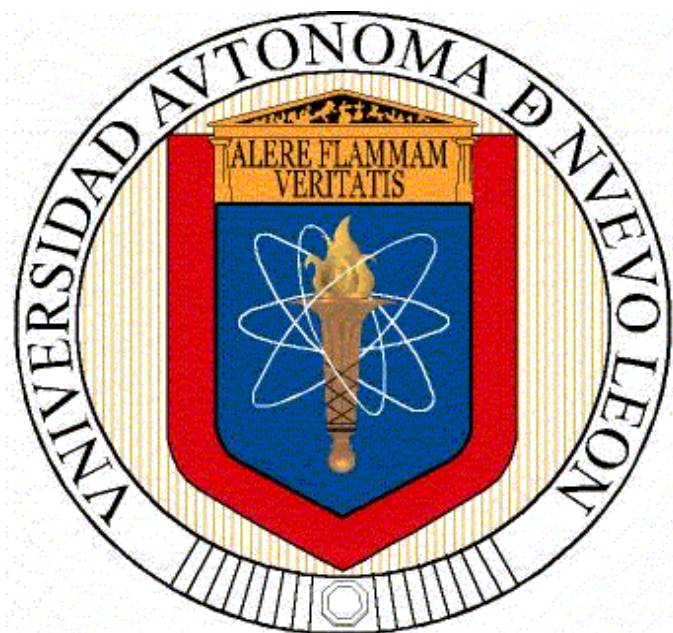


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**ESTUDIO DE LA POBLACIÓN MICROBIANA EN UN SISTEMA DE
BIORREMEDIACIÓN *IN SITU* DE UN SUELO IMPACTADO CON
HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO.**

POR

ALEJANDRO LEDEZMA VILLANUEVA

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA**

FEBRERO, 2016

COMITÉ DE TESIS

DIRECTORA

Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal

SECRETARIO

Dr. Arturo Espinoza Mata

VOCAL 1

Dra. Dvorak Montiel Condado

VOCAL 2

Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna

VOCAL 3

Dra. Yolanda Gutiérrez Puente

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	5
ABSTRACT	7
JUSTIFICACIÓN	9
ANTECEDENTES.....	11
o Actividad industrial.	11
o Propiedades físico-químicas.....	12
o Norma Oficial Mexicana 138.	13
o Biodegradabilidad.....	13
o Bioaugmentación de ambientes prístinos.	17
o Metabolismo del proceso.....	17
o Rutas catabólicas asociadas a la degradación de hidrocarburos.....	18
o Rango de géneros bacterianos capaces de romper hidrocarburos	20
o Bacterias asociadas a ectomicorrizas ayudan.	21
o Estimulación mineral en el sistema de biorremediación.	21
o Poblaciones degradadoras de hidrocarburos.....	22
o Técnicas para determinar la riqueza de la diversidad microbiana.....	24
o Caracterización de poblaciones microbianas.....	25
o Métodos para determinar los niveles de remediación de suelos.....	26
o La cuantificación de hidrocarburos.	28
o Pruebas de toxicidad aplicables.	28
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS PARTICULARES:.....	29
HIPOTESIS	30
METODOLOGIA	31
o ETAPA I.	31
□ Estrategias moleculares	31
o ETAPA II.....	34
□ Proceso de Biorremediación In Situ.....	34
o ETAPA III	37
□ Secuenciación masiva.	37
o ETAPA IV	38
□ Ensayo de fertilidad del suelo	38

RESULTADOS.....	39
o Caracterización del consorcio microbiano CMic 4	39
o Resultados Etapa II.....	43
o Resultados etapa III	49
o Resultados secuenciación masiva.....	49
o Resultados etapa IV	50
DISCUSIONES	52
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFIA.....	56
Tabla 1 Propiedades físicas de los HAP y límites máximos permisibles (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003) (Bisth et al. 2014)	12
Tabla 2 Técnicas de remediación de zonas contaminadas	13
Tabla 3 Técnicas de remediación de zonas contaminadas	14
Tabla 4 Técnicas de remediación de zonas contaminadas	15
Tabla 5 Técnicas de remediación de zonas contaminadas	16
Tabla 6 Técnicas de remediación de zonas contaminadas	16
Tabla 7 estrategias moleculares para la detección de genes catabólicos de contaminantes .	27
Tabla 8 Sonda universal de Souza et al. 2006	34
Tabla 9 Reactivo y volúmen.....	37
Tabla 10 Listado completo de géneros y especies en CMic 4.....	40
Tabla 11 listado completo de clases bacterianas encontradas en CMic 4	41
Tabla 12 Valores de la degradación de hidrocarburos	46
Tabla 13 Valores de la regresión lineal, Estos valores fueron calculados a partir de aplicar logaritmo natural (ln) en el promedio de las determinaciones y posteriormente graficarlos.	48
Tabla 14 Valores del peso de las lombrices	51
Gráfica 1 Exportaciones automotrices y petroleras.....	11
Gráfica 2 Se presentan otras clases bacterianas que también integran al consorcio pero estas no completaron un nivel de identidad superior al 90%	41
Gráfica 3 Curva de refracción de las unidades transcripcionales operacionales (OTUs)	42
Gráfica 4 biodegradación de hidrocarburos alcanzada por CMic 4	45
Gráfica 5 regresión lineal	¡Error! Marcador no definido.
Gráfica 6 Regresión lineal de los primeros 10 días	48
Gráfica 7 Desarrollo de Eisenia foetida en suelo.	50

Ilustración 1. Efecto sinérgico de rizobacterias en raíz de plantas degradando hidrocarburos aromáticos en suelo	18
Ilustración 2 Los géneros que predominan son Pseudomonas spp. (34%), Ochrobactrum spp. (28%) y Alcaligenes spp. (17%). En una pequeña cantidad (0.5%) se encuentra el Genero Bacillus spp.....	39
Ilustración 3ADN genómico.....	49
Imagen 1 Proceso de estimulación de suelo.	43
Imagen 2 Determinaciones de hidrocarburos mediante equipo Retorta.....	44
Imagen 3 proceso del ensayo de fertilidad del suelo	50

DEFINICIONES

HCP: Hidrocarburos de petróleo

HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

BPM: Bajo peso molecular.

PM: Peso molecular.

No CAS: Numero de Chemical Abstracts Service.

T°E: Temperatura de ebullición.

T°F: Temperatura de fusión.

P.V.: Presión de vapor.

Pa: Pascales.

mg/L: Miligramos por litro.

LMP: Límite máximo permisible.

A/R/I: Suelo Agrícola/suelo residencial/suelo industrial.

mg/kg: Miligramos por kilo.

ppm: Partes por millón.

BTEX : Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno

PCR: Polimerase chain reaction

pb: Pares de bases.

Oligonucleótido/sondas específicas: secuencia corta de ADN o ARN, con cincuenta pares de bases o menos.

Primer: Cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

Cluster: Grupo de genes encontrados en el ADN de un organismo.

INTRODUCCIÓN

La biorremediación involucra varias técnicas en las que se aplican diferentes componentes sobre los factores bióticos en hábitats terrestres y acuáticos que fueron contaminados con un sinnúmero de sustancias químicas. Cualquier técnica por usar, tiende a lograr la disminución a niveles técnicamente aceptables según la normatividad de cada país y con esto lo primero que se obtiene es evitar la pérdida de grandes cantidades de suelo ya que a nivel globalizado se tiende a confinar el suelo o el agua.

La biorremediación, disminuye los elevados costos que se generan al confinar pues involucra maquinaria pesada, mano de obra especializada y transporte del sitio al que recibe y confina además del trámite para determinar el tipo de contaminación y el volumen por confinar lo cual no es muy asequible a la economía y en la mayoría de los casos el sitio se abandona quedando en estado de pasivo ambiental por un tiempo indeterminado hasta que la autoridad consiga un acuerdo para su tratamiento.

El descubrimiento de la biorremediación, se basa en la observación y registro de la evaluación de hábitats contaminados. Por ejemplo citamos el cómo las plantas con sistema vascular especializado filtran e integran a su sistema hidráulico el contaminante con el cual hacen contacto, así los sitios acuáticos y sub acuáticos contaminados forman los llamados wetlands, que para nosotros serían el equivalente a un humedal o un pantano.

Otra actividad que muestra la naturaleza es la de sitios terrestres con suelos contaminados que han sido integrados a través del tiempo (más de cien años) por un proceso denominado atenuación natural donde los factores del medio natural como el viento, la humedad relativa, los rayos lumínicos y la temperatura que diariamente se presentan lograron reducir en un 25% el volumen original a su estado inicial. Estos descubrimientos se reprodujeron al laboratorio en diferentes partes del mundo con el fin de imitar el proceso natural de atenuación.

Tomando como base lo anteriormente explicado, el presente estudio profundiza en el análisis de la variación en la población de un consorcio bacteriano denominado con fines prácticos como (CMic 4) el cual fue previamente aislado de un suelo altamente contaminado (35,000 ppm) con Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) con un historial mayor a 30 años.

En la Unidad de Manipulación Genética del LMYF se llevó a cabo una pirosecuenciación en el 16s ribosomal del ADN extraído del consorcio, se caracterizaron las bacterias que lo integraban para así diseñar oligonucleótidos específicos de los principales géneros constituyentes y generar un sistema de monitoreo de la evolución del proceso *In Situ*. La técnica sirvió para visualizar su variabilidad en un proceso de bioestimulación sobre el mencionado suelo.

El proceso de pruebas en campo tuvo lugar en el sitio de confinamiento de una empresa privada dedicada al manejo, recolección y disposición final de sustancias químicas peligrosas. El suelo inoculado con el consorcio bajo condiciones de temperatura no controladas, llegó a la degradación del contaminante en solo 30 días naturales. Posteriormente al tratamiento, el suelo resultante tuvo una prueba de toxicidad y para ello se requirió como un bioindicador a la lombriz de tierra *Eisenia foetida*, obteniendo resultados satisfactorios ya que no murió y aumentó su peso.

ABSTRACT

Bioremediation involves various techniques in which different biotic factors are applied in terrestrial and aquatic habitats that were contaminated with recalcitrant chemicals. Any technique tends to achieve the decrease of the pollutants following the regulations of each country and with this avoiding the loss of large amounts of soil as the most common solution is to confine soil or water.

Bioremediation reduces high costs generated by confinement because it involves training, transportation and extensive use of heavy machinery thus resulting in a not very affordable way for the economy and in most cases the site is left behind in a state of environmental liability for an indefinite period until the authority establish an agreement for a treatment.

The discovery of bioremediation was based on the observation and recording of contaminated habitats. For example we can cite the how plants filter in their specialized vascular system contaminants which make contact with well water. Another activity that shows the nature of soils are contaminated land sites that have been integrated over time (more than a hundred years) by a process called natural attenuation where the natural environment factors such as wind, relative humidity, lightning and temperature are presented daily letting the soil to reduce its pollutants by 25% of the original volume and eventually to its initial state. These findings were reproduced in the laboratory over the world in order to mimic the natural attenuation process.

Based on the reasons explained above, the present study explores the analysis of variation in the population of a bacterial consortium called for practical purposes as CMIC 4 which was previously isolated from a highly contaminated soil (35,000 ppm) with Aromatic Hydrocarbons (PAH) for more than 30 years.

In our laboratory (LMYF) a pyrosequencing in the 16s ribosomal DNA extracted from the bacterial consortium took place integrating data in order to design specific oligonucleotides of the main genus and therefore create a system to monitor presence and growth during a *In Situ* bioremediation process. The technique was used to visualize their variability in a bio stimulation process on a different PAH polluted soil.

The process of field testing took place at the landfill site of a private company dedicated to the handling, collection and disposal of hazardous chemicals. The soil inoculated with the consortium under temperature uncontrolled reached pollutant degradation in just 30 days. Following the treatment, the resulting soil had a toxicity test where the earthworm *Eisenia fetida* was used as a bio indicator, having satisfactory results since it did not die and increased its weight.

JUSTIFICACIÓN

El creciente uso de técnicas para biorremediación que descontaminen suelos y aguas por innumerables compuestos químicos ha tenido grandes beneficios económicos para el comercio transnacional. Este oferta microorganismos modificados genéticamente de los cuales hacen uso indiscriminado y tiene nula información sobre el impacto ambiental a nivel micro ecosistema cuando se introducen estos microorganismos ajenos a este. Por otro lado, no hay información sobre el tiempo que estos microorganismos perduran una vez terminado el proceso o si logran subsistir con los nativos. Es difícil demostrar de una manera sencilla si los microorganismos son o están genéticamente modificados y más difíciles aún si hay impactos residuales con respecto a los nativos.

Creemos es posible rescatar los organismos nativos, seleccionar los más adecuados e inducir su crecimiento estimulando las condiciones del sitio y de sus requerimientos nutricionales para con esto tener una biorremediación exitosa ante cualquier contaminante.

El estudio aquí presentado, propone elaborar no una técnica sino un Sistema de Biorremediación y que permita la selección de organismos nativos (es decir no modificados), bajo un procedimiento, que involucra un monitoreo molecular con la identificación del crecimiento de los microorganismos inoculados durante y después del proceso de biorremediación de suelo o el agua impactados con hidrocarburos totales de petróleo como es el presente caso.

Para la realización del Sistema, se cuenta hoy en día con dos consorcios microbianos (CMic 4 y CMic 10) aislados de suelos contaminados con petróleo que son capaces de degradar Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) ,BTEX y Diesel *In Vitro* A estos consorcios, se les determinó su eficiencia en fracciones de hidrocarburos que representan alto riesgo para la salud humana y un peligro ecológico como la fracción ligera, media y pesada en condiciones *In situ*, controlando factores como la humedad, pH y estimulación mineral. Es con ello que se establece un sistema de monitoreo de la población microbiana en un proceso biodegradación en suelo para poder caracterizar el proceso y generar antecedentes de una metodología de aplicación eficiente de consorcios microbianos de Biorremediación

en zonas afectadas en la región. De acuerdo a lo establecido por la NOM 138 SEMARNAT 2003 para lograr reducir niveles permisibles de hidrocarburos en suelos afectados.

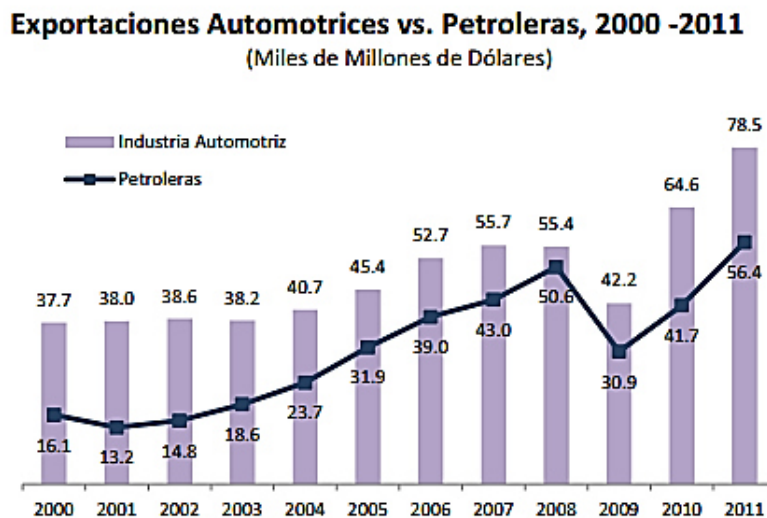
ANTECEDENTES

○ Actividad industrial.

La actividad industrial se ha incrementado exponencialmente durante el último siglo, teniendo como consecuencia la contaminación del medio ambiente ante una gran cantidad de químicos antropogénicos y recalcitrantes (Bisht *et al.* 2014). Uno de los principales contaminantes son los hidrocarburos de petróleo (HCP), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), hidrocarburos halogenados, pesticidas, solventes, metales y sales.

A nivel nacional es importante mencionar como el incremento entre la producción automotriz y la producción petrolera según la siguiente gráfica va en un crecimiento proporcional donde sube una y por consecuencia sube la otra. Una contamina la atmosfera y la otra contamina el suelo, el aire y también la atmosfera.

Gráfica 1 Exportaciones automotrices y petroleras



http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/Monografia_Industria_Automotriz_MARZO_2012.pdf

En el proceso industrial de ambas el resultado es también la producción perdo de los contaminantes anteriormente señalados que son depositados en el ambiente afectando directamente la salud humana los cuales se han documentado muy bien (CCME, 2001) y en lo que respecta a los HAP se reportan por diferentes instituciones médicas como químicos peligrosos por su toxicidad y efectos cancerígenos-mutagénicos en el cuerpo. Los combustibles actuales como el Diesel contienen altas cantidades de HAP que se propagan rápidamente en la ecósfera (Ruma *et al.* 2007).

○ **Propiedades físico-químicas**

Estos pueden ser; líquidos, sólidos y/o gaseosos, incoloros/amarillentos con baja solubilidad en agua, altos puntos de fusión y evaporación. El resto de las propiedades físico-químicas se muestran en la tabla 1. Estos compuestos entran al ambiente de muchas formas como el resultado de una combustión incompleta o de compuestos orgánicos provenientes de combustiones naturales como los incendios forestales y las erupciones volcánicas sin embargo, surgen principalmente de las actividades antropogénicas liberándolos en el aire con serias implicaciones a la salud humana ya que es alérgeno y sensibilizador (Fawell y Hunt, 1988). Ya en el suelo los HAPs absorben sedimentos orgánicos y en ecosistemas acuáticos estos se acumulan en los peces y demás organismos acuáticos que después pueden ser consumidos por humanos (Meador *et al.* 1995).

