UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

"Región Poza Rica - Tuxpan"

MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

"ESTABLECIMIENTO DE UN PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN USANDO *Stenotrophomonas maltophilia*"

TESIS

Que para obtener el título de:
MAESTRA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

PRESENTA:

Nancy Deyanira Hernández Castellanos

DIRECTOR:
Dr. Leandro Chaires Martínez
CO-DIRECTOR:
Dr. Rodrigo Cuervo González

Tuxpan, Veracruz 2016

Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

Revisión del trabajo de intervención de la alumna: **Nancy Deyanira Hernández Castellanos.**

JURADO EXAMINADOR

NOMBRE	FECHA	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Juan Manuel Pech Canché	20-oct-16	Aprobado	Pech C
Maribel Ortiz Domínguez	21 X 2016	Aprobado	mO
Luette A. Quiñonero F.	24-X-2016	Aprobado	

En la presente revisión se acordó que el trabajo de intervención denominado **"ESTABLECIMIENTO DE UN PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN USANDO *Stenotrophomonas maltophilia*"** que presenta la sustentante para obtener el Título de Maestra, está terminado por lo que puede proceder a su inmediata impresión.

El presente trabajo de intervención titulado: **"ESTABLECIMIENTO DE UN PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN USANDO *Stenotrophomonas maltophilia*"**, realizado por la C. Nancy Deyanira Hernández Castellanos, bajo la dirección del Dr. Leandro Chaires Martínez y asesoría del consejo particular del Dr. Rodrigo Cuervo González, ha sido revisada y aprobada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

Dr. Leandro Chaires Martínez
DIRECTOR

Dr. Rodrigo Cuervo González
CODIRECTOR

Tuxpan de Rodríguez Cano, Ver. octubre de 2016.

Agradecimientos:

A **Jehová**, el Dios verdadero, de quien procede conocimiento, sabiduría, y la fuerza vital.

Al **Dr. Leandro Cahires Martínez**, Director de tesis, por su entrega y apoyo incondicional en la realización de éste proyecto.

Al **Dr. Rodrigo Cuervo González**, Co-Director de tesis, por su dedicación a este trabajo.

A mi **comisión lectora**, integrada por la Dra. Ivette Chamorro Florescano, la Dra. Maribel Ortiz Domínguez y el Dr. Juan Manuel Pech Canché, que por medio de sus observaciones se enriqueció y fortaleció este trabajo de tesis.

A la **Universidad Veracruzana**, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en esta casa de estudios.

Al **Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache**, por darme las herramientas y el apoyo para alcanzar ésta meta de superación profesional.

Agradezco el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca No. 395380 Para la realización de mis estudios de posgrado que concluyen con ésta tesis, como producto final de la Maestría en Ciencias del Ambiente.

Dedicatoria:

A mi amada familia....

Denis... tu compañía ha sido un aliciente para mí,

Andrés... tu guía y palabras de ánimo me han fortalecido,

Leonardo... tu cuidado y confianza en mí me permitieron seguir adelante,

Nori... mi mamita, la razón de mi vivir, por tu cariño, fuerza, consejo, alegría, fe, amor.

Son el motor que impulsa mi vida, gracias por creer en mí y apoyarme en el trayecto hacia el cumplimiento de ésta meta!!!

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS…….....v
ÍNDICE DE FIGURAS…...…….....v
RESUMEN…….... vi
1 INTRODUCCIÓN 1
2 ANTECEDENTES 4
2.1 Degradación de hidrocarburos por microorganismos 5
2.1.1 Degradación de hidrocarburos por *Stenotrophomonas maltophilia* 7
3 OBJETIVOS 10
3.1 Objetivo general 10
3.2 Objetivos específicos 10
4 HIPÓTESIS 11
5 MATERIALES Y MÉTODOS 12
5.1 Material biológico 12
5.2 Diseño experimental 12
5.2.1 Condiciones óptimas de crecimiento 12
5.2.2 Evaluación de la efectividad de la capacidad biorremediadora de *S. maltophilia* 14
5.3 Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de *S. maltophilia*… 15
5.4 Métodos de análisis 16
5.5 Evaluación del efecto de hidrocarburos en parámetros de crecimiento de *S. maltophilia* 16
5.6 Degradación de hidrocarburos en suelo nativo 17
5.6.1 Tratamiento en frascos 17
5.6.2 Tratamiento en BTACA 17
5.7 Degradación de hidrocarburos en un suelo modelo 18
5.7.1 Tratamiento en frascos 18
5.7.2 Tratamiento en BTACA 18

5.7.3 Prueba piloto en campo 19
5.8 Análisis cromatográfico 19
5.9 Análisis estadísticos 20
6 RESULTADOS 21
6.1 Condiciones óptimas de crecimiento 21
6.2 Efecto de hidrocarburos en los parámetros de crecimiento de *S. maltophilia*… 25
6.3 Evaluación de la efectividad de remediación en suelo nativo 26
6.4 Evaluación de la efectividad de remediación en suelo modelo 28
7 DISCUSIÓN 31
7.1 Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de *S. maltophilia*… 31
7.2 Influencia de hidrocarburos sobre los parámetros de crecimiento. 33
7.3 Efectividad de la biorremediación con *S. maltophilia* mediante la aplicación en un suelo nativo y un suelo modelo 33
8 CONCLUSIONES 37
9 APLICACIÓN PRÁCTICA 38
10 BIBLIOGRAFÍA 40
ANEXO A 49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de *S. maltophilia*.....24

Cuadro 2. Influencia de los hidrocarburos en los parámetros de crecimiento de *S. maltophilia*.....25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diseño experimental para la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de *S. maltophilia*. 13

Figura 2. Diseño experimental para la evaluación de la capacidad biorremediadora de *S. maltophilia*. 14

Figura 3. Crecimiento de *S. maltophilia* a diferentes condiciones.....23

Figura 4. Capacidad biorremediadora de *S. maltophilia* con dos diferentes tratamientos en muestras de suelo nativo.....27

Figura 5. Interacciones entre tratamientos y fracciones en el proceso de biorremediación del suelo nativo usando *S. maltophilia*. 27

Figura 6. Capacidad biorremediadora de *S. maltophilia* con tres diferentes tratamientos en muestras de suelo modelo.....29

Figura 7. Interacciones entre tratamientos y fracciones en el proceso de biorremediación del suelo modelo utilizando *S. maltophilia*……...30

RESUMEN

Se determinaron las condiciones óptimas de crecimiento de *Stenotrophomonas maltophilia* obteniéndose mayor densidad de biomasa en condiciones de 24° C, 70 rpm, pH 5 y 2 vvm. Posteriormente se realizaron experimentos de biorremediación, usando la técnica de bioaumentación, en muestras de suelo nativo y suelo modelo. En el suelo nativo se obtuvo una degradación superior al 60% en tratamiento en frascos y hasta el 90% en biorreactor de tanque agitado a cielo abierto. En cuanto al suelo modelo el mayor porcentaje de remoción se presentó en biorreactor de tanque agitado a cielo abierto con 95.2 %; en el tratamiento en frascos se obtuvo un porcentaje de remoción del 92.4%; el tratamiento donde se presentó menor remoción fue en la pileta con un porcentaje máximo de 76.8 %. Se concluyó que *Stenotrophomonas maltophilia* posee la capacidad de limpiar suelos contaminados con hidrocarburos y su uso es factible en la técnica de bioaumentación.

Palabras clave: *Stenotrophomonas maltophilia,* crecimiento, hidrocarburos lineales, bioaumentación, degradación.

1 INTRODUCCIÓN

La región norte del estado de Veracruz cuenta con un gran número de sitios con diferentes niveles de impacto ambiental, resultado de la actividad petrolera. Dicha actividad económica está acompañada de numerosos eventos de riesgo tales como derrames de hidrocarburos líquidos y en estado gaseoso, además de explosiones por fugas en ductos. Todo esto deteriora los ecosistemas, dejando inutilizables suelos, cuencas hidrológicas, genera contaminación atmosférica y todo ello trae como consecuencia fenómenos como el calentamiento global, cambio climático y modificación de los ciclos biogeoquímicos (Vela, 2007).

Para contrarrestar el efecto de todo lo anterior, se han desarrollado diversas tecnologías de remediación que mediante acciones físicas, químicas o biológicas pueden alterar la composición de los contaminantes, extraer y separar el contaminante del medio, o inmovilizarlo para que no continúe afectando otras áreas (Loya del Ángel, 2013). Una de estas tecnologías para recuperar espacios contaminados con hidrocarburos es la biorremediación. Ésta utiliza elementos biológicos autóctonos del sitio contaminado, que degradan y/o transforman éstos contaminantes a sustancias inocuas (Ferrera-Cerrato *et al*., 2006; Travieso *et al.*, 2004).

El éxito y el tiempo de aplicación del tratamiento de biorremediación están condicionados por la capacidad del organismo utilizado para degradar los contaminantes orgánicos a productos inocuos como dióxido de carbono, agua y biomasa, así como por los factores limitantes que afectan el tratamiento como son las características del microorganismo, el medio y del producto petrolífero (Ferrera-Cerrato *et al*., 2006).

