



UNIVERSIDAD DE QUINTANA ROO

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

***Estudio de la participación microbiana presente en un suelo
contaminado con hidrocarburos en los procesos de
biorremediación.***

Tesis para obtener el grado de:
INGENIERA AMBIENTAL

Presenta:
ELENA ALCOCER REYES

Director de Tesis
Dra. Elizabeth Miranda Tello

Chetumal, Quintana Roo, México Junio de 2008.



UNIVERSIDAD DE QUINTANA ROO

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

Tesis elaborada bajo la supervisión del comité de asesoría y aprobada como requisito para obtener el título de:

Ingeniera Ambiental

Comité de tesis:

Director: _____
Dra. Elizabeth Miranda Tello

Asesor Titular: _____
M. I Norma Angélica Oropeza García

Asesor Titular: _____
Dr. Víctor Hugo Delgado Blas

Asesor Suplente: _____
M. C José Martin Rivero Rodríguez

Chetumal, Quintana Roo, México Junio de 2008.

Dedico este trabajo a....

A mi papá que es la persona que más admiro porque ha sido el pilar de mi familia, porque siempre me ha motivado a superarme y alcanzar mis metas y con su esfuerzo me ha podido brindar la herencia más importante: mi educación.

A mi mamá por el esfuerzo de mejorar las cosas día con día...

A mi hermanita por toda su paciencia y apoyo en los momentos difíciles. Espero poder ser un ejemplo para ti.

A mi hermano, a Olga, a Andrea y a Andresito por compartir los buenos y malos momentos de esta familia.

Gracias a ustedes por estar siempre conmigo y apoyarme en todo momento, por su confianza incondicional y su motivación para lograr mis metas.

Tal vez no existen palabras para expresarles todo lo que siento... los quiero mucho y estoy orgullosa de formar parte de esta familia.

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por todo su apoyo y confianza incondicional.

Al Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica (CONACYT-Gobierno del estado de Quintana Roo) por haber financiado el proyecto QROO-2006-001-55927 a través del cual se pudo realizar el presente trabajo.

A la doctora Elizabeth Miranda Tello por permitirme formar parte de este proyecto, por su paciencia, tiempo y enseñanzas. Por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo de tesis.

Al doctor Juan Manuel Arce Ortega por su paciencia, tiempo y enseñanzas durante los trabajos de laboratorio.

A la doctora Refugio Rodríguez Vásquez por permitir realizar las determinaciones en el laboratorio del CINVESTAV y al doctor Jaime García Mena por realizar los estudios moleculares.

A la maestra Norma Oropeza por su tutoría durante toda la carrera y en la realización de esta tesis, a quien admiro por ser una persona dedicada a su trabajo y uno de los mejores maestros.

A mis maestros por sus enseñanzas académicas y las experiencias compartidas durante todo el proceso de mi formación en la Universidad de Quintana Roo. Cada uno de ellos me dejó una enseñanza como persona.

A mi comité de tesis por el tiempo brindado en la revisión de este trabajo de tesis y por las correcciones realizadas.

A mis compañeros con los que compartí muchas experiencias durante estos 5 años y con los que concluí esta primera meta.

A mis amigos por su apoyo y siempre creer en mí.

ÍNDICE GENERAL**Página**

Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Índice General	III
Índice de Figuras	VI
Índice de Tablas	IX
Glosario	XI
Resumen	XIV

Capítulo I. Introducción

1.1 Generalidades de los hidrocarburos del petróleo	1
1.1.1 Composición química	1
1.1.1.1 Hidrocarburos alifáticos	2
1.1.1.2 Hidrocarburos aromáticos	5
1.1.2 Toxicidad de los PAH en el ser humano	6
1.2 Emergencias ambientales producidas por derrames de hidrocarburos en el mundo	9
1.2.1 Fuentes de contaminación por hidrocarburos	12
1.3 Métodos de recuperación de sitios contaminados con hidrocarburos	14
1.3.1 Métodos físicos	15
1.3.2 Métodos químicas	16
1.3.3 Métodos biológicos	16
1.3.3.1 Tecnologías de biorremediación	19
1.3.3.1.1 Bioestimulación	20
1.3.3.1.2 Bioaumentación	21
1.3.3.1.3 Composteo	21
1.4 Antecedentes	22
1.5 Justificación	26
1.6 Objetivos	27
1.6.1 Objetivo general	27

1.6.2 Objetivos específicos	28
Capítulo II. Materiales y Métodos	
2.1 Plan de trabajo	29
2.2 Aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas	30
2.2.1 Enriquecimiento	30
2.2.2 Propagación	30
2.3 Identificación	32
2.3.1 Caracterización morfológica	32
2.3.2 Caracterización filogenética	32
2.3.2.1 Extracción de DNA	33
2.3.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	36
2.3.2.3 Secuenciación	38
2.4 Estudio cinético para determinar la remoción de hidrocarburos	38
2.4.1 Extracción de hidrocarburos totales	38
2.4.2 Fraccionamiento de los hidrocarburos totales	39
2.4.2.1 Fraccionamiento de hidrocarburos alifáticos	39
2.4.2.2 Fraccionamiento de hidrocarburos aromáticos	39
Capítulo III. Resultados y Discusión	
3.1 Aislamiento de cepas	41
3.2 Identificación filogenética	41
3.3 Estudio cinético	42
3.3.1 Remoción de la fracción alifática por el consorcio bacteriano	42
3.3.2 Remoción de la fracción aromática por el consorcio bacteriano	44
3.3.3 Remoción de la fracción alifática por cepas C1-C4	47
3.3.4 Remoción de la fracción aromática por las cepas C1-C4.	53
Capítulo IV. Conclusiones	54

Capítulo V. Anexos

Anexo 1. Materiales y Métodos 56

Anexo 2. Resultados 60

Capítulo VI. Referencias Bibliográficas 75

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Capítulo I. Introducción	
Figura 1.1 Estructura de hidrocarburos alifáticos saturados	3
Figura 1.2 Estructura de hidrocarburos alifáticos saturados de la familia de las isoparafinas	3
Figura 1.3 Estructura de hidrocarburos alifáticos no saturados de la serie de las olefinas	4
Figura 1.4 Estructura de hidrocarburos alifáticos saturados de la serie de naftenos	4
Figura 1.5 Estructura química del benceno	5
Figura 1.6 Ejemplos de la estructura de hidrocarburos aromáticos	6
Figura 1.7 Estructura química de algunos PAH's carcinógenos	8
Figura 1.8 Emergencias Ambientales reportadas a la PROFEPA que involucran materiales peligrosos en México.	12
Figura 1.9 Grupo de sustancias involucradas en las emergencias ambientales en México de los años 1996- 2006.	14
Figura 1.10 Bacteria <i>Ralstonia sp.</i>	22
Figura 1.11 Ruta metabólica propuesta para la degradación de 3,4-diclorotolueno por <i>Ralstonia sp</i>	23
Figura 1.12 Ruta metabólica propuesta para la degradación de tolueno a metilcatecol (A) y de o-xileno dimetilcatecol (B) catalizado por TOMO y PHP	24
Figura 1.3 Ruta metabólica de la degradación del pireno por <i>Mycobacterium sp.</i> AP1	25
Capítulo II. Materiales y Métodos	
Figura 2.1 Plan de Trabajo	39
Figura 2.2 Muestra de suelo contaminado con hidrocarburos del estado de Tabasco	30
Figura 2.3 Cultivos del consorcio bacteriano.	31
Figura 2.4 Siembra en placa en a) agar nutritivo, b) agar medio mineral	31
Figura 2.5 Caja de Petri con agar medio mineral	32
Figura 2.6 Aislamiento de las cepas (C1-C4) en agar nutritivo	32
Figura 2.7 Concentrado de biomasa de las cepas	33
Figura 2.8 Agitación de tubos con vortex	33
Figura 2.9 Centrifugación de las muestras a 13 000 rpm	34

Figura 2.10 Concentrador para el secado del DNA extraído	34
Figura 2.11 Espectrofotómetro para cuantificar la cantidad y pureza de DNA	35
Figura 2.12 Elaboración del gel de agarosa	35
Figura 2.13 Inyección de muestras en el gel de agarosa	35
Figura 2.14 Corrimiento de la electroforesis	36
Figura 2.15 Transluminador de luz UV	36
Figura 2.16 Termociclador para la amplificación de DNA	37
Figura 2.17 Agitación vigorosa de las muestras en el embudo de separación	38
Figura 2.18 Procedimiento del fraccionamiento de hidrocarburos	39

Capítulo III. Resultados y Discusión

Figura 3.1 Unidades Formadoras de Colonias en agar nutritivo y agar mineral	42
Figura 3.2 Remoción de los hidrocarburos alifáticos por el consorcio bacteriano	43
Figura 3.3 Compuestos alifáticos de 10 a 18 carbonos removidos por el consorcio bacteriano	44
Figura 3.4 Remoción de hidrocarburos aromáticos por el consorcio bacteriano	45
Figura 3.65 Compuestos aromáticos removidos durante la cinética por el consorcio bacteriano	46
Figura 3.6 Cinética de remoción y concentración de las fracciones aromática y alifática de un destilado de petróleo por el consorcio bacteriano durante la cinética	47
Figura 3.7 Remoción de los hidrocarburos alifáticos por las cepas C1-C4	48
Figura 3.8 Remoción de compuestos alifáticos por la cepa C1	48
Figura 3.9 Remoción de compuestos alifáticos por la cepa C2	49
Figura 3.10 Remoción de compuestos alifáticos por la cepa C3	50
Figura 3.11 Remoción de compuestos alifáticos por la cepa C4	51
Figura 3.12 Compuestos alifáticos removidos por las cepas (C1-C4)	52
Figura 3.13 Compuestos aromáticos removidos por las cepas (C1-C4)	53

Capítulo V. Anexos

Anexo 2. Resultados

Figura 1. Cromatogramas de la remoción de hidrocarburos alifáticos por el consorcio bacteriano al inicio y final de la cinética	61
--	----

Figura 2. Cromatogramas de la remoción de hidrocarburos aromáticos por el consorcio bacteriano al inicio y final de la cinética.....	62
Figura 3. Cromatograma de la remoción de hidrocarburos alifáticos por la cepa 1 al final de la cinética	65
Figura 4. Cromatograma de la remoción de hidrocarburos alifáticos por la cepa 2 al final de la cinética	65
Figura 5. Cromatograma de la remoción de hidrocarburos alifáticos por la cepa 3 al final de la cinética	66
Figura 6. Cromatograma de la remoción de hidrocarburos alifáticos por la cepa 4 al final de la cinética	66
Figura 7. Cromatograma de la remoción de hidrocarburos aromáticos por la cepa 1 al final de la cinética	69
Figura 8. Cromatograma de la remoción de hidrocarburos aromáticos por la cepa 2 al final de la cinética	69
Figura 9. Cromatograma de la remoción de hidrocarburos aromáticos por la cepa 3 al final de la cinética	70
Figura 10. Cromatograma de la remoción de hidrocarburos aromáticos por la cepa 4 al final de la cinética	70

INDICE DE TABLAS**Página****Capítulo I. Introducción**

Tabla 1.1 Fracciones importantes del petróleo	1
Tabla 1.2 Clasificación del petróleo según su densidad	2
Tabla 1.3 Estructura química y propiedades de los alquinos	5
Tabla 1.4 Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos de interés ambiental por sus efectos tóxicos en el hombre	7
Tabla 1.5 Cantidad derramada de petróleo en los accidentes marítimos a nivel mundial en 20 años	10
Tabla 1.6 Emergencias ambientales ocurridas en México asociadas a la industria petrolera	11
Tabla 1.7 Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo	14
Tabla 1.8 Límites máximos permisibles para hidrocarburos aromáticos en suelo	15
Tabla 1.9 Tecnologías biológicas para la remediación de sitios contaminados	20

Capítulo II. Materiales y Métodos

Tabla 2.1 Mezcla de reacción para PCR	37
Tabla 2.2 Programa en el termociclador para la reacción de PCR	37

Capítulo III. Resultados y Discusión

Tabla 3.1 Características morfológicas de cepas aisladas (C1-C4).	41
Tabla 3.2 Cuantificación del DNA total de las cepas aisladas (C1-C4).	41

Capítulo V. Anexos**Anexo 1. Materiales y Métodos**

Tabla 1. Medio mineral basal	56
Tabla 2. Solución mineral de micronutrientes	56
Tabla 3. Formulación del agar nutritivo	56
Tabla 4. Soluciones para extracción de DNA	57
Tabla 5. Estándar de hidrocarburos alifáticos y aromáticos utilizado para cromatografía de gases	57
Tabla 6. Especificaciones de reactivos	58
Tabla 7. Especificaciones de equipo	59

Anexo 2. Resultados

Tabla 1. Degradación de hidrocarburos alifáticos por el consorcio bacteriano	60
---	----

Tabla 2. Degradación de compuestos alifáticos por el consorcio bacteriano	60
Tabla 3. Degradación de hidrocarburos aromáticos por el consorcio bacteriano	60
Tabla 4. Compuestos alifáticos identificados durante la cinética de remoción en el consorcio bacteriano	63
Tabla 5. Concentración de los compuestos aromáticos identificados durante la cinética de remoción en el consorcio bacteriano y porcentaje de remoción final	64
Tabla 6. Concentración de los compuestos aromáticos identificados durante la cinética de remoción por las cepas C1-C4	67
Tabla 7. Porcentaje de remoción de los compuestos aromáticos identificados durante la cinética de remoción por las cepas C1-C4	68
Tabla 8. Compuestos aromáticos identificados al tiempo 0 horas en el consorcio bacteriano	71
Tabla 9. Compuestos aromáticos identificados al tiempo 8 horas en el consorcio bacteriano	71
Tabla 10. Compuestos aromáticos identificados al tiempo 32 horas en el consorcio bacteriano	72
Tabla 11. Compuestos aromáticos identificados al tiempo 48 horas en el consorcio bacteriano	73
Tabla 12. Compuestos aromáticos identificados al tiempo 72 horas en el consorcio bacteriano	73
Tabla 13. Compuestos aromáticos identificados al tiempo 144 horas en el consorcio bacteriano	74

Glosario

Amplificación de DNA: Multiplicación repetida de una secuencia concreta de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

Bacterias Hidrocarbonoclastas: Son aquellas capaces de crecer en presencia de hidrocarburos como única fuente de carbono y energía.

Biota microbiana: Todas las especies de microorganismos dentro de un territorio o área especial.

Carcinógeno: una sustancia que puede causar o agravar un cáncer.

Cepa: Organismo que presenta un fenotipo característico reproducible de una generación a la otra.

Consorcio bacteriano: Asociación interactiva entre microorganismos que generalmente causa una actividad metabólica combinada.

Contaminación: La presencia en el ambiente de uno o más contaminantes o de cualquier combinación de ellos que cause desequilibrio ecológico.

Contaminante: Toda materia o energía en cualesquiera de sus estados físicos y formas, que al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural, altere o modifique su composición y condición natural.

Cometabolismo: Transformación metabólica innecesaria de una sustancia por un microorganismo que crece a partir de otro sustrato; la biomasa catabolizada no se incorpora a la biomasa del organismo y este no obtiene energía en la transformación de esa sustancia.

Compuestos xenobióticos: Aquellos compuestos químicos sintetizados por el hombre que no existían previamente en la naturaleza.

Craqueo: Descomposición de los hidrocarburos en otros hidrocarburos de menor número de átomos de carbono. Cuando se realiza con calor se denomina **craqueo térmico**. Si tiene lugar mediante catalizadores es el **craqueo catalítico**. Esta reacción se utiliza para obtener gasolinas a partir de otras fracciones más pesadas del petróleo.

DNA (Ácido Dexoxirribonucleico): Polímero de desoxirribonucleótidos. El DNA constituye el material genético de la mayoría de los organismos que se conocen; normalmente se encuentra formando una doble hélice, aunque algunos genomas virales contienen DNA de una sola cadena y otros, RNA de una o de doble cadena.

Enlace covalente: Enlace en el que dos átomos comparten dos electrones. Es muy fuerte y se rompe con dificultad.

Genotipos: Constitución genética de un organismo. Comprende toda la información genética codificada en el DNA cromosómico y extracromosómico.

Inóculo: Medio que contiene organismo, usualmente bacterias y hongos, que son introducidos dentro de un cultivo para comenzar una acción biológica.

Lodos de perforación: Mezcla de arcillas, agua y químicos usada en las operaciones de perforación para lubricar y enfriar la barrena, para transportar los recortes de perforación a la superficie, para prevenir el colapso de las paredes del pozo y para controlar el flujo ascendente de crudo a gas.

Metabolitos: Cualquier producto intermedio o final resultante del metabolismo.

Microorganismos heterótrofos: Organismo que se alimenta de compuestos orgánicos provenientes de otros organismos o de los subproductos de éstos.

Mutagénico: un agente que causa un cambio genético permanente en una célula alterando su crecimiento normal.

Pirólisis: Descomposición de un químico por altas temperaturas.

Recortes de perforación: Tierra y rocas removidas durante las operaciones de perforación de pozos de exploración y producción. Los recortes se impregnan de aceite por su contacto con lodos de perforación.

RNA (Ácido Ribonucleico): Ácido orgánico, polímero de los ribonucleótidos adenina, guanina, citosina y uridina. Constituye el material genético de algunos virus y, de forma más general, es la molécula derivada del DNA por transcripción, que transporta la información (RNA mensajero), suministra la estructura subcelular (RNA ribosómico), transporta los aminoácidos (RNA de transferencia) o facilita su propia modificación bioquímica o la de otras moléculas.

RNA ribosómico (RNAr): Moléculas de RNA que constituyen los componentes estructurales y funcionales esenciales de los ribosomas, en donde tiene lugar la síntesis de proteínas. Se han identificado distintas clases de moléculas RNAr, los ribosomas de *E. Coli* contienen una molécula de RNAr 16S de 1541 nucleótidos.

Ruta metabólica: Serie de reacciones consecutivas catalizadas por una enzima que produce compuestos intermedios y uno o varios productos.

Secuenciación del DNA: Procedimiento para determinar la secuencia de nucleótidos de un fragmento de DNA.

Sustancia tóxica: un elemento químico o un compuesto que puede representar un riesgo de daño a la salud o al ambiente.

Toxicidad aguda: Capacidad de una sustancia para producir efectos adversos dentro de un corto plazo de tiempo (usualmente hasta 14 días) después de la administración de una dosis única (o una exposición dada) o tras dosis o exposiciones múltiples en 24 horas.

Toxicidad crónica: Capacidad de una sustancia de causar efectos tóxicos de larga duración en la salud humana, de animales, peces u otros organismos.

Yacimiento: Acumulación de aceite y/o gas en roca porosa tal como arenisca. Un yacimiento petrolero normalmente contiene tres fluidos (aceite, gas y agua) que se separan en secciones distintas debido a sus gravedades variantes. El gas siendo el más ligero ocupa la parte superior del yacimiento, el aceite la parte intermedia y el agua la parte inferior.

Resumen

En el presente trabajo se utilizaron los métodos biológicos, teniendo como objetivo general estudiar la capacidad de diferentes microorganismos para llevar a cabo procesos de biorremediación y como objetivos específicos aislar por técnicas microbiológicas los diferentes tipos de cepas hidrocarbonoclastas presentes en un suelo contaminado con hidrocarburos, identificar por técnicas moleculares el/los géneros representativos y determinar la capacidad de remoción de hidrocarburos en medio líquido de las cepas aisladas y en consorcio.

A partir de una muestra de suelo contaminado con hidrocarburos proveniente del estado de Tabasco, se realizó el proceso de enriquecimiento en medio líquido, posteriormente se llevó a cabo la propagación de este cultivo utilizando como fuente de carbón y energía un destilado de petróleo. Se pudieron aislar cuatro cepas (C1-C4) mediante la selección en placa en agar mineral. Mediante estudios moleculares con el gen 16S se pudo realizar la identificación filogenética, encontrando una identificación cercana al género *Ralstonia spp.*

Por otra parte se realizó un estudio cinético para conocer la capacidad de remoción de hidrocarburos por estas cepas y por el consorcio bacteriano. Se montaron una serie de botellas serológicas conteniendo medio mineral basal, el inóculo y como fuente de carbono y energía el destilado de petróleo. Los tiempos utilizados para el corrimiento de la cinética fueron 0, 8, 24, 32, 48, 72 y 144 horas. Para determinar la remoción de la fracción alifática y aromática se efectuó el fraccionamiento de los hidrocarburos totales mediante cromatografía en columna y se cuantificó la remoción de cada fracción mediante cromatografía de gases con detector FID.

El consorcio bacteriano removió un 33 % de hidrocarburos alifáticos y en un 94 % los aromáticos. Los hidrocarburos alifáticos fueron removidos por la cepa 1 en un 83 %, la cepa 2 removió un 88%, la cepa 3 un 79% y la cepa 4 un 83%, mientras que los compuestos aromáticos fueron removidos en su totalidad por las cepas C2, C3 y C4.

Los compuestos alifáticos que se pudieron identificar fueron hidrocarburos de 10 a 18 átomos de carbono y los aromáticos fueron 24 compuestos, entre ellos el benceno multisustituido, naftaleno y el ciclohexiltridecano, entre otros.

Capítulo I. Introducción

1.1 Generalidades de los hidrocarburos

Se denomina petróleo crudo a la mezcla de hidrocarburos líquidos que se extraen de los yacimientos, de color oscuro (casi negro) con olor fuerte y penetrante, inflamable y viscoso. Sus componentes básicos varían de 82 % a 87 % de carbón, 12 % a 15 % de hidrógeno, 0.1 % a 5.0 % de azufre en peso y pequeñas cantidades de impurezas (Jiménez, 2001).

El petróleo es separado en fracciones para diferentes aplicaciones. La Tabla 1.1 muestra las fracciones de hidrocarburos más importantes y sus características.

Tabla 1.1 Fracciones importantes del petróleo (Sodhi, 2000).

Fracción	Composición en número de carbonos	Punto de ebullición (°C)
Gases	C ₁ - C ₄	-160- 30
Éter de petróleo	C ₅ - C ₇	30- 70
Gasolina	C ₅ - C ₁₀	40- 200
Queroseno	C ₁₀ - C ₁₆	175- 290
Aceite de gas	C ₁₅ - C ₁₈	250- 320
Aceites lubricantes	C ₁₇ - C ₃₀	320- 400

1.1.1 Composición química

Los hidrocarburos son compuestos que están constituidos principalmente de átomos de carbono e hidrógeno. Son una mezcla compuesta de alcanos, compuestos aromáticos, asfaltenos y compuestos con nitrógeno, oxígeno y azufre (Baek *et al.*, 2006) además de algunos organometales constituidos sobre todo de níquel y vanadio (Van *et al.*, 2003).

Son miles los compuestos químicos que constituyen el petróleo, y entre muchas otras propiedades, estos compuestos se diferencian por su volatilidad (dependiendo de la temperatura de ebullición). Al calentarse el petróleo, se evaporan preferentemente los compuestos ligeros (de estructura química sencilla y bajo peso molecular), de tal manera que conforme aumenta la temperatura, los componentes más pesados van incorporándose al vapor (IMP, 2008).

La industria mundial de hidrocarburos líquidos, clasifica el petróleo de acuerdo a su densidad utilizando el parámetro internacional del Instituto Americano del Petróleo API, el cual diferencia las calidades del crudo. Esta clasificación es señalada en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2 Clasificación del petróleo según su densidad (IMP, 2008)

Aceite crudo	Densidad (g/ cm³)	Densidad grados API
Extrapesado	>1.0	<10.0
Pesado	1.0 - 0.92	10.0 - 22.3
Mediano	0.92 - 0.87	22.3 - 31.1
Ligero	0.87 - 0.83	31.1 - 39
Superligero	< 0.83	> 39

En México se producen tres variedades de petróleo crudo:

- Istmo: Ligero con densidad de 33.6 grados API y 1.3% de azufre en peso.
- Maya: Pesado con densidad de 22 grados API y 3.3% de azufre en peso.
- Olmeca: Superligero con densidad de 39.3 grados API y 0.8% de azufre en peso.

Los hidrocarburos están divididos en dos tipos principales: hidrocarburos alifáticos e hidrocarburos aromáticos. Esta clasificación se realizó en el siglo XIX, cuando la química orgánica estaba casi exclusivamente dedicada al estudio de materiales procedentes de fuentes naturales. El término alifático proviene de la palabra griega *aleiphar* que significa grasa. Los hidrocarburos aromáticos, independientemente de su olor, normalmente se obtenían por tratamientos químicos de extractos procedentes de plantas aromáticas (Carey, 1999).

1.1.1.1 Hidrocarburos alifáticos

Los hidrocarburos alifáticos son compuestos no aromáticos y no cíclicos constituidos de carbono e hidrógeno. Estos hidrocarburos pueden ser subdivididos en tres clases principales (Stroud *et al.*, 2007):

- a) Alcanos - hidrocarburos saturados con enlaces simples de carbono C-C.
- b) Alquenos - hidrocarburos insaturados con enlaces dobles de carbonos C=C.
- c) Alquinos - hidrocarburos insaturados con triple enlace de carbono C≡C.

Los hidrocarburos saturados son aquellos en los cuales los átomos de carbono adyacentes se unen por un solo enlace covalente C-C y todos los demás enlaces están ocupados por hidrógeno. Estos constituyen una serie completa de compuestos que comienzan con un átomo de carbono y cada miembro de la serie va aumentando en un átomo de carbono en forma sucesiva. Las cadenas lineales de carbono asociadas a hidrógeno, constituyen las parafinas también conocidas como alcanos y se caracterizan por el sufijo *-ano* en sus nombres (Figura 1.1) (Sawyer, 2001).

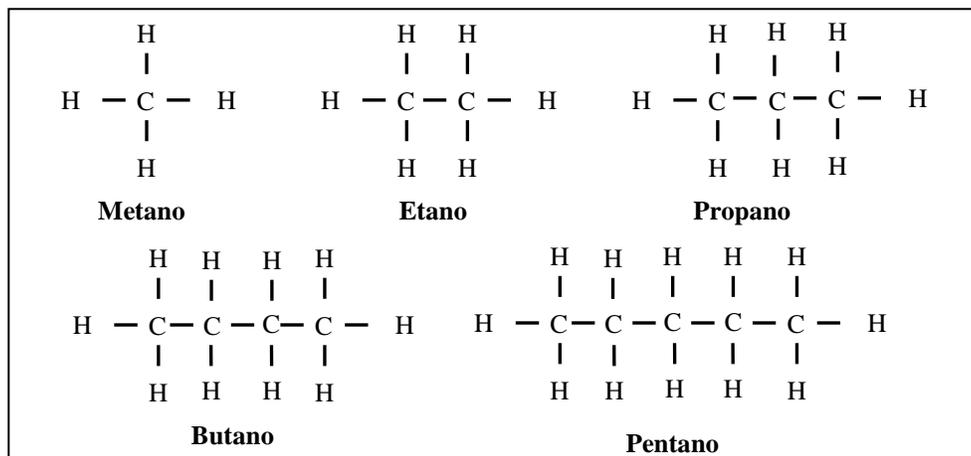


Figura 1.1 Estructura de hidrocarburos alifáticos saturados llamados también parafinas normales % en peso C1 C2 C3 C4 C5 — ∞ (IMP, 2008).

25	20	18.2	17.3	16.7	14.3
----	----	------	------	------	------

Cuando las cadenas asociadas a hidrógenos son ramificadas se tienen las isoparafinas, ejemplos de su estructura química se muestran en la Figura 1.2. Los isómeros del pentano, hexano, heptano y octano son los principales constituyentes de la gasolina.

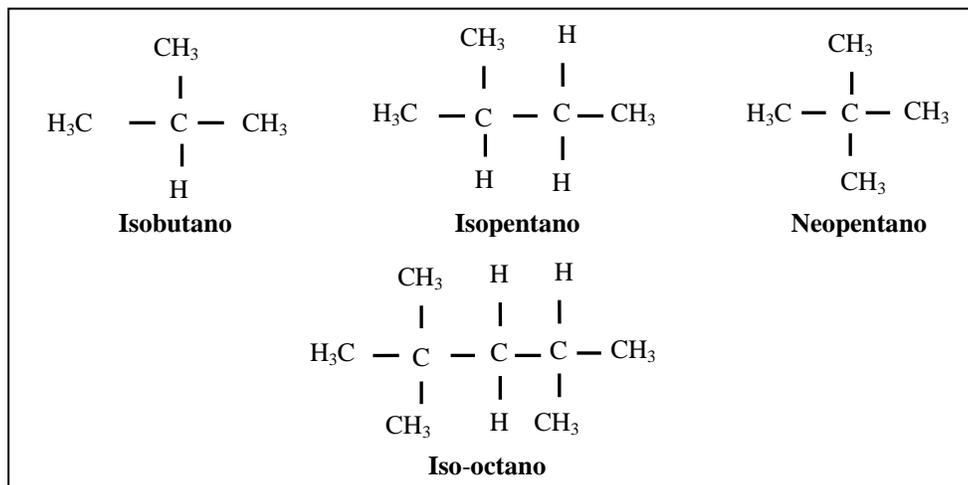


Figura 1.2 Estructura de hidrocarburos alifáticos saturados de la familia de las isoparafinas. % en peso H₂: Idem N° de isómeros C4 C5 C6 C7 C8 C9...C12...C15... C18 (IMP, 2008).

2	3	5	9	18	35	355	3447	60523
---	---	---	---	----	----	-----	------	-------

Cada miembro de la serie de los alifáticos saturados, exceptuando el metano, pueden perder hidrógeno para formar compuestos insaturados. Estos compuestos también llamados olefinas o alquenos, tienen un doble enlace entre los átomos de carbono adyacentes y su nombre termina en *-eno* (Figura 1.3). Los compuestos olefínicos, en particular el etileno, propileno y butileno se forman en grandes cantidades durante el craqueo o pirólisis del petróleo (Sawyer, 2001).

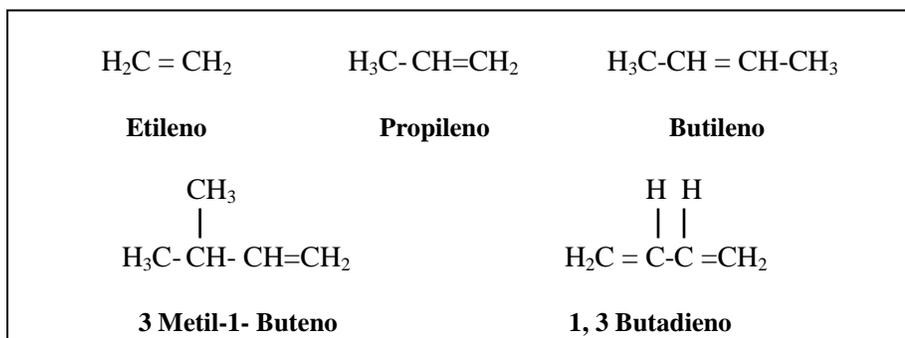


Figura 1.3 Estructura de hidrocarburos alifáticos no saturados de la serie de las olefinas (IMP, 2008)

Las moléculas en las que se forman ciclos de carbono son denominadas naftenos. Ejemplos de ellos se muestran la Figura 1.4.

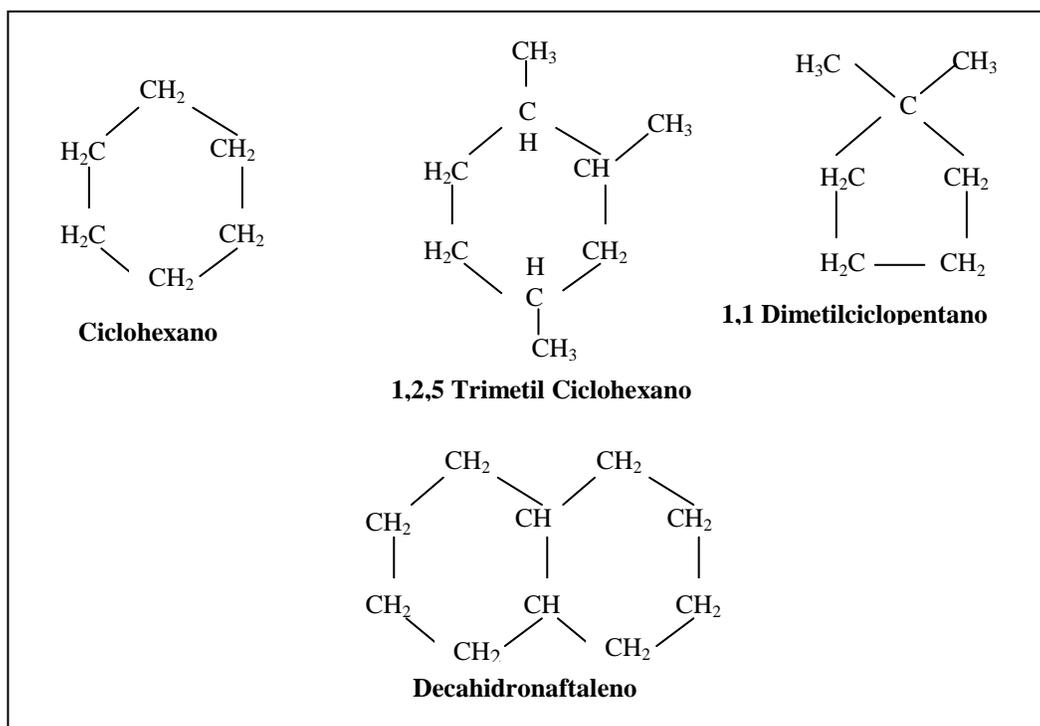


Figura 1.4 Estructura de hidrocarburos alifáticos saturados de la serie de naftenos (IMP, 2008).