Tabla 1 Propiedades físicas de los HAP y límites máximos permisibles (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003) (Bisth *et al.* 2014). P.M. es el peso molecular, No. CAS es el número de registro en el Chemical Abstract Service, T°E temperatura de ebullición, T°F temperatura de fusión, P.V. Presión en pascales de volatilización, L.M.P. límite máximo permisible y finalmente A/R/I es suelo agrícola, residencial e industrial.

Nombre	P.M.	No. CAS	T° E	T°F	P.V.(Pa a 25°C)	Solubilidad acuosa (mg/L)	L.M.P. en suelo A/R/I mg/kg (NOM-138)
Benzo[k] flouroantreno	C ₂₀ H ₁₂	207-08-09	480	215.7	5.2 X 10 ⁻⁸	-	8/8/80
Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	120-12-7	342	216.4	1 X 10 ⁻³	0.015	2/2/10
Benzo[b] flouroantreno	C ₂₀ H ₁₂	205-99-2	481	168.3	6.7 X 10 ⁻⁵	-	2/2/10
Flouroantreno	C ₁₆ H ₁₀	206 -44-0	375	108.8	1.2 X 10 ⁻³	0.25	2/2/10
Naftaleno	C ₁₀ H ₈	91-20-3	218	80.2	11	30	2/2/10
Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	85-01-8	340	100.5	2 X 10 ⁻²	1-2	2/2/10
Benzo[ghi] peryleno	C ₂₂ H ₁₂	191-24-2	500	277	6X10 ⁻⁸	-	2/2/10
Benzo[e] pyreno	C ₂₀ H ₁₂	192-97-2	493	178.7	4 X 10 ⁻⁷	-	40/40/100
Pyreno	C ₁₆ H ₁₀	129-00-0	150.4	393	6 X 10 ⁻⁴	0.12 - 0.18	2/2/10
Hidrocarburos de fracción ligera	C ₅ H ₁₂ - C ₁₀ H ₁₄	68476-26-6, 68476-29-9	-107.8	-185	109.7	poca	200/200/500
Hidrocarburos de fracción media	C ₁₀ H ₂₄ - C ₂₈ H ₃₈	68476-34-6	-	-	-	-	1,200/1,200/5,000
Hidrocarburos de fracción pesada	C ₁₈ H ₁₂ -C _n H _n	97488-96-5	35 - 190	-	280	-	3,000/3,000/6,000

Una forma de categorizar los HAPs es por su peso molecular y así aparecen como de bajo peso (BPM) que usualmente tienen dos o tres anillos de carbono, esto le confiere propiedades volátiles, solubles y son más degradables que los de alto peso (APM) que poseen cuatro o más anillos los cuales se absorben en las partículas de suelo y en sedimento

son más resistentes a la degradación microbiana por su mismo peso y su característica hidrofóbica además de ser tóxicos para las bacterias (Sikkema *et al.* 1995).

○ **Norma Oficial Mexicana 138.**

En México existe la Norma Oficial Mexicana 138 (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003) la cual categoriza a los hidrocarburos en tres fracciones, ligera (de 5 a 10 átomos de carbono), media (de 10 a 28 átomos de carbono) y pesada (mayor de 18 átomos de carbono). Sus límites máximos permisibles dependiendo el tipo de suelo en donde se encuentren son de 200 mg/kg en suelo agrícola/residencial y 500 mg/kg en suelo industrial para la fracción ligera, 1,200 mg/kg en suelo residencial/agrícola y 5,000 mg/kg en suelo industrial para la fracción media, 3,000 mg/kg en suelo residencial/agrícola y 6,000 mg/kg en suelo industrial.

○ **Biodegradabilidad.**

La habilidad de los microorganismos (hongos y bacterias) para degradar hidrocarburos fue reconocida desde principios del siglo veinte donde principalmente las bacterias que eran aisladas de sitios contaminados con estos lograron degradar HAP (Cerniglia y Heitkamp, 1987, Juhasz y Naidu, 1996; Wilson y Jones, 1993) esto conllevó a la capacidad de rehabilitación *In Situ* del suelo. La biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos usando microorganismos para la desintoxicación y rehabilitación de estos es una manera eficiente, económica y versátil de tratamiento para el medio ambiente. Los microbios que degradan HAP prevalecen en los ecosistemas gracias al aprovechamiento de las cadenas de carbono de estos estableciéndose después de que la contaminación en el sitio ocurre (Margesin *et al.* 2000). La restauración de esta extensión territorial contaminada reduce la posibilidad de que el agua subterránea se contamine (Gibson y Parales 2000; Mishra *et al.* 2001).

Tabla 2 Técnicas de remediación de zonas contaminadas

Proceso de remediación	Técnica	Características
Procesos Biológicos	Landfarming Biorremediación <i>Ex situ</i>	Involucra la excavación del suelo y lo coloca en líneas de suelo donde se estimula la población microbiana nativa mediante la adición de nutrientes, agua, abultantes y homogenización
	Biopila, bioceldas,	Excavación de suelo y acomodo en

	biomontículos, compostaje de celdas, Biorremediación <i>Ex Situ</i>	montículos o pilas de aireación, estimula la actividad microbiana proveyendo nutrientes, agua y oxígeno
--	---	---

Singh *et al.* 2009

Tabla 3 Técnicas de remediación de zonas contaminadas

Proceso de remediación	Técnica	Características
PROCESO DE REMEDIACIÓN	TÉCNICA	CARACTERÍSTICAS
	Bioreactor de suspensión Biorremediación <i>Ex Situ</i>	Es la excavación de suelo que es llevado a tratamiento en ambientes de contención como los tanques o reactores donde se les provee oxígeno, agua, nutrientes bajo condiciones controladas para la aceleración de la biodegradación
	Bioleaching	Limpieza de suelos contaminados con metales usando bacterias acidofílicas que oxidan o reducen compuestos de sulfuro en ácido sulfúrico, esto puede ser realizado ya sea por bioreactor de suspensión o por la misma absorción (leaching) de la biocelda
	Biorremediación mejorada, Biorremediación <i>In Situ</i>	Lograda al crear un ambiente favorable para estimular a la población natural o inducida de microorganismos. La tasa de biodegradación está influenciada por la bioestimulación o el cometabolismo
	Bioventing ó biorremediación <i>In Situ</i>	Involucra inyección de aire o agua para administrar oxígeno y nutrientes en el subsuelo contaminado
	Biosparging	Es añadir aire/oxígeno y nutrientes para mejorar la biodegradación de subsuelo contaminado. También mejora notablemente la biodegradación de zonas no saturadas de contaminante
	Biodegradación anaeróbica	Es una degradación anaeróbica de sedimentos contaminados con organoclorados generalmente es acompañado de un proceso aeróbico una vez que justo finalizó, para así terminar de des halogenizar
	Fitorremediación	Plantas superiores son usadas para degradar contaminantes, dejarlos inmóviles en el suelo o acumulándolo dentro del tejido vegetal para después liberarlo en una atmosfera controlada
	Atenuación natural monitoreada	Es una estrategia que permite el proceso natural de reducción de un contaminante con el tiempo lo que involucra un proceso físico, químico o biológico en continuo monitoreo

Singh *et al.* 2009

Tabla 4 Técnicas de remediación de zonas contaminadas

	TÉCNICA	CARACTERÍSTICAS
PROCESOS QUÍMICOS	Agentes oxidantes (oxígeno, ozono, UV, H ₂ O ₂ , gas clorado, entre otros); agentes reductores (Al, Na, y Zn, glicoles polietilenos alcalinos, entre otros	Procesos de oxidación y reducción que pueden tratar a cierto rango de contaminantes lo que incluye a los compuestos orgánicos y los metales pesados
	Declorinación	Remoción de agentes reductores que remueven los átomos de cloro en los compuestos organoclorados como los PCBs y pesticidas.
	Extracción química con ácidos inorgánicos (HCl, H ₂ SO ₄ , HNO ₃), ácidos orgánicos (acético, tartárico y cítrico), compuestos quelantes (EDTA, DTPA, NTA).	Los ácidos orgánicos e inorgánicos son usados para bajar los niveles de pH en suelos contaminados y así liberar a los metales pesados; compuestos quelantes son usados para formar complejos de agua-metal soluble-iones
	Solventes orgánicos mediante extracción de solventes	Un solvente orgánico que tiene alta solubilidad para el contaminante es intensivamente mezclado en el suelo
	Agentes de solidificación/estabilización como el cemento portland, cenizas volatilizadas, silicatos, limo, arcillas y polímeros	Lograda al solidificar (a manera de cemento) suelo contaminado convirtiendo los contaminantes en químicos menos móviles al unirlos a una matriz para reducir su absorción
	Suministro de asfalto	Un método de estabilización/solidificación alternativa que trata a los suelos contaminados por hidrocarburos incorporándolos en una mezcla de asfalto caliente y así ser usado para la pavimentación

Singh *et al.* 2009

Tabla 5 Técnicas de remediación de zonas contaminadas

PROCESOS FÍSICOS	TÉCNICA	CARACTERÍSTICAS
	Lavado de suelo	Uso de agua o surfactante y un proceso mecánico para tallar los suelos
	Enjuague de suelos	Se tiene que inundar a los suelos contaminados con un fluido de extracción que mueve al contaminante a un área en particular. Generalmente se usa en un conjunto de carbón activado, biodegradación y tratamiento de bomba
	Extracción de vapores del suelo	Remueve los gases orgánicos volátiles o semi volátiles de un suelo mediante aspiración mecánica; también estimula el proceso de biorremediación en zonas no saturadas
	Remediación electroquímica	Es un proceso <i>In Situ</i> en el que se induce una electrolisis, electroósmosis y electroforesis a través de un sistema de electrodos dispuestos en el suelo al que se necesita descontaminar
	Clasificación húmeda	Se realiza en dos etapas en las que se mezcla intensivamente el sedimento para desintegrar las partículas de sedimento aglomeradas seguido de una separación mecánica
	Encapsulación	Aislamiento físico del contaminante del suelo por revestimientos de baja permeabilidad logrando así la absorción de paredes o pisos impregnados con hidrocarburos

Singh *et al.* 2009

Tabla 6 Técnicas de remediación de zonas contaminadas

PROCESOS TÉRMICOS	Lavado de suelo	Uso de agua o surfactante y un proceso mecánico para tallar los suelos
	Destrucción térmica	Calentamiento a 600°C que resulta en la evaporación de contaminantes volátiles y así una remoción subsecuente por la condensación de los gases extraídos. Tallado, filtración o destrucción
	Incineración	Se trata de calentar el suelo excavado a temperaturas de 880-1,200°C para destruir o detoxificar contaminantes
	Vitrificación	Calienta el suelo a 1,000-1,700°C lo cual resulta en una vitrificación del mismo, formando un sólido de vidrio
	Oxidación húmeda	Este proceso de oxidación ocurre en la fase líquida del agua a altas temperaturas y altas presiones, solo lo justamente abajo de la temperatura superficial del agua a presión
	Oxidación supercrítica	Es al aplicación de presión y temperatura por encima del punto crítico de agua lo cual resulta en una solubilidad superior de oxígeno y compuestos orgánicos tóxicos en el estado líquido del agua y un rango de oxidación alto

Singh *et al.* 2009

○ **Bioaugmentación de ambientes prístinos.**

Profundizando más en las técnicas biológicas, se ha visto que las bacterias capaces de degradar hidrocarburos están distribuidas en ambientes prístinos (ambientes primitivos), tal es el ejemplo de Wünsche *et al.* (1995), quien reportó que un suelo contaminado con hidrocarburos aumentó su población en un 3.6%. De esta manera se sabe que la degradación en sitios con contaminantes derivados del petróleo es efectiva y barata en comparación de los procedimientos de limpieza mecánica. (Gibson y Parales 2000, Margesin y Schinner (2001). Estos microorganismos también utilizan a los compuestos como los BTEX como donadores de electrones para su propio metabolismo, lo cual facilita la remediación de estos sitios afectados (Stephen *et al.* 1999). Lo dicho anteriormente también lo menciona Wünsche *et al.* (1995) quienes reportan que los patrones para consumo de un sustrato en un sistema biológico cambian al momento de agregar hidrocarburos. Entre otras cosas que podemos ver en los procesos de biorremediación, es que las bacterias nativas de un suelo cambian su población y se vuelve predominante por el género *Pseudomonas* la cual posee la habilidad de degradar hidrocarburos, algo similar estudiaron Maila *et al.* (2005) quienes usaron métodos microbiológicos y moleculares para ver como una población que se encontraba removiendo contaminantes de petróleo aumentaba su población en diferentes niveles del suelo, el 48% de la comunidad microbiana se encontraba en el suelo de la superficie mientras que el 31% se encontraba a un metro de profundidad y finalmente el 11% estuvo a 1.5 metros. En esta y otras investigaciones se ha demostrado que los HAP y fenoles son degradables bajo condiciones adecuadas (Guerin 1999), aun así los hidrocarburos más dificultosos de degradar son los n-alcenos con un número promedio de 44 átomos de carbono (Atlas 1981).

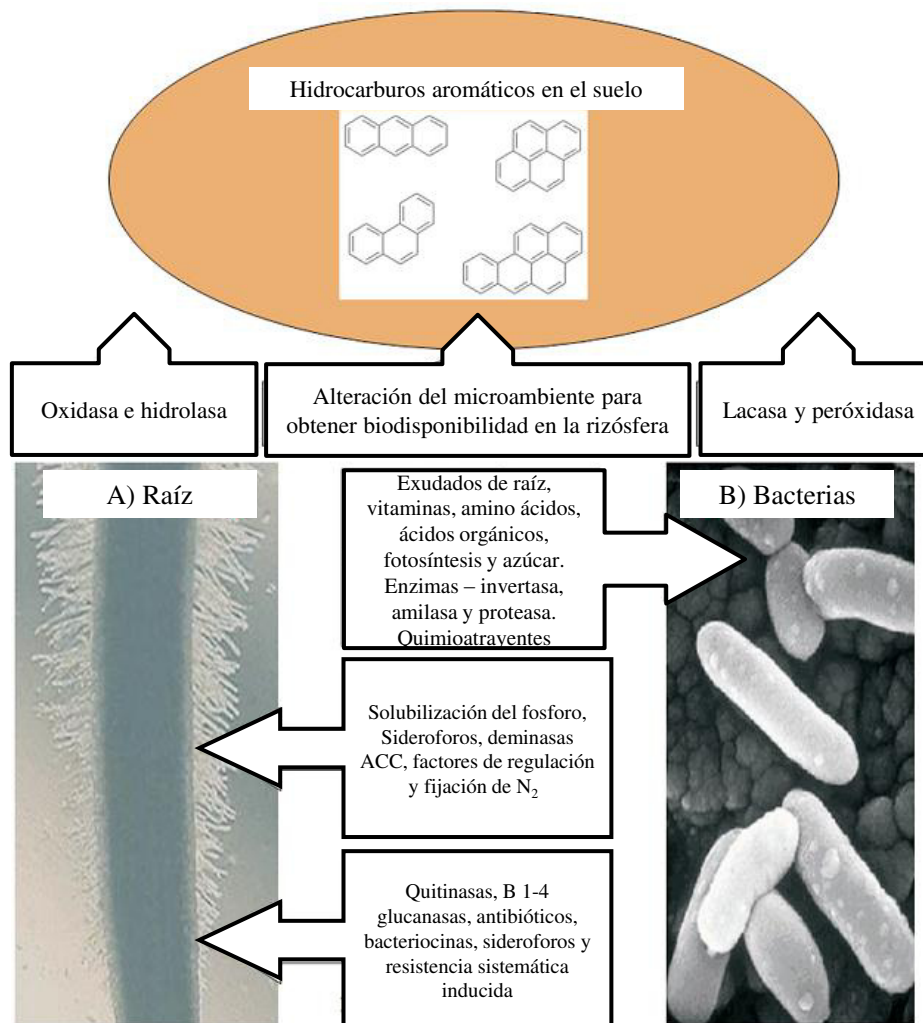
○ **Metabolismo del proceso**

La ruta metabólica en la que se biodegradan estos n-alcenos comienza en los extremos de esta cadena, formando un alcohol primario, un aldehído y un ácido monocarboxílico. El resto de la degradación es en la vía de la β -oxidación, la cual forma dos unidades de carbono, ácidos grasos cortos, acetil co-enzima A y monóxido de carbono (CO) (Atlas 1981).

○ **Rutas catabólicas asociadas a la degradación de hidrocarburos.**

Varias bacterias se conocen por catabolizar de dos a cuatro anillos de HAPs como única fuente carbono (Bogan *et al.* 2001). Este catabolismo se lleva a cabo usando hidrocarburo di oxigenasas dentro de un sistema multi-complementario de enzimas (Samanta *et al.* 2002). Se ha hipotetizado que la ingeniería genética metabólica pudiera mejorar la capacidad microbiana para degradar compuestos tóxicos (Samanta *et al.* 2002). Aun así el hallazgo organismos capaces de metabolizar hidrocarburos pudiera ser mejorada por la optimización de la biodisponibilidad del contaminante, absorción del mismo y la transferencia en el medio (ver ilustración 1) (Samanta *et al.* 2002).

