



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
COLEGIO DE INGENIERÍA AMBIENTAL

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE SUELO
CICM-ICUAP

Licenciatura en Ingeniería Ambiental
Tesis

Aislamiento de bacterias de suelo contaminado
por diésel asociadas a la rizosfera de higuera
(*Ricinus communis*)

Que presenta:

Adriana Cristina Sánchez Dávila

Para obtener el grado:

LICENCIADA EN INGENIERÍA AMBIENTAL

Director de Tesis:

M.C. Refugio Armando Tapia Hernández

Co-asesora:

M.C. Teresita Jiménez Salgado

H. Puebla de Zaragoza. Julio del 2025



AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Microbiología de Suelo CICM-ICUAP que me abrió las puertas para poder desarrollar este trabajo.

Al Maestro Armando Tapia y la Maestra Teresita Salgado por guiarme durante este trabajo, compartir sus conocimientos y haber obrado más de lo debido en este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio que me apoyaron en algunos procesos y tramites mientras estaba fuera del país.

A mis sinodales que con paciencia me apoyaron y entendieron mi situación.

A mis amigas y amigos que estuvieron conmigo durante esta trayectoria. Especialmente a Jalil Sosa que me abrió las puertas de su casa para evitar que tenerme que trasladar diaria de un Estado a otro para poder seguir asistiendo al laboratorio.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
OBJETIVO	6
HIPÓTESIS	6
ANTECEDENTES	7
METODOLOGÍA	19
RESULTADOS	25
CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	49
ANEXOS	55

INTRODUCCIÓN

México es uno de los principales productores de petróleo del mundo, siendo un pilar fundamental de la economía nacional, impulsando el desarrollo industrial y generando ingresos considerables. Las actividades relacionadas a la industria petrolera como la exploración, extracción del crudo, producción, almacenamiento y transporte, además de su extracción ilícita, provocan afluencias, que no solo afectan el ámbito económico y social, sino que además representan un grave problema ambiental, debido a que la eliminación de los contaminantes se vuelve complicada por la naturaleza química y efectos tóxicos de los componentes del petróleo y sus derivados que alteran los ecosistemas. Ávila Salazar (2016) reportó que, en la zona sureste del país, las concentraciones de hidrocarburos en suelos pueden llegar hasta 450,000 mg/Kg, donde además de afectar la calidad del suelo, los hidrocarburos ponen en riesgo los mantos acuíferos subterráneos, contaminándolos de forma casi irreversible. En 2019 SEMARNAT reportó que en el país había aproximadamente 5,000 sitios contaminados por hidrocarburos, de los cuales 2,000 han sido caracterizados, pero solo una mínima parte ha sido remediada. Mientras tanto, en Puebla se detectaron 2,072 sitios contaminados en los últimos 14 años, en su mayoría siendo dañados por hidrocarburos, de los cuáles el 52.61% se han podido tratar (Rivera, G., 2023)

Esto ha generado la necesidad de desarrollar tecnologías eficientes y económicamente viables para la restauración de suelos contaminados, destacando la biorremediación como una alternativa prometedora. A diferencia de las técnicas tradicionales como la excavación o el tratamiento fisicoquímico, la biorremediación se caracteriza por ser más económica, eficiente y segura. Además, es una opción sostenible, ya que aprovecha procesos naturales o microorganismos para degradar o transformar contaminantes en sustancias menos tóxicas. Su enfoque poco invasivo la convierte en una excelente opción para la limpieza ambiental.

Se han implementado con éxito proyectos de biorremediación en diferentes regiones de México, sobre todo en sitios petroleros como en Tabasco, áreas

afectadas por derrames de petróleo en la zona de Campeche, y al sureste del país en zonas rurales donde el suelo y las comunidades se han visto afectadas por derrames de hidrocarburos de las tuberías que se encuentran en el área. La mayoría de estos proyectos utilizaron bioestimulación y bioaumentación por su bajo costo y mayor eficiencia que han demostrado estas técnicas de remediación en comparación al resto.

La fitorremediación es una técnica de biorremediación en la que se emplean plantas para el tratamiento de sitios contaminados donde en algunos casos se pueden aprovechar las especies locales que ayudan a fortalecer la resiliencia de los ecosistemas. Un ejemplo de especie local del centro de México es la higuera (*Ricinus communis*), una planta con múltiples usos y beneficios, entre los cuales destaca su potencial en la biorremediación. Es conocida por su resistencia a suelos contaminados y condiciones extremas; su sistema radicular profundo y su capacidad para acumular nutrientes y agua le permiten prosperar en suelos contaminados con metales pesados, hidrocarburos u otros contaminantes. Además, la higuera produce una sustancia llamada ricino, que es tóxica para muchos microorganismos y puede tener efectos adversos en la flora y fauna del suelo, sin embargo, esto puede favorecer la inhibición del crecimiento de ciertos microorganismos patógenos o competidores, permitiendo que los microorganismos degradadores de contaminantes prosperen y realicen su función de manera más eficiente. Estas cualidades hacen de la higuera una opción prometedora y eficaz para la restauración de áreas contaminadas. (Palanivel, et al; 2020).

OBJETIVO

Aislar y caracterizar bacterias asociadas a la higuera de suelo contaminado con hidrocarburos de la zona de San Francisco Ocotlán, Coronango, Puebla.

Objetivos específicos:

- a. Aislar bacterias degradadoras de diésel en suelo de la zona contaminada de estudio.
- b. Aislar bacterias degradadoras de diésel de la rizosfera y raíz de la higuera
- c. Probar el crecimiento de las cepas aisladas en un medio de cultivo con diésel como única fuente de carbono.
- d. Caracterizar las cepas aisladas por medio de sistemas miniaturizados API.

HIPÓTESIS

1. Las cepas bacterianas aisladas asociadas a la higuera (*Ricinus communis*) son capaces de utilizar el diésel como fuente de carbono.

ANTECEDENTES

México cuenta con reservas probadas de petróleo equivalente a 6,120 millones de barriles (CONACYT, 2022). La empresa encargada mayormente del procesamiento y administración de petróleo en el país es Petróleos Mexicanos (PEMEX) que cuenta con 5,259 kilómetros de oleoductos y 8,883 kilómetros de poliductos, cuya concentración más importante es el Sistema Zona Sur-Golfo-Centro-Occidente (De la Torre, et al., 2022). En Puebla están situados gasoductos y poliductos que provienen de Veracruz llegando hasta CDMX. Asimismo, Puebla es el tercer estado con mayor superficie identificada con derrames de hidrocarburos, solo por debajo de Guanajuato y Tabasco, con una superficie reportada de 308,996 metros cuadrados, donde las zonas más afectadas son suelos destinados a la agricultura y pecuaria (Merino, 2020), que pertenecen al coloquialmente llamado "triángulo rojo" conformado por municipios del estado donde se reportaron la mayoría de las tomas clandestinas destacando Acajete, Acatzingo, Quecholac, Tepeaca, Palmar de Bravo (figura 1), que es por donde pasa uno de los oleoductos más importantes del país (Vieira, 2018), extendiéndose más tarde al noroeste por Coronango y San Miguel Xoxtla. Debido a la cantidad de contaminantes presentes en el suelo de esta zona, muchos sitios han quedado infructuosos para la agricultura e incluso algunos se han convertido en pasivos ambientales; demostrando así que los hidrocarburos pueden alterar gravemente un ecosistema.