La degradación de hidrocarburos es realizada principalmente por bacterias y hongos. Los géneros de bacterias reportados como degradadores de hidrocarburos en el agua y suelo son: *Acinetobacter sp., Alcaligenes sp., Mycobacterium sp., Pseudomonas sp., Rhodococcus sp., Corynebacterium renale, Moraxella sp., Streptomyces sp., Vibrio sp., Nocardia sp., Cycloclasticus sp*. *Agrobacterium sp., Sphingomonas sp.,Stenotrophomonas sp.* Entre los géneros de hongos con capacidad degradadora de hidrocarburos encontramos: *Absida sp., Aspergillus sp., Basidiobolus sp., Candida sp., Choanephora sp., Circinella sp., Claviceps sp., Cokeromyces sp., Conidiobolus sp., Gliocladium sp., Pestalotia sp., Pestalotia palmarum, Beauveria alba, Aspergillus terreus, Mortierella sp., Rhizopus sp., Laetiporus sp., Daedaela sp., Flamulina sp., Penicullium sp.*(Juhasz *et al.,* 2000; Berry y Brigmon, 2006).

Se ha reportado a *Stenotrophomonas maltophilia* como degradadora de hidrocarburos de bajo peso molecular, por su naturaleza hidrocarbonoclasta y actividad lipolítica (Cervantes-Gonzalez *et al.,* 2013), pero aún no se ha establecido un proceso de biorremediación utilizando ésta bacteria. Por lo que el presente trabajo se enfocará en establecer un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos utilizando *Stenotrophomonas maltophilia,* así como la evaluación de su efectividad en un suelo nativo y un suelo modelo.

2 ANTECEDENTES

El petróleo es un recurso natural no renovable que tiene una composición diversa, que determina sus características y calidad, por lo cual el Instituto Americano del Petróleo (API, por sus siglas en inglés) los clasifica en extrapesado, pesado, mediano, ligero y superligero. La composición del petróleo depende del porcentaje de los compuestos como: carbono 84-87%; hidrógeno 11-14%; azufre 0-8%; oxígeno, nitrógeno y metales pesados 0-4%; se divide en cuatro tipos principales de hidrocarburos (Viñas, 2005):

a) Saturados: Conocidos también como parafinas, alcanos o metanos, son los más abundantes en el petróleo. Se subdividen en alifáticos y acíclicos.
b) Aromáticos: Compuestos por uno o más anillos del benceno, se conocen monoaromáticos, diaromáticos y aromáticos policíclicos, están presentes tanto en el crudo como en sus derivados, es común encontrarlos en sitios contaminados por derrames.
c) Resinas. Fracción del crudo constituido por agregados de anillos aromáticos fusionados entre sí, se encuentran en una fase de transición entre el crudo y los asfaltenos.
d) Asfaltenos: Moléculas de elevado peso molecular que se encuentran en dispersión coloidal en el crudo.

El diésel o gasoil es una mezcla de hidrocarburos de composición química no definida en la que predominan cadenas de n-alcanos de entre 11 y 22 átomos de carbono además de alquenos y aromáticos. El uso principal de diésel producido en México es para uso automotriz, industrial y marino (Rodríguez *et al.,* 2006). Debido a sus características el diésel se ha utilizado como hidrocarburo modelo en estudios de biorremediación (Nikakhtari *et al.,* 2009; Sanscartier *et al.,* 2011).

2.1 Degradación de hidrocarburos por microorganismos

La degradación de los hidrocarburos por microorganismos se basa en su capacidad de aceptar como sustrato sustancias orgánicas para transformarlas en compuestos menos tóxicos, o inocuos y/o eliminarlos de forma total produciendo CO_2, agua y biomasa microbiana. El resultado del proceso de biorremediación depende de las características de la población microbiana (biomasa, actividad enzimática, diversidad de la población, tipo de metabolismo), características del sitio (nutrientes, donadores y receptores de electrones, condiciones ambientales inhibidoras, pH, temperatura, etc.) y características del sustrato (estructura química del contaminante, toxicidad, solubilidad y concentración del contaminante). Estos factores determinan si es necesario un periodo de aclimatación del microorganismo y son indicadores del mecanismo de degradación

del contaminante y si éste servirá como sustrato primario, secundario o co-metabólico (Boopathy, 2000; Solanas, 2009).

Dependiendo de la complejidad de cada fracción del petróleo crudo, es la facilidad de degradación que poseen los microorganismos. Al derramarse en el suelo los hidrocarburos inician procesos fisicoquímicos que al ser lentos, aumentan su toxicidad. Debido a su alta salinidad su tratamiento es complicado, pues los microorganismos utilizados mueren por deshidratación al no metabolizarlas (De Mesa *et al*., 2006). Es importante mencionar que los microorganismos pueden degradar los hidrocarburos, utilizándolos como fuente única de alimento, o bien mediante el co-metabolismo: pueden alimentarse de otras moléculas como azúcares y proteínas y al mismo tiempo, de los hidrocarburos presentes en el medio (Solanas, 2009).

De acuerdo con estudios realizados, algunos microorganismos aislados de suelos en donde ha ocurrido un derrame, independientemente del tiempo que lleve contaminado el sitio, son degradadores de petróleo (Del Carmen Rivera *et al*., 2002). Los hidrocarburos en el medio ambiente son degradados principalmente por bacterias y hongos que poseen la capacidad peroxidasa y oxigenasa que facilitan la degradación de los mismos mediante ataques secundarios (Rich *et al*., 2003).

Se han realizado diversos estudios de degradación de hidrocarburos usando cepas bacterianas, por ejemplo en su estudio de degradación de n-alcanos Hasanuzzaman *et al.* (2007) obtuvieron porcentajes de degradación del 51% usando una cepa de *Pseudomonas aeruginosa.* Otros estudios reportan valores de degradación de n-alcanos e hidrocarburos policíclicos superiores al 70% utilizando cepas de *Exiguobacterium aurantiacum, Burkholderia cepacia, Sphingobium indicum, Sphingobium japonicum, Staphylococcus lentus, Pseudomonas fluorescens, Acinetobacter calcoaceticus, Acidovorax delafieldii, Klebsiella, Bacillus, Enterobacter, Streptomycesy, Stenotrophomonas maltophilia* (Khoury *et al.,* 1992; Juhasz *et al.,* 2000; Berry y Brigmon*,* 2006; Moliterni *et al.,* 2012).

2.1.1 Degradación de hidrocarburos por *Stenotrophomonas maltophilia*

El género *Stenotrophomonas* se encuentra presente en todo el medio ambiente, dentro de estas la especie más predominante es *Stenotrophomonas maltophilia,* presenta gran versatilidad ya que tiene actividad simbiótica con plantas, posee una capacidad intrínseca de resistencia a los metales y degrada contaminantes de bajo y alto peso molecular por su capacidad de metabolizar compuestos presentes en la rizósfera (Vallejo *et al.,* 2007; Ryan *et al.,* 2009). Es una bacteria Gram

negativo, y como tal, posee una membrana externa adicional que le permite impermeabilizar a la célula, intercambiar sustancias con el medio y producir proteínas específicas y surfactantes para degradar compuestos (Lazaroaie, 2010; Singh *et al*., 2015).

Stenotrophomonas maltophilia es la primer especie Gram negativa reportada por poseer la capacidad de crecer utilizando pireno como única fuente de carbono, sin embargo, *S. maltophilia* no puede iniciar su crecimiento en medios con hidrocarburos de alto peso molecular, por lo que es necesario inocular una carga grande de microorganismos adultos en medios con éstas características (Juhasz, 1998).

Boonchan *et al.* (1988) aisló una cepa de *S. maltophilia* de un suelo contaminado con hidrocarburos de alto peso molecular y observó que la bacteria, en consorcio con otras bacterias y hongos, degrada el 53% de benzo a pireno en un lapso de 49 días. De acuerdo con Zafra *et al.* (2014), *S. maltophilia* tolera concentraciones de 2000 mg de HAP/l sin presentar inhibición en su crecimiento. Salek *et al.* (2013) realizó estudios de degradación de hidrocarburos con *S. maltophilia* utilizando tensoactivos y obtuvo valores de remoción del 45%. Por lo que se puede deducir que es un organismo con potencial para la recuperación de espacios contaminados con hidrocarburos.

Por lo anteriormente expuesto el presente trabajo tiene como objetivo, establecer un proceso de biorremediación usando *Stenotrophomonas maltophilia,* mediante la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento, así como la influencia de la presencia de hidrocarburos en sus parámetros de crecimiento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la efectividad de la biorremediación en muestras de suelo nativo y un suelo modelo usando *Stenotrophomonas maltophilia*, a nivel laboratorio y mediante una prueba piloto de campo utilizando la técnica de bioaumentación.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar las condiciones óptimas de crecimiento de *S. maltophilia*: nutrientes, temperatura, pH, oxígeno, agitación.

- Evaluar la influencia de hidrocarburos sobre los parámetros de crecimiento: velocidad especifica de crecimiento y tiempo de duplicación.

- Determinar el porcentaje de degradación de hidrocarburos por *S. maltophilia* en muestras de suelo nativo y suelo modelo, con diferentes tratamientos.

- Evaluar la efectividad de cada tratamiento para el establecimiento del proceso de biorremediación.

4 HIPÓTESIS

El establecimiento de las condiciones óptimas de crecimiento de *S. maltophilia* permitirá producir intensivamente la cepa para su aplicación en campo.

El mejor tratamiento de remoción de hidrocarburos será el de biorreactor en tanque agitado a cielo abierto ya que este sistema proporcionará un mejor mezclado de componentes.

Se obtendrán mejores resultados de remoción en las muestras de suelo modelo debido a la menor complejidad estructural del suelo.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

La cepa de *S. maltophilia* fue aislada de un suelo contaminado con hidrocarburos, procedente de las tarquinas-PEMEX de Tuxpan, Veracruz. La bacteria fue identificada taxonómicamente mediante la secuenciación de los espaciadores internos transcritos y/o dominios D1/D2 del gen ITS y 16S del ADNr realizada en el centro de Biotecnología Genómica del IPN, Reynosa, Tamaulipas. La cepa se mantiene en refrigeración en medio agar/peptona/glucosa, en el Centro de Investigación de Alimentos y Ambiental del Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache.