Los alquinos son hidrocarburos con triples enlaces de carbono-carbono. Los nombres de los alquinos tiene el sufijo *-ino*. El triple enlace es lineal, de modo que no hay posibilidad de isomería geométrica entre ellos (Wade, 1993). En la Tabla 1.3 se muestran ejemplos de su estructura química.

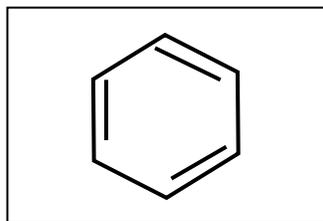
Tabla 1.3 Estructura química y propiedades de los alquinos (Pine, 1998)

Nombre	Formula	Punto de Fusión (°C)	Punto de Ebullición (°C)	Densidad g/mL (20 °C)
Acetileno	$\text{HC} \equiv \text{CH}$	-81	-84	0.625(-82°)
Propino	$\text{HC} \equiv \text{CCH}_3$	-102	-23	0.706 (-50°)
1- Butino	$\text{HC} \equiv \text{CCH}_2\text{CH}_3$	-126	8	0.678 (0 °)
2- Butino	$\text{CH}_3\text{C} \equiv \text{CCH}_3$	-32	27	0.691
1- Pentino	$\text{HC} \equiv \text{C}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	-90	40	0.690
2- Pentino	$\text{CH}_3\text{C} \equiv \text{CCH}_2\text{CH}_3$	-101	56	0.712
1- Hexino	$\text{HC} \equiv \text{C}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$	-132	71	0.716
2- Hexino	$\text{CH}_3\text{C} \equiv \text{C}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$	-90	84	0.731
3- Hexino	$\text{CH}_3\text{C H}_2 \text{C} \equiv \text{CC H}_2\text{CH}_3$	-103	82	0.723
1- Heptino	$\text{HC} \equiv \text{C}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	-81	100	0.733
1- Octino	$\text{HC} \equiv \text{C}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$	-79	125	0.746
1- Nonino	$\text{HC} \equiv \text{C}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$	-50	151	0.757
1- Decino	$\text{HC} \equiv \text{C}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$	-36	174	0.766

1.1.1.2 Hidrocarburos aromáticos

Los Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos o PAH's (por sus siglas en inglés) constituyen un grupo de compuestos cíclicos que contienen anillos de seis eslabones, en los cuales se alternan enlaces sencillos y dobles (Pine, 1988).

El hidrocarburo aromático más sencillo es el benceno, que es el compuesto fundamental de toda la serie aromática. La estructura molecular del benceno se muestra en la Figura 1.5.

**Figura 1.5** Estructura química del benceno.

Los hidrocarburos aromáticos más sencillos pueden considerarse como derivados del benceno, por sustitución de uno o varios átomos de hidrógeno por radicales hidrocarbonados, bien sean saturados, como metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo (entre otros), o no saturados, como vinilo, etinilo, etc. Existen además, muchos otros aromáticos con varios anillos, llamados por esto poliaromáticos; como por ejemplo: el naftaleno, antraceno, fenantreno y todos sus derivados (Figura 1.6) por sustitución de átomos de hidrógeno por radicales hidrocarbonados (Flores *et al.*, 2004).

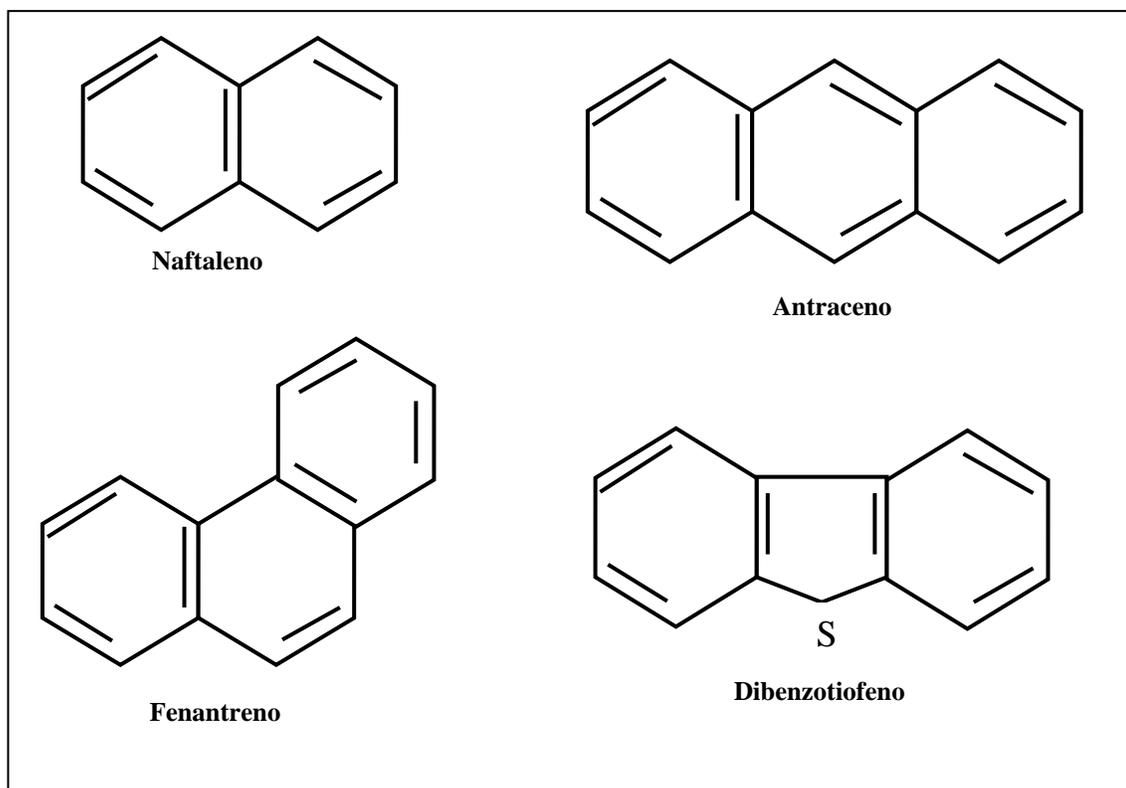


Figura 1.6 Ejemplos de la estructura de hidrocarburos aromáticos (Bracho *et al.*, 2004).

1.1.2 Toxicidad de los PAH's en el ser humano

En los años treinta, se demostró que diversos PAH's del alquitrán de hulla, por separado o como mezcla, podían inducir el crecimiento de cánceres de piel en los animales de laboratorio. Algunos PAH's son sustancias potencialmente carcinógenas y mutagénicas por lo que son un contaminante prioritario en la lista de las agencias de protección ambiental de algunos países (Eriksson *et al.*, 2002).

El naftaleno es el más sencillo de los PAH's; los compuestos aromáticos de mayor interés tienen hasta 5 y 6 anillos. Los PAH's individuales difieren sustancialmente en sus propiedades físicas y químicas y para reflejar este intervalo se seleccionaron los 10 PAH's (Tabla 1.4) considerados por la Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos (EPA por sus siglas en inglés), Organización Mundial de la Salud (OMS) y Comunidad Económica Europea (CEE), como contaminantes prioritarios debido a sus efectos carcinogénicos (Barrera *et al.*, 2004). En la Figura 1.7 se muestran la estructura química de algunos PAH's carcinógenos.

Tabla 1.4 Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos de interés ambiental por sus efectos tóxicos en el hombre (Barrera *et al.*, 2004).

PAH	Peso molecular	Solubilidad en agua mg/L	Presión de vapor kPa	Toxicidad
Naftaleno	128	31.0	0.012	Tóxico
Antraceno	178	0.073	$2.26 \cdot 10^{-6}$	Carcinógeno
Fenantreno	178	1.3	$9.04 \cdot 10^{-5}$	Carcinógeno
Pireno	202	0.14	$3.33 \cdot 10^{-7}$	Tóxico
Benzo(a)antraceno	228	0.04	$2.93 \cdot 10^{-9}$	Carcinógeno
Criseno	228	0.002	$8.38 \cdot 10^{-8}$	Carcinógeno
Benzo(k)fluorenteno	252	$6.0 \cdot 10^{-4}$	$7.86 \cdot 10^{-10}$	Carcinógeno
Benzo(a)pireno	252	$3.8 \cdot 10^{-3}$	$7.45 \cdot 10^{-10}$	Carcinógeno
Dibenzo(a,h)antraceno	278	$5.0 \cdot 10^{-4}$	$1.33 \cdot 10^{-11}$	Carcinógeno
Idenol(1,2,3-cf)pireno	276	$5.3 \cdot 10^{-2}$	$1.33 \cdot 10^{-12}$	Carcinógeno

En el caso del naftaleno el valor límite ambiental de exposición diaria es de 50 mg/L y el valor límite ambiental de exposición de corta duración es de 80 mg/L. Los efectos agudos provocados en la salud son: irritación en la piel, los ojos, la nariz y la garganta. Niveles muy altos pueden causar dolor de cabeza, fatiga, confusión, náuseas y vómitos. Otros efectos de larga duración son: cataratas, alergia en la piel, daño al hígado, riñones y glóbulos rojos (New Jersey Department of Health and Senior Services, 2008).

El antraceno al contacto con la piel puede causar irritación, picazón y ardor, que se agravan con la exposición solar. El contacto repetido puede causar espesamiento de la piel y cambios de pigmentación, respirarlo puede irritar la nariz, la garganta y los pulmones. El contacto con los ojos puede provocar irritación y quemaduras (New Jersey Department of Health and Senior Services, 2008).

El benzo(a)pireno puede causar daños en el feto y el aparato reproductivo del hombre y la mujer. El contacto con los ojos puede causar irritación y quemaduras. El contacto con la piel provoca irritación, picazón y ardor, que se gravan con la exposición solar. Los efectos crónicos en la salud son que puede provocar efectos carcinógenos en el ser humano; en los animales se ha comprobado que causa cáncer en el estomago, pulmones, sangre, piel, páncreas y cáncer de mama (New Jersey Department of Health and Senior Services, 2008).

El Benzo(a)antraceno es un posible carcinógeno en los seres humanos; en los animales se ha comprobado que causa cáncer en la vejiga y en la piel (New Jersey Department of Health and Senior Services, 2008).

El benzo(k)fluorenteno provoca efectos agudos en la salud como: al contacto con los ojos provoca irritación y quemaduras. Los efectos crónicos son que puede causar cáncer en el ser humano; en los animales se ha comprobado que causa cáncer en la piel (New Jersey Department of Health and Senior Services, 2008).

El criseno puede producir cambios permanentes en la pigmentación de la piel contaminada con este compuesto, lo efectos se agravan con la exposición solar (New Jersey Department of Health and Senior Services, 2008).

El contacto con el fenantreno puede irritar la piel y los ojos, agravándose con la exposición solar, respirarlo puede irritar la nariz y la garganta (New Jersey Department of Health and Senior Services, 2008).

El Idenol(1,2,3-cf)pireno puede ser un carcinógeno en el ser humano; en los animales se ha comprobado que es causa de cáncer en la piel y los pulmones (New Jersey Department of Health and Senior Services, 2008).

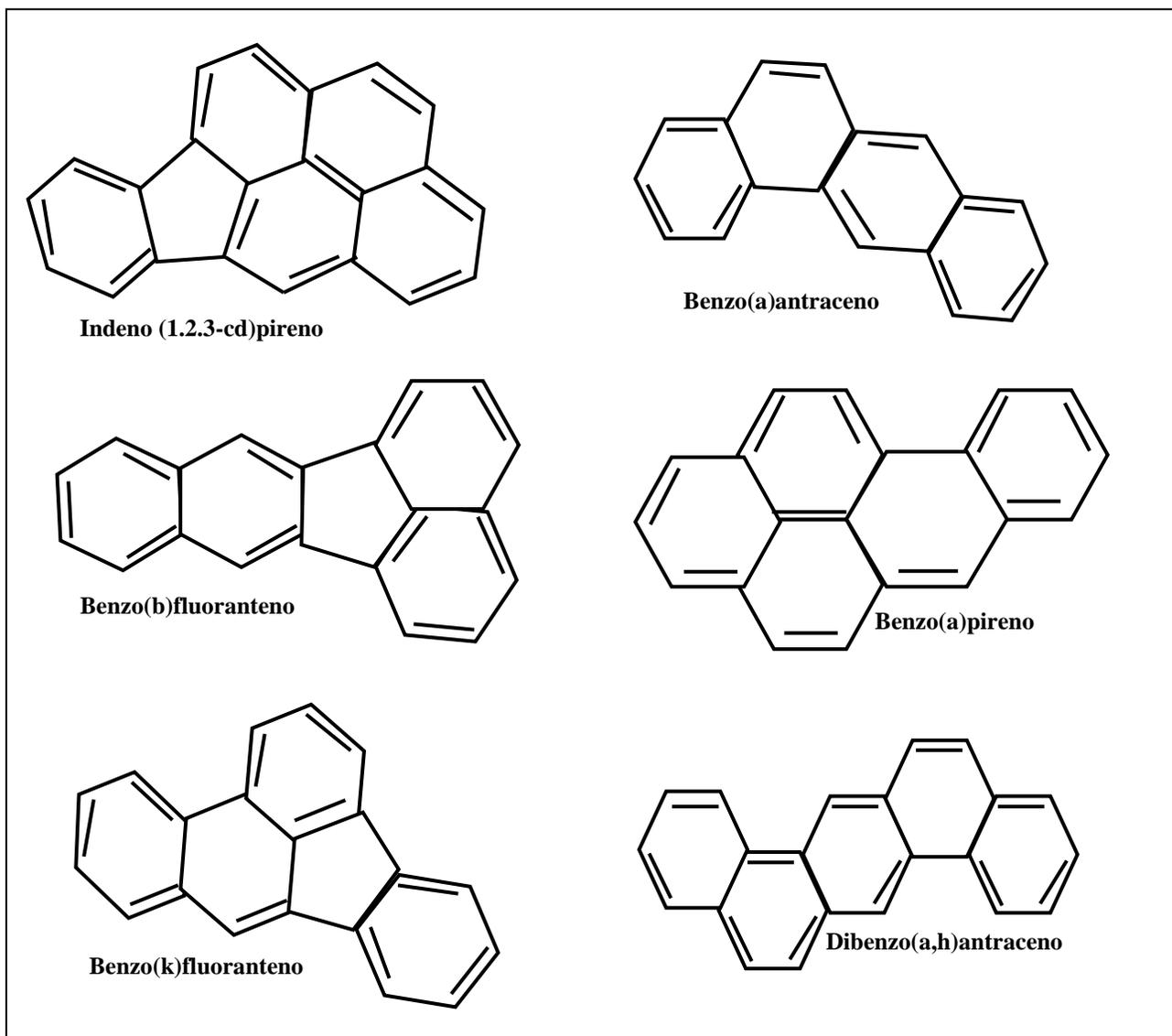


Figura 1.7 Estructura química de algunos PAH's carcinógenos (Barrera *et al.*, 2004).

La NOM-047-SSA1-1993 “Límites Biológicos Máximos Permisibles de Disolventes Orgánicos en Personal Ocupacionalmente Expuesto” establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos aromáticos (benceno, xileno y tolueno) proporcionando una guía para valorar el riesgo a que pueden estar expuestos los trabajadores que laboran con estas sustancias y los efectos que generan a la salud. A partir del conocimiento de los límites máximos permisibles establece las medidas de control para la conservación de la salud y prevención de daños a ésta.

Los límites señalados son:

- Benceno: Fenoles totales en orina al final del turno de trabajo: 50 mg/g creatinina
- Tolueno: Acido hipúrico en orina al final del turno de trabajo: 2.5 g/g de creatinina. Ambos compuestos en sangre venosa al final del turno de trabajo 1 mg/L
- Xileno: Acido metilhipúrico en orina al final del turno de trabajo: 1.5 g/g de creatinina

1.2 Emergencias ambientales producidas por derrames de hidrocarburos en el mundo.

La Agencia de Protección al Ambiente “EPA” (por sus siglas en inglés), define emergencia ambiental como una amenaza súbita a la salud pública o al bienestar del medio ambiente, debido a la liberación (actual o potencial) del aceite, los materiales radioactivos, o químicos peligrosos en el aire, suelo o agua. Estas emergencias pueden suceder por accidentes de transporte, por incidentes en industrias que emplean o fabrican sustancias químicas, o como resultado de un desastre natural o la acción del ser humano (Flores *et al.*, 2004).

La Norma Oficial Mexicana NOM-138 “Límites Máximos Permisibles de Hidrocarburos en Suelos y las Especificaciones para su Caracterización y Remediación” define emergencia ambiental como un evento o circunstancia indeseado, que ocurre repentinamente y que resulta en la liberación no controlada, incendio o explosión de una o varias sustancias peligrosas para el medio ambiente y/o la salud humana, de manera inmediata o a largo plazo (Flores *et al.*, 2004).

A nivel mundial de 1956 a 1959 ocurrieron 38 derrames de hidrocarburos importantes (mayores a 2,000 barriles), principalmente por derrames marítimos. Los principales se muestran en la Tabla 1.5. En 1967 el petrolero Torrey Canyon encalló cerca de las costas inglesas del Canal de la Mancha y derramó cerca de 100,000 toneladas de crudo, las cuales provocaron la marea negra en costas inglesas y francesas (Jiménez, 2001).

Los accidentes más graves en Estados Unidos sucedieron en el año 1969 en el Canal de Santa Bárbara (California) donde ocurrió un derrame de 1,500 toneladas de petróleo en un periodo de 10 días por una explosión registrada en una plataforma de perforación. De igual manera en 1970 en Marchan Bay (Luisiana) se suscitó una explosión que fue seguida de un incendio que tardó cuatro meses en dominarse. Fuera de las aguas de Estados Unidos, se han producido tres grandes accidentes: Australia, Indonesia y en el yacimiento de Rakish- Irán en el Golfo Pérsico. En este último se registró un derrame de 30,000 toneladas de petróleo que duro tres semanas (Jiménez, 2001).

En 1989, el petrolero Exxon Valdez encalló en el estrecho Prince William de Alaska, vertiendo al mar más de 40 millones de litros de petróleo crudo. La marea negra alcanzó más de 1,500 km de costa. Los tratamientos físicos no fueron suficientes para la limpieza del sitio por lo que se experimentó con técnicas de biorremediación. El éxito de la biorremediación para el tratamiento de la marea negra sirvió también para que se conociera mejor esta técnica y para estimular la investigación y el desarrollo de técnicas de biorremediación para otras aplicaciones (Atlas y Bartha, 2002).

Tabla 1.5 Cantidad derramada de petróleo en los accidentes marítimos a nivel mundial en 20 años (Jiménez, 2001)

Año	Nombre del buque	País afectado	Cantidad derramada (Toneladas)
1967	Torrey Canyon	Inglaterra, Francia	100,000
1980	Exxon Valdez	Estados Unidos	40,000
1980	Princess Ann Marie	Cuba	6,000
	Irens Serenade	Grecia	102,000
	Tanio	Francia	6,000
	Juan A. Lavajella	Argelia	40,000
1981	José Martí	Suecia	6,000
	Ondina	República Federal de Alemania	500
	Cavo Cambanos	Francia	18,000
1983	Castello de Belver Sudáfrica	Sudáfrica	255,525
	Sivand	Reino Unido	6,000
	Feoso Ambassador	China	4,000
1984	Assimi	Omán	51,421
	Pericles GC	Qarar	46,631
1985	Bridgeness	Reino Unido	-
1986	Nova	Golfo Pérsico	50,000
1987	Carguero Americano	Estados Unidos	50
	Contenedor FFA	Dinamarca	45

En México, la paraestatal Petróleos Mexicanos (PEMEX) con apoyo del Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), identificó en el año 97 aproximadamente 300 hectáreas contaminadas en el Estado de Tabasco y 178 presas contaminadas con desechos aceitosos (Adams *et al.*, 1999).

En 1981 se registró el derrame de petróleo en el pozo Ixtoc, localizado al sureste del Golfo de México, en la sonda de Campeche. Se estima que se perdieron un total de 3.1 millones de barriles en 281 días. Los efectos de la contaminación no fueron cuantificados aunque en varias playas mexicanas se observó la presencia del crudo, además de pérdidas económicas, humanas y afectaciones en la salud pública (Jiménez, 2001). En el país se han presentado múltiples emergencias ambientales de hidrocarburos o sus derivados como se observa en la Tabla 1.6 (Ortiz, 2005).

Las principales consecuencias ambientales después de un evento de contaminación por hidrocarburos en el suelo son: reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal del lugar del derrame; cambios en la dinámica poblacional de la fauna y la biota microbiana, y contaminación de cuerpos de agua subterráneos por infiltración (Pardo *et al.*, 2004).

Tabla 1.6 Emergencias ambientales ocurridas en México asociadas a la industria petrolera (Ortiz, 2005).

Fecha	Evento	Ubicación	Sustancia involucrada	Causas	Daños
Abril, 2001	Derrame	Jalisco	Gasolina	Toma clandestina	40 hectáreas de suelo
Abril, 2001	Derrame	Nanchital, Veracruz	5000 barriles de petróleo crudo	Construcción de oleoducto	3,000 km de un arroyo
Diciembre, 2002	Derrame	Acatzingo, Puebla	Petróleo crudo	Ruptura de oleoducto	40 hectáreas de cultivo
Enero, 2003	Derrame	Huimanguillo, Tabasco	Diesel 22, 600 L	Toma clandestina	76,250 m ² de pastizales
Enero, 2003	Derrame	Acatzingo, Puebla	Diesel 171, 890 L	Toma clandestina	Afectación de suelo
Febrero, 2003	Incendio	Ocoyoacac, Estado de México	Gas L.P	Volcadura de un autotransporte	Área de 5,000 m ² de suelo
Febrero, 2004	Derrame	Omealca Veracruz.	Diesel 286, 356 L	Toma clandestina	Se afectaron 1,500 m ² de suelo.
Abril, 2004	Derrame	Juárez, Chihuahua.	Petróleo crudo 37,365 L	Fractura de ducto	Se afectaron 17,500 m ² de suelo.
Julio, 2004	Derrame	San Juan del Río, Querétaro	Gasolina 500, 000 L	Toma clandestina	1,200 m ² de suelo agrícola.
Octubre, 2004	Derrame e incendio	Omealca, Veracruz	Petróleo crudo 1, 590, 000 L	Falla en el suministro de gas	A cañaverales, al río Tlacuache y a un área de suelo no cuantifica
Diciembre, 2004	Derrame	Nanchital, Veracruz	Petróleo crudo 795, 000 L	Explosión en la estación de bombeo Mazumiapan	20,000 m ² de suelo, 12 km. del río Coatzacoalcos y de playas

Los derrames de petróleo en ambientes marinos reducen la transmisión de luz solar a través de la columna de agua, dando como resultado que la fotosíntesis de las algas no se lleve a cabo de manera óptima y el nivel de oxígeno disminuya, en consecuencia toda la vida marina es afectada (Sodhi, 2000).

En las instalaciones de PEMEX ocurren más de la mitad de las emergencias ambientales que se presentan a nivel nacional con materiales peligrosos (Figura 1.8). Estas emergencias se concentran en los Estados de Veracruz, Campeche y Tabasco donde ocurren 88.7% de todos los eventos relacionados con la paraestatal, según lo reportó la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) en el 2006.

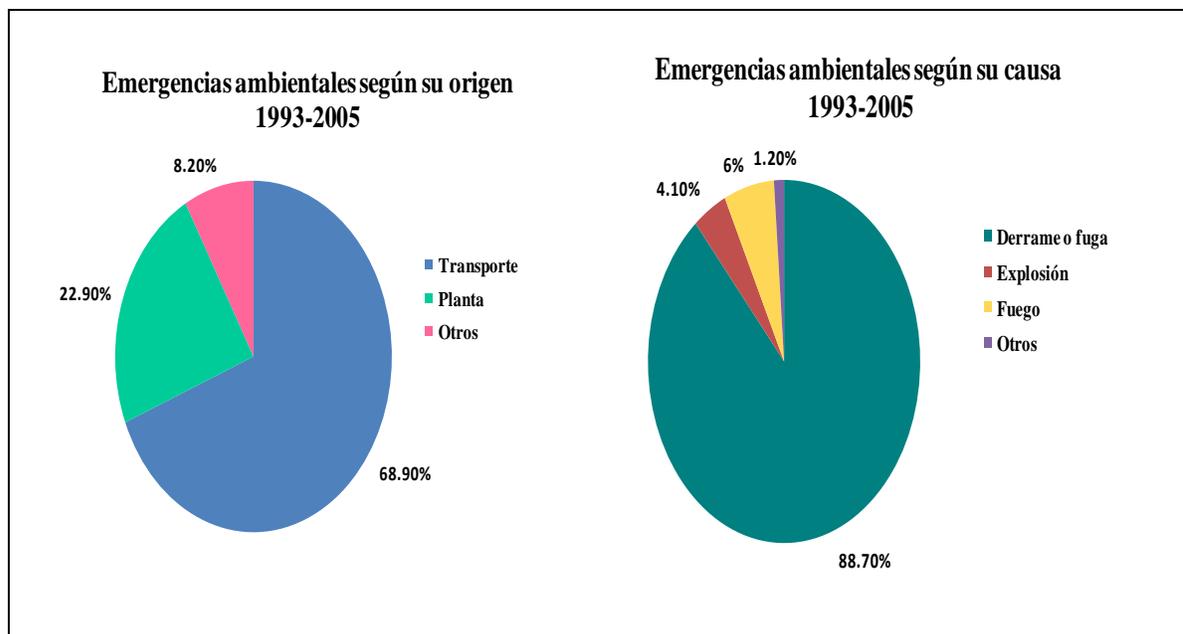


Figura 1.8 Emergencias ambientales reportadas por la Procuraduría de Protección al Ambiente (PROFEPA) que involucran materiales peligrosos en México (SEMARNAT, 2006).

Una de las contingencias ambientales más reciente fue la ocurrida en octubre de 2007 en la plataforma Kab-101 en la sonda de Campeche, en la cual se derramaron unos 422 barriles diarios de crudo ligero afectando 10 kilómetros de la costa y con riesgo de contaminar dos áreas naturales protegidas: los pantanos de Centla, donde se encuentra una de las más importantes muestras de flora vascular acuática de mesoamérica y la laguna de Términos, la cual forma parte de la mayor cuenca hidrológica del país (PROFEPA, 2007a).

En octubre de ese mismo año, en Veracruz fueron vertidos 10,000 barriles del hidrocarburo, afectando varios centros de suministro de agua potable que surten a 600,000 personas en el Estado y aproximadamente 10,000 metros cuadrados de pastizales, según se informó en un comunicado difundido por la PROFEPA en 2007b.

1.2.1 Fuentes de contaminación por hidrocarburos

La economía mundial está basada en la explotación de energías no renovables como es el petróleo. Este provoca impactos negativos de carácter económico, social y ambiental. Una investigación realizada en 1981 por el Instituto Americano del Petróleo “API” (por sus siglas en inglés) identificó entre las principales fuentes de contaminación: 1) lodos de perforación de tipo inverso y recortes, 2) tuberías corroídas, 3) “tiraderos” de desechos semisólidos, y 4) sitios contaminados por descargas de petroquímicas y refinerías (Benavides *et al.*, 2006).

1) Los lodos de perforación de tipo inverso contienen un tipo de aceite muy similar al diesel, en concentraciones de aproximadamente 10 %, y son sumamente arcillosos. Este material se

deposita en presas. Anteriormente, muchas de estas presas eran construidas de materiales permeables que filtraban los hidrocarburos al medio ambiente. La política de la industria petrolera hoy en día es de confinar estos desechos en presas hechas con materiales impermeables y bajo techo (Benavides *et al.*, 2006).

2) La segunda fuente importante de contaminación por hidrocarburos de petróleo viene de tuberías corroídas. Existen algunos campos petroleros con alrededor de cincuenta años de antigüedad (Benavides *et al.*, 2006).

3) Existen varios “tiraderos” de desechos aceitosos semisólidos en la región sureste del país, ya que los confinamientos industriales se encuentran en otras partes de la república. Debido a esta limitación, los distritos petroleros han usado presas de pozos para confinamiento. Regularmente, usan la presa principal de desechos de un pozo petrolero que nunca produjo petróleo, o un pozo antiguo que no produce y que está tapado. Estas presas nunca fueron diseñadas para recibir las cantidades de desechos que se colocan en ellas y muchas no son construidas de materiales impermeables. Este manejo inadecuado de desechos frecuentemente resulta en escurrimientos e infiltraciones de hidrocarburos al ambiente cercano (Benavides *et al.*, 2006).

4) Existen además varias descargas de petroquímicas y refinerías que generan la contaminación de áreas aledañas a éstas (comúnmente a pantanos, canales, ríos o lagunas).

La PROFEPA estima que al año se presentan un promedio de 103 accidentes en plantas de extracción que involucran sustancias peligrosas, sin embargo, la mayor cantidad de accidentes con materiales peligrosos ocurre durante su transporte (en promedio 312 al año). La mayoría de los accidentes se presenta en los ductos que transportan el petróleo crudo y sus derivados (combustóleo, diesel y gasolina). Los derrames se deben principalmente a la toma clandestina, a daños provocados por terceros y, en menor medida, a la corrosión y fallas del material. Estos derrames afectan de manera directa e inmediata al suelo y a los cuerpos de agua. Entre 1993 y 2002, las emergencias ambientales asociadas con materiales peligrosos afectaron a más de 100 mil personas en México. Sin embargo, los daños ambientales no fueron calculados. (SEMARNAT, 2006).

En México existen extensas áreas contaminadas con hidrocarburos totales del petróleo (HTP's), por lo cual hoy en día una de las mayores preocupaciones de las autoridades ambientales es encontrar y/o desarrollar tecnologías que permitan la eliminación de este tipo de contaminantes. En la Figura 1.9 se muestran las sustancias involucradas en las emergencias ambientales reportadas por la PROFEPA en el periodo 1993-2006.

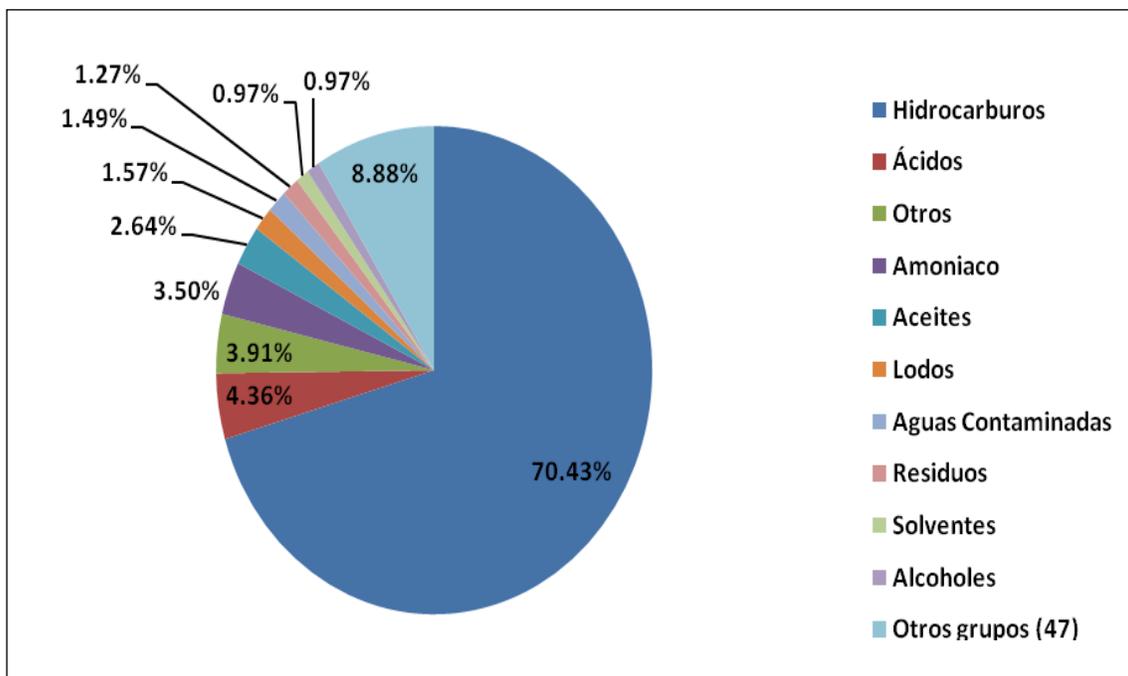


Figura 1.9 Grupo de sustancias involucradas en las emergencias ambientales en México de los años 1996-2006 (Ortiz, 2007).

