, comparando la bioaumentación con bacterias del tracto digestivo de T. molitor y aquella realizada con bacterias hidrocarbonoclastas del suelo.

2. Marco teórico.

2.1. Contaminación por hidrocarburos.

La contaminación del suelo se define como la presencia de compuestos químicos o sustancias en concentraciones elevadas que producen efectos adversos sobre la biodiversidad, ocasionan la pérdida de la fertilidad del suelo y representan un riesgo para la salud humana, ya que alteran sus características físicas, químicas y biológicas (Rodríguez *et al*., 2019). Los contaminantes del suelo más comunes son: (Aqeel *et al*., 2014):

• Hidrocarburos del petróleo

• Metales pesados

• Plaguicidas

• Solventes

Para efectos del presente trabajo se enfocará en el primero del listado. La contaminación del suelo asociada a hidrocarburos representa una problemática que persiste a nivel global.

Los hidrocarburos totales del petróleo (TPH, por sus siglas en inglés) constituyen un término que se utiliza para describir un amplio conjunto de compuestos químicos derivados del crudo. Estos compuestos constituyen una mezcla de sustancias formadas principalmente por átomos de hidrógeno y carbono (ATSDR, 1999).

Entre las sustancias químicas que pueden encontrarse los hidrocarburos totales del petróleo se incluyen compuestos como el hexano, la naftalina, los xilenos, el tolueno, el benceno, los aceites minerales, los combustibles para aviones de reacción y el fluoreno, así como diversos componentes de la gasolina. No obstante, es común que las muestras de TPH contengan únicamente algunas de estas sustancias o bien una mezcla específica de ellas. (ATSDR, 1999).

Los TPH pueden incorporarse al ambiente a causa de accidentes, como consecuencia de actividades industriales o como subproductos derivados de su utilización en contextos

comerciales o domésticos. Algunas de sus fracciones tienen la capacidad de flotar sobre el agua y formar una película superficial, mientras que otras se depositan en los sedimentos del fondo (Ambaye *et al*., 2022). Ciertas fracciones pueden ser degradadas por bacterias y otros microorganismos presentes en el agua, mientras que otras se adsorben a las partículas del suelo, donde pueden persistir durante largos periodos (Sun *et al*., 2022).

Entre los principales efectos físicos que ejercen los hidrocarburos sobre el suelo se encuentran la disminución de la capacidad de campo y de la permeabilidad, lo que reduce la fertilidad y dificulta los procesos de rehabilitación del suelo. Los suelos con alto contenido de materia orgánica y textura arcillosa presentan una mayor capacidad de adsorción de hidrocarburos, lo que reduce su solubilidad y la presión de vapor efectiva debido a su distribución entre fases lipofílicas; esto conlleva una menor biodisponibilidad y movilidad del contaminante y, en consecuencia, una disminución de su toxicidad (Islam *et al*., 2018). En contraste, los suelos de textura arenosa retienen escasamente los hidrocarburos, incluso en presencia de materia orgánica, por lo que los efectos tóxicos suelen ser más severos (Labud *et al*., 2007).

Por otra parte, los crudos pesados y extrapesados presentan una menor capacidad de infiltración en suelos y sedimentos, quedando frecuentemente retenidos en las capas superficiales del suelo o en zonas costeras, donde actúan como una barrera física que limita el desarrollo de la vida vegetal y animal (Oudot *et al*., 1989).

2.2. Hidrocarburos en México.

Los TPH incluyen diferentes fracciones de compuestos; la fracción ligera consta de moléculas con entre 5 y 10 átomos de carbono, la fracción media entre 10 y 28 átomos de carbono y la fracción pesada posee de 28 a 40 átomos de carbono, estos últimos son los que se pretende degradar por medio de un proceso biológico de bioaumentación. Los hidrocarburos de peso molecular medio y elevado, dentro de los cuales se incluyen los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), presentan una naturaleza hidrofóbica y tienden a adsorberse en los suelos, lo que favorece su persistencia durante largos periodos. Los criterios de remediación o los niveles permitidos dependen de la normativa aplicable

vigente. Para identificar aquellos suelos que generan afectaciones al ambiente o al equilibrio ecológico, en la Tabla 01 se presentan los valores definidos por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, en la que se establecen los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos, así como los lineamientos para el muestreo en la caracterización y las especificaciones correspondientes para su remediación; un resumen de esta información se presenta en la Figura 01.

De acuerdo con los registros más recientes de las autoridades ambientales mexicanas, en el país se han identificado 1,142 sitios contaminados, de los cuales 1,065 (93.26 %) presentan contaminación por hidrocarburos. Estos sitios se originaron principalmente por derrames y fugas, que en conjunto, representan la causa mayoritaria de liberación de hidrocarburos al ambiente. Las actividades más frecuentemente asociadas a esta problemática son la extracción de petróleo y gas, el autotransporte de carga y la fabricación de productos derivados del petróleo; estos sectores concentran la mayor parte de los eventos registrados. Asimismo, la contaminación por hidrocarburos afecta superficies extensas de suelo, superando los 10.5 km^2, y grandes volúmenes de material impactado, lo cual evidencia la relevancia del problema y la necesidad de implementar estrategias efectivas de remediación ambiental a nivel nacional.

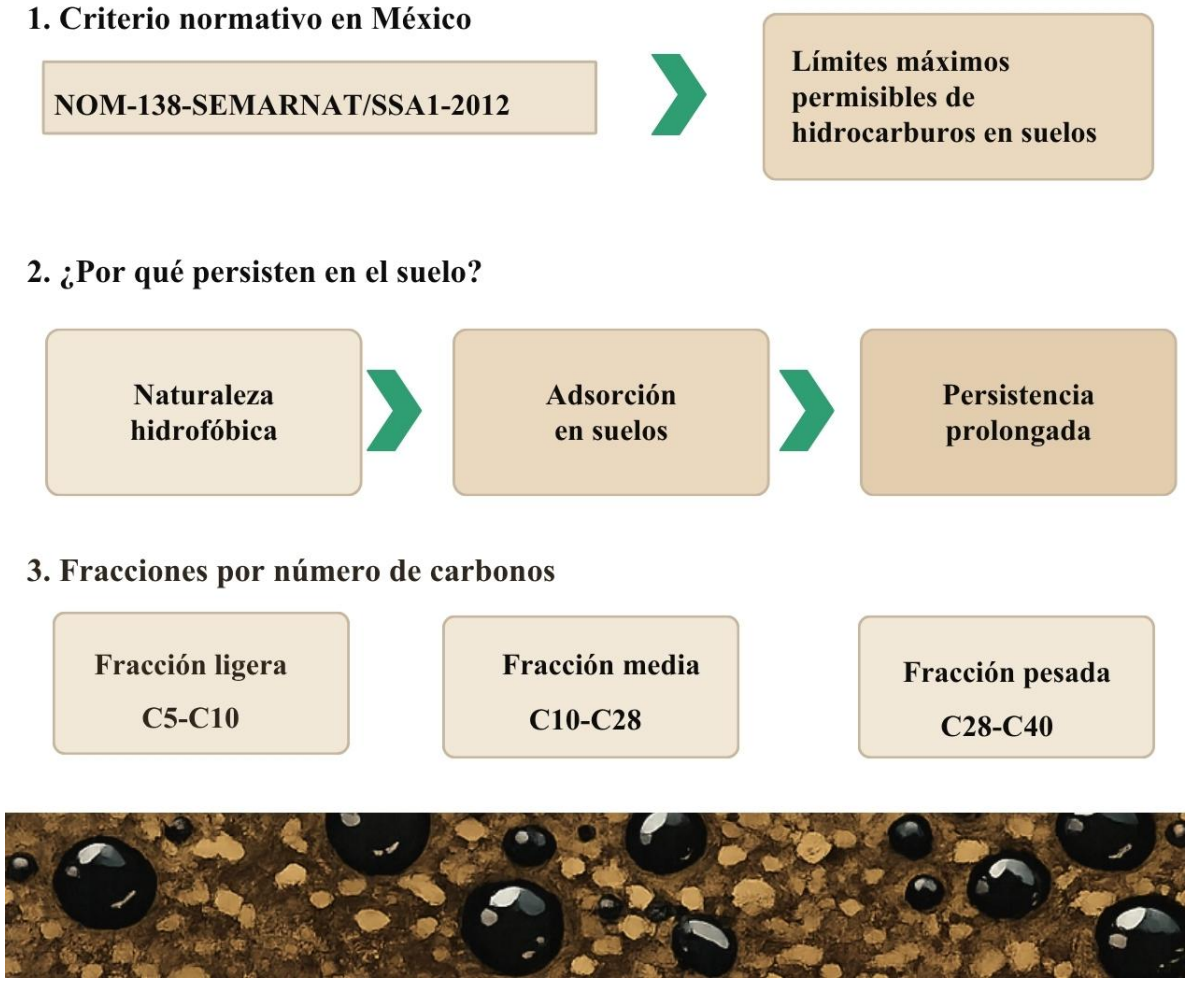

Figura 01. Hidrocarburos totales de petróleo, persistencia y normatividad.

Uno de los principales responsables de los derrames de hidrocarburos es Petróleos Mexicanos (PEMEX, 2024c). No obstante, de algún tiempo hacia acá, la extracción ilegal de combustible o también llamado "huachicoleo" aumentó (CESOP, 2017) y se convirtió en una de las causas de la contaminación de suelos por hidrocarburos en México; por ejemplo, en el 2017 fueron extraídos de manera ilegal 15,208 mb de hidrocarburos de los ductos de la petrolera mexicana (ASF, 2019b) y de estas extracciones, una fracción fue a parar a los suelos generando 1,641.62 hectáreas de suelos contaminados (PEMEX, 2024b).

El caso más reciente de contaminación por hidrocarburos en México para el 2026 corresponde a la presencia de hidrocarburos en el litoral del Golfo de México, con afectaciones reportadas en Tabasco, Veracruz y Tamaulipas, como posibles fuentes un

vertimiento ilegal y dos chapopoteras naturales; el acumulado oficial era de 785 toneladas en playa, 40.6 toneladas en el mar, con 39 playas, un manglar y un estero bajo atención (PEMEX, 2026d). Para su control se implementaron principalmente medidas de contención, limpieza, recuperación y monitoreo ambiental, más que un programa de remediación de largo plazo, por lo que se instalaron barreras de contención y cordones oleofílicos, se realizó la recuperación manual y mecánica del material contaminante, se realizó la disposición final de residuos y se usaron sistemas de dispersión en mar abierto, además de la vigilancia marítima, terrestre, aérea y satelital. Para el 3 de abril de 2026, se reportaban acciones en 48 playas, 2,000 metros de barreras de contención instalados, 475 recorridos en más de 630 kilómetros de costa y la recolección de 889,4 toneladas de hidrocarburo (PEMEX, 2026e).

Tabla 01.- Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo (SEMARNAT)

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

2.3. Hidrocarburos en el ambiente.

La biodegradación de los hidrocarburos ocurre de forma natural pero muy lentamente, lo que provoca resultados efectos adversos en áreas expuestas al contaminante, como riesgos potenciales elevados e impactos peligrosos en los seres humanos y otros organismos vivos que rodean el ecosistema terrestre (Ambaye *et al*., 2022). Además, Grifoni *et al*. (2020), así como Haider *et al*. (2021) han informado que la contaminación del suelo con hidrocarburos de petróleo altera las propiedades fisicoquímicas de la capa superior y las subcapas del suelo, presentando un impacto fitotóxico en la germinación de semillas y el crecimiento de los cultivos alterando su rendimiento.

Los TPH generalmente se liberan al ambiente a partir de la producción, el transporte, las operaciones de almacenamiento, el refinado, y el consumo, y posteriormente se trasladan al aire, al agua y al suelo, alterando el equilibrio ecológico. La ruta principal por la cual ingresan y contaminan el suelo se muestra en la Figura 02. Además, la propiedad de hidrofobicidad de varios TPH aumenta su porcentaje de afinidad por el agua, el aire y el suelo, como se muestra en la Figura 03 (Ambaye *et al*., 2022).

Los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) se caracterizan por presentar puntos de ebullición elevados y alto peso molecular, lo que se traduce en distintos grados de efecto toxicológico sobre el ambiente, la salud humana y la vida silvestre (Vandana *et al*., 2022).

Figura 02. Rutas de contaminación del suelo por TPH

2.3.1. Problemas para la salud de los residuos aceitosos.

Los países de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency, EPA) han reconocido y declarado que los residuos aceitosos son

materiales peligrosos debido a sus propiedades mutagénicas, cancerígenas y tóxicas (USEPA, 2004). La eliminación inadecuada de estos contaminantes puede causar la mutación o la muerte de plantas y animales (Poddar *et al*., 2019). Además, la acumulación de estos contaminantes en el ambiente representa un peligro para la salud humana, la vida acuática y disminuye la fertilidad del suelo (Poddar *et al*., 2019; Poi *et al*., 2017). Por lo tanto, los lodos ricos en hidrocarburos requieren un tratamiento eficaz y una eliminación adecuada para garantizar la seguridad ambiental.

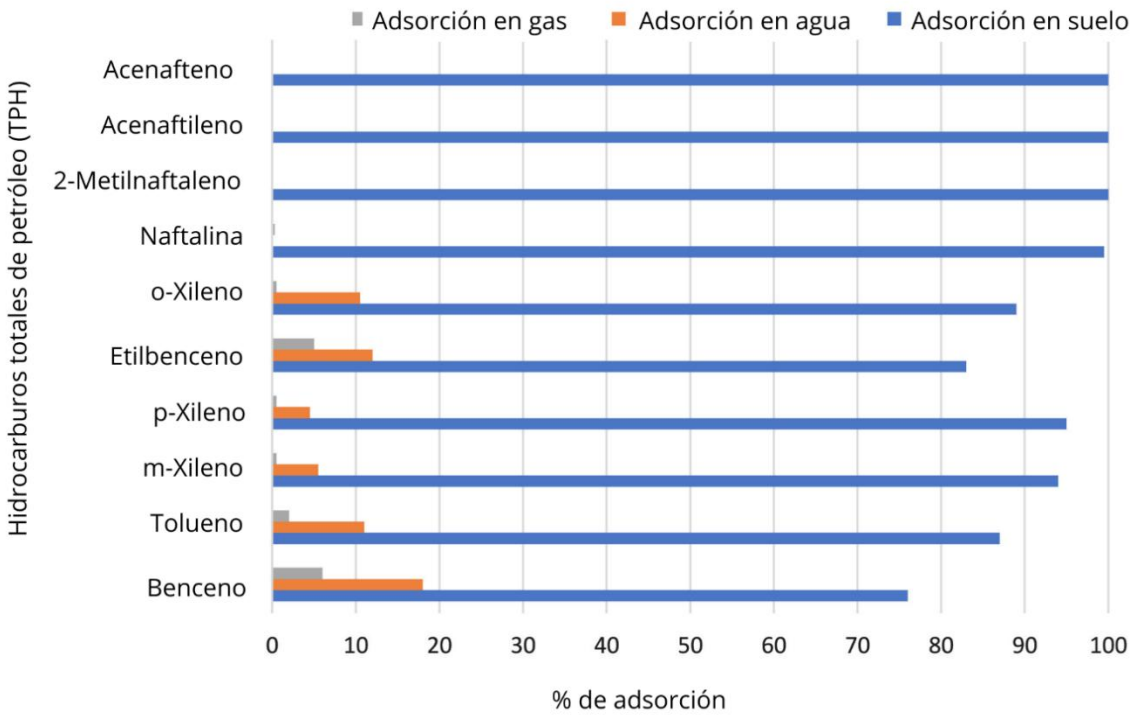

Figura 03. Porcentaje de afinidad de TPH en gas, agua y suelo (Tomada de Ambaye *et al*., 2022)

2.4. Tecnologías de remediación de suelos contaminados por TPH.

De manera general, los suelos impactados por hidrocarburos del petróleo pueden ser recuperados y descontaminados a través de distintos métodos ampliamente empleados:

i) *in situ* (en el lugar original)

ii) *ex situ* (fuera del lugar original).

Por ejemplo, para la eliminación de las moléculas más ligeras, en particular de xilenos, etilbenceno, tolueno y benceno (BTEX), se suele emplear in situ la extracción de aire del suelo contaminado, el rociado de aire, la inyección de aire o combinaciones de estos métodos. Los métodos de tratamiento de limpieza de suelos *ex situ* se llevan a cabo fuera del sitio mediante tecnología de excavación, desintoxicación y destrucción, y se pueden aplicar para eliminar los hidrocarburos de fracción pesada y media del suelo (Ambaye *et al*., 2022).

Como se muestra en la Tabla 02, los métodos físicos, químicos y biológicos afectan la velocidad de degradación de hidrocarburos del petróleo. Por lo tanto, las cualidades fisicoquímicas y la naturaleza del contaminante es una de las variables esenciales a considerar al desarrollar métodos de remediación. Por ejemplo, los hidrocarburos alifáticos tienen una tasa de degradación más alta que los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y BTEX debido a su menor complejidad estructural y peso molecular; el aumento del peso molecular y de la complejidad estructural de los hidrocarburos del petróleo conducen a compuestos con menor grado de degradación. Sin embargo, la adición de nutrientes o cosustratos a los hidrocarburos puede mejorar sus tasas de degradación y otros factores ambientales, por ejemplo, la temperatura, el pH, la salinidad o la presión (Rodriguez-Campos *et al*., 2019).

Tabla 02. Métodos para la descontaminación de suelos con hidrocarburos

Tipo	**Método**	**Explicación**
Físico	Excavación de suelos	Consiste en la excavación y eliminación de los contaminantes presentes en el suelo contaminado, proviene principalmente de las bases industriales y militares (Ferronato & Torretta, 2019).
	Recubrimiento superficial	Se utiliza para conservar el suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo mediante la barrera física entre los medios contaminados y la superficie (Li *et al.,* 2022).
	Lavado de suelos	En este método, se produce la dispersión de HTP tóxicos entre las partículas de arcilla del suelo y la solución de lavado

		(Murena & Gioia, 2009).
	Calentamiento por microondas	Consiste en el calentamiento homogéneo del suelo contaminado por irradiación electromagnética, especialmente infrarroja (Falciglia *et al.,* 2018).
Químico	Oxidación-reducción	Es una técnica ventajosa basada en reacciones de oxidación química *in situ* (Besha *et al.,* 2018).
	Oxidación ultravioleta y fotocatalítica	Implican irradiación UV y oxidantes químicos como el O_3 y H_2O_2 para degradar y mineralizar compuestos de HTP (Pisharody *et al.,* 2022).
	Sistemas electroquímicos	En este sistema, la corriente eléctrica sirve como donante o aceptor de electrones para la remediación de derrames de petróleo (Wang *et al.,* 2022a).
Biológico	Biorremediación	Los microorganismos, especialmente bacterias y hongos, se aplican para degradar los hidrocarburos del petróleo (Ruley *et al.,* 2022).
	Fitorremediación	Se utilizan plantas y especies simbiontes para eliminar los TPH del ambiente contaminado (Ruley *et al.,* 2022).

2.4.1. Biorremediación.

La biorremediación es una estrategia emergente y sostenible para la mitigación de la contaminación ambiental, que puede ocurrir de manera espontánea en el medio (atenuación natural) u optimizarse mediante la adición de nutrientes (bioestimulación) y/o la introducción de microorganismos específicos (bioaumentación), lo que incrementa la eficiencia de la degradación de los contaminantes (Castro *et al*., 2022).

La remediación impulsada por insectos se distribuye en varios tipos de contaminantes orgánicos (por ejemplo, plaguicidas, productos farmacéuticos, microplásticos,

nanomateriales, hidrocarburos) y especies de insectos, como se resume en la Figura 04. El intestino de un insecto está poblado de microorganismos de importancia biotecnológica. Varias enzimas hidrolíticas clave como la amilasa, la celulasa, la lacasa, la proteasa, la pectinasa y la quitinasa son secretadas por diferentes bacterias y hongos que habitan la región intestinal de los insectos (Jaffar *et al*., 2022). Estos insectos obtienen beneficios nutricionales de su dieta mediante su asociación microbiana, que degrada compuestos mediante diferentes enzimas hidrolíticas. Más de un millón de insectos se agrupan en 31 órdenes, sin embargo, solo 10 de estos órdenes han sido explorados por su capacidad para secretar enzimas a través de la asociación microbiana intestinal (Banerjee *et al*., 2022). La asociación simbiótica entre insectos y microbios intestinales ofrece un amplio margen para explorar su aplicación en la biorremediación.