Ilustración 1. Efecto sinérgico de rizobacterias en raíz de plantas degradando hidrocarburos aromáticos en suelo (Bisht *et al.* 2013)



(A) Factores que afectan la rizoremediación de HAP por las raíces de plantas las cuales apoyan el crecimiento microbiano en la superficie de la raíz así como en la rizósfera con la ayuda de exudados de raíz los cuales proveen nutrientes, vitaminas, azúcares, ácidos orgánicos, compuestos enzimáticos como las proteasas, amilasas y otras más las cuales actúan como quimioatrayentes de bacterias. (B) Las rizobacterias que promueven el crecimiento de la planta (PGPR) proveen específicamente a la hormona IAA, minerales, nutrientes cíclicos, deaminasa ACC y varias enzimas para proteger a la raíces de hongos patógenos. (Bisht *et al.* 2013). Otro gran avance en estas investigaciones fue cuando identificaron a las enzimas que están involucradas en el catabolismo de los hidrocarburos Widmer *et al.* (1998), así se tomó conciencia del potencial que tenían los microorganismos en un medio ambiente, especialmente las especies de *Pseudomonas*, esto desarrollo un protocolo específico de PCR para detectar a *Pseudomonas* (sensu stricto) en muestras ambientales. Lo cual resultó en el desarrollo de un primer altamente selectivo para los genes del ARNr del 16s de las especies de *Pseudomonas* obteniendo 91.7% de eficiencia en la identificación de esta bacteria en el medio ambiente, basándose en una secuencia filogenética. Seguido a esto, Milcic-Terzic *et al.* (2001) y Whyte *et al.* (2001) combinaron a los métodos microbiológicos convencionales y los análisis moleculares usando sondas de genes catabólicos de hidrocarburos como alkB (degradación de n-parafinas con 6 a 32 átomos de carbono), xylE (degradación de tolueno y xileno) y ndoB (degradación de naftaleno) para demostrar que la presencia de microbios degradadores de hidrocarburos en suelo. La presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno es un instrumento muy útil en la biorremediación de hidrocarburos. Sin embargo estas son difíciles de cultivar, debido a sus requerimientos nutricionales y fisiológicos que limitan el crecimiento por separado de las especies (Widmer *et al.* 1999). Para identificar a estas bacterias fijadoras de nitrógeno así como también a las archeas existen métodos moleculares de primers degenerados de amplio espectro los cuales codifican para la enzima reductora de nitrógeno (nitrogenasa). Rosado *et al.* (1998) estudio las diversas secuencias del gen nifH en *Paenibacillus azotofixans* y encontró divergencia de secuencia a nivel ADN pero una secuencia conservada a nivel proteína, así se desarrolló entonces los primers degenerados. Después de este diseño Widmer *et al.* (1999) hicieron dos sets universales de primers

específicos para el PCR anidado, basándose en la secuencia de aminoácidos del gen conservado *nifH*

○ **Rango de géneros bacterianos capaces de romper hidrocarburos**

Investigaciones de Widada *et al* (2002) tuvieron que ver con el aislamiento de 19 especies de bacterias degradadoras de HAP que pertenecían a los géneros *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Flavobacterium* y *Bacillus* obtenidos de muestras ambientales en Kuwait, Indonesia, Tailandia y Japón. Estas fueron aisladas en medios de cultivo enriquecido con naftaleno o fenantreno como única fuente de carbono y el resultado fue la aparición de múltiples fenotipos, en términos de utilización y degradación metabólica. En otra investigación, Tesar *et al.* (2002) enlistaron un amplio rango de géneros bacterianos capaces de romper hidrocarburos, las bacterias que encontraron fueron *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas* and *Xanthomonas*. En adición a esto Riis *et al.* (2003) encontraron ciertas bacterias capaces de llevar a cabo un proceso de biorremediación de suelo contaminado con Diesel y altas concentraciones de sal. Las bacterias encontradas pertenecían a los géneros *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Dietzia* y *Halomonas* re habitaron los suelos con una salinidad de más del 15%. En años posteriores, Kleinstuber *et al.* (2006), determinaron que la salinidad tiene un efecto negativo en las especies dominantes de suelos contaminados con Diesel mientras que en baja salinidad se favoreció a *Sphingomonas spp.*, en altas salinidades favoreció a *Ralstonia spp.* y una gran variedad de géneros halofílicos como *Halomonas*, *Dietzia* and *Alcanivorax*. Algunas bacterias han sido reportadas por degradar específicos HAPs en medios de cultivo, tal es el caso de Willson (2004) , por instancia, él encontró una especie *Sphingomonas spp.* CHY-1 fue capaz de degradar criseno como única fuente de carbono en un cultivo enriquecido con este. Específicamente los miembros del género *Providencia* se sabe que rompen los complejos del hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-tiazine (RDX) y nitroso-RDX, este género ha sido utilizado ya en procesos de biorremediación *In Situ* (Kitts *et al.*1994).

○ **Bacterias asociadas a ectomicorrizas ayudan.**

Los hongos ecto y endomicorrizicos tienen una distribución cosmopolita, forman asociaciones simbióticas en las raíces de las plantas (Linderman 1988). Estos hongos endófitos, particularmente las ectomicorrizas ayudan a las plantas en la absorción de nutrientes del suelo, especialmente a inmovilizar elementos como el zinc, cobre, azufre, calcio, potasio, hierro, cloratos, boro y nitrógeno. La absorción del fosforo es enriquecida por ambas las ecto y las endomicorrizas. Las micorrizas fúngicas han sido reportadas en la reducción de contaminantes de altos niveles de sal, residuos mineros, agrícolas, metales pesados y micro-elementos tóxicos mediante la asociación planta-hongo (Linderman 1988). La biorremediación, por virtud de la degradación, depende principalmente de que los microorganismos se sobrepongan a las limitaciones de nutrientes en el suelo a ser rehabilitado. La remediación de los suelos contaminados con hidrocarburos esta usualmente limitada por la cantidad de carbono libre, fosforo y/o nitrógeno presente (Bogan *et al.* 2001; Margesin and Schinner 2001; Röling *et al.* 2002). Aun así, Struthers *et al.* (1998) y colaboradores encontraron que el herbicida atrazin puede ser degradado por *Agrobacterium radiobacter* en suelo sin la adición de carbono o de nitrógeno externo aunque la población inoculada no creció en números, indicando un estado de supervivencia en vez de crecimiento. Los números en la comunidad microbiana pueden ser incrementados mediante la inyección de nutrientes solubles justo por debajo de la superficie del suelo. Esto puede, sin embargo, llevar a los microorganismos a un crecimiento excesivo localizado en ese lugar de la estimulación, a esto se le conoce como “biofouling” (bioapelmasamiento) (Bogan *et al.* 2001).

○ **Estimulación mineral en el sistema de biorremediación.**

El uso de formulaciones gaseosas ha demostrado que tiene una mejor distribución de los nutrientes de nitrógeno y fosforo, en vez de inyectarlos, ya que se sabe que mejoran la biodegradación del petróleo liberado a un ambiente marino (Kasai *et al.* 2002). Existe sin embargo, enmiendas para rectificar la deficiencia de nutrientes la cual debe de ser optima, las altas concentraciones resultan en una eutrofización mientras que muy poco desemboca en una biodegradación muy por debajo de lo esperado (Röling *et al.* 2002). El trietilfosfato las (TEP) y el tributilfosfato (TBP) son los compuestos fosforados más seguros que pueden ser fácilmente gasificados y aplicados en suelos que lo necesiten, también el óxido nitroso

gasificado ha sido usado para suministrar nitrógeno (Bogan et al. 2001). Si no se aplica una mejora al sistema de remediación de suelos contaminados con HAP, se genera un suministro gaseoso de nutrientes de manera natural, esto sucede en sitios contaminados con solventes clorados, compuestos orgánicos volátiles, alcanos de 4 a 10 cadenas de carbono e hidrocarburos mono aromáticos (Bogan *et al.* 2001). En complemento a esto, Lee *et al.* (2003) encontraron que al agregar piruvato a óptimos niveles como fuente adicional de carbono en suelos contaminados con HAPs ayuda al rompimiento de los mismos (se usó un modelo de naftaleno). Ellos fueron capaces de determinar las concentraciones máximas de fuentes de carbono necesarias para completar la degradación de naftaleno utilizando a *Pseudomonas putida* G7.

La inoculación de microorganismos puede ser realizada utilizando varios materiales. Los desechos de la industria agrícola son los más utilizados para transferir microbios sin afectarlos en su capacidad degradadora (Mishra *et al.* 2001). En este asunto, la tasa de intensidad de degradación del contaminante está influenciada por los factores ambientales como lo son la comunidad original de microorganismos, disponibilidad de nutrientes, niveles de oxígeno, pH, temperatura, contenido de humedad, cantidad y calidad de los contaminantes biohabiles y propiedades del suelo (Margesin *et al.* 2000). Aunque la biorremediación es el mecanismo primario involucrado en la remoción de contaminantes en suelo se puede optar por otros procesos como la dispersión, dilución, absorción, volatilización y transformación abiótica que también son procesos de rehabilitación (Margesin y Schinner 2001).

- **Poblaciones degradadoras de hidrocarburos.**

Respecto a las comunidades microbianas, el concepto de “poblaciones” viene de los campos de la ecología, biología evolutiva y la preservación de la biología. Krebs (1994) define a la población como “un grupo de organismos de la misma especie ocupando un espacio en particular en determinado tiempo en particular”. Waples y Gaggiotti (2006) realizaron una reciente revisión en el concepto tomando en cuenta los paradigmas de la evolución y la ecología sugiriendo que algunos criterios a considerar en la definición incluyan a algunos grupos de individuos que son lo suficientemente diferentes como para

ser considerados comunidades separadas. Una población natural está ligada a sus barreras genéticas o ecológicas, un ejemplo sería cuando una población local de individuos interactúa para su reproducción y formación de nicho ecológico. Basándose en esta interacción, Waples y Gaggiotti concluyeron que un cluster de individuos, sin usar información del sitio muestreado, es detectable cuando las comunidades verdaderas tienen un flujo genético moderado. Es así que este trabajo estudia un número considerable de especies dentro de un medio ambiente establecido por lo tanto podemos referirnos a esto como la comunidad de microorganismos. Por lo tanto, debido al flujo de genes entre las comunidades las investigaciones se apoyan en el uso de marcadores de ADN, los cuales han tenido mucho interés en el estudio del genoma de comunidades naturales de microorganismos.

Las comunidades de microorganismos del suelo están justamente distribuidas en ambientes contaminados. Sin embargo Smalla *et al.* (2001) probaron que las comunidades de una rizósfera están ligeramente favorecidas a las de suelos que no tienen vegetación. Zhou *et al.* (2002) examinaron las comunidades microbianas de 29 tipos de suelos encontrando que la diversidad en suelos de poco carbono permanecía poco perturbada y en la superficie de ese mismo suelo mostraba un patrón distintivo de microorganismos, en contraste con los suelos de mucho carbono en los que se vio una diversidad uniformizada en las diferentes profundidades de este, indicando que las comunidades se estructuran cuando el suelo tiene una alta cantidad de carbono. Esto es apoyado por Dejonghe *et al.* (2001) quien menciona que una alta diversidad microbiana es proporcional al incremento en el potencial catabólico. Esto puede ser extrapolado afirmando que una alta diversidad de especies lleva a una mejor remoción de metabolitos y contaminantes en un sustrato. La mejora en la capacidad de bioremediación en suelos mediante la inoculación de cepas específicas o consorcios de microorganismos es conocida como la bioaugmentación (Halden *et al.* 1999; Dejonghe *et al.* 2001). Hay dos factores que constituyen al término diversidad, el número total de especies (abundancia de especies/abundancia) y la distribución de las especies (equilibrio de las especies) (Dejonghe *et al.* 2001). Para promover e incrementar el potencial degradador de una comunidad de microbios se requiere la competencia de ciertas reacciones bajo condiciones establecidas lo cual implica que los genes dentro de un sistema

necesitan ser activados para participar en el flujo de energía de un medio ambiente (Dejonghe *et al.* 2001).

- **Técnicas para determinar la riqueza de la diversidad microbiana**

Existen algunos métodos para determinar la riqueza de la diversidad en un medio ambiente entre ellos hay métodos microbiológicos en placas Petri, microscopia de luz y fluorescencia así como los análisis de ADN y ARN (Dejonghe *et al.* 2001; Duineveld *et al.* 2001; Torsvik y Øvereås 2002). Hay algunas limitaciones generales que deben ser tomadas en cuenta cuando se estudia la diversidad microbiana, tal es la heterogeneidad espacial en donde la mayoría de las réplicas ambientales consisten en 1 a 5 gramos de muestra lo cual no da un reflejo de la distribución espacial de los microorganismos (Kirk *et al.* 2004). El cultivo de unidades formadoras de colonia (UFC) en medios nutritivos fue el método más popular para investigar la diversidad microbiana, sin embargo, la mayoría de las bacterias que se querían aislar son difíciles de cultivar debido a la inadaptabilidad de estas a medios artificiales en los que se desean crecer (Sekiguchi *et al.* 2002). Los métodos basados en cultivos son tediosos y en ciertos organismos como las micobacterias se llevan mucho tiempo para crecer. Solo el 1 al 10% de las bacterias globales son cultivables debido a la selectividad de los medios de cultivo y las condiciones de estos (McCaig *et al.* 1999, Von Wintzingerode *et al.* 2002, Kirk *et al.* 2004). Menos del 1% de los microbios de suelo contaminado son cultivables (Stephen *et al.* 1999). Los análisis de respiración de células individuales en muestras de suelos ha tenido como resultado un alto número de bacterias metabólicamente activas que el número de bacterias cultivables (McCaig *et al.* 1999), por lo tanto el plaque y la microscopia no tienen la capacidad de discriminar entre múltiples comunidades bacterianas y la evaluación de su diversidad (Duineveld *et al.* 2001). Profundizando más, si un organismo es cultivado en un medio artificial, las sustancias que produce en el medio de cultivo pueden inhibir o estimular el crecimiento en otros microbios. Estas sustancias pueden tener un desempeño mucho menor si se introducen en el suelo como tratamiento de recuperación, esto debido al pH, adsorción por arcilla y uso microbiano, todo esto puede influenciar a la rizósfera (Schroth y Hilderbrand 1964).

○ **Caracterización de poblaciones microbianas.**

Los métodos moleculares han provisto una vista más fina de la riqueza de especies dentro de la diversidad. Inicialmente, fragmentos al azar de ADN genómico de muestras ambientales eran clonados y esos genes de ARNr eran seleccionados para secuenciar (Dejonghe *et al.* 2001). El próximo avance en los análisis moleculares vino cuando el PCR fue usado usando con diferentes sets de primers para amplificar estos genes de ARNr del ADN de la totalidad de la comunidad microbiana (Archaea, Bacteria, Eukarya) (Dejonghe *et al.* 2001, Torsvik y Øvereås 2002). Ahn *et al.* (1999) probaron que existía ADN en suelos contaminados por HAP de naftaleno. Encontraron que la mayoría de las bacterias que degradaban HAP tenían un genotipo parecido al NAH7 usando como sonda al gen nahA, solo el 15% no fue detectado usando a esta sonda. Nuevas sondas de genes fueron sugeridas a realizarse para enumerar organismos degradadores de HAP. El próximo paso más lógico de esta tecnología 34^a que mezclara fragmentos de PCR que pudieran ser clonados y secuenciados o ser separados y visualizados por varias técnicas de huellas digitales por ejemplo el DGGE (Dejonghe *et al.* 2001, Duineveld *et al.* 2001). Sin embargo estas técnicas solo son eficientes mientras sus metodologías (eficientización de lisis celular, limitaciones de extracción de ADN, desbasificaran las amplificaciones de PCR y bajaran la efectividad del análisis (Kirk *et al.* 2004). Las proporciones cultivables de comunidades bacterianas en medios ambientes son despreciables comparadas con el número de especies presentes. Por lo tanto las técnicas de cultivo para análisis de la diversidad en comunidades bacterianas se están volviendo obsoletas. Apoyando esta afirmación esta la investigación de Øvereås y Torsvik (1998) quienes compararon la diversidad de comunidades bacterianas cultivables de un suelo agrícola contra una técnica molecular, encontrado que los métodos moleculares mostraban más diversidad bacteriana, concluyendo que los análisis de diversidad deben de hacerse considerando a la comunidad total, no solo la comunidad cultivable.

Algunas técnicas moleculares han sido desarrolladas para identificar y determinar especies y diversidad de organismos sin aislarlos (Kawai *et al.* 2002). Las técnicas basadas en el PCR se están volviendo populares entre las investigaciones ya que abarcan desde el trabajo de diagnóstico hasta el desarrollo de huellas digitales y sondas (Øvereås y Torsvik 2002).