5.2 Diseño experimental

5.2.1 Condiciones óptimas de crecimiento

Para la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento se montaron once tratamientos secuenciales por triplicado (Figura 1). Los tratamientos partieron de la evaluación del crecimiento de *S. maltophilia* a cuatro diferentes temperaturas (T_1 a T_4). En cada tratamiento se evaluó el aumento de biomasa y se eligió el que proporcionara mayor concentración de la cepa. Posteriormente, se evaluó el

crecimiento a diferentes velocidades de agitación y se eligió aquella que proporcionara mayor concentración de biomasa (A_1 a A_3). A continuación se evaluó el crecimiento de la cepa combinando la temperatura y velocidad de agitación seleccionadas con dos valores de pH (pH_1 y pH_2) y se eligió el valor en que se obtuvo mayor cantidad de biomasa. Finalmente, los valores de temperatura, velocidad de agitación y pH elegidos se combinaron con dos valores de aireación (Ar_1 y Ar_2) y se eligió la combinación en la que existió mayor cantidad de biomasa.

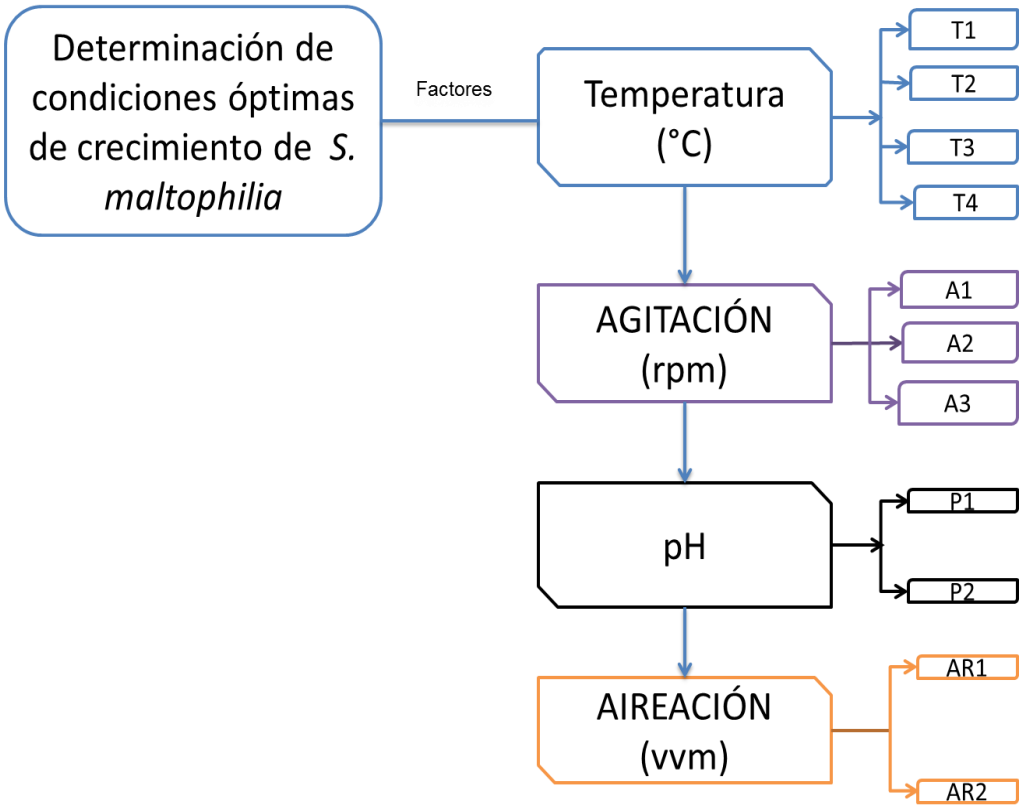

Figura 1. Diseño experimental para la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de *S. maltophilia*.

5.2.2 Evaluación de la efectividad de la capacidad biorremediadora de *S. maltophilia*

Para la evaluación de la efectividad de biorremeciación de *S. maltophilia* se evaluaron dos grupos de muestras. El primer grupo de muestras, provenientes de un suelo nativo, fueron sometidas a tratamientos en frascos de vidrio y en biorreactor de tanque agitado a cielo abierto (BTACA). El segundo grupo, compuesto por muestras de un suelo modelo, se sometieron a tratamientos en frascos de vidrio, en BTACA y en pileta. Cada tratamiento se evaluó por triplicado (Fig. 2).

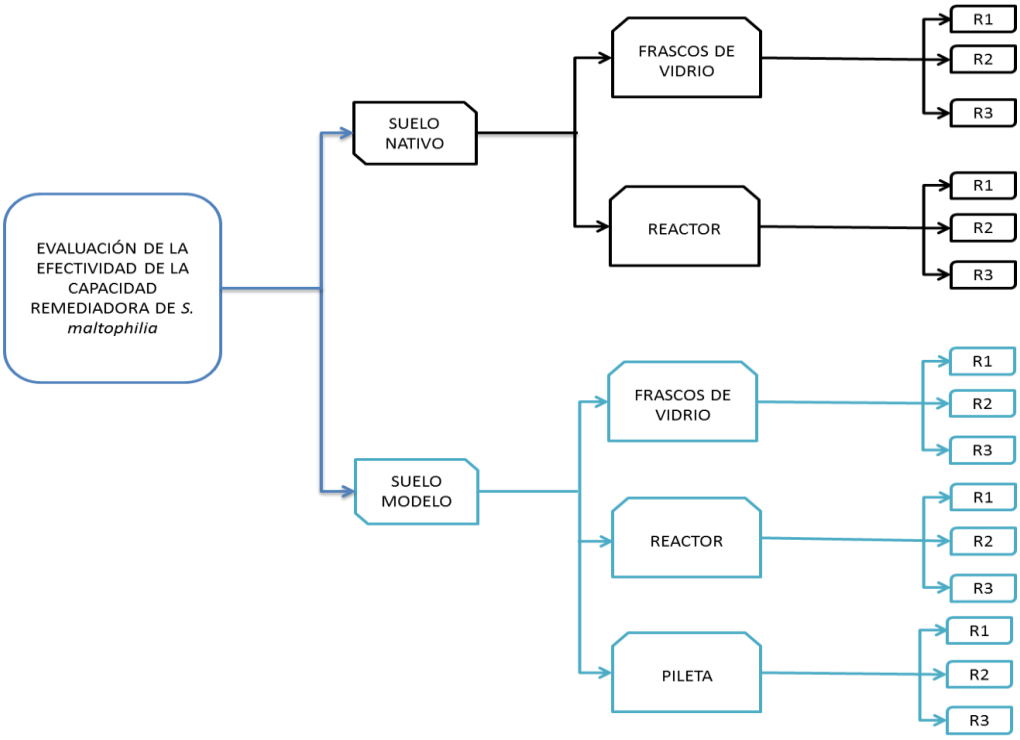

Figura 2. Diseño experimental para la evaluación de la capacidad biorremediadora de *S. maltophilia*.

Los tratamientos para el crecimiento celular, la determinación de parámetros de crecimiento, evaluación de la influencia de los hidrocarburos en los parámetros de crecimiento y la efectividad de la capacidad biorremediadora de *S. maltophilia* se realizaron en el Centro de Investigación de Alimentos y Ambiental del Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache. Los análisis cromatográficos de los tratamientos de evaluación de la capacidad biorremediadora se realizaron en el laboratorio del Instituto Tecnológico de Toluca.

5.3 Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de *S. maltophilia*

Para reactivar el crecimiento del microorganismo la bacteria se inoculó en 300 ml de medio de agar y glucosa. Previa esterilización, los tres matraces inoculados se incubaron con agitación magnética a 30° C durante 48 h, con una agitación de 60 rpm (Chaires *et al*., 2012).

Con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de crecimiento se llevaron a cabo fermentaciones en un biorreactor con capacidad de 10 L, trabajando a volumen de 7 L. El fermentador trabajó con medio esterilizado a 121° C, con una aireación de 1 - 2 vvm, temperatura de 24 a 36° C, pH 4 - 5 y velocidad de

agitación de entre 70 - 280 rpm. El biorreactor se inoculó con una biomasa de 0.08g/L obtenida de la fermentación en los matraces.

5.4 Métodos de análisis

Se recolectaron muestras de la fermentación realizada en los matraces durante 48 h a intervalos de 2 h para su análisis. Los azúcares se determinaron por el método del Ácido Dinitro Salicílico (DNS) (Miller, 1959). Se determinó la desviación óptica, usando un espectrofotómetro UV/VIS (Cecil CE 100-series, Aquarius Inc., London, UK). Las variables cinéticas se estudiaron de acuerdo al procedimiento de Pirt (1975). Se evaluó la velocidad específica de crecimiento μ (h-1), el coeficiente de rendimiento celular (Yx/s), el coeficiente de rendimiento del sustrato (Ys/x), el tiempo de duplicación (Td), la constante de utilización de sustrato (qs) y la velocidad específica de formación de células (qx).

5.5 Evaluación del efecto de hidrocarburos en parámetros de crecimiento de *S. maltophilia*

El inóculo se preparó en matraces Erlenmeyer de 125 ml utilizando 25 ml de medio con glucosa-peptona y pH 6.5 y se evaluó la influencia de los hidrocarburos

en el crecimiento de la bacteria en tres tratamientos diferentes: el primer tratamiento contenía diésel como fuente de carbono, el segundo contenía diésel y glucosa como fuentes de carbono. El tercer tratamiento contenía peptona y glucosa como fuente de carbono y, después de 20 h de crecimiento, se adicionó diésel.