1.3 Métodos de recuperación de sitios contaminados con hidrocarburos

La normatividad mexicana estableció en la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos, los cuales se detallan en la Tabla 1.7.

Tabla 1.7 Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003).

Fracción de Hidrocarburos	Uso de suelo predominante (mg/kg base seca)		
	Agrícola	Residencial	Industrial
Ligera	200	200	500
Media	1,200	1,200	5,000
Pesada	3,000	3,000	6,000

De acuerdo a su toxicidad la misma norma ha especificado los límites máximos permisibles para PAH's por sus efectos tóxicos en el hombre, los cuales se muestran en la Tabla 1.8.

Tabla 1.8 Límites máximos permisibles para hidrocarburos aromáticos en suelos (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003).

Hidrocarburos específicos	Uso de suelo predominante (mg/Kg base seca)		
	Agrícola	Residencial	Industrial
Benceno	6	6	15
Tolueno	40	40	100
Etilbenceno	10	10	25
Xileno (suma de isómeros)	40	40	100
Benzo(a)pireno	2	2	10
Dibenzo(a,h)antraceno	2	2	10
Benzo(a)antraceno	2	2	10
Benzo(b)fluoranteno	2	2	10
Benzo(k)fluoranteno	8	8	80
Indeno(1,2,3-cd)pireno	2	2	10

Existen diferentes métodos para la recuperación de sitios contaminados los cuales son aplicados dependiendo de las características físico- químicas del sitio y de la concentración del contaminante a tratar. Estos métodos se agrupan en: Físicos, Químicos y Biológicos.

1.3.1 Métodos físicos

Estos procesos son aplicables en la separación sólido-liquido, incluyendo la centrifugación, flotación, sedimentación y filtración. El carbón activado es efectivo para la extracción de compuestos tóxicos orgánicos. Para la remoción de compuestos específicos, los procesos de membranas semipermeables (ósmosis inversa, diálisis o electrodiálisis) pueden ser empleados (Henry and Heinke, 1996).

Desorción térmica: Esta técnica es aplicable únicamente a hidrocarburos ligeros y debe ir acompañada de otra operación unitaria para la recuperación de éstos.

Extracción de vapores: Esta técnica es útil cuando los contaminantes son hidrocarburos volátiles alojados en el subsuelo como gases adsorbidos a la fase sólida. Para ello, se instalan pozos acoplados a extractores al vacío y a filtro de carbón activado.

Filtración por carbón activado: Tiene una eficiencia alta, ya que los contaminantes quedan inmovilizados en el carbón activado. Una vez que se agota su capacidad de adsorción, el carbón activado debe ser sometido a tratamiento antes de su disposición final (Saval, 1999).

Remediación electrocinética: Esta técnica utiliza corriente continua directa de baja intensidad conducida hacia el suelo a través de electrodos de cerámica divididos en ánodos y cátodos. Los iones metálicos, iones amonio y compuestos orgánicos con carga positiva,

migran hacia el cátodo; mientras que los aniones como el cloruro, cianuro, fluoruro, nitratos y compuestos orgánicos cargados negativamente se mueven hacia el ánodo (Van Deuren *et al.*, 2002).

1.3.2 Métodos químicos

Los métodos químicos son usados para facilitar la transformación de contaminantes tóxicos a menos tóxicos, mediante la modificación de sus propiedades químicas, por ejemplo reduciendo su solubilidad (Batstone *et al.*, 1989).

Oxidación: Los oxidantes químicos empleados comúnmente incluyen el peróxido, el ozono, y el permanganato. Estos oxidantes pueden causar la destrucción química rápida y completa de muchos productos químicos orgánicos tóxicos, cuando la degradación de los contaminantes es parcial. Aquí es necesaria la aplicación subsecuente de otro tratamiento. En general los oxidantes han sido capaces de alcanzar hasta un 90 % de eficiencia para los compuestos alifáticos (Tricloroetileno [TCE]) y para aromáticos no saturados (como el benceno) (Van Deuren *et al.*, 2002).

Lavado de suelos: Los contaminantes absorbidos en las partículas finas del suelo son removidos con el uso de soluciones acuosas en un suelo excavado. De esta manera se reduce el volumen del material contaminado, ya que las partículas finas son extraídas del resto del suelo. Esta técnica puede ser aplicada con éxito para tratar suelos contaminados con hidrocarburos, plaguicidas y metales pesados (Volke y Velasco, 2002).

Precipitación: La precipitación de contaminantes se puede llevar a cabo mediante la adición de químicos que reaccionan con los contaminantes formando un producto soluble, o cambiando la temperatura para reducir la solubilidad del contaminante. Los carbonatos, sulfuros e hidróxidos, son usualmente utilizados para la remoción de metales pesados y compuestos inorgánicos (Riser-Roberts, 1998).

1.3.3 Métodos biológicos

El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan algunos organismos vivos para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos (Van Deuren *et al.*, 2002).

En diferentes países del mundo, la contaminación de suelos generalmente se ha tratado de solucionar con el uso de procesos fisicoquímicos, que son altamente eficientes para eliminar altas concentraciones de contaminantes. Sin embargo, cuando se tratan bajas concentraciones de contaminantes, estos procesos son poco factibles debido a sus costos de operación (Riser-Roberts, 1998).

A mediados del siglo XX se desarrollaron las primeras investigaciones encaminadas a estudiar el potencial de los microorganismos para biodegradar contaminantes. Este “uso”

intencionado recibió entonces el nombre de biorremediación. Las primeras patentes, para remediación de vertidos de gasolina, aparecen en los años 70's. En los años 80's se generalizó el uso del aire y peróxidos para suministrar oxígeno a las zonas contaminadas mejorando la eficiencia de los procesos degradativos. Durante los años 90's el desarrollo de las técnicas de "*air sparging*" (burbujeo de oxígeno) hizo posible la biorremediación en zonas por debajo del nivel freático (Rodríguez y Sánchez, 2003).

Se ha señalado que la biorremediación puede emplear organismos propios del sitio contaminado (autóctonos) o de otros sitios (exógenos); puede realizarse *in situ* o *ex situ*; en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno) y aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP's), solventes (benceno y tolueno), explosivos (Trinitrotolueno o TNT), clorofenoles (PCP), plaguicidas (2,4-D), conservadores de madera (creosota) e Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's) (Volke y Velasco, 2003)

De acuerdo con datos de la SEMARNAT, en México las 57 empresas autorizadas para remediar suelos contaminados, están enfocadas exclusivamente a sitios contaminados con compuestos orgánicos. Entre los principales contaminantes se encuentran los HTP's y los PAH's, lodos aceitosos, lodos de perforación y recortes de perforación. De acuerdo con datos proporcionados por 40 de estas empresas, treinta y un empresas utilizan métodos biológicos (biorremediación) para el tratamiento; el lavado de suelos, la oxidación química y la separación física constituyen otra parte importante de las tecnologías más empleadas en México (Volke y Velasco, 2002).

La biodegradación implica una serie de procesos biológicos que culminan con la oxidación del compuesto y generación de energía. La degradación completa, implica la oxidación del compuesto a dióxido de carbono y agua, un proceso que permite el crecimiento y reproducción de las células. Indistintamente de la estructura de la fuente de carbono por ejemplo un azúcar como la glucosa, un polímero complejo como la celulosa o un compuesto contaminante; cada paso de degradación en la ruta catabólica es catalizado por una enzima específica (Sharma, 2005). Las rutas de biodegradación de los contaminantes orgánicos, varían en función de la estructura química del compuesto y de las especies microbianas degradadoras (Hamdan, 2004).

En un estudio realizado a través de métodos moleculares, con ayuda de la Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante "DGGE" (por sus siglas en inglés) se observó, que a medida que aumenta la concentración de contaminantes en el suelo, los cambios en la estructura genética de la comunidad disminuyen. Las comunidades microbianas tienden a responder ante la presencia de contaminantes del petróleo, cambiando su estructura a una que favorezca a los organismos capaces de sobrevivir a las nuevas condiciones a expensas de otros organismos que son reprimidos (Contreras, 2005).

Se han tenido experiencias muy exitosas con la biorremediación de hidrocarburos utilizando cepas autóctonas, tanto en aguas como en suelos. Esto ha llevado a los científicos y a las

compañías biotecnológicas a aislar estos microorganismos y a venderlos como productos comerciales (Fontúrbel e Ibáñez, 2006).

El éxito de la biorremediación depende del potencial para degradar los contaminantes y el tiempo que esto tome. Antes de la implementación de técnicas biológicas *in situ*, se requiere un análisis de riesgo, la cuantificación del contaminante degradado y los metabolitos formados. Frecuentemente no se presenta un solo contaminante sino una mezcla de contaminantes. Un ejemplo es el grupo de los Bifenilos Policlorados “PCB’s” (por sus siglas en inglés) formados por 209 compuestos diferentes (Rein *et al.*, 2007).

La biodegradación de hidrocarburos en suelo se puede ver afectada por diversos factores físicos y ambientales del lugar del derrame como son:

Temperatura

La mayor parte de estudios realizados indican que las condiciones mesofílicas son las óptimas para la biorremediación de suelos contaminados, sin embargo, también se ha descrito la biodegradación de hidrocarburos a temperaturas de 10°C (en suelos subárticos y subalpinos), a 5°C (en suelos árticos) y hasta 60°C por una cepa termófila: *Bacillus stearothermophilus* aislada de un suelo contaminado con crudo de petróleo del desierto kuwaití (Viñas, 2005).

pH

La mineralización de hidrocarburos se ve favorecida a un pH próximo a la neutralidad, sin embargo, en algunas bacterias heterótrofas acidófilas, se ha demostrado la adquisición y expresión de genes que codifican enzimas implicadas en la degradación de hidrocarburos aromáticos (Quentmeir and Friedrich, 1994).

Salinidad

Algunos residuos provenientes de la actividad petrolera tiene alto contenidos en sales, generalmente cloruros de Na, K, Ca, Sr, y Ba, que pueden alterar la estructura proteica de las membranas microbianas afectando su estabilidad y actividad enzimática (Manacorda y Cuadros, 2005). La presión osmótica del agua aumenta proporcionalmente con aumentos en la salinidad.

Cambios en la salinidad pueden ocasionar efectos osmóticos. Se han identificado tres grupos de organismos halofílicos a base de su preferencia por determinadas concentraciones de sal: (i) halofílicos halodúricos (concentración óptima de sal, 2 a 5%); (ii) halofílicos moderados (concentración óptima de sal, 5 a 20%) y (iii) halofílicos extremos (20 a 30%) (Fuentes y Massol, 2002).

Oxígeno

Los pasos iniciales del catabolismo de hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos por parte de bacterias u hongos, implican la oxidación del sustrato mediante oxigenasas. En

ausencia de oxígeno (condiciones anaerobias), los contaminantes orgánicos son metabolizados hasta metano y cantidades limitadas de dióxido de carbono e hidrógeno molecular. Bajo condiciones sulfato-reductoras, el sulfato es transformado a ión sulfuro o azufre elemental; y bajo condiciones nitrato-reductoras se pueden generar como productos finales nitrógeno, NH_4 , NH_3 , etc. (Sharma, 2005).

Nutrientes

Cuando hay un vertido de petróleo en ambientes que presentan una baja concentración de nutrientes inorgánicos se suelen producir elevados cocientes C:N y/o C:P, los cuales son desfavorables para el crecimiento microbiano. De esta manera, el ajuste de estas proporciones mediante la adición de los nutrientes en forma de fertilizantes oleofílicos estimulará la biodegradación (Swannell *et al.*, 1996).

El conocimiento de las condiciones ambientales y químicas del lugar que ha sido contaminado es un paso imprescindible a la hora de diseñar una estrategia de biorremediación que permita recuperar la zona afectada por el vertido de manera exitosa.

1.3.3.1 Tecnologías de biorremediación

Se han desarrollado diferentes tecnologías de biorremediación cuyas principales diferencias son las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso y los parámetros que son controlados o modificados. En la Tabla 1.9 se muestra el fundamento de las técnicas de biorremediación, así como su aplicación para tratar diversos contaminantes.

Tabla 1.9 Tecnologías biológicas para la remediación de sitios contaminados (Volke y Velasco, 2002).

Técnica	Aplicación	Fundamento
Bioestimulación	Gasolinas, Compuestos Orgánicos Volátiles (COV), Compuestos Orgánicos Semivolátiles (COS) y plaguicidas.	Circulación de soluciones acuosas (que contengan nutrientes y/u oxígeno) a través del suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos.
Composteo	Clorofenoles (PCP), gasolinas, Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP's), Hidrocarburos Policíclicos Aromaticos (PAH's), Trinitotolueno (TNT).	Adición de sustancias orgánicas sólidas biodegradables (paja, aserrín, estiércol, desechos agrícolas), adicionadas para mejorar el balance de nutrientes y asegurar una mejor aireación y generación del calor
Bioaumentación	Herbicidas (2,4-D, clorofam), insecticidas (lindano, clordano, paratión), PCP y nitrofenoles, bifenilos policlorados (BPC), HTP's, PAH's y metales.	Adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante en cuestión, para promover su biodegradación o su biotransformación.
Bioventeo	COS o no volátiles. HTP's, solventes no clorados, plaguicidas y conservadores de la madera.	Estimular la biodegradación natural de cualquier compuesto biodegradable en condiciones aerobias.
Biolabranza	Diesel, gasolinas, lodos aceitosos, PCP, creosota y coque, plaguicidas y HTP's.	Adición de agentes de volumen y nutrientes que se remueven periódicamente para favorecer su aireación. La diferencia con el composteo, es que en la biolabranza, se mezcla el suelo contaminado con suelo limpio
Fitorremediación	Benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX); disolventes clorados; desechos de nitrotolueno; agroquímicos clorados y organofosforados; compuestos inorgánicos como Cd, Cr(VI), Co, Cu, Pb, Ni, Se y Zn	Utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes.
Biorreactores	HTP, COS no halogenados y COV, BPC, COS halogenados, plaguicidas y desechos de artillería	Uso de reactores para el cultivo microbiano en fase líquida o semisólida.

A continuación, se presentan las características más representativas de 3 de estas tecnologías:

1.3.3.1.1 Bioestimulación

Consiste en la inyección de una mezcla de agua no contaminada y los elementos necesarios para el desarrollo microbiano, es decir, nutrientes y aceptores o donadores de electrones. Los nutrientes son generalmente: carbono, nitrógeno y fósforo en forma de CO₂, amonio o urea y fosfatos, y el aceptor de electrones suele ser el oxígeno disuelto (Suthersan, 1997).

La técnica se ha usado con éxito para remediar suelos contaminados con gasolinas, COV, COS y plaguicidas. Estudios a escala piloto, han mostrado la biodegradación de suelos contaminados con desechos de municiones (Volke y Velasco, 2002).

Esta tecnología no es recomendable para suelos arcillosos, altamente estratificados o demasiado heterogéneos, ya que pueden provocar limitaciones en la transferencia de oxígeno. Otros factores que pueden limitar su aplicación son, que el tipo del suelo no favorezca el crecimiento microbiano; el incremento en la movilidad de los contaminantes; o que haya obstrucción en los pozos de inyección provocada por el crecimiento microbiano (Volke y Velasco, 2002).

1.3.3.1.2 Bioaugmentación

Implica la adición de un inóculo microbiano con capacidad de degradar contaminantes. El uso de organismos nativos que se han cultivado y propagado en laboratorio se recomiendan para ser aplicados nuevamente al suelo contaminado (Stroud *et al.*, 2007).

Los microorganismos reportados en la degradación del petróleo comprenden principalmente géneros bacterianos como: *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthobacter*, *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium* y *Bacillus*. Los géneros más comunes de hongos son: *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Candida* y *Sporobolomyces* (Hamdan, 2004).

Antes de llevar a cabo la bioaugmentación en un sitio, deben realizarse cultivos de enriquecimiento, aislar microorganismos capaces de cometabolizar o utilizar el contaminante como fuente de carbono, y cultivarlos hasta obtener grandes cantidades de biomasa (Volke y Velasco, 2002).

1.3.3.1.3 Composteo

Esta estrategia de biorremediación utiliza microorganismos aeróbicos y termófilos, formando pilas de material orgánico que deben ser mezcladas y humedecidas periódicamente para promover la actividad microbiana (Vargas *et al.*, 2004).

Es una tecnología *ex situ* diseñada para tratar los suelos contaminados. El proceso implica la mezcla del suelo contaminado con sustancias orgánicas sólidas biodegradables como virutas de madera, paja, heno o alfalfa, estiércol y desechos agrícolas. La selección de los ingredientes específicos depende de los contaminantes que se tratarán y de las características físico-químicas del suelo a fin de proporcionar el equilibrio apropiado de carbón y nitrógeno para promover la actividad biológica (Goetz and Brenner, 2002).

El composteo se utiliza para tratar los contaminantes sustituidos o aromáticos de alto peso molecular. Los compuestos tratados con éxito incluyen los contaminantes asociados a los explosivos tales como TNT, RDX, HMX, y nitrocelulosa; productos químicos incluyendo PAH's y PCP; y ciertos plaguicidas; y otras clases de compuestos incluyendo los hidrocarburos, aceites y grasas y COV's (Goetz and Brenner, 2002).

Algunas limitaciones del proceso son la necesidad de espacio; las excavaciones del suelo contaminado, lo que puede provocar la liberación de COV, y el incremento volumétrico del material a tratar (Volke y Velasco, 2002).

1.4 Antecedentes

Bushnell y Hass en el año de 1941 realizaron un estudio para determinar la capacidad de ciertos microorganismos aislados de diferentes fuentes, para utilizar fracciones de petróleo como: gasolina, queroseno, aceites y parafinas; encontrando que el género *Pseudomonas* era capaz de utilizar el keroseno, mientras que *Micrococci* y *Corynebacteria* tenían preferencia por las parafinas (Bushnell and Hass, 1941).

En el año 2002, Bhattacharya y colaboradores realizaron un estudio para determinar la diversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos en diferentes regiones de la India. Mediante técnicas de biología molecular utilizando el gene 16S rDNA, pudieron identificar 150 especies entre las que se encontraban: *Yokenella spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Roseomonas spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Flavomonas spp.*, *Cornybacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Providencia spp.*, *Sphingobacterium spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Moraxella spp.* y *Bacillus spp.* En estudios de laboratorio, obtenían remociones de HTP's de 65 a 95% (Bhattacharya *et al.*, 2003).

En el año 2002, Bogan y colaboradores aislaron *Mycobacterium austroafricanum* de un suelo contaminado con hidrocarburos, la cual demostró ser capaz de mineralizar algunos PAH's como fenantreno, fluoranteno y pireno; este organismo demostró de igual manera que podía mineralizar dos hidrocarburos alifáticos: el dodecano y el hexadecano (Bogan *et al.*, 2003).

En un estudio realizado en el año 2002 por Pollmann y colaboradores se determinó la capacidad de *Ralstonia sp.* PS12 (Figura 1.10) de mineralizar compuestos cloro sustituidos del benceno, como 2,4-, 2-5 y 3-4 diclorotolueno. En la Figura 1.11 se muestra la ruta metabólica para la degradación de 3-4 diclorotolueno.

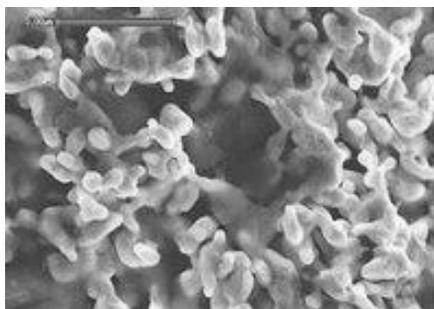


Figura 1.10 Bacteria *Ralstonia sp.* URL <http://www.7fm.eu/?p=4090>

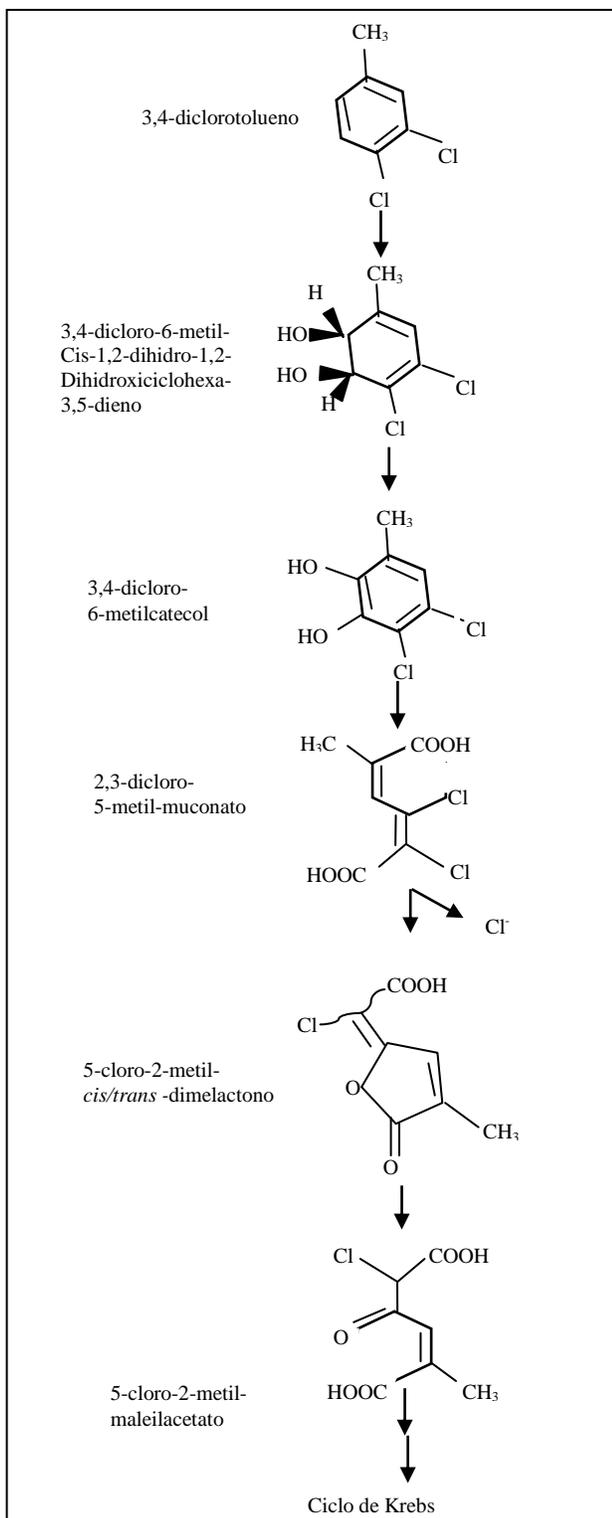


Figura 1.11 Ruta metabólica propuesta para la degradación de 3,4-diclorotolueno por *Ralstonia sp.* (Pollman *et al.*, 2002).

En el año 2003, Yerushalmi y colaboradores llevaron a cabo un estudio en muestras de suelo contaminadas con hidrocarburos tomadas del norte de Quebec, Canadá. Los

resultados obtenidos mostraron que el consorcio bacteriano tenía una alta capacidad para degradar los compuestos aromáticos. Al aplicar métodos biológicos como la bioestimulación se mejoró la remoción de HTP's de 20.45% a 49.2%. En los procesos de biorreactores se obtuvo un incremento en la eficiencia de remoción mayor al 70% después de 45 días (Yerushalmi *et al.*, 2003).

En el año 2005, Cafaro y colaboradores propusieron una ruta metabólica para *Pseudomonas stutzeri* OX1, la cual es capaz de crecer a elevadas concentraciones de compuestos aromáticos tóxicos, como el benceno, tolueno, xileno y dimetilfenol, los cuales son utilizados como fuente de carbono y energía. En la *P. stutzeri* el (metil)benceno es inicialmente activado por dos grupos hidroxílicos para formar (metil)fenol y eventualmente (metil)catecol (Figura 1.12). En el estudio realizado se demostró, que los pasos de hidroxilación inicial se llevan a cabo por dos monooxigenasas: monooxigenasa multicomponente bacteriana (BMM's) y monooxigenasa tolueno o xileno (ToMO) pertenecientes a la familia que contiene 4 componentes monooxigenasa aromáticos/alcanos (grupo 2- BMM's) y fenol hidroxilasa (PH), perteneciente al grupo del Tolueno 2-monooxigenasa (T2MO)/fenol hidroxilasas (grupo 1 BMMs).

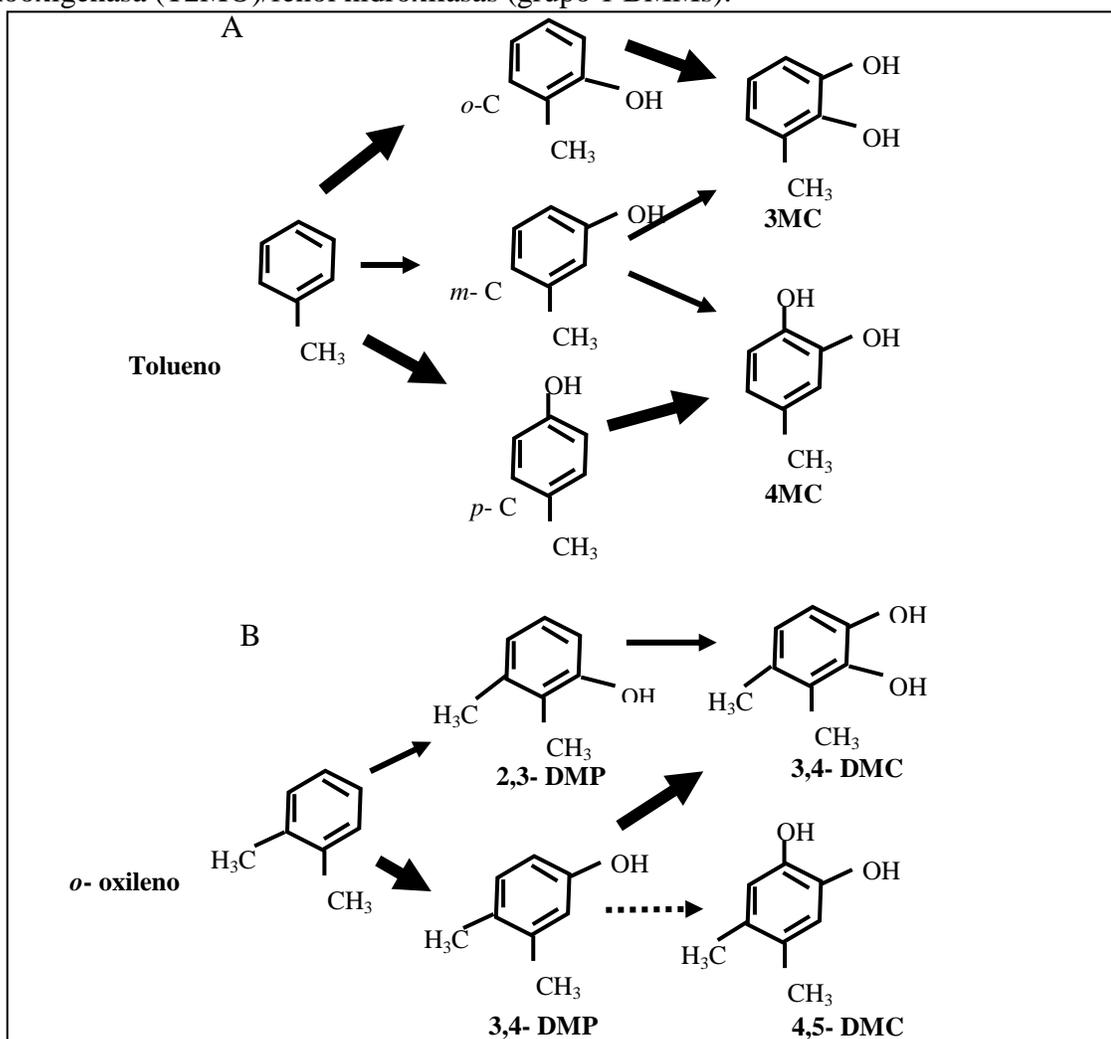


Figura 1.12 Ruta metabólica propuesta para la degradación de tolueno a metilcatecol (A) y de *o*-xileno a dimetilcatecol (B) catalizado por TOMO y PHP (Cafaro *et al.*, 2005).

La degradación bacteriana del pireno, ha sido descrita por varios investigadores quienes han identificado los metabolitos y los caminos de transformación propuestos. Las micobacterias se han aislado en varias ocasiones como bacterias que pueden degradar el pireno y benzo[a]pireno. El camino esquemático propuesto para la degradación del pireno por *Mycobacterium sp* se muestra en la Figura 1.13 (Cafaro *et al.*, 2005).

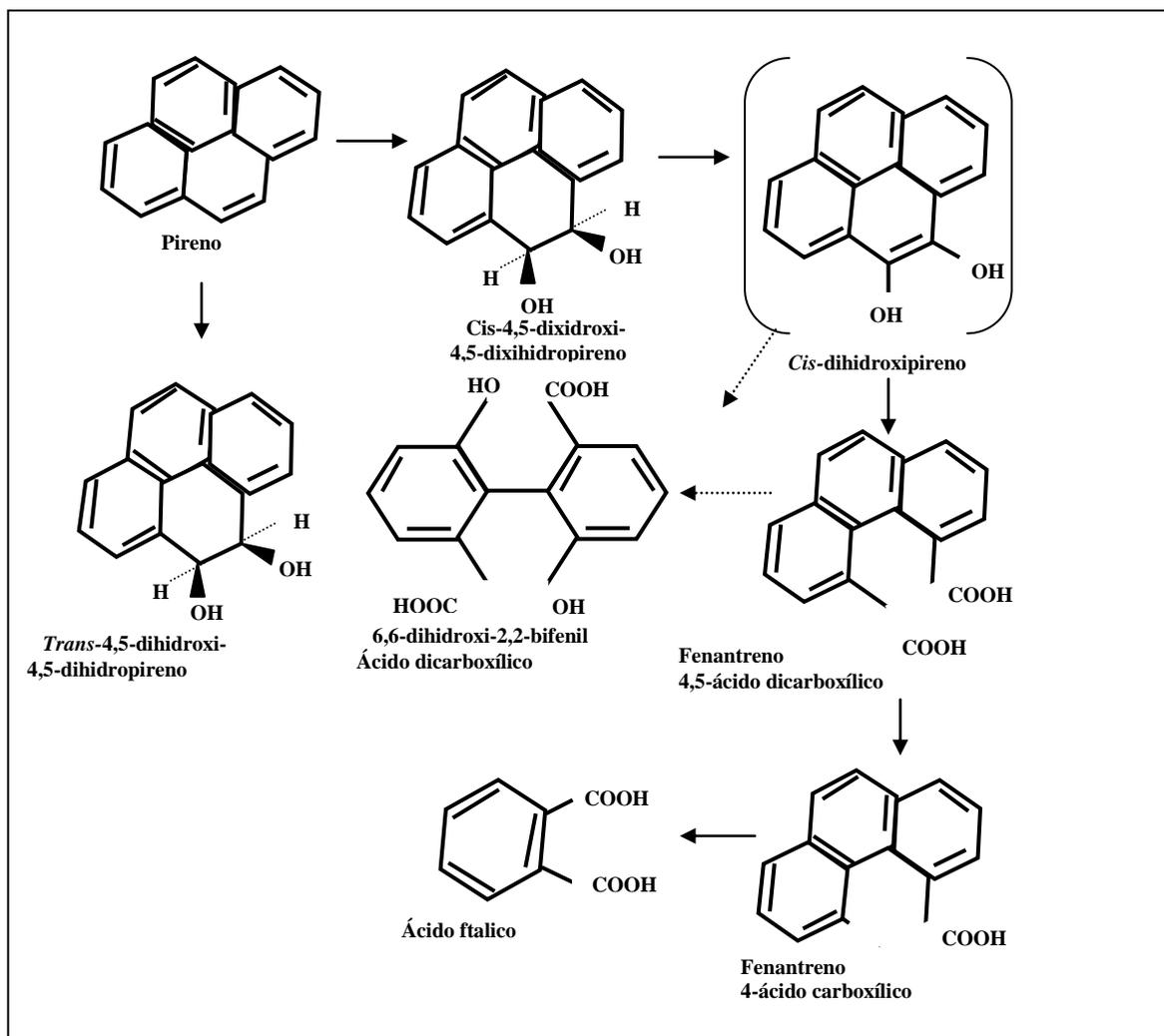


Figura 1.13 Ruta metabólica de la degradación del pireno por *Mycobacterium sp.* AP1 (Vila *et al.*, 2001).