El PCR es regularmente aplicado en la evaluación de muestras ambientales debido a que la técnica tiene la habilidad de detectar pequeños números de organismos de interés sin que estos necesiten ser cultivados (Volossiouk *et al.* 1995). Así, el PCR puede ser usado para encontrar cierto tipo de genes esperados dentro de una comunidad en específico ya que estos pueden realizar funciones especiales. En el 2003 Set *et al.* desarrolló un par de sets de primers en los que detecto bacterias degradadoras de alcanos. Los primers fueron diseñados para unirse a regiones homologas de genes hidroxiladas de alcanos (alcagenes) y así evaluar el potencial degradador de alcanos en un ambiente en particular.

Estos primers fueron probados en comunidades capaces de degradar n-alcanos, el mayor componente del petróleo crudo. Sei *et al.* (2003) encontraron que entre más corta la cadena de carbonos más rápido se degradaba por las bacterias degradadoras de alcanos del grupo I, mientras que las bacterias degradadoras de alcanos del grupo III degrado cadenas más largas. Aunque como en la mayoría de las técnicas hay algunas desventajas al usar PCR, por ejemplo la amplificación preferencial de ciertos tipos de secuencias, la generación de secuencias quiméricas y falsos resultados debido a la contaminación (Osborne *et al.* 2005). A pesar de esto el PCR se mantiene confiable, actualmente es la técnica base para la mayoría del trabajo

- **Métodos para determinar los niveles de remediación de suelos.**

Existen algunos métodos disponibles para determinar los niveles de remediación de suelos contaminados. El buscar contaminantes desaparecidos puede ser logrado mediante el monitoreo de la toxicidad en un organismo de prueba que pueda producir un cambio en el mismo. Clásicamente, las especies usadas para la determinación de la toxicidad han sido los crustáceos Ceriodaphnia y el pescado “Carpa cabezona” (*Pimephales promelas*) para aguas y algunos invertebrados para suelos (White *et al.* 1998). Sin embargo, los análisis de las comunidades microbianas ya han demostrado ser un indicador mucho más amplio para contaminantes residuales. Monitorear el regreso de una comunidad base es usado para indicar que la comunidad biológica de un suelo está regresando a la normalidad (White *et al.* 1998). Li *et al.* (2006) encontraron que las especies de bacterias tolerantes a suelos contaminados con metales incrementan sus números conforme se va aumentando la

contaminación y puede ser consecuentemente un indicativo del nivel de contaminación de metales pesados y por ende de la calidad de ese suelo.

Tabla 7 estrategias moleculares para la detección de genes catabólicos de contaminantes

GEN A DETECTAR	TÉCNICA MOLECULAR	TIPO DE MUESTRA	REFERENCIA
nahAc	RT-PCR con primers degenerados	muestras de agua subterránea	Wilson <i>et al.</i> 1999
phnAc, nahAc, glutatión-s-transferasa	PCR con algunos primers	muestras de suelo	Lloyd <i>et al.</i> 1999
Hidroxilasa fenol-s-transferasa (LmPH)	PCR-DGGE con primers degenerados	lodos activados	Watanabe <i>et al.</i> 1998
RDH	PCR con primers degenerados	suelos contaminados con HAP	Yeates <i>et al.</i> 2000
PAH dioxigenasa	PCR con primers específicos	suelos contaminados con HAP	Lloyd <i>et al.</i> 1999
nahAC	PCR con primers degenerados	sedimentos marítimos y acuíferos contaminados con alquitrán	Hedlund <i>et al.</i> 1999, Bakermans <i>et al.</i> 2002
NahR	PCR con primers degenerados	Bacterias de suelo	Hamann <i>et al.</i> 1999
Nah	PCR con primers degenerados	Bacterias de suelo	Cavalca <i>et al.</i> 1999
TfdC	PCR con primers degenerados	Bacterias de suelo	Meyer <i>et al.</i> 1999
Dioxigenasa de HAP y dioxigenasa catecol	PCR con primers degenerados	Agua y suelo de drenaje urbano	Widada <i>et al.</i> 2002
Dioxinasa de HAP, phnAc y nahAc	PCR con algunos primers degenerados	Agua y sedimento de río	Widada <i>et al.</i> 2002
RHD	PCR DGGE con primers degenerados	Cultivo in vitro de <i>Rhodococcus</i> spp. cepa RHA1	Kitagawa <i>et al.</i> 2001
dszABC	PCR DGGE con algunos primers	Suelos con petróleo y sulfuro	Duarte <i>et al.</i> 2001

Limitaciones de estas técnicas se ven con la microbiota de la rizósfera la cual no es tan fácilmente desestabilizada, esto debido al efecto buffer de los alrededores bióticos y abióticos en los que habitan (Bahme *et al.* 1988). Investigaciones han mostrado sin embargo, que la microbiota de la rizósfera puede ser alterada por la inoculación de raíces de plantas con rizobacterias específicas. La capacidad del cambio de microbiota depende de varios factores, por ejemplo la naturaleza de la cepa introducida, el efecto de su colonización y la habilidad de persistir en el sistema de raíces por periodos prolongados (Bahme *et al.* 1988). El tamaño del inoculo y la manera de ser inducido afecta la dinámica

de la comunidad en el suelo, por ejemplo, la densidad de la comunidad disminuye proporcionalmente a la distancia del punto o fuente de inoculación (Bahme *et al.* 1988).

- **La cuantificación de hidrocarburos.**

Los métodos analíticos más utilizados para la cuantificación de hidrocarburos son la cromatografía de gases, de infrarrojo, la espectrometría de masas y de fluorescencia ya que son herramientas analíticas sensibles y eficaces que cuantifican los contaminantes aromáticos (Singh *et al.* 2009). Sin embargo existen otras alternativas de medición para casos en donde el monitoreo en tiempo real pueda ser evaluado teniendo así un control inmediato en cualquiera de las estrategias de remediación aplicadas. Tales alternativas son proporcionadas por equipos como el Portable Hydrocarbon Analyzer (PetroSense) y el Retort Kit (OFITE), este último utilizado para sitios altamente contaminados de hidrocarburos (>100,000 mg/kg) que a *grosso modo* permiten evaluar la cantidad de hidrocarburos presentes en una muestra de suelo/lodo.

- **Pruebas de toxicidad aplicables.**

Finalmente, el suelo descontaminado debe de ser reintegrado al ambiente (Singh *et al.* 2009), por lo que diferentes autores han sugerido ensayos de toxicidad del mismo para descartar efectos adversos a las cadenas tróficas. Entre los más destacados se encuentra la empresa alemana IBACON (www.ibacon.com; 2012) quienes ofrecen este servicio al sector empresarial dedicado a la descontaminación de suelos. Nuestro equipo de trabajo (Ledezma-Villanueva *et al.* 2015) también integra estas determinaciones para el proceso de biorremediación utilizando diferentes consorcios bacterianos con capacidades de degradar hidrocarburos de fracción media. El presente trabajo culmina la estandarización de estas técnicas (Bioaugmentación de un consorcio específico, variabilidad microbiana durante el proceso, cinética de degradación del contaminante y Toxicidad de suelo) ofreciendo un paquete tecnológico que refuerce las opciones de disposición final de suelos contaminados con hidrocarburos pudiendo reducir los costos con una técnica rápida y segura para el ambiente.

OBJETIVO GENERAL

Describir la dinámica de la población microbiana durante el proceso de Biorremediación de suelos y/o agua impactada con hidrocarburos bajo diferentes condiciones.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1.- Caracterizar los grupos de microorganismos que forman parte de un consorcio altamente eficiente de degradación de hidrocarburos utilizando métodos pirosecuenciación del 16s.

2.- Describir las variaciones cualitativas y cuantitativas de las sub poblaciones microbianas en procesos de Biorremediación de hidrocarburos *In Situ* bajo condiciones ambientales no controladas.

3.- Asociar los cambios en las características de la población microbiana a las diferentes etapas de biodegradación.

4.- Determinar la Fertilidad de suelo utilizando como bioindicador de contaminación a la lombriz de tierra *Eisenia fetida*

.
.

HIPOTESIS

La dinámica poblacional de las bacterias en un proceso de biorremediación por bioagumentación *In Situ* se puede monitorear utilizando métodos moleculares que pueden ser más eficientes que los microbiológicos.

METODOLOGIA

Las actividades de este proyecto fueron realizadas en 3 etapas, en la primera se desempeñan las estrategias moleculares, la segunda especifica las condiciones del proceso de biorremediación y la tercera se detalla el ensayo de fertilidad en el suelo descontaminado.

○ **ETAPA I.**

✓ *Estrategias moleculares*

El consorcio microbiano CMic 4 es un conjunto de microorganismos previamente aislados de un suelo contaminado por más de 30 años con hidrocarburos (Ledezma-Villanueva *et al.* 2015). A dicho consorcio se le aplico la técnica de extracción de ADN genómico propuesta por Williams *et al.* (2002) la cual lleva a cabo una lisis enzimática en Bromuro trimetil cetílico del amonio (CTAB), los pasos realizados fueron los siguientes:

- 1) En el tubo eppendorf que contenía las células de CMic 4 se agregó 390 μL de buffer TE (tris 10 mM EDTA 1 mM)/SDS 10%, junto con 10 μL de proteinasa K (Invitrogen) y se incubó durante 1 hora a 55°C
- 2) Posteriormente se añadió 100 μL de NaCl 5 M y mezclar
- 3) Se agregó 80 μL de CTAB/NaCl 5 M (1:1), y se incubó por 10 minutos a 65°C en termomixer (Eppendorf Thermomixer R.)
- 4) Se dispuso un volumen de fenol/cloroformo 1:1 y se mezcló en vortex (ThermoMylne), tras obtener una mezcla homogénea y de aspecto lechoso se procedió a centrifugar a 13,000 rpm por 5 segundos.
- 5) Se separó la fase acuosa y se transfirió a un tubo limpio para repetir el paso 4.
- 6) Se recuperó una vez más la fase acuosa en un tubo limpio y se agregaron 2 volúmenes de etanol frío absoluto y 0.1 volumen de acetato de amonio 3 M, se mezcló por inversión y se incubó por 20 minutos a una temperatura de -20°C

- 7) Esta mezcla se centrifugó por 5 minutos a 13,000 rpm a 4°C, después se limpió el pellet en alcohol etílico al 70% para volver a centrifugar como anteriormente se hizo.
- 8) Se separó la pastilla del alcohol por decantación y se secó a temperatura ambiente durante 30 minutos
- 9) Por último se re suspendió la pastilla de ADN en 40 µL de buffer TE

Este ADN fue cuantificado en espectrofotometría NanoDrop (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, E.U.) donde se comprobó que tuviera una lectura de 200 ng/µL, después fue llevado para su análisis de pirosecuenciación al Research and Testing Laboratory (RTL) en la ciudad de Lubbock, Texas, E.U., para su pirosecuenciación de etiqueta bacteriana (bTEFAP), esta se realizó mediante las instrucciones del sistema FLX Genome Sequencer (modelo 454; Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana, E.U.) en donde se utiliza los primers universales bacterianos Gray28F (5'-TTTGATCNTGGCTCAG-3') y Gray519R (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3') descritos por Dowd *et al.*, en el 2008. Para realizar la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó en Kit Mix HotStarTaqPlus Master (Qiagen, Valencia, CA) se utilizaron las siguientes condiciones cíclicas: 94°C por 3 minutos, seguido por 32 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 40 segundos y 72°C por 1 minuto, finalmente la etapa de elongación de 72°C por 5 minutos. Un PCR secundario fue hecho en el sistema FLX para secuenciar el amplicón bajo las mismas condiciones, usando primers de fusión con diferentes secuencias específicas (Dowd *et al.* 2008). Los análisis de pirosecuenciación del amplicón codificado específico en el FLX se realizaron con los reactivos del secuenciador Titanium (www.researchandtesting.com).

Análisis de los datos y la identificación de las bacterias

Después de la secuenciación, todas las amplificaciones fallidas (terminaciones de secuencias de baja calidad, sitios de interés y primers) fueron retiradas, la colección de secuencias se agotó y no se dejó ninguna secuencia de ribosoma y quimeras utilizando el software B2C2 (Gontcharova *et al.* 2010, Dowd *et al.* 2008; Ishak *et al.* 2011). Para

determinar la identidad de las bacterias y las secuencias faltantes, estas fueron diagnosticadas ensamblándolas en clusters con el programa BLASTn. El algoritmo NET (Dowd *et al.* 2005) fue utilizado para comparar una base de datos de secuencias del 16s bacteriano de alta calidad proveniente del NCBI. La base de datos de la secuencia fue caracterizado como de alta calidad basándose en un criterio similar en donde se utilizó el proyecto “base de datos ribosomal” (Cole *et al.* 2009). Usando un análisis de conexiones .NET y C#, los resultados de BLASTn fueron confirmados y validados usándolos métodos de la distancia taxonómica, la reducción de datos de análisis fue hecha como lo describe Ishak *et al.* (2011). Basándose en esta identidad de secuencias de BLASTn las cuales abarcan el porcentaje de la longitud total de la secuencia de consulta que se alinea con una secuencia de la base de datos, se realiza entonces la validación usando métodos de distancia taxonómica, las bacterias fueron clasificadas en el nivel taxonómico apropiado de acuerdo al siguiente criterio: secuencias con resultados de identidad (en relación con secuencias conocidas o secuencias de 16s bien caracterizadas) superiores al 97% (divergencia menor al 3%) fueron reportadas hasta el nivel de especie; aquellas con el resultado de identidad entre 95 y 97% fueron reportadas hasta el nivel de género, entre 90 y 95% fueron reportadas hasta el nivel de familia, 85 a 90% a nivel de orden, 80 a 85% a nivel de clase y entre el 77 al 80% en el nivel de filum. Las lecturas de secuenciamiento fueron alineadas y dispuestas en clusters siguiendo el procedimiento del RDPRelease Pyrosequencing pipeline (<http://pyro.cme.msu.edu/>), esto para reportar índices de igualdad, Shannon y Chao 1.

Diseño de sondas específicas.

La construcción de estos oligonucleótidos fue realizada conforme a lo reportado con anterioridad como genes únicos y conservados de cada microorganismo, en el caso del género *Pseudomonas* se utilizó el gen *ecfX* relacionado con la degradación de hidrocarburos, para *Ochrobactrum* se diseñó conforme al gen XXX relacionado también con la degradación de hidrocarburos y para *Bacillus* el gen *spoVID* el cual controla la esporulación de este género. Una vez estudiados estos genes se realizó un análisis de las regiones conservadas usando al programa BioEdit v7.2.5 y se obtuvieron las siguientes secuencias.

Tabla 8 Sonda universal de Souza et al. 2006

GEN	OLIGONUCLEÓTIDO	TAMAÑO DE AMPLICON	REALIZADO POR
ecfX	ecfX-F, 5'-TTC CAT GGC GAG TTG CT-3' ecfX-R, 5'-CGG GCG ATC TGG AAA AGA A-3'	152 pb	M.C. Eurídice Muñiz Chávez, 2012
spoVID	spoVIDf, 5' GHAAANARYTTYGYAAATAVAG 3' spoVIDr, 5'GKTTYCAAAAAGGACAGGAAG 3'	720 pb	L.B.G. Héctor López Calderón, 2012
pcaH	F 5' CCTT GTG CAT GGC CGT GTT C 3' R 5' GATCGTCTCGAAAGTGAATTC 3'	540 pb	L.B.G. Elida Lee, 2015
16s bacteriano como control positivo	F515, 5'-GCG GAT CCT CTA GAC TGC AGT GCC AGC AGC CGC GGT AA-3' R1492, 5'-GGC TCG AGC GGC CGC CCG GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	1248 pb	Souza <i>et al.</i> 2006

La tabla anterior muestra los resultados obtenidos con el resultado de la capacitación a los estudiantes que participaron en la elaboración de estas sondas específicas obtuvieron el grado de licenciatura por comprobar la correcta amplificación de estas bajo condiciones estandarizadas, estos datos aún no han sido publicados. Para identificar la amplificación del ADN ribosomal bacteriano (16s) se utilizó la sonda universal de Souza *et al.* 2006

○ **ETAPA II**

✓ **Proceso de Biorremediación *In Situ*.**

El suelo contaminado y lugar de ejecución fue proporcionado por una empresa dedicada a la colecta y confinamiento de residuos químicos peligrosos. Omitiremos sus datos por acuerdo mutuo, más información acerca de esta empresa y su modus operandi puede ser solicitada vía directora del proyecto (Dra. Elva T. Aréchiga Carvajal, elva.arechigacr@uanl.edu.mx).

El suelo fue caracterizado mediante la técnica de Black y Dinauer, 1965 en donde se determinó la textura, esto es utilizando una probeta de 100 mL con 20 g de suelo y 20 mL de agua, posteriormente se agito vigorosamente y dejo reposar hasta que las partículas se sedimentaran por tamaño, el resultado fue medido con la graduación de la probeta para registrar en porcentaje la cantidad de arena, limo y arcilla. Otros datos físicos y químicos

que se obtuvieron fueron la estructura, consistencia, drenaje, color, profundidad, pH, rocosidad, pedregosidad, porcentaje de inclinación, porosidad y el porcentaje de humedad.