Posteriormente se evaluaron nuevamente los parámetros de crecimiento velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}) y tiempo de duplicación (Td)

5.6 Degradación de hidrocarburos en suelo nativo

5.6.1 Tratamiento en frascos

Se inocularon 50 ml de la cepa de *Stenotrophomonas maltophilia* en 100g de suelo nativo contaminado con hidrocarburos en botellas de vidrio de 500 ml cerradas y se incubó a 28°C y 140 rpm durante 90 días, las botellas se reinocularon a los 45 días de tratamiento.

5.6.2 Tratamiento en BTACA

Se llevaron a cabo tres ensayos trabajando con muestras de 200 g de suelo nativo contaminado con hidrocarburos y 100 ml de la cepa de *Stenotrophomonas*

maltophilia en BTACA*;* la muestra se mantuvo en agitación constante a 170 rpm a temperatura ambiente, se reinoculó a los 45 días de tratamiento y a los 90 días de tratamiento se evaluó la capacidad de *S. maltophilia* para degradar hidrocarburos, mediante análisis cromatográfico.

5.7 Degradación de hidrocarburos en un suelo modelo

5.7.1 Tratamiento en frascos

Se inocularon 50 ml de la cepa de *Stenotrophomonas maltophilia* en 100g de suelo nativo contaminado con hidrocarburos en botellas de vidrio de 500 ml cerradas y se incubó a 28°C y 140rpm durante 90 días, las botellas se reinocularon a los 45 días de tratamiento.

5.7.2 Tratamiento en BTACA

Se llevaron a cabo tres ensayos trabajando con muestras de 200 g de suelo modelo contaminado con hidrocarburos y 100 ml de la cepa de *Stenotrophomonas maltophilia,* la muestra se mantuvo en agitación constante a 170 rpm a temperatura ambiente, se reinoculó a los 45 días de tratamiento y a los 90 días de tratamiento se evaluó la capacidad de *S. maltophilia* para degradar hidrocarburos, mediante análisis cromatográfico.

5.7.3 Prueba piloto en campo

Se realizó una prueba piloto en campo, mediante la inoculación de 1.198×10^{-3}g de la cepa de *Stenotrophomonas maltophilia* por cada 100g de suelo modelo contaminado con un hidrocarburo prueba (diésel). El suelo inoculado se depositó una pileta de 205 cm^3 de capacidad y se reiniculó con la cepa cada 20 días.

5.8 Análisis cromatográfico

La degradación de combustóleo se determinó a los 90 días, mediante extracción y cuantificación de hidrocarburos de dos muestras compuestas de suelo de cada tratamiento. La extracción se realizó con diclorometano mediante agitación mecánica (Schwab *et al.,* 1999) usando el método modificado EPA 8270B SW-846 (USEPA, 1986; Louchouarn *et al*., 2000). Los extractos se concentraron por evaporación del solvente, recolectando una alícuota final de 1 ml para su análisis cualitativo con GC-MS en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard GCD PLUS G1800-B y una columna capilar HP-5 (5%-fenil)-metilpolisiloxano (30 m; 0.25 mm i.d.; 0.25 µm espesor de película). Cada componente se identificó con base en su tiempo de retención y por la búsqueda y comparación de su espectro de masas (70 eV) en la biblioteca del HP-Chemstation-NIST MS, versión A.00.00-1995.

5.9 Análisis estadísticos

Se verificaron las medias y la desviación estándar de los parámetros de crecimiento y de las tres repeticiones realizadas a los ensayos de capacidad degradadora de hidrocarburos de *S. maltophilia*. Adicionalmente se verificó la existencia de interacciones entre los tratamientos y las fracciones de hidrocarburos, mediante un modelo lineal general (GML), siendo la variable de respuesta el porcentaje de degradación de hidrocarburos, y las variables independientes los tratamientos. Los datos se analizaron con el test ANOVA y comparación de medias por Tukey usando el software MINITAB (Minitab 16.1.0)

6 RESULTADOS

6.1 Condiciones óptimas de crecimiento

Al realizar el análisis estadístico ANOVA del factor temperatura se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (F = 5.85, P = 0.002), La mayor biomasa se obtuvo en el tratamiento a 24° C. (Figura 3a). A continuación al analizar la combinación de dicha temperatura con el factor agitación el estadístico indicó la existencia de diferencias significativas entre tratamientos (F = 9.10, P = 0.001), se obtuvo mayor densidad de células con una agitación de 70 rpm (Figura 3b).

Los resultados del ANOVA para el factor pH (Figura 3c) no muestra diferencias significativas (F=0.09, P = 0.771) por lo que se eligió el tratamiento que proporcionó mayor cantidad de biomasa (pH = 5). Por último, para el factor aireación, el resultado de la prueba de Tukey tampoco indicó diferencias significativas entre los tratamientos con dos diferentes valores de aireación (p = 0.564), como se observa en la figura 3 d), por lo que se eligió el tratamiento en el que se obtuvo mayor biomasa (24° C, 70 rpm, pH 5 y 2 vvm). Así mismo, en tales condiciones, el tiempo de duplicación (Td) fue menor y la velocidad específica de crecimiento (μ) mayor (Cuadro 1).

Adicionalmente se estimaron valores de algunos parámetros cinéticos partiendo de que en 24 h las células consumen 32.28 g/l de azúcar. Conociendo éste dato y la biomasa producida (53.6 g/l) se calculó el rendimiento celular $Y_{x/s}$ (1.66 g cel.g substrato^{-1}), el rendimiento del sustrato $Y_{s/x}$ (0.602 g substrato.g cel^{-1}), así como la constante de utilización de sustrato q_s (32.38 g.g cel^{-1}.h^{-2}) y la velocidad específica de formación de células q_x (88.97 g cel.l^{-1}.h^{-2})

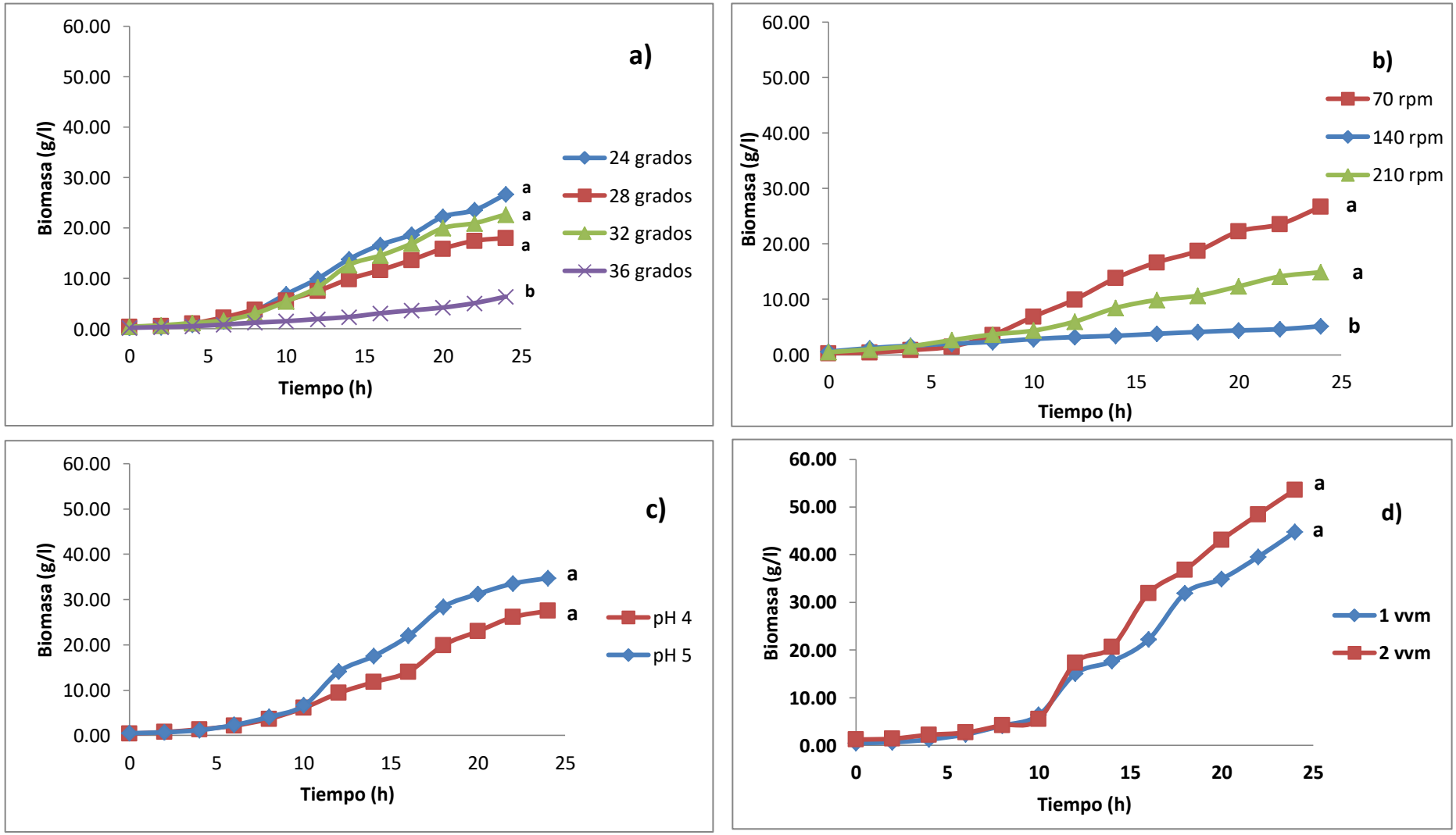

Figura 3. Crecimiento de *S. maltophilia* a diferentes condiciones. a) Temperatura b) Velocidad de agitación (a 24°C) c) pH (a 24°C y 70 rpm) d) Aireación (a 24°C, 70 rpm y pH 5). Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Cuadro 1. Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación de *S. maltophilia.*