Entre los trabajos realizados en México, podemos citar el estudio efectuado para evaluar la remoción de las fracciones del petróleo: alifática, policíclica aromática (PAH's) y policíclica aromática azufrada (PAS's) de un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo en el sureste de México (Arce, 2004). Mediante estrategias de biorremediación: bioaumentación y bioestimulación se obtuvo una remoción del 79%, 49% y 54% de cada una de las fracciones, cuando los sistemas fueron enriquecidos con los microorganismos obtenidos a partir del suelo y cáscara de piña. De la población microbiana involucrada en la remoción de los hidrocarburos alifáticos se logró identificar mediante pruebas bioquímicas a *Rhodococcus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas* y *Flavobacterium*; en la remoción de PAH's

a *Achromobacter*, *Pseudomonas* y *Flavobacterium*; y en la remoción de los PAS's a *Pseudomonas*, *Serratia* y *Flavobacterium*.

En el mismo año, Hamdan realizó un estudio de biomonitorio para el seguimiento de poblaciones microbianas en procesos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de Huimanguillo, Tabasco y Poza Rica, Veracruz. Logrando identificar las siguientes bacterias *Stenotrophomonas maltophilia*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Chryseomonas luteola*, *Burkholderia cepacia* y *Agrobacterium radiobacter* (Hamdan, 2004).

De igual manera en el mismo año, Cuéllar y colaboradores realizaron un estudio para determinar la capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* para utilizar alcanos sólidos (parafinas) como única fuente de carbono y energía, teniendo como resultado una remoción del 48 % de parafinas con punto de fusión entre 56 - 61 °C y entre 18 y 28 átomos de carbono (Cuéllar *et al.*, 2004).

En al año 2006, Fernández y colaboradores realizaron un manual de técnicas de análisis de suelos, necesarias para el seguimiento de la remediación y caracterización de sitios contaminados. El contenido se encuentra dividido en cuatro secciones:

- 1) Pruebas físicas y químicas de suelos, que incluyen parámetros importantes por considerar en la remediación de suelos contaminados como pH, humedad, salinidad, conductividad eléctrica, fósforo, nitrógeno, sulfatos, potencial de oxido-reducción e intercambio catiónico, entre otros;
- 2) Análisis de hidrocarburos del petróleo, principalmente hidrocarburos totales de petróleo;
- 3) Análisis microbiológicos que incluyen hongos y bacterias aerobias y anaerobias; y
- 4) Ensayos toxicológicos para suelos contaminados, que incluyen pruebas de germinación, crecimiento de plantas y toxicidad aguda con lombrices de tierra (Fernández *et al.*, 2006).

1.5 Justificación

En México se han aplicado diversas técnicas de remediación de sitios contaminados con hidrocarburos. Una de las prácticas más comunes que se ha realizado en el pasado, es la utilización de microencapsuladores. Estos productos absorben el hidrocarburo y lo retienen en su estructura interna, sin embargo el contaminante no se descompone (Ortínez *et al.*, 2003).

En otros casos se han aplicado productos a base de detergentes con el objeto de hacer un lavado de suelos y así separar la matriz del hidrocarburo. Tecnologías como el proceso de incineración, desorción térmica o la extracción de vapor resultan demasiado costosas o ecológicamente incompatibles para considerarse como una solución viable (Ortínez *et al.*, 2003).

En México el lavado de suelos se utilizó para la limpieza de 45,000 toneladas de sedimentos contaminados con hidrocarburos en diversas zonas. Al principio el proyecto se ejecutó con

gran éxito debido a las características de los sitios contaminados, sin embargo ciertas propiedades del sedimento como la textura (alto contenido de arcillas) y el contenido de materia orgánica resultó una limitante para esta tecnología (Ortíz et al., 2003).

Las técnicas biológicas para remediación de sitios contaminados son consideradas como una opción viable aplicada a una gran variedad de contaminantes. Las ventajas de estas técnicas con respecto a las técnicas físicas o químicas son:

- Dan lugar a la destrucción del contaminante, no simplemente la transferencia o remoción del contaminante fuera del sitio.
- Son diseños simples que requieren un mínimo de energía
- Bajos costos de instalación y operación en comparación con las técnicas físicas o químicas.
- Permiten la reutilización del suelo una vez descontaminado. (Goetz and Brenner, 2002).

Entre las desventajas que se presentan en las técnicas biológicas están: el requerimiento de mayores tiempos de tratamiento; la toxicidad de intermediarios y/o productos y el tipo de suelo que en ocasiones no favorece el crecimiento microbiano (Volke y Velasco, 2002).

La viabilidad de estas técnicas se debe a la diversidad de microorganismos presentes en el suelo. Estudios realizados reportan más de 10, 000 especies diferentes de bacterias encontradas por gramo de suelo. En suelos contaminados se encuentran de 350 a 1, 500 géneros microbianos. Las técnicas de biología molecular ofrecen la oportunidad de analizar la estructura y composición de tales comunidades microbianas. El conocimiento de la diversidad microbiana en ambientes naturales, ha sido revelado por el estudio con biomarcadores moleculares de los microorganismos como el gen del 16S rRNA (Hamdan, 2004).

Las técnicas moleculares de identificación proveen una importante herramienta para determinar la función ecológica de los genes que se encuentran involucrados en el metabolismo de compuestos xenobióticos y para encontrar nuevos genotipos a través de la inoculación de microorganismos provenientes de sitios contaminados, los cuales pueden ser aplicados en otros sitios contaminados con características similares (Padmanabhan *et al.*, 1998).

Por lo anterior se plantea la necesidad de fomentar la investigación de métodos biológicos para la recuperación de sitios contaminados con hidrocarburos en México.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Estudiar la capacidad de diferentes microorganismos para llevar a cabo procesos de biorremediación.

1.6.2 Objetivos específicos

- Aislar por técnicas microbiológicas los diferentes tipos de cepas hidrocarbonoclastas presentes en un suelo contaminado con hidrocarburos.
- Identificar por técnicas moleculares el/los géneros representativos.
- Determinar la capacidad de remoción de hidrocarburos en medio líquido de las cepas aisladas y en consorcio.

Capítulo II. Materiales y Métodos

2.1 Plan de trabajo

El presente estudio se realizó en los laboratorios de Microbiología Ambiental y Biología Molecular de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) unidad Chetumal, Quintana Roo. La muestra de suelo contaminado con petróleo que se analizó en este trabajo fue tomada del Estado de Tabasco. En la Figura 2.1 se esquematiza el plan de trabajo que se siguió en la presente investigación.

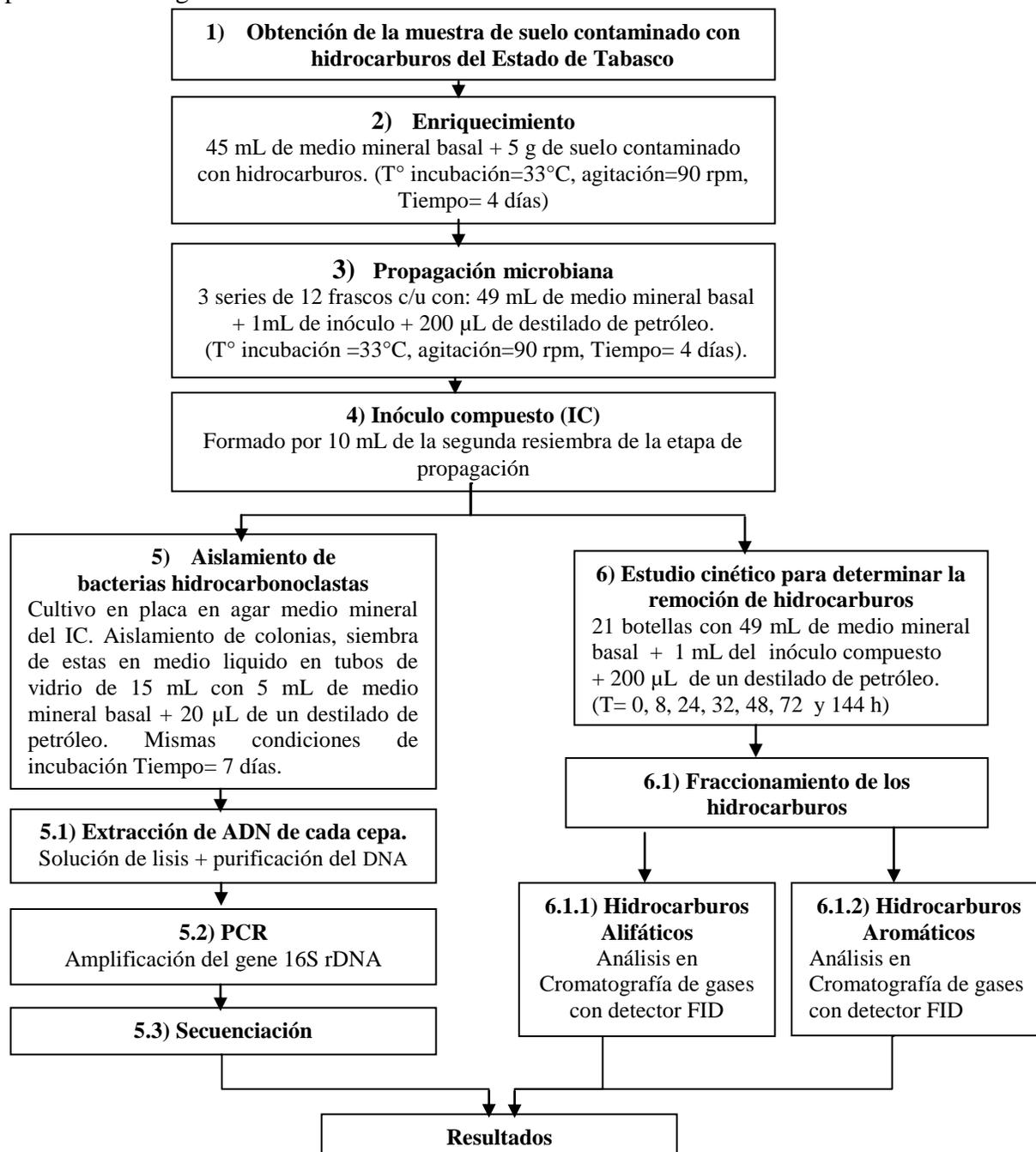


Figura 2.1. Plan de trabajo.

2.2 Aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas

2.2.1 Enriquecimiento

Para poder llevar a cabo el aislamiento y propagación de los microorganismos capaces de degradar los contaminantes de petróleo, se realizó el proceso de enriquecimiento microbiano. Así, después de una serie de resiembras en medio líquido se obtuvieron los microorganismos capaces de adaptarse a un medio donde la única fuente de carbono y energía fue un destilado de petróleo.

El proceso de enriquecimiento se realizó por triplicado en matraces de 250 mL con 45 mL de medio mineral basal, tomado del manual de “Técnicas de Análisis de Suelos Aplicadas a la Remediación de Sitios Contaminados” (Fernández *et al.*, 2006) (Tabla 1-Anexo 1). El inóculo inicial lo conformaron 5 g de suelo contaminado con hidrocarburos, estos sirvieron como única fuente de carbono (Figura 2.2). Los cultivos se denominaron A₁, A₂ y A₃, estos permanecieron en incubación por 4 días a 33 °C y con una agitación de 90 rpm.



Figura 2.2 Muestra de suelo contaminado con hidrocarburos del estado de Tabasco.

Después de 24 horas, se adicionó en una botella serológica de 120 mL: 49 mL de medio mineral, 200 μ L de un destilado de petróleo y 1 mL de inóculo del sistema A₁, este cultivo fue denominado A₁₁, permaneciendo en incubación durante 3 días bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación, descritas anteriormente.

2.2.2 Propagación

Posteriormente, con el propósito de conservar el consorcio bacteriano, se realizaron periódicamente 3 resiembras de los sistemas, por triplicado, en botellas serológicas de 120 mL conteniendo un volumen final de 50 mL: 49 mL de medio mineral basal, 1 mL de inóculo y 200 μ L de un destilado de petróleo (Figura 2.3), estos permanecieron en incubación durante 4 días bajo los mismas condiciones de temperatura y agitación, descritas anteriormente.

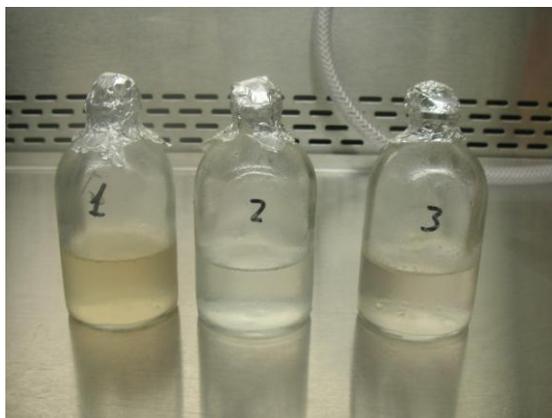


Figura 2.3 Cultivos del consorcio bacteriano.

Como una forma de determinar la dinámica poblacional durante la remoción de hidrocarburos se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC). La siembra en placa se realizó en medio agar nutritivo (23 g/L) y en agar medio mineral (15 g/L). En el primero crecieron todos los microorganismos heterótrofos cultivables y en el segundo sólo las bacterias hidrocarbonoclastas, (Figura 2.4). El medio de cultivo se preparó con la formulación que se menciona en la Tabla 3-Anexo 1.

Para la cuantificación de los microorganismos se prepararon tubos de vidrio de 15 mL con 9 mL de solución salina al (0.85 %) realizando diluciones sucesivas decimales hasta 10^{-8} , con el fin de obtener colonias separadas. La siembra en placa se realizó por duplicado tomando 100 μL de las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} y esparciéndolos con una varilla en las cajas de Petri.

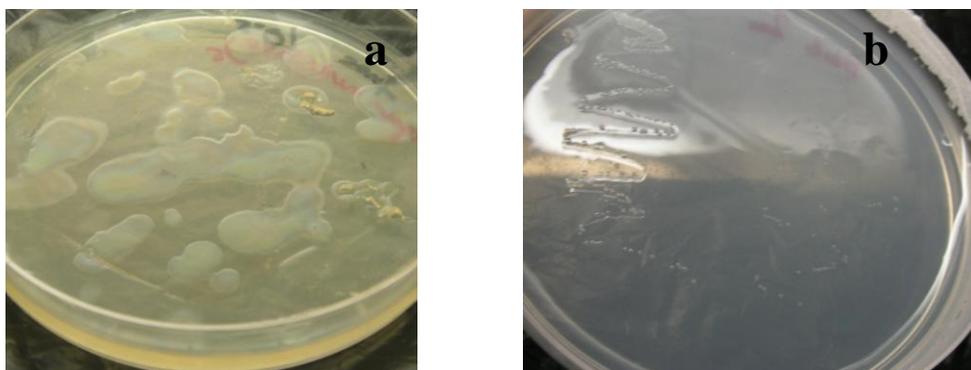


Figura 2.4 Siembra en placa a) agar nutritivo, b) agar medio mineral.

El aislamiento de las bacterias hidrocarbonoclastas, se efectuó a partir de un inóculo compuesto, formado por 10 mL de la segunda resiembra del consorcio bacteriano en la etapa de propagación. Mediante el cultivo en placa en agar medio mineral y utilizando los hidrocarburos volátiles de un destilado de petróleo como fuente de carbono y energía (Figura 2.5) se lograron aislar y purificar 4 cepas (C1 – C4).

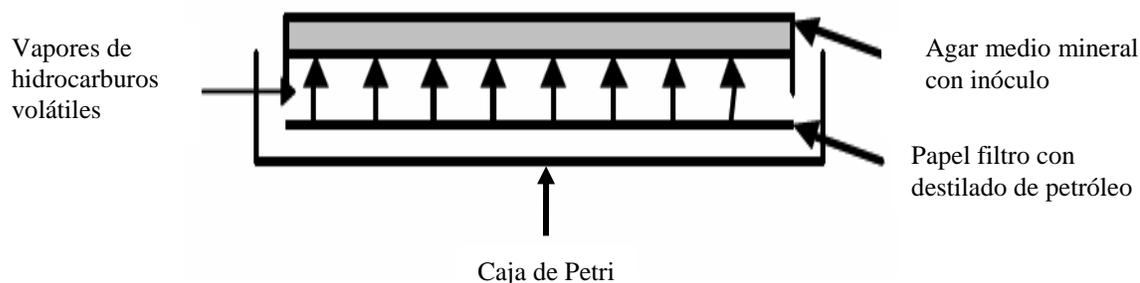


Figura 2.5 Caja de Petri con agar medio mineral (Hamdan, 2004).

Las cepas aisladas (Figura 2.6) se inocularon por duplicado en tubos de vidrio de 15 mL conteniendo 5 mL de medio mineral y 20 μ L de un destilado de petróleo. Estos se dejaron incubar durante 7 días a 33 °C y 90 rpm.

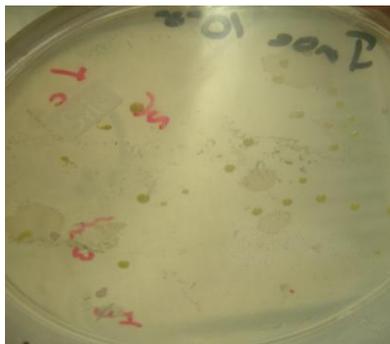


Figura 2.6 Aislamiento de las cepas (C1-C4) en agar nutritivo.

Posteriormente, se realizó la propagación en botellas serológicas de 120 mL conteniendo un volumen final de 50 mL: 45 mL de medio mineral, 5 mL de inóculo tomado de los tubos de vidrio de 15 mL (correspondiente a 10 % del volumen total) y 200 μ L de un destilado de petróleo. Estos permanecieron en incubación durante 4 días bajo las mismas condiciones, de temperatura y agitación, descritas anteriormente.

2.3 Identificación

2.3.1 Caracterización morfológica

Las placas utilizadas para realizar el conteo de bacterias también sirvieron para observar la morfología de las colonias. Las características que las diferenciaron fueron: color, borde, diámetro, elevación, textura y forma.

2.3.2 Caracterización filogenética

Para llevar a cabo la identificación molecular de las cepas aisladas se realizó la extracción

del DNA total de cada una, tomándolo como molde para llevar a cabo la amplificación del gene que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosomal, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa “PCR” (por sus siglas en inglés). Finalmente se descifró la secuenciación dicho gene. Los procedimientos y especificaciones de cada etapa se describen a continuación.

2.3.2.1 Extracción de DNA

A partir de un cultivo de 96 h de cada una de las 4 cepas (C1-C4) se obtuvo un concentrado de biomasa que se dejó decantar invirtiendo los frascos de cultivo boca abajo (Figura 2.7a). Con ayuda de una jeringa se tomaron 45 mL de la fase líquida, y se dejaron los 5 mL restantes que contenían el hidrocarburo. Posteriormente se depositó en tubos Falcon de 15 mL y se centrifugó durante 5 minutos a 3,500 rpm (Figura 2.7b). Con la biomasa obtenida se realizó el procedimiento de extracción de DNA.

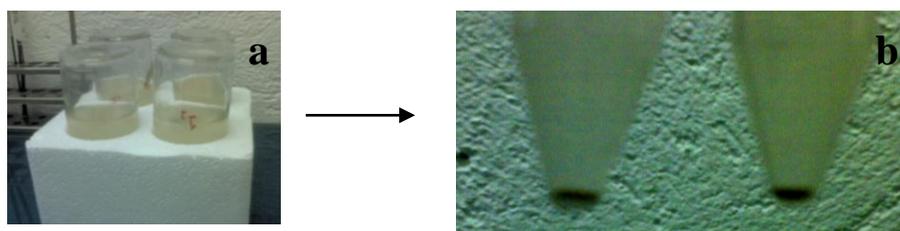


Figura 2.7 Concentrado de biomasa de las cepas.

La biomasa obtenida se depositó en tubos Eppendorff de 1.5 mL. Posteriormente se agregaron 300 μ L de solución de lisis (Tabla 4-Anexo 1) y se incubó en baño María a 60°C durante una hora. Transcurrido este tiempo se agregaron 500 μ L de fenol equilibrado pH= 8, se agitó el tubo con vortex vigorosamente durante 2 minutos (Figura 2.8) y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos.



Figura 2.8 Agitación de tubos con vortex.

Al sacar el tubo de la centrífuga se observaron dos fases, se tomó la fase acuosa, cuidando de no tomar la fase media, y se transfirió a otro tubo conteniendo 500 μ L de cloroformo puro. La mezcla se agitó con vortex y se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm durante 5 minutos (Figura 2.9). Una vez más se transfirió la fase acuosa a otro tubo con 50 μ L de

acetato de sodio 3 M pH=5.2 y se adicionó 1 mL de etanol absoluto guardado a -20°C , se agitó suavemente por inversión y se incubó en el congelador por una noche.



Figura 2.9 Centrifugación de las muestras a 13 000 rpm.

Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 minutos, se decantó el etanol absoluto y se adicionó 1 mL de etanol al 70 %, se centrifugó a 13, 000 rpm durante 30 minutos, después se decantó y se secó en un concentrador al vacío a 45°C durante 5 minutos (Figura 2.10). El DNA seco, se resuspendió en 50 μL o 25 μL de buffer TE (Tris-EDTA) pH= 8 dependiendo del tamaño del botón obtenido.



Figura 2.10 Concentrador par el secado del DNA extraído.

Con el fin de cuantificar la cantidad y la pureza del DNA, las muestras obtenidas en la extracción se analizaron en un espectrofotómetro (Figura 2.11). El blanco se realizó con 100 μL de solución TE y las muestras se diluyeron 1 en 50 en este mismo buffer. La concentración se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}), en tanto que la pureza se evaluó observando la relación A_{260}/A_{280} .



Figura 2.11 Espectrofotómetro para cuantificar la cantidad y pureza de DNA.

Además de ello se corrió una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X. Antes de depositar el gel en la cámara de electroforesis se agregaron 0.8 μL de bromuro de etidio (10 mg/mL) para un gel de 30 mL (Figura 2.12).



Figura 2.12 Elaboración del gel de agarosa.

La inyección de las muestras se realizó de la siguiente manera: en el primer carril se depositaron 5 μL de marcador de peso y 10 μL de buffer TAE 1X, para los siguientes carriles 5 μL de muestra de DNA extraído, 10 μL de TAE 1X y 2 μL de buffer de carga, para el cual se utilizó azul de bromofenol (Figura 2.13).

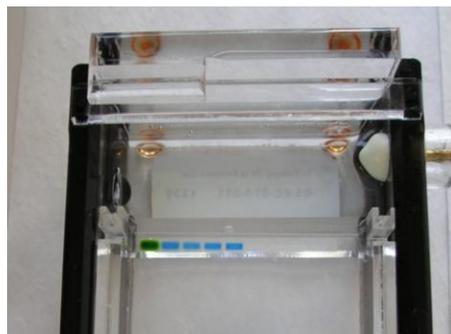


Figura 2.13 Inyección de muestras en el gel de agarosa.

El corrimiento de la electroforesis se llevo a cabo a 80 voltios durante 40 minutos. En la Figura 2.14 se muestra el equipo utilizado.

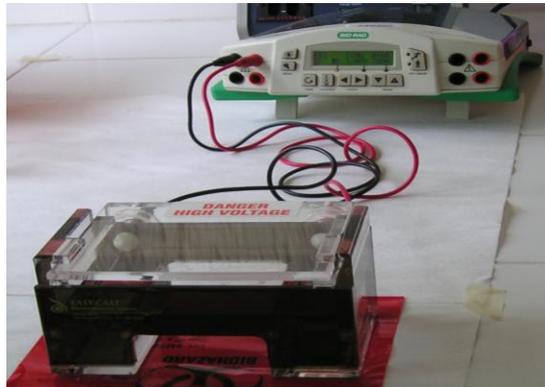


Figura 2.14 Corrimiento de la electroforesis.

Finalmente, con el fin de verificar la presencia de DNA completo después de terminar el corrimiento del gel, este se observó a través de un transluminador de luz UV (Figura 2.15).

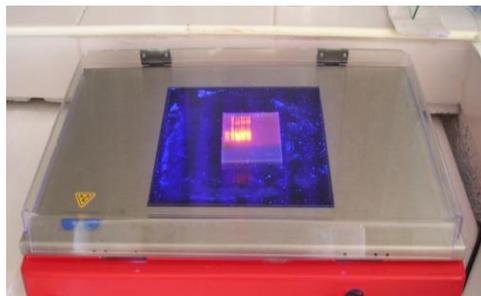


Figura 2.15 Transluminador de luz UV.

2.3.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción de PCR permite amplificar fragmentos de DNA que se pueden utilizar para la identificación de microorganismos de diversos ambientes. En nuestro caso, se amplificó el gen 16S rRNA del DNA extraído de las cepas (C1-C4). Los oligos iniciadores o “primers” utilizados fueron los siguientes:

Fd₁ 5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'

Rd₁ 5' – AAGGAGGTGATCCAGCC -3'

Las condiciones establecidas para la amplificación se describen en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Mezcla de reacción para PCR

Mezcla de reacción	Volumen (μL)	Concentración final
Buffer	5	10 X
MgCl ₂	5	50 mM
dNTP's	1	20 mM
Iniciadores	1 de c/u	10 μM
<i>Taq</i> polimerasa	0.4	0.5 U/μL
DNA molde	1	10- 100 pMol
H ₂ O _d	Hasta completar a 50 μL	

Una vez preparados los tubos con la mezcla de reacción, estos se introducen en un termociclador (Figura 2.16).



Figura 2.16 Termociclador para la amplificación de DNA.

El programa utilizado en el termociclador para la reacción de PCR se describe en la tabla 2.2.

Tabla 2.2 Programa en el termociclador para la reacción de PCR

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo	
1	Pre-desnaturalización	96	3 min
2	Desnaturalización	96	30 s
3	Alineamiento	57.1	30 s
4	Extensión	72	2 min
5	Repetir pasos 2 al 4 por 30 ciclos		
6	Post-extensión	72	7 min
7	Pausa	4	∞

2.3.2.3 Secuenciación

La secuenciación del DNA se realizó en el laboratorio de Ácidos Nucleídos del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

2.4 Estudio cinético para determinar la remoción de hidrocarburos

La capacidad de remoción de hidrocarburos por el inóculo compuesto, se observó preparando 21 botellas serológicas de 120 mL, conteniendo 49 mL de medio mineral (Tabla 1-Anexo1), 1 mL de inóculo y 200 μ L de un destilado de petróleo. Las condiciones de incubación fueron 33° C y una agitación de 90 rpm. Las muestras se retiraron a las 0, 8, 24, 32, 48, 72 y 144 horas respectivamente.

Como control abiótico se prepararon 7 botellas serológicas de 120 mL con las mismas características anteriores pero sin el inóculo, retirando las botellas en los tiempos establecidos anteriormente.

El estudio cinético de las cepas aisladas se realizó bajo las mismas condiciones que el inóculo compuesto, pero retirando los cultivos a las 48 horas.

2.4.1 Extracción de hidrocarburos totales

Para determinar la concentración de los hidrocarburos totales se efectuó una extracción líquido-líquido (Fernández *et al.*, 2006). Las muestras contenidas en las botellas serológicas se depositaron en un embudo de separación, se agregaron 50 mL de diclorometano, se agitó vigorosamente de manera manual durante 1 minuto (Figura 2.17) y se dejó reposar hasta la separación de dos fases. La fase orgánica se recolectó en un matraz esférico de fondo redondo. Posteriormente se evaporó el solvente con ayuda de un rotaevaporador a 40°C y 1 atm de presión por aproximadamente 30 minutos hasta un volumen final de 0.5 mL.

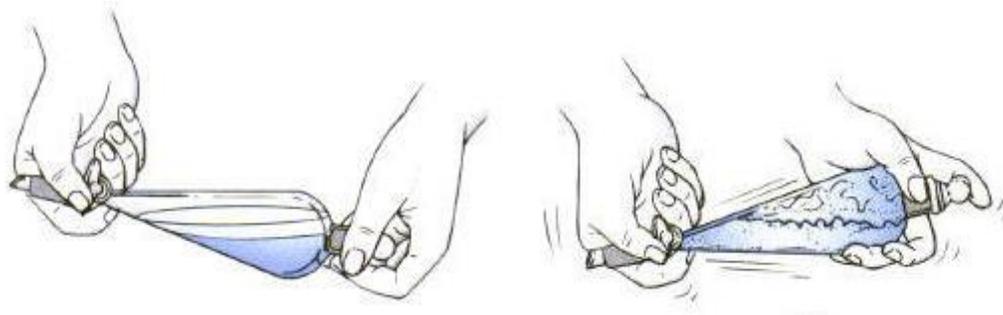


Figura 2.17 Agitación vigorosa de las muestras en el embudo de separación URL (<http://www.quimicaorganica.net/laboratorios/extraccion/extraccion.htm>).

2.4.2 Fraccionamiento de los hidrocarburos totales

Se realizó el fraccionamiento utilizando la técnica de cromatografía sólido-líquido en columna de 13 mm de diámetro y 24 cm de longitud empacada con óxido de aluminio (alúmina) de pH neutro (Fernández *et al.*, 2006). La Figura 2.18 ilustra el procedimiento seguido para la realización del fraccionamiento.

Para ello se pesaron por separado 0.75 y 1.5 g de alúmina. A los 0.75 g de alúmina se agregaron 0.5 mL del extracto de la muestra y después se homogenizó la mezcla y se dejó evaporar el diclorometano.

2.4.2.1 Fraccionamiento de hidrocarburos alifáticos

Se agregaron a la columna 2 mL de hexano y seguidamente 1.5 g de alúmina, después se agregó la mezcla de alúmina con el extracto de la muestra y 2 mL de hexano y se inició la elusión. A la salida de la columna se colectaron de 2.5 a 2.7 mL de hidrocarburos alifáticos y se detuvo la elusión.

2.4.2.2 Fraccionamiento de hidrocarburos aromáticos

En seguida de la elusión de los hidrocarburos alifáticos se adicionaron 7.5 mL de tolueno y se reanudó la elusión. A la salida de la columna se colectó la fracción aromática hasta que quedó vacía la columna.

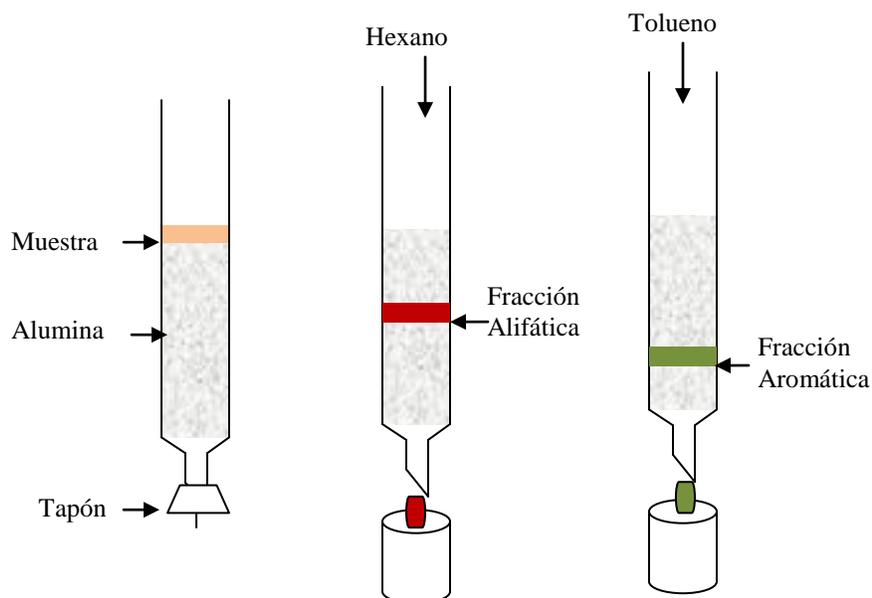


Figura 2.18 Procedimiento del fraccionamiento de hidrocarburos.