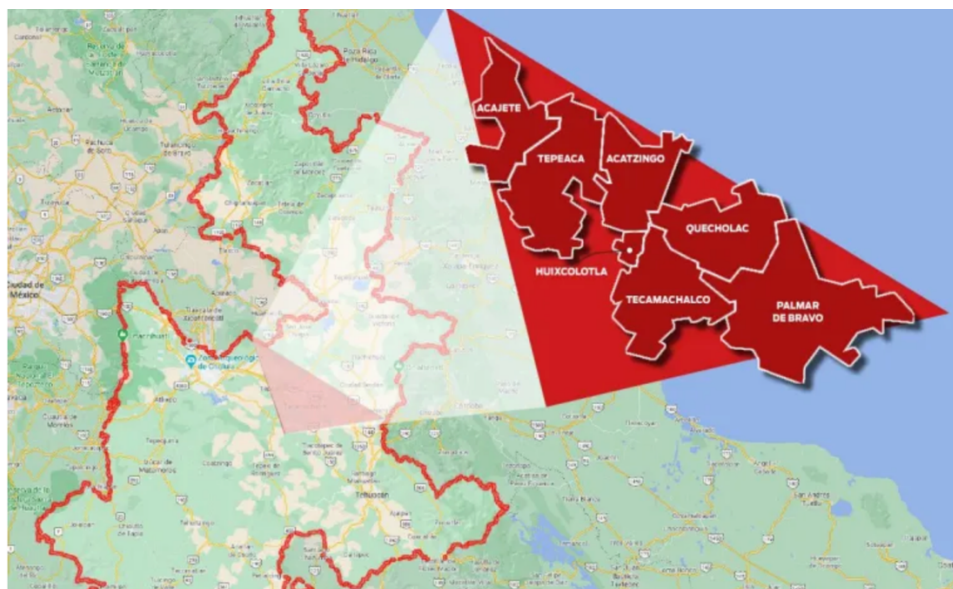


Figura 1. Mapa de la ubicación de los municipios que integran el "triángulo rojo". Fuente: Transporte.mx (25 de marzo de 2021).

1.1 HIDROCARBUROS

El petróleo es una mezcla de hidrocarburos acompañados de azufre, oxígeno y nitrógeno que forman un aceite mineral de color oscuro que se encuentra sólo en las rocas sedimentarias (Eneh, 2011). La NOM-138-SEMARNART/SSA1-2012 define a los hidrocarburos como compuestos químicos orgánicos, constituidos principalmente por átomos de carbono e hidrógeno y los clasifica dependiendo del número de átomos de carbono que contengan en su cadena principal. La Fracción ligera (HFL) son los componentes que contienen cadenas de 5 a 10 átomos de carbono, la Fracción media (HFM) con cadenas 11 a 28 átomos de carbono, y la Fracción pesada (HFP) compuesta por cadenas de 29 a 40 átomos de carbono.

Para obtener los diferentes derivados es necesario someter el crudo a un proceso de refinamiento, cuya operación principal es la destilación fraccionada donde a distintas temperaturas se obtiene una gama de productos comerciales como sustancias gaseosas: metano, etano, propano; líquidas: gasolinas, queroseno y fuelóleo; sólidas: las parafinas y los alquitranes (Wauquier, 1995).

El gasóleo o diésel se obtiene de la destilación del petróleo a una temperatura entre los 200° y 380°C. Es más denso que la gasolina por ende se evapora más lento debido a su número de carbonos, cuenta con un mayor poder calorífico y un mejor proceso de combustión, con 30% más eficiente que la gasolina, aunque el diésel produce una mayor cantidad de dióxido de carbono que contribuye al efecto invernadero (CONUEE, s.f.).

1.2 REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS

Los suelos contaminados por hidrocarburos representan un daño grave al ecosistema y a la salud humana. En México, los suelos contaminados por hidrocarburos pueden tener diversos orígenes como fugas, derrames accidentales, o provocadas por las tomas clandestinas de combustible. El suelo es un recurso natural biogeoquímico dinámico que soporta todos los componentes que comprenden los ecosistemas terrestres (Brutti et al., 2018).

La Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR, Art. 5, fracc. XL) define un sitio contaminado como un lugar, espacio, suelo, cuerpo de agua, instalación o cualquier combinación de éstos que ha sido contaminado con materiales o residuos que, por sus cantidades y características, pueden representar un riesgo para la salud humana, a los organismos vivos y el aprovechamiento de los bienes o propiedades de las personas.

La presencia de hidrocarburos en el suelo trae como consecuencia el deterioro parcial o total del ambiente, afectando flora y fauna, además de alterar sus propiedades fisicoquímicas como el contenido de materia orgánica, pH, permeabilidad y retención de agua, niveles de intercambio catiónico, entre otros. Si la liberación de los contaminantes de un sitio no fue contenida oportunamente, o si después de la retención, no hubo un seguimiento debido para la remediación total del sitio, se convertirá en un pasivo ambiental ya que implica una obligación de remediación (LGPEGIR, 2006). En cuanto a sus efectos a la salud depende de las concentraciones de los contaminantes, donde las rutas de exposición son mediante inhalación, ingesta y absorción a través de la piel (FAO and UNEP, 2021). A nivel microscópico afecta a la microbiota del sitio debido a la toxicidad de estos compuestos, modificando los procesos biogeoquímicos del suelo. El análisis de la población microbiana en el suelo es un indicador biológico para la evaluación de la capacidad de recuperación y regeneración del sistema, resistencia a cambios ambientales y potencial degradativo debido a la sensibilidad de los cambios y a su capacidad de proveer información de diversos factores ambientales (Zamora, et al. 2012). También se ve afectado el ámbito social debido a la baja producción de cultivos, repercutiendo así en la economía de productores y/o campesinos. Por lo que el sector rural es el que se ve principalmente afectado como lo señalan Cavazos-Arroyo, et al. (2014) donde expone la problemática de este sector de la población debido al entorno socioeconómico de desventaja.

Para determinar el grado de contaminación en México, existe la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. A partir de los resultados obtenidos se puede escoger el mejor tratamiento para recuperar el suelo dañado por hidrocarburos o derivados del mismo.

Cuando ocurre una fuga de combustible a suelos ya sea de forma accidental o provocada, se busca detener el daño y tratar de remediar el sitio contaminado a través de procesos físicos, químicos o biológicos. Los tratamientos físicos y químicos utilizan las propiedades de los contaminantes o del medio contaminado para efectuar la limpieza del suelo dañado. La contención mediante barreras físicas para aislar el contaminante es un ejemplo de método físico (CEUPE, s.f.). En décadas pasadas, una práctica común para estabilizar reservas de crudo en suelo fue el uso de micro-encapsulados. Estos productos funcionaban mediante la adsorción de hidrocarburos, reteniéndolos en su estructura interna, pero sin llevar a cabo una fase de degradación del contaminante. Otra limitante de estos micro-encapsulados era la inhibición de absorción ante la presencia de ciertos compuesto no polares como aceites e hidrocarburos aromáticos halogenados, que afecta su endurecimiento dejando así a expensas los contaminantes a posibles afectaciones a mantos acuíferos subterráneos (Brito, et al; 2003).

También se han usado sustancias detergentes para “lavar” el suelo separando el suelo de los hidrocarburos, pero esta técnica es de alto costo, sin mencionar que su más grande desventaja es la inhibición de la actividad microbológica. Y aunque el lavado de suelo mostró buenos resultados en sus inicios, el alto contenido de arcillas y materia orgánica de algunos suelos fueron limitantes para seguir utilizando esta técnica (Brito, et al; 2003)

Otras alternativas que se han practicado en México han sido la incineración, desorción térmica, la extracción con vapor y la vitrificación, que además de

costosas, su impacto ecológico es mayor que dejar la zona se convierta en un pasivo ambiental (Volke y Velasco, 2002). Las ventajas de los tratamientos fisicoquímicos y térmicos son que pueden verse resultados en periodos cortos de tiempo y con equipo accesible pues no se necesita desarrollar una nueva tecnología. En cambio, los tratamientos biológicos son más efectivos en cuanto a costos, son tecnologías más amigables con el medio ambiente y se requiere un mínimo de mantenimiento posterior. En México se han utilizado con éxito la bioestimulación mediante la incorporación de fertilizantes y aireación del suelo para degradar los hidrocarburos; y la fitorremediación con el uso de ciertas especies de plantas.