Condiciones	T °C	Velocidad de crecimiento μ (h^{-1})	Tiempo de duplicación Td (h)
	24	0.143 ± 0.008 a	4.86 ± 0.297 b
	28	0.1312 ± 0.058 a	6.95 ± 3.932 b
	32	0.1494 ± 0.00 a	4.63 ± 0.000 b
	36	0.1076 ± 0.028 b	6.84 ± 1.539 b
	Velocidad de Agitación (rpm)		
24° C	70	0.1409 ± 0.000 b	4.91 ± 0.000 a
	140	0.0472 ± 0.013 a	16.06 ± 5.227 b
	210	0.1018 ± 0.026 b	7.23 ± 1.685 b
	pH		
24° C; 70 rpm	4	0.1388 ±0.000 a	4.99 ± 0.000 b
	5	0.1493 ± 0.000 a	4.64 ± 0.000 b
	Aireación (vvm)		
24° C; 70 rpm; pH 5	1	0.162 ± 0.000 a	4.27 ± 0.000 b
	2	0.1728 ± 0.003 a	4.01 ± 0.063 b

Medias con letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, 0.05).

6.2 Efecto de hidrocarburos en los parámetros de crecimiento de *S. maltophilia*

En el cuadro 2 se evidencia el efecto de la adición de hidrocarburos del diésel sobre los parámetros de crecimiento (μ y Td) de *S. maltophilia.* Se puede observar el efecto negativo de los hidrocarburos sobre la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación, cuando el diésel fue adicionado desde el inicio del cultivo. Sin embargo, se demostró que *S. maltophilia* puede sobrevivir en un medio teniendo como única fuente de carbono a los hidrocarburos. Por otro lado, también se evidenció que *S. maltophilia* incrementó la producción de biomasa cuando se adicionó diésel a las 20 h de cultivo.

Cuadro 2. Influencia de los hidrocarburos en los parámetros de crecimiento de *S. maltophilia*

Parámetro cinético	μ (h^{-1})	Td (h)
Diésel/Peptona	0.09	7.7
Diésel al inicio/glucosa/peptona	0.13	5.33
Diésel a 20 h de crecimiento	0.17	4.07

6.3 Evaluación de la efectividad de remediación en suelo nativo

La efectividad de remediación de *S. maltophilia* del suelo nativo presentó variaciones estadísticamente significativas ($F_{0.05,1,28}$ = 34.03, P < 0.05) entre el tratamiento en frascos y en biorreactor de tanque agitado a cielo abierto (BTACA). Se observa mayor remoción con el tratamiento en BTACA, ya que en todas las fracciones supera el 50%, mientras que el tratamiento en frascos alcanza un máximo de 67% y no muestra actividad de remoción en la fracción de los hexadecanos (Figura 4). Por otro lado, el análisis de interacción entre tratamientos y fracciones ($F_{0.05,4,24}$ = 3.79, P = 0.019) indica la existencia de diferencias significativas entre los tres tratamientos, así mismo confirma que en todas las fracciones en el tratamiento en BTACA se obtienen mayores resultados de remoción (Figura 5). En cuanto a las fracciones, los valores del estadístico muestran variaciones estadísticamente significativas entre sí ($F_{0.05,4,24}$ = 10.72, P < 0.05) .

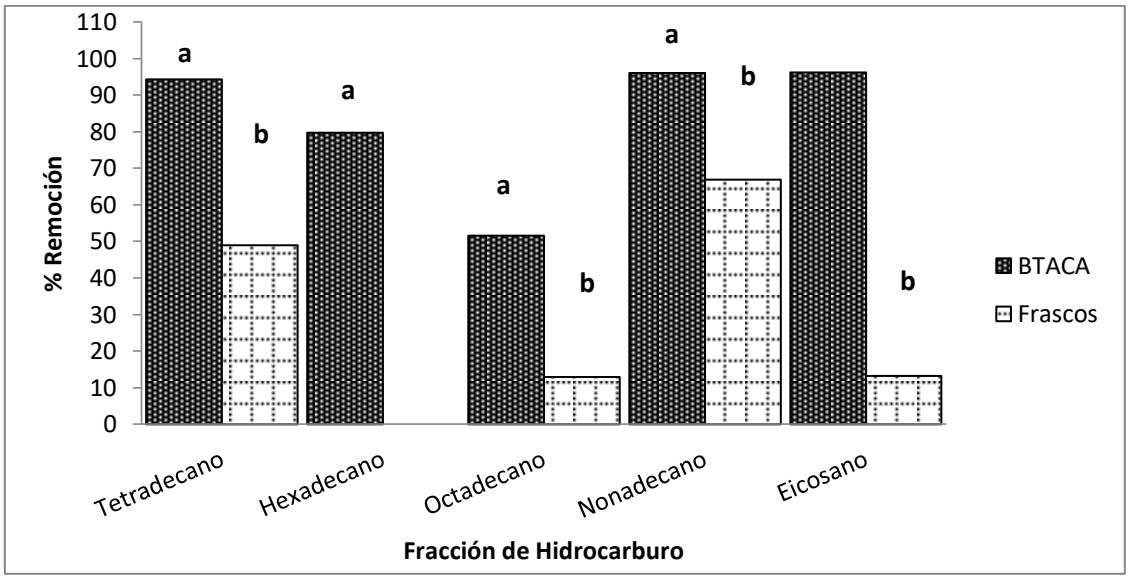

Figura 4. Capacidad de remoción de *S. maltophilia* con dos diferentes tratamientos en muestras de suelo nativo. Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

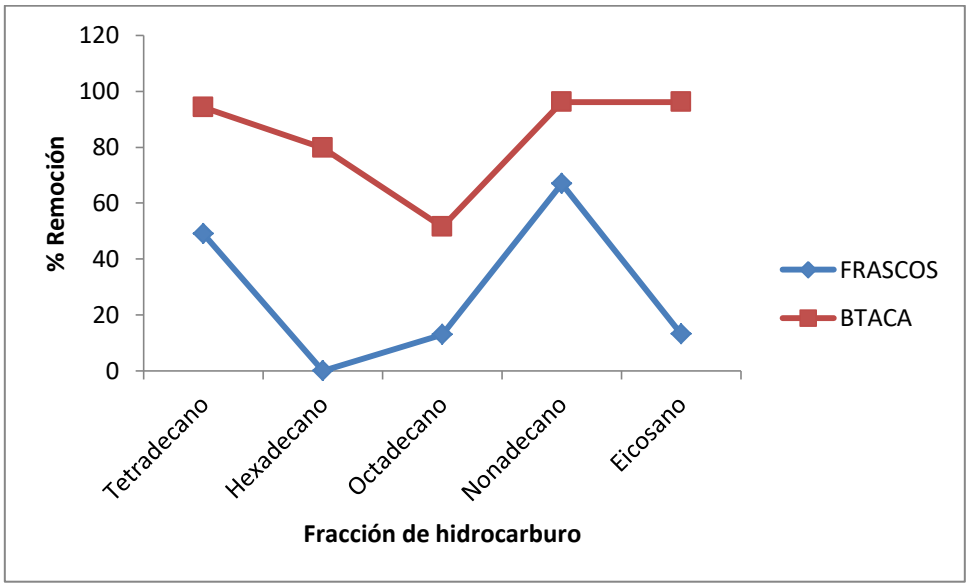

Figura 5. Interacciones entre tratamientos y fracciones en el proceso de biorremediación del suelo nativo usando *S. maltophilia.*

6.4 Evaluación de la efectividad de remediación en suelo modelo

En la figura 6 se muestran los valores de remoción de hidrocarburos por *S. maltophilia* alcanzados en los tratamientos en frascos, BTACA y pileta, se observa que el mejor tratamiento fue el de BTACA ya que alcanzó valores de hasta 95.2%, seguido del tratamiento en frascos con 92.4%. En el tratamiento en pileta el valor máximo fue del 76.8% para la fracción de los tetradecanos, también se encontró efecto en las fracciones de dodecanos y hexacosanos, fracciones en las que los otros tratamientos no tuvieron actividad.

Al realizar el análisis estadístico (ANOVA) se determinó que existen diferencias significativas ($F_{0.05,2,78}$ = 6.26, P = 0.003) entre tratamientos. Con base en la prueba de Tukey se determinó que los tratamientos en frascos y en pileta presentan un porcentaje de remoción estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) El análisis de interacciones muestra diferencias significativas ($F_{0.05,2,54}$ = 10.65, $P < 0.05$) en la actividad de los tratamientos sobre cada fracción. (Figura 7). En cuanto a las fracciones, el análisis muestra diferencias significativas entre sí $F_{0.05,2,54}$ = 9.78, P = 0.000). En conjunto, el tratamiento en frascos obtuvo mayores resultados de remoción seguido del tratamiento en BTACA y por último el tratamiento en pileta.