Posteriormente se evaporó el solvente de cada una de las fracciones obtenidas con ayuda de un rotaevaporador. Para el hexano se utilizó una temperatura de 30 °C y 300 mm Hg de presión y para el tolueno, una temperatura de 70 °C y 100 mm Hg de presión. En ambos casos, el solvente se evaporó hasta un volumen final de 0.5 mL y se aforó con el solvente usado para cada fracción hasta un volumen de 2 mL.

Finalmente se realizó el análisis de las fracciones alifática y aromática, mediante cromatografía de gases con Detector de Ionización de Flama o “FID” (por sus siglas en inglés) marca THERMO, utilizando una columna DB1, programando las siguientes condiciones de temperatura en el horno: temperatura inicial 50 °C por 2 minutos, 30 °C/min hasta 220 °C, 5 °C/min hasta 290 °C manteniendo esta temperatura por 2 minutos.

Para cuantificar los hidrocarburos se prepararon los estándares de hidrocarburos alifáticos y aromáticos con concentraciones conocidas, descritos en la tabla 6-Anexo 1. Los cuales fueron analizados en cromatografía de gases bajo las condiciones descritas anteriormente. Para cada uno de los compuestos se obtuvo el área bajo la curva la cual se correlacionó directamente con la concentración del compuesto analizado.

La evaluación de los compuestos presentes en las muestras de cada fracción de hidrocarburos se realizó considerando el área total en cada una de las fracciones la cual se correlacionó directamente con la concentración total de los compuestos.

La remoción de los hidrocarburos se calculó a partir de las concentraciones obtenidas mediante la fórmula:

$$\% \text{ remoción} = \left[\frac{\text{Concentración final}}{\text{Concentración inicial}} * 100 \right]$$

Capítulo III. Resultados y Discusión

3.1 Aislamiento de cepas

Para el aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas del suelo contaminado, se escogieron 4 colonias de manera aleatoria, crecidas sobre el agar mineral con vapores de hidrocarburos. Las colonias presentaron diferentes morfologías, las cuales se mencionan en la Tabla 3.1

Tabla 3.1 Características morfológicas de cepas aisladas (C1-C4).

Cepa	Apariencia	Color	Diámetro	Borde
C1		Blanca	De 0.2 a 0.45 cm	Filamentoso
C2		Amarilla transparente	De 0.16 a 0.25 cm	Regular
C3		Transparente	De 0.08 a 0.16 cm	Regular
C4		Amarilla	De 0.08 a 0.12 cm	Regular

3.2 Identificación filogenética

De la extracción del material genético, que se llevó a cabo como se describe en el apartado (2.3.3), se obtuvo el DNA de cada una de las cepas, el cual se cuantificó en un espectrofotómetro (Bio photometre de Eppendorff) los resultados se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Cuantificación del DNA total de las cepas aisladas (C1-C4).

Cepa	Concentración de DNA ($\mu\text{g/mL}$)	$A_{260/280}$	A_{260}
C1	290.7	1.860	0.969
C2	240	1.92	0.800
C3	184.4	1.76	0.628
C4	147	1.96	0.490

El conteo en placa de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) realizado como se describe en el apartado (2.2.2) permitió determinar la dinámica poblacional durante la remoción de hidrocarburos. La Figura 3.1 muestra los resultados obtenidos en agar nutritivo y agar medio mineral, observándose un menor crecimiento de bacterias Hidrocarbonoclastas, creciendo en este último.

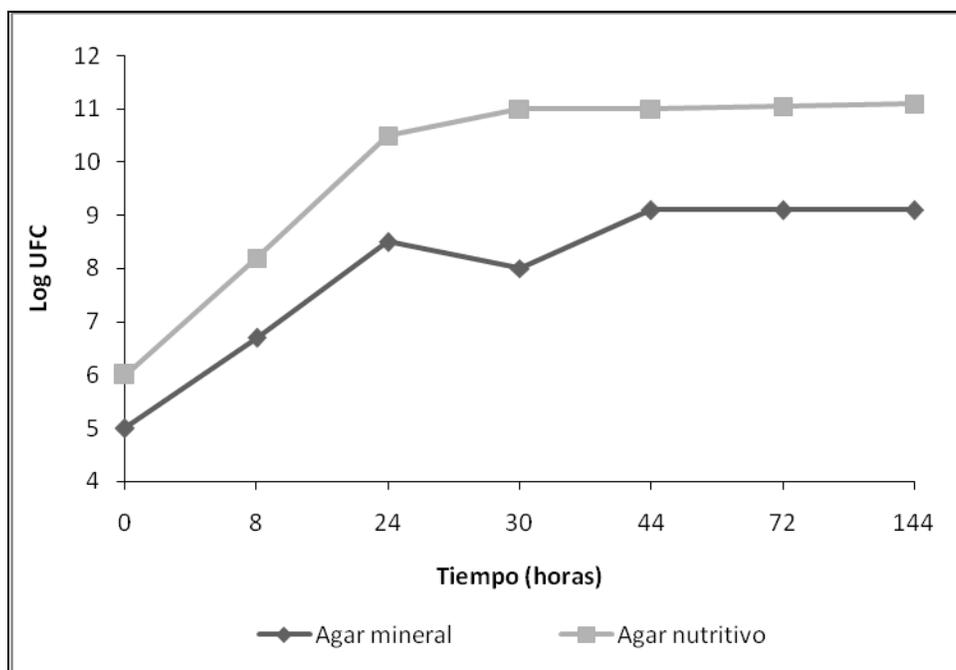


Figura 3.1 Unidades Formadoras de Colonias en agar nutritivo y agar mineral.

A través de estudios moleculares con el gene 16S se pudo obtener una identificación de las 4 cepas aisladas cercana al género *Ralstonia spp.*

3.3 Estudio cinético

En el estudio cinético realizado para determinar la remoción de hidrocarburos en consorcio bacteriano se analizaron las muestras al tiempo 0, 8, 24, 32, 72 y 144 horas, mediante cromatografía de gases con detector FID obteniendo los siguientes resultados.

3.3.1 Remoción de la fracción alifática por el consorcio bacteriano

La degradación de la fracción alifática se determinó por la disminución de la concentración (en ppm) del inicio de la cinética. A las 8 horas se presentó una disminución de 2, 296 a 2,196 ppm, arrojando un 4 % de remoción. De las 24 a las 48 horas el porcentaje de remoción fue en aumento gradual de 8 a 31 %. A las 144 horas se detectó la máxima remoción, con una disminución de 2, 296 a 1, 536 ppm, lo que correspondió a un 33 % (Figura 3.2). El control señalado con una línea roja se encontró en un valor igual a la concentración del tiempo 0 horas.

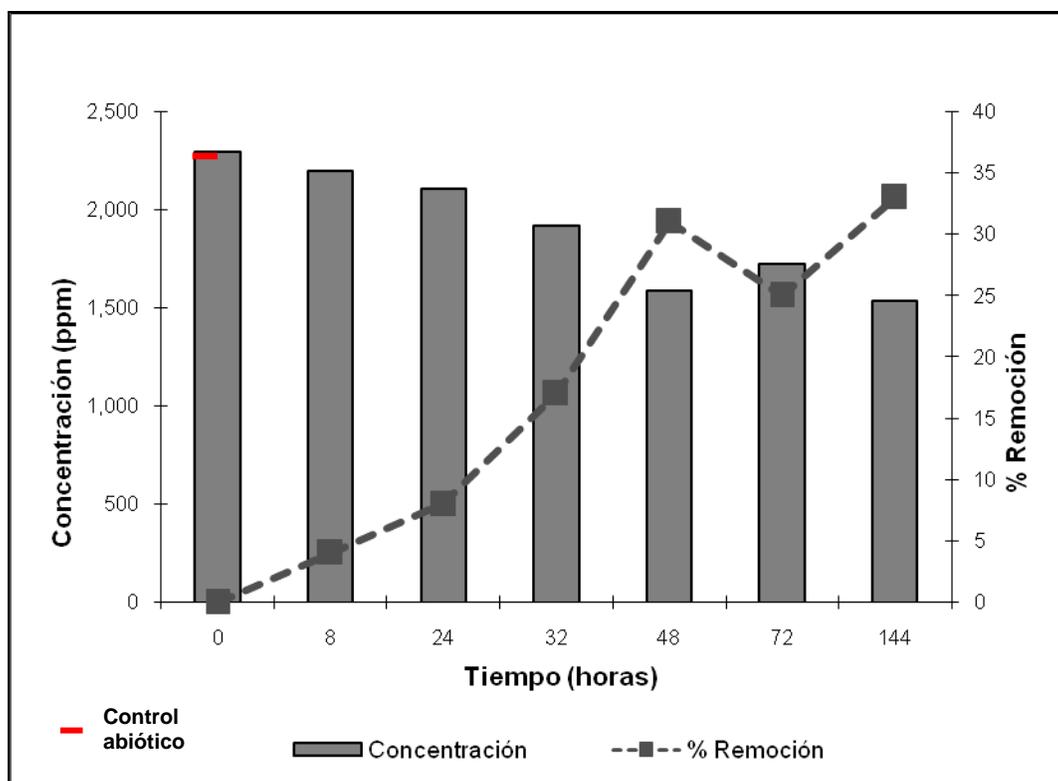


Figura 3.2 Remoción de los hidrocarburos alifáticos por el consorcio bacteriano.

Los compuestos alifáticos identificados fueron compuestos con 10, 12, 14, 16 y 18 átomos de carbono (C_{10} , C_{12} , C_{14} , C_{16} y C_{18}). Los compuestos C_{10} y C_{14} representaron el 71 % de la concentración inicial de la fracción alifática. La concentración inicial de compuestos C_{10} fue de 860 ppm y disminuyó a las 144 horas hasta 282 ppm, teniendo una remoción de 67 %. Los compuestos C_{12} presentaron una disminución de 377 a 249 ppm, arrojando un 34 % de remoción. Los compuestos C_{14} arrojaron una remoción de 9 %, disminuyendo su concentración de 771 a 700 ppm. Mientras que los compuestos de C_{16} y C_{18} no presentaron ninguna remoción. Del compuesto C_{16} se presentó un aumento de 230 a 248 ppm, mientras que en los compuestos C_{18} la concentración aumentó de 58 a 59 ppm.

En la Figura 3.3 se muestran las concentraciones presentes al inicio y final de la cinética, así como la remoción obtenida de cada compuesto.

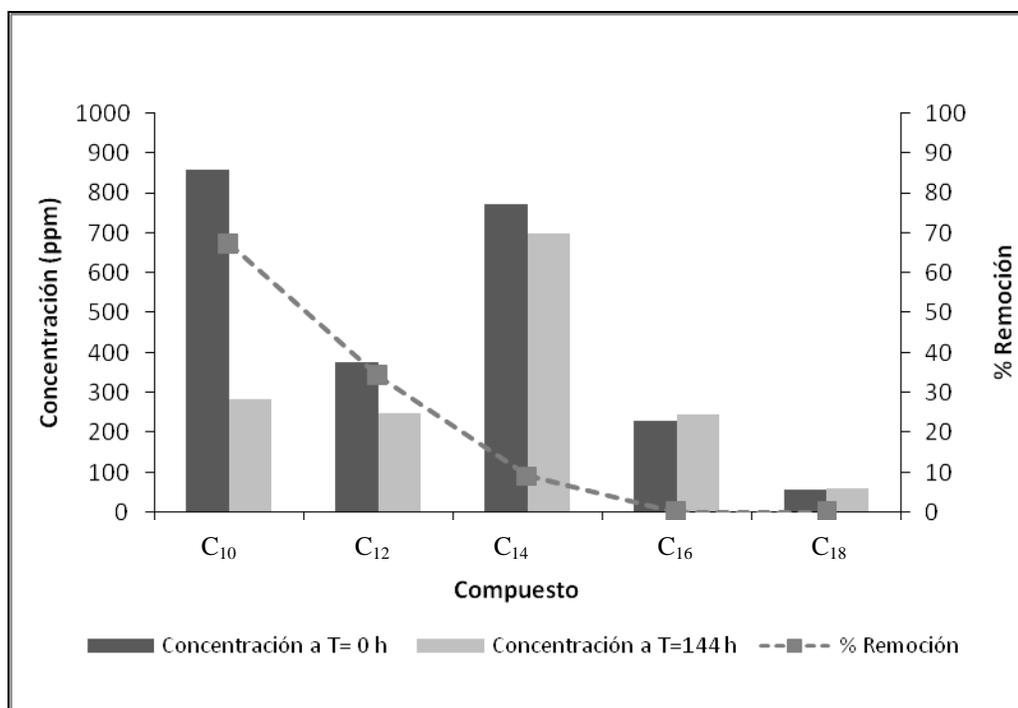


Figura 3.3 Compuestos alifáticos de 10 a 18 carbonos removidos por el consorcio bacteriano.

En las Tablas 1 y 2 del Anexo-2 se muestran los datos obtenidos en la remoción de la fracción alifática. Así mismo, en la Figura 1–Anexo 2 se aprecian los cromatogramas al inicio y al final de la cinética.

3.3.2 Remoción de la fracción aromática por el consorcio bacteriano

El estudio cinético de la fracción aromática en el consorcio bacteriano, se llevó a cabo a las 0, 8, 32, 48, 72 y 144 horas. Al inicio de la cinética se presentó una concentración de 1198 ppm disminuyendo a 343 ppm a las 32 horas, presentando un 71% de remoción. A las 48 horas la concentración se mantuvo constante, pero disminuyó a 110 ppm a las 72 horas, arrojando una remoción de 91 %. Al final de la cinética se obtuvo una remoción del 94 % de compuesto aromático obteniendo una concentración final de 69 ppm (Figura 3.4).

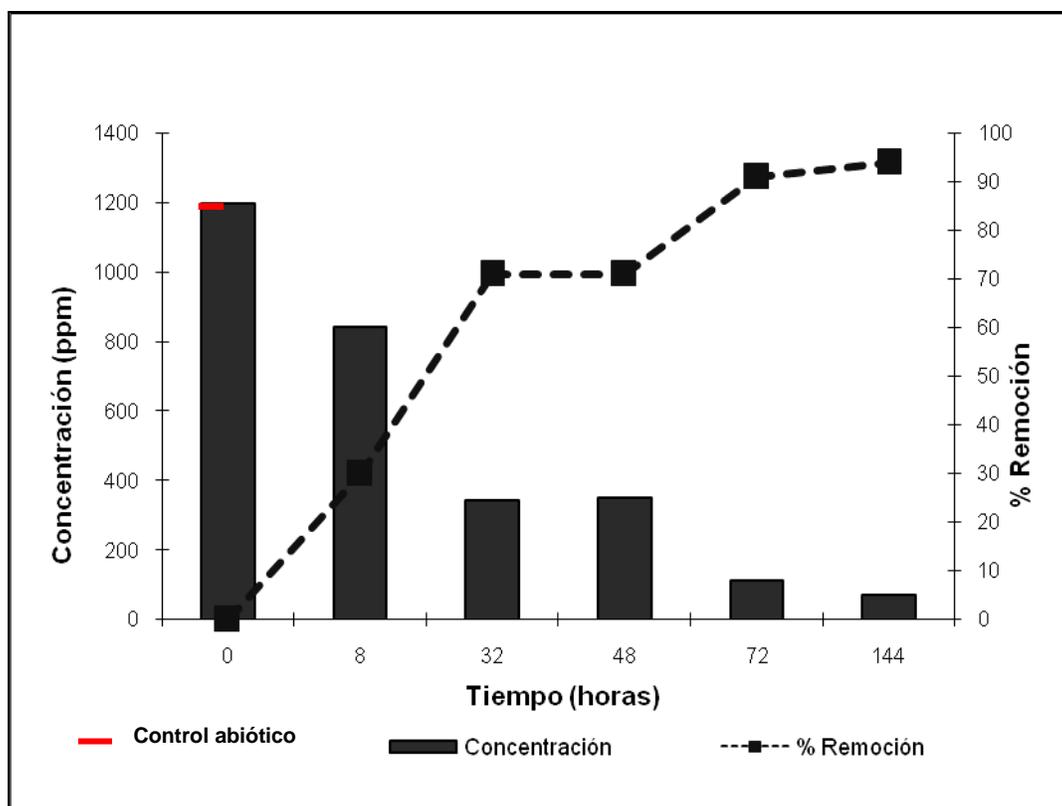


Figura 3.4 Remoción de hidrocarburos aromáticos por el consorcio bacteriano.

En la Tabla 3-Anexo 2 se muestran los valores de la concentración inicial y final, así como el porcentaje de remoción de hidrocarburos aromáticos obtenido a lo largo de la cinética; mientras que, en la Figura 2-Anexo 2 se muestran los cromatogramas de la misma.

En la Figura 3.5 se muestran las concentraciones presentes al inicio y final de los compuestos aromáticos identificados en el consorcio bacteriano. Se puede observar que la mayoría de los compuestos fueron removidos al 100 %. Mientras que el trimetilnaftaleno (representado con el número 20) presentó una remoción de un 88 %, el ciclohexiltridecano (TR:6.268) (representado con el número 22) fue removido en un 91 % y el ciclohexiltridecano (TR:6.303) (representado con el número 23) arrojó una remoción de 66 %. El ciclohexiltridecano (TR:6.368) (representado con el número 24) fue removido en un bajo porcentaje (42 %).

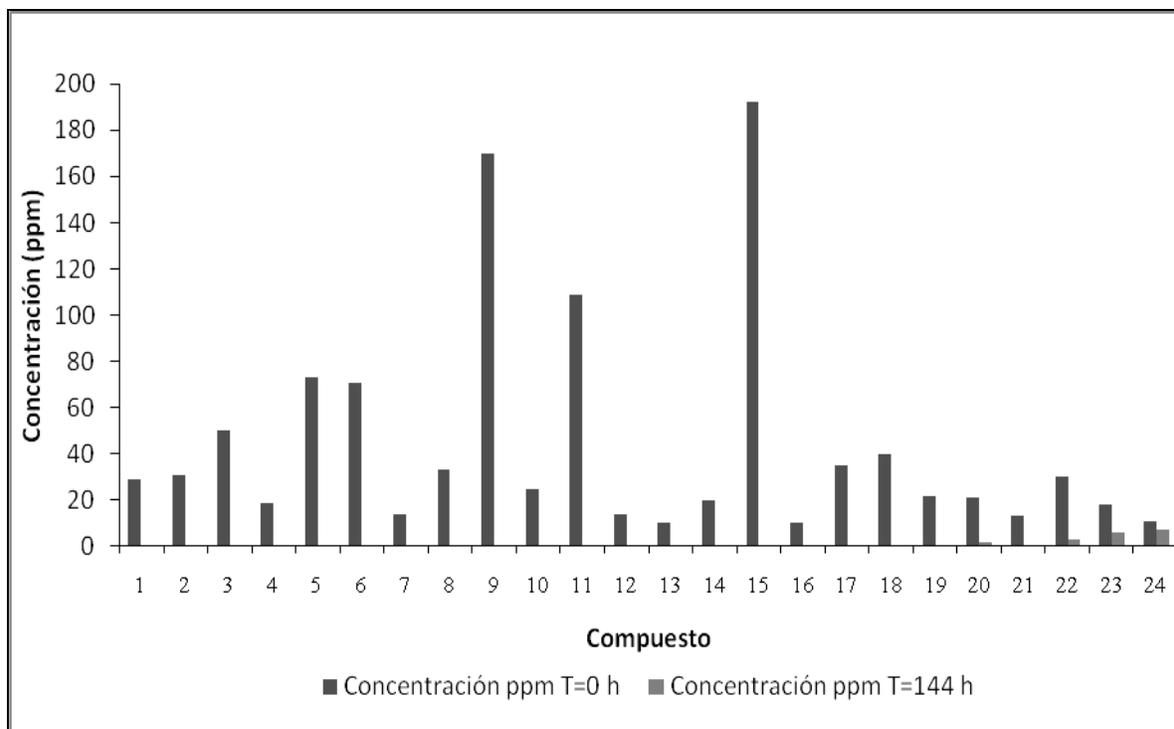


Figura 3.5 Compuestos aromáticos removidos por las cepas (C1-C4) 1) etil benceno, 2) decano 2,2,8 trimetil, 3) benceno 1 etil 2 metil, 4) benceno 1 etil 2 metil (TR:5.245), 5) benceno trimetil, 6) benceno 1,4 dietil, 7) benceno 1,2,4,5 tetrametil (TR:5.415), 8) benceno 1,2,4,5 tetrametil (TR:5.447), 9) naftaleno , 10) naftaleno tetrahidro metil, 11) 2 metil naftaleno (TR:5.685), 12) metil naftaleno (TR:5.8), 13) metil naftaleno, 14) metil naftaleno, 15) ciclohexano 1,2 dimetil 3 pentil 4 propil, 16) naftaleno 1,4 dimetil, 17) naftaleno 1,2 dimetil , 18) ciclohexildecano , 19) trimetilnaftaleno (TR:6.067), 20) trimetilnaftaleno (TR:6.125), 21) terta hidro fenantreno, 22) ciclohexiltridecano (TR:6.268), 23) ciclohexiltridecano (TR:6.303), 24) ciclohexiltridecano (TR:6.368).

En la Tabla 5-Anexo 2 se muestran los valores de la concentración inicial y final, así como el porcentaje de remoción final de los compuestos aromáticos identificados a lo largo de la cinética.

Haciendo una comparación entre la remoción obtenida de ambas fracciones del hidrocarburo (Figura 3.6), se puede observar que la cantidad de hidrocarburos alifáticos y aromáticos presentes en el consorcio bacteriano no fue la misma. Los compuestos alifáticos representaron un 66 % de los hidrocarburos totales mientras que la fracción aromática representó sólo un 34 %. La remoción obtenida de los compuestos aromáticos al final de la cinética fue de un 94 % mientras que la fracción alifática arrojó una remoción de un 33%. En ambos casos la remoción fue en aumento gradual, sólo a las 72 horas en la fracción alifática se observó una disminución de 31 a 25% aumentando a las 144 horas en un 33 %.

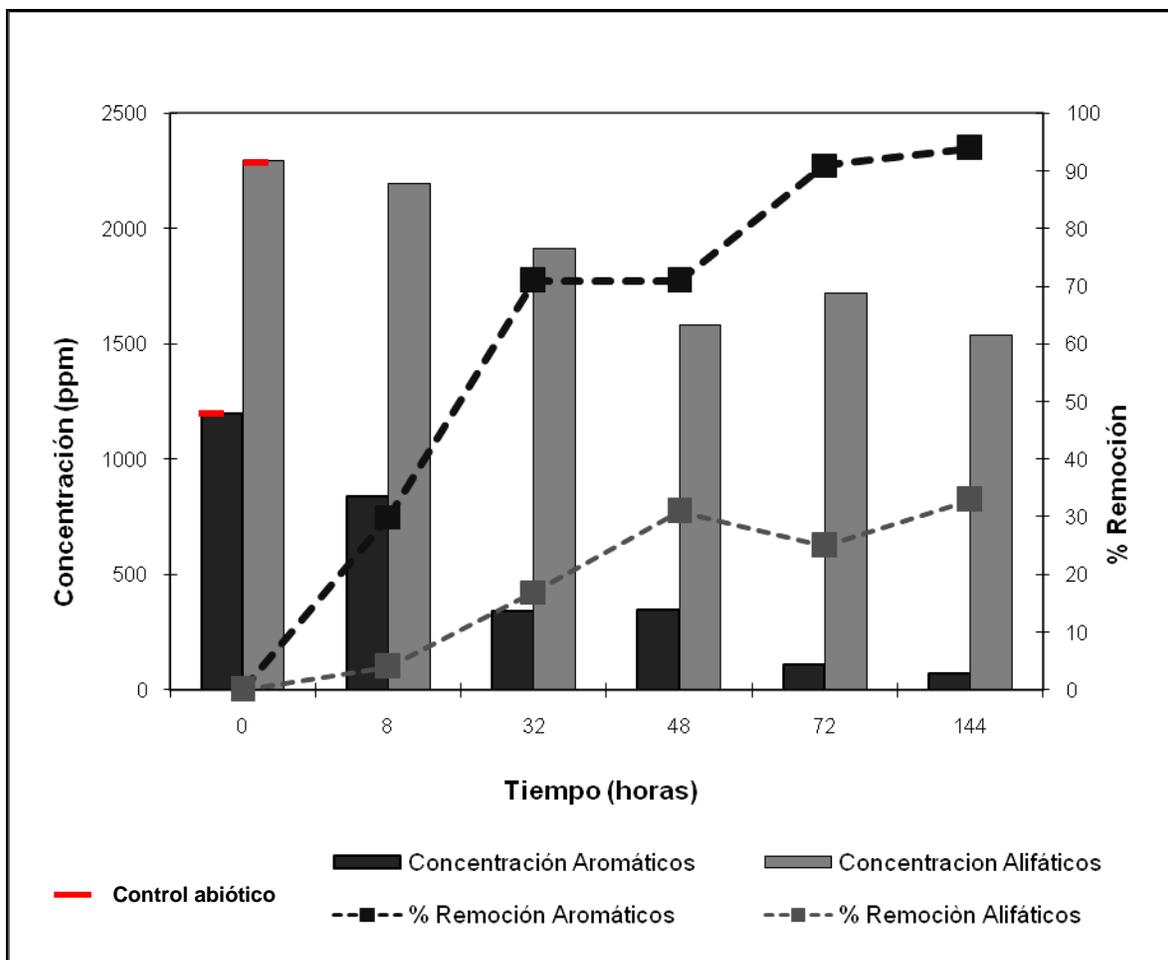


Figura 3.6 Cinética de remoción y concentración de las fracciones aromática y alifática de un destilado de petróleo por el consorcio bacteriano durante la cinética.

3.3.3 Remoción de la fracción alifática por las cepas C1-C4

La Figura 3.7 muestra la remoción de la fracción alifática por las cepas C1- C4. En ellas se observa que la mayor remoción de hidrocarburos alifáticos la llevó a cabo la cepa 2, con un 88 %; mientras que las cepas 1 y 4 obtuvieron una remoción de 83 % cada una. La cepa 3 arrojó un porcentaje de remoción de un 79 %.

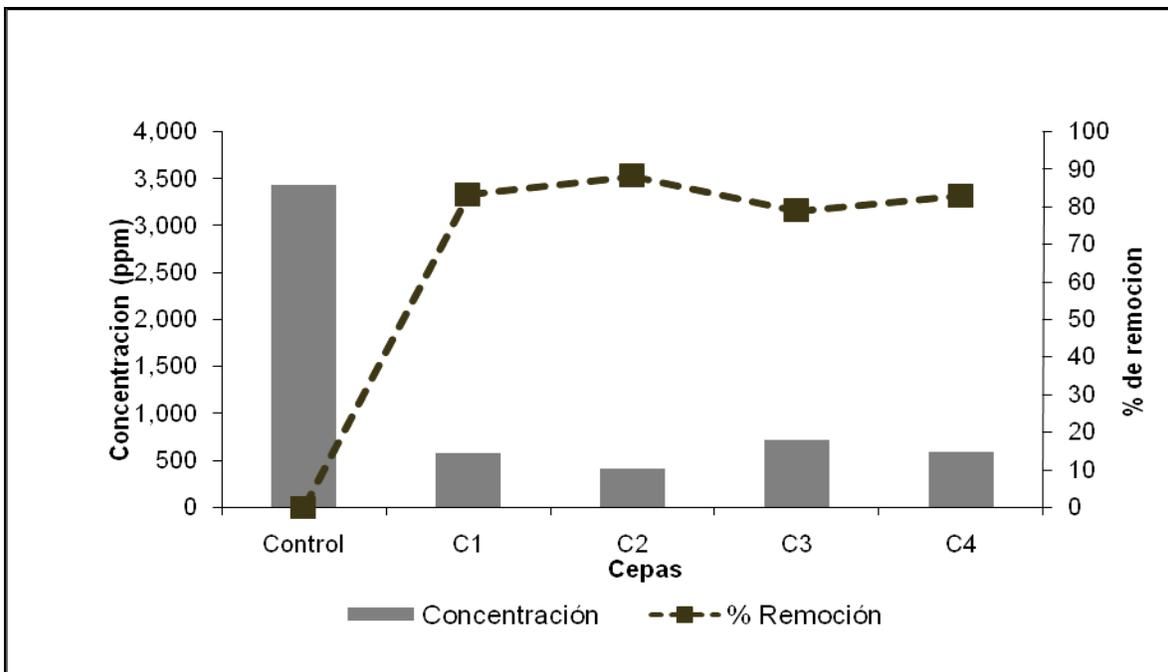


Figura 3.7 Remoción de los hidrocarburos alifáticos por las cepas C1-C4.

Mediante el análisis por cromatografía de gases se pudieron identificar compuestos de 10 a 18 átomos de carbono C₁₀- C₁₈. En la figura 3.8 se muestra la remoción que realiza la cepa 1 de cada compuesto. Esta cepa removió un mayor porcentaje (91 %) de compuestos C₁₀, mientras que para los compuestos C₁₂ se obtuvo una remoción de 85 %. Los compuestos C₁₄ fueron removidos en un 82 % y en los compuestos C₁₆ y C₁₈ se presentó una remoción de 81 %.

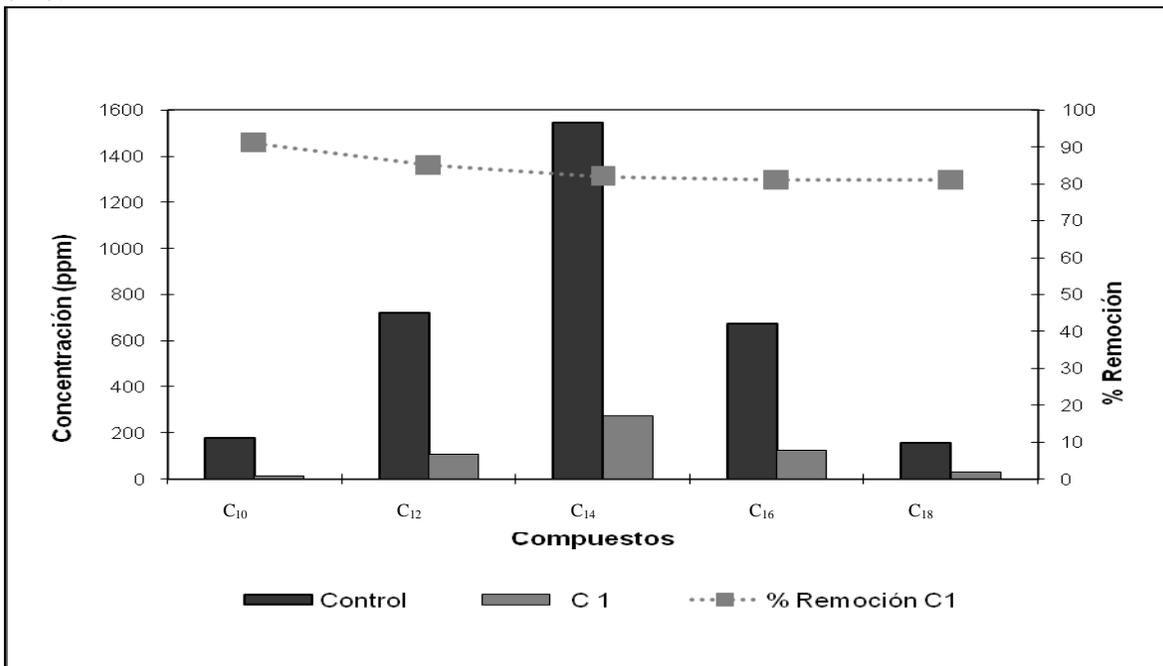


Figura 3.8 Remoción de compuestos alifáticos por la cepa C1.

La figura 3.9 muestra el porcentaje de remoción de compuestos alifáticos realizado por la cepa 2. En dicha figura se observa un 97 % de remoción para compuestos C₁₀, un 93 % para compuestos C₁₂, un 88 % para compuestos C₁₄, un 84 % para compuestos C₁₆ y 82 % para compuestos C₁₈.