Varios métodos fisicoquímicos, como la incineración, la flotación por espuma, la extracción con disolventes, la pirólisis, el tratamiento ultrasónico o el tratamiento químico mediante la adición de tensioactivos, biotensioactivos, álcalis u oxidantes, se han aplicado para tratar los contaminantes del petróleo. El uso de estos métodos crea varios problemas debido al alto consumo de sustancias químicas y de energía; y la generación de contaminantes secundarios que requerirán un tratamiento, sin mencionar que la estructura del suelo cambia completamente. Debido a estos problemas, la biodegradación es una opción respetuosa con el medio ambiente, rentable y eficiente para degradar los hidrocarburos del petróleo. En la biodegradación, los microorganismos vivos llevan a cabo un proceso eficaz para la eliminación de contaminantes tipo TPH en sistemas terrestres y acuáticos, ya que emplean los hidrocarburos como principales fuentes de carbono y energía para su desarrollo y actividad metabólica. Diversos microorganismos, como las levaduras, las bacterias, los hongos y las algas, poseen la capacidad de mitigar la contaminación ambiental, y algunos pueden degradar los TPH como única fuente de carbono y energía. El uso de comunidades microbianas indígenas permite una mejor degradación debido a su mutabilidad genética, efecto sinérgico, resistividad y mayor adaptabilidad a ambientes tóxicos. Siempre es deseable utilizar un consorcio microbiano para la biodegradación de lodos de petróleo complejos que contienen alcanos, cicloalcanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos en comparación con las cepas individuales debido a la interacción sinérgica y al sistema enzimático. Durante el tratamiento de cultivo mixto, existe la posibilidad de que, si una especie elimina parcialmente

un metabolito tóxico en particular, las otras especies puedan degradarlo completamente, promoviendo el proceso de cometabolismo y comensalismo (Behera *et al*, 2021).

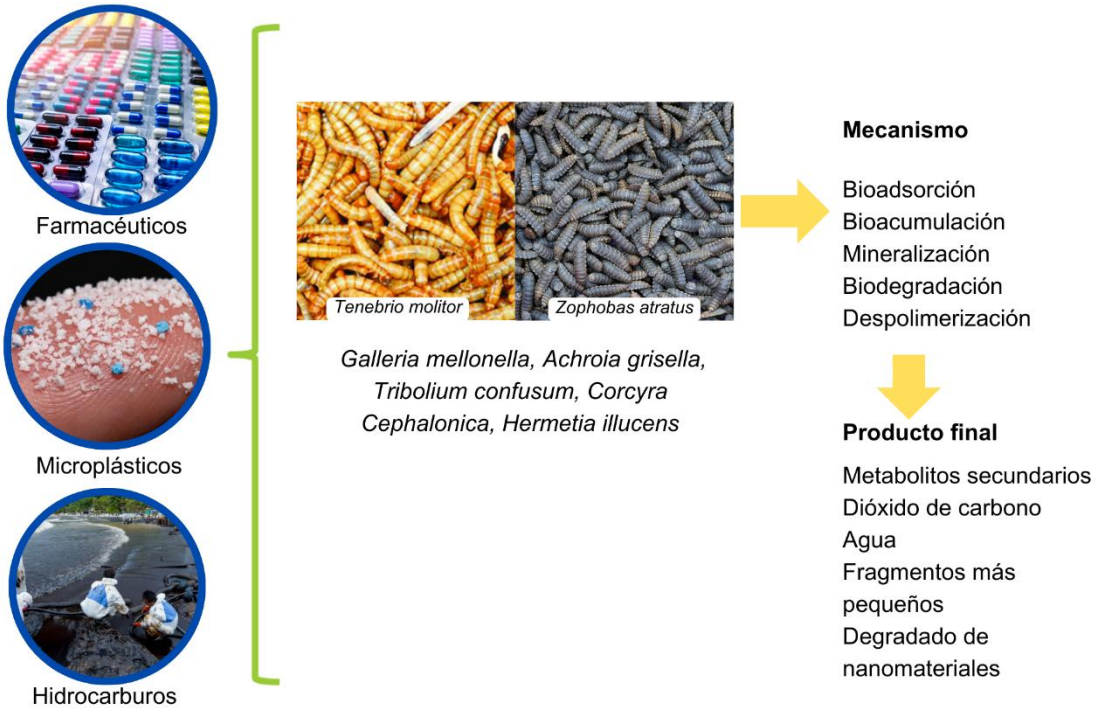

Figura 04. Contaminante, insecto, mecanismo de degradación, producto final.

Aunque la resistencia a los insecticidas en los microorganismos que degradan este tipo de compuestos plantea una importante preocupación mundial, también constituye una oportunidad para investigar y aprovechar los beneficios que ello conlleva para la degradación de contaminantes. Un estudio realizado por Meijer *et al*. (2021) probó seis insecticidas diferentes como clorpirifos, propoxur, cipermetrina, imidacloprid, Spinosad y tebufenozida sobre la supervivencia y el crecimiento de la biomasa de las larvas de *Hermetia illucens* (*H. illucens*). Aplicaron diferentes concentraciones de insecticidas de una a diez veces el límite máximo de residuos (LMR). Entre estos insecticidas, el clorpirifos, el propoxur y la tebufenozida no mostraron efecto algún sobre la *H. illucens* en ninguno de los LMR ensayados. Lo anterior indica que los microbiomas intestinales de estas especies de insectos desempeñan un papel importante en la degradación de los insecticidas mediante la secreción de enzimas.

Muchas especies de insectos, como los gusanos de la harina (larvas de *T. molitor*), los supergusanos (larvas de *Zophobas atratus*) (Wang *et al*., 2022b) y las larvas de la polilla de

la cera (*Galleria mellonella*) (Sanluis-Verdes *et al*., 2022) se han reportado recientemente por su capacidad para degradar plásticos. Entre estas, las larvas de *T. molitor* destacan por su elevada capacidad para degradar diversos tipos de plásticos, como el polietileno de alta densidad, el polietileno lineal de baja densidad, el polietileno de baja densidad, el policloruro de polivinilo, el poliéster, el poliestireno y la espuma de poliéster-poliuretano. Liu *et al*. (2022); Wang *et al*. (2022b) y Yang *et al*. (2022), resumieron que la capacidad de despolimerización se asoció principalmente con el tipo y tamaño del plástico, el peso molecular y el número de ramificaciones.

2.4.1.2. Bacterias.

Una bacteria es un microorganismo unicelular procariota decir, carece de núcleo definido y de organelos rodeados por membranas. Son algunos de los seres vivos más antiguos y abundantes del planeta, capaces de vivir en casi cualquier ambiente, desde el suelo y el agua hasta el interior del cuerpo humano.

La morfología de las bacterias puede verse influida por la composición del medio de cultivo, por haberse desarrollado en un medio sólido o líquido, por la temperatura de incubación y por otros factores.

Su reproducción se realiza mediante fisión binaria, lo que permite su crecimiento exponencial.

Su importancia en el ambiente radica en la descomposición, el ciclo del nitrógeno y la fermentación, y es clave en la biotecnología para la producción de antibióticos y la investigación genética.

La composición aproximada de las bacterias es de 81 % de agua y 19 % de solidos respecto a su peso total. Las bacterias secas contienen 18.5 % de carbohidratos, 14 % de grasas, 60 % de proteínas y 8 % de sales inorgánicas, es decir de cenizas. Estas últimas contienen 7 % de calcio (CaO), 2 % de cloro (Cl), 2 % de hierro (FeO), 6 % de magnesio (MgO), 40 % de fósforo (P_2O_5), 8 % de potasio (K_2O), 2 % de silicio (SiO_2), 23 % de sodio (Na_2O) y 10 % de azufre (SO_3) (Cervera, 1959).

2.4.2. Mecanismos de biodegradación.

De acuerdo con Gwenzi *et al*. (2024) se pueden observar dos mecanismos de biodegradación descritos en la Figura 05:

1) Procesos impulsados por insectos y sus enzimas asociadas.

2) Procesos mediados por la microbiota intestinal y sus enzimas.

Además, idealmente se pueden enumerar cuatro fases:

1) El biodeterioro: crea grupos carbonilo mediante el uso de enzimas oxidativas producidas por insectos o microbiomas intestinales de insectos. Una mayor despolimerización oxidativa disminuye el número de grupos carbonilo y produce ácidos carboxílicos.

2) La biofragmentación: implica la hidrólisis o fragmentación de las cadenas de carbono de los polímeros, seguida de la liberación de moléculas intermedias por enzimas secretadas por insectos o por microbiomas intestinales.

3) En la bioasimilación, mediante la cual la microbiota absorbe y metaboliza diminutas partículas de hidrocarburos generadas por la biofragmentación.

4) La mineralización, consiste en convertir los productos de la hidrólisis en biomasa microbiana y liberar dióxido de carbono y agua. El microbioma intestinal del *T. molitor* comprende bacterias y hongos (Bulak *et al*., 2021).

2.4.3. Factores de degradación del contaminante.

La comprensión de los procesos de remediación promovidos por insectos resulta esencial para el diseño y la operación de estos sistemas en distintos escenarios de contaminación. A continuación, se presenta una visión general de los factores que los regulan.

2.4.3.1. Especies de insectos.

Algunos investigadores tales como Wang *et al*. (2022a), Yang *et al*. (2021), Bulak *et al*. (2021), Liu *et al*. (2022) y Ángel-Sánchez & Galián (2022) han segido insectos que han mostrado en su microbiota intestinal la capacidad de degradar contaminantes. Las especies de insectos tienen diferentes capacidades para absorber, bioacumular y metabolizar diversos

contaminantes, por ejemplo, algunas especies de insectos como las larvas de la mosca soldado negra y los gusanos de la harina han demostrado una excelente capacidad para remediar los desechos orgánicos y convertirlos en biomasa y bioproductos valiosos. Otras especies de insectos y su microbioma intestinal producen enzimas específicas (p. ej. hidrolasas, lacasas) que catalizan la degradación de contaminantes orgánicos (Mika *et al*., 2013). Esto apunta al potencial de desarrollar sistemas de remediación impulsados por insectos específicos para contaminantes.

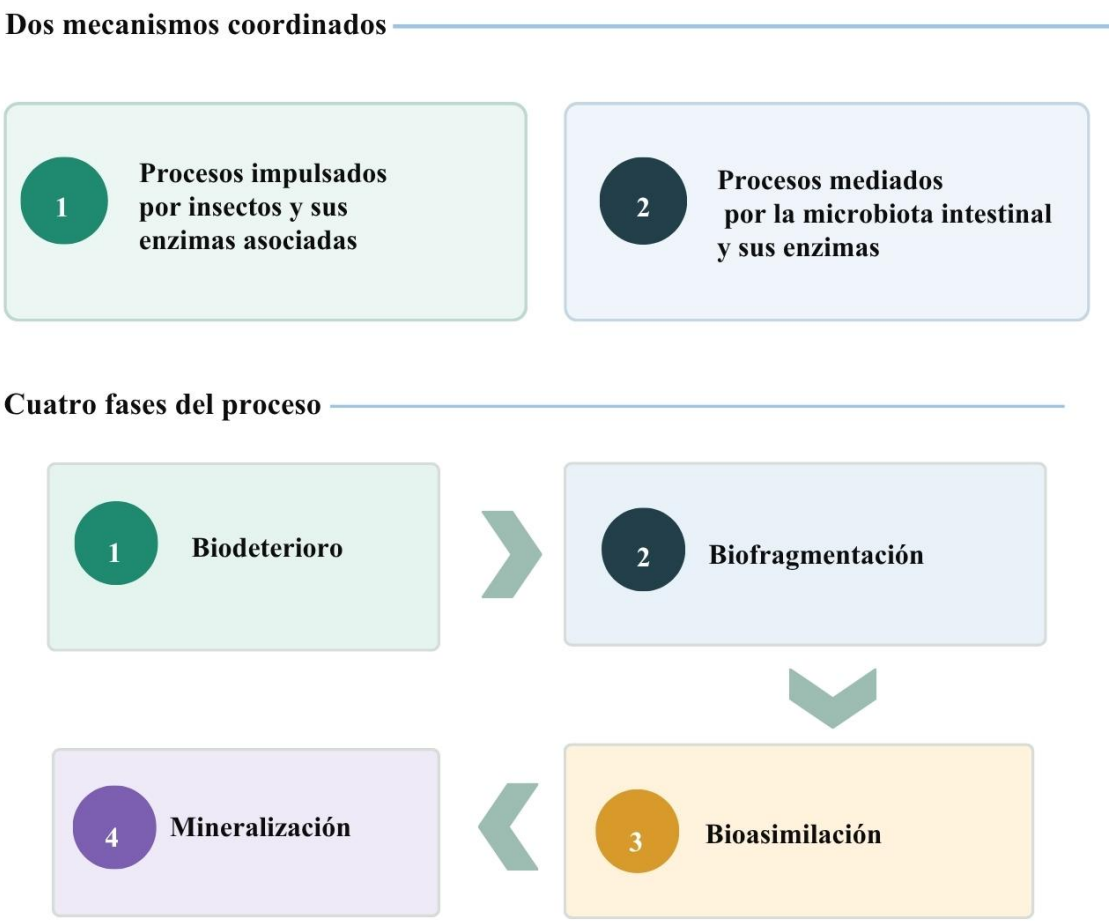

Figura 05. Mecanismos de biodegradación y fases del proceso.

2.4.3.2. Etapa larvaria.

La capacidad de los insectos para mitigar los contaminantes también depende de la etapa de vida. Por ejemplo, las etapas larvarias de la mayoría de los insectos se consideran más eficaces para la eliminación de contaminantes que las etapas adultas. Esto se debe

probablemente al crecimiento relativamente lento y altas tasas metabólicas asociadas con la etapa larvaria en relación con otras etapas de la vida. Por lo tanto, la aplicación de sistemas de remediación impulsados por insectos requiere condiciones óptimas para la etapa de vida más efectiva de los insectos. También existe la posibilidad de diseñar y manipular las condiciones de operación para promover y prolongar las etapas de vida más efectivas, pero este aspecto ha recibido una atención limitada en la investigación sobre la remediación ambiental (Giannetto *et al*., 2020).

2.4.3.3. Tipo de contaminante y su concentración.

La concentración inicial del contaminante objetivo en el sustrato afecta tanto la tasa de remediación como su eficacia. Por ejemplo, las concentraciones más altas pueden requerir una exposición más prolongada o una mayor densidad de insectos, e incluso inducir toxicidad en los insectos (Purschke *et al*., 2017).

2.4.3.4 Condiciones ambientales.

Las condiciones ambientales, como el pH, la humedad, la concentración de oxígeno, los nutrientes y la temperatura del sustrato, pueden influir en la reproducción, el crecimiento y la actividad de los insectos durante la degradación de los contaminantes. Salam *et al*. (2022) investigaron las condiciones ambientales óptimas para el *H. illucens* demostrando que la temporada de verano y una humedad relativa de 75 a 85 % eran las ideales para la reproducción y el crecimiento del *H. illucens*. Además del trabajo sobre *H. illucens*, la ecología y las condiciones ambientales óptimas de otros insectos utilizados en la remediación son poco conocidas.

2.5. *Tenebrio molitor.*

El *T. molitor* es miembro del orden Coleóptera, de la familia Tenebrionidae, su larva, conocida como gusano amarillo de la harina, es una plaga característica del trigo, que se puede dar en granos almacenados y productos molidos como harinas, sobre todo en lugares oscuros como depósitos de grano, sacos de pienso, molinos, almacenes (Ángel-Sánchez & Galián, 2022).

2.5.1 El ciclo de vida.

El ciclo de vida completo se ilustra en la Figura 06 y se resume:

Huevo: Los huevos son pequeños, blancos y ovalados. Eclosionan en aproximadamente 1 a 3 semanas, dependiendo de las condiciones ambientales.

Larva: Esta es la etapa de mayor interés, especialmente en aplicaciones alimentarias. Las larvas crecen durante 8 a 10 semanas, pasando por hasta 12 mudas de piel antes de convertirse en pupas. Para la experimentación se acondicionaron las larvas en esta etapa, ya que es la etapa más larga y se alimentan intensamente.

Pupa: En esta etapa de transición, las larvas se transforman en pupas inmóviles. Este proceso dura de 1 a 2 semanas, durante las cuales el insecto no se alimenta.

Adulto: Los escarabajos emergen de las pupas y son inicialmente blancos, pero se oscurecen con el tiempo. Los adultos son sexualmente activos y pueden vivir entre 8 y 12 semanas. Su alimentación disminuye debido a que priorizan la reproducción.

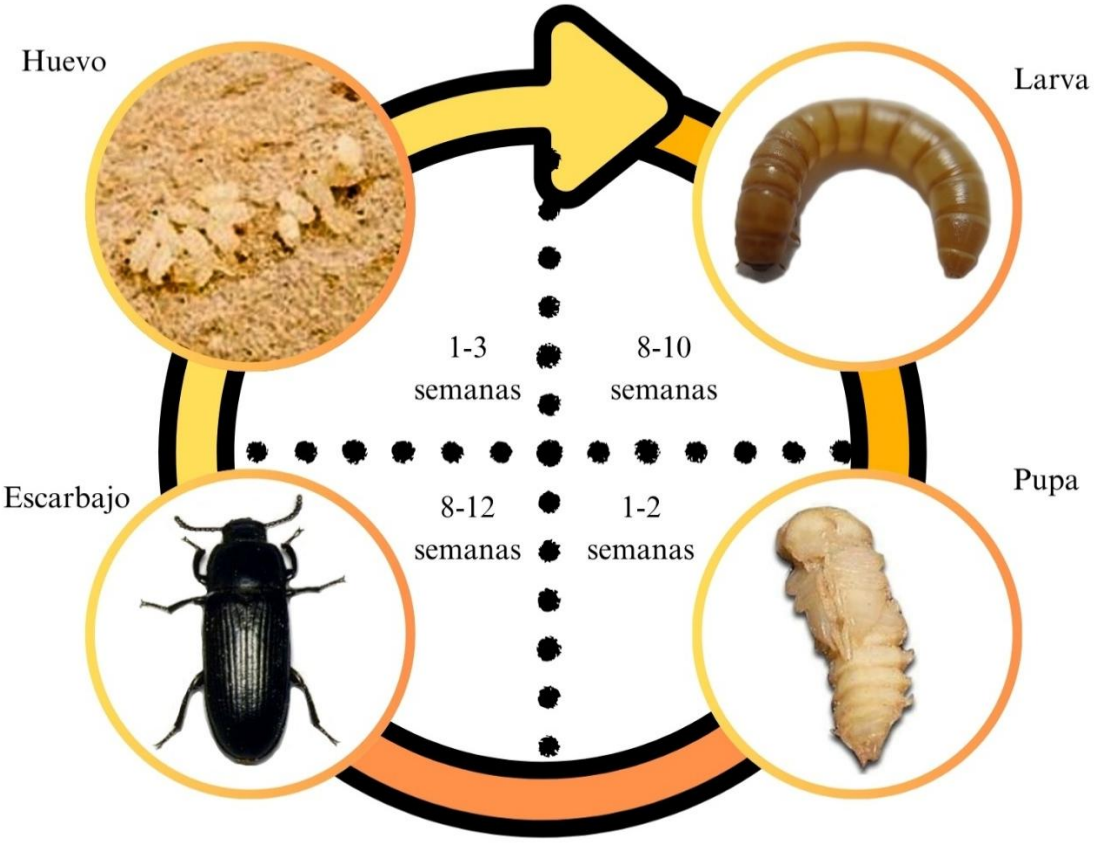

Figura 06. Ciclo de vida de *T. molitor*.

2.5.2. Temperatura y humedad ambiental.

En la mayoría de los insectos, la temperatura de su cuerpo está determinada por las variaciones en la temperatura del entorno. Las temperaturas de cría óptimas de las larvas son de 25 a 28º C y una humedad óptima de 60 a 75 % (Ángel-Sánchez & Galián, 2022).