Se construyeron celdas de tratamiento utilizando charolas de plástico comerciales de capacidad de 5 L en donde se dispusieron 2 kg de suelo contaminado con 30% de aserrín como agente abultante, 4 g de urea granular (2 g/kg) y 30% de agua (Sarkar *et al.* 2005). Una vez homogenizado esto se inoculó por aspersion al consorcio degradador CMic 4 en una cantidad de 1×10^3 cel/g.

A partir de ese momento se dio inicio al sistema de biorremediación en donde se mantuvieron las condiciones de humedad (determinación visual), se monitoreaba el pH usando papel indicador (Machery Nagel) y se administraba una homogenización mecánica por cinco minutos durante 31 días (Ledezma-Villanueva, 2015). La temperatura durante el ensayo fue ambiental. Otra celda de tratamiento se designó para correr un control en el que se estimuló con aserrín, agua y urea pero no se inoculó a CMic 4.

Cada cinco días, las celdas fueron muestreadas para determinar la cantidad de contaminante y variación de los microorganismos, para realizar el muestreo se utilizó contenedores de vidrio de boca ancha y sello de teflón junto con espátulas de acero inoxidable.

Para determinar la degradación de hidrocarburos se utilizó un equipo Retorta de 50 mL (Fann) en el que se ensamblaron sus componentes de acuerdo a lo especificado por el fabricante, se colocó suelo en la cámara de destilación y se elevó la temperatura a 900°C , durante este proceso, la totalidad de los hidrocarburos y agua fue recuperada en una probeta de 50 mL, los valores obtenidos con respecto al peso del suelo húmedo y seco se ingresaron en la siguiente formula especificada por el fabricante:

$$\%Volumen = 100X \frac{V(\text{mL}) \text{ de aceite o agua recuperado}}{P(\text{g}) \text{ suelo}}$$

Después el porcentaje de volumen obtenido fue convertido a partes por millón (mg del contaminante/kg de suelo).

Las determinaciones de hidrocarburos se realizaron por triplicado, obteniendo así un promedio y una desviación estándar que se graficó en el programa computacional Microsoft

Office Excel. Estos mismos datos fueron procesados con un algoritmo natural que permitió de nuevo graficarlos y ahora realizar una regresión lineal que mediante la ecuación de la recta determina la tasa de degradación durante el proceso (Ks). Una nueva grafica de los tiempos que más se diferencian de la recta fue realizada con el fin de visualizar las diferentes etapas de la biorremediación logradas por diferentes microorganismos (Villarreal-Chiu *et al.* 2014)

Extracción de ADN en suelo

Conforme la determinación de hidrocarburos se fue realizando, así mismo la extracción de ADN en el suelo, este procedimiento se estableció bajo el siguiente protocolo modificado de Ranjard *et al.* (2012):

1. Después de homogenizar el suelo, colocar 1 gramo en 1 tubo falcon de 25 mL estéril, enseguida de esto agregar 3 mL de buffer NTES y agitar en vortex hasta mezclar por completo.
2. Se llevó a sonicación por 10 minutos con un nivel 5.
3. Después se centrifugó la muestra a 4,500 rpm por 10 minutos.
4. Posteriormente se recuperó la fase líquida en tubos eppendorf (500 µL/tubo).
5. Seguido a esto se realizó la extracción fenólica con un volumen de fenol/cloroformo 1:1 y se mezcló en vortex (Thermolyne), tras obtener una mezcla homogénea y de aspecto lechoso se procedió a centrifugar a 13,000 rpm por 5 segundos.
6. Se separó la fase acuosa y se transfirió a un tubo limpio.
7. Se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio y se agregaron 2 volúmenes de etanol frío absoluto y 0.1 volumen de acetato de amonio 3 M, se mezcló por inversión y se incubó por 20 minutos a una temperatura de -20°C
8. Esta mezcla se centrifugó por 5 minutos a 13,000 rpm a 4°C, después se limpió el pellet en alcohol etílico al 70% para volver a centrifugar como anteriormente se hizo.
9. Se separó la pastilla del alcohol por decantación y se secó a temperatura ambiente durante 30 minutos
10. Por último se re suspendió la pastilla de ADN en 40 µL de buffer TE

PCR durante la degradación de hidrocarburos

La técnica se llevó a cabo con la enzima GoTaq® DNA Polymerase bajo las siguientes cantidades de reactivos especificadas en la Tabla siguiente.

Tabla 9 Reactivo y volumen

Reactivo	Volumen μL
Buffer 10x	2.5
MgCl ₂	1.25
dNTPs	0.5
GoTaq	0.25
ADN	0.5
Oligo Forward	0.5
Oligo Reversa	0.5
H ₂ O	6.5
Total de volumen	12.5

Un volumen de 10 μL fue agregado al total de la reacción para evitar la evaporación de la muestra. Las condiciones de amplificación fueron 1 Ciclo 95°C 10 minutos, 45 ciclos: 95°C 10 segundos, 50°C 10 segundos, 72°C 20 segundos, 1 ciclo 72°C 5 minutos en termociclador MJ RESEARCH INC., PTC-100

- **ETAPA III**
- ✓ **Secuenciación masiva.**

Cuatro muestras de ADN extraído del suelo (tiempo 1, 2,5 y 6) fueron llevados a un análisis de secuenciación masiva de ADN genómico. El material genético fue purificado con el kit PrepEase Genomic DNA Isolation (USB) y secuenciado en MySeq (Illumina) en la empresa Biotech del Norte (www.biotechdelnorte.com)

- **ETAPA IV**
- ✓ **Ensayo de fertilidad del suelo**

Los suelos bajo tratamiento (CMic 4 y control) fueron llevados a un total de 50 días de degradación (los resultados solo muestran 30 días, esto fue bajo especificación del cliente) en los que se dispusieron en recipientes separados 10 lombrices de tierra por triplicado (30 lombrices en total para cada tratamiento) en ambos suelos (60 lombrices en total en ambos suelos). Las lombrices de tierra fueron lavadas con agua para después dejarlas reposando en papel filtro donde los individuos vaciaron el tracto intestinal. Enseguida las lombrices fueron pesadas individualmente y colocadas en los recipientes correspondientes. Nuevas determinaciones de peso fueron realizadas a los 7 y 14 días. (Cuevas-Díaz *et al.*, 2008).

RESULTADOS

○ Caracterización del consorcio microbiano CMic 4

Después de caracterizar por pirosecuenciación el consorcio se obtuvo la siguiente información con los géneros y especies más representativas

Ilustración 2 Los géneros que predominan son *Pseudomonas spp.* (34%), *Ochrobactrum spp.* (28%) y *Alcaligenes spp.* (17%). En una pequeña cantidad (0.5%) se encuentra el Genero *Bacillus spp.*

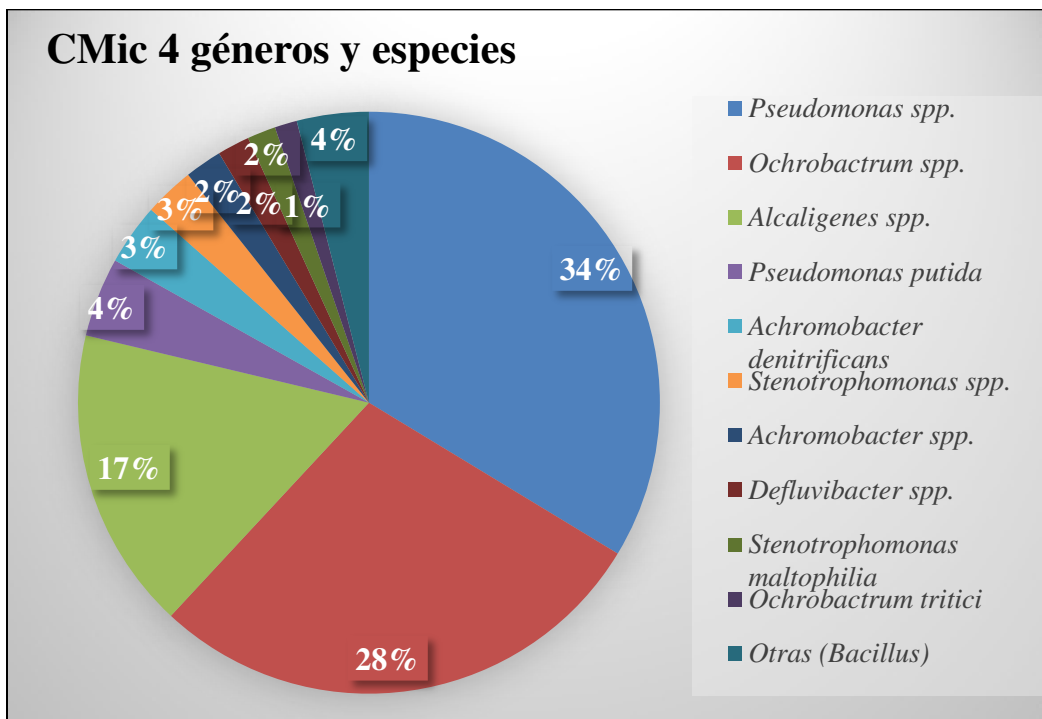


Tabla 10 Listado completo de géneros y especies en CMic 4

No.	Género y especie	Porcentaje
1	<i>Enterobacter spp.</i>	0.03443526
2	<i>Rhodanobacter spp.</i>	0.03443526
3	<i>Sinorhizobium spp.</i>	0.03443526
4	<i>Brucella spp.</i>	0.03443526
5	<i>Enterococcus spp.</i>	0.03443526
6	<i>Pusillimonas terrae</i>	0.03443526
7	<i>Ochrobactrum cytisi</i>	0.03443526
8	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.03443526
9	<i>Xanthomonas spp.</i>	0.03443526
10	<i>Aeromonas spp.</i>	0.03443526
11	<i>Ensifer spp.</i>	0.03443526
12	<i>Janthinobacterium spp.</i>	0.06887052
13	<i>Bordetella spp.</i>	0.06887052
14	<i>Solomonas fluorantheni</i>	0.10330579
15	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0.17217631
16	<i>Ochrobactrum pseudogrignonense</i>	0.20661157
17	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0.24104683
18	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	0.27548209
19	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	0.30991736
20	<i>Bacillus spp.</i>	0.56954257
21	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0.61983471
22	<i>Arthrobacter spp.</i>	0.61983471
23	<i>Defluviobacter lusatiensis</i>	0.92975207
24	<i>Ochrobactrum tritici</i>	1.23966942
25	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1.58402204
26	<i>Defluviobacter spp.</i>	1.79063361
27	<i>Achromobacter spp.</i>	2.0661157
28	<i>Stenotrophomonas spp.</i>	2.7892562
29	<i>Achromobacter denitrificans</i>	3.40909091
30	<i>Pseudomonas putida</i>	4.4077135
31	<i>Alcaligenes spp.</i>	16.8044077
32	<i>Ochrobactrum spp.</i>	28.2369146
33	<i>Pseudomonas spp.</i>	33.677686

Gráfica 2 Se presentan otras clases bacterianas que también integran al consorcio pero estas no completaron un nivel de identidad superior al 90%

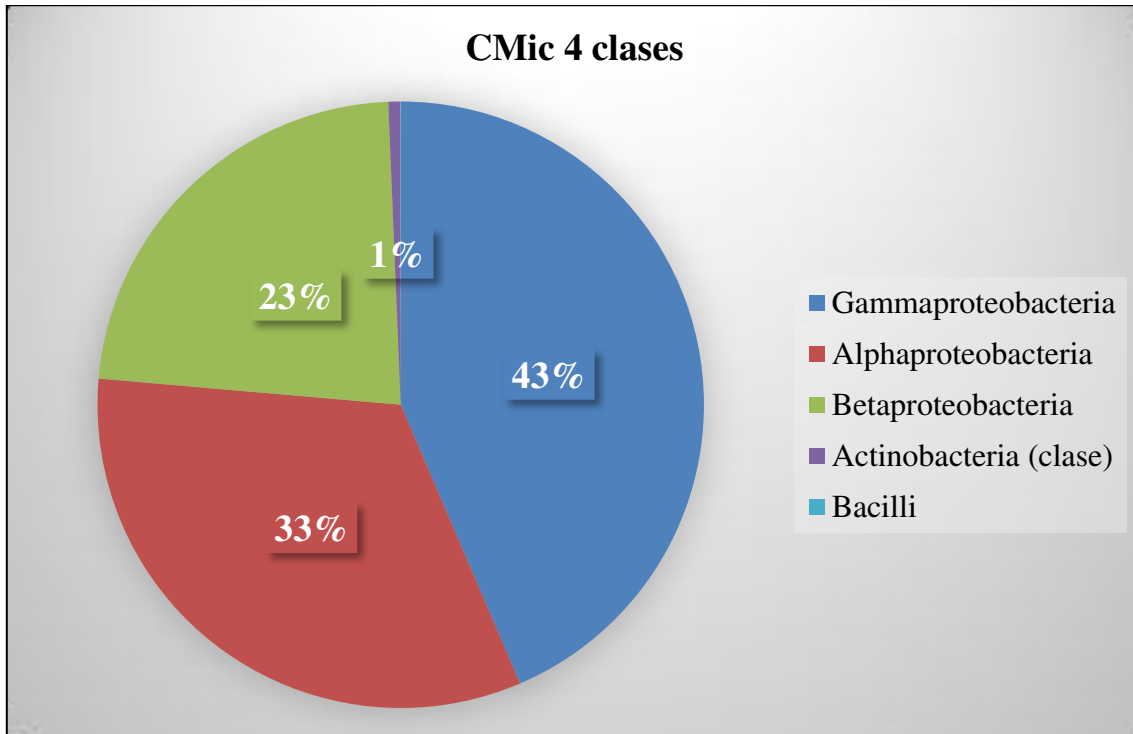
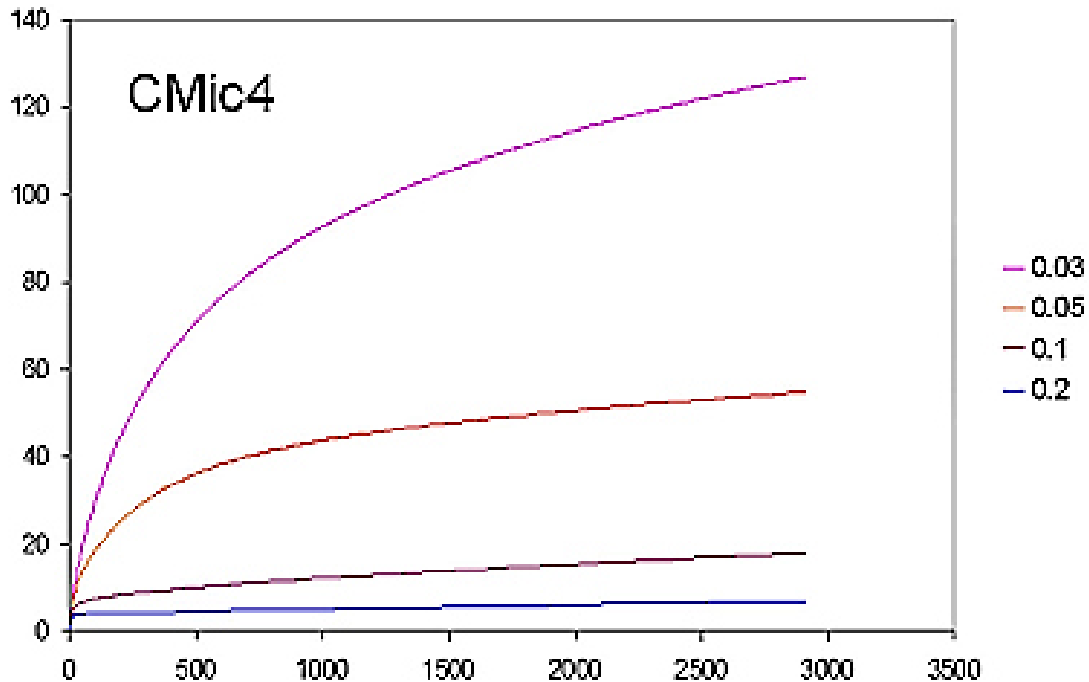


Tabla 11 listado completo de clases bacterianas encontradas en CMic 4

Nombre de la clase	Porcentaje
Gammaproteobacteria	43.56061
Alphaproteobacteria	32.8168
Betaproteobacteria	22.96832
Actinobacteria	0.619835
Bacilli	0.034435

Gráfica 3 Curva de refracción de las unidades transcripcionales operacionales (OTUs)



Esta grafica describe que tan abundante es la diferencia de géneros dentro del consorcio microbiano la cual se puede visualizar al ver que tan alejadas están los porcentajes de géneros encontrados. En el eje de X encontramos a la cantidad de Unidades Transcripcionales Operativas (OTUs) en el eje de las Y tenemos el valor de Shannon encontrado.

Tabla 12 valores de Shannon, Equidad y Dominancia reportados

Muestras de suelo (CMic 4)	Shannon	Equidad	Dominancia
Comunidad A	3.359	0.961	0.076
Comunidad B	3.014	0.961	0.091

○ Resultados Etapa II

En esta imagen se pueden observar ambos suelos siendo bioestimulados. El tratamiento con CMic 4 corresponde a las imágenes 1a y 3a mientras que el control negativo se observa en las imágenes 2a y 4a. Durante ambas estimulaciones se mantuvieron condiciones de temperatura ambientales (25 a 40 °C), el pH se mantuvo estable (6.5-6.8), la cantidad de agua se mantuvo en un 30% con respecto al volumen total de suelo (2kg) y la oxigenación se proporcionó mecánicamente con espátulas de acero inoxidable.