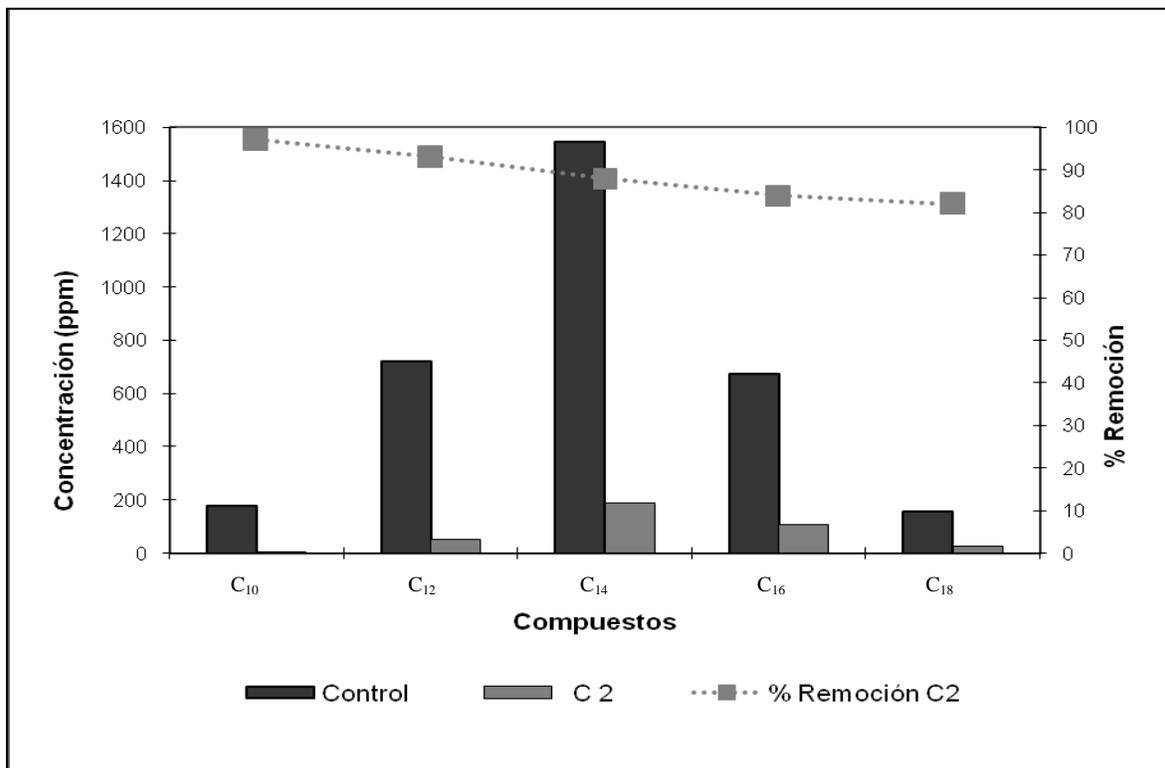


Figura 3.9 Remoción de compuestos alifáticos por la cepa C2.

En la figura 3.10 se muestran la remoción de los compuestos alifáticos realizada por la cepa 3. Se puede observar que el mayor porcentaje de remoción se presentó para los compuestos C₁₈ con un 84 %, mientras que para los compuestos C₁₀ se obtuvo una remoción del 64 %. Los compuestos C₁₂ se removieron en un 76 %, los compuestos C₁₄ presentaron una remoción de un 80 % y en los compuestos C₁₆ se observó un 83 % de remoción.

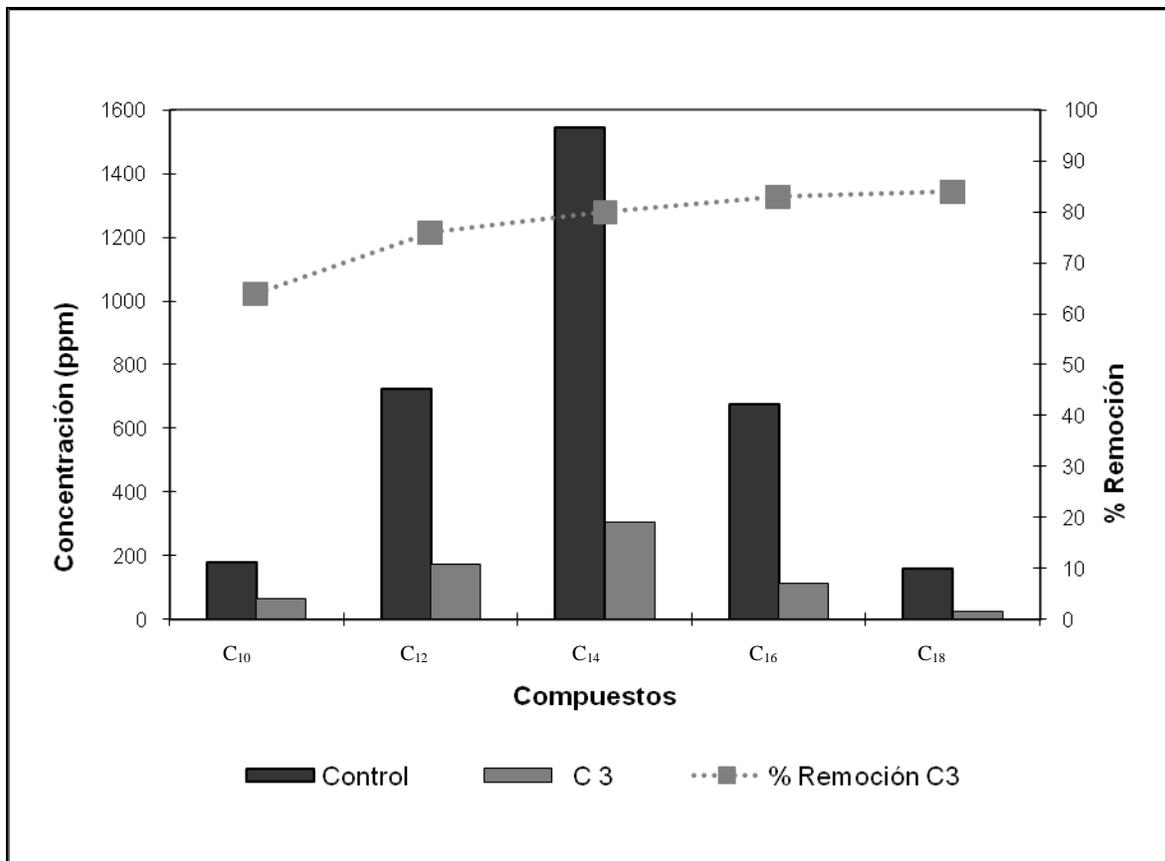


Figura 3.10 Remoción de compuestos alifáticos por la cepa C3.

Los porcentajes de remoción obtenidos por la cepa 4 se muestran en la Figura 3.11, en dicha figura se observa que el mayor porcentaje de remoción se realizó en los compuestos C₁₈ (87 %), para los compuestos C₁₀ se removi6 un 74 %; los compuestos C₁₂ fueron removidos en un 80 %, los compuestos C₁₄ en un 84 % y los compuestos C₁₆ en un 86 %.

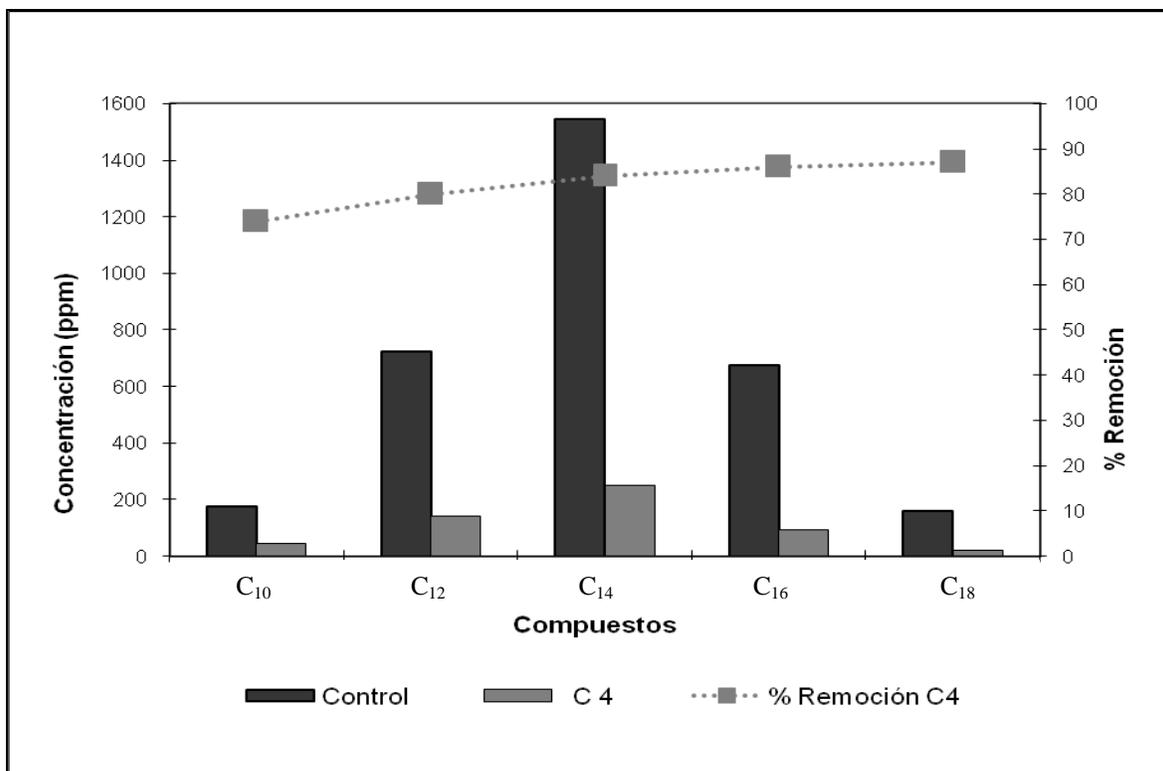


Figura 3.11 Remoción de compuestos alifáticos por la cepa C4.

En la Figura 3.12 se muestra una comparación de las concentraciones presentes de los compuestos alifáticos al final de la cinética, así como los porcentajes de remoción obtenidos por las cepas (C1-C4). En las Figuras 3,4,5,6-Anexo 2 se muestran los cromatogramas obtenidos.

Se puede observar que para los compuestos C₁₀ la cepa 2 presentó una mayor preferencia por estos compuestos disminuyendo la concentración de 178 a 6 ppm representando un 97 % de remoción, la cepa 1 presentó una remoción de un 91% alcanzando una concentración de 16 ppm, la cepa 4 alcanzó una remoción de 74 % obteniendo así una concentración final de 46 ppm, mientras que la cepa 3 obtuvo un porcentaje de remoción de un 64 % teniendo una concentración final de 65 ppm.

Para los compuestos C₁₂ la cepa que alcanzó una mejor remoción fue la cepa 2 (93 %) disminuyendo la concentración de 722 a 52 ppm, la cepa 1 logró una remoción de un 85 % obteniendo una concentración final de 107 ppm, la cepa 4 presentó una remoción de un 80 % teniendo una concentración final de 144 ppm, en tanto que la cepa 3 obtuvo una remoción de un 76 % obteniendo una concentración final de 174 ppm.

Los compuestos C₁₄ fueron removidos en mayor porcentaje (88 %) por la cepa 2 disminuyendo la concentración de 1543 a 189 ppm, la cepa 4 obtuvo una remoción de 84 % teniendo una concentración final de 250 ppm, la cepa 1 logró una remoción de 82 % teniendo una concentración final de 274 ppm, mientras que la cepa 3 presentó una remoción de 80 % obteniendo así una concentración final de 304 ppm.

Los compuestos C₁₆ fueron removidos en mayor porcentaje por la cepa 4 disminuyendo la concentración de 675 a 94 ppm representando una remoción de 86 %, la cepa 2 obtuvo una remoción de 84 % teniendo una concentración final de 110 ppm, la cepa 3 logró una remoción de 83 % teniendo una concentración final de 115 ppm, en tanto que la cepa 1 presentó una remoción de 81 % obteniendo así una concentración final de 126 ppm.

Los compuestos C₁₈ presentaron una mayor remoción (87 %) por la cepa 4 disminuyendo la concentración de 159 a 21 ppm, la cepa 3 obtuvo una remoción de 84 % teniendo una concentración final de 26 ppm, la cepa 2 logró una remoción de 82 % teniendo una concentración final de 28 ppm, mientras que la cepa 1 presentó una remoción de 81 % obteniendo así una concentración final de 30 ppm.

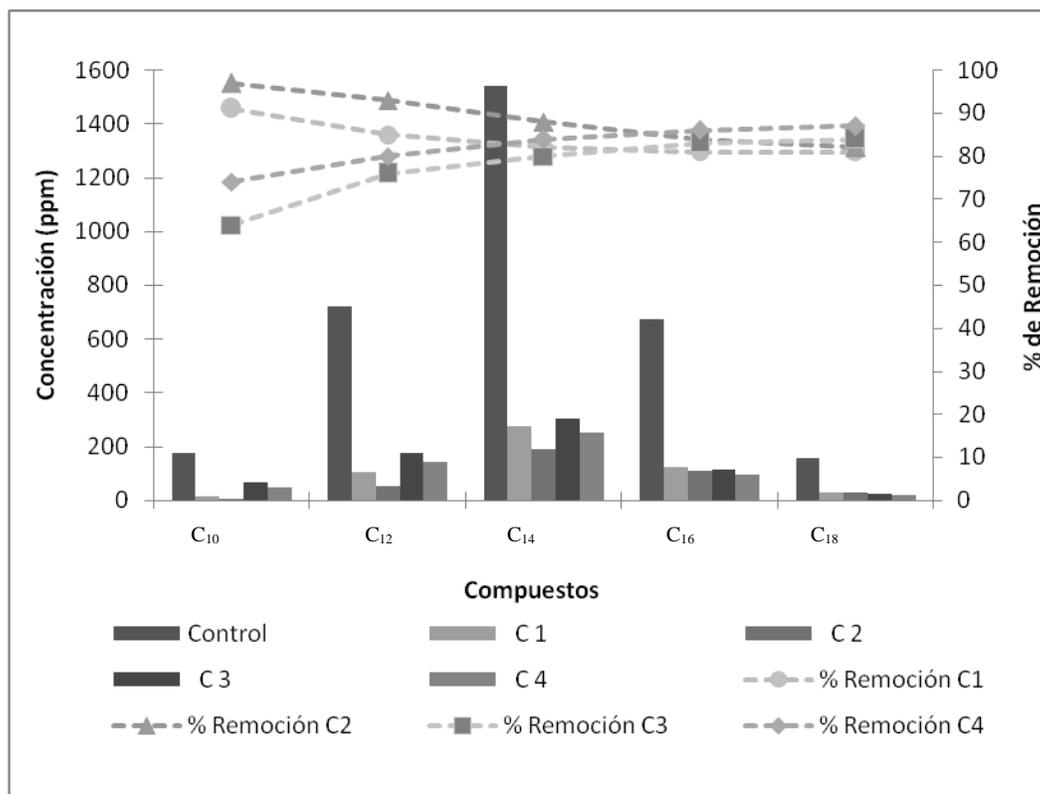


Figura 3.12 Compuestos alifáticos removidos por las cepas (C1-C4).

En las Figuras 7,8,9,10-Anexo 2 se muestran los cromatogramas obtenidos de la fracción aromática por las cepas (C1-C4).

3.3.4 Remoción de la fracción aromática por las cepas C1-C4

La Figura 3.13 muestra la remoción de la fracción aromática por las cepas C1- C4. Se observa que las cepas C2, C3 y C4 alcanzaron la remoción total de los compuestos aromáticos identificados, en tanto que la cepa 1 presentó menores porcentajes de remoción.

La cepa 1 removió la mayoría de los compuestos en un porcentaje mayor a 80 %. Los compuestos que presentaron menor remoción fueron: naftaleno 1,2 dimetil (74 %) (representado con el numero 17), trimetilnaftaleno (41 %) (representado con el numero 20), terta hidro fenantreno (58 %) (representado con el numero 21), ciclohexiltridecano (TR:6.268) (57 %) (representado con el numero 22), ciclohexiltridecano (20 %) (TR:6.303) (representado con el numero 23) y ciclohexiltridecano (TR:6.368) (9 %) (representado con el numero 24). En la Figura 3-Anexo 2 se muestran los cromatogramas obtenidos.

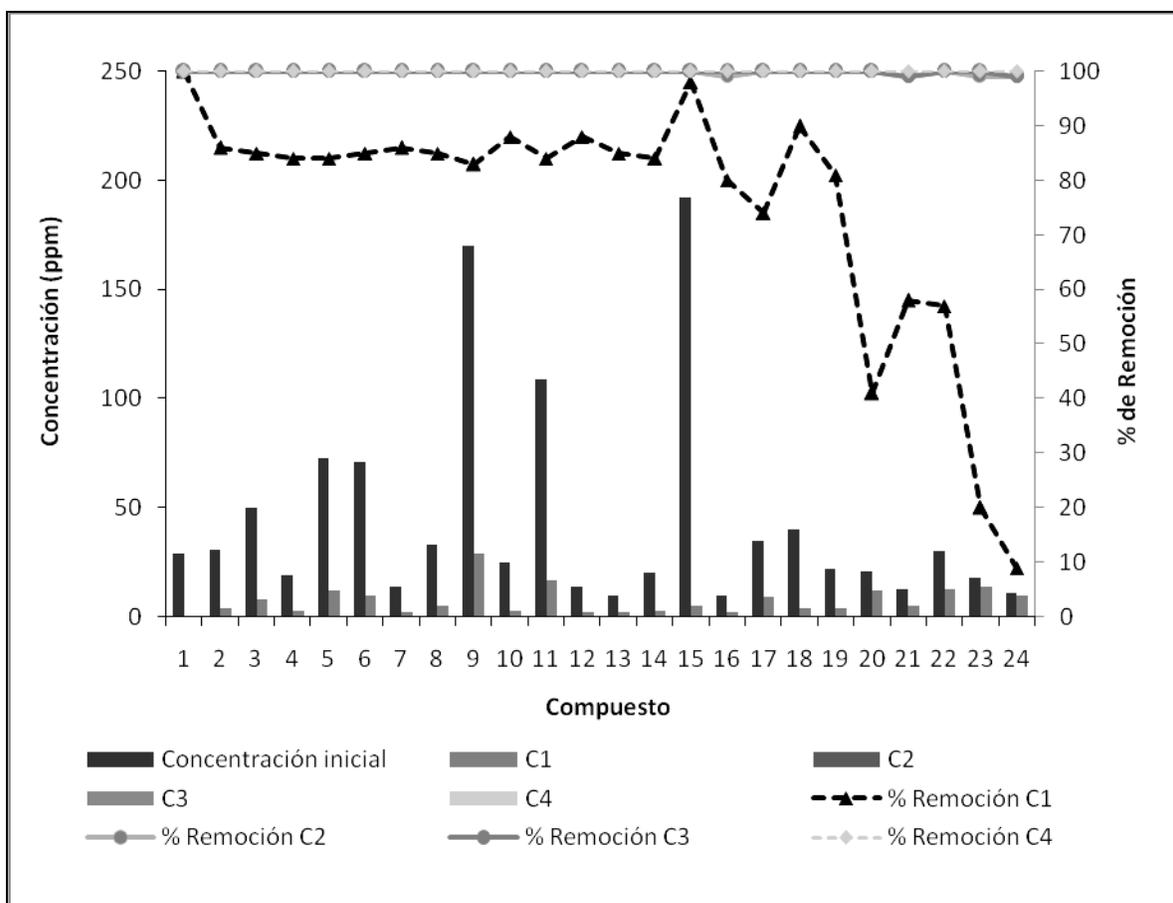


Figura 3.13 Compuestos aromáticos removidos por las cepas (C1-C4) 1) etil benceno, 2) decano 2,2,8 trimetil, 3) benceno 1 etil 2 metil, 4) benceno 1 etil 2 metil (TR:5.245), 5) benceno trimetil, 6) benceno 1,4 dietil, 7) benceno 1,2,4,5 tetrametil (TR:5.415), 8) benceno 1,2,4,5 tetrametil (TR:5.447), 9) naftaleno , 10) naftaleno tetrahidro metil, 11) 2 metil naftaleno (TR:5.685), 12) metil naftaleno (TR:5.8), 13) metil naftaleno, 14) metil naftaleno, 15) ciclohexano 1,2 dimetil 3 pentil 4 propil, 16) naftaleno 1,4 dimetil, 17) naftaleno 1,2 dimetil , 18) ciclohexildecano , 19) trimetilnaftaleno (TR:6.067), 20) trimetilnaftaleno (TR:6.125), 21) terta hidro fenantreno, 22) ciclohexiltridecano (TR:6.268), 23) ciclohexiltridecano (TR:6.303), 24) ciclohexiltridecano (TR:6.368).

Capítulo IV. Conclusiones

En el presente estudio a nivel laboratorio, se pudieron aislar a través de técnicas microbiológicas cuatro cepas a partir de un suelo contaminado con hidrocarburos proveniente del estado de Tabasco. Las cuales demostraron ser capaces de degradar los hidrocarburos alifáticos y aromáticos de un destilado de petróleo.

Realizando el fraccionamiento de los hidrocarburos totales del destilado de petróleo se pudo obtener el porcentaje de remoción de la fracción alifática y aromática. El consorcio bacteriano removió en un 33% los hidrocarburos alifáticos, en tanto que los hidrocarburos aromáticos fueron removidos en un 94%.

Los compuestos alifáticos identificados fueron compuestos de 10 a 18 átomos de carbono. El consorcio bacteriano removió los compuestos alifáticos C_{10} en un 67 %, los compuestos C_{12} en un 34 %, los compuestos C_{14} en un 9 %, los compuestos de C_{16} y C_{18} no presentaron ninguna remoción.

La mayor remoción de hidrocarburos alifáticos la llevó a cabo la cepa 2, con un 88 %; mientras que las cepas 1 y 4 obtuvieron una remoción de 83 % cada una. La cepa 3 arrojó un porcentaje de remoción de un 79 %.

La cepa 2 presentó una mayor preferencia por los compuestos C_{10} removiendo un 97 % de estos compuestos, la cepa 1 presentó una remoción de un 91%, la cepa 4 alcanzó una remoción de 74 %, mientras que la cepa 3 obtuvo un porcentaje de remoción de un 64 %.

Para los compuestos C_{12} , de igual manera la cepa 2 alcanzó una mejor remoción (93 %), la cepa 1 logró una remoción de un 85 %, la cepa 4 presentó una remoción de un 80 %, en tanto que la cepa 3 obtuvo una remoción de un 76 %.

Los compuestos C_{14} fueron removidos en mayor porcentaje (88 %) por la cepa 2, la cepa 4 obtuvo una remoción de 84 %, la cepa 1 logró una remoción de 82 %, mientras que la cepa 3 presentó una remoción de 80 %.

Los compuestos C_{16} fueron removidos en mayor porcentaje por la cepa 4 (86 %), la cepa 2 obtuvo una remoción de 84 %, la cepa 3 logró una remoción de 83 %, en tanto que la cepa 1 presentó una remoción de 81 %.

Los compuestos C_{18} presentaron una mayor remoción (87 %) por la cepa 4, la cepa 3 obtuvo una remoción de 84 %, la cepa 2 logró una remoción de 82 %, mientras que la cepa 1 presentó una remoción de 81 %.

Los compuestos aromáticos identificados fueron los señalados en la Figura 3.6.

El consorcio bacteriano removió el 100 % de la mayoría de los compuestos aromáticos, mientras que el trimetilnaftaleno (TR:6.87) presentó una remoción de un 88 %, el ciclohexiltridecano (TR:6.268) fue removido en un 91 % y el ciclohexiltridecano (TR:6.303) arrojó una remoción de 66 %. El último de los ciclohexiltridecano (TR:6.368) fue removido en un bajo porcentaje (42 %).

Las cepas C2, C3 y C4 alcanzaron la remoción total de los compuestos aromáticos identificados, en tanto que la cepa 1 presentó menores porcentajes de remoción, esta removió la mayoría de los compuestos en un porcentaje mayor a 80 %. Los compuestos que presentaron menor remoción fueron: naftaleno 1,2 dimetil (74 %), trimetilnaftaleno (TR:6.87) (41%), terta hidro fenantreno (58 %), ciclohexiltridecano (TR:6.303) (57 %), ciclohexiltridecano (TR:6.303) (20 %) y ciclohexiltridecano (TR:6.368) (9 %).

Los estudios realizados en la degradación con hidrocarburos reportan una mayor eficiencia de remoción para los compuestos alifáticos, debido a que estos compuestos poseen una estructura química más sencilla en comparación a los compuestos aromáticos, sin embargo las cepas aisladas demostraron altos porcentajes de remoción de los compuestos aromáticos.

Se presentó una mejor remoción en los cultivos de las cepas aisladas en comparación con el consorcio bacteriano. Debido a que las cepas presentaron diferente morfología colonial: color, diámetro y borde, y por su manera diferencial de degradar los hidrocarburos, se concluye que estas cepas no pertenecen a la misma especie.

A través de estudios moleculares con el gene 16S se pudo obtener una identificación de estas cepas cercana al género *Ralstonia spp.* Al igual que en el presente trabajo, diversos estudios han reportado que este género es capaz de mineralizar varios compuestos aromáticos entre los que se encuentran: cloro sustituidos del benceno, por ejemplo el 1, 2, 5-tetraclorobenceno y varios diclorotoluenos como el 3- y 4-clorotolueno y 2,4-, 2,5- y 3,4-diclorotolueno, además de degradar eficientemente 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP), de igual manera es capaz de degradar naftaleno y fenoles. La cepa *Ralstonia picketti* es capaz de remover fenantreno de un suelo contaminado, mientras que la cepa *Ralstonia eutropha* tiene la capacidad de degradar el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Por otra parte, se han encontrado bacterias, como la *Ralstonia eutropha*, que convierten directamente azúcares en un tipo de biopolímeros llamados PHA (polihidroxialcanoatos). El PHA se acumula en las bacterias y llega a constituir hasta un 90 % del peso de ésta. Algunas empresas, entre ellas la Imperial Chemical Industries, han usado la bacteria *Ralstonia eutropha* para obtener PHA. Una vez que las bacterias se llenan de gránulos de plástico, estos se extraen para obtener el material. La principal ventaja de estos biopolímeros es que se biodegradan muy rápido, hasta un 80 % en solo siete semanas. La desventaja es que el proceso de elaboración es muy costoso: se calcula que producir por fermentación bacteriana un kilogramo de PHA cuesta 15 dólares, mientras que hacer un kilogramo de plástico convencional cuesta sólo un dólar. Esto se debe a que las bacterias requieren fuentes externas de alimento, como la celulosa.

Capítulo V. Anexos

Anexos 1. Materiales y Métodos

Tabla 1. Medio mineral basal

Componente	Fórmula	Cantidad
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	1.0 g
Fosfato de sodio dibásico	Na_2HPO_4	1.0 g
Sulfato de amonio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
Nitrato de sodio	NaNO_3	0.5 g
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02 g
Solución mineral*		1.0 mL
Agua destilada	H_2O_d	Aforar a 1L

*La solución mineral (tabla 2) se agregó después de esterilizar

Tabla 2. Solución mineral de micronutrientes

Componente	Fórmula	Cantidad
Cloruro de Magnesio dihidratado	$\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.1 g
Cloruro de manganeso monohidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.66 g
Cloruro de sodio	NaCl	1.0 g
Cloruro férrico hexahidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0 g
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1 g
Cloruro de cobre	CuCl_2	0.01 g
Cloruro de zinc	ZnCl_2	0.08 g
Cloruro de aluminio	AlCl_3	0.05 g
Acido bórico	H_3BO_3	0.01 g
Molibdato de sodio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.04 g
Agua destilada	H_2O_d	1 L

Se esterilizó y se guardó en refrigeración a 4°C.

Tabla 3. Formulación del agar nutritivo

Componente	Cantidad
Peptona de gelatina	5 g
Extracto de carne	3 g
Agar	15 g

Formulación aproximada para 100 ml

Tabla 4. Soluciones para extracción de DNA

	Reactivos
Solución de lisis	100 µL de EDTA 10 mM pH=8 100 µL de Tris-Base 50 mM pH=8 100 µL de SDS al 3% 4 µL de proteinasa k 20 mg/L.
Solución para la proteinasa K	250 µL de Tris- HCl 40 mM 250 µL de CaCl ₂ 80 mM 500 µL de glicerol puro
TAE 50X	242 g de Tris-base 57.1 mL de ácido acético glacial 100 mL EDTA 0.5 M pH=8 600 mL de H ₂ O desionizada. Mezclar y aforar a1000 mL
Tampón TE	250 µL de Tris-HCl 40 mM 100 µL de EDTA 10 mM 650 µL de agua desionizada

Tabla 5. Estándar de hidrocarburos alifáticos y aromáticos utilizado para cromatografía de gases

Compuesto	Concentración (ppm)	Tiempo de retención (min)	Área bajo la curva
Alifáticos			
C ₁₂	525	6.04	479, 961
C ₁₄	525	6.91	834, 743
C ₁₆	525	7.71	928, 862
C ₁₈	525	8.53	965, 034
Total de alifáticos	2100		3, 208, 600
Aromáticos			
Naftaleno	1200	6.07	4, 681, 319
Fenantreno	1300	8.80	5, 285, 400
Benzo(a)pireno	1500	18.50	5, 297, 514
Total de aromáticos	4000		15, 264, 233

Tabla 6. Especificaciones de reactivos

	Reactivos	Especificaciones
Medio de Cultivo	Agar nutritivo.	BD Bioxon pH= 6.8.
Extracción DNA	Tris-HCl tris- hydrochloride	Invitrogen, ultrapuro TM pM= 157.64.
	EDTA ácido etilendiamino-tetracético,	Fluka Chemika, 99% de pureza, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ , pM=292.25.
	Tris-base Tris (hidrometil)-ominometano	AIDRICH, pureza 99%, pM=121.14.
	SDS sulfato de sodio dodecil	Fluka Chemika, C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S, pM=288.38, 99% de pureza.
	Alcohol etílico absoluto anhidro,	J.T Baker C ₂ H ₅ OH, pureza 99.94%
	Cloroformo	Sigma- Aldrich 99.9% de pureza, A:C:S grado HPLC. CHCl ₃ , pM=119.38
	Fenol- equilibrado	USB. Ultrapuro, p= 19mg/m ³ . Guardar a 4 °C
Electroforesis	Agarosa	Promega grado analítico, resistencia de gel 1000g/cm ² , punto de ebullición 87-89 °C, punto de gelidificación 36-39 °C. Guardar a 22-25 °C.
	Marcador de peso	Tracklt 100 pb DNA ladder concentración 0.1 µg/µL,.
	Buffer de carga	Azul de bromofenol C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S pM=669.96
PCR	Buffer para Taq polimerasa 1X, MgCl ₂ 1.25 mM, dNTPs Taq DNA polimerasa	Todos los reactivos para PCR serán marca INVITROGEN y deberán ser almacenados en congelación a -20°C.

Tabla 7. Especificaciones de equipo

Equipo	Especificaciones
Vortex	Genie 2 Scientific Industries, modelo G-560, voltaje máximo de 120 volts
Incubadora	Felisa, análoga, rango de temperatura +5 a 100°C.
Centrifugadora	Heraeus Biofuge Fresco, lugares/volumen= 24*1.5/2 mL, peso máximo permisible 24*4 g, rango de temperatura máxima permisible= - 4 a 40°C, velocidad= 2, 000 a 13, 000 rmp.
Cámara de electrofóresis	The easy cast TM horizontal electrophoresis system, owl scientific, inc., modelo B1A, capacidad del buffer 400 mL, voltaje 200-150 V, tiempo requerido= 30- 60 minutos, medidas H*W*L= 8*15*22 cm, tamaño del gel W*L= 9*11 cm.
Trasluminador	T=1 Biometra, voltaje 115V.
Termociclador	Biometra Tpersonal, rango de temperatura= -3 a 100°C, voltaje= 115 V o 230 V.
Balanza	Adventurer AR2140. Pantalla de cristal liquido 3 cm de altura, platillo 9 cm de diámetro, dimensiones 21.7*36.3*34.3cm
Espectrofotómetro	Bio photometre de Eppendorf modelo 22311
Campana	NUAIRE, Lagbard clase II, tipo A2. Cabina con flujo laminar.
Medidor de Ph	Hach. con electrodo Hach modelo 51935-00
Concentrador	Eppendorf modelo 5301. Tubos/volumen= 48/1.5-2 mL y 72/0.5mL. Máxima rotación 1400rmp, máxima fuerza centrifuga 240*g, máximo consumo 500W.