2.5.3. Intensidad de la luz.

Los graneros y almacenes ofrecen un ambiente oscuro o con un nivel de iluminación bajo. *T. molitor* muestra respuestas de fototaxis negativa en estos entornos, donde el movimiento se dirige en la dirección contraria a la fuente de luz para mejorar su crecimiento (Ángel-Sánchez & Galián, 2022).

2.5.4. Alimentación o medio de crecimiento.

Generalmente, se alimentan de salvado o harina de cereales (maíz, avena, trigo), que contienen gran parte de los nutrientes necesarios, complementados con frutas y verduras frescas crudas (como zanahorias, patatas o lechuga) para aportar la humedad requerida. Sin embargo, las hortalizas tienden a deshidratarse y a presentar crecimiento de moho. No obstante, las larvas de *T. molitor* son resistentes a la sequedad, aunque cuando hay una fuente húmeda, crecen más rápido, con una mejor tasa de conversión de alimento, de desarrollo, y un mayor tamaño corporal (Ángel-Sánchez & Galián, 2022). El *T. molitor* presenta una alimentación omnívora en su fase larvaria, lo que sugiere que es capaz de adquirir nutrientes tanto de materia vegetal como de productos de origen animal. Los residuos orgánicos pueden emplearse como fuente de alimento, debido a que en estos insectos presentan una alta eficiencia en la conversión del alimento (superando en más de cinco veces a la carne de res). Además, tiene la capacidad de transformar productos de desecho poco nutritivos en una dieta rica en proteínas, energía y grasas (Ángel-Sánchez & Galián, 2022).

2.5.5. Enfermedades.

El daño más evidente causado por los insectos en los productos almacenados es la destrucción de los alimentos destinados al consumo humano. Además, los insectos contaminan el producto con excrementos, heces, exuvias y cadáveres. La acumulación de suciedad puede provocar el rechazo del material almacenado. A excepción de algunos escarabajos tenebriónidos de los cereales infectados con cierta tenia, no se ha demostrado que los insectos de los productos almacenados transmitan patógenos o enfermedades humanas. Sin embargo, algunos de sus subproductos pueden resultar muy alergénicos para los humanos (Resh & Cardé, 2009).

2.5.6. Mudas de piel.

En muchos insectos se han observado cambios en el número de mudas. Las larvas del *T. molitor* se desarrollan en 11 a 15 estadios a 25 °C y en 15 a 23 estadios a 30 °C. La distribución de enzimas en las regiones intestinales de los Tenebrionidae adultos es similar a la de sus larvas. Esto sugiere que el patrón general de digestión en larvas y adultos de Coleóptera es similar, aunque (a diferencia de los adultos) las larvas de escarabajo generalmente carecen de buche. Los insectos del orden Cucujiformia (que incluye Tenebrionidae, Chrysomelidae, Bruchidae y Curculionidae) tienen cisteína proteasas y serina proteasas como enzimas digestivas, lo que sugiere que sus antepasados fueron insectos adaptados para alimentarse de semillas (Resh & Cardé, 2009).

3. Revisión del estado del arte.

La Tabla 03 presenta antecedentes relevantes sobre el uso de estrategias de biorremediación aplicadas a suelos contaminados con hidrocarburos y otros compuestos orgánicos persistentes. En conjunto, los estudios reportados muestran que la bioaumentación, ya sea por sí sola o en combinación con otras tecnologías, puede incrementar significativamente la degradación en contraste con la atenuación natural de contaminantes. Asimismo, varios trabajos destacan que la eficacia del proceso depende del tipo de consorcio microbiano

empleado, de la interacción con la microbiota propia del medio, así como las condiciones del sistema en tratamiento. En este contexto, los antecedentes reunidos respaldan el potencial de los microorganismos especializados como una opción eficiente para el tratamiento de suelos contaminados.

Tabla 03. Estudios relacionados con la biodegradación de contaminantes

Título y Resumen	**Autor y año**
Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos con la combinación de tres tecnologías: bioaumentación, fitorremediación y vermiremediación. La mayor parte de la eliminación de alcanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos se redujo en un plazo de 28 días; a los 112 días, el alcano fue de 78 a 94 % y los hidrocarburos aromáticos policíclicos de 55 a 77 %. En los tratamientos no esterilizados, la mayor eliminación de hidrocarburos fue con lombrices de tierra más bacterias (86 %).	(Rodriguez *et al.,* 2019)
Respuesta del escarabajo verde de junio y su microbioma intestinal al RDX y al fenantreno. Los escarabajos verdes de junio son una plaga. Las larvas ingieren y procesan grandes volúmenes de tierra mientras se alimentan. En este estudio, las larvas del escarabajo verde de junio fueron expuestas al explosivo RDX y al fenantreno. Los hallazgos generales incluyeron que altas concentraciones, la RDX y el fenantreno no ejercieron ningún efecto significativo sobre el peso corporal o la supervivencia.	(Jung *et al.,* 2021)
Respuestas dinámicas en el bioaumento de Pseudomonas stutzeri M3 de suelos contaminados con petróleo crudo: hidrocarburos, estructuras de comunidades microbianas y genes funcionales. *Pseudomonas stutzeri M3* contiene varios genes funcionales para la degradación del petróleo. La degradación efectiva de las composiciones de petróleo reconstruidas se produjo 15 días después.	(Li *et al.,* 2024)

La cepa exógena M3 influyó significativamente en la comunidad microbiana autóctona. El análisis de redes reveló que las bacterias del centro interactúan positivamente para degradar el petróleo.	
Bioaumento a escala piloto de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) utilizando un consorcio bacteriano autóctono en biorreactores de lodos de suelo. En este estudio, el consorcio autóctono degrado los HAP, lo que demuestra el gran potencial de los biorreactores de lodos de suelo para las aplicaciones de biorremediación de suelos a escala de campo.	(Geng *et al.,* 2022)
Bioaumento y bioestimulación: comparación de sus efectos a largo plazo sobre la ecotoxicidad y la actividad biológica de suelos contaminados con petróleo. La bioaumentación demostró una mayor eficiencia en comparación con la actividad de los microorganismos nativos en las etapas iniciales de la remediación, mientras que no se encontraron diferencias entre la bioestimulación y la bioaumentación. Los resultados indican que la estimulación de la microbiota autóctona del suelo por nutrientes es suficiente para lograr una biorremediación exitosa del suelo.	(Polyak *et al.,* 2022)
Bioaumento a gran escala de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo utilizando un consorcio microbiano mixto. Este estudio destaca se confirma la biorremediación como una estrategia adecuada para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos a escala comercial, según el conocimiento de los autores, este es uno de los primeros estudios que informan de la degradación exitosa de grandes volúmenes (hasta 2,500 toneladas) de suelo contaminado con hidrocarburos totales de petróleo.	(Poi *et al.,* 2017)

3.1. La biodegradación.

El término biodegradación hace referencia a la descomposición de contaminantes orgánicos mediada por la actividad de los microorganismos. En este sentido, dichos compuestos pueden considerarse como fuente de sustrato o alimento para la microbiota. La degradación de un compuesto orgánico puede entenderse como una serie de etapas biológicas o una ruta metabólica que culmina en la oxidación del compuesto original, tal como se resume en la Figura 07.

La mineralización completa, también conocida como biodegradación, implica la oxidación del compuesto de origen hasta su conversión en dióxido de carbono y agua, proceso que aporta carbono y energía necesarios para el crecimiento y la reproducción celulares, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Las etapas que conforman la mineralización son comparables independientemente de si la fuente de carbono es un azúcar simple como la glucosa, un polímero vegetal como la celulosa o una molécula contaminante. Cada una de las fases de la degradación dentro de la vía es catalizada por enzimas producidas por la célula responsable de la degradación. Las enzimas se encuentran con mayor frecuencia dentro de una célula, pero también se producen y liberan de la célula para ayudar a iniciar las reacciones de degradación. Las enzimas que se encuentran fuera de la célula se conocen como enzimas extracelulares; son importantes en la degradación de macromoléculas como el polímero vegetal celulosa. Las macromoléculas deben descomponerse en subunidades más pequeñas fuera de la célula para permitir su transporte hacia ella. La biotransformación puede detenerse en cualquier paso de la vía de biodegradación si la enzima apropiada, ya sea interna o extracelular, no está presente. De hecho, la falta de enzimas biodegradadoras adecuadas es una razón común de la persistencia de contaminantes orgánicos, en particular de aquellos con estructuras químicas inusuales que las enzimas existentes no reconocen. Por lo tanto, los compuestos contaminantes con estructuras similares a las de los sustratos naturales suelen degradarse con facilidad. Aquellos con estructuras muy diferentes a las de los sustratos naturales suelen degradarse lentamente o no degradarse en absoluto (Pepper *et al*. 2015).

En suelos contaminados con hidrocarburos, las bacterias Gram-negativas suelen ser más predominantes y adaptadas para sobrevivir y degradar estos compuestos. Esto se debe a:

1. Membrana externa: Las gramnegativas tienen una membrana externa rica en lipopolisacáridos que les proporciona resistencia frente a condiciones adversas, permitiéndoles adaptarse a ambientes extremos, como suelos contaminados con petróleo y sus derivados.

2. Capacidad metabólica: Muchas bacterias Gram-negativas, como *Alcanivorax spp*., *Burkholderia spp*., y *Pseudomonas spp*., poseen rutas metabólicas especializadas para la degradación de hidrocarburos, incluyendo la producción de biosurfactantes que facilitan la solubilización y el acceso a estos compuestos.

Aunque las bacterias Gram-positivas también pueden participar en la biodegradación, su papel suele ser menos destacado en comparación con las Gram-negativas en estos entornos específicos.

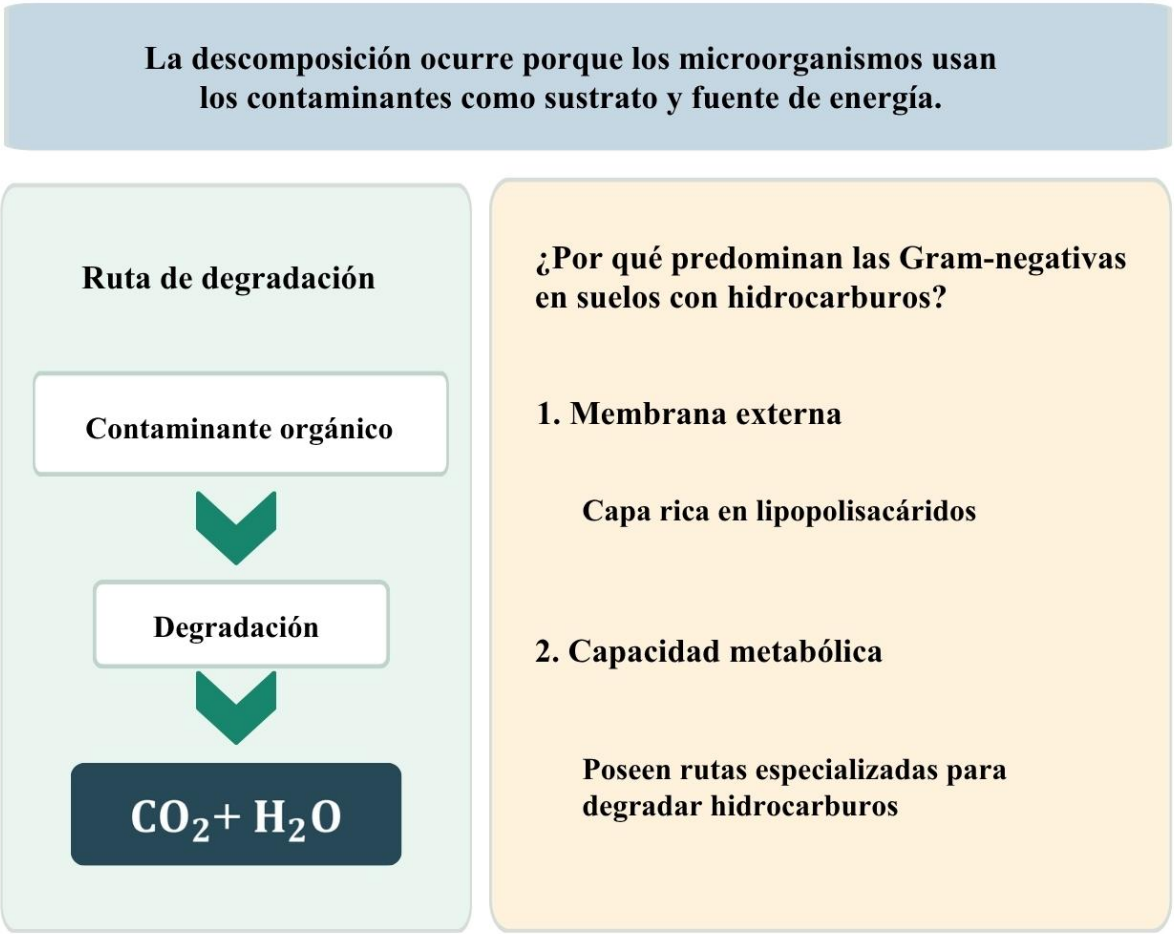

Figura 07. Biodegradación microbiana de contaminantes orgánicos.

4. Justificación.

Existe un alto riesgo para la salud de la sociedad debido a la contaminación por HTP. Por esta razón, los diferentes métodos de tratamiento *ex situ* o *in situ* incluyen la separación y la destrucción mediante métodos ultrasónicos, acústicos, electromagnéticos, eléctricos, térmicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos, como estrategias para restaurar el suelo contaminado (Koshlaf & Ball, 2017). En consecuencia, provoca una gama diversa de efectos toxicológicos en la salud humana y animal, como mutagenicidad, hemotoxicidad, genotoxicidad, carcinogenicidad, toxicidad ocular, cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, inmunotoxicidad, neurotoxicidad, citotoxicidad y teratogenicidad (Abdullah *et al*., 2020). Además, repercute en el desarrollo de las plantas al reducir la absorción de agua y sales minerales, lo que conduce a la interrupción de sus procesos metabólicos y agrava la deficiencia de nutrientes y clorofila. Esto conlleva una disminución de la resistencia frente a plagas y enfermedades, lo que se traduce en un crecimiento limitado de la planta. Además, la raíz se deforma y las hojas, al igual que las flores sufren necrosis y clorosis (Mallah *et al*., 2022).

La contaminación del suelo por hidrocarburos constituye una problemática ambiental que requiere regulación obligatoria, que debe ser atendida de manera inmediata por lo que la remediación por mediante métodos que estimulen su saneamiento sin afectar ni generar residuos secundarios es una opción viable.

Este trabajo ayudará a determinar la eficiencia de las cepas que degradan el hidrocarburo fracción pesada (HFP) y proporcionará información para el desarrollo futuro de tecnologías de biodegradación.

5. Hipótesis.

La bioaumentación con bacterias del intestino de *T. molitor* en suelos contaminados por hidrocarburos reducirá su concentración hasta los límites máximos permisibles establecidos por la normatividad.

6. Objetivos.

6.1. Objetivo general.

Evaluar la eficiencia de la remoción de hidrocarburos fracción pesada mediante bioaumentación con un cultivo de bacterias hidrocarbonoclastas del tracto digestivo de *T. molitor*.

6.2. Objetivos específicos.

- Evaluar la remoción de hidrocarburos mediante atenuación natural.

- Evaluar la remoción de hidrocarburos mediante bioaumentación con bacterias nativas hidrocarbonoclastas.

- Evaluar la remoción de hidrocarburos mediante bioaumentación con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor*.

7. Desarrollo experimental.

La experimentación se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis de la Calidad de Agua y Residuos (LCAR), situado en la planta baja del edificio 'O' de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco.

Para demostrar la hipótesis se tomó un suelo contaminado para la bioaumentación, el proceso inició con la caracterización del suelo y la adaptación del *T. molitor*. al contaminante.

Posteriormente se diseccionó al espécimen para extraer las bacterias e inocularlas. Al mismo tiempo se aisló del suelo contaminado bacterias hidrocarbonoclastas. La aplicación de los inóculos con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor*. y bacterias hidrocarbonoclastas del suelo contaminado se realizó cada 15 días.

7.1. Caracterización del suelo.

Las muestras de suelo con presencia de hidrocarburos empleadas en los ensayos fueron recolectadas en un taller de mecánica automotriz ubicado en el Estado de México. Se realizó una caracterización inicial de las muestras de suelos. Los parámetros determinados, así como el método de análisis se señalan en la Tabla 04.

Tabla 04. Caracterización inicial del suelo

Parámetro	**Método**
Capacidad de campo	Determinación de la humedad a capacidad de campo (Reyes Jaramillo, 1996).
Densidad aparente	Método AS-03, de la probeta.
Densidad real	Método AS-04, método del picnómetro.
Porosidad	Cálculo de manera indirecta utilizando datos de densidad aparente y densidad real.
Humedad	Método AS-05, determinación por gravimetría.
Textura del suelo	Método AS-09 o procedimiento de Bouyoucos.
Fosforo aprovechable	Método AS-11, procedimiento de Olsen y colaboradores.
Materia orgánica	Método AS-07, procedimiento de Walkley y Black.
Nitrógeno total Kjeldahl	Método AS-25, procedimiento por digestato.
pH	Método AS-06.
Conteo bacteriano	Cuenta de microorganismo viables por dilución en placa (Fernández *et al.,* 2006).
HFP	Método EPA 1664.

7.2. Inóculo de bacterias para la bioaumentación.

El aislamiento de bacterias del suelo contaminado por hidrocarburos y del tracto digestivo de *T. molitor* permitió identificar y seleccionar microorganismos con capacidades específicas para degradar hidrocarburos, aprovechando la adaptación natural de las bacterias en el suelo contaminado y la selección de cepas eficientes al aislar bacterias del tracto digestivo que faciliten la biodegradación.

Una vez aisladas, las bacterias se cultivaron en condiciones controladas para aumentar su población antes de introducirlas en el suelo.

Para obtener el inóculo de bacterias de *T. molitor* se realizó:

7.2.1. Adaptación de las larvas de *T. molito* al contaminante.

En esta parte se observó la toxicidad del *T. molitor*; a pesar de que Chen *et al*. (2015), Tang *et al*. (2017) y Yang *et al*. (2015), los alimentaron con polímeros, no se sabía qué podría suceder al alimentar a esta especie con hidrocarburos.

Para evaluar el efecto toxicológico del HFP en las larvas de *T. molitor*. se realizaron tres experimentaciones, denominadas A, B, C y D. La experimentación A, consistió en agregar 0.008 kg de sustrato de salvado de trigo,10 especímenes y una concentración de hidrocarburo de 480, 960 y 1440 mg/kg respectivamente, durante 24 días. Para poder determinar su toxicidad se tomó como guía el protocolo estandarizado de la OCDE n.º 207 y se determinó la concentración letal media (CL50), dosis letal 100 (DL100) y el nivel sin efecto observable (NOEL).

La DL_{50} indica la dosis a partir de la cual se alcanza un 50 % de mortalidad en las larvas. Este valor permitía establecer un umbral de toxicidad medio, útil para comparar la peligrosidad entre distintas concentraciones.

La DL_{100} representó la dosis en la que se observó el 100 % de mortalidad, el límite extremo de toxicidad, más allá del cual ninguna larva sobrevivía. Proporcionaba información sobre el nivel crítico de contaminación.

El NOEL determinó la concentración máxima del contaminante en la que no se observaron mortalidad ni efectos adversos significativos. Lo que permitió establecer el límite seguro de exposición de *T. molitor* al contaminante.

En la experimentación B, se agregó 0.5 kg de suelo contaminado en un recipiente de polietileno con 10 especímenes; en la experimentación C, se agregó 0.25 kg de suelo contaminado más 0.25 kg de suelo de jardín con 10 especímenes; y en la experimentación D, se agregó 0.4 kg de suelo contaminado más 0.1 kg de salvado de trigo.

7.2.2. Selección de larvas.

En esta fase las larvas que sobrevivieron a la experimentación de adaptación se diseccionaron y se extrajeron sus intestinos como se describe en el apéndice B.