Imagen 1 Proceso de estimulación de suelo.

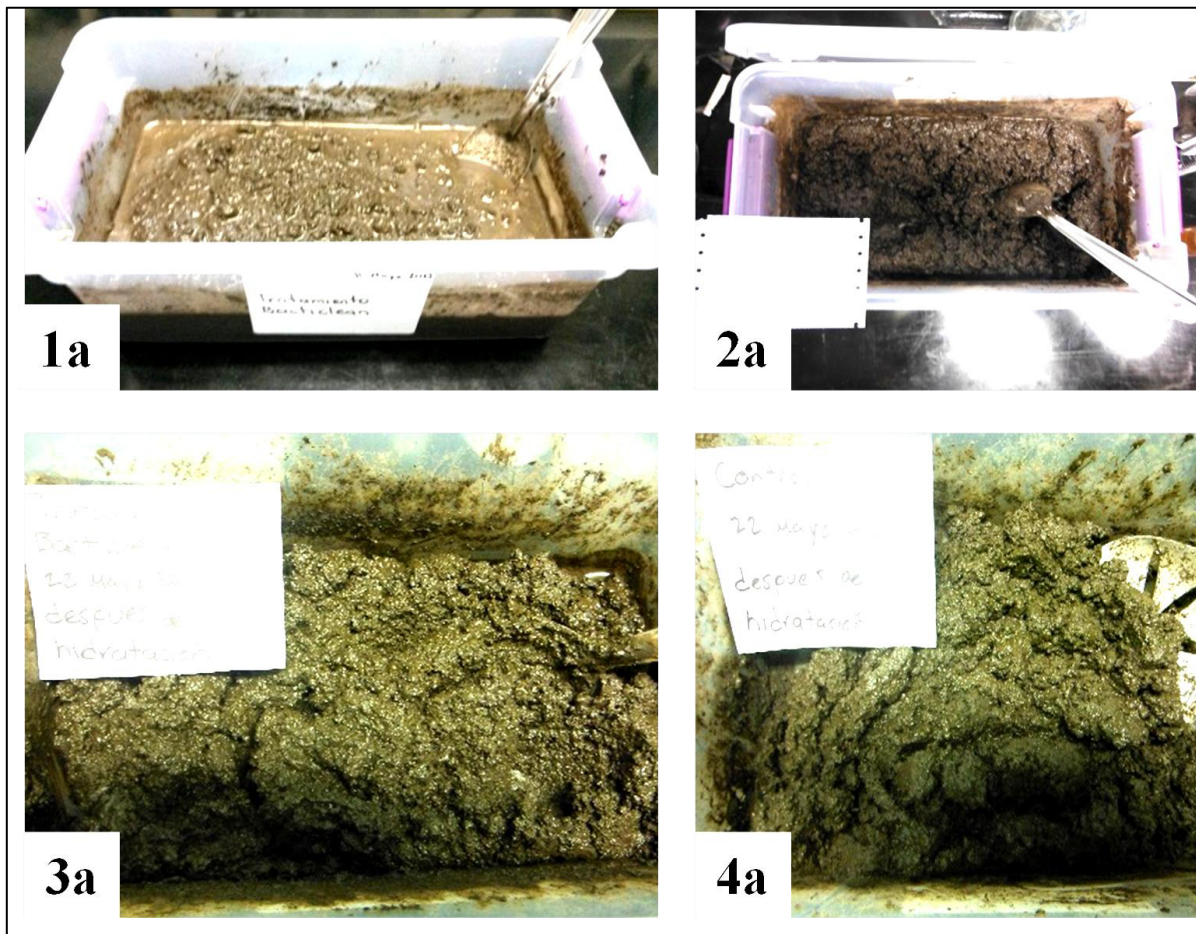
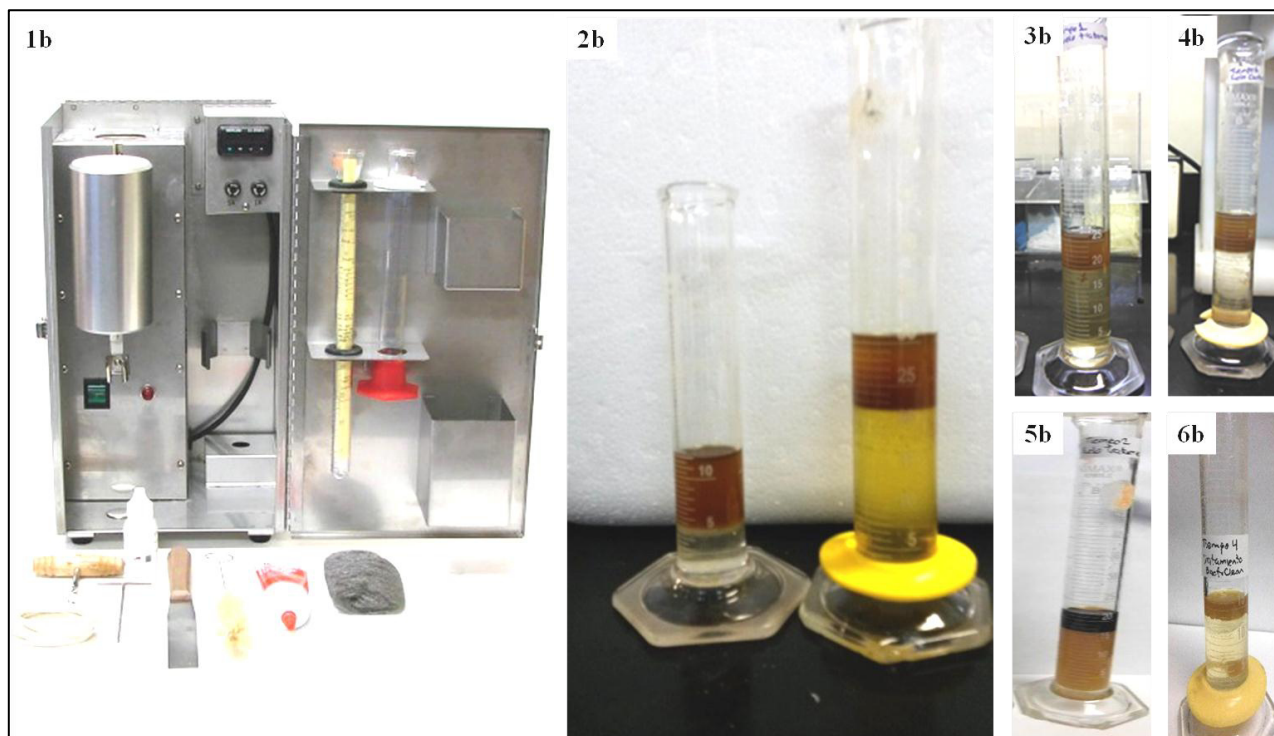


Imagen 2 Determinaciones de hidrocarburos mediante equipo Retorta

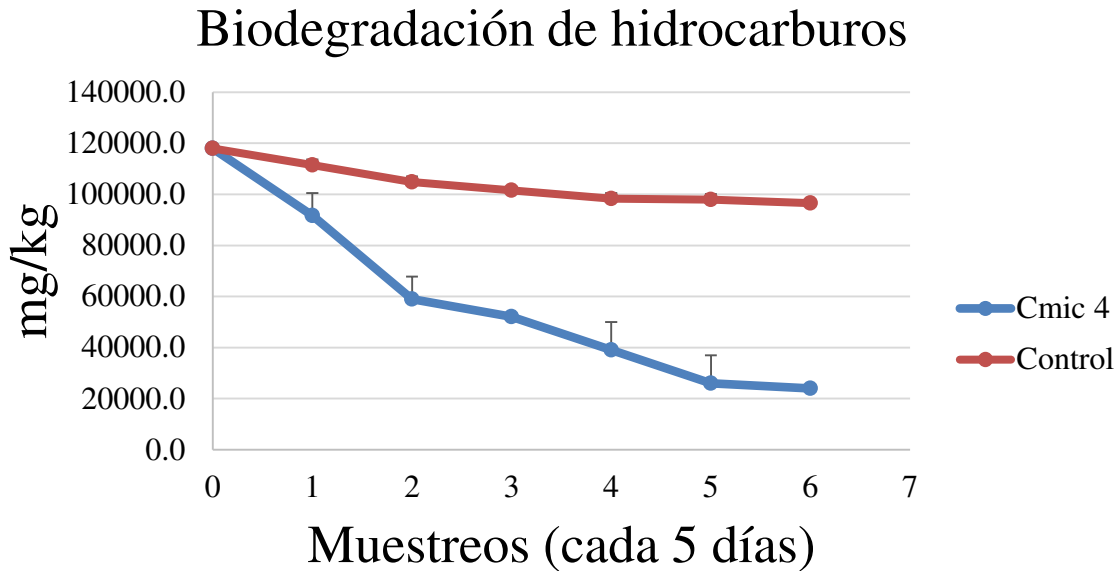


El equipo Retorta (1b) consta de una cámara de combustión donde se deposita el suelo que se desea analizar y se calienta a 900°C, provocando una volatilización del agua e hidrocarburos presentes, estos son recuperados y cuantificados para después ser reportados en partes por millón (mg/kg). Las primeras determinaciones de hidrocarburos (2b) mostraron las mismas cantidades para ambos suelos y conforme avanzó el tratamiento se fue observando una disminución de estos para el tratamiento con CMic 4 (5b y 6b) que en el control negativo (3b y 4b).

Tabla 13 características físico-químicas del suelo

Característica	Valor	Característica	Valor
Textura	Arcilloso	pH	6.8
Estructura	Blocoso angular	Rociedad	Sin
Consistencia	Dura	Pedregosidad	Sin
Drenaje	Lento	Porcentaje de inclinación	0-3
Color Munsell	5YR 2.5/2	Porosidad	10%
Profundidad	>50 cm	Humedad (antes del trat.)	10%

Gráfica 4 biodegradación de hidrocarburos alcanzada por CMic 4



En esta grafica de dispersión XY se demuestra en línea azul la biodegradación de hidrocarburos alcanzada por CMic 4 la cual comenzó en una cantidad de 118,000 ppm (mg/kg) y en un lapso de 30 días disminuyo hasta 24,030 ppm. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado con un equipo retorta. Para la línea roja (control negativo) la cantidad de hidrocarburos disminuyó hasta 96,530 ppm y también fue determinada por triplicado por retorta. La disminución de hidrocarburos entre un muestreo y otro presenta diferencia después del segundo muestreo (10 días) y después del quinto muestreo (25 días), mientras que en el control negativo esta disminución se observa constante pero escasa.

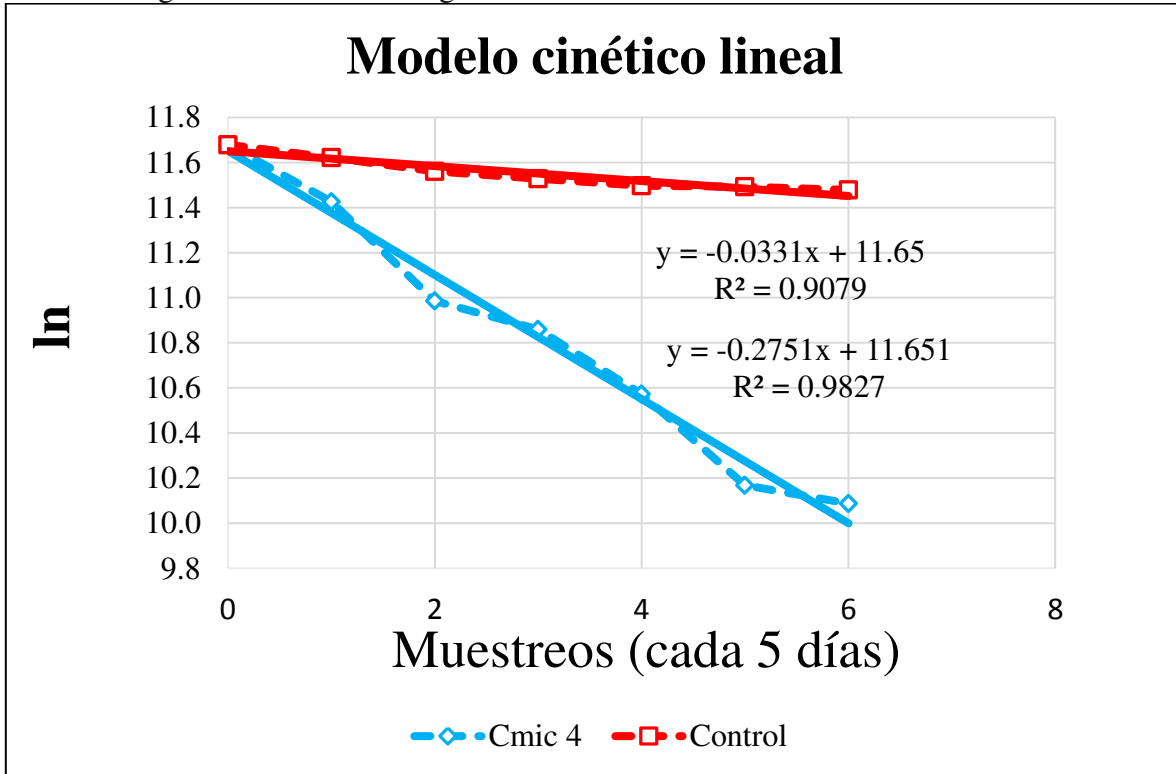
Tabla 12 Valores de la degradación de hidrocarburos

TIEMPO	CMic 4 (mg/kg)	PROMEDIO CMic 4	ERROR (desv. est/ $\sqrt{3}$)	CONTROL	PROMEDIO CONTROL	ERROR (desv. est/ $\sqrt{3}$)
0	118000	118000.0	68127.3	118000	118000.0	0.0
	118000			118000		
	118000			118000		
1	91700	91703.7	0.0	111444	111442.3	2185.3
	91705			111442		
	91706			111441		
2	59000	59003.7	0.0	104880	104881.0	2185.7
	59005			104881		
	59006			104882		
3	52000	52002.0	52945.1	101500	101501.0	0.9
	52002			101501		
	52004			101502		
4	39000	39002.7	0.0	98333	98334.3	2187.2
	39004			98334		
	39004			98336		
5	26000	26001.3	0.0	97900	97903.0	2186.8
	26001			97903		
	26003			97906		
6	24000	24002.0	34065.8	96500	96503.0	0.6
	24003			96503		
	24003			96506		

En esta tabla se enlistan los valores obtenidos por triplicado de la degradación de hidrocarburos con los cuales se ensambló la gráfica 4 y 5. Los valores reportados en la columna CMic 4 son las determinaciones de partes por millón (mg/kg) por triplicado de hidrocarburos en el suelo, el promedio es la suma de esos tres valores dividido entre tres, dando como resultado los valores de la gráfica 4 y el error es la desviación estándar de los

tres valores dividido entre la raíz cuadrada del total de números (3) para así visualizar las barras de error en la misma.

Grafica 5 regresión lineal de la degradación

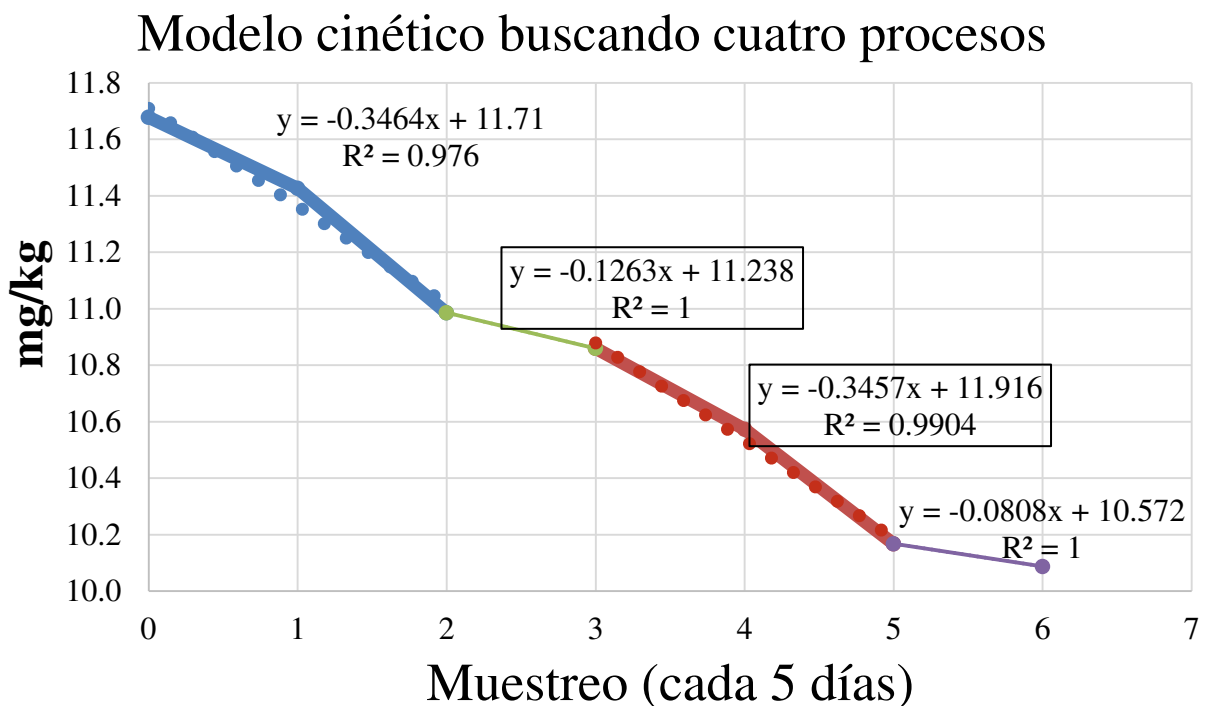


La regresión lineal consta de una operación matemática en donde al valor graficado (promedio de las lecturas) se le aplica un logaritmo natural (ln) obteniendo esta nueva grafica en donde se observa a CMic 4 (azul) que tiene una tasa de degradación de 27.51%, esto quiere decir que cada 5 días, el proceso de biorremediación disminuía la cantidad de hidrocarburos en dicha cantidad, mientras que para el control negativo la disminución de contaminante fue de únicamente 3.37%.