1.3 BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS POR HIDROCARBUROS

Mueller, et al. (1996) definen a la biorremediación como “el proceso mediante el cual los desechos orgánicos se degradan biológicamente en condiciones controladas a un estado inocuo, o a niveles por debajo de los límites de concentraciones establecidos por las autoridades reguladoras”. La restauración de los suelos por medio de la actividad biológica se basa en el empleo de organismos vivos como levaduras, bacterias, hongos, microalgas, plantas y sistemas biológicos o enzimas para mineralizar compuestos tóxicos en condiciones aerobias o anaerobias, oxidando o transformando hidrocarburos en productos metabólicos como CO₂ y agua, o biomasa (Rivera Ortiz, et al; 2018). Este proceso emplea a los organismos para degradar los compuestos contaminantes utilizándolos como fuente de energía donde se elimina el contaminante o se transforma en compuestos más simples y, por ende, menos tóxicos para el medio.

Existen dos técnicas principales de biorremediación que son la bioestimulación y bioaumentación, la primera se refiere a la adición de nutrientes que favorecen el crecimiento y actividad de los microorganismos presentes en el entorno, los cuales son capaces de llevar a cabo la biorremediación; mientras que la bioaumentación implica la introducción de organismos vivos que tiene la capacidad de acelerar el

proceso de descomposición de contaminantes específicos (Islas-García, y otros, 2016).

Para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, se emplean ciertas biotecnologías para el saneamiento y recuperación del suelo como es el bioventeo donde se inyecta aire de manera controlada, oxigenando el suelo para estimular a los microorganismos aerobios presentes y acelerar el proceso de biorremediación. Otra biotecnología que se usa son los biorreactores que son buques donde se introduce el suelo con microorganismos que ayudan a la degradación del contaminante ya que imita su ambiente natural para optimizar las condiciones de crecimiento; la biolabranza es uno de los procesos más simples pues consiste en el arado del suelo periódicamente para airear el suelo y ayudar a los microorganismos ya presentes con la transformación de los contaminantes a sus estados menos perjudiciales. Las biopilas, que es una combinación entre la biolabranza y los biorreactores, son cápsulas grandes con suelo contaminado pretratado aireado adicionado con nutrientes suministrados con un flujo de agua controlado; otra biotecnología que se usa es la fitorremediación que usa las planta para remover, transferir, estabilizar o destruir contaminantes en el suelo, que ha mostrado tener éxito principalmente para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos (Harekrushna, et al; 2012)

Estas técnicas ofrecen soluciones sostenibles y de bajo costo para la remediación de suelos contaminados, utilizando procesos naturales para reducir la concentración de contaminantes a niveles seguros, que promueven la recuperación de sistemas afectados, restaurando su funcionalidad y biodiversidad.

1.4 FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS

La fitorremediación es una técnica amigable con el ambiente, rentable y viable para la remediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Forma parte de la

biorremediación que puede aplicarse a contaminantes orgánicos a través de sus propias fitotecnologías, donde se establecen especies vegetales tolerantes y estimular la actividad microbiana de la rizosfera consiguiendo la remoción, transferencia, estabilización y neutralización de compuestos orgánicos e inorgánicos tóxicos (Chan-Quijano, et al, 2015). Dentro de ella existen varias categorías destacadas, cada una con su mecanismo específico de acción.

La **fitoextracción** es una técnica de fitorremediación que se centra en la capacidad de las plantas para absorber contaminantes inorgánicos del suelo y acumularlos en sus tejidos. Este proceso facilita la remoción de metales pesados y otros contaminantes inorgánicos del suelo, permitiendo una limpieza progresiva del área afectada (González, et al. 2010).

Por otro lado, Bolan et al. (2011) explican que la **fitoestabilización** introduce plantas compatibles con el ambiente contaminado con el objetivo de reducir la movilidad de los contaminantes en la rizosfera o acumulándolos en sus raíces donde la actividad microbiana asociada a ésta puede acelerar la degradación en el caso de contaminantes orgánicos.

En el caso de la **fitovolatilización**, la planta capta los contaminantes del suelo o agua y los libera a la atmósfera en una forma menos tóxica a través de su transpiración. Este proceso es particularmente útil para contaminantes volátiles, transformándolos en formas menos dañinas antes de su liberación (Delgadillo-López et al, 2011).

La **rizorremediación** se basa en la interacción entre las plantas y los microorganismos asociados a sus raíces para degradar los contaminantes orgánicos en el ambiente. Este enfoque es especialmente eficaz para tratar suelos contaminados con hidrocarburos, ya que los microorganismos de la rizosfera pueden metabolizar y descomponer estos compuestos complejos (Massot, 2018).

Según Yavari (2015), la rizorremediación es considerada una de las mejores estrategias para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

De acuerdo con Chan-Quijano et al. (2013) reportan que se han identificado 129 especies de plantas capaces de degradar hidrocarburos. Estas plantas no solo ayudan a limpiar los suelos contaminados, sino que también contribuyen a la recuperación del ecosistema al mejorar la estructura y la fertilidad del suelo. Saadawi et al. (2015) realizaron un estudio en el que probaron tres tipos de plantas (*Malva parviflora*, *Ricinus communis* y *Triticum repen*) para la fitorremediación de suelos contaminados con crudo. Los resultados demostraron que estas plantas son efectivas en la remoción del contaminante, logrando disminuir su concentración en el suelo hasta un 0.5% de su concentración inicial. Las plantas mostraron una rápida adaptación a las condiciones ambientales, con *Ricinus communis* (higuerilla) degradando el 77% del crudo en un lapso de 30 días. Sin embargo, se observó que, a mayores concentraciones de contaminantes, las plantas requieren más tiempo para adaptarse y poder degradar con mayor eficacia el contaminante.

Adicionalmente, diversos estudios han resaltado la capacidad de la higuerilla para degradar pesticidas organoclorados. Rissato et al. (2015) demostraron que esta planta puede degradar hasta 15 compuestos orgánicos persistentes en un período de 66 días, con una eficiencia de degradación que varía entre el 25% y el 70%. Además, la higuerilla ha mostrado una notable capacidad para retener y acumular cadmio, llegando a concentrar este metal hasta 17 veces más que *Brassica juncea* en un período de 90 días (Bauddh & Sigh, 2012). También ha sido efectiva en la acumulación de metales pesados en general, como lo indican los estudios de Yeboah et al. (2020)

1.4.1 RICINUS COMMUNIS

De la familia *Euphorbiaceae*, la *Ricinus communis* conocida en México como “Higuerilla” (figura 2) y en inglés como “*Castor bean*”, es nativa de África que crece en climas calurosos. Es un arbusto de rápido crecimiento que, en ocasiones puede

desarrollarse como un pequeño árbol de madera blanda, alcanzando alturas de hasta 6 metros o más. Sus hojas son características, con entre 5 y 12 lóbulos profundos y segmentos toscamente dentados, dispuestos de manera alterna y palmeada. Las semillas (figura 3) de la planta son ovaladas, lisas, de color pardo con una carúncula cónica. Miden entre 8 y 18 mm de largo y entre 4 a 12 mm de ancho, y están recubiertas por una testa rígida y quebradiza (Jena & Gupta, 2012).



Figura 2. Higuerrilla. (Autoría propia).



Figura 3. Semillas de higuerrilla. (Autoría propia).