7.2.3. Aislamiento de bacterias del intestino de *T. molitor.*

Para el aislamiento de bacterias, se utilizó una solución salina estéril que contenía los intestinos de *T. molitor*, a partir de la cual se realizó un cultivo en placa sobre agar nutritivo durante 24 horas a 30 °C. Una vez concluido el periodo de incubación, se llevó a cabo el conteo, se seleccionó una colonia y se llevó a cabo la tinción de Gram para su posterior observación al microscopio y comprobar la pureza de la cepa. Posteriormente, las bacterias se inocularon en tubos de ensayo (150 × 20 mm) con agar nutritivo inclinado, los cuales se incubaron a 30 °C durante 48 horas. Finalizado este tiempo, se evaluó el medio para confirmar el crecimiento de un único microorganismo mediante tinción de Gram y observación microscópica.

7.2.4. Inoculo y bioaumentación con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor.*

Para la bioaumentación con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* se preparó 0.5 L de caldo nutritivo se esterilizó; posteriormente, se adicionó 0.5 mL de hidrocarburo y se inoculó con las bacterias aisladas del paso 7.2.3. La solución se llevó a una parrilla con temperatura de 30 °C a 200 rpm durante toda la experimentación. Se realizó una cinética de crecimiento mediante densidad óptica. En un recipiente de plástico se agregaron 0.5 kg de suelo

contaminado y se realizó la bioaumentación con un volumen de 0.05 L con una concentración de $3.3x10^8$ UFC/mL cada 15 días. El método se resumió en la Figura 08.

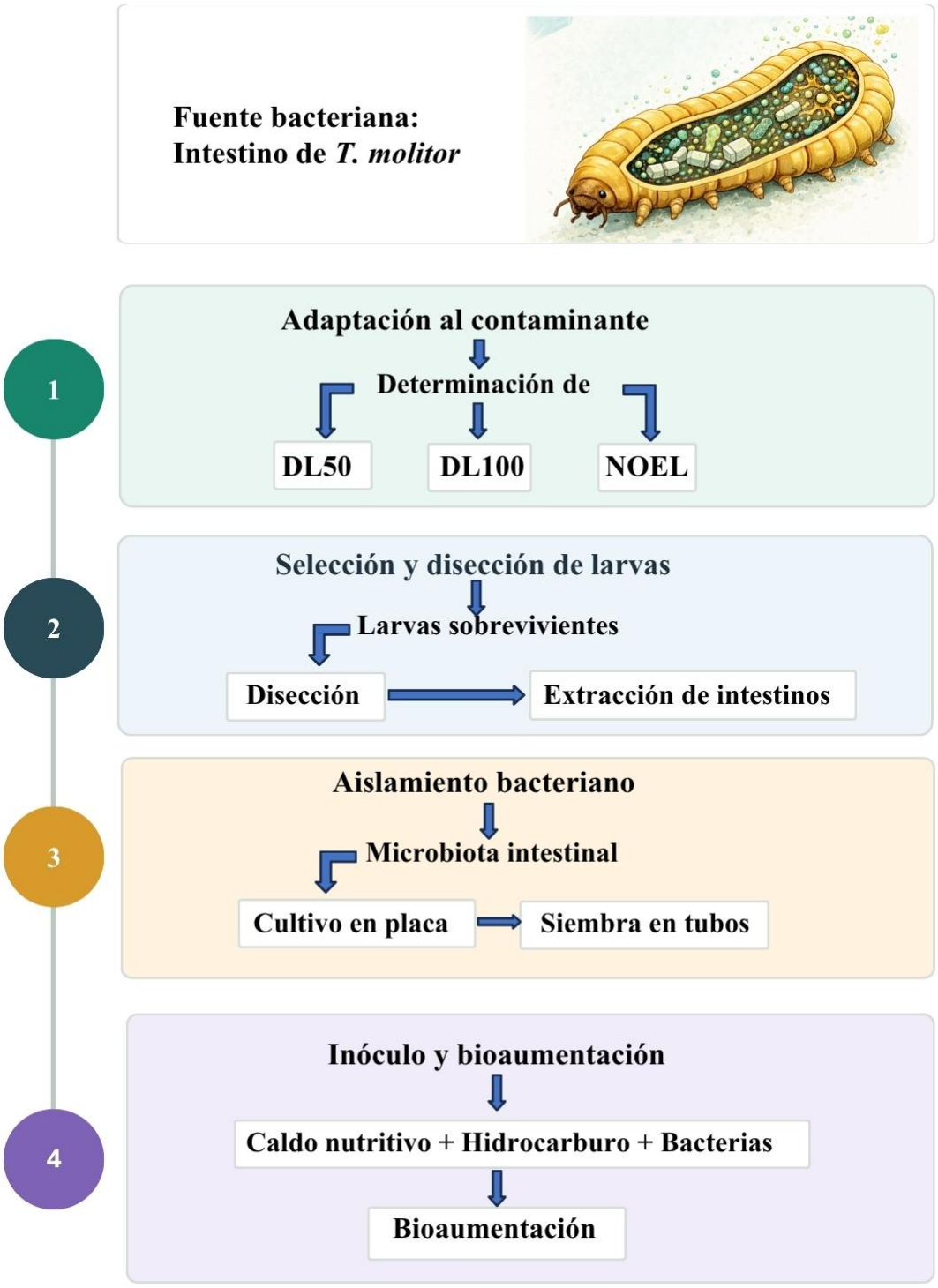

Figura 08. Obtención del inoculo de *T. molitor.*

7.3.1. Aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas del suelo contaminado.

Para el aislamiento bacteriano se aplicaron las técnicas de dilución en serie y de siembra en placa. La dilución utilizada fue de 10^{-5} y el cultivo se realizó en agar nutritivo durante 72 horas a 25 °C. Al concluir el periodo de incubación, se efectuó el conteo de colonias, se seleccionó una y se realizó la tinción de Gram, procediendo después a su observación al microscopio para comprobar la pureza de la cepa. En caso de no obtenerse una cepa pura, se repitió la siembra por estriado hasta verificar su pureza mediante la tinción de Gram y la observación microscópica. Una vez comprobada su pureza, la cepa fue inoculada en tubos de ensayo con agar nutritivo inclinado, los cuales se mantuvieron en incubación a 30 °C durante 48 horas. Transcurrido este periodo, se evaluó el medio para corroborar el crecimiento de un único microorganismo mediante tinción de Gram y observación microscópica.

7.3.2. Inoculo y bioaumentación con bacterias hidrocarbonoclastas del suelo contaminado.

Para la bioaumentación con bacterias hidrocarbonoclastas del suelo contaminado se preparó 0.5 L de solución nutritiva de acuerdo con Rodrigues *et al*. (2020), se esterilizó, posteriormente se adicionó 0.5 mL de hidrocarburo y se inoculó con las bacterias aisladas del paso 7.3.1; la solución se llevó a una parrilla con temperatura de 30 °C a 200 rpm durante toda la experimentación. Se realizó una cinética de crecimiento mediante la medición de densidad óptica. La experimentación se realizó por triplicado, en cada recipiente de plástico se agregó 0.5 kg de suelo contaminado y se realizó la bioaumentación con un volumen de 0.05 L con una concentración de $3.2x10^{8}$ UFC/mL cada 15 días. El método se resume en la Figura 09.

Los muestreos se realizaron cada 15 días; para su identificación se marcaron los 8 reactores con las letras B para los 2 testigos, T1, T2, T3 en los reactores con bioaumentación de las bacterias del tracto digestivo del *T. molitor* y H1, H2, H3 para la bioaumentación con bacterias hidrocarbonoclastas.

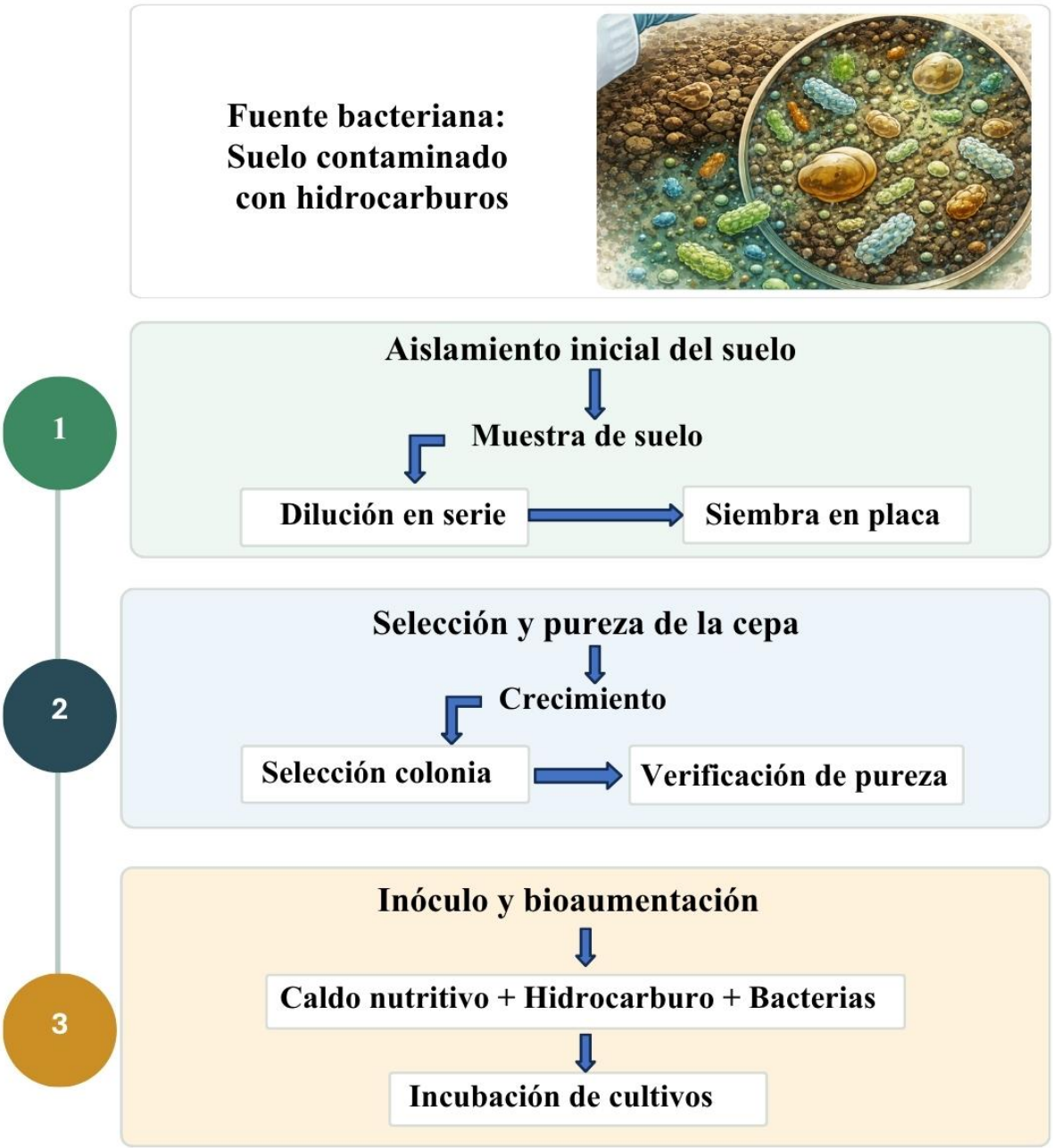

Figura 09. Obtención del inóculo de hidrocarbonoclastas.

8. Análisis y resultados.

8.1. Caracterización del suelo.

Los resultados derivados de la caracterización de las muestras de suelo se presentan en la Tabla 05.

Tabla 05. Resultado de la caracterización de las muestras de suelo.

Parámetro	**Unidad**	**Suelo contaminado**
Capacidad de campo	%	60.43 ± 0.01
Densidad aparente	g/cm^2	1.10 ± 0.01
Densidad real	g/cm^2	2.10 ± 0.01
Porosidad	%	20.45 ± 0.55
Humedad	%	20.67 ± 0.62
Textura del suelo		Franca
Materia orgánica	%	14.15 ± 0.04
Nitrógeno total Kjeldahl	%	0.33 ± 0.01
pH	Unidades	6.84 ± 0.01
Conteo bacteriano suelo	UFC/g	$8x10^7$
HFP	mg/kg	20,449.90 ± 189.25

Los datos correspondientes a la capacidad de campo fueron utilizados para conservar la humedad a lo largo de los ensayos, debido a que este parámetro define el volumen de agua que el suelo es capaz de almacenar después de su saturación y posterior drenaje.

La porosidad corresponde al porcentaje de espacios vacíos en un suelo, es decir, aquellos que no están ocupados por sólidos; Por lo general, se asume que cerca del 50 % del suelo está constituido por material sólido, como minerales y materia orgánica, mientras que el otro 50 % corresponde a los espacios porosos. Los resultados de porosidad estuvieron alrededor del 20 %, por lo que se clasificaron como suelos ligeros (FAO, 2020).

Usando cartas edafológicas del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), se identificó al suelo predominante en el área como Feozem, el cual es definido como suelo rico en materia orgánica y nutrientes (INEGI, 2004, 2021).

Los resultados correspondientes a los parámetros de pH, nitrógeno total, materia orgánica y fósforo aprovechable fueron clasificados con base en la Norma NOM-021-SEMARNAT-2000. Los dos suelos analizados presentaron un contenido un alto contenido de fósforo, considerando que las concentraciones registradas se sitúan alrededor de 45 mg/kg, mientras que la norma establece que valores superiores a 11 mg/kg se clasifican como altos. En cuanto a la materia orgánica, se obtuvo un valor de 16 %, lo que, de acuerdo con la clasificación normativa, indica un contenido elevado. El nitrógeno total presentó un valor cercano al 0.3 %, lo que indica una clasificación de suelo con elevada concentración de este elemento. Finalmente, a partir de los valores de pH, el suelo se clasificó como medianamente alcalino.

Respecto a la concentración de HFP, el suelo presentó una concentración que sobrepasa el LMP (6,000 mg/kg) para un suelo industrial según la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (SEMARNAT & SSA, 2012).

8.2. Adaptación del *T. molitor*.

En la Figura 10 se presenta la experimentación A, el tiempo para la adaptación fue de 24 días. No se observó la muerte de las larvas, pero sí un cambio en su metamorfosis de larva a pupa; para determinar la DL_{50}, DL_{100} y NOEL se consideró la transformación de la larva como su muerte. De acuerdo con lo anterior, los valores obtenidos se presentan en la Tabla 06.

Tabla 06. Número de larvas vivas y muertas a t=0 días, t=24 días y % de mortalidad al final del ensayo

	Contaminante (mg/kg)	**Larvas vivas (t=0 d)**	**Larvas muertas (t=10 d)**	**Larvas vivas (t=24 d)**	**Larvas muertas (t=24 d)**	**% de mortalidad (t=24 d)**
Control	0	10	0	10	0	0
A	480	10	0	4	6	60
B	960	10	0	3	7	70
C	1440	10	0	2	8	80

d=días

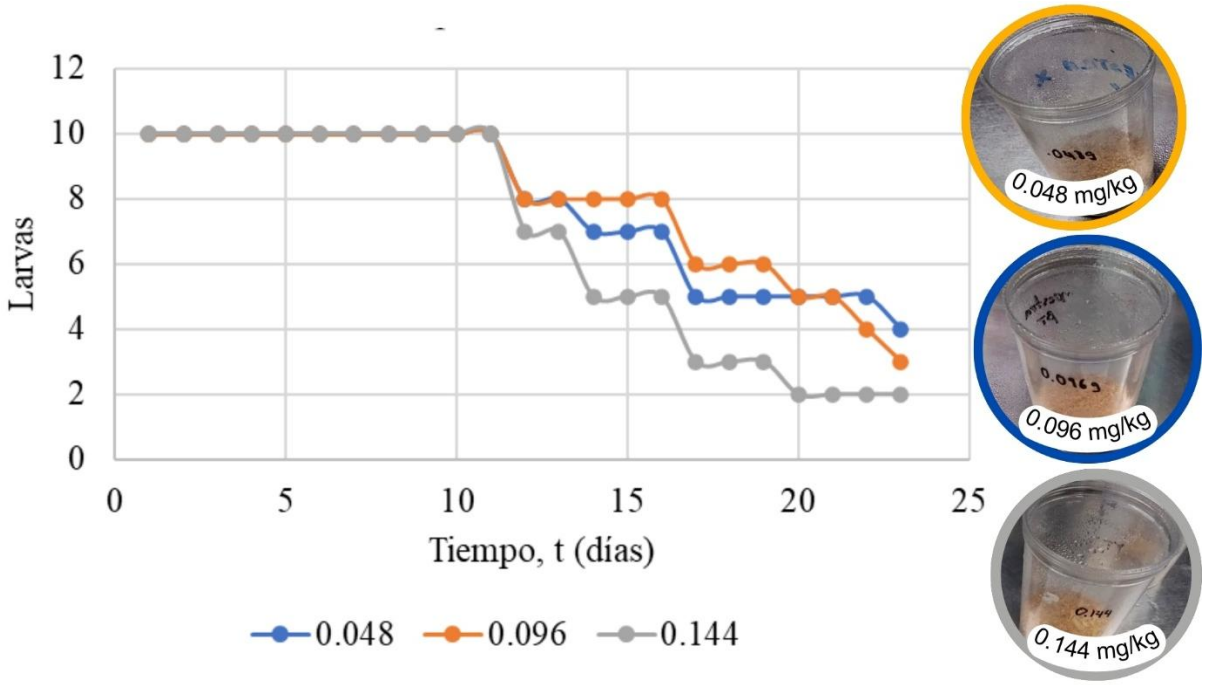

Figura 10. Periodo de adaptación (Experimentación A).

Algunas muestras presentaron hongos en el sustrato que infectaba a la larva, como se observa en la Figura 11.

Figura 11. Hongos sobre *T. molitor*. en la experimentación A.

Los cálculos para la DL_{50}, DL_{100} y NOEL se encuentran el Apéndice C.

1. Dosis Letal Media (DL_{50}):

Los datos experimentales indicaron que la DL_{50} es de 1,120 mg/kg. Este valor sugiere que el umbral de toxicidad afectó de manera significativa al 50 % de la población de larvas.

2. Dosis Letal 100 (DL_{100}):

Según los datos obtenidos, la máxima concentración utilizada, 1,440 mg/kg, alcanzó un 80 % de mortalidad en 24 días, lo que indicaba que la DL_{100} estaba por encima de este valor. Para determinarla con precisión, sería necesario realizar experimentos adicionales con concentraciones superiores a 1,440 mg/kg.

3. Nivel Sin Efecto Observable (NOEL):

Se estableció en 0 mg/kg (control), ya que la primera concentración evaluada, 480 mg/kg, mostró un efecto significativo con una mortalidad del 60 %.

Se identificó que la toxicidad del contaminante afectaba significativamente la supervivencia de *T. molitor*, con un impacto mayor a concentraciones más altas. En la Figura 10 se observa que las larvas no presentan cambios en 10 días; por ello, en las experimentaciones B, C y D se estableció un tiempo de experimentación de 10 días.

En la Figura 12 se presenta la experimentación B, C y D; el tiempo que transcurrió para la adaptación fue de 10 días, que fue el tiempo aproximado antes de que se produjera la metamorfosis de la larva a una pupa del *T. molitor*

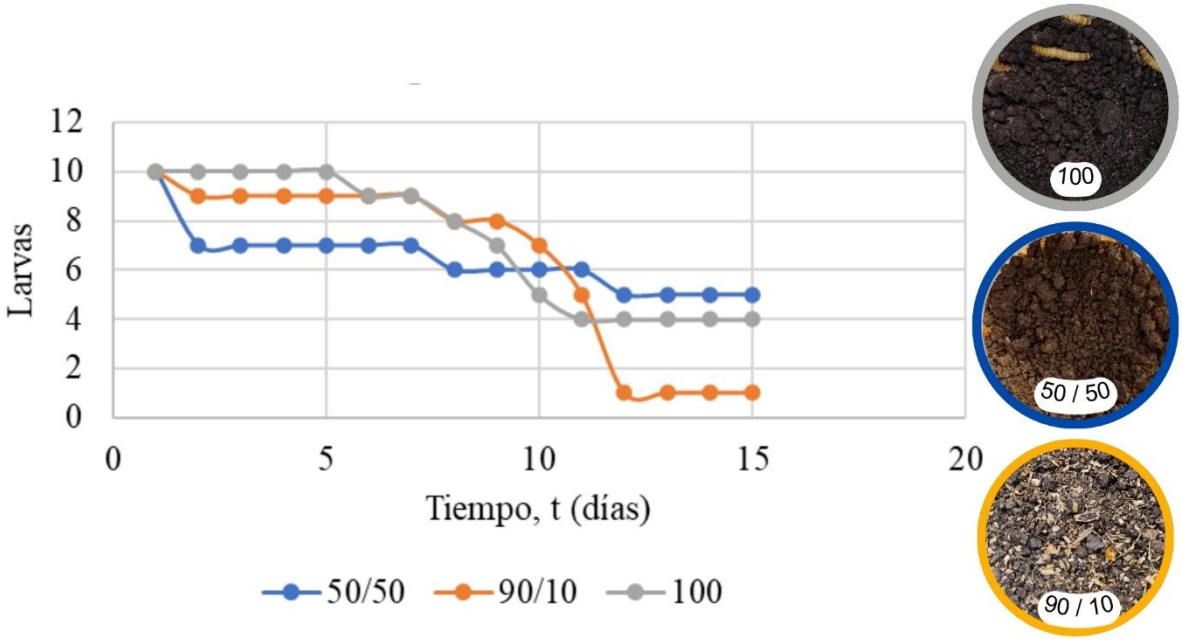

Figura 12. Periodo de adaptación, experimentación B, C y D.