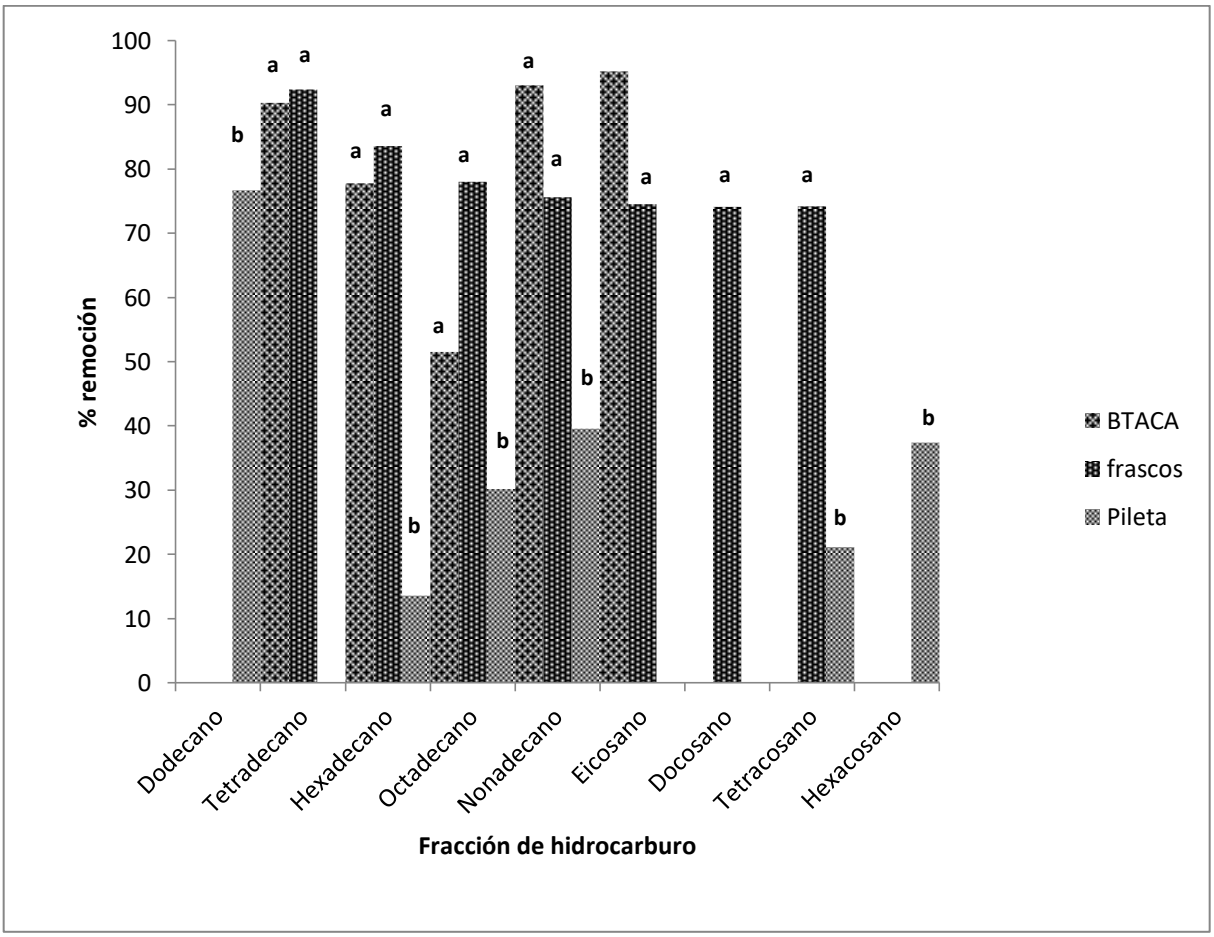

Figura 6. Capacidad biorremediadora de *S. maltophilia* en tres tratamientos diferentes para muestras de suelo modelo. Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

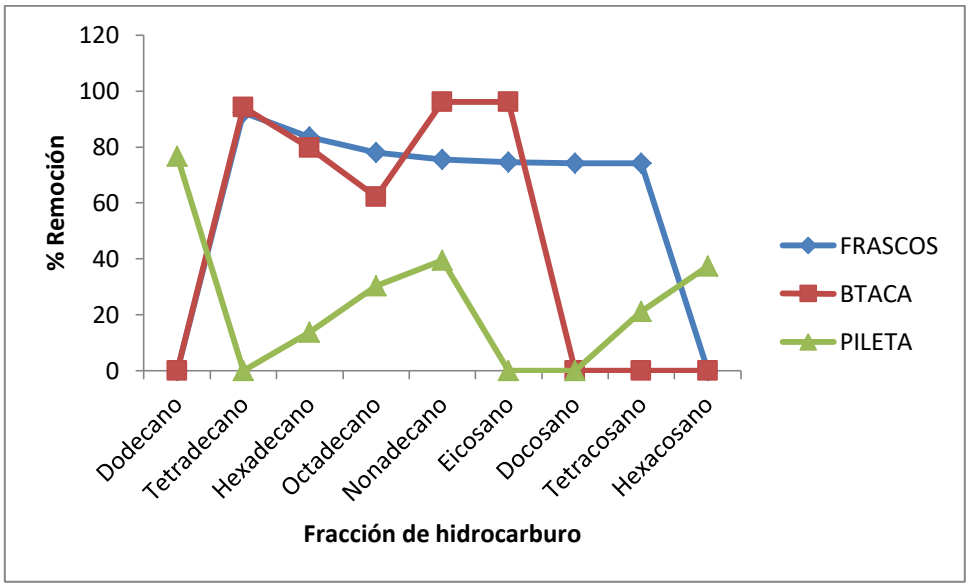

Figura 7. Interacciones entre tratamientos y fracciones en el proceso de biorremediación del suelo modelo usando *S. maltophilia.*

7 DISCUSIÓN

Stenotrophomonas maltophilia es una especie identificada con la capacidad de degradar hidrocarburos (Lee *et al.,* 2002; Juhasz *et al.,* 2000), por lo cual, en el presente estudio se establecieron sus condiciones óptimas de crecimiento en laboratorio y se obtuvo una eficiencia en la producción de biomasa más alta que la reportada en estudios similares (Vazquez *et al.,* 2005; Oves *et al.*, 2013; Tebyanian *et al.,* 2013). Así mismo, se realizaron pruebas de remoción de hidrocarburos por *S. maltophilia* en muestras de dos tipos de suelo con tres diferentes tratamientos.

7.1 Determinación de las condiciones óptimas de crecimiento de *S. maltophilia*

Un factor de éxito en la técnica de biorremediación por bioaumentación es obtener la mayor densidad de biomasa microbiana posible (Bhalerao, 2012). En el presente trabajo se establecieron las condiciones óptimas de crecimiento de *S. maltophilia* a nivel laboratorio. Se produjo mayor cantidad de biomasa a 24° C, 70 rpm, pH 5 y 2 vvm, en comparación con la reportada por Vazquez *et al.* (2005), que obtuvo una biomasa de 2.4 gl^{-1}, al inocular la cepa de *S. maltophilia* en caldo nutritivo suplementado con $CaCl_2.2H_2O$ a 24° C y 240 rpm, o la reportada por Oves *et al*. (2013) y Tebyanian *et al.* (2013), quienes obtuvieron valores que van de 4 a 6 gl^{-1} al combinar diferentes valores de pH (2 – 12), temperatura (30 – 37° C) y agitación (120 - 180 rpm). Ésta mejora en el volumen de producción de

biomasa de la bacteria en el presente trabajo, puede atribuirse al control de la aireación en biorreactor de tanque agitado, que no se realizó en los trabajos anteriormente citados.

En cuanto a las variables cinéticas, a las condiciones de crecimiento establecidas en éste estudio, se obtuvo una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.17 h^{-1}, similar a la reportada en estudios de crecimiento de consorcios microbianos a 26° C y 50 rpm (Moliterni *et al.,* 2012), pero menor que la reportada por Vazquez *et al.* (2005), que obtuvo una μ con valor de 0.78 h^{-1}. En el presente estudio *S. maltophilia* tiende a aumentar su velocidad específica de crecimiento (μ) y disminuir tiempo de duplicación (Td), y viceversa, cuando aumenta su tiempo de duplicación (Td), disminuye su velocidad específica de crecimiento (μ) (ver cuadro 1), lo cual se debe a la relación inversa entre los parámetros citados .

Por otro lado, en éste trabajo se obtuvo un tiempo de duplicación (Td) dentro del intervalo (3 – 19 h) reportado por otros autores para microorganismos degradadores de hidrocarburos (Rivera *et al.,* 2002; Willison, 2004; Marcon *et al.* 2007). En cuanto a los cocientes metabólicos se obtuvieron resultados que superan en un 70 % los reportados en estudios de cinética de crecimiento en consorcios microbianos degradadores de hidrocarburos (Khoury *et al.,* 1992*;* Binks *et al*., 1995; Chen *et al.,* 2011*;* Bhattacharya *et al*., 2015). Por lo tanto, se deduce que las condiciones de crecimiento establecidas en el presente estudio son las óptimas.

7.2 Influencia de hidrocarburos sobre los parámetros de crecimiento.

El aumento en la biomasa está fuertemente influido por la presencia inicial de hidrocarburos, ya que el volumen de biomasa de *S. maltophilia* disminuyó drásticamente si se inoculaba para iniciar el crecimiento en el medio con diésel. Así mismo, se observó un efecto negativo sobre la µ y aumento desfavorable del Td, mientras que si se inoculaba una población más madura al medio con diésel, la concentración de biomasa aumentaba significativamente y por consiguiente los parámetros cinéticos tomaron valores favorables, lo cual puede atribuirse a la sensibilidad de *S. maltophilia* a los hidrocarburos en su etapa inicial de crecimiento (Juhasz *et. al.* 2002, Willison, 2004; Marcon *et al.* 2007), sin embargo, éstos datos coinciden con el comportamiento reportado es estudios de degradación de n-alcanos presentes en diésel con cepas de otras especies (Mohanty y Mukherji, 2008; Moliterni *et al.* 2012).