En la actualidad, India se destaca como el mayor productor de *Ricinus communis* a nivel mundial. Es una planta de origen africano que se ha adaptado con éxito a diversos tipos de suelos en México, donde se considera una especie invasora. No obstante, en otros países se cultiva en grandes cantidades debido a la importancia de sus semillas, de las cuales se extrae el aceite de ricino, un producto de gran relevancia en las industrias de aceites y cosméticos (Benavides, 2007). El aceite de ricino tiene registros de sus usos desde el antiguo Egipto, habiéndose encontrado en tumbas egipcias de hace 4000 años. Fue de las primeras civilizaciones en utilizar el aceite de las semillas de esta planta como combustible para lámparas. Además, el uso medicinal del aceite de ricino está documentado en el Papiro de Ebers, un antiguo escrito de aproximadamente 1550 a.C. Este papiro describe el empleo del

aceite como laxante, en el tratamiento de afecciones cutáneas, para problemas de visión y como inductor del parto (Mesa, 2023). Actualmente es muy sabido que la ingesta de este aceite es perjudicial para la salud debido a su toxicidad, pero tiene múltiples aplicaciones industriales. El aceite de ricino deshidratado se emplea en la fabricación de pinturas y barnices, así como en la manufactura de fibras de nylon. Además, se utiliza en la producción de lubricantes y fluidos hidráulicos, que son esenciales en la operación de aviones y naves espaciales (Sujatha et al; 2008).

La adaptación rápida de la higuera a diversas condiciones ambientales y su efectividad en la remoción de contaminantes la posiciona como una opción viable y sostenible para la remediación de suelos contaminados. Estas características, sumadas a su valor económico por la producción de aceite de ricino, hacen de la higuera una especie de gran interés tanto ecológico como comercial.

1.4.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Generalmente no requieren condiciones de crecimientos especiales para su desarrollo, sin embargo, esta especie es típicamente de climas áridos y semiáridos. Su germinación es lenta en suelos fríos, la temperatura óptima es de 25 a 31°C, soportando mínimas de 14°C y máximas de 36°C (Severino & Auld, 2013).

La higuera se ha probado como una planta tolerante a metales pesados, capaz de crecer en suelos contaminados, lo que la convierte en una planta valiosa en el campo de la fitorremediación (Olivares, et al, 2013). Esta capacidad de tolerancia a la contaminación permite que la higuera se utilice para limpiar suelos contaminados, aportando beneficios ambientales significativos. Además, es una buena alternativa para la producción de biocombustibles, sector en el que ha tenido un notable auge en países como Brasil e India, debido a que estas regiones ofrecen condiciones climáticas favorables para su crecimiento.

Un estudio publicado en 2015 por González-Chávez, et al. evaluó la concentración de contaminantes en los productos de plantas de higuera que crecieron en suelos

contaminados por metales. Los resultados demostraron que tanto el aceite extraído de las semillas como el biocombustible producido a partir de la planta no presentaban riesgo de introducir metales a la cadena trófica, consolidando aún más su potencial como recurso sostenible y seguro.

La higuera es una especie potencial para la fitorremediación por su capacidad para beneficiar la microbiota de la rizosfera a través del reciclaje y la solubilización de nutrientes minerales, así como el incremento de metabolitos, incluidas las fitohormonas del crecimiento. Crece en suelos contaminados por metales pesados y posee una gran tolerancia a diversas condiciones de estrés, tales como suelos salinos, secos y helados (Kiran, et al., 2017). Su rápido crecimiento y la poca necesidad de mantenimiento hacen que sea recomendada para la plantación en suelos agrícolas contaminados por hidrocarburos.

METODOLOGÍA

2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SUELO

Se tomaron cuatro muestras de suelo en la junta auxiliar de San Francisco Ocotlán en el municipio de Coronango, Puebla, con las en las coordenadas en zona 14N, Este 576,636.7111 m, Norte 2,116,563.2693 m, que se muestra en la figura 1 de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos. Las muestras puntuales se recolectaron en frascos de vidrio ámbar de boca ancha con tapa de PTFE debidamente identificadas. Para conocer la contaminación de fondo, se tomaron muestras de suelo visualmente no contaminado a 10 metros aproximadamente pendiente arriba (Este 576,596.7692 m, Norte 2, 117, 566.7756 m) del primer punto, siguiendo los mismos parámetros de muestreo que se llevaron a cabo para suelo contaminado.



Figura 4. Fotografía aérea del lugar de estudio indicando el punto exacto de las tomas de muestra de suelo contaminado en el rectángulo rojo. Tomado de Google Maps, s.f.

2.2 CARACTERIZACIÓN DE SUELO

La caracterización parcial de las muestras de suelo se realizó de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad,

salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis; determinando los siguientes parámetros: pH del suelo en agua (potenciómetro), conductividad eléctrica (conductímetro), textura (hidrómetro de Bouyoucos), contenido de fósforo (procedimiento de Bray y Kurtz 1), contenido de potasio (con acetato de amonio), contenido de nitrógeno total, capacidad de intercambio catiónico (EDTA) y materia orgánica (Walkey-Black).

2.3 GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE HIGUERILLA

Las semillas de higuerilla se recolectaron en la zona de estudio. Para evaluar la germinación y optimizar el tiempo de obtención de las plantas que se usaron en este estudio, se sugirió una metodología propia donde se probaron dos condiciones: semillas con testa y semillas sin testa. En el caso de las semillas sin testa, estas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 5 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada para eliminar residuos del desinfectante. Posteriormente, las semillas se colocaron en contenedores de plástico entre dos capas de toallas de papel previamente esterilizadas, las cuales se mantuvieron húmedas con agua destilada estéril. Los contenedores se incubaron a una temperatura constante de 30 °C en ausencia de luz hasta que se observó la emergencia de la radícula en las semillas. El mismo procedimiento se aplicó a las semillas con testa, con el objetivo de comparar la velocidad de germinación entre ambos tratamientos y determinar si la presencia de la testa influye en este proceso.

Para la germinación de semillas en suelo se ocuparon cinco macetas de 15 cm de diámetro por 20 cm de altura, se agregó un kilogramo a cada una de la mezcla de suelo contaminado con suelo limpio en proporción 1:1 previamente humedecido con agua destilada y cribado por un tamiz de dos milímetros para homogeneizar el suelo. Además, se preparó una sexta maceta con suelo limpio. Las seis macetas se llevaron al invernadero a una temperatura máxima de 26°C con luz natural donde se regaron dos veces por semana con 120 ml de agua destilada hasta que las plantas alcanzaran una altura de 15 cm o por lo menos que hayan desarrollado 3 hojas verdaderas.

2.4 AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE SUELO CONTAMINADO

Se pesaron 100 g de suelo contaminado y se tamizaron a través de una malla de acero inoxidable de 2 mm. De esta muestra, se tomaron 20 g, los cuales se mezclaron con 40 mL en buffer de fosfatos estéril 0.1 M (ver anexo 1). Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas hasta una concentración de 10^{-5} en buffer.

Cien microlitros de las diluciones comprendidas entre 10^{-2} y 10^{-5} se sembraron por triplicado mediante la técnica de extendido en placas, utilizando medio BH (Bushnell Haas) (ver anexo 2) con 100 μ l de diésel estéril, y medio TSA (Agar Triptona-Soya). Las placas con medio TSA se incubaron a 32°C por 24 horas, mientras que las placas con medio BH se incubaron a 32°C durante 72 horas.

Se realizó el recuento de la población bacteriana en las placas que presentaron entre 20 y 200 colonias. Se describió la morfología de las colonias observadas en ambos medios y, posteriormente, se aislaron mediante el método de estrías cruzadas.