En las experimentaciones C y D se observó la presencia de hongos en la larva, como se muestra en la Figura 13, por lo que se decidió elegir la experimentación B para la adaptación del *T. molitor*.

Figura 13. Crecimiento de hongos sobre *T. molitor* en las experimentaciones C y D.

El periodo de adaptación fue de 10 días; posteriormente, se continuó con la selección y disección de los especímenes y el cultivo en placa como se observa en la Figura 14.

Figura 14. Disección de *T. molitor*.

8.3. Cinética de crecimiento bacteriano para la bioaumentación.

La cinética de crecimiento para las bacterias hidrocarbonoclastas aisladas del suelo contaminado mostró su máximo valor a los 18 días con una absorbancia de 0.271 a 600 nm y una concentración de $3.2x10^8$ UFC/mL de acuerdo al método de turbidez estándar de McFarland (OMS, 2003), en la Figura 15 se puede observar una ligera línea oscura que es el hidrocarburo, la cual disminuyó progresivamente conforme transcurrió el tiempo, lo que sugirió su degradación por parte de las bacterias con afinidad hacia el contaminante. Los valores obtenidos para la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación se calcularon con base en las ecuaciones presentadas en el Apéndice A.

Tiempo de crecimiento (μ) = 0.09 d^{-1}

Tiempo de duplicación (td) = 7.17 d

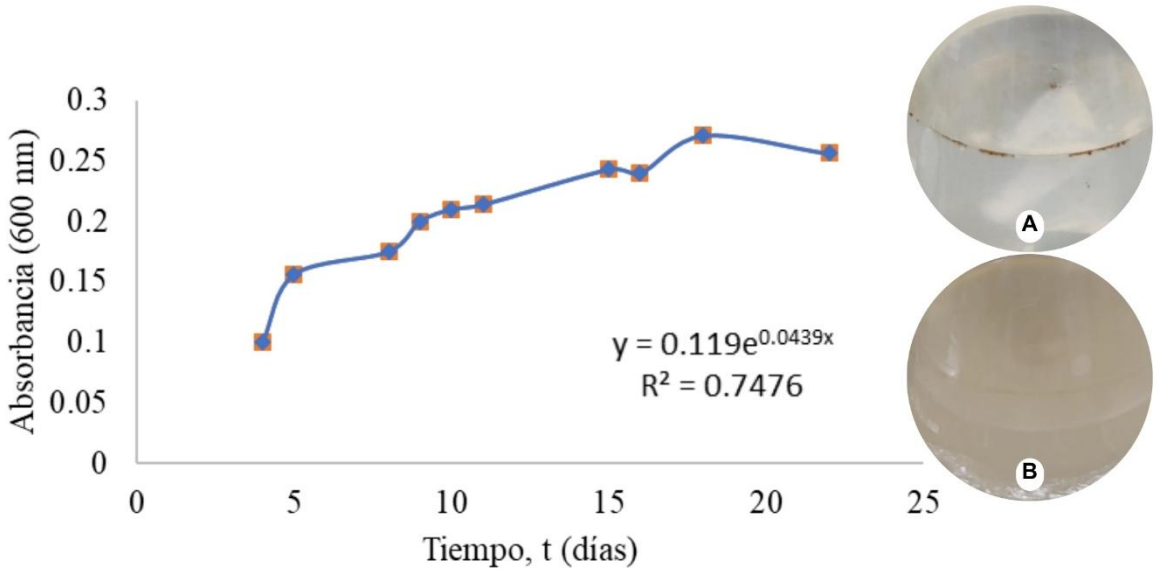

Figura 15. Cinética de crecimiento de bacterias hidrocarbonoclastas del suelo, medida a 600 nm. A) Se observó una línea oscura, correspondiente al hidrocarburo. B) Turbidez al final de la experimentación.

La cinética de crecimiento de las bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* presentó su máximo valor a los 15 días con un valor de absorbancia de 0.282 a 600 nm y una concentración de $3.3x10^8$ UFC/mL de acuerdo al método de turbidez estándar de McFarland (OMS, 2003), en la Figura 16 se puede observar una línea oscura asociada al hidrocarburo durante los primeros días, la cual dejó de observarse aproximadamente al día 14, lo que indicó una mayor afinidad y capacidad de degradación por parte de este consorcio bacteriano.

Tiempo de crecimiento (μ) = 0.11 d^{-1}

Tiempo de duplicación (td) = 5.99 d

La Figura 16 mostró un pico de absorbancia que posiblemente se debió a la temperatura constante en el área de microbiología durante esos días, atribuible a la carga de trabajo en el laboratorio.

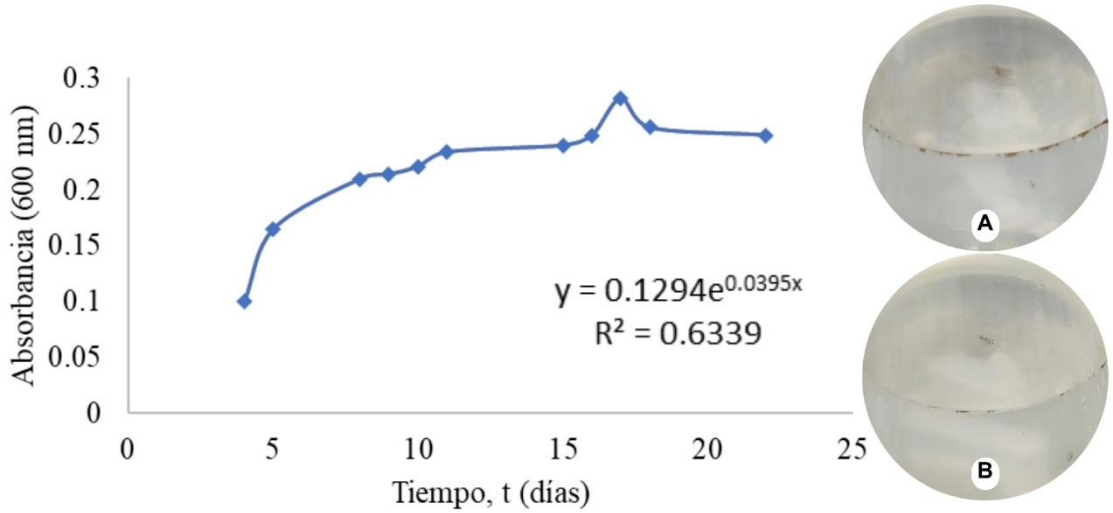

Figura 16. Cinética de crecimiento de bacterias del tracto digestivo de *T. molitor*: A) se observó una línea oscura correspondiente al hidrocarburo; B) línea del hidrocarburo a los 14 días.

La tasa de crecimiento específica $\mu = 0.11\ d^{-1}$ del *T. molitor* fue mayor que la de las bacterias hidrocarbonoclastas, $\mu = 0.09\ d^{-1}$; esto significaba que, bajo condiciones óptimas, las bacterias de *T. molitor* proliferaban más rápido en términos de población. Así, el tiempo de duplicación más corto fue en las bacterias *T. molitor*, con un td de 5.99 días; estas bacterias tenían una generación más rápida que las hidrocarbonoclastas, que tardaban 7.17 días en duplicarse. Esto sugiere una mayor eficiencia reproductiva en las bacterias de *T. molitor* y una mejor adaptación al contaminante, mientras que las bacterias hidrocarbonoclastas, al tener un tiempo de duplicación más prolongado, podrían requerir condiciones más específicas para proliferar, lo que puede influir en la biodegradación de hidrocarburos.

Las bacterias de *T. molitor* mostraron un crecimiento más rápido y un tiempo de duplicación más corto, lo que podría indicar una mayor capacidad de adaptación y reproducción en el suelo contaminado. En contraste, las hidrocarbonoclastas crecían más lentamente, lo que puede afectar su función ecológica en el proceso de remediación ambiental.

El proceso de aislamiento del tracto de *T. molitor* se muestra en la Figura 17. La disección se observa en la Figura 17-A. Las colonias que se formaron en la placa mostraron una coloración blanca, forma circular y una apariencia de tipo lechoso (Figura 17-B). La tinción de Gram,

por otro lado, mostró que era un coco Gram negativo que se distribuía de manera lineal como se observa en la Figura 17-C (Madigan *et al*., 2021).

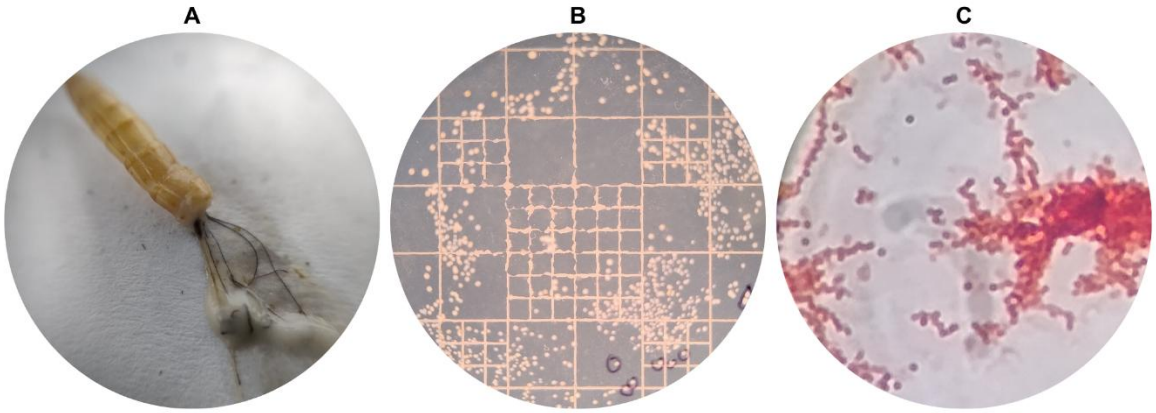

Figura 17. La imagen corresponde al *T. molitor*, A) Intestinos, B) crecimiento de bacterias C) Tinción de Gram.

El proceso de aislamiento de las bacterias hidrocarbonoclastas se muestra en la Figura 18. En la Figura 18-A se observa el suelo contaminado con hidrocarburos. Tras el proceso de extracción y siembra en placa, las bacterias desarrollaron colonias de color blanco, con forma circular y un aspecto lechoso (Figura 18-B).

En la Figura 18-C se observaron células bacterianas de morfología de cocoide a bacilar corta, distribuidas en cadenas y agregados ramificados, formando estructuras que recordaban a redes o microcolonias. La coloración predominantemente rojiza o rosada indicó una respuesta Gram negativa, lo que sugirió la presencia de bacterias con una pared celular característica de este grupo. No obstante, también se observaron agrupaciones densas que podrían corresponder a consorcios bacterianos o biopelículas en formación, fenómeno común en ambientes con alta carga de hidrocarburos (Madigan *et al*., 2021).

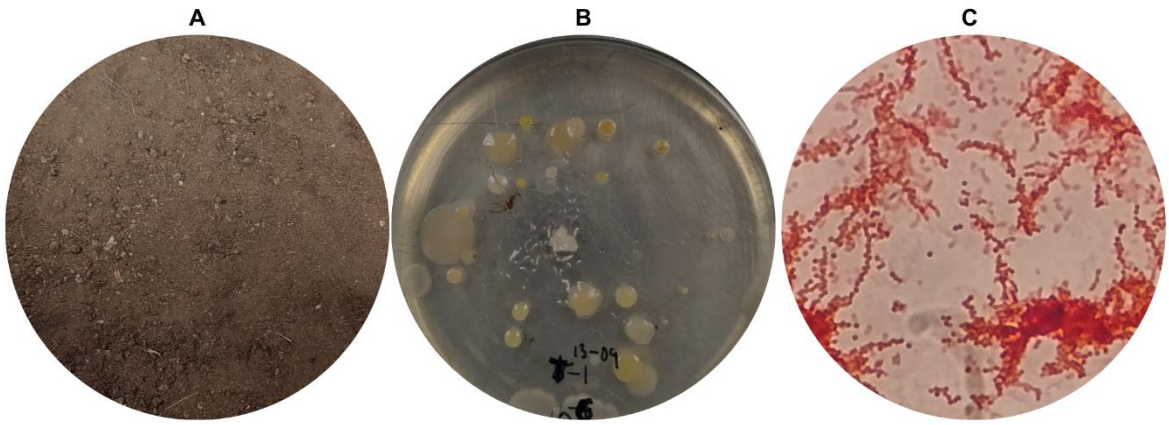

Figura 18. A) Suelo contaminado, B) Crecimiento de bacterias, C) Tinción de Gram

La organización en estructuras ramificadas o pseudofilamentosas puede asociarse con bacterias ambientales capaces de colonizar partículas del suelo y de participar en procesos de biodegradación de compuestos orgánicos complejos. En suelos contaminados con hidrocarburos es frecuente encontrar géneros bacterianos hidrocarbonoclásticos como *Pseudomonas, Acinetobacter, Alcaligenes, Rhodococcus o Arthrobacter*, que presentan una elevada capacidad metabólica para degradar compuestos de los hidrocarburos (Atlas & Bartha, 1998).

Asimismo, la formación de agregados celulares observada podría indicar el establecimiento de microconsorcios bacterianos, en los cuales diferentes especies cooperan metabólicamente para la transformación y mineralización de hidrocarburos. Este tipo de organización celular favorece la adhesión a partículas del suelo y a hidrocarburos, lo que incrementa la eficiencia de los procesos de biodegradación (Alexander, M., 1999).

Es importante señalar que la identificación taxonómica precisa de las bacterias no puede determinarse únicamente mediante la observación microscópica y la tinción de Gram. Para una caracterización más precisa se requerirían análisis complementarios, tales como el aislamiento en medios selectivos, la secuenciación del gen 16S rRNA o técnicas moleculares de identificación microbiana.

En conjunto, las características morfológicas observadas sugirieron la presencia de comunidades bacterianas ambientales potencialmente involucradas en procesos de

biorremediación, lo cual es consistente con la dinámica microbiana típica de suelos contaminados con hidrocarburos.

8.4. Degradación de Hidrocarburos de Fracción Pesada.

8.4.1. Degradación por atenuación natural.

El tratamiento testigo presentó la menor eficiencia de degradación de HFP en el transcurso del estudio experimental como se observa en la Figura 19. Aunque se registró una disminución gradual en la concentración del contaminante, esta fue limitada y se atribuyó principalmente a procesos de atenuación natural, tales como la actividad de la microbiota autóctona del suelo, la volatilización de fracciones más ligeras y fenómenos fisicoquímicos de adsorción. En términos globales, el tratamiento testigo alcanzó una remoción cercana al 13.85 %, valor considerablemente inferior al observado en los tratamientos bioaumentados.

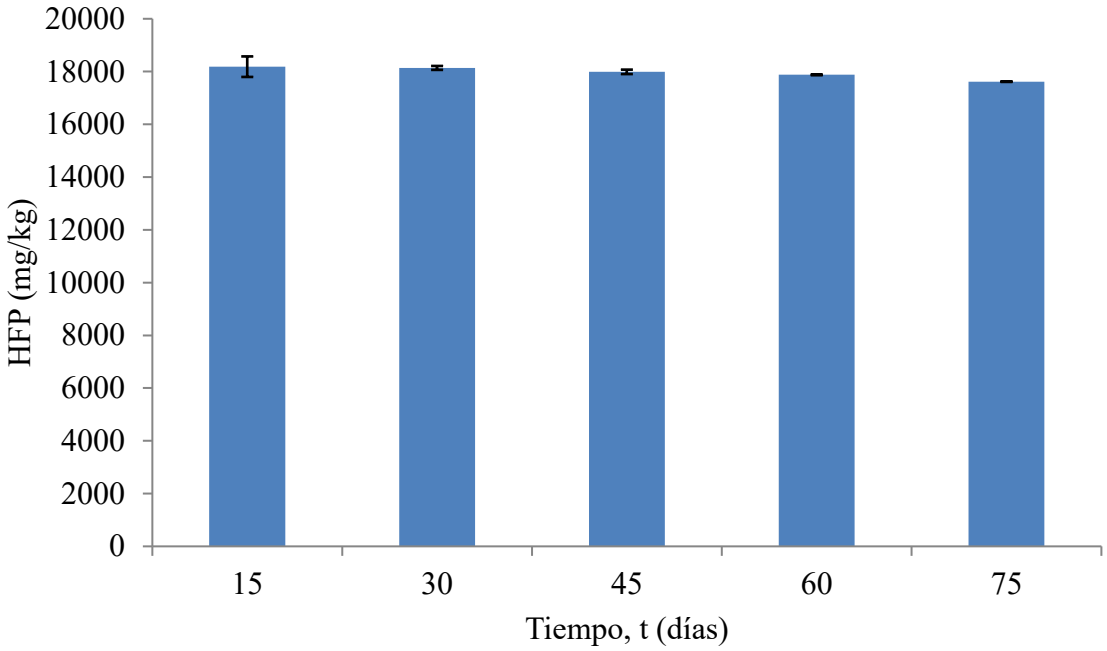

Figura 19. Tratamiento testigo, degradación del contaminante.

Desde el punto de vista cinético, el tratamiento testigo presentó la constante de degradación más baja, lo que indicaba que la velocidad de biodegradación del contaminante fue mínima en ausencia de inoculación microbiana. De manera consistente, también mostró la mayor vida media y el mayor tiempo estimado para alcanzar una degradación del 90 %, lo que evidencia que la remediación del suelo en condiciones naturales ocurrió de forma extremadamente lenta. Estos resultados confirman que, aunque existía cierta capacidad natural del sistema para transformar el contaminante, dicha capacidad no era suficiente para lograr una remoción eficiente en tiempos operativamente viables de 6 meses (Ferreira *et al*., 2025) a 24 meses (Sandoval Rojas *et al*., 2016). En conjunto, el comportamiento del tratamiento testigo sirve como línea base para demostrar el efecto de la bioaumentación. La baja degradación observada en este tratamiento indicó que la incorporación de microorganismos especializados fue determinante para favorecer la velocidad del proceso de biodegradación y optimizar la eficacia en la eliminación de hidrocarburos de fracción pesada.

8.4.2. Degradación por bioaumentación con bacterias Hidrocarbonoclastas.

El tratamiento bioaumentado con bacterias hidrocarbonoclastas mostró una disminución progresiva y significativa de la concentración de HFP a lo largo del periodo experimental, lo que evidenció la capacidad de este consorcio microbiano para utilizar compuestos hidrocarbonados como fuente de carbono y energía. En comparación con el tratamiento testigo, la bioaumentación con bacterias hidrocarbonoclastas incrementó significativamente la eficiencia de remoción del contaminante, alcanzando una degradación aproximada del 61.89 % al final del experimento. Este comportamiento confirma que la adición de microorganismos especializados favoreció la degradación del contaminante y aceleró el proceso de remediación del suelo, como se muestra en la Figura 20.