Anexo 2. Resultados

Tabla 1. Degradación de hidrocarburos alifáticos por el consorcio bacteriano

Tiempo (horas)	Concentración (ppm)	% Remoción
0	2,296	0
8	2,196	4
24	2,105	8
32	1,914	17
48	1,585	31
72	1,720	25
144	1,536	33

Tabla 2. Degradación de compuestos alifáticos por el consorcio bacteriano

Compuesto	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	% Remoción
C ₁₀	860	282	67
C ₁₂	377	249	34
C ₁₄	771	700	9
C ₁₆	230	248	0
C ₁₈	58	59	0

Tabla 3. Degradación de hidrocarburos aromáticos por el consorcio bacteriano

Tiempo (horas)	Concentración (ppm)	% Remoción
0	1,198	0
8	842	30
32	343	71
48	350	71
72	110	91
144	69	94

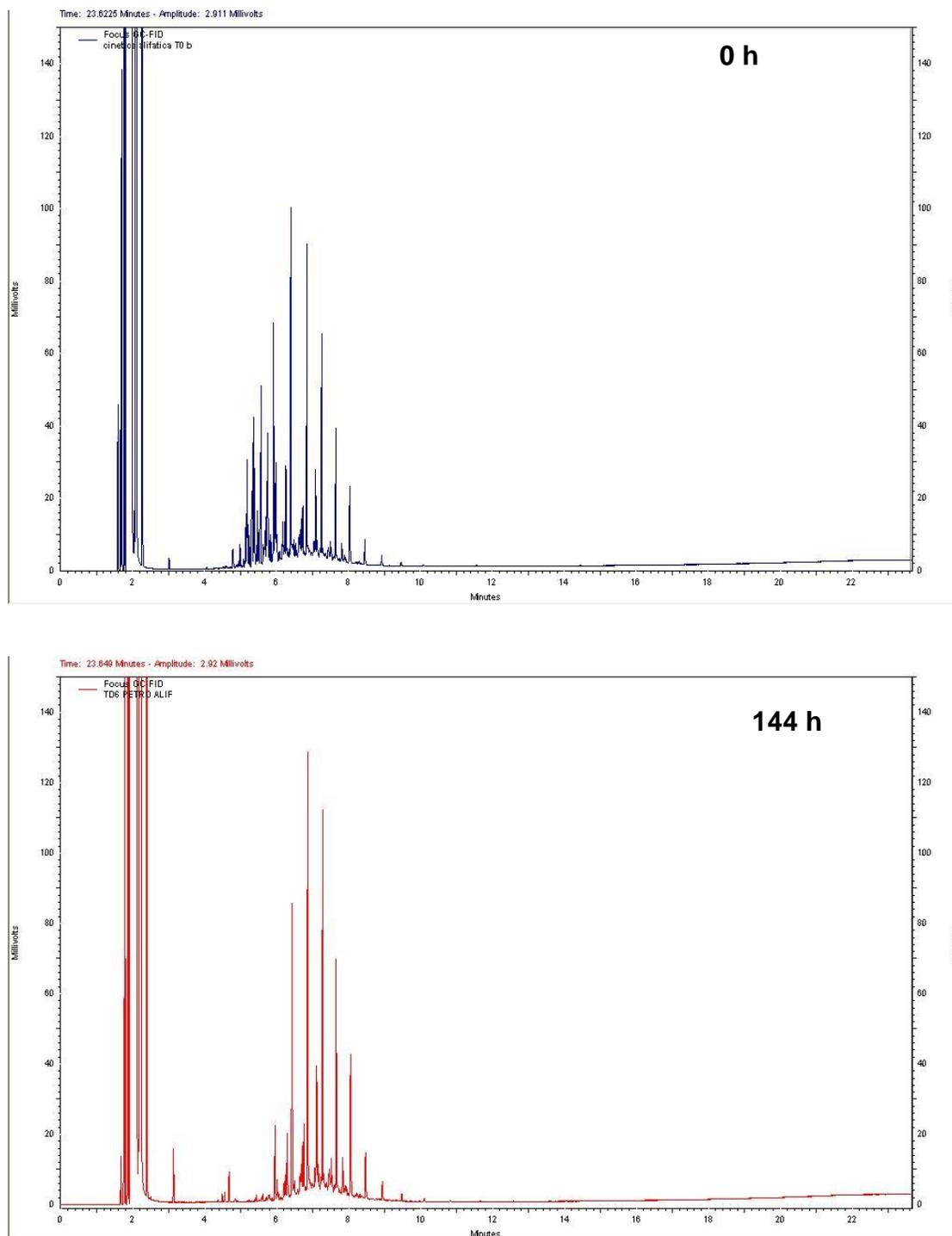


Figura 1. Cromatogramas de la remoción de hidrocarburos alifáticos por el consorcio bacteriano al inicio y final de la cinética.

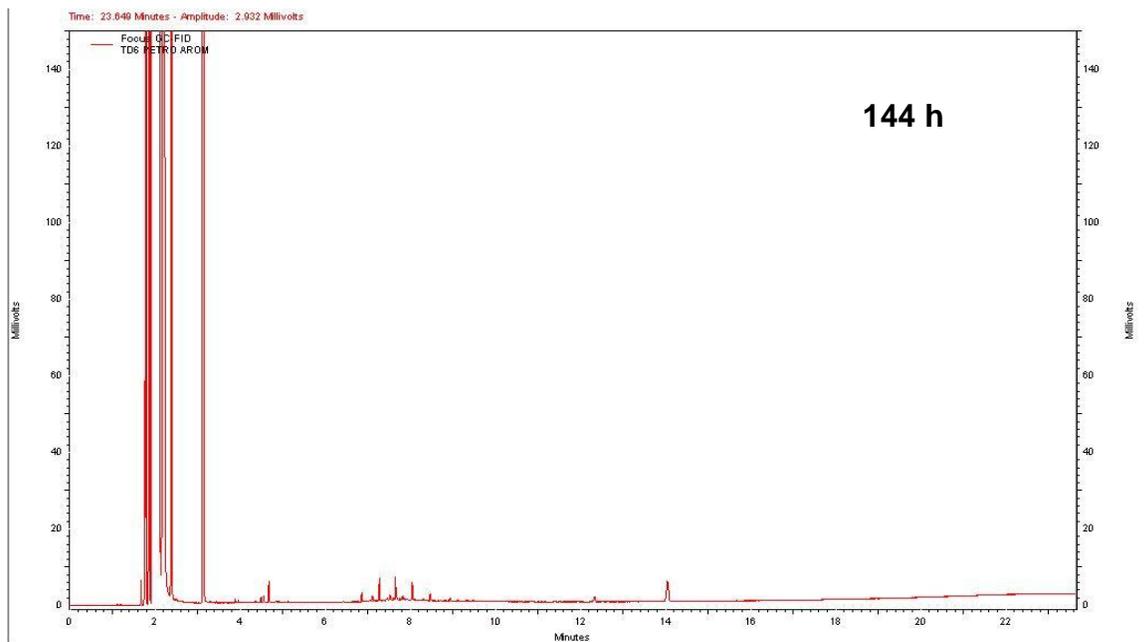
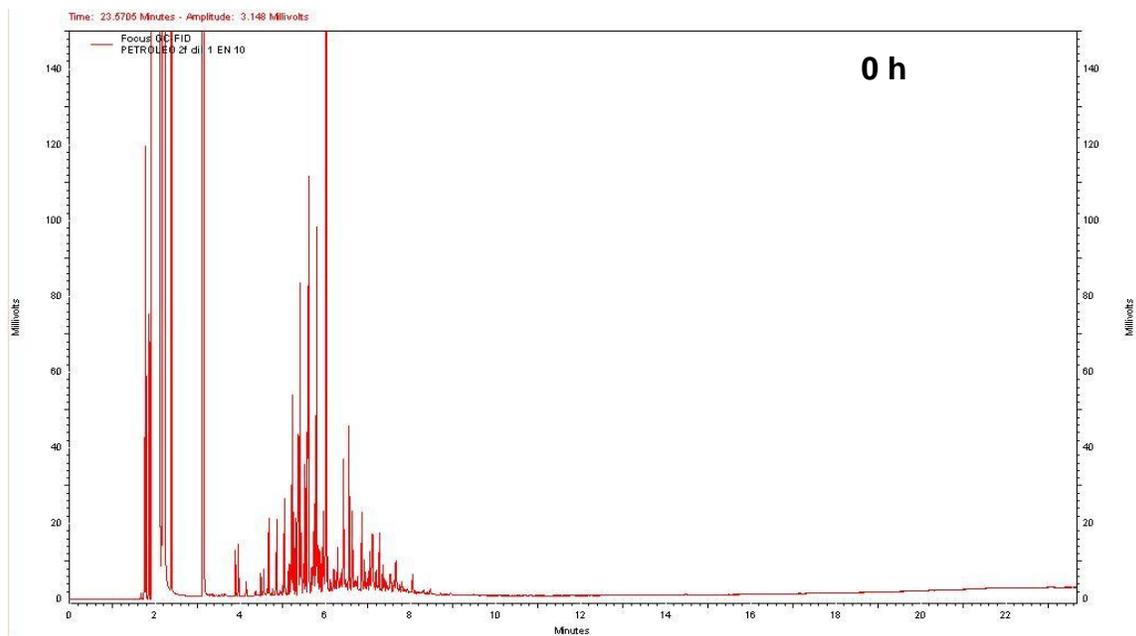


Figura 2. Cromatogramas de la remoción de hidrocarburos aromáticos por el consorcio bacteriano al inicio y final de cinética.

Tabla 4. Compuestos alifáticos identificados durante la cinética de remoción en el consorcio bacteriano y porcentaje de remoción final.

Compuesto	Tiempo de Retención	Concentración ppm T=0	Concentración ppm T=8	Concentración ppm T=24	Concentración ppm T=144	% Remoción final
C ₁₀	5.199	51.11	63.74	72.22	0.61	98.81
C ₁₀	5.247	41.02	11.64	3.34	1.54	96.23
C ₁₀	5.318	35.41	48.41	11.29	7.44	79.00
C ₁₀	5.367	54.50	47.20	16.13	7.75	85.77
C ₁₀	5.399	44.57	71.38	20.39	16.14	63.79
C ₁₀	5.444	29.29	9.88	4.40	4.05	86.17
C ₁₀	5.482	35.61	32.97	10.62	7.81	78.07
C ₁₀	5.558	78.50	103.37	31.25	32.79	58.23
C ₁₀	5.627	94.94	12.82	9.29	6.15	93.53
C ₁₀	5.689	18.79	41.59	12.45	13.40	28.67
C ₁₀	5.752	57.36	76.23	29.31	31.08	45.81
C ₁₀	5.802	63.38	13.33	7.77	7.72	87.82
C ₁₀	5.849	15.14	12.50	5.81	5.79	61.74
C ₁₀	5.912	78.29	152.05	99.23	64.38	17.77
C ₁₀	5.977	84.70	70.23	43.32	41.07	51.52
C ₁₀	6.025	44.85	13.27	9.99	11.31	74.78
C ₁₀	6.085	11.48	7.18	2.34	4.47	61.10
C ₁₀	6.158	20.78	31.80	22.79	18.78	9.62
C ₁₂	6.224	25.06	29.14	25.07	18.85	24.81
C ₁₂	6.266	45.95	69.40	59.55	46.79	-1.81
C ₁₂	6.367	164.69	143.59	217.04	136.45	17.15
C ₁₂	6.462	89.46	68.99	80.51	6.47	92.76
C ₁₂	6.550	9.15	7.22	6.61	5.94	35.05
C ₁₂	6.624	11.30	10.74	0.00	0.00	100.00
C ₁₂	6.654	11.45	23.06	21.33	9.71	15.22
C ₁₂	6.694	19.82	20.52	30.72	24.60	-24.13
C ₁₄	6.744	47.17	59.04	63.74	51.40	-8.97
C ₁₄	6.850	249.57	209.62	339.25	246.15	1.37
C ₁₄	7.054	15.52	17.69	20.44	16.51	-6.34
C ₁₄	7.100	91.63	110.83	125.24	101.66	-10.95
C ₁₄	7.138	8.82	10.62	12.13	9.48	-7.45
C ₁₄	7.255	213.21	255.54	292.37	218.90	-2.67
C ₁₄	7.322	99.58	7.20	7.71	6.19	93.78
C ₁₄	7.463	17.75	21.35	25.54	17.79	-11.48
C ₁₄	7.511	21.95	25.99	30.54	25.41	-15.75
C ₁₄	7.600	5.68	4.46	5.81	4.88	14.19
C ₁₆	7.650	115.49	140.90	163.85	121.97	-5.61
C ₁₆	7.825	19.46	24.43	28.23	22.90	-17.68

C ₁₆	7.890	5.87	10.83	10.57	4.69	20.14
C ₁₆	8.045	89.60	110.84	128.07	98.90	-10.38
C ₁₈	8.297	5.17	3.56	3.87	2.99	42.08
C ₁₈	8.464	32.10	40.08	45.49	35.00	-9.02
C ₁₈	8.933	13.98	15.95	19.00	14.26	-2.03
C ₁₈	9.466	6.84	8.26	9.21	6.81	0.40

Tabla 5. Concentración de los compuestos aromáticos identificados durante la cinética de remoción en el consorcio bacteriano y porcentaje de remoción final.

Compuesto	Tiempo de retención	Concentración ppm						% Remoción final
		T=0 h	T=8 h	T=32 h	T=48 h	T=72 h	T=144 h	
Etil benceno	5.05	29	0	0	0	0	0	100
Decano 2,2,8 trimetil	5.21	31	25	4	12	0	0	99
Benceno 1 etil 2 metil	5.25	50	10	2	4	0	0	100
Benceno 1 etil 2 metil	5.31	19	39	9	18	0	0	100
Benceno trimetil	5.38	73	38	9	18	0	0	100
Benceno 1,4 dietil	5.42	71	9	2	5	0	0	100
Benceno 1,2,4,5 tetrametil	5.45	14	3	1	2	0	0	100
Benceno 1,2,4,5 tetrametil	5.53	33	19	6	9	0	0	100
Naftaleno	5.62	170	107	1	53	0	0	100
Naftaleno tetrahidro metil	5.75	25	14	29	7	0	0	100
2 metil naftaleno	5.80	109	68	4	4	1	0	100
Metil naftaleno	5.85	14	8	1	4	0	0	100
Metil naftaleno	5.89	10	6	0	0	0	0	100
Metil naftaleno	5.96	20	20	2	11	1	0	100
Ciclohexano 1,2 dimetil 3 pentil 4 propil	6.03	192	110	88	3	0	0	100
Naftaleno 1,4 dimetil	6.30	10	16	2	6	1	0	100
Naftaleno 1,2 dimetil	6.44	35	58	8	22	7	0	99
Ciclohexildecano	6.57	40	26	24	6	1	0	100
Trimetilnaftaleno	6.65	22	15	12	6	2	0	98
Trimetilnaftaleno	6.87	21	10	3	16	10	2	88
Terta hidro fenantreno	7.05	13	9	8	4	5	0	98
Ciclohexiltridecano	7.11	30	29	17	12	11	3	91
Ciclohexiltridecano	7.28	18	28	5	13	11	6	66
Ciclohexiltridecano	7.67	11	13	5	8	8	7	42
Total	total	1061	680	243	245	59	19	98

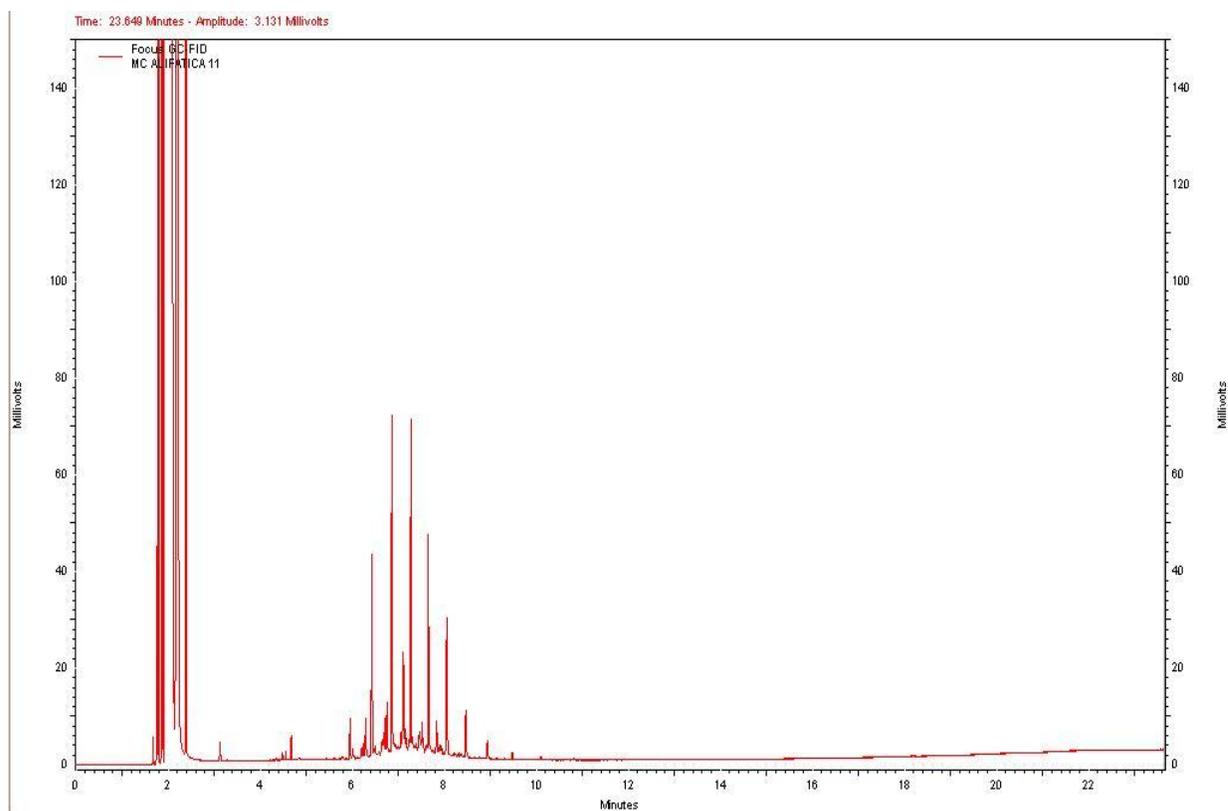


Figura 3. Cromatograma de la remoción de hidrocarburos alifáticos por la cepa 1 al final de la cinética.

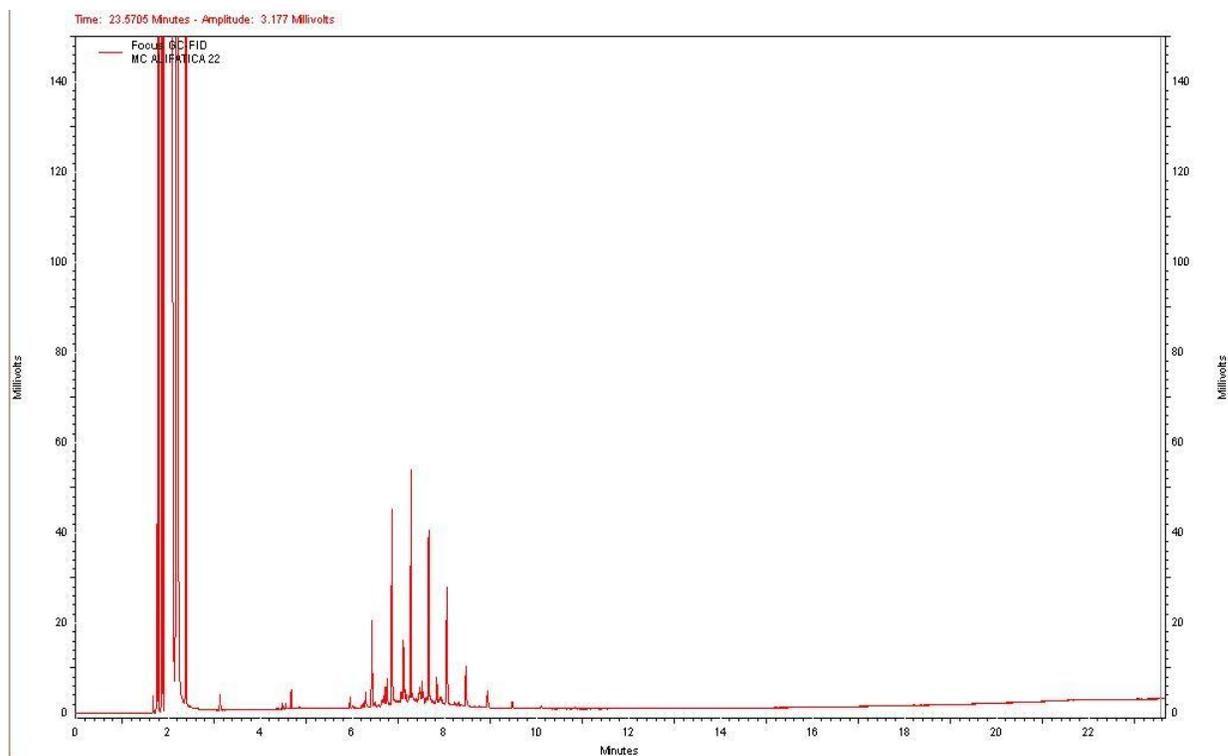


Figura 4. Cromatograma de la remoción de hidrocarburos alifáticos por la cepa 2 al final de la cinética.

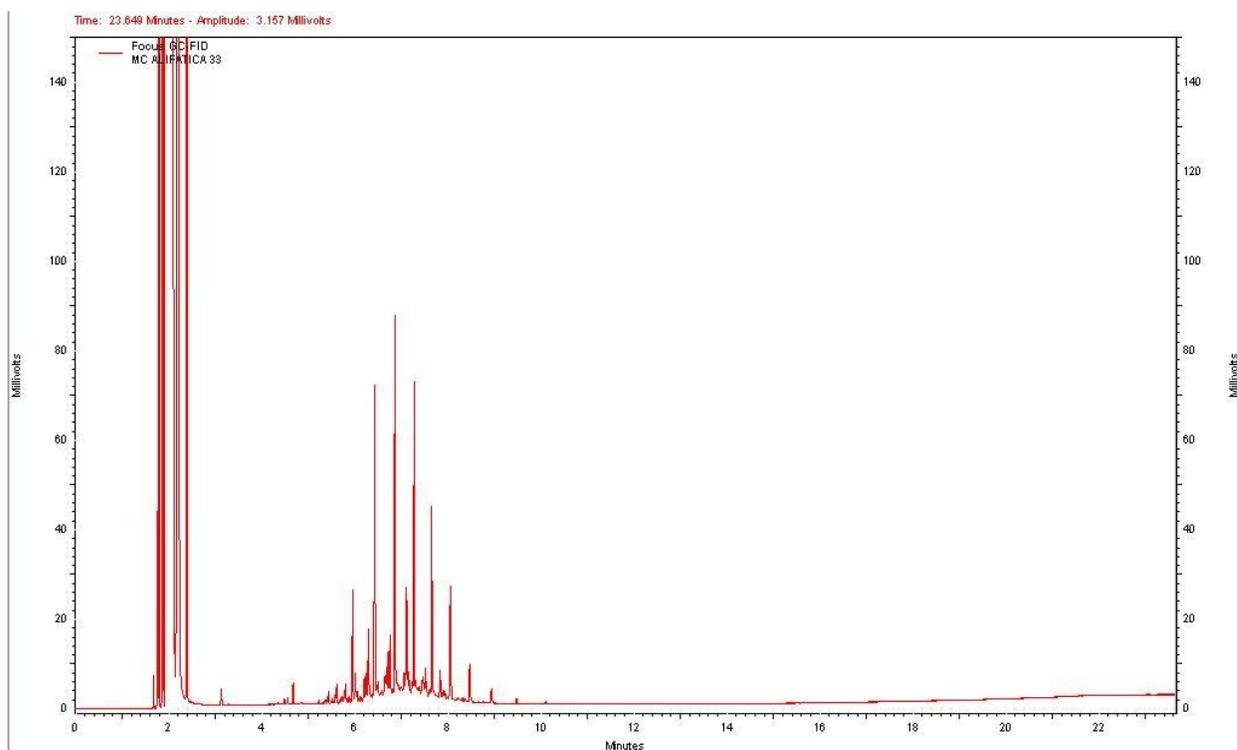


Figura 5. Cromatograma de la remoción de hidrocarburos aromáticos por la cepa 3 al final de la cinética.

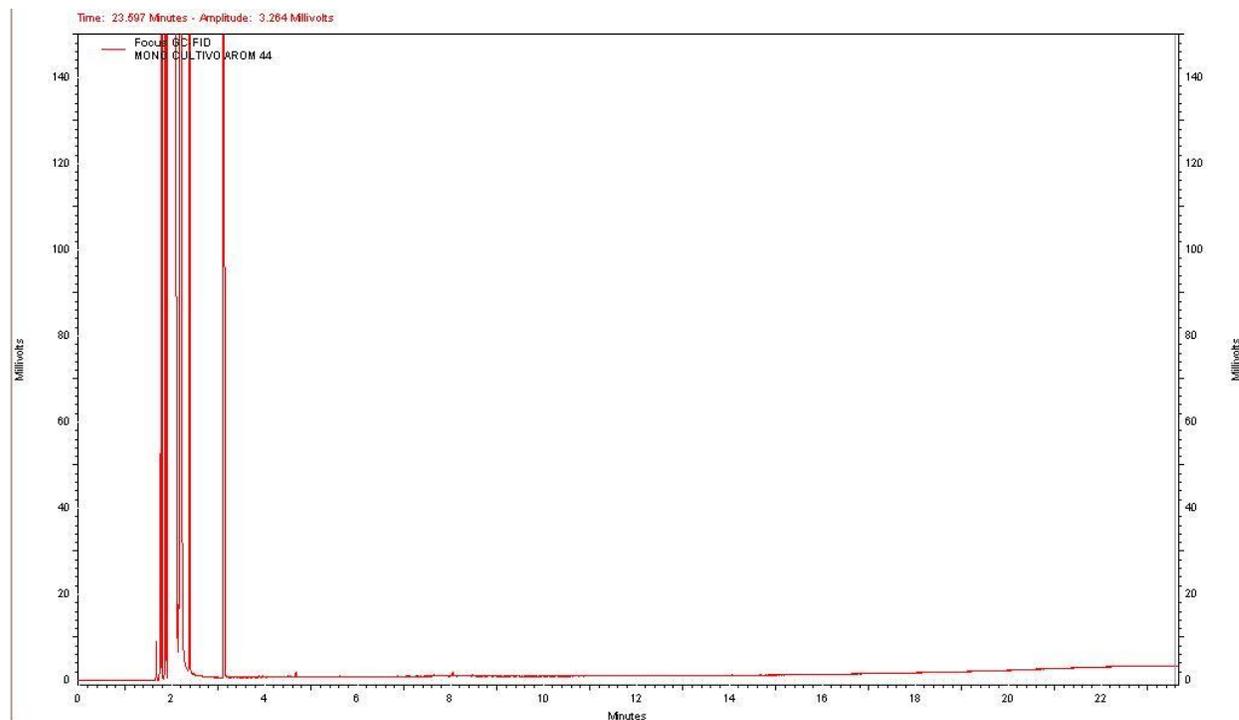


Figura 6. Cromatograma de la remoción de hidrocarburos aromáticos por la cepa 4 al final de la cinética.

Tabla 6. Concentración de los compuestos aromáticos identificados durante la cinética de remoción por las cepas C1-C4.

Compuesto	Tiempo de retención	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)			
			Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4
Etil benceno	5.05	29	0	0	0	0
Decano 2,2,8 trimetil	5.21	31	4	0	0	0
Benceno 1 etil 2 metil	5.25	50	8	0	0	0.001
Benceno 1 etil 2 metil	5.31	19	3	0	0	0
Benceno trimetil	5.38	73	12	0	0	0.001
Benceno 1,4 dietil	5.42	71	10	0	0	0.001
Benceno 1,2,4,5 tetremetil	5.45	14	2	0	0	0
Benceno 1,2,4,5 tetremetil	5.53	33	5	0	0	0.001
Naftaleno	5.62	170	29	0	0	0.003
Naftaleno tetrahidro metil	5.75	25	3	0	0	0
2 metil naftaleno	5.80	109	17	0	0	0.002
Metil naftaleno	5.85	14	2	0	0	0
Metil naftaleno	5.89	10	2	0	0	0
Metil naftaleno	5.96	20	3	0	0	0
Ciclohexano 1,2 dimetil 3 pentil 4 propil	6.03	192	5	0	0	0
Naftaleno 1,4 dimetil	6.30	10	2	0.091	0	0
Naftaleno 1,2 dimetil	6.44	35	9	0	0	0.001
Ciclohexildecano	6.57	40	4	0	0	0
Trimetilnaftaleno	6.65	22	4	0	0	0
Trimetilnaftaleno	6.87	21	12	0.050	0	0.001
Terta hidro fenantreno	7.05	13	5	0.072	0.084	0.001
Ciclohexiltridecano	7.11	30	13	0	0	0.001
Ciclohexiltridecano	7.28	18	14	0.108	0.084	0.002
Ciclohexiltridecano	7.67	11	10	0.060	0.095	0.001
Total	total	1061	178	0.380	0.262	0.019

Tabla 7. Porcentaje de remoción de los compuestos aromáticos identificados durante la cinética de remoción por las cepas C1-C4.

Compuesto	Tiempo de retención	% Remoción final				
		Inicial	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4
Etil benceno	5.05	0	100	100	100	100
Decano 2,2,8 trimetil	5.21	0	86	100	100	100
Benceno 1 etil 2 metil	5.25	0	85	100	100	100
Benceno 1 etil 2 metil	5.31	0	84	100	100	100
Benceno trimetil	5.38	0	84	100	100	100
Benceno 1,4 dietil	5.42	0	85	100	100	100
Benceno 1,2,4,5 tetrametil	5.45	0	86	100	100	100
Benceno 1,2,4,5 tetrametil	5.53	0	85	100	100	100
Naftaleno	5.62	0	83	100	100	100
Naftaleno tetrahidro metil	5.75	0	88		100	100
2 metil naftaleno	5.80	0	84	100	100	100
Metil naftaleno	5.85	0	88	100	100	100
Metil naftaleno	5.89	0	85	100	100	100
Metil naftaleno	5.96	0	84	100	100	100
Ciclohexano 1,2 dimetil 3 pentil 4 propil	6.03	0	98	100	100	100
Naftaleno 1,4 dimetil	6.30	0	80	99	100	100
Naftaleno 1,2 dimetil	6.44	0	74	100	100	100
Ciclohexildecano	6.57	0	90	100	100	100
Trimetilnaftaleno	6.65	0	81	100	100	100
Trimetilnaftaleno	6.87	0	41	100	100	100
Terta hidro fenantreno	7.05	0	58	99	99	100
Ciclohexiltridecano	7.11	0	57	100	100	100
Ciclohexiltridecano	7.28	0	20	99	100	100
Ciclohexiltridecano	7.67	0	9	99	99	100

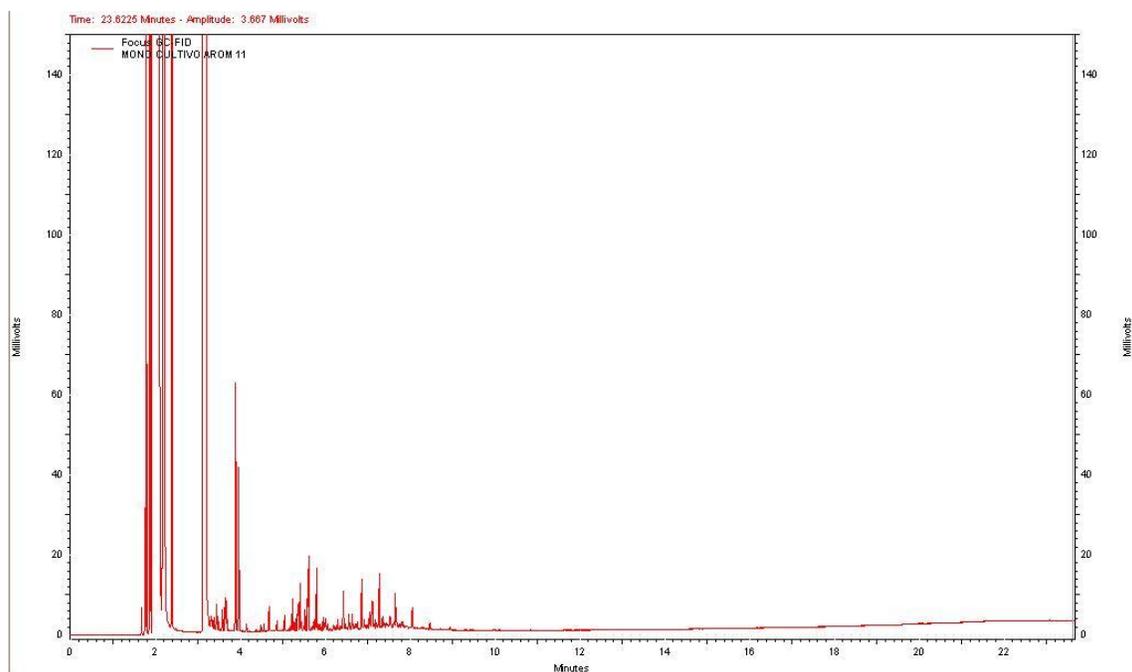


Figura 7. Cromatograma de la remoción de hidrocarburos aromáticos por la cepa 1 al final de la cinética.