2.5 AISLAMIENTO DE BACTERIAS RELACIONADAS A LA HIGUERILLA

Se seleccionaron aleatoriamente seis plantas que cumplieran con el criterio de crecimiento previamente mencionado. Con cuidado, se extrajeron de las macetas, reservando el suelo cercano a la raíz (suelo rizosférico) y el suelo adherido a la misma (suelo rizoplano) para su posterior análisis.

Siguiendo la metodología anteriormente descrita para el aislamiento de bacterias de suelo contaminado, se aislaron cepas tanto del suelo rizosférico como del rizoplano. Para aislar las bacterias asociadas a la raíz, se trituraron tres gramos de raíz en un vaso de licuadora a de vidrio estéril con 30 mL de caldo BH en pulsos de 20 segundos durante cinco repeticiones para evitar el calentamiento de la muestra. Posteriormente, se hicieron diluciones seriadas en buffer de fosfatos hasta 10^{-5} para su cultivo en medios TSA y BH con diésel.

2.6 IDENTIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

La identificación de las bacterias se realizó a través tinción de gram, prueba de catalasa y oxidasa, además un sistema de microtubos de pruebas bioquímicas llamadas galerías API20NE tomando lectura a las 24 h y a las 72 h.

2.7 PRUEBA DE RESISTENCIA DE DIÉSEL

Las cepas aisladas se inocularon en tubos de ensayo de 13x100 con cuatro mL de caldo BH y glucosa con 1000, 2000, 4000 y 8000 ppm de diésel. El ensayo se realizó por triplicado y un control sin diésel por cada cepa sembrada. Los tubos fueron incubados con agitación continua a 32°C por 10 días.

Las cepas que mostraron crecimiento se sembraron por estriado en agar TSA como control para descartar contaminación. Estas cepas se sembraron en tubos de ensayo de 18x150 con 20 mL de caldo BH sin glucosa con 1000, 2000, 4000 y 8000 ppm de diésel por triplicado y se llevaron a agitación continua a 32°C por 10 días. Al final del periodo de incubación se les hizo prueba de control para descartar contaminación sembrando cada ensayo en medio TSA.

2.8 MEDICIÓN DE DEGRADACIÓN DE DIÉSEL POR CROMATOGRAFÍA

2.8.1 CRECIMIENTO DE CEPAS PARA LA EVALUACIÓN CUALITATIVA DE DEGRADACIÓN DE DIÉSEL

Las cepas que pasaron la prueba de resistencia a las concentraciones más alta de diésel se sembraron por triplicado en tubos de ensayo de 18x100 con 15 mL de cald BH adicionado con 8000 ppm del hidrocarburo estéril y se incubaron a 32°C en agitación por 20 días. Pasado el tiempo de incubación, los caldos se prepararon para medir la concentración final de diésel por lo que cada muestra se separó el caldo de cultivo de los microorganismos usando la centrifugadora Beckman modelo J2-21 a 15,000 ppm por 16 minutos. Posteriormente, el diésel se extrao utilizando diclorometano, realizando tres extracciones por cada muestra, utilizando embudos de separación de 100 mL y 15 mL de diclorometano por extracción, pasando la fase

pesada por papel filtro con sílica y sulfato de sodio (NaSO_4). Finalmente se redujeron a 1 mL cada una de las extracciones en Rotavapor R-100 a 25°C . Cada una de estas extracciones se almacenaron en viales de 2 mL sellados con PTFE, y se refrigeraron hasta su análisis.

Para el análisis de las muestras de suelo, se colocaron cinco gramos de suelo en viales con tapa de rosca, a los que se añadió dos gramos de sílice para absorber completamente la humedad del suelo. Luego, se agregaron 15 mL de diclorometano, asegurándose de que el nivel del solvente superará el del suelo en el vial. Los viales se sometieron a agitación por ultrasonido utilizando un limpiador ultrasónico Branson 1210 durante 15 minutos. El contenido de los viales se filtró a través de papel filtro y sílica. Posteriormente se siguió el mismo proceso de extracción que el realizado con las muestras de las cepas en caldo de cultivo.

La metodología utilizada en esta parte del estudio toma como referencia la Norma Mexicana NMX-AA-145-SCFI-208, Suelos-hidrocarburos fracción media por cromatografía de gases con detector de ionización de flama-método de prueba, de acuerdo con la técnica de Cromatografía de Gases de Detector de Ionización de Flama (CG/DIF) referenciada en la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, que clasifica el diésel en la fracción media de hidrocarburos. Para realizar el análisis se utilizó un cromatógrafo THERMO FU con detector de ionización de flama (DIF), con una columna de fase estacionaria de DB-TPH de 30 m x 0.320 mm x 0.25 μm , con las siguientes condiciones de operación: temperatura del inyector de 280°C , detector a 280°C , temperatura inicial del horno 45°C por 4 minutos, un incremento de 20°C por minuto hasta alcanzar 275°C , con un tiempo de corrida total de 16.5 minutos, con inyección manual de 1 μl de muestra.

Los resultados obtenidos se compararon con los valores de una curva estándar para determinar la eficiencia del proceso de biodegradación llevado a cabo por las cepas seleccionadas para evaluar su potencial en biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburo.

RESULTADOS

3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO

Conocer las características de un suelo es la base para comprender sus efectos en los ecosistemas. El presente estudio se enfoca en la caracterización parcial de las muestras de suelo para comparar el nivel de nutrientes, su salud general y conocer las condiciones que las muestras de suelo brindan para el desarrollo de la investigación. En esta sección se presentan los resultados obtenidos de la caracterización de las muestras de suelo, abordando su composición física y química.

En la tabla 1 se proporcionan los resultados detallados de la caracterización parcial de las muestras de suelos obtenidas del lugar de estudio, proporcionando así una visión clara y cuantitativa de ambas muestras para su comparación.

Tabla 1. Valores de los parámetros analizados para la caracterización parcial de la muestra de suelo limpio. (Autoría propia)

Parámetro analizado	Valor obtenido		Norma de referencia
	Suelo limpio	Suelo contaminado	
pH	6.0	6.41	NOM-021-RECNAT-2000 AS-02
Conductividad eléctrica (mS/cm)	0.210	0.280	NOM-021-RECNAT-2000 AS-18
Contenido de Fósforo (mg/l)	11.86	6.82	NOM-021-RECNAT-2000 AS-11
Contenido de K (cmol(+)/kg)	0.399	0.396	NOM-021-RECNAT-2000 AS-12
Nitrógeno total %	0.09	0.3	NOM-021-RECNAT-2000 AS-25
CIC (cmol(+)/kg)	1.5	2.0	NOM-021-RECNAT-2000 AS-12
Materia orgánica (%)	11.86	6.1	NOM-021-RECNAT-2000 AS-07
Textura	Franco arenoso	Arena	NOM-021-RECNAT-2000 AS-09

3.1.1 pH DEL SUELO EN AGUA

La suspensión de suelo limpio en agua destilada obtuvo un valor de pH de 6.0. Por otro lado, el suelo contaminado presentó un pH ligeramente más elevado, con una lectura de 6.14. De acuerdo con la clasificación establecida por la NOM-021-RECNAT-2000, ambas muestras se encuentran dentro de la categoría de

“moderadamente ácido”, la cual abarca un rango de pH de 5.1 a 6.5. Esta acidez puede tener implicaciones en la actividad enzimática y microbiana del suelo, lo cual podría explicar, en parte, la baja densidad de población vegetal observada en la zona de muestreo. Sin embargo, la presencia de hidrocarburos no es un factor que pueda cambiar drásticamente el pH del suelo.

3.1.2 CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

La CE del suelo determina su capacidad para conducir corriente eléctrica, determinada por la cantidad de sales disueltas en la solución (Shainberg, et al. 1980).