7.3 Efectividad de la biorremediación con *S. maltophilia* mediante la aplicación en un suelo nativo y un suelo modelo

Se ha reportado la capacidad de *S. maltophilia* de degradar compuestos xenobióticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos de alto peso molecular (Juhasz *et al.*, 2000; Lee *et al.,* 2002). En éste trabajo *S. maltophilia* mostró altos

valores de degradación de hidrocarburos lineales (figuras 2 y 3), similares a los obtenidos en estudios de degradación de hidrocarburos con microorganismos (Singh *et al*., 2015; Berry y Brigmon, 2006; Juhasz y Naidu, 2000; Rich *et al*., 2003). Así mismo, los porcentajes de remoción alcanzados en éste estudio se encuentran dentro del intervalo (20 a 95 %) reportado en estudios de remoción de hidrocarburos por métodos químicos (Oprea *et al.,* 2009; Mora *et al.,* 2013).

Los resultados de remoción de hidrocarburos por *S. maltophilia* muestran variación en la degradación de las fracciones de hidrocarburos, en general presenta tendencia a degradar las fracciones de eicosano, nona y tetradecanos, lo cual puede ser atribuido a las diferencias en la facilidad de degradabilidad de cada compuesto individual (Pond *et al.,* 2002; Zytner *et al.,* 2006). Por ejemplo, autores como Mohanty *et al.* (2008) reportan que los n-alcanos más cortos son más fáciles de degradar, mientras que Hasanuzzaman *et al.* (2007) indican que las fracciones más cortas resultan tóxicas para los microorganismos, por lo que se puede inferir que el éxito en la degradación de hidrocarburos depende de la capacidad del microorganismo para metabolizar cada fracción.

S. maltophilia mostró porcentajes más altos de degradación de hidrocarburos, tanto en muestras de suelo nativo como de suelo modelo, en el tratamiento en BTACA, probablemente debido a que en éste tratamiento se promueve el intercambio de oxígeno y la homogenización del medio en el que se encuentra el microorganismo, así mismo se promueve la solubilidad de las fracciones de

hidrocarburos (Bhattacharya *et al*., 2015; AbuBakr *et al.,* 2016). Sanscartier *et al.* (2011) reporta porcentajes de remoción que van del 48 al 83% usando un biorreactor con control de temperatura y velocidad de aireación, aunque en el reactor usando en el presente estudio sólo se controló la agitación se obtuvieron porcentajes de remoción superiores (96.22%).

El tratamiento en frascos limitó la disponibilidad de oxígeno para *S. maltophilia,* lo cual afectó el metabolismo de la bacteria, ya que es un aerobio, no fermentativo (Gurjeet *et al.,* 2014) y provocó una reducción en la efectividad de remoción de hidrocarburos en ambos tipos de suelo (Figuras 4 y 6), sin embargo, aunque se obtuvieron porcentajes más bajos, tuvo actividad en más fracciones que los otros tratamientos.

En el caso del tratamiento para el suelo modelo en la pileta *S. malthopihilia* presentó bajos porcentajes de remoción de hidrocarburos (0 - 76.68%). La causa principal de la reducción en la efectividad, es que a diferencia del reactor, en la pileta no existe homogenización del medio, lo cual reduce la actividad de la bacteria confinándola a la parte superficial del suelo contaminado, esto se combina con la exposición a las variaciones de temperatura ya que de acuerdo con estudios sobre degradación de hidrocarburos por *S. maltophilia,* la cepa reduce su actividad a temperaturas superiores a 35° C (Gurjeet *et al.* 2014; Del Carmen Rivera *et al*., 2002).

Otro factor que influyó en los bajos porcentajes de remoción en el tratamiento en la pileta fue el número de reinoculaciones, Lebkowska *et al.* (2011) en su estudio de remoción de hidrocarburos por bioaumentación obtuvo porcentajes del 95% reinoculando microorganismos cada tres días lo cual aumentó la eficiencia de la biorremediación, a diferencia del presente trabajo en el que se reinoculó cada 20 días.

8 CONCLUSIONES

Las condiciones de crecimiento para *S. maltophilia* establecidas en el presente trabajo permiten obtener una densidad de biomasa nueve veces mayor que la reportada en otras investigaciones, aunque su velocidad de crecimiento (μ) es baja, por lo tanto, es factible su aplicación en la técnica de biorremediación por bioaumentación.

Para una mayor efectividad en el proceso de biorremediación utilizando *S. maltophilia,* es necesario que el inóculo sea maduro ya que la presencia de hidrocarburos al comienzo del crecimiento de la bacteria tiene un efecto negativo en el aumento de biomasa y, por lo tanto, en sus valores de μ y Td.

S. maltophilia es un microorganismo que logra altos porcentajes de remoción de hidrocarburos, y dada su naturaleza biótica, es una mejor alternativa a los tratamientos químicos.

Dado que los porcentajes más altos de remoción de hidrocarburos se obtuvo en el tratamiento en BTACA, para optimizar el proceso de remoción con *S. maltophilia* es necesario implementar un sistema de homogenización del medio que permita el intercambio de oxígeno, la disponibilidad del contaminante para la bacteria así

como la atenuación del efecto de la temperatura sobre el área a tratar. Del mismo modo, se debe establecer un sistema de reinoculación constante de *S. maltophilia*.

9 APLICACIÓN PRÁCTICA

El presente trabajo amplía el conocimiento de especies hidrocarbonoclastas, específicamente *Stenotrophomonas maltophilia,* y contribuye el establecimiento de estrategias de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Las condiciones de crecimiento de *Stenotrophomonas maltophilia* establecidas en éste estudio permiten su producción intensiva para su aplicación en la técnica de biorremediación por bioaumentación. Sin embargo, se recomienda realizar un estudio de crecimiento en medios enriquecidos con diferentes nutrientes para potencializar aún más el aumento de biomasa a una mayor velocidad específica de crecimiento.

La información obtenida sobre el comportamiento cinético de la bacteria en presencia de hidrocarburos permite establecer estrategias de remediación de suelos en campo, ya que se demostró que *S. maltophilia* produce mejores resultados de degradación si se inoculan cepas de edad adulta.

El análisis de interacciones realizado contribuye al conocimiento del comportamiento de *S. maltiphilia* en la degradación de hidrocarburos lineales, ya que presenta tendencia a degradar tetracosanos y nonadecanos tanto en tratamiento en BTACA como en frascos.

En este trabajo se demostró la capacidad biorremediadora de *Stenotrophomonas maltophilia,* por lo tanto, es factible su uso en la técnica de bioaumentación en zonas afectadas por derrames petroleros. Dado que el tratamiento de biorremediacion en que se obtuvieron porcentajes más altos fue el de BTACA y la remediación *in situ* se da en áreas extensas a cielo abierto, se recomienda implementar un sistema de labranza que promueva la homogenización del suelo afectado por el derrame y un sistema de inoculación por aspersión que distribuya la carga microbiana de forma continua.

10 BIBLIOGRAFÍA

AbuBakr, S. M., Davidova, I. A., Duncan, K. E. 2016. Test of Polyaromatic Hydrocarbon Degradation by Nitrate-reducing Microorganisms Isolated from Tallgrass Prairie Soils. In Proceedings of the Oklahoma Academy of Science (Vol. 95).

Berry, C., Brigmon, R. L. 2006. BTEX biodegradation by biosurfactant-producing bacteria. In Environmental Engineering: Proceedings of the Second National Congress of Environmental Engineering, Lublin, Poland, 4-8 (p. 445). Taylor and Francis.

Bhalerao, T. S. 2012. Bioremediation of endosulfan-contaminated soil by using bioaugmentation treatment of fungal inoculant *Aspergillus niger*. Turkish Journal of Biology. **36(5):** 561-567.

Bhattacharya, M., Guchhait, S., Biswas, D., Datta, S. 2015. Waste lubricating oil removal in a batch reactor by mixed bacterial consortium: a kinetic study. Bioprocess and biosystems engineering. **38(11):** 2095-2106

Binks, P. R., Nicklin, S., Bruce, N. C. 1995. Degradation of hexahydro-1, 3, 5-trinitro-1, 3, 5-triazine (RDX) by *Stenotrophomonas maltophilia* PB1. Applied and environmental microbiology. **61(4):** 1318-1322.

Boonchan, S., Britz, M. L., Stanley, G. A. 1998. Surfactant enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by

Stenotrophomonas maltophilia. Biotechnology and Bioengineering. **59(4):** 482-494.

Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource technology* ***74*(1):** 63-67.

Cervantes-Gonzalez, E., Salazar-Quintanilla, L. M., Díaz-Flores P. E. 2013. Lipasas Inducidas por Hidrocarburos del Petróleo. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, ***29*(2):** 9-15.

Chaires M. L., Pérez – Ramírez J., Santander- Cordova C., Del ángel Alarcón S., Hernández-Pacheco M.E., Casados-Molar J., Vargas-Reyes M.S., Jiménez-Ávalos H.A. 2012. Effect of coconut water dilution on *Saccharomyces cerevisiae* biomass production and determination of optimal growth parameters. Food Science and Food Biotechnology Essentials A contemporary perspective. *Ed. AMECA.*, 101-108.

Chen, S., Yang, L., Hu, M., Liu, J. 2011. Biodegradation of fenvalerate and 3-phenoxybenzoic acid by a novel *Stenotrophomonas sp.* strain ZS-S-01 and its use in bioremediation of contaminated soils. Applied microbiology and biotechnology. **90(2):** 755-767.