Tabla 13 Valores de la regresión lineal, Estos valores fueron calculados a partir de aplicar logaritmo natural (ln) en el promedio de las determinaciones y posteriormente graficarlos.

Tiempo	CMic 4	Control
0	11.7	11.7
1	11.4	11.6
2	11.0	11.6
3	10.9	11.5
4	10.6	11.5
5	10.2	11.5
6	10.1	11.5

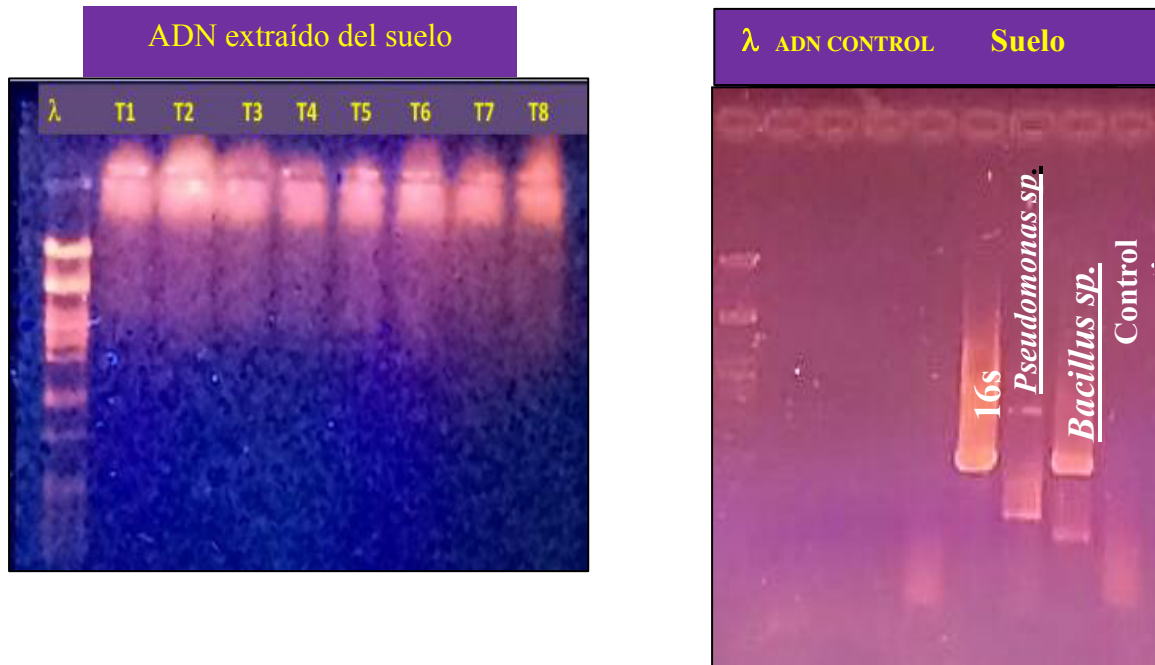
Gráfica 5 Regresión lineal de los primeros 10 días



Esta grafica tiene como propósito diferenciar en CMic 4 los muestreos que tienen diferente tendencia (no lineales) y en cada uno de estos se observan similares Ks, en azul se muestra la regresión lineal de los primeros 10 días en donde la degradación es de 34.64%, en verde se reduce esta cantidad a 12.63% para después volverse a acelerar en la línea roja a 34.57% y de nuevo disminuir a 8%.

○ **Resultados etapa III**

Ilustración 3 ADN genómico



El ADN genómico que se extrajo durante el proceso de biorremediación tuvo buena lectura en NanoDrop y buena visualización en gel de agarosa. Este ADN de los diferentes muestreos fue sometido a PCR bajo las condiciones especificadas dando como resultado la amplificación de las sondas específicas para *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.* y el control positivo 16s, como control negativo se agregó a la reacción ADN de la bacteria *Eschechichia coli* que no amplificó. Los resultados fueron negativos para la sonda de *Ochrobactrum spp.*

○ **Resultados secuenciación masiva**

Estos resultados están siendo procesados en la empresa BioTech del Norte S.A. de C.V. La entrega de estos está programada para finales de diciembre del 2015. Debido a la necesidad de cumplir la entrega a tiempo de este documento se dejará pendiente la confirmación de los microorganismos detectados a diferentes tiempos, estos deben incluir a los principales integrantes del consorcio (*Pseudomonas spp.*, *Ochrobactrum spp.* y *Alcaligenes spp.*) junto

a cualquier otro género que se hubiese encontrado nativamente en el suelo. Una vez entregados los resultados, serán reportados en una publicación científica del año 2016.

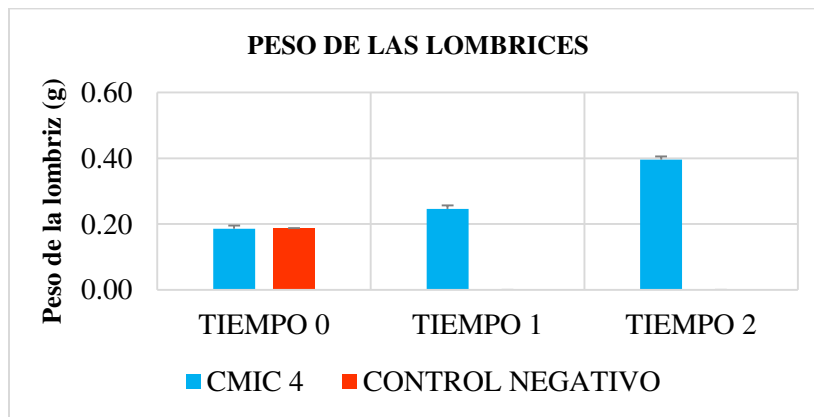
○ **Resultados etapa IV**

Imagen 3 proceso del ensayo de fertilidad del suelo



Las lombrices fueron lavadas y reposadas (1c) para después ser pesadas (2c) y colocadas en los diferentes recipientes para observar su crecimiento durante 14 días (3c).

Gráfica 6 Desarrollo de *Eisenia foetida* en suelo.



La lombriz de tierra *Eisenia foetida* logró aumentar su peso después de 14 días de exposición ante el suelo descontaminado (barras azules) mientras que en el suelo del control negativo estas no sobrevivieron.

Tabla 14 Valores del peso de las lombrices

	LOMBRICES EN SUELO CMIC4 (g)			LOMBRICES EN SUELO CONTROL (g)		
	REP. 1	REP. 2	REP. 3	REP. 1	REP. 2	REP. 3
TIEMPO 0	0.23	0.13	0.23	0.17	0.25	0.21
	0.21	0.21	0.11	0.25	0.21	0.2
	0.25	0.19	0.20	0.20	0.23	0.12
	0.19	0.15	0.15	0.19	0.33	0.16
	0.28	0.18	0.17	0.12	0.22	0.18
	0.10	0.14	0.15	0.16	0.21	0.15
	0.13	0.23	0.29	0.17	0.23	0.17
	0.17	0.20	0.21	0.14	0.21	0.14
	0.18	0.15	0.25	0.15	0.22	0.16
PROMEDIO DESV. EST. ERROR	0.18	0.18	0.194	0.17	0.23	0.162
	0.05			0.05		
	0.01			0.01		
TIEMPO 1	0.23	0.21	0.22	0	0	0
	0.20	0.22	0.27	0	0	0
	0.15	0.23	0.23	0	0	0
	0.21	0.24	0.22	0	0	0
	0.16	0.24	0.26	0	0	0
	0.37	0.26	0.25	0	0	0
	0.36	0.29	0.26	0	0	0
	0.40	0.25	0.24	0	0	0
	0.18	0.26	0.22	0	0	0
PROMEDIO DESV. EST. ERROR	0.25	0.25	0.242	0	0	0
	0.05			0		
	0.01			0		
TIEMPO 2	0.32	0.35	0.37	0	0	0
	0.48	0.32	0.42	0	0	0
	0.41	0.33	0.44	0	0	0
	0.30	0.4	0.39	0	0	0
	0.48	0.36	0.45	0	0	0
	0.45	0.32	0.44	0	0	0
	0.48	0.35	0.4	0	0	0
	0.42	0.4	0.45	0	0	0
	0.38	0.39	0.39	0	0	0
PROMEDIO DESV. EST. ERROR	0.42	0.36	0.409	0	0	0
	0.05			0		
	0.01			0		

DISCUSIONES

La determinación de microorganismos mediante estrategias moleculares tiene una alta incidencia en las investigaciones de biorremediación (Sun *et al.* 2015, Armani *et al.* 2015). Dichas técnicas se basan en la buena extracción de material genético (ADN) y la implementación de sondas específicas (Wilson *et al.* 1999, Lloyd *et al.* 1999, Watanabe *et al.* 1998, Yeates *et al.* 2000, Lloyd *et al.* 1999, Hedlund *et al.* 1999, Bakermans *et al.* 2002, Hamann *et al.* 1999, Cavalca *et al.* 1999, Meyer *et al.* 1999, Widada *et al.* 2002, Widada *et al.* 2002, Kitagawa *et al.* 2001, Duarte *et al.* 2001). En los resultados obtenidos el ADN genómico extraído mediante una modificación a las técnicas mecánicas y químicas resulto ser de buena calidad para los procesos de PCR y secuenciación masiva, teniendo así una herramienta de fácil implementación y rápidos resultados en los procesos de biorremediación *In Situ*. Diferentes autores (Burbach *et al.* 2015, Wagner *et al.* 2015, Santos *et al.* 2015) basan sus estrategias de extracción mediante kits, los cuales tienen un alto costo y no demuestran resultados con diferencia significativa, más si facilitan el mecanismo de trabajo. La cantidad de especies reportadas es mucho más abundante que los métodos microbiológicos tradicionales que incluyen la dilución de la muestra en solución salina y siembra en medios de cultivo específicos (agar LB, agar nutritivo, agar PDA) en donde se reportaban únicamente 6 colonias diferentes (Ledezma-Villanueva *et al.* 2015), en cambio la técnica de pirosecuenciación dio como resultado 33 géneros bacterianos, esto gracias a los equipos de secuenciación que detectan las millones de hibridaciones de ADN y también a la gran base de datos con las que se cuenta en la actualidad en donde se comparan las secuencias obtenidas, dando como resultado final un panorama más real de la comunidad que habita a la muestra. En los resultados obtenidos los géneros de *Pseudomonas*, *Ochrobactrum*, *Alcaligenes* y *Bacillus* han sido reportados anterior y recientemente en los procesos de biorremediación (Bezza y Chirwa, 2015, Demakov *et al.* 2015, Zhu *et al.* 2015, Leite *et al.* 2015) teniendo así gran concordancia con el proceso realizado.

El proceso de biorremediación *In Situ* mediante Landfarming es un proceso en el que se estimulan a microorganismos nativos e inducidos para utilizar a los hidrocarburos presentes en un suelo como fuente de carbono (Margesin *et al.* 2000) este proceso ha sido

ampliamente descrito y se ha especificado la adición de nutrientes específicos (dietilfosfato, butilfosfato) en estado físico gaseoso, con la finalidad de incrementar el tiempo de degradación del contaminante. En nuestros resultados se utilizó urea sólida (2g/kg) como fuente de nitrógeno y fósforo, la cual no es reportada como la mejor opción, aun así el consorcio CMic 4 muestra una alta tasa de degradación ($K_s=27.5\%$) lo cual facilita el trabajo en campo ya que la urea sólida es un reactivo barato y de fácil manejo. Este buen resultado de degradación no sería posible con otro tratamiento (control negativo) ya que el consorcio CMic 4 ha demostrado tener una gran actividad metabólica y enzimática (Bisht *et al.* 2013). En la gráfica 5 y 6 (modelos cinéticos) se visualizan diferentes etapas de degradación, esto coincide con diferentes autores (Dados *et al.* 2014, Seklemova *et al.* 2001, El Fantroussi y Agathos 2005, Delille y Coulon 2008, Nikolopoulou y Kalogerakis 2009, Liu *et al.* 2010) quienes repetidas veces han asociado estos cambios de velocidad de degradación de contaminantes con la participación de diferentes géneros de la comunidad inducida en el proceso de biorremediación. Durante nuestro proceso, se tiene evidencia mediante las sondas específicas (imagen 4) que el género *Pseudomonas* está presente durante todo el tiempo del proceso pero también lo está el género *Bacillus* que en un principio se reportó como un microorganismo que no tenía gran abundancia en el consorcio. Por esta situación, el presente trabajo tendrá que ser complementado con una técnica molecular de PCR tiempo real que podrá cuantificar la cantidad de amplificaciones de los géneros y así establecer una relación de actividad metabólica, así mismo los resultados por llegar de secuenciación masiva durante el proceso complementaran esta información al enlistar nuevos géneros del propio consorcio o microorganismos nativos que se hallan sumado al proceso.

Las publicaciones científicas deben incluir métodos analíticos cuantitativos específicos (Singh *et al.* 2009), la implementación de equipos portátiles para la determinación de hidrocarburos como en este caso es el equipo Retorta tendrá que ser complementado con determinaciones en cromatografía de gases para tener una concordancia de resultados y poder así cumplir los requisitos de publicación, sin embargo tenemos que los procesos de biorremediación en campo deben de ser monitoreados con este tipo de herramientas que determinen al momento la actividad metabólica del proceso y así continuar o corregir factores bióticos (microorganismos) o abióticos (temperatura, humedad, oxigenación y pH).

Para muestras altamente contaminadas con hidrocarburos (>100,000 mg/kg) el equipo retorta determina el buen funcionamiento del proceso de biorremediación.

Existen diferentes organismos catalogados como bioindicadores, de los que se pueden destacar a los copépodos, plantas y nematodos (Ladhar-Chaabouni *et al.* 2015). La lombriz de tierra es un organismo sensible a la contaminación y puede así demostrar el buen estado de un suelo (Van Gestel *et al.* 1992). Durante el ensayo de toxicidad realizado, los individuos de *Eisenia fetida* fueron expuestos al suelo resultante ya finalizado el proceso de biorremediación. Las lombrices del suelo del control negativo no sobrevivieron debido a la persistencia del contaminante mientras que las del suelo en donde se aplicó la estimulación de CMic 4 lograron incrementar su peso (grafica 7). Resultados similares son reportados por la empresa IBACON y otros autores (Cuevas-Díaz *et al.* 2008, El-Temsah *et al.* 2015) quienes recomiendan el uso de estos organismos para comprobar la fertilidad y biodisponibilidad de nutrientes en el suelo restaurado.

CONCLUSIONES

El consorcio microbiano CMic 4 presenta abundancia de géneros bacterianos los cuales pueden ser detectados en los procesos de biorremediación mediante la extracción estandarizada de ADN en suelo, una vez teniéndolo es posible conocer los géneros responsables del proceso usando primers específicos.

Mediante un proceso de biorremediación por landfarming en el que se estimula con urea solida (2g/kg), 30% de agua y agitación mecánica es posible llegar a una alta tasa de degradación (27.5% de remoción cada 5 días) en suelos altamente contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).

Mediante una regresión lineal (ln) en los datos obtenidos de la disminución del contaminante es posible visualizar diferentes constantes de degradación (Ks), estas constantes están relacionadas con el incremento de géneros específicos que integran al consorcio y pueden ser confirmadas mediante una secuenciación de ADN extraído del suelo a el tiempo específico de la biodegradación.

El resultado del proceso de biorremediación realizado es un suelo en el que las especies pueden desarrollarse, esto gracias a los resultados de supervivencia e incremento de peso en lombrices de tierra *Eisenia fetida*.

BIBLIOGRAFIA

Acuña-Askar, K., Gracia-Lozano, M., Villarreal-Chiu, J., Marmolejo, J., Garza-Gonzalez, M., & Chavez-Gomez, B. (2005). Effect of soil and a nonionic surfactant on BTE-oX and MTBE biodegradation kinetics. *Water Science & Technology*, 52(8), 107-115.

Atlas RM (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev* 45:180–209.