Siguiendo la interpretación de la NOM-021-SEMARNAT-2000, los valores obtenidos de la muestra de suelo limpio y suelo contaminado en la tabla 1 se sugiere que ambos suelos se clasifican como “moderadamente salinos”. Estos niveles resultan en una disminución en la diversidad de la vegetación, por lo que se debe de tomar en cuenta medidas precautorias para el cultivo de especies vegetales sensibles. La higuera por su parte, no se vería afectada por suelos moderadamente salinos en cuanto se garantice un suministro adecuado de agua, ya que es una especie sensible al estrés hídrico (Severino, et al. 2012)

3.1.3 PORCENTAJE DE SATURACIÓN Y PASTA SATURADA

El porcentaje de saturación del suelo es un indicador clave de la capacidad del suelo para retener agua y nutrientes, que tienen relación directa con la estructura física del suelo y su soporte de agua. Es la proporción entre el agua requerida para saturar el suelo seco (Aali, et al. 2009) y se expresa como un porcentaje de volumen (volumen de agua /volumen de muestra de suelo). El análisis de este parámetro proporciona un panorama detallado de cómo la contaminación afecta la capacidad de retención de agua del suelo y su estructura física, lo que repercute en la salud del ecosistema y la decisión de estrategias de remediación.

En el caso del suelo limpio, el porcentaje de saturación del suelo (PS) fue de 31.6%, mientras que en el suelo contaminado fue ligeramente mayor, con un 34%. Debido a que son muestras compuestas mayormente por arena, el agua añadida a estos tipos de suelo suele perderse en su mayoría por escorrentía ya que las arenas no retienen la humedad. Sin embargo, es importante destacar que el suelo contaminado cuenta con un porcentaje ligeramente mayor de PS que el suelo limpio, aunque este último contenga más arcillas. Esto puede atribuirse al contenido de hidrocarburos en la muestra de suelo contaminado debido a su hidrofobicidad provocado por una acumulación irregular de agua y limitando su drenaje (Gennadiev, et al. 2015). Y una vez que se ha logrado humedecer uniformemente, es más fácil que el agua pueda quedar encapsulada y así obtener diminutas reservas de agua, según lo observado.

3.1.4 CONTENIDO DE FÓSFORO

El contenido de fósforo disponible en el suelo está relacionado con la fertilidad de este. Aunque otros elementos como el nitrógeno, potasio y calcio son igualmente importantes para el desarrollo vegetal, el fósforo se destaca como un factor limitante que influye significativamente en la calidad y proliferación de las plantas. Este elemento interviene en la síntesis proteica y contribuye al crecimiento radicular, y formación de órganos de reserva, como semillas y tubérculos, al formar parte de fosfolípidos y ácidos nucleicos (Sanzano, 2006).

Los resultados obtenidos revelan diferencias significativas en el contenido de fósforo entre muestras de suelo limpio y contaminado. Mientras que la muestra de suelo limpio exhibe un valor de 11.86 mg/kg, lo que corresponde a una clasificación de clase media según la NOM-021-RECNAT-2000, el suelo contaminado muestras un contenido más bajo, con un valor de 6.82 mg/kg, situándose en una categoría baja de contenido de fósforo debido a que los hidrocarburos presentes en la muestra de suelo podrían estar inhibiendo la movilidad del fósforo, atrapándolo en formas no disponibles (Elgazali, et al. 2023). Estas disparidades resaltan la importancia de comprender y gestionar el fósforo en los suelos, que además de ser favorable para la fertilidad del suelo, también ayuda al desarrollo saludable de las plantas.

3.1.5 CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIÓNICO Y CATIONES INTERCAMBIABLES (CALCIO, MAGNESIO, SODIO Y POTASIO) EN SUELOS NEUTROS

En suelos con porcentaje de arcilla alto y gran cantidad de materia orgánica, el valor de CIC será mayor lo que indica que el suelo tiene un gran potencial para retener e intercambiar nutrientes y por ende serán suelos más fértiles. La CIC indica la reserva de nutrientes para reponer los que fueron absorbidos por las plantas, estos nutrientes son los cationes que están adheridos a las partículas del suelo (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} y H^+) que son los predominantes en suelos agrícolas que pueden ser reemplazados por otros nutrientes (Agrología, 2020).

El suelo limpio presentó 1.5 cmol/kg de cationes intercambiables, mientras que el suelo contaminado mostró 2.9 cmol/kg. Ambos valores se consideran bajos, lo que indica un bajo porcentaje de arcillas en ambas muestras de suelo (INTAGRI, 2015). Aunque normalmente los suelos contaminados con hidrocarburos tienden a tener una CIC bajo debido a que los hidrocarburos atrapan las partículas de arcilla y materia orgánica, bloqueando los sitios de intercambio catiónico (Sutormin, et al; 2024)

Los niveles de potasio intercambiable en ambas muestras de suelo, tanto limpio como contaminado (0.399 y 0.396 cmol/kg, respectivamente), alcanzan apenas los valores adecuados para el desarrollo saludable de la vegetación.

3.1.6 NITRÓGENO TOTAL

El nitrógeno total (NT) es un nutriente esencial para el desarrollo de las plantas y un indicador clave de la salud del suelo (Partida-Sedas et al., 2021). Este parámetro refleja la cantidad total de nitrógeno presente en el suelo, incluyendo sus formas orgánicas e inorgánicas. Dependiendo de su forma química, el nitrógeno interactúa de manera diferente con los procesos biológicos y químicos del suelo y las plantas. La mayor parte del nitrógeno en el NT es de origen orgánico, y debido a su baja

tasa de mineralización, este indicador representa las reservas orgánicas y el equilibrio nutricional del suelo (Jarquín-Sánchez et al., 2011).

Los resultados obtenidos en las muestras analizadas mostraron una diferencia significativa en el contenido de nitrógeno total. El suelo no contaminado presentó un valor de 0.09%, considerado bajo según los estándares de la NOM-021-SEMARNAT-2000. El suelo contaminado registró un valor de 0.3%, clasificado como muy alto según la misma norma. Este incremento en el suelo contaminado podría atribuirse al ciclo del carbono y al proceso de inmovilización del nitrógeno, en el cual los microorganismos que degradan hidrocarburos retienen el nitrógeno en formas no disponibles para las plantas (Sutton et al., 2013). Además, en suelos contaminados con hidrocarburos, la transformación del nitrógeno hacia formas asimilables por las plantas, como el nitrato (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+), podría verse ralentizada debido a la alteración de las actividades microbianas y enzimáticas (Margesin et al., 2000).

3.1.7 MATERIA ORGÁNICA

Se refiere a todos los materiales de origen biológico presentes en el suelo, como diferentes restos vegetales y animales en diferentes etapas de descomposición, así como microorganismos presentes en el suelo. Provee energía y nutrientes para los procesos biológicos de los microorganismos (Brady & Weil, 2008). El método para obtener los valores de materia orgánica se basa en la medición de carbono orgánico. El suelo limpio tuvo un porcentaje de 11.86 considerado como una clase alta de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000, y la muestra de suelo contaminado se clasificó como clase media con un porcentaje de 6.1.

Un porcentaje medio de MO en el suelo contaminado podría suponer una ventaja para los procesos biológicos responsables de la degradación de los hidrocarburos debido a que los microorganismos presentes en el área afectada podrían estar enfocados en la degradación de los combustibles, aunque este mismo escenario podría limitar la diversidad microbiana. Dado que un porcentaje del NT proviene de

la MO, y que se obtuvo un valor alto de NT, es probable que la MO contenga suficiente nitrógeno para ser asimilado por los microorganismos (Herrera-Navarrete et al., 2011).