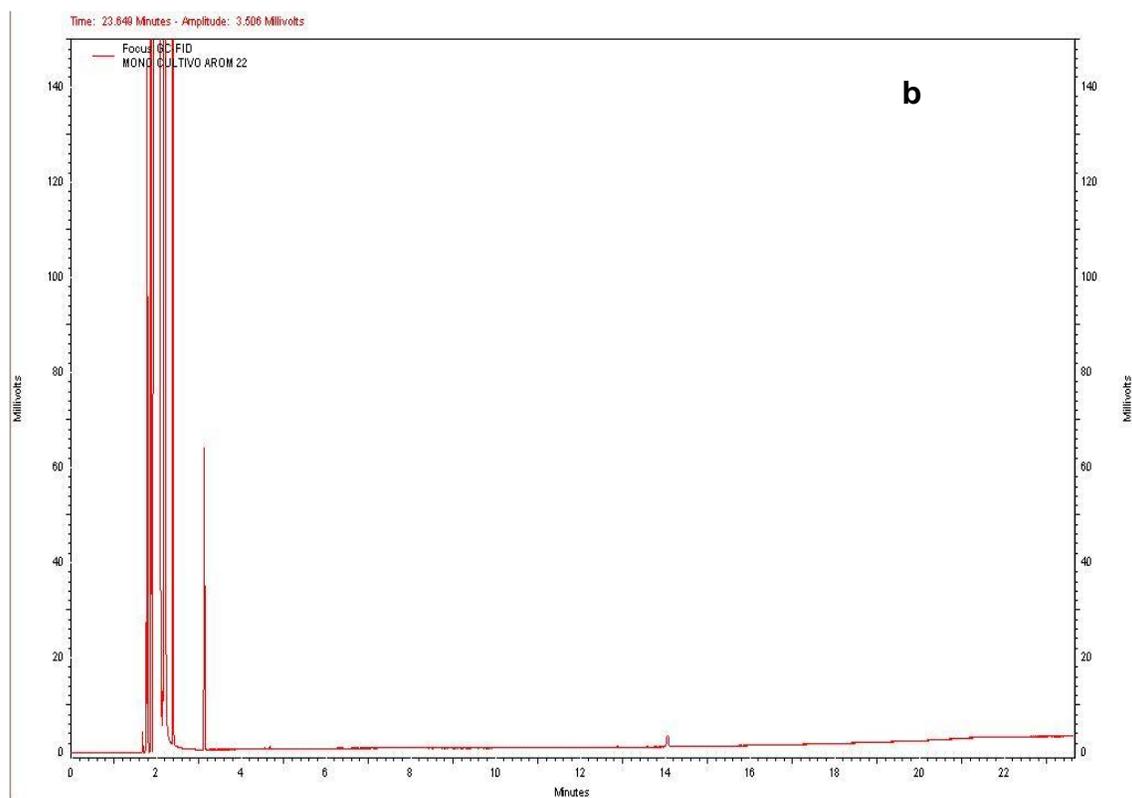


Figura 8. Cromatograma de la remoción de hidrocarburos aromáticos por la cepa 2 al final de la cinética.

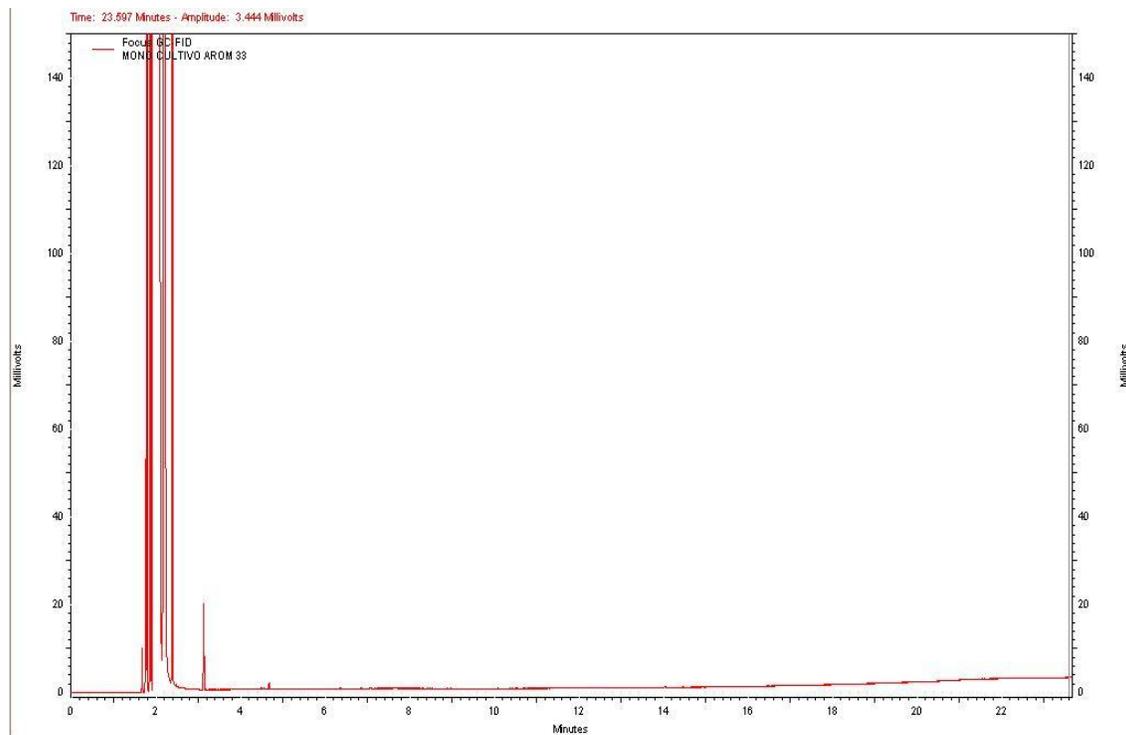


Figura 9. Cromatograma de la remoción de hidrocarburos aromáticos por la cepa 3 al final de la cinética.

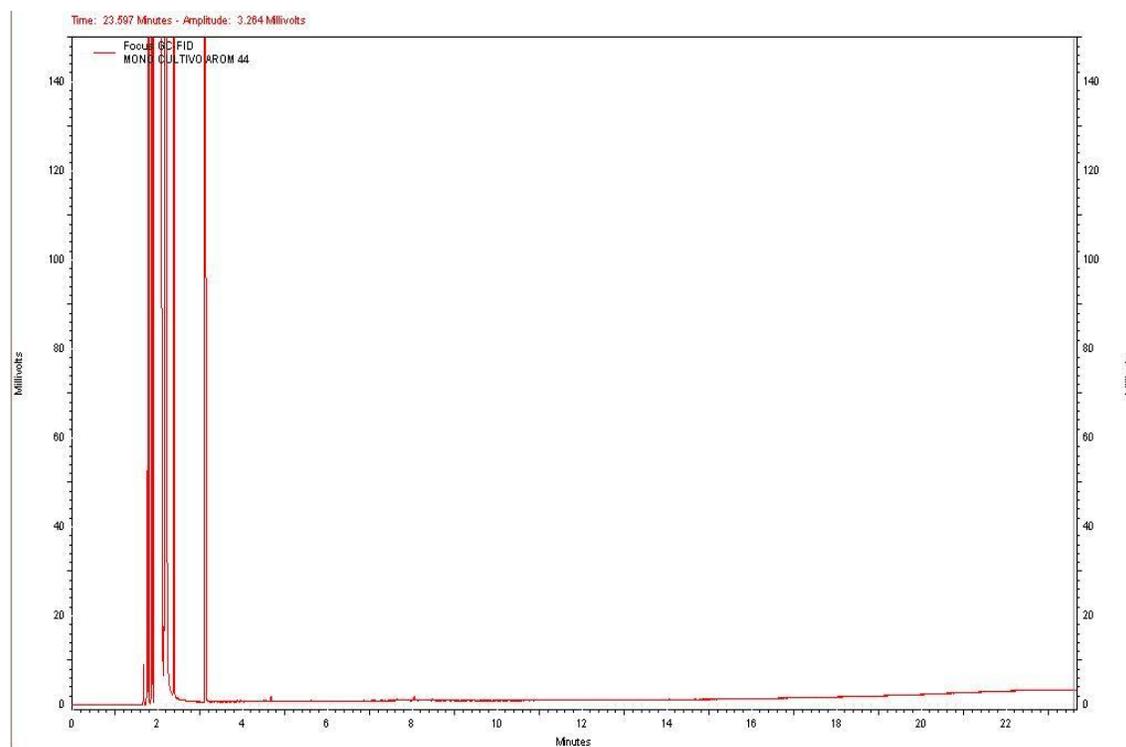


Figura 10. Cromatograma de la remoción de hidrocarburos aromáticos por la cepa 4 al final de la cinética.

Tabla 8. Compuestos aromáticos identificados al tiempo 0 horas en el consorcio bacteriano.

Compuesto	Tiempo de Retención	Área	Área %	Concentración ppm
Etil benceno	5.05	271936	2.38	29
Decano 2,2,8 trimetil	5.152	293554	2.57	31
Benceno 1 etil 2 metil	5.212	478998	4.19	50
Benceno 1 etil 2 metil	5.245	181339	1.59	19
Benceno trimetil	5.307	698135	6.11	73
Benceno 1,4 dietil	5.378	679045	5.94	71
Benceno 1,2,4,5 tetrametil	5.415	134798	1.18	14
Benceno 1,2,4,5 tetrametil	5.447	319233	2.79	33
Naftaleno	5.5	1621184	14.18	170
Naftaleno tetrahidro metil	5.533	234449	2.05	25
2 metil naftaleno	5.62	1043585	9.13	109
Metil naftaleno	5.685	137132	1.2	14
Metil naftaleno	5.748	98322	0.86	10
Metil naftaleno	5.8	187048	1.64	20
Ciclohexano 1,2 dimetil 3 pentil 4 propil	5.848	1831906	16.02	192
Naftaleno 1,4 dimetil	5.893	98664	0.86	10
Naftaleno 1,2 dimetil	5.963	336921	2.95	35
Ciclohexildecano	6.033	385967	3.38	40
Trimetilnaftaleno	6.067	205974	1.8	22
Trimetilnaftaleno	6.125	196183	1.72	21
Terta hidro fenantreno	6.21	123199	1.08	13
Ciclohexiltridecano	6.268	286882	2.51	30
Ciclohexiltridecano	6.303	169786	1.49	18
Ciclohexiltridecano	6.368	108621	0.95	11
Total		10122861	88.57	1061

Tabla 9. Compuestos aromáticos identificados al tiempo 8 horas en el consorcio bacteriano.

Compuesto	Tiempo de Retención	Área	Área %	Concentración ppm
Etil benceno	5.05	240817	3	0
Decano 2,2,8 trimetil	5.152	91339	1.14	25
Benceno 1 etil 2 metil	5.212	375549	4.67	10
Benceno 1 etil 2 metil	5.245	364623	4.54	39
Benceno trimetil	5.307	85375	1.06	38
Benceno 1,4 dietil	5.378	32396	0.4	9
Benceno 1,2,4,5 tetrametil	5.415	176500	2.2	3
Benceno 1,2,4,5 tetrametil	5.447	1017299	12.66	19
Naftaleno	5.5	131359	1.64	107

Naftaleno tetrahidro metil	5.533	647783	8.06	14
2 metil naftaleno	5.62	76689	0.95	68
Metil naftaleno	5.685	56791	0.71	8
Metil naftaleno	5.748	186803	2.33	6
Metil naftaleno	5.8	1051035	13.08	20
Ciclohexano 1,2 dimetil 3 pentil 4 propil	5.848	152802	1.9	110
Naftaleno 1,4 dimetil	5.893	549533	6.84	16
Naftaleno 1,2 dimetil	5.963	244455	3.04	58
Ciclohexildecano	6.033	140663	1.75	26
Trimetilnaftaleno	6.067	96016	1.2	15
Trimetilnaftaleno	6.125	86896	1.08	10
Terta hidro fenantreno	6.21	279297	3.48	9
Ciclohexiltridecano	6.268	271380	3.38	29
Ciclohexiltridecano	6.303	128713	1.6	28
Ciclohexiltridecano	6.368	240817	3	13
Total		6484113	80.71	680

Tabla 10. Compuestos aromáticos identificados al tiempo 32 horas en el consorcio bacteriano.

Compuesto	Tiempo de Retención	Área	Área %	Concentración ppm
Decano 2,2,8 trimetil	5.152	41031	1.25	4
Benceno 1 etil 2 metil	5.212	20472	0.62	2
Benceno 1 etil 2 metil	5.245	88834	2.71	9
Benceno trimetil	5.307	84991	2.59	9
Benceno 1,4 dietil	5.378	16865	0.51	2
Benceno 1,2,4,5 tetrametil	5.415	5050	0.15	1
Benceno 1,2,4,5 tetrametil	5.447	53733	1.64	6
Naftaleno	5.5	13782	0.42	1
Naftaleno tetrahidro metil	5.533	279932	8.54	29
2 metil naftaleno	5.62	37790	1.15	4
Metil naftaleno	5.685	14018	0.43	1
Metil naftaleno	5.8	14828	0.45	2
Ciclohexano 1,2 dimetil 3 pentil 4 propil	5.848	843164	25.73	88
Naftaleno 1,4 dimetil	5.893	19274	0.59	2
Naftaleno 1,2 dimetil	5.963	75661	2.31	8
Ciclohexildecano	6.033	228244	6.97	24
Trimetilnaftaleno	6.067	113392	3.46	12
Trimetilnaftaleno	6.125	29294	0.89	3
Terta hidro fenantreno	6.21	80919	2.47	8
Ciclohexiltridecano	6.268	161590	4.93	17

Ciclohexiltridecano	6.303	48629	1.48	5
Ciclohexiltridecano	6.368	51096	1.56	5
Total		2322589	70.85	243

Tabla 11. Compuestos aromáticos identificados al tiempo 48 horas en el consorcio bacteriano.

Compuesto	Tiempo de Retención	Área	Área %	Concentración ppm
Decano 2,2,8 trimetil	5.152	113635	3.4	12
Benceno 1 etil 2 metil	5.212	39428	1.18	4
Benceno 1 etil 2 metil	5.245	176380	5.28	18
Benceno trimetil	5.307	174801	5.24	18
Benceno 1,4 dietil	5.378	47951	1.44	5
Benceno 1,2,4,5 tetrametil	5.415	18849	0.56	2
Benceno 1,2,4,5 tetrametil	5.447	87905	2.63	9
Naftaleno	5.5	509818	15.27	53
Naftaleno tetrahidro metil	5.533	69921	2.09	7
2 metil naftaleno	5.62	38216	1.14	4
Metil naftaleno	5.685	35954	1.08	4
Metil naftaleno	5.8	108856	3.26	11
Ciclohexano 1,2 dimetil 3 pentil 4 propil	5.848	29561	0.89	3
Naftaleno 1,4 dimetil	5.893	55292	1.66	6
Naftaleno 1,2 dimetil	5.963	211861	6.35	22
Ciclohexildecano	6.033	59024	1.77	6
Trimetilnaftaleno	6.067	53313	1.6	6
Trimetilnaftaleno	6.125	150662	4.51	16
Terta hidro fenantreno	6.21	40000	1.2	4
Ciclohexiltridecano	6.268	114799	3.44	12
Ciclohexiltridecano	6.303	126320	3.78	13
Ciclohexiltridecano	6.368	75162	2.25	8
Total		2337708	70.02	245

Tabla 12. Compuestos aromáticos identificados al tiempo 72 horas en el consorcio bacteriano.

Compuesto	Tiempo de Retención	Área	Área %	Concentración ppm
Naftaleno	5.5	4291	0.41	0
2 metil naftaleno	5.62	6422	0.61	1
Metil naftaleno	5.685	1172	0.11	0
Metil naftaleno	5.748	1547	0.15	0
Metil naftaleno	5.8	9192	0.88	1
Ciclohexano 1,2 dimetil 3 pentil 4 propil	5.848	3444	0.33	0
Naftaleno 1,4 dimetil	5.893	13396	1.28	1

Naftaleno 1,2 dimetil	5.963	67534	6.46	7
Ciclohexildecano	6.033	8984	0.86	1
Trimetilnaftaleno	6.067	20768	1.99	2
Trimetilnaftaleno	6.125	94988	9.08	10
Terta hidro fenantreno	6.21	43210	4.13	5
Ciclohexiltridecano	6.268	105821	10.11	11
Ciclohexiltridecano	6.303	105144	10.05	11
Ciclohexiltridecano	6.368	79303	7.58	8
Total		565216	54.03	59

Tabla 13. Compuestos aromáticos identificados al tiempo 144 horas en el consorcio bacteriano.

Compuesto	Tiempo de Retención	Área	Área %	Concentración ppm
Decano 2,2,8 trimetil	5.152	1665	0.25	0
Naftaleno	5.5	1193	0.18	0
Naftaleno tetrahidro metil	5.533			0
2 metil naftaleno	5.62	608	0.09	0
Naftaleno 1,2 dimetil	5.963	2262	0.34	0
Trimetilnaftaleno	6.067	3211	0.49	0
Trimetilnaftaleno	6.125	22944	3.5	2
Terta hidro fenantreno	6.21	2645	0.4	0
Ciclohexiltridecano	6.268	24391	3.72	3
Ciclohexiltridecano	6.303	57615	8.78	6
Ciclohexiltridecano	6.368	63168	9.63	7
Total		179702	27.38	19

Capítulo VI. Referencias Bibliográficas

Adams R. H., Domínguez V. I. y García L., (1999). Potencial de la Biorremediación de Suelo y Agua Impactados por Petróleo en el Trópico Mexicano. *Terra* 17 (2): 159-174.

Atlas R. M. y Bartha R., (2002). *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Madrid, España: Pearson Education S.A. 677 pp (579).

Arce J. M., (2004). Remoción de las Fracciones Alifática, Policíclica Aromática y Azufrada de Petróleo en Suelo por Cultivo Sólido. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Tesis que presenta para obtener el grado de Doctor en Ciencias. 190 pp (1,96).

Baek K. H., Yoon B. D., Oh H. M. and Kim H. S., (2006). Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons by *Nocardia sp.* H17-1. *Geomicrobiology Journal*, 23:253–259.

Barrera J., Gavilán A. y Castro J., (2004). Listado adicional al Convenio de Estocolmo: Sustancias de Uso Industrial. En: *Las sustancias Toxicas Persistentes*. Fernández A., Castro J. y Yarto M. A. México. 257 pp (174, 184). (En línea) Disponible en www.ine.gov.mx/publicaciones/libros/447/cap5.html, (15 de abril de 2008).

Bhattacharya D., Priyangshu M., Krishnan S., Mishra S., and Lal B., (2003). Evaluation of Genetic Diversity among *Pseudomonas citronellolis* Strains Isolated from Oily Sludge-Contaminated Sites. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (3): 1435–1441

Batstone R., Smith J., and Wilson D., (1989). *The Safe Disposal of Hazardous Waste: The special needs and Problems of Developing Countries Volume II*. Estados Unidos de América: The World Bank, World Health Organization and United Nations Environment Programme. 551 pp (273).

Benavides J., Quintero G., Guevara A. L., Jaimes D. C., Gutiérrez S. M. y Miranda J., (2006). Biorremediación de Suelos Contaminados con Hidrocarburos Derivados del Petróleo. *Nova*, 4 (5): 82-90.

Bogan B.W., Lahner L.M., Sullivan W.R. and Paterek J.R., (2003). Degradation of Straight-Chain Aliphatic and High-Molecularweight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a Strain of *Mycobacterium Austroafricanum*. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 230–239.

Bracho M., Díaz L., y Soto L. M., (2004). Biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos y Heterocíclicos por *Pseudomonas spp.* *CIEN* 12 (4): 269-275.

Bushnell L. and Hass H., (1941). The Utilization of certain Hydrocarbons by Microorganism. *Journal Bacteriol.* 41:653–673.

Carrey F., (1999). *Química Orgánica*. España: Mc Graw Hill. 1132 pp (44).

Cafaro V., Notomista E., Capasso P., and Di Donato A., (2005). Regiospecificity of Two Multicomponent Monooxygenases from *Pseudomonas stutzeri* OX1: Molecular Basis for Catabolic Adaptation of This Microorganism to Methylated Aromatic Compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (8): 4736–474.

Contreras P. A., (2005). Suelos contaminados con Hidrocarburos: RNA 16s como Indicador de impacto. Memoria para optar al Título de Ingeniero Civil en Biotecnología. Universidad de Chile Facultad de ciencias físicas y matemáticas Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. 74 pp (28). (En línea) Disponible en <http://cabierta.uchile.cl/revista/26/articulos/pdf/rev6.pdf> (5 de marzo de 2008).

Cuéllar G., Pineda G., Mestral A. y Salgado R., (2004). Degradación de parafinas por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1. Investigación Universitaria Multidisciplinaria 3(3): 41-46.

Eriksson M., Sodersten E., Yu Z., Dalhammar G. and Mohn W. W., (2002). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Low Temperature under Aerobic and Nitrate-Reducing Conditions in Enrichment Cultures from Northern Soils. Applied And Environmental Microbiology, 69 (1): 275-284.

Fernández L., Rojas G., Roldán T., Ramírez M., Zegarra H., Hernández R., Reyes R., Hernández D y Arce J., (2006). Manual de Técnicas de Análisis de Suelos Aplicadas a la Remediación de Sitios Contaminados. México: Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Instituto Nacional de Ecología (INE). 184 pp (91-98, 126-129).

Flores M. A., Ortiz S. T. y Gutiérrez R. T., (2004). Medidas de Mitigación para Uso de Suelos Contaminados por Derrames de Hidrocarburos en Infraestructura de Transporte Terrestre. Secretaría de Comunicaciones y Transporte, Instituto de Mexicano del Transporte. Publicación Técnica No 257. 72 pp (13). (En línea) Disponible en <http://www.imt.mx/Espanol/Publicaciones/pubtec/pt257.pdf> (15 de enero de 2008).

Fontúrbel F. e Ibáñez C., (2006). Fuentes de Energía Biológica: Empleo del Metabolismo Microbiano para la Descontaminación de Aguas. Biología. Org La revista 17: 1-6.

Fuentes F. y Massol A., (2002). Manual de Laboratorio: Ecología de Microorganismos. Universidad de Puerto Rico. Puerto Rico, 264 pp (68). (En línea) Disponible en <http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/> (30 de abril de 2008).

Goetz J. and Brenner R., (2002). Application, Performance, and Costs of Biotreatment Technologies for Contaminated Soils. Estados Unidos de América: Environmental Protection Agency. 115 pp (37, 41, 42, 94).

Hamdan P. A., (2004). Biomonitorio: Seguimiento de Poblaciones Microbianas en Procesos de Biorremediación de Suelos Contaminados con Hidrocarburos. Tesis para obtener el grado de: maestro en biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. División de ciencias biológicas y de la salud, México, D.F. 81 pp (4, 12).

Henry J. G. and Heinke G. W. (1996). Environmental science and engineering. Estados Unidos de América: Prentice Hall. 778 pp (652-653).

Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), (2008). (En línea) disponible en <http://www.imp.mx/petroleo/composicion.htm> (28 de abril de 2008).

Jiménez Cisneros B. E., (2001). La Contaminación Ambiental en México: Causas, Efectos y tecnología Apropriadada. México: Limusa, Colegio de Ingenieros de México A.C, Instituto de Ingeniería de la UNAM y FEMISCA. 926 pp (642, 660).

Manacorda A. M. y Cuadros D., (2005). Técnicas de Biorremediación Biológicas. Escuela Superior de Salud y Ambiente Universidad Nacional del Comahue Buenos Aires 21 pp. (En línea) Disponible en http://essa.uncoma.edu.ar/academica/materias/microbiologia_ambiental/tecnicas_de_remediacion_biologicas.pdf (28 de abril de 2008).

New Jersey Department of Health and Senior Services, (2008). (En línea) Disponible en <http://www.state.nj.us/health/eoh/odisweb/> (18 de mayo de 2008).

Norma Oficial Mexicana NOM-047-SSA1-1993. Límites Biológicos Máximos Permisibles de Disolventes Orgánicos en Personal Ocupacionalmente Expuesto. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de septiembre de 1996. 7 pp (4-5).

Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Límites Máximos Permisibles de Hidrocarburos en Suelos y las Especificaciones para su Caracterización y Remediación. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 20 de agosto de 2005. 21 pp (6).

Ortíz O, Lema I. y Gavilán A., (2003). La Restauración de Suelos Contaminados con Hidrocarburos en México. Gaceta Ecológica. 069: 83-92.

Ortiz E., (2005). Las Emergencias Químicas en México. México: Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, Dirección General de Fuentes de Contaminación. (En línea) Disponible en http://www.iztacala.unam.mx/www_fesi/proteccioncivil/higieneysseguridad/memorias_emerg_quim/martes/1_lasemergenciasquimicasenmexico.pdf (26 de marzo de 2006).

Ortiz E., (2007). Curso de administración de Emergencias Químicas, Biológicas y Radiológicas. Las Emergencias Químicas en México. México: Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, Dirección General de Fuentes de Contaminación. (En línea) Disponible en http://www.cudi.edu.mx/salud2/proteccion_civil/las%20emergencias%20quimicas%20en%20mexico.pdf (25 de abril de 2008).

Padmanabhan P., Shanker R. and Khanna P., (1998). Short Communication: A Method for Extraction of DNA and PCR-Based Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria in Soil Contaminated with Oil and Grease. World Journal of Microbiology & Biotechnology 14: 925-926.

Pardo J. L., Perdomo M. C. y Benavides J. L., (2004). Efecto de la Adición de Fertilizantes Inorgánicos Compuestos en la degradación de Hidrocarburos en Suelos Contaminados con Petróleo. NOVA, 2: 40-49.

Pine S., (1998). Química Orgánica. México: Mc Grall Hill. 1088 pp (31-32).

Pollmann K., Kaschabek S., Wray V., Reineke W. and Pieper1 D., (2002). Metabolism of Dichloromethylcatechols as Central Intermediates in the Degradation of Dichlorotoluenes by *Ralstonia* sp. Strain PS12. Journal of Bacteriology 184 (19):5261-5274.

Procuraduría Federal de Protección al Ambiente PROFEPA, (2007a). (En línea) Disponible en <http://www.profepa.gob.mx/PROFEPA/ComunicacionSocial/BoletinesdeMedios/CP+109-07.htm> (11 de noviembre de 2007).

Procuraduría Federal de Protección al Ambiente PROFEPA, (2007b). (En línea) Disponible en

http://teorema.com.mx/articulos.php?id_sec=44&id_art=4575&id_ejemplar=0 (11 de noviembre de 2007).

Procuraduría Federal de Protección al Ambiente PROFEPA, (2007c). (En línea) Disponible en http://actualidad.terra.es/nacional/articulo/afectados_derrame_petroleo_rio_mexicano_1971081.htm (11 de noviembre de 2007).

Quentmeir A., and Friedrich C. G., (1994). Transfer and Expression of Degradative and Antibiotic Resistance Plasmids in Acidophilic Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 60(3): 973–978.

Rein A., Fernqvist M., Mayer P., Trapp S., M. Bittens and Karlson U., (2007). Degradation of PCB congeners by bacterial strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 469–481.

Riser-Roberts, E. (1998). Remediation of Petroleum Contaminated Soils. Biological, Physical and Chemical Processes. Estados Unidos de América: Lewis Publishers. 542 pp (6, 33).

Rodríguez J. L. & Sánchez J., (2003). Aspectos tecnológicos y aplicación al vertido del Prestige: Biorremediación. *Industria y minería.* 622(05): 17-21.

Saval S., (1999). Éxitos y Fracasos de la Remediación de Suelos en Sitios Contaminados con Hidrocarburos. En: Conservación y Restauración de suelos. Siebe C., Rodarte H., Toeldo G., Etchevers J. y Oleshko K. México: Instituto de Ingeniería de Bioprocesos Ambientales, Universidad Nacional Autónoma de México. 654 pp (519-525).

Sawyer C., McCarty P. and Parkin G., (2001). Química para Ingeniería Ambiental. Colombia: Mc Graw Hill. 713 pp (211-214).

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales SEMARNAT, (2006). La Gestión Ambiental en México. 472 pp (277-278). (En línea) Disponible en http://www.semarnat.gob.mx/informacionambiental/Publicacion/Gestion_Ambiental.pdf (11 de noviembre de 2007).

Sharma P. D., (2005). Environmental Microbiology. Delhi, India: Alpha Science International Ltd. 372 pp (148-149).

Sodhi G.S., (2000). Fundamentals Concepts of Environmental Chemistry. Delhi, India: Alpha Science International Ltd. 465 pp (156-166).

Stroud J.L., Paton G.I. and Semple K.T., (2007). Microbe-Aliphatic Hydrocarbon Interactions in Soil: Implications for Biodegradation and Bioremediation. *Journal of Applied Microbiology* 102: 1239–1253.

Suthersan S., (1997). Remediation Engineering: Design Concepts. Estados Unidos de América: Lewis Publisher. 362pp (141-142).

Swannell R. P., Lee K., and McDonagh M., (1996). Field Evaluations of Marine Oil Spill Bioremediation. *Microbiol Rev* 60(2): 342–365.

Van Deuren, J., Wang, Z. and Ledbetter, J., (2002). Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. Technology Innovation Office, EPA.(En línea) Disponible en <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>(4 de abril de 2008).

Van J. D., Singh A. and Ward O. P., (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4): 503–549.

Vargas P. A., Cuéllar R. R., y Dussán J., (2004). Biorremediación de Residuos del Petróleo. *Hipótesis / Apuntes Científicos Uniandinos*, 4: 43-49.

Vila J., López Z., Sabaté J., Minguillón C., Solanas A., and Grifoll M., (2001). Identification of a Novel Metabolite in the Degradation of Pyrene by *Mycobacterium* sp. Strain AP1: Actions of the Isolate on Two- and Three-Ring Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (12): 5497–5505.

Viñas M., (2005). Biorremediación de Suelos Contaminados por Hidrocarburos: Caracterización Microbiológica, Química y Ecotoxicológica. Memoria presentada para optar al título de Doctor en Biología por la Universitat de Barcelona. (En línea) Disponible en http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0920105085623//TESIS_MVI%D1AS_CANALS.pdf (15 de noviembre de 2007).

Volke T. L. y Velasco J. A., (2002). *Tecnologías de Remediación para Suelos Contaminados*. México: Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Instituto Nacional de Ecología. 62 pp (31-39).

Volke T. L. y Velasco J. A., (2003). *Biodegradación de Hidrocarburos del Petróleo en Suelos Intemperizados mediante Composteo*. México: Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental. 33 pp (5-6).

Wade L. G., (1993). *Química Orgánica*. México: Prentice Hall. 1312 pp (71).

Yerushalmi L., Rocheleau S., Cimpoiu R., Sarrazin M., Sunahara G., Peisajovich A., Leclair G. and Guiot S., (2003). Enhanced Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Soil. *Bioremediation Journal* 7(1):37–51.