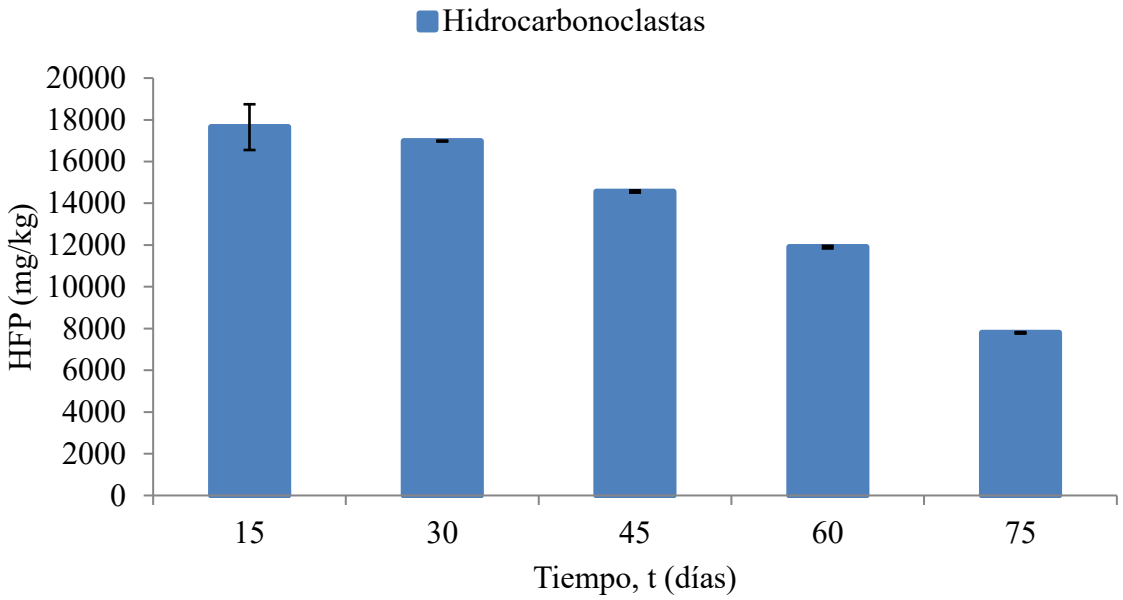

Figura 20. Tratamiento con bacterias hidrocarbonoclastas, para la degradación de contaminantes.

Desde el punto de vista cinético, este tratamiento presentó una constante de degradación considerablemente mayor que la observada en el control, lo que indicó una velocidad de biodegradación más alta. De forma consistente, la vida media del contaminante y el tiempo estimado para alcanzar una degradación del 90 % fueron sustancialmente menores que en el tratamiento testigo, lo que demuestra que la bioaumentación con bacterias hidrocarbonoclastas redujo significativamente el tiempo requerido para la remoción del contaminante. Estos resultados sugieren que los microorganismos inoculados tienen la capacidad de degradar HFP presentes en el suelo de manera más eficiente.

En términos generales, el tratamiento con bacterias hidrocarbonoclastas demostró que la bioaumentación constituye una estrategia eficaz para mejorar la biodegradación de HFP. No obstante, aunque este tratamiento mostró una eficiencia elevada, su desempeño fue inferior al observado con el tratamiento con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor*, lo cual indica que la composición microbiana o la capacidad metabólica de este último consorcio podría ser aún más favorable para la degradación de compuestos hidrocarbonados complejos.

El tratamiento bioaumentado con bacterias provenientes del tracto digestivo de *T. molitor* presentó la mayor eficiencia de degradación de HFP durante el periodo experimental. Desde los primeros muestreos se registró una reducción más pronunciada de la concentración del contaminante en comparación con los demás tratamientos. Esto demostró una elevada capacidad biodegradadora de este consorcio microbiano. Al final del experimento, este tratamiento alcanzó una remoción aproximada del 70.33 %, constituyéndose como el tratamiento más efectivo para la biorremediación del suelo contaminado, según se presenta en la Figura 21.

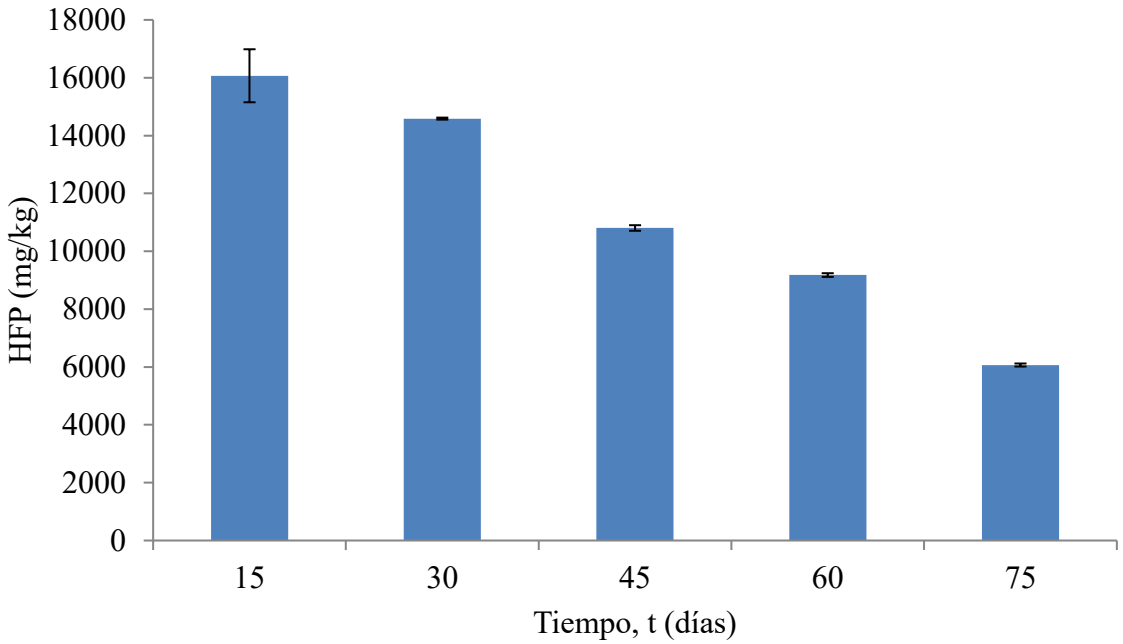

Figura 21. Tratamiento con bacterias del intestino de *T. molitor*, degradación contaminante.

Desde el enfoque cinético, el tratamiento presentó la mayor constante de degradación, lo que indicó una velocidad de biodegradación superior a la observada tanto en el tratamiento testigo como en el tratamiento con bacterias hidrocarbonoclastas. De manera consistente, mostró la vida media más corta del contaminante y el menor tiempo estimado para alcanzar una degradación del 90 %, lo que confirma que fue el sistema más eficiente en términos de rapidez y remoción global. Estos resultados permiten inferir que la microbiota intestinal de *T. molitor* posee una elevada capacidad metabólica para transformar compuestos

hidrocarbonados complejos, posiblemente debido a la presencia de consorcios microbianos adaptados a la transformación de materia orgánica de difícil asimilación.

En conjunto, el comportamiento de este tratamiento demostró que las bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* representan una opción biotecnológica altamente prometedora para la biorremediación de suelos contaminados con HFP. La mayor eficiencia observada frente a los otros tratamientos aplicados sugiere que este consorcio microbiano no solo favorece la degradación del contaminante, sino que además podría ofrecer ventajas metabólicas frente a otros microorganismos degradadores convencionales.

La bioaumentación con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* mostró la mayor eficiencia en la degradación de HFP, alcanzando una remoción del 70.33 % al final del experimento, superior la del tratamiento con bacterias hidrocarbonoclastas (61.89 %) y a la del control sin inoculación (13.85 %). La concentración inicial de HFP fue 20,449.9 ± 189.25 mg/kg en todos los reactores. Todos los tratamientos redujeron significativamente las concentraciones a lo largo del tiempo tal como se presenta en la Figura 22.

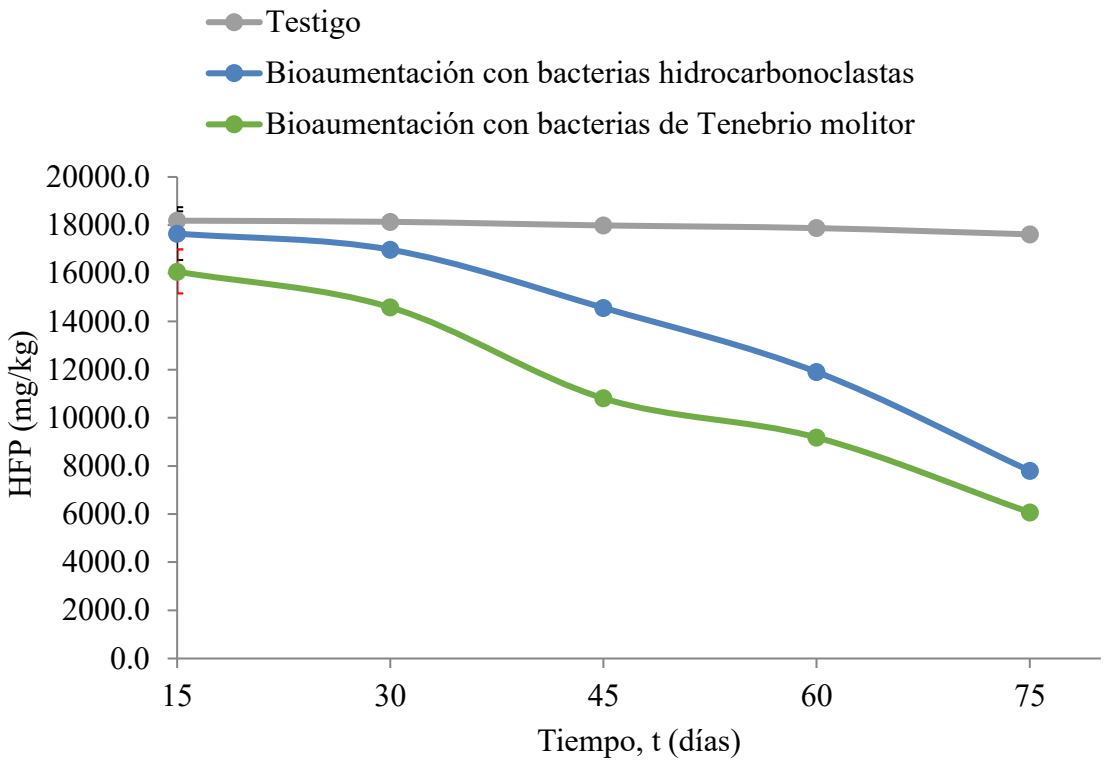

Figura 22. Concentración del contaminante en los tratamientos.

El tratamiento testigo presentó una reducción limitada de los HFP, lo que indicó que la atenuación natural del suelo, aunque presente, no fue suficiente para lograr una remoción eficiente del contaminante en el tiempo experimental establecido como se observa en la Figura 23. Por su parte, el tratamiento con bacterias hidrocarbonoclastas demostró una mejora significativa en la degradación, lo que confirma que la bioaumentación con microorganismos especializados favorece de manera significativa la remoción de hidrocarburos. Sin embargo, el tratamiento con bacterias obtenidas a partir del tracto digestivo de *T. molitor* fue el que mostró el mejor desempeño global, al presentar la mayor reducción de la concentración del contaminante y la mayor velocidad de biodegradación. Estos resultados sugieren, de manera preliminar, que la incorporación de consorcios microbianos con mayor capacidad metabólica incrementa la eficiencia del proceso de biorremediación, siendo particularmente notable el potencial de la microbiota asociada a *T. molitor*.

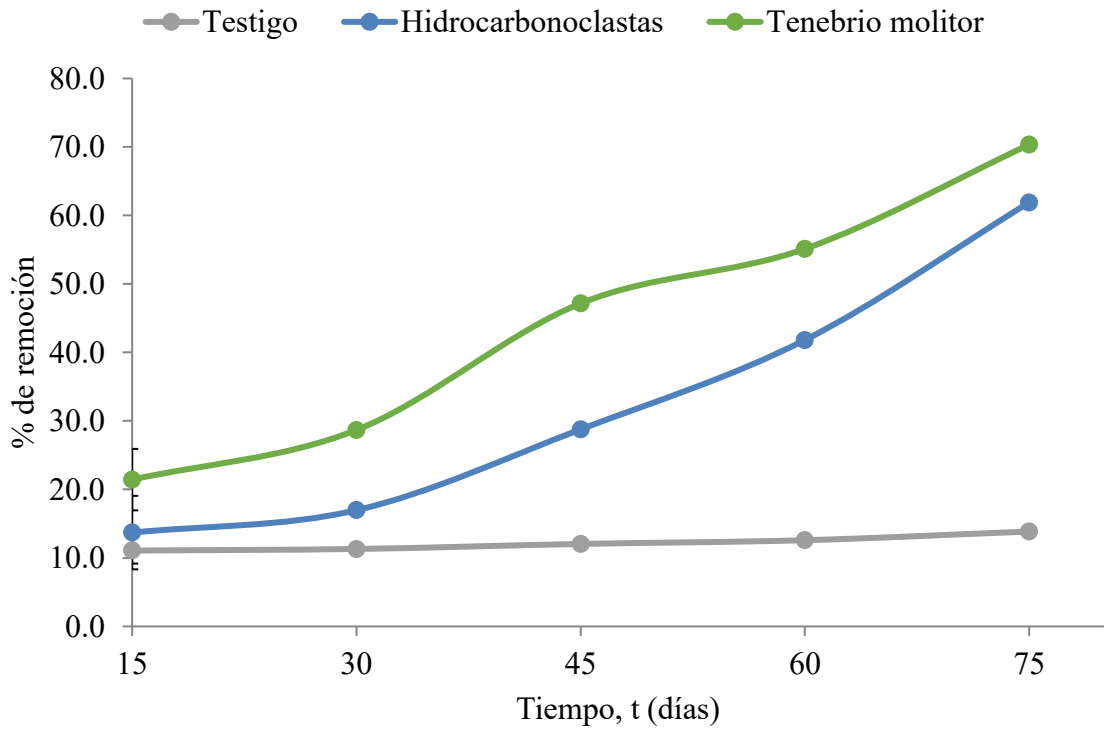

Figura 23. Eficiencia de remoción en cada tratamiento.

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman que la bioaumentación con bacterias hidrocarbonoclastas incrementa significativamente la eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos fracción pesada en suelos contaminados, en comparación con los procesos de atenuación natural. En este sentido, el tratamiento testigo mostró una remoción limitada (13.85 %), lo cual es consistente con lo reportado por García Pérez (2025), quien señala que la atenuación natural alcanza eficiencias bajas, aproximadamente del 11.4 %, debido a la limitada actividad microbiana autóctona y a la baja biodisponibilidad del contaminante. Este comportamiento evidencia que, sin intervención, los procesos de degradación pueden ser lentos y prolongarse durante varios años.

Por otro lado, la bioaumentación en este estudio permitió alcanzar porcentajes de remoción significativamente mayores. El tratamiento con bacterias hidrocarbonoclastas alcanzó 61.89 %, mientras que el tratamiento con bacterias provenientes del intestino de Tenebrio molitor logró el valor más alto (70.33 %). Estos resultados son comparables e incluso superiores a los obtenidos en sistemas biológicos más complejos, como los sistemas combinados de vermicomposteo y composteo con sargazo, que reportaron eficiencias de hasta 62 %. Esto sugiere que el uso de consorcios microbianos especializados puede ser eficiente.

Asimismo, los resultados coinciden con lo reportado por Bautista García (2021), quien demostró que el composteo bioaumentado con bacterias del tracto digestivo de Tenebrio molitor puede alcanzar eficiencias de remoción de hasta 87 % en presencia de cosustratos. Aunque el valor obtenido en el presente estudio (70.33 %) es inferior al máximo reportado por dicho autor, esta diferencia puede explicarse por la ausencia de cosustratos en el sistema experimental, los cuales han demostrado potenciar la actividad microbiana. El mismo autor señala que en ausencia de cosustratos la eficiencia puede disminuir considerablemente, alcanzando valores cercanos al 20 %, lo que resalta la importancia de las condiciones operacionales en los procesos de biorremediación.

Desde el punto de vista microbiológico, los resultados del presente estudio refuerzan la idea de que el tracto digestivo del *T. molitor* constituye una fuente importante de bacterias con alta capacidad metabólica para degradar hidrocarburos. Además, la mayor constante de degradación y menor vida media observadas en este estudio indican una cinética más favorable, lo que implica un proceso más rápido y eficiente. La superioridad del tratamiento

con bacterias del intestino de *T. molitor* sugiere que este consorcio microbiano no solo incrementa la magnitud de la degradación, sino también su velocidad, lo cual es crucial para aplicaciones a escala real.

Finalmente, al comparar los resultados globales, se puede establecer que la bioaumentación con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* representa una alternativa altamente eficiente, comparable o superior a otras estrategias de biorremediación reportadas, especialmente cuando se considera su simplicidad operativa frente a sistemas más complejos como el vermicomposteo. No obstante, los resultados también sugieren que la incorporación de cosustratos podría incrementar aún más la eficiencia del proceso, lo que representa una línea de investigación futura relevante.

9. Conclusiones.

La presente investigación demostró que la bioaumentación favoreció significativamente la degradación de hidrocarburos fracción pesada en un suelo contaminado, en comparación con la atenuación natural observada en el tratamiento testigo. Los resultados alcanzados indicaron que la incorporación de microorganismos especializados incrementa significativamente la eficiencia del proceso de biorremediación.

El tratamiento testigo presentó la menor remoción del contaminante, alcanzando aproximadamente 13.85 %, lo que indicó que la actividad natural del suelo no fue suficiente para lograr una degradación eficiente dentro del periodo experimental evaluado. Este comportamiento confirma que, en ausencia de inoculación microbiana, la reducción del contaminante es lenta y limitada.

En contraste, el tratamiento con bacterias hidrocarbonoclastas alcanzó una degradación considerablemente mayor, con una remoción aproximada de 61.89 %, lo que confirma la aptitud de estos microorganismos para aprovechar los hidrocarburos como fuente de carbono y energía. No obstante, el tratamiento con bacterias obtenidas a partir del tracto digestivo de *T. molitor* presentó el mejor desempeño, alcanzando una remoción de 70.33 %, por lo que se identificó como la alternativa más eficiente entre los tratamientos evaluados.

El análisis estadístico presentado en el anexo 1 corroboró que existieron diferencias significativas entre tratamientos, entre tiempos de muestreo y en la interacción tratamiento-tiempo, lo que demuestra que la degradación del contaminante dependió tanto del tipo de inóculo empleado como del tiempo de incubación. De igual manera, la prueba de Tukey confirmó diferencias significativas entre los tres tratamientos, lo que respalda estadísticamente la superioridad del tratamiento con bacterias provenientes del tracto digestivo de *T. molitor*.

Desde el punto de vista cinético, el modelo de primer orden describió adecuadamente la tendencia general de degradación y permitió estimar parámetros útiles para comparar la eficiencia de los tratamientos. En este sentido, el tratamiento con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* presentó la mayor constante de degradación, la menor vida media y el menor tiempo estimado para alcanzar una degradación del 90 % del contaminante, lo que demostró un incremento en la velocidad de biodegradación en comparación con los demás tratamientos.

En conjunto, los resultados obtenidos permitieron concluir que la bioaumentación constituye una estrategia efectiva para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos fracción pesada, y que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, las bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* representan el consorcio microbiano con mayor potencial para acelerar este proceso.

10. Recomendaciones.

De acuerdo con los resultados alcanzados en esta investigación, se recomienda evaluar el tratamiento con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* en periodos de incubación más prolongados, con el fin de determinar si es posible incrementar aún más el porcentaje de degradación de hidrocarburos fracción pesada y aproximarse a niveles de remoción superiores bajo condiciones controladas.

De igual manera, se recomienda ampliar la investigación mediante ensayos a mayor escala, con el objetivo de validar el desempeño de los tratamientos más eficientes en condiciones más cercanas a la aplicación en campo y determinar su viabilidad técnica para programas de biorremediación de suelos contaminados.

Finalmente, se sugiere profundizar en la caracterización microbiológica y molecular de las bacterias del tracto digestivo de *T. molitor*, a fin de identificar los grupos microbianos o rutas metabólicas responsables de la mayor eficiencia observada en la degradación de hidrocarburos fracción pesada.