3.1.8 TEXTURA

La textura del suelo es la relación entre los tamaños de partículas que componen el suelo, principalmente arena, limo y arcilla. Siendo una de las características más importantes que determinan su función (Malone & Searle, 2021).

Se evaluó la textura de ambos suelos de estudio: el suelo limpio presentó un porcentaje de 22.52% de limo, 6.52% de arcilla y 70.96%, y el suelo contaminado consistió en 3.52% de limo, 1.52% de arcilla y 94.95% de arena. donde de acuerdo con el triángulo de texturas, el suelo limpio se clasificó como franco arenoso; por el contrario, la muestra de suelo contaminado donde se obtuvieron porcentajes significativamente bajos de limo y arcilla se clasificó como arena. Esta distinción textural es crucial ya que influye en la capacidad del suelo para retener agua, su aireación y su susceptibilidad a inundaciones (Brady, 2008). Siendo que las muestras se tomaron en la misma área a no más de 50 metros de distancia, la textura del suelo en el área contaminada pudo haber cambiado en la reparación del ducto donde ocurrió la fuga de combustibles, ya sea por la mezcla de los horizontes del suelo o se pudo haber ocupado suelo de otra área cercana para su relleno.

Aunque ambos tipos de suelo presentan características generales favorables como poca retención de agua y buena aireación, además de baja probabilidad de inundación, el análisis por cromatografía de gases registró una concentración de más de 20,000 ppm de hidrocarburos, 40 veces más que los resultados obtenidos para el suelo limpio con apenas 500 ppm. Por lo que además de tener en cuenta que el alto porcentaje de arena en el suelo limpio podría ser inconveniente para la agricultura, también es importante considerar los hidrocarburos presentes en suelo podrían ser reto para el desarrollo de la higuera y cualquier otro tipo de vegetación. Estos resultados subrayan la importancia de considerar la textura del suelo y la

presencia del tipo de contaminantes para el análisis con los resultados experimentales, como el desarrollo de las plantas de higuierillas en laboratorio, y el crecimiento microbiano de ambos suelos.

En un estudio realizado en 1996 por Elías Munguía y Martínez (SEMARNAT, 1996), establecieron que el componente de mayor importancia es la arcilla por su persistencia a sustancias tóxicas, es decir que la arcilla al ser una partícula muy pequeña dentro de las texturas del suelo, los hidrocarburos permanecen significativamente más en su sistema reteniendo y limitando el movimiento del contaminante, en comparación a partículas más grandes como es la arena que no absorbe tanta materia y los hidrocarburos pueden expandirse con mayor facilidad sobre el área afectada.

3.2 AISLAMIENTO DE BACTERIAS EN LAS MUESTRAS DE SUELO

La distribución de los microorganismos en el suelo está estrechamente vinculada con la disponibilidad de nutrientes y oxígeno en los poros del suelo. En suelos libres de petróleo, las poblaciones microbianas son más densas en las capas superficiales y disminuyen con la profundidad. Sin embargo, en el suelo limítrofe a pozos petroleros y sumideros naturales de petróleo, las bacterias hidrocarbonoclasticas son especialmente abundantes (Del Carmen Rivera-Cruz, et al. 2002).

3.2.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE SUELO CONTAMINADO

El diésel es una mezcla compleja de hidrocarburos que puede ser tóxica para muchos microorganismos, lo que resulta en una disminución inicial de la diversidad bacteriana. Sin embargo, ciertos grupos bacterianos, especialmente aquellos con capacidad para degradar hidrocarburos, pueden proliferar bajo estas condiciones (Sutton et al; 2013).

El número de unidades formadoras de colonias (UFC) fue de 5.8×10^3 por gramo de suelo en TSA. En total se lograron observar al menos 12 tipos de morfología colonial marcadas de la A-L, sus características se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Descripción morfológica de las cepas aisladas de TSA asociadas al suelo contaminado. (Autoría propia).

CEPA	Descripción morfológica	Resultado tinción Gram	Morfología celular
A	Circulares de bordes redondeados, elevación planoconvexa de superficie lisa y tamaño mediano de color rosa pálido, aspecto húmedo mucoide.	-	bacilos cortos
B	Circulares con bordes redondeados, elevación plana convexa de superficie lisa y tamaño pequeño de color blanco, aspecto húmedo brillante mucoide.	-	bacilos cortos
C	Circular de bordes redondeados, elevación planoconvexa, de superficie lisa y tamaño pequeño de color marrón anaranjado claro, aspecto húmedo brillante mucoide.	+	bacilos
D	Circular de bordes redondeados, elevación planoconvexa, de superficie lisa y tamaño pequeño amarillo brillantes, aspecto húmedo mucoide	-	cocos
E	Circular de bordes irregulares, elevación umbilicada, de superficie rugosa y tamaño grande, de color blanco amarillento transparente, aspecto húmedo brillantes mucoide.	-	bacilos cortos
F	Circular de bordes redondeados, elevación planoconvexa, de superficie lisa y tamaño pequeño de color verde pálido transparente, aspecto húmedo brillante mucoide.	-	bacilos cortos
G	Circular de bordes irregulares, elevación umbilicada, de superficie rugosa y tamaño pequeño, de color blanco amarillento transparente, aspecto húmedo brillantes mucoide.	+	bacilos
H	Circular de bordes irregulares, elevación acuminada, de superficie lisa y tamaño mediano, color blanco transparente, aspecto húmedo brillantes mucoide.	-	bacilos cortos
I	Circular de bordes irregulares, elevación acuminada, de superficie rugosa y tamaño mediana, color amarillo blanquecino transparente, aspecto húmedo brillantes mucoide.	-	bacilos cortos
J	Circular de bordes redondeados, elevación planoconvexa, de superficie lisa y tamaño mediano amarillo brillantes, aspecto húmedo mucoide	+	bacilos
K	Circular de bordes redondeados, elevación plano convexa, de superficie lisa y tamaño pequeño de color anaranjado claro, aspecto húmedo brillante mucoide.	-	bacilos cortos
L	Circular de bordes irregulares, elevación umbilicada, de superficie lisa y tamaño mediano, color blanco transparente, aspecto húmedo brillantes mucoide.	-	bacilos cortos

Es común encontrar predominancia de bacterias gram-negativas, particularmente bacilos, en suelos contaminado por hidrocarburos que pertenecen a géneros bacterianos capaces de metabolizar compuestos orgánicos complejos. Sin embargo, también puede haber presencia de gram-positivas que tengan una alta tolerancia a condiciones adversas lo que les permite sobrevivir en ambientes contaminados. La coexistencia de ambos grupos se debe a la diversidad de estrategias metabólicas y adaptaciones que permiten a las bacterias colonizar y remediar suelos contaminados (Atlas, 1981).

En el ensayo de aislamiento de bacterias en medio BH con diésel como fuente de carbono y energía, se observó un crecimiento más lento, lo que requirió un período prolongado de incubación de 72 horas. Debido a las propiedades del medio selectivo, las colonias no desarrollaron colores distintivos, presentando en su mayoría una apariencia blanquecina y traslúcida. Por esta razón la diferenciación entre las colonias se basó principalmente en sus características morfológicas, como la forma, la elevación y el borde. Se identificaron un total de 5 tipos de colonias (tabla 3), lo que sugiere una menor diversidad en comparación al medio TSA.

Las colonias presentes fueron visiblemente menos que en el medio TSA obteniendo un UCF de 1.6×10^3 por gramo de suelo (a, b, c, d, e).

Se observó que el medio BH inhibe el crecimiento de bacterias sensibles a la falta de nutrientes por lo que es normal que la densidad poblacional haya sido menor que medio TSA. Este medio cubre las necesidades básicas de las bacterias que puedan usar el diésel como fuente de carbono, por lo que las cepas no mostraron características particulares significativas como color. Asimismo, se confirmó la predominancia de las bacterias Gram-negativas por lo que se sugiere que son capaces de tolerar y metabolizar hidrocarburos.