Bahme JB, Schroth MN, Van Gundy SD, Weinhold AR, Tolentino DM (1988) Effect of inocula delivery systems on rhizobacterial colonisation of underground organs of potato. *Phytopathology* 78:534–542.

Bakermans, C., and E.L. Madsen. 2002. Diversity of 16S rDNA and naphthalene dioxygenase genes from coal-tar-waste-contaminated aquifer waters. *Microb. Ecol.*44: 95-106.

Bezza, F. A., & Chirwa, E. M. N. (2015). Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere*, 144, 635-644.

Bisht, S., Pandey, P., Bhargava, B., Sharma, S., Kumar, V., & Sharma, K. D. (2015). Bioremediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 7-21.

Black, C. A., Evans, D. D., & Dinauer, R. C. (1965). *Methods of soil analysis* (Vol. 9, pp. 653-708). Madison, WI: American Society of Agronomy.

Bogan BW, Lahner LM, Trbovic V, Szajkovic AM, Paterek JR (2001) Effects of alkylphosphates and nitrous oxide on microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 67:2139–2144.

Bogan BW, Lahner LM, Trbovic V, Szajkovic AM, Paterek JR (2001) Effects of alkylphosphates and nitrous oxide on microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 67:2139–2144.

Burbach, K., Seifert, J., Pieper, D. H., & Camarinha-Silva, A. (2015). Evaluation of DNA extraction kits and phylogenetic diversity of the porcine gastrointestinal tract based on Illumina sequencing of two hypervariable regions. *MicrobiologyOpen*.

Cavalca, L., A. Hartmann, N. Rouard, and G. Soulas. 1999. Diversity of *catA* genes: distribution and polymorphism among 2,4-dichloroacetic acid degrading soil bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 45-58.

Cerniglia CE (1984) Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Appl Microbiol* 30:31-71.

Cerniglia CE (1997) Fungal metabolisms of polyaromatic hydrocarbons; past, present and future implication in bioremediation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19:324-333.

Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris RJ, Kulam-SyedMohideen AS, McGarrell DM, Marsh T, Garrity GM, Tiedje JM (2009) The ribosomal database project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 37[Suppl 1]: D141–D145.

Cuevas, D. M. C., C. Ferrera, L. E. Ríos y V. R. Rodríguez. 2006. Respuesta de *Eisenia andreaea* a TPH's y pireno en pruebas agudas. En: Congreso de Ecotoxicología y Química Ambiental. Memorias. 24-28 abril 2006. Puebla, pp. 78.

Dados A, Omirou M, Demetriou K, Papastephanou C, Ioannides IM (2014) Rapid remediation of soil heavily contaminated with hydrocarbons: a comparison of different approaches. *Ann Microbiol* 65:241–251.

Dejonghe W, Boon N, Seghers D, Top EM, Verstraete W (2001) Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness, missing links. *Environ Microbiol* 3:649–657.

Dejonghe W, Boon N, Seghers D, Top EM, Verstraete W (2001) Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness, missing links. *Environ Microbiol* 3:649–657.

Delille D, Coulon F (2008) Comparative mesocosm study of biostimulation efficiency in two different oil-amended sub-Antarctic soils. *Microb Ecol* 56:243–252.

Demakov, V. A., Vasil'ev, D. M., Maksimova, Y. G., Pavlova, Y. A., Ovechkina, G. V., & Maksimov, A. Y. (2015). Activated sludge bacteria transforming cyanopyridines and amides of pyridinecarboxylic acids. *Microbiology*, 84(3), 433-441.

Dowd SE, Callaway TR, Wolcott RD, Sun Y, McKeenan T, Hagevoort RG, Edrington TS (2008) Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol* 8:1–8.

Dowd SE, Zaragoza J, Rodriguez JR, Oliver MJ, Payton PR (2005) Windows NET network distributed basic local alignment search toolkit (W.ND-BLAST). *BMC Bioinformatics* 6:1–14.

Duarte, G.F., A.S. Rosado, L. Seldin, W. de Araujo, and J.D. van Elsas, 2001. Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (dsz) genes. *Appl. Environ. Microbiol.*67: 1052-1062.

Duineveld BM, Kowalchuk GA, Keijzer A, Van Elsas JD, Van Veen JA (2001) Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of *Chrysanthemum* via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 67:172–178.

Duineveld BM, Kowalchuk GA, Keijzer A, Van Elsas JD, Van Veen JA (2001) Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of *Chrysanthemum* via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 67:172–178.

El Amrani, A., Dumas, A. S., Wick, L. Y., Yergeau, E., & Berthomé, R. (2015). "Omics" Insights into PAH Degradation toward Improved Green Remediation Biotechnologies. *Environmental science & technology*, 49(19), 11281-11291.

El Fantroussi S, Agathos SN (2005) Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr Opin Microbiol* 8:268–275.

El-Temseh, Y. S., Sevcu, A., Bobcikova, K., Cernik, M., & Joner, E. J. (2015). DDT degradation efficiency and ecotoxicological effects of two types of nano-sized zero-valent iron (nZVI) in water and soil. *Chemosphere*, 144, 2221-2228.

Fawell JK, Hunt S (1988) The Polyaromatic hydrocarbons. In: JKFawell, S, Hunt (eds) *Environmental Toxicology: Organic Pollutants*. Ellis Harwood, West Sussex, pp. 241-269.

Feil, W. S. H., & Feil, H. (2004). Bacterial genomic DNA isolation using CTAB 2. *Joint Genome Institute, US Department of Energy, Walnut Creek, CA*. <http://jgi.doe.gov/collaborate-with-jgi/pmo-overview/protocols-sample-preparation-information>.

Gibson DT, Parales RE (2000) Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 11:236–243.

Gontcharova V, Youn E, Wolcott RD, Hollister EB, Gentry TJ, Dowd SE (2010) Black box chimera check (B2C2): a windows-based software for batch depletion of chimeras from bacterial 16S rRNA gene datasets. *Open Microbiol J* 11:47–52.

Guerin TF (1999) Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote polluted soil using ex situ land treatment. *J Hazard Mat* B65:305–315.

Halden RU, Tepp SM, Halden BG, Dwyer DF (1999) Degradation of 3-phenoxybenzoic acid in soil by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310(pPOB) and two modified *Pseudomonas* strains. *Appl Environ Microbiol* 65:3354–3359.

Hamann, C., J. Hegemann, and A. Hildebrandt. 1999. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *FEMS Microbiol. Lett.* 173: 255-263.

Hedlund, B.P., A.D. Geiselbrecht, J.B. Timothy, and J.T. Staley. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans*, sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 251-259.

Ishak HD, Plowes R, Sen R, Kellner K, Meyer E, Estrada DA, Dowd SE, Mueller UG (2011) Bacterial diversity in *Solenopsis invicta* and *Solenopsis geminata* ant colonies characterized by 16S amplicon 454 pyrosequencing. *Microb Ecol* 61:821–831.

Juhasz AL, Naidu R (1996) Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International J of Biodet Biodeg* 45:57-88.

Kawai M, Matsutera E, Kanda H, Yamaguchi N, Tani K, Nasu M (2002) 16S ribosomal DNA based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 68:699–704.

Kent AD, Triplett EW (2002) Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Ann Rev Microbiol* 56:211–236.

Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of microbiological methods*, 58(2), 169-188.

Kitagawa, W., A. Suzuki, T. Hoaki, E. Masai, and M. Fukuda. 2001. Multiplicity of aromatic ring hydroxylation dioxygenase genes in a strong PCB degrader, *Rhodococcus* sp. strain RHA1 demonstrated by denaturing gel electrophoresis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 1907-1911.

Kitts CL, Cunningham DP, Unkefer PJ (1994) Isolation of three hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine-degrading species of the family Enterobacteriaceae from nitramine explosive polluted soil. *Appl Environ Microbiol* 60:4608–4611.

Kleinstüber S, Riis V, Fetzer I, Harms H, Müller S. (2006) Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. *Appl Environ Microbiol* 72:3531–3542.

Krebs CJ (1994) *Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance*. Harper Collins, New York.

Ladhar-Chaabouni, R., & Hamza-Chaffai, (2015) A. The cell cultures and the use of haemocytes from marine molluscs for ecotoxicology assessment. *Cytotechnology*, 1-17.

Ledezma-Villanueva, A., Adame-Rodríguez, J. M., O'Connor-Sánchez, I. A., Villarreal-Chiu, J. F., & Aréchiga-Carvajal, E. T. (2015). Biodegradation kinetic rates of diesel-contaminated sandy soil samples by two different microbial consortia. *Annals of Microbiology*, 1-10.

Leite, G. G., Figueirôa, J. V., Mendes de Almeida, T. C., Valões, J. L., Marques, W. F., Duarte, M. D., & Gorlach-Lira, K. (2015). Production of Rhamnolipids and Diesel Oil Degradation by Bacteria Isolated from Soil Contaminated by Petroleum. *Biotechnology progress*.

Li Z, Xu J, Tang C, Wu J, Muhammad A, Wang H (2006) Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. *Chemosphere* 62:1374–1380.

Li Z, Xu J, Tang C, Wu J, Muhammad A, Wang H (2006) Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. *Chemosphere* 62:1374–1380.

Liu K, Ding X, Wang HF, Zhang X, Hozzein WN, Wadaan MA, Lan A, Zhang B, Li W (2014) Eukaryotic microbial communities in hypersaline soils and sediments from the alkaline hypersaline Huama Lake as revealed by 454 pyrosequencing. *Anton Leeuw* 105:871–880.

Lloyd-Jones, G., A.D. Laurie, D.W.F. Hunter, and R. Fraser. 1999. Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils. *FEMS Microbiol. Ecol.*29: 69-79.

Margesin R, Schinner F (2001) Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-polluted soil in an Alpine Glacier skiing area. *Appl Environ Microbiol* 67:3127–3133.

Margesin R, Zimmerbauer A, Schinner F (2000) Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* 40:339–346.

McCaig AE, Glover LA, Prosser JI (1999) Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Appl Environ Microbiol* 65:1721–1730.

Meador JP, Stein JE, Reichert WLet al.(1995) Bioaccumulation of polyaromatic hydrocarbon by marine organisms. *Review of Env Cont Toxicol* 79:143-145.

Mexicana, N. O., LAS, S. Y., & REMEDIACIÓN, E. P. S. C. Y. (2003). NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación.

Meyer, S., R. Moser, A. Neef, U. Stahl, and P. Kämpfer. 1999. Differential detection of key enzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiology* 145: 7131-1741.

Milcic-Terzic J, Lopez-Vidal Y, Vrvic MM, Saval S (2001) Detection of catabolic genes in indigenous microbial consortia isolated from a diesel-polluted soil. *Biores Technol* 78:47–54.

Mishra S, Jyot J, Kuhad RC, Lal B (2001) Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-polluted soil. *Appl Environ Microbiol* 67:1675–1681.

Nikolopoulou M, Kalogerakis N (2009) Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. *J Chem Technol Biotechnol* 84:802–807.

Osborne CA, Galic M, Sangwan P, Panssen PH (2005) PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. *Microb Lett* 248:183–187.

Plassart, P., Terrat, S., Thomson, B., Griffiths, R., Dequiedt, S., Lelievre, M., & Ranjard, L. (2012). Evaluation of the ISO standard 11063 DNA extraction procedure for assessing soil microbial abundance and community structure.

Riis V, Kleinstauber S, Babel W (2003) Influence of high salinities on the degradation of diesel fuel by bacterial consortia. *Can J Microbiol* 49:713–721.

Röling WFM, Milner MG, Jones DM, Lee K, Daniel F, Swannell RJP, Head IM (2002) Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 68:5537–5548.

Ruma R, Raja R, Ranjana Cet al.(2007) Degradation of polyaromatic hydrocarbons by mixed culture isolated from oil contaminated soil-A bioprocess engineering study. *Indian J Biotechnol* 6:107-113.

Samanta SK, Singh OV, Jain RK (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol* 20:243–248.

Santos, S. S., Nielsen, T. K., Hansen, L. H., & Winding, A. (2015). Comparison of three DNA extraction methods for recovery of soil protist DNA. *Journal of microbiological methods*, 115, 13-19.

Sarkar, D., Ferguson, M., Datta, R., & Birnbaum, S. (2005). Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental pollution*, 136(1), 187-195.

Schroth MN, Hildebrand DC (1964) Influence of plant exudates on root-infecting fungi. *Annu Rev Phytopathol* 2:101–132.

Sei K, Mori K, Kohno T, Maki H (2003) Development and application of PCR primers for monitoring alkane-degrading bacteria in a seawater microcosm during crude oil degradation process. *J Chem Eng Jpn* 36:1185–1193.

Seklemova E, Pavlova A, Kovacheva K (2001) Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation* 12:311–316.

Sikkema J, De Bont JAM, Poolman B (1995) Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbial Review* 59:201-222.

Singh, A., Kuhad, R. C., & Ward, O. P. (2009). *Advances in applied bioremediation* (pp. 1-19). Springer-Verlag.

Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Kaiser S, Roskot N, Heuer H, Berg G (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl Environ Microbiol* 67:4742–4751.

Stephen JR, Chang YJ, Gan YD, Peacock A, Pfiffner SM, Barcelona MJ, White DC, McNaughton SJ (1999) Microbial characterisation of a JP-4 fuel-contaminated site using a combined lipid biomarker/polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) – based approach. *Environ Microbiol* 1:231–241.

Stephen JR, Chang YJ, Gan YD, Peacock A, Pfiffner SM, Barcelona MJ, White DC, McNaughton SJ (1999) Microbial characterisation of a JP-4 fuel-contaminated site using a combined lipid biomarker/polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) based approach. *Environ Microbiol* 1:231–241.

- Sun, S., Xie, S., Chen, H., Cheng, Y., Shi, Y., Qin, X., ... & Yuan, J. S. (2016). Genomic and molecular mechanisms for efficient biodegradation of aromatic dye. *Journal of hazardous materials*, 302, 286-295.
- Tesar M, Reichenauer TG, Sessitsch A (2002) Bacterial rhizosphere communities of black poplar and herbal plants to be used for phytoremediation of diesel fuel. *Soil Biol Biochem* 34:1883–1892.
- Torsvik V, Øvereås L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 5:240–245.
- Van Gestel, C. A. M., Dirven-Van Breemen, E. M., Baerselman, R., Emans, H. J. B., Janssen, J. A. M., Postuma, R., & Van Vliet, P. J. M. (1992). Comparison of sublethal and lethal criteria for nine different chemicals in standardized toxicity tests using the earthworm *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 23(2), 206-220.
- Volossiouk T, Robb EJ, Nazar RN (1995) Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Appl Environ Microbiol* 61:3972–3976.
- Von Wintzingerode F, Böcker S, Schlötelburg C, Chiu NH, Storm N, Jurinke C, Cantor CR, Göbel UB, Van den Boom D (2002) Base-specific fragmentation of amplified 16S rRNA genes analysed by mass spectrometry: A tool for rapid bacterial identification. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7039–7044.
- Wagner, A. O., Praeg, N., Reitschuler, C., & Illmer, P. (2015). Effect of DNA extraction procedure, repeated extraction and ethidium monoazide (EMA)/propidium monoazide (PMA) treatment on overall DNA yield and impact on microbial fingerprints for bacteria, fungi and archaea in a reference soil. *Applied Soil Ecology*, 93, 56-64.
- Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol Ecol* 15:1419–1439.
- Watanabe K, Futamata H, Harayama S (2002) Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of bioremediation strategies. *Anton van Leeuwenh* 81:655–663.
- Watanabe K, Teramoto M, Futamata H, Harayama S (1998) Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 64:4396–4402.

Watanabe, K., Y. Kodama, and S. Harayama. 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *J. Microbiol. Methods*44: 253-262.

White DC, Flemming CA, Leung KT, MacNaughton SJ (1998) In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of population remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms. *J Microbiol Methods* 32:93–105

Whyte LG, Goalen B, Hawari J, Labbé D, Greer CW, Nahir M (2001) Bioremediation treatability assessment of hydrocarbon-polluted soils from Eureka, Nunavut. *Cold Regions Science and Technology* 32:121–132.

Widada, J., H. Nojiri, K. Kasuga, T. Yoshida, H. Habe, and T. Omori. 2001. Quantification of carbazole 1,9a-dioxygenase gene by real-time competitive PCR combined with co-extraction of internal standards. *FEMS Microbiol. Lett.*202: 51-57.

Widmer F, Seidler RJ, Gillevet PM, Watrud LS, Di Giovanni GD (1998) A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas*(sensu stricto) in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 64:2545–2553.

Willison JC (2004) Isolation and characterisation of a novel sphingomonad capable of growth with chrysene as sole carbon and energy source. *Microbiol Lett* 241:143–150.

Wilson SC, Jones KC (1993) Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Env Pollut* 81:229-249.

Wilson, M.S., C. Bakerman, and E.L. Madsen. 1999. In situ, real-time catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 80-87.

Yeates, C., A.J. Holmes, and M.R. Gillings. 2000. Novel forms of ringhydroxylating dioxygenases are widespread in pristine and contaminated soils. *Environ. Microbiol.*2: 644-653.

Zhu, L., Yang, Z., Yang, Q., Tu, Z., Ma, L., Shi, Z., & Li, X. (2015). Degradation of dexamethasone by acclimated strain of *Pseudomonas Alcaligenes*. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(7), 10971.