De Mesa, J. B. L., Quintero, G., Vizcaíno, A. L. G., Cáceres, D. C. J., Riaño, S. M. G., García, J. M. 2006. Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Nova. **4(5):**82-90.

del Carmen Rivera, M., Ferrera, R., Haller, V. V., Vázquez, R. R., Linares, L. F. 2002. Adaptaciónn y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petroleo crudo. Terra. **(20)** 423-434.

Del Carmen Rivera, M., Ferrera, R., Volke, V., Rodríguez, R., Fernández, L., 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. Terra Latinoamericana. **20(4):** 423-434.

Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A., Cañizares-Villanueva, R. O. 2006. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. Revista Lationoamericana de Microbiología, ***48*(2):** 179-187.

Gurjeet, P., Kothiyal, N. C., Kumar, V. 2014. Bioremediation of some polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from soil using *Sphingobium indicum, Sphingobium japonicum* and *Stenotrophomonas maltophilia* bacterial strains under aerobic conditions. Journal of Environmental Research and Development. **8(3):** 395.

Hasanuzzaman, M., Ueno, A., Ito, H., Ito, Y., Yamamoto, Y., Yumoto, I., Okuyama, H. 2007. Degradation of long-chain n-alkanes (C 36 and C 40) by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG. International biodeterioration and biodegradation. ***59*(1):** 40-43.

Juhasz, A. L., Naidu, R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo [a] pyrene. International biodeterioration and biodegradation. ***48*(1):** 57-88.

Juhasz, A. L., Stanley, G. A., Britz, M. L. 2002. Metabolite repression inhibits degradation of benzo [a] pyrene and dibenz [a, h] anthracene by *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,003. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. **28(2):** 88-96.

Juhasz, A. L.1998. Microbial degradation of hig molecular weight polycyclic aromatic. Doctoral thesis. Victoria University of Technology. Melbourne, Australia.

Khoury, N., Dott, W., Kämpfer, P. 1992. Anaerobic degradation of phenol in batch and continuous cultures by a denitrifying bacterial consortium. Applied microbiology and biotechnology. **37(4):** 524-528.

Lazaroaie, M. M. 2010. Multiple responses of gram-positive and gram-negative bacteria to mixture of hydrocarbons. Brazilian Journal of Microbiology, **41(3):** 649-667.

Lebkowska, M., Zborowska, E., Karwowska, E., Miaskiewicz-Peska, E., Muszynski, A., Tabernacka, A., Jeczalik, M. 2011. Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: field-scale processes in Poland. Ecological Engineering. ***37*(11):** 1895-1900.

Lee, E. Y., Jun, Y. S., Cho, K. S., Ryu, H. W. 2002. Degradation characteristics of toluene, benzene, ethylbenzene, and xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. Journal of the Air Waste Management Association. ***52*(4):** 400-406.

Loya del Ángel, D. I. 2013. Tecnologías para la restauración de suelos contaminados por hidrocarburos. Tesis de especialidad. Universidad Veracruzana, Túxpan, Ver., México.

Marcon, R., Bestetti, G., Frati, F., Pepi, M., Baldi, F. 2007. Naphthalene and biphenyl oxidation by two marine *Pseudomonas* strains isolated from Venice Lagoon sediment. International biodeterioration and biodegradation. **59(1):** 25-31.

Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. Analytical Chemestry, **31(3):** 426-428.

Minitab 16 Statistical Software (2010)[Software de ordenador]. State College, PA: Minitab, Inc. (www.minitab.com)

Mohanty, G., Mukherji, S. 2008. Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia.* International Biodeterioration and Biodegradation. **61(3):** 240-250.

Moliterni, E., Jimenez-Tusset, R. G., Rayo, M. V., Rodriguez, L., Fernandez, F. J., Villasenor, J. 2012. Kinetics of biodegradation of diesel fuel by enriched microbial consortia from polluted soils. International Journal of Environmental Science and Technology. **9(4):** 749-758.

Mora, V. C., Peluffo, M., Rosso, J. A., Del Panno, M. T., Morelli, I. 2013. Remediación de suelos contaminados con fenantreno por oxidación química: efecto de la concentración de oxidante. In *VII Congreso de Medio Ambiente*.

Nikakhtari, H., Kumar, P., Nemati, M., Hill, G. A. 2009. Physical and biological treatment of oil-contaminated soil in a baffled roller bioreactor. Bioremediation Journal. **13(3):** 130-140.

Oprea, I., Badea, A., Ziglio, G., Ragazzi, M., Andreottola, G., Ferrarese, E., Apostol, T. 2009. The remediation of contaminated sediments by chemical oxidation. *Sci. Bull.* **(*71*)** 131-142.

Oves, M., Khan, M. S., Zaidi, A., Ahmed, A. S., Ahmed, F., Ahmad, E., Azam, A. 2013. Antibacterial and cytotoxic efficacy of extracellular silver nanoparticles biofabricated from chromium reducing novel OS4 strain of *Stenotrophomonas maltophilia.* PloS one. **8(3):** 59140.

Pirt S.J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Halsted. Press Book. Wiley, N.Y., pp 182, 183.

Pond, K. L., Huang, Y., Wang, Y., Kulpa, C. F. 2002. Hydrogen isotopic composition of individual n-alkanes as an intrinsic tracer for bioremediation and source identification of petroleum contamination. Environmental science and technology. ***36*(4):** 724-728.

Rich, J. J., Heichen, R. S., Bottomley, P. J., Cromack, K., Myrold, D. D. 2003. Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soils. Applied and Environmental Microbiology. **69(10):** 5974-5982.

Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., Dow, J. M. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. Nature Reviews Microbiology. **7(7):** 514-525.

Salek, K., Zgola-Grześkowiak, A., Kaczorek, E. 2013. Modification of surface and enzymatic properties of *Achromobacter denitrificans* and *Stenotrophomonas maltophilia* in association with diesel oil biodegradation enhanced with alkyl polyglucosides. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**111**: 36-42.

Sanscartier, D., Reimer, K., Zeeb, B., Koch, I. 2011. The effect of temperature and aeration rate on bioremediation of diesel-contaminated soil in solid-phase bench-scale bioreactors. Soil and Sediment Contamination. ***20*(4):** 353-369.

Schratzberger, M., Daniel, F., Wall, C. M., Kilbride, R., Macnaughton, S. J., Boyd, S. E., Swannell, R. P. 2003. Response of estuarine meio-and macrofauna to in situ bioremediation of oil-contaminated sediment. Marine pollution bulletin. ***46*(4):** 430-443.

Schroeder, R. H. A., Rodríguez, V. I. D., Hernández, L. G. 1999. Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. Terra. ***17*(2):** 159-174.

Schwab, A. P., Su, J., Wetzel, S., Pekarek, S., Banks, M. K. 1999. Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. Environmental science and technology. **33(11):** 1940-1945.

Singh, A., Kumar, K., Pandey, A. K., Sharma, A., Singh, S. B., Kumar, K., Nain, L. 2015. Pyrene Degradation by Biosurfactant Producing Bacterium *Stenotrophomonas maltophilia.* Agricultural Research. ***4*(1):** 42-47.

Solanas A. 2009. La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. Universidad de Barcelona. Departamento de Microbiología. Barcelona.8 pp.

Tebyanian, H., Hassanshahian, M., Kariminik, A. 2013. Hexadecane-degradation by *Teskumurella* and *Stenotrophomonas* strains isolated from hydrocarbon contaminated soils. Jundishapur Journal of Microbiology. **6(7).**

Travieso, L., Sánchez, E., Borja, R., Benítez, F., León, F., Colmenarejo, M. F. 2004. Evaluation of a laboratory and full-scale microlage pond for tertiary treatment of piggery wastes. Environmental technology. **25(5):** 565-576.

Vallejo, V., Salgado, L., Roldan, F. 2007. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. Revista Colombiana de Biotecnología. **7(2):** 67-78.

Vazquez, S., Ruberto, L., Mac Cormack, W. 2005. Properties of extracellular proteases from three psychrotolerant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Antarctic soil. Polar Biology. **28(4):** 319-325.

Vela M. R. 2007. Daños ambientales en Veracruz provocados por PEMEX. El colegio de Veracruz. Xalapa, México. 78 pp.

Viñas C. M. 2005. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of experimental Botany. **52(1):** 487-511

Willison, J. C. 2004. Isolation and characterization of a novel s*phingomonad capable* of growth with chrysene as sole carbon and energy source. FEMS microbiology letters. **241(2):** 143-150.

Zafra, G., Absalón, Á. E., Cuevas, M. D. C., Cortés-Espinosa, D. V. 2014. Isolation and selection of a highly tolerant microbial consortium with potential for PAH biodegradation from heavy crude oil-contaminated soils. Water, Air, and Soil Pollution, **225(2):** 1-18.

Zytner, R. G., Salb, A. C., Stiver, W. H. 2006. Bioremediation of diesel fuel contaminated soil: comparison of individual compounds to complex mixtures. Soil and Sediment Contamination: An International Journal. ***15*(3):** 277-297.

ANEXO A

Tabla IV Distribución F; F_{α,ν_1,ν_2} para $P(F \geq F_{\alpha,\nu_1,\nu_2}) = \alpha$.

	$\alpha = 0.05$																		
$\nu_2 \backslash \nu_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0	249.1	250.1	251.1	252.2	253.3	254.3
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49	19.50
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.36
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79	1.73
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75	1.69
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25	2.20	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73	1.67
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24	2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71	1.65
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70	1.64
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35	1.25
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00

Fuente: Kuehl, R. O. R. O. 2001.Diseño de Experimentos: Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones. Thomson Learning. 666 pp.