Tabla 3. Descripción morfológica de las cepas aisladas de BH asociadas al suelo contaminado. Autoría propia.

CEPA	Descripción morfológica	Resultado tinción Gram	Morfología celular
a	Circulares de bordes redondeados, elevación planoconvexa de superficie lisa y tamaño grande de color blanco, aspecto húmedo mucoide.	-	bacilos cortos
b	Circulares con bordes redondeado puntiforme, elevación planoconvexa de superficie lisa y tamaño pequeño de color blanco, aspecto húmedo brillante mucoide.	-	bacilos cortos
c	Circular de bordes redondeados, elevación planoconvexa, de superficie lisa y tamaño pequeño de color amarillo claro, aspecto húmedo brillante mucoide.	-	bacilos cortos curvos
d	Circular de bordes irregulares, elevación planoconvexa, de superficie rugosa y tamaño pequeño de color blanquecino transparente, aspecto húmedo mucoide	-	bacilos largos
e	Circular de bordes irregulares, de superficie plana y tamaño grande, de color blanco transparente, aspecto húmedo brillantes mucoide.	-	bacilos
f	Circular de bordes redondeados puntiforme, elevación plana, de superficie lisa y tamaño muy pequeño de color blanco, aspecto húmedo brillante.	-	bacilos

3.3 AISLAMIENTO DE BACTERIAS DEGRADADORAS ASOCIADAS A LA HIGUERILLA

3.3.1 PRUEBAS DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Para el aislamiento de bacterias asociadas a la higuera, fue necesario cultivar las plantas a partir de semillas. Con el fin de determinar las condiciones óptimas para el crecimiento, se evaluó la germinación de semillas con testa y sin testa. Las semillas sin testa lograron germinar, aunque presentaron crecimiento de hongos. En cambio, las semillas con testa se contaminaron completamente por hongos y no mostraron ningún brote.

Es probable que la aparición de hongos esté relacionada con el exceso de humedad en las semillas. Aunque ambas pruebas se realizaron bajo las mismas condiciones de humedad, la testa acumula más agua debido a la porosidad de su estructura. Raya et al. (2016) mencionan algunos hongos que atacan a esta planta,

especialmente cuando hay un exceso de humedad en el ambiente y el suelo en el que se encuentra no tiene un buen drenaje. Esto hace que la higuera sea propensa al desarrollo de hongos cuando el riego es excesivo. Sin embargo, también se observó que, si no se mantiene un nivel adecuado de humedad en el ambiente de germinación (en este caso, papel estéril permanece seco por al menos 24 horas), las raíces que lograron brotar pueden morir.

3.3.2 CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

Las macetas con suelo contaminado presentaron menor permeabilidad de agua, aunque se observó una mejor retención de ésta. Cuando un suelo se contamina por hidrocarburos, estos recubren las partículas del suelo creando una capa repelente al agua. Una vez que el agua logra penetrar el suelo, ya sea por un riego intenso o al maniobrar un poco el suelo para que se cree una mezcla, puede quedar retenida debido a una reducción de la capacidad de drenaje (Aislabe et al; 1999). La textura del suelo en las macetas con suelo contaminado y en el control fue bastante similar. Sin embargo, el suelo control, al estar libre de hidrocarburos, presentó un drenaje muy alto debido a su textura franco-arenosa. Esta característica provocó estrés hídrico en las plantas, ya que el suelo no fue capaz de retener suficiente agua para satisfacer sus necesidades, por ende, las semillas en la maceta de control no pudieron germinar.

Las semillas en el suelo contaminado comenzaron a brotar después de 15 días. Para la quinta semana, se observaron las primeras hojas verdaderas, con una altura promedio de 2.1 cm. Durante este mismo período, la maceta de control no presentó ningún brote. Al finalizar la novena semana, cada una de las cinco macetas con suelo contaminado contaba con cuatro plantas de higuera. Estas plantas presentaban al menos dos hojas verdaderas y alcanzaron una altura promedio de 3.2 cm. Por su parte, Singer, et al. (2003) determinaron que los metabolitos secundarios de ciertas plantas pueden estimular la degradación de agentes contaminantes en suelos y los compuestos resultantes pueden incluso servir de nutrientes para las mismas plantas. Por lo que se podría sugerir que lo

hidrocarburos presentes en las macetas pudieron ayudar en cierta medida al desarrollo de las plantas de higuera.

En total se dejaron crecer 12 semanas y tres días. La maceta de control no tuvo algún desarrollo de higuera. Tuvieron una evolución de 33.33%, es decir que, de cada 12 semillas plantadas, germinan 4. Un porcentaje bajo cuando se han reportado tasas del 83% al 90% de germinación (MERI, s.f.). Las plantas crecieron entre un rango de 4.9 a 7.6 cm y un promedio de 4 hojas por planta.

3.3.3 AISLAMIENTO DE BACTERIAS ASOCIADAS A LA HIGUERA

Los cultivos de suelo rizosférico en TSA mostraron crecimiento después de 24 horas, con una densidad poblacional de 33×10^4 UFC por gramo de suelo. Por otro lado, las cepas cultivadas en medio BH con diésel como única fuente de carbono tardaron 72 horas en crecer, con un rango de 2.9 a 11×10^4 UFC por gramo de suelo.

En las cepas asociadas al rizoplaneo (la superficie de la raíz y el suelo adherido a ella), se observó una mayor densidad poblacional microbiana en comparación con el suelo rizosférico. En medio TSA, el recuento fue de 28×10^4 UFC, mientras que en medio BH se registró un valor más alto de 50×10^4 UFC. Este resultado contrasta con lo observado en el suelo rizosférico, donde el medio TSA favoreció un mayor crecimiento microbiano. Esto sugiere que las bacterias asociadas al rizoplaneo están mejor adaptadas para metabolizar el diésel, lo que explica su mayor crecimiento en el medio BH.

En el caso de las cepas asociadas a la raíz de higuera, la densidad poblacional fue menor. En medio TSA, el recuento fue de 7.5×10^4 UFC, mientras que en medio BH se registraron 29×10^4 UFC, superando incluso los resultados del suelo rizosférico. Esto indica que, aunque la densidad poblacional en la raíz es menor que en el rizoplaneo, las bacterias asociadas a la raíz tienen una mayor capacidad para degradar hidrocarburos, como lo demuestra su crecimiento en el medio BH.

En resumen, la densidad poblacional bacteriana en BH disminuyó en el siguiente orden: rizoplano > raíz > rizosfera. Esto se debe a que el rizoplano es una zona rica en nutrientes y exudados radiculares, que favorecen el crecimiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos. La raíz, aunque tiene una menor densidad poblacional, alberga bacterias especializadas en la degradación de compuestos orgánicos. Finalmente, la rizosfera, al estar más alejada de la raíz, presenta una menor densidad de bacterias, ya que los nutrientes y exudados están menos disponibles (Berg & Smalla; 2009).

3.3.4 PRUEBA DE RESISTENCIA A DIÉSEL

Las cepas asociadas a la higuera que crecieron en los medios TSA y BH fueron aisladas para realizar las pruebas de resistencia. Cada cepa se diferenció según su morfología, considerando características como el tamaño, color, forma, aspecto y tipo de borde. Aquellas cepas que presentaron similitudes morfológicas, que crecieron en el mismo medio y que provenían de la misma muestra de suelo, se consideraron como la misma cepa. En total, se identificaron 47 cepas.

Para determinar la resistencia de las cepas, se utilizó un criterio de selección basado en