11. Referencias.

Abdullah, S. R. S., Al-Baldawi, I. A., Almansoory, A. F., Purwanti, I. F., Al-Sbani, N. H., & Sharuddin, S. S. N. (2020). Plant-assisted remediation of hydrocarbons in water and soil: Application, mechanisms, challenges, and opportunities. Chemosphere, 247. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125932

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2024). Hidrocarburos totales de petróleo (TPH). Centers for Disease Control and Prevention.

Alexander, M. (1999). Biodegradation and Bioremediation (2nd ed.). Academic Press.

Ambaye, T. G., Chebbi, A., Formicola, F., Prasad, S., Gomez, F. H., Franzetti, A., & Vaccari, M. (2022). Remediation of soil polluted with petroleum hydrocarbons and its reuse for agriculture: Recent progress, challenges, and perspectives. Chemosphere, 293. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133572

Amin, A., Wahyuni A., Ekawati, A., Kurniawan A. (2022) Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) bioremediation by hydrocarbonoclastic degrading bacteria (Gordonia terrae), Earth and Environmental Science, (1036): 012028

Ángel-Sánchez, A., & Galián, J. (2022). Estudio de la microbiota del insecto tenebrio molitor en diferentes condiciones de luz y con dos dietas basadas en subproductos de la industria alimentaria. Anales de Veterinaria de Murcia, 36. https://doi.org/10.6018/analesvet.535101

Atlas, R. M., & Bartha, R. (1998). Microbial Ecology: Fundamentals and Applications (4th ed.). Benjamin/Cummings.

Aqeel, M., Jamil, Mohd., & Yusoff, I. (2014). Soil Contamination, Risk Assessment and Remediation. In Environmental Risk Assessment of Soil Contamination. InTech. https://doi.org/10.5772/57287

Auditoría Superior de la Federación. (2019). Auditoría de desempeño a Pemex Logística: Informe individual de auditoría. Informe de resultados de la fiscalización superior de la Cuenta Pública 2018. Auditoría Superior de la Federación. Recuperado de: https://www.asf.gob.mx/Trans/Informes/IR2018c/Documentos/Auditorias/2018_0474_a.pdf

ASF. (2019b). Auditoría 474-DE: Desempeño de la Empresa Productiva Subsidiaria Pemex Logística. México.

Banerjee, S., Maiti, T. K., & Roy, R. N. (2022). Enzyme producing insect gut microbes: an unexplored biotechnological aspect. Critical Reviews in Biotechnology, 42(3), 384–402. https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1942777

Bautista García, J. A. (2021). Composteo bioaumentado con bacterias de la larva Tenebrio molitor para el tratamiento de un suelo contaminado con hidrocarburos. Obtenido de: https://doi.org/10.24275/uama.6734.8739

Behera, I., Nayak, M., Biswas, S., Meikap, B., Sen, R. (2021). Enhanced biodegradation of total petroleum hydrocarbons by implementing a novel two-step bioaugmentation strategy using indigenous bacterial consortium, Journal of Environmental Management, 292, https://doi.uam.elogim.com/10.1016/j.jenvman.2021.112746.

Berzhanova, R. Z., Yessentayeva, K. Y., Mukasheva, T. D., Kassenova, A., Aralbayeva, A. A., Kudabayev, A., & Tursunova, K. (2021). Influence of hydrocarbon pollution on the

structure of the microbial community of soils of the zaburunye deposit. Eurasian Journal of Ecology, 68(3), 4–9. https://doi.org/10.26577/EJE.2021.v68.i3.01

Besha, A. T., Bekele, D. N., Naidu, R., Chadalavada, S. (2018). Recent advances in surfactant-enhanced In-Situ Chemical Oxidation for the remediation of non-aqueous phase liquid contaminated soils and aquifers. Environmental Technology & Innovation, 9, 303–322. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eti.2017.08.004

Bulak, P., Proc, K., Pytlak, A., Puszka, A., Gawdzik, B., & Bieganowski, A. (2021). Biodegradation of Different Types of Plastics by Tenebrio molitor Insect. Polymers, 13(20). https://doi.org/10.3390/polym13203508

Castro, D. J., Gutiérrez Benítez, O., Casals Pérez, E., Demichela, M., Godio, A., Chiampo, F. (2022). Bioremediation of Hydrocarbon-Polluted Soil: Evaluation of Different Operative Parameters. Applied Sciences, 12(4). https://doi.org/10.3390/app12042012

Comisión Nacional de Hidrocarburos. (2024). Consolidación de reservas de hidrocarburos de la Nación al 1° de enero de 2024. Gobierno de México. Recuperado de: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/921219/ConsolidaciondeReservas2024.pdf

Cervera, B. E. (1959). Tratado de microbiología (4ª ed.). México: Porrúa.

Centro de Estudios Sociales y de Opinión Pública. (2017). Robo de combustible: asalto a la nación. (Informe Legislativo No. 72). Cámara de Diputados. Recuperado de: https://www.cesop.diputados.gob.mx

Das, S., Dash, H. (2022) Microbial Biodegradation and Bioremediation, Elsevier, Second Edition, https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85455-9.00033-3

Falciglia, P. P., Roccaro, P., Bonanno, L., De Guidi, G., Vagliasindi, F. G. A., & Romano, S. (2018). A review on the microwave heating as a sustainable technique for environmental remediation/detoxification applications. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 95, 147–170. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.07.031

FAO. (2020). Propiedades físicas. Portal de suelos de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. http://www.fao.org/soils-portal/soil-survey/propiedades-delsuelo/propiedades-fisicas/es/

Fernández, L., Rojas, N., Roldán, T., Ramírez, M., Zegarra, H., Hernández, R., Ávila, J., Hernández, D., & Arce, J. (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.

Ferreira, C., Silva, T. N., Bezerra, N., & Pontes, A. (2025). Biodegradation of oil-derived hydrocarbons by marine actinobacteria: A systematic review. Environmental Pollution, 367, 125509. Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.125509

Ferronato, N., & Torretta, V. (2019). Waste Mismanagement in Developing Countries: A Review of Global Issues. International Journal of Environmental Research and Public Health, 16(6). https://doi.org/10.3390/ijerph16061060

Galvis, J. D., Quiñones, R. y Jiménez, P. (2016). Aislamiento de Microorganismos del Tracto Digestivo de Larvas de Coleópteros y Lepidópteros Detritívoros y Evaluación, In Vitro, de su Efecto Antagónico en una Cepa de Fusarium oxysporum. Revista Facultad de Ciencias Básicas, 5(1-2), 106–113. https://doi.org/10.18359/rfcb.2124

García Pérez, M. A. (2025). Remediación de un suelo contaminado con hidrocarburos fracción pesada utilizando la combinación de vermicomposteo y composteo con sargazo (Sargassum spp.). Obtenido de: https://doi.org/10.24275/uama.6734.13350

Geng, S., Qin, W., Cao, W., Wang, Y., Ding, A., Zhu, Y., Fan, F., & Dou, J. (2022). Pilot scale bioaugmentation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil using an indigenous bacterial consortium in soil-slurry bioreactors. Chemosphere, 287. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132183

Giannetto, A., Oliva, S., Riolo, K., Savastano, D., Parrino, V., Cappello, T., Maisano, M., Fasulo, S., & Mauceri, A. (2020). Waste Valorization via Hermetia Illucens to Produce Protein-Rich Biomass for Feed: Insight into the Critical Nutrient Taurine. Animals, 10(9). https://doi.org/10.3390/ani10091710

Grifoni, M., Rosellini, I., Angelini, P., Petruzzelli, G., & Pezzarossa, B. (2020). The effect of residual hydrocarbons in soil following oil spillages on the growth of Zea mays plants. Environmental Pollution, 265. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114950

Guavara, J., Serrano, L. I., Rodríguez, M. A., Hernández, G., Toribio, J., Toledo, E., & Romero, Y. (2022). Isolated bacteria from hot springs able to use hydrocarbons as carbon source. Revista Internacional De Contaminación Ambiental, 38, 68-77. https://doi.org/10.20937/RICA.54234

Gwenzi, W., Gufe, C., Alufasi, R., Makuvara, Z., Marumure, J., Shanmugam, S. R., Selvasembian, R., & Halabowski, D. (2024). Insects to the rescue? Insights into applications, mechanisms, and prospects of insect-driven remediation of organic contaminants. Science of The Total Environment, 925. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171116

Haider, F. U., Ejaz, M., Cheema, S. A., Khan, M. I., Zhao, B., Liqun, C., Salim, M. A., Naveed, M., Khan, N., Núñez-Delgado, A., & Mustafa, A. (2021). Phytotoxicity of petroleum hydrocarbons: Sources, impacts and remediation strategies. Environmental Research, 197. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111031

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2004). Edafología. Carta de suelos de México

Islam, M., Biswas, B., Smith, E., Naidu, R., Megharaj, M. (2018). Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil- a review, Chemosphere, 212:755-767. (Islam *et al*., 2018)

Jaffar, S., Ahmad, S., & Lu, Y. (2022). Contribution of insect gut microbiota and their associated enzymes in insect physiology and biodegradation of pesticides. Frontiers in Microbiology, 13. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.979383

Jung, C. M., Carr, M., Fleischman, E., & Roesch, C. J. (2021). Response of the green June beetle and its gut microbiome to RDX and phenanthrene. International Journal of Environmental Science and Technology, 18(7), 1785–1792. https://doi.org/10.1007/s13762-020-02960-1

Koshlaf, E., & Ball, A. S. (2017). Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. AIMS Microbiology, 3(1), 25–49. https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.1.25

Labud, V., Garcia, C., Hernandez, T. (2007). Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil, Chemosphere, (66): 1863-1871.

Li, L., Liu, Y., Zhang, Y., Wang, X., Liu, H., Liu, Q., Chen, S., & Zhou, G. (2024). Dynamic responses in Pseudomonas stutzeri M3 bioaugmentation of crude-oil-contaminated soil: Hydrocarbons, microbial community structures, and functional genes. Journal of Environmental Chemical Engineering, 12(1), 111863. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.111863

Li, Y.-T., Zhang, J.-J., Li, Y.-H., Chen, J.-L., & Du, W.-Y. (2022). Treatment of soil contaminated with petroleum hydrocarbons using activated persulfate oxidation, ultrasound, and heat: A kinetic and thermodynamic study. Chemical Engineering Journal, 428. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131336

Liu, J., Liu, J., Xu, B., Xu, A., Cao, S., Wei, R., Zhou, J., Jiang, M., & Dong, W. (2022). Biodegradation of polyether-polyurethane foam in yellow mealworms (Tenebrio molitor) and effects on the gut microbiome. Chemosphere, 304. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135263

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). Brock Biology of Microorganisms (16th ed.). Pearson.

Mallah, M. A., Changxing, L., Mallah, M. A., Noreen, S., Liu, Y., Saeed, M., Xi, H., Ahmed, B., Feng, F., Mirjat, A. A., Wang, W., Jabar, A., Naveed, M., Li, J.-H., & Zhang, Q. (2022). Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: An overeview. Chemosphere, 296. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133948

Meijer, N., de Rijk, T., van Loon, J. J. A., Zoet, L., & van der Fels-Klerx, H. J. (2021). Effects of insecticides on mortality, growth and bioaccumulation in black soldier fly (Hermetia illucens) larvae. PLOS ONE, 16(4), e0249362-. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249362

Mika, N., Zorn, H., & Rühl, M. (2013). Insect-Derived Enzymes: A Treasure for Industrial Biotechnology and Food Biotechnology. In A. Vilcinskas (Ed.), Yellow Biotechnology II: Insect Biotechnology in Plant Protection and Industry (pp. 1–17). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2013_204

Murena, F., & Gioia, F. (2009). Solvent extraction of chlorinated compounds from soils and hydrodechlorination of the extract phase. Journal of Hazardous Materials, 162(2), 661–667. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.05.081

OMS. (2003). Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de Importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo : Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis, Streptococcus pneum (p. WHO/CDS/CSR/RMD/2003.6). p. WHO/CDS/CSR/RMD/2003.6. Ginebra : Organización Mundial de la Salud.

Oudot, J., Ambles, A., Bourgeois, S., Gatellier, C., & Sebyera, N. (1989). Hydrocarbon infiltration and biodegradation in a landfarming experiment. Environmental Pollution, 59(1), 17–40. https://doi.org/10.1016/0269-7491(89)90019-5

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (1984).

OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests.

Petróleos Mexicanos. (2024a). Producción de petróleo crudo por tipo de crudo. Base de Datos Institucional (BDI). Recuperado de https://ebdi.pemex.com/bdi/bdiController.do?action=cuadro&cvecua=EPROEF

Petróleos Mexicanos. (2024b). Anuario estadístico 2024. Ciudad de México: PEMEX. Recuperado de: https://www.pemex.com/ri/Publicaciones/Anuario %20Estadistico %20Archivos/Anuario %20Estad %C3 %ADstico %202024.pdf

Petróleos Mexicanos. (2024c). Informe de sostenibilidad 2023. PEMEX.

Petróleos Mexicanos. (2026d). *Gobierno de México concluye contención de hidrocarburos en el mar y avanza en limpieza de playas del Golfo de México. Recuperado de: https://www.pemex.com/saladeprensa/boletines_nacionales/Paginas/20260316_conjunto.aspx

Petróleos Mexicanos. (2026e). Un buque y dos chapopoteras naturales, la causa de la emanación de hidrocarburos en Veracruz y Tabasco: GI. Recuperado de: https://www.pemex.com/saladeprensa/boletines_nacionales/Paginas/2026_31_nacional.aspx

Pepper, I. L., Gerba, C. P., Gentry, T. J. (2015). Environmental microbiology. Elsevier. (377–413).

Pisharody, L., Gopinath, A., Malhotra, M., Nidheesh, P. V, & Kumar, M. S. (2022). Occurrence of organic micropollutants in municipal landfill leachate and its effective treatment by advanced oxidation processes. Chemosphere, 287. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132216

Poi, G., Aburto-Medina, A., Mok, P. C., Ball, A. S., & Shahsavari, E. (2017). Large scale bioaugmentation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons using a mixed microbial consortium. Ecological Engineering, 102, 64–71. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.01.048

Polyak, Y., Bakina, L., Chugunova, M. V, Mayachkina, N., Gerasimov, A., & Bure, V. M. (2022). Bioaugmentation and Biostimulation: Comparison of Their Long-Term Effects on Ecotoxicity and Biological Activity of Oil-Contaminated Soil. In E. Saljnikov, L. Mueller, A. Lavrishchev, & F. Eulenstein (Eds.), Advances in Understanding Soil Degradation (pp. 361–377). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85682-3_17

Poddar, K., Sarkar, D., & Sarkar, A. (2019). Construction of potential bacterial consortia for efficient hydrocarbon degradation. International Biodeterioration & Biodegradation, 144, 104770. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104770

Purschke, B., Scheibelberger, R., Axmann, S., Adler, A., & Jäger, H. (2017). Impact of substrate contamination with mycotoxins, heavy metals and pesticides on the growth performance and composition of black soldier fly larvae (Hermetia illucens) for use in the feed and food value chain. Food Additives & Contaminants: Part A, 34(8), 1410–1420. https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1299946

Resh, V. H., & Cardé, R. T. (2009). Encyclopedia of Insects: Vol. 2nd ed. Academic Press. https://uam.elogim.com/authmeta/login.php?url=https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=e000xww&AN=297216&lang=es&site=eds-live&scope=site

Rodriguez-Campos, J., Perales-Garcia, A., Hernandez-Carballo, J., Martinez-Rabelo, F., Hernández-Castellanos, B., Barois, I., & Contreras-Ramos, S. M. (2019). Bioremediation of soil contaminated by hydrocarbons with the combination of three technologies: bioaugmentation, phytoremediation, and vermiremediation. Journal of Soils and Sediments, 19(4), 1981–1994. https://doi.org/10.1007/s11368-018-2213-y

Rodrigues, M., Cesar, D. E., Santos de Oliveira, R., de Paula Siqueira, T., & Tótola, M. R. (2020). Hydrocarbonoclastic bacterial species growing on hexadecane: Implications for bioaugmentation in marine ecosystems. Environmental Pollution, 267, 115579. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115579

Ruley, J. A., Amoding, A., Tumuhairwe, J. B., & Basamba, T. A. (2022). Chapter 14 - Rhizoremediation of petroleum hydrocarbon–contaminated soils: A systematic review of mutualism between phytoremediation species and soil living microorganisms. In R. A. Bhat, F. M. P. Tonelli, G. H. Dar, & K. Hakeem (Eds.), Phytoremediation (pp. 263–296). Academic Press. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89874-4.00008-X

Salam, M., Shahzadi, A., Zheng, H., Alam, F., Nabi, G., Dezhi, S., Ullah, W., Ammara, S., Ali, N., & Bilal, M. (2022). Effect of different environmental conditions on the growth and development of Black Soldier Fly Larvae and its utilization in solid waste management and pollution mitigation. Environmental Technology & Innovation, 28. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102649

Sandoval Rojas, M. E., García Rodríguez, G., Corona Romano, E. R., López Islas, H. A., Cuevas Viveros, M. A., & Martínez Ortiz, A. (2016). Informe técnico de la comparación de dos tecnologías para la biorremediación de lodos bentoníticos contaminados con hidrocarburo realizado para el Proyecto de Remediación Ambiental Texistepec (PRAT). Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Minatitlán. Recuperado de https://prodep.solicitudv3.tecnm.mx/archivospdf/Informes/Producto2591126.PDF

Sanluis-Verdes, A., Colomer-Vidal, P., Rodriguez-Ventura, F., Bello-Villarino, M., Spinola Amilibia, M., Ruiz-Lopez, E., Illanes-Vicioso, R., Castroviejo, P., Aiese Cigliano, R., Montoya, M., Falabella, P., Pesquera, C., Gonzalez-Legarreta, L., Arias-Palomo, E., Solà, M., Torroba, T., Arias, C. F., & Bertocchini, F. (2022). Wax worm saliva and the enzymes therein are the key to polyethylene degradation by Galleria mellonella. Nature Communications, 13(1), 5568. https://doi.org/10.1038/s41467-022-33127-w

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2000). Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2005). Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y los lineamientos para su muestreo y remediación. Diario Oficial de la Federación.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales & Secretaría de Salud. (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y los lineamientos para su muestreo y remediación, con el objetivo de proteger la salud humana y el medio ambiente. Diario Oficial de la Federación.

Sun, S., Su, Y., Chen, S., Cui, W., Zhao, C., & Liu, Q. (2022). Bioremediation of oil contaminated soil: Exploring the potential of endogenous hydrocarbon degrader Enterobacter sp. SAVR S-1. Applied Soil Ecology, 173. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104387

Tang, Z.L., Kuo, T.A., Liu, H.H., (2017). The study of the microbes degraded polystyrene. Adv. Technol. Innovation. 2, 13–17.

United States Environmental Protection Agency. (2004). Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) hazardous waste regulations. Washington, DC: USEPA. Retrieved from https://www.epa.gov/hw

Vandana, M., Mahto, U., & Das, S. (2022). Mechanism of toxicity and adverse health effects of environmental pollutants. En S. Das & H. R. Dash (Eds.), Microbial biodegradation and bioremediation. 2ª ed., 33–53. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85455-9.00024-2

Wang, H., Chen, P., Zhang, S., Jiang, J., Hua, T., & Li, F. (2022a). Degradation of pyrene using single-chamber air-cathode microbial fuel cells: Electrochemical parameters and bacterial community changes. Science of The Total Environment, 804. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150153

Wang, Y., Luo, L., Li, X., Wang, J., Wang, H., Chen, C., Guo, H., Han, T., Zhou, A., & Zhao, X. (2022b). Different plastics ingestion preferences and efficiencies of superworm (Zophobas atratus Fab.) and yellow mealworm (Tenebrio molitor Linn.) associated with distinct gut microbiome changes. Science of The Total Environment, 837. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155719

Yang, S.-S., Ding, M.-Q., He, L., Zhang, C.-H., Li, Q.-X., Xing, D.-F., Cao, G.-L., Zhao, L., Ding, J., Ren, N.-Q., & Wu, W.-M. (2021). Biodegradation of polypropylene by yellow mealworms (Tenebrio molitor) and superworms (Zophobas atratus) via gut-microbe dependent depolymerization. Science of The Total Environment, 756. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144087

Yang, S. S., Ding, M. Q., Ren, X. R., Zhang, Z. R., Li, M.-X., Zhang, L. L., Pang, J. W., Chen, C. X., Zhao, L., Xing, D. F., Ren, N. Q., Ding, J., & Wu, W. M. (2022). Impacts of physical-chemical property of polyethylene on depolymerization and biodegradation in yellow and dark mealworms with high purity microplastics. Science of The Total Environment, 828. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.15445

Yang, Y., Yang, J., Wu, W, Zhao, J., Song, Y., Gao, L., Yang, R., yJiang, L. (2015). Biodegradation and Mineralization of Polystyrene by Plastic-Eating Mealworms: Part 1. Chemical and Physical Characterization and Isotopic Tests. Environmental Science and Technology, 49(20), 12080-12086. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02661

Anexo 1

Análisis estadístico

Concentración de HFP

Los datos obtenidos en los muestreos permitieron comparar las concentraciones de HFP entre los tres tratamientos (Blanco, Hidrocarbonoclastas, *T. molitor*). Para ello se calcularon estadísticos descriptivos (media ± desviación estándar) de las concentraciones HFP a partir de los datos del experimento. Los resultados se presentan en la Tabla 07.

La concentración inicial de HFP fue 20449.9 ± 189.25 mg/kg en todos los reactores. Todos los tratamientos redujeron significativamente las concentraciones a lo largo del tiempo. La comparación permitió identificar el tratamiento con menor concentración residual en cada muestreo.

Tabla 07. Concentración de HFP (mg/kg) por tratamiento y muestreo

Muestreo	**Control (B) (mg/kg)**	**Hidrocarbonoclastas (H) (mg/kg)**	***T. molitor* (T) (mg/kg)**
Inicial	20449.9 ± 189.3	20449.9 ± 189.3	20449.9 ± 189.3
M1	18184.8 ± 609.1	17649.0 ± 1030.0	16067.8 ± 1119.0
M2	18137.3 ± 150.6	16980.7 ± 158.1	14585.9 ± 108.8
M3	17988.0 ± 105.5	14566.0 ± 110.4	10805.0 ± 142.4
M4	17876.0 ± 71.6	11899.0 ± 124.2	9177.3 ± 98.0
M5	17617.0 ± 71.5	7793.0 ± 68.2	**6067.0 ± 84.5**

La Tabla 07 muestra que la bioaumentación T mantuvo consistentemente la menor concentración de HFP en todos los muestreos, alcanzando 6,067.0 ± 84.5 mg/kg en M5 frente a 17,617.0 ± 71.5 mg/kg del control.

Porcentaje de remoción

Con el propósito de normalizar en la tabla 08 se presentan los resultados respecto a la concentración inicial (C_0 = 20449.9 ± 189.25 mg/kg) y permitir una comparación de eficiencia, se calculó el porcentaje de remoción para cada tratamiento y muestreo mediante la fórmula:

$$\%Rem = [(C_0 - C_t) / C_0] \times 100$$

Donde:

%Rem Porcentaje de remoción

C_0 Concentración inicial

C_t Concentración en tiempo t

× 100 Convertir a porcentaje

Este análisis cuantifica la efectividad relativa de cada estrategia de bioaumentación frente al proceso natural.

Tabla 08. Porcentaje de remoción de HFP respecto a concentración inicial

Muestreo	**Control (B) %**	**Hidrocarbonoclastas (H) %**	***T. molitor* (T) %**
M1	11.08	13.70	21.43
M2	11.31	16.96	28.68
M3	12.04	28.77	47.16
M4	12.59	41.81	55.12
M5	13.85	61.89	**70.33**

El tratamiento con bacterias de *T. molitor* alcanzó la mayor eficiencia de remoción (70.33 % en M5), superando al tratamiento con hidrocarbonoclastas (61.89 %) en 8.44 puntos porcentuales. Ambos superaron ampliamente al control natural (13.85 %), confirmando la efectividad de la bioaumentación.

ANOVA entre tratamientos

Para evaluar el efecto de los tratamientos y del tiempo de incubación sobre la degradación de HFP en suelo contaminado, se aplicó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos factores).

Este análisis estadístico se presenta en la tabla C, permitió determinar si existen diferencias significativas entre las medias de varios grupos cuando se consideran simultáneamente dos factores experimentales. En este estudio, los factores analizados fueron:

• Tratamiento, con tres niveles: blanco (B), bioaumentación con bacterias hidrocarbonoclastas (H) y bioaumentación con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* (T).

• Tiempo, correspondiente a los cinco muestreos realizados durante el experimento (cada 15 días, por lo que la unidad de tiempo muestral es de M=15 días).

El ANOVA de dos vías se resumen en la tabla 09, nos permitió evaluar tres efectos principales:

1. El efecto del tratamiento sobre la concentración de HFP.

2. El efecto del tiempo en la degradación del contaminante.

3. La interacción tratamiento × tiempo, que indicó si el comportamiento de los tratamientos cambia a lo largo del tiempo.

Modelo del ANOVA de dos vías:

$$Yijk = \mu + \alpha i + \beta j + (\alpha\beta)ij + \varepsilon ijk$$

Donde:

Yijk valor observado de la concentración de hidrocarburos en la observación k, tratamiento i y tiempo j.

μ media general del experimento.

αi efecto del tratamiento i.

βj efecto del tiempo j.

(αβ)ij interacción entre tratamiento y tiempo.

εijk error experimental.

Tabla 09. ANOVA para la degradación de HFP

Fuente de variación	**Suma de cuadrados**	**Gl**	**F**	**p**
Tratamiento	7.90×10^8	2	1935.78	<0.001
Tiempo	9.06×10^8	4	1109.98	<0.001
Tratamiento × Tiempo	2.73×10^8	8	167.21	<0.001
Error	2.14×10^7	105	-	-

Los resultados del análisis de varianza mostraron que tanto el tratamiento aplicado como el tiempo tuvieron un efecto significativo sobre la concentración de hidrocarburos fracción pesada en el suelo contaminado ($p < 0.001$).

El factor tratamiento presentó un valor de F elevado ($F = 1935.78$), lo que indicó que existen diferencias significativas en la eficiencia de degradación entre los diferentes tratamientos evaluados.

De igual manera, el factor tiempo mostró un efecto significativo ($F = 1109.98$), evidenciando que la concentración de hidrocarburos disminuyó progresivamente a lo largo del periodo experimental.

Asimismo, la interacción tratamiento × tiempo resultó estadísticamente significativa ($F = 167.21$; $p < 0.001$), lo que indicó que la velocidad de degradación del contaminante depende del tratamiento aplicado y varía a lo largo del tiempo.

Estos resultados confirman que la bioaumentación influye significativamente en la degradación de hidrocarburos fracción pesada, siendo los tratamientos inoculados con bacterias más eficientes que el control.

Comparación de tratamientos (Prueba Tukey HSD)

Una vez identificado mediante el análisis de varianza (ANOVA) que existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, es necesario aplicar una prueba de comparación múltiple que permitió determinar específicamente entre qué tratamientos se presentan dichas diferencias.

Para este propósito se utilizó la prueba Tukey HSD (Honest Significant Difference), la cual permitió comparar todas las medias posibles entre los grupos experimentales controlando el error tipo I acumulado.

En la tabla 10 se presentan los datos de la prueba de Tukey que se aplicó para comparar los tres tratamientos evaluados en el proceso:

Blanco (B)

Bacterias hidrocarbonoclastas (H)

Bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* (T)

Este análisis permitió identificar cuál tratamiento presentó una eficiencia significativamente mayor en la degradación del contaminante.

Modelo matemático de Tukey

$HSD = q * \sqrt{(MSerror / n)}$

Donde:

HSD diferencia significativa mínima entre medias

q valor crítico de la distribución de Tukey

MSerror cuadrado medio del error obtenido del ANOVA

n número de observaciones por grupo

Tabla 10. Comparación múltiple entre tratamientos

Comparación	Diferencia de medias	Significancia
Blanco vs Hidrocarbonoclastas	significativa	$p < 0.001$
Blanco vs Tenebrio	significativa	$p < 0.001$
Hidrocarbonoclastas vs Tenebrio	significativa	$p < 0.001$

Los resultados de la prueba de Tukey HSD indicó que existen diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos evaluados.

En primer lugar, se observó que los tratamientos bioaumentados presentaron concentraciones de hidrocarburos significativamente menores en comparación con el tratamiento control, lo que demostró la efectividad de la bioaumentación en la degradación del contaminante.

Asimismo, la comparación entre los tratamientos bioaumentados mostró que el tratamiento inoculado con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* presentó una degradación mayor que el tratamiento con bacterias hidrocarbonoclastas.

Estos resultados sugieren que la microbiota intestinal de *T. molitor* posee un mayor potencial metabólico para la degradación de hidrocarburos fracción pesada en suelo contaminado.

Tabla11. Medias de concentración de HFP por tratamiento

Tratamiento	Concentración HFP (mg/kg)
B	17960.62 ± 338.36 a
H	13777.54 ± 3680.01 b
T	11340.60 ± 3696.77 c

Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey HSD, $p < 0.05$).

Los resultados de la tabla 11 muestran que existen diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos evaluados.

El tratamiento control presentó las mayores concentraciones de hidrocarburos fracción pesada, indicando una degradación mínima atribuible únicamente a procesos de atenuación natural.

Por otro lado, los tratamientos bioaumentados mostraron reducciones significativas del contaminante. En particular, el tratamiento inoculado con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* presentó las concentraciones más bajas de hidrocarburos, evidenciando una mayor eficiencia en la biodegradación.

El orden de eficiencia observado fue:

T. molitor > Hidrocarbonoclastas > Control

Los resultados de la prueba de Tukey confirmaron que la bioaumentación mejora significativamente la degradación de hidrocarburos fracción pesada en suelo contaminado.

Asimismo, el tratamiento con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* presentó una eficiencia superior en comparación con las bacterias hidrocarbonoclastas aisladas, lo que sugiere que la microbiota intestinal del insecto posee un alto potencial metabólico para la degradación de compuestos hidrocarbonados complejos.

Modelo cinético

Con el fin de describir cuantitativamente la velocidad de degradación de los HFP durante el proceso de bioaumentación, se aplicó un modelo cinético de biodegradación para representar matemáticamente la relación entre la concentración del contaminante y el tiempo, lo cual permitió estimar parámetros importantes del proceso de biodegradación, tales como la constante de degradación y la velocidad de remoción del contaminante.

En este estudio se utilizó un modelo cinético de primer orden, el cual es ampliamente aplicado en procesos de degradación de compuestos orgánicos en sistemas ambientales.

Ecuación del modelo cinético de primer orden:

$\ln(C / C0) = -k * t$

C concentración del contaminante en el tiempo t

C0 concentración inicial del contaminante

k constante de degradación

t tiempo

ln logaritmo natural

Tabla 12. Parámetros cinéticos de biodegradación

Tratamiento	**k (1/tiempo)**	**R^2**
B	0.0078	0.94
H	0.199	0.89
T	0.241	0.96

Cálculo de la vida media de degradación

La vida media se calcula mediante:

$t1/2 = \ln(2) / k$

Tabla 13 vida media

Tratamiento	**Vida media**
B	88.9
H	3.48
T	2.87

El modelado cinético mostró diferencias claras en la velocidad de degradación entre los tratamientos evaluados como se observa en la tabla 12.

El tratamiento control presentó una constante de degradación muy baja, lo que indicó que la reducción del contaminante ocurrió principalmente por procesos de atenuación natural.

En contraste, los tratamientos bioaumentados mostraron valores de la constante de degradación significativamente mayores, indicando una mayor velocidad de biodegradación del contaminante.

El tratamiento inoculado con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* presentó la mayor constante cinética de degradación y la menor vida media del contaminante como se observa en la tabla 13, lo que evidencia su mayor eficiencia en la degradación de hidrocarburos fracción pesada.

Comparación de velocidades de degradación

Con el propósito de evaluar y comparar la rapidez con la que los diferentes tratamientos degradaron los HFP, se realizó un análisis de comparación de velocidades de degradación que se presentan en la tabla 14.

De esta manera, es posible comparar cuantitativamente la rapidez del proceso de biodegradación entre los tratamientos evaluados, identificando aquellos que presentan mayor potencial para la remediación de suelos contaminados.

La velocidad de degradación se presenta en la tabla H y se obtiene a partir del modelo cinético de primer orden:

$\ln(C / C0) = -k * t$

Donde:

C concentración del contaminante en el tiempo t

C0 concentración inicial del contaminante

k constante de degradación

t tiempo

ln logaritmo natural

Tabla 14. Velocidad de degradación para cada tratamiento

Tratamiento	**Constante k**	**Velocidad relativa**	**R^2**
B	0.0078	muy baja	0.94
H	0.199	alta	0.89
T	0.241	muy alta	0.96

Comparación relativa de velocidades

Las velocidades de degradación se presentan en la tabla 15 y se utilizó la ecuación:

Velocidad relativa = ki / kcontrol

Tabla 15. velocidad relativa de degradación

Tratamiento	**Velocidad relativa**
B	1
H	25.5
T	30.9

La velocidad relativa de degradación se calculó comparando la constante cinética de cada tratamiento con la constante obtenida para el tratamiento control. Los resultados indican que el tratamiento con bacterias hidrocarbonoclastas degradó los hidrocarburos aproximadamente 25 veces más rápido que el control, mientras que el tratamiento con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* presentó una velocidad de degradación aproximadamente 31 veces mayor que la observada en el control.

Tiempo para degradar el 90 % del contaminante (t_{90})

Además de evaluar la constante cinética y la vida media del proceso de biodegradación, se estimó el tiempo requerido para degradar un porcentaje específico del contaminante presente en el sistema.

Uno de los parámetros más utilizados que se observa en la Tabla 16 es el tiempo para degradar el 90 % del contaminante (t_{90}), el cual representa el tiempo necesario para que la concentración del compuesto se reduzca al 10 % de su valor inicial.

Este parámetro permitió:

• estimar el tiempo necesario para alcanzar niveles muy bajos del contaminante

• comparar la eficiencia de distintos tratamientos de biorremediación

• evaluar la viabilidad de aplicar un tratamiento a escala real

Mientras que parámetros como la vida media indican el tiempo para reducir la concentración a la mitad, el parámetro t_{90} proporciona una estimación más cercana al tiempo requerido para una remoción casi completa del contaminante.

El cálculo de t_{90} se deriva del modelo cinético de primer orden:

$\ln(C / C_0) = -k * t$

donde:

C concentración del contaminante en el tiempo t

C_0 concentración inicial del contaminante

k constante cinética de degradación

t tiempo

ln logaritmo natural

Tabla 16. Tiempo para degradar el 90 % del contaminante

Tratamiento	**k**	**t_{90}**
B	0.0078	295
H	0.199	11.6
T	0.241	9.6

Los resultados obtenidos muestran diferencias significativas en el tiempo requerido para alcanzar una degradación del 90 % del contaminante entre los tratamientos evaluados.

El tratamiento control presentó el mayor valor de t_{90}, indicando que el proceso de degradación natural del contaminante ocurre a una velocidad muy lenta.

Por el contrario, los tratamientos bioaumentados redujeron considerablemente el tiempo requerido para alcanzar una degradación del 90 %. En particular, el tratamiento inoculado con bacterias del tracto digestivo de *T. molitor* presentó el menor valor de t_{90}, lo que evidencia su mayor eficiencia en la biodegradación de hidrocarburos fracción pesada.

Apéndice A

Tiempo de duplicación

$$y = (a)(e)^{(b)(x)}$$

Donde:

x = tiempo

y = es la variable dependiente.

x = es la variable independiente.

a,b = son los coeficientes de la regresión

Tiempo de duplicación:

Velocidad especifica de crecimiento

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{N_f}{N_0}\right)}{\Delta t}$$

μ = velocidad especifica de crecimiento (h^-1)

N_f = número final de células

N_0= número inicial de células

Δt = Intervalo de tiempo

Apéndice B

Aislamiento de Bacterias del tracto digestivo de *T. molitor*

Se seleccionan las larvas de *T. molitor*. que se van a diseccionar. La disección es preparada de acuerdo con el método de Galvis *et al*. (2016) adaptado para la larva *T. molitor*. en un área y material estéril como se describe a continuación:

1. La larva se lleva a un ambiente con temperatura por debajo de 4°C por 30 minutos.

4. La larva se coloca en una placa Petri de 35x10 mm ayudándose con pinzas de disección.

5. Después, se realiza la disección con una navaja previamente esterilizada; se realizan dos cortes transversales (uno en la zona del ano y otro en la zona cefálica) y un corte longitudinal cuidando de no dañar el tracto de la larva.

6. Con ayuda de pinzas de disección, se extrae el intestino y se coloca en un microtubo Eppendorf con 0.9 mL de solución salina de cloruro de sodio (NaCl) al 0.85 %.

7. El paso 4, 5 y 6 se repitió hasta obtener el intestino de 10 larvas.

8. Posteriormente el tubo se agita en un Vortex para homogenizar la solución.

9. Se toma 0.1 mL para sembrar en placa con agar nutritivo. Las placas se incubaron boca abajo a 30 °C por 24 horas.

Aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas del suelo

Aislamiento de bacterias del suelo contaminado fue de acuerdo con el método de Guavara *et al*., (2022), modificado para bacterias hidrocarbonoclastas. Este procedimiento se debe realizar preferiblemente dentro de un área estéril.

1. Colocar 5 g de suelo en un tubo falcón estéril de 50 mL, adicionar agua estéril o solución salina hasta completar un volumen de 50 mL. A esta primera solución de suelo se denomina “Solución Stock”. Agitar la solución Stock con el agitador mecánico Vortex, obteniéndose la suspensión para iniciar las soluciones seriadas.

2. Transferir 1 mL (mililitro) de la solución stock (previamente agitada) a un primer tubo estéril conteniendo 9 mL de agua destilada estéril, obteniendo un volumen total de 10 mL, la cual se denomina “primera suspensión”. Colocar esta primera suspensión en el agitador Vortex para su correcta mezcla obteniéndose la “primera dilución Vortex” de 10^{-1}.

3. Con la primera dilución 10^{-1} se repite el procedimiento anterior. Colocar 1 mL de la primera dilución en un segundo tubo falcón conteniendo 9 mL de agua destilada estéril, los 10 mL de suspensión obtenida es agitada para su correcta mezcla obteniéndose la “segunda dilución” a 10^{-2}.

4. Para obtener la cuarta, quinta y demás diluciones, se debe repetir este procedimiento en forma sucesiva hasta lograr todas las diluciones deseadas. Para propósitos del proyecto se obtuvo hasta la dilución 10^{-7}.

5. Para sembrar se preparó AGAR Noble estéril en placas Petri. Se tomo los tubos con las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} agitándolo en el Vortex para mantener los organismos en suspensión. Inmediatamente se tomó 0.1 mL del tubo y se depositó en el centro de la superficie de la placa.

6. Con la espátula de Drigaslky se realizó barridos sobre la superficie del medio de cultivo, extendiendo en toda la placa la muestra diluida de 0.1 mL previamente depositada.

7. Se llevó a incubar las placas a 25°C durante 72 horas. Si el crecimiento de colonias es lento, prolongar el tiempo hasta las 96 ó 120 horas para lograr un mejor desarrollo de colonias.

Apéndice C

1. Identificación de datos relevantes:

- Concentración baja: 960 ppm (donde la mortalidad fue del 40 %).

- Concentración alta: 1440 ppm (donde la mortalidad fue del 70 %).

- Queremos calcular la concentración (DL_{50}) en la que se alcanzaría exactamente un 50 % de mortalidad.

2. Fórmula básica:

La DL_{50} se encuentra usando una regla de tres, interpolando entre las concentraciones baja y alta:

DL_{50} = concentración baja + [(50 % - mortalidad baja) / (mortalidad alta - mortalidad baja)] × (concentración alta - concentración baja)

3. Sustituimos los valores:

$CL_{50} = 960 + [(50 - 40) / (70 - 40)] \times (1440 - 960)$

$CL_{50} = 960 + 160 = 1120$ ppm

Así, la concentración letal media (CL_{50}) es 1120 ppm, lo que significa que esta es la concentración en la que se espera un 50 % de mortalidad en las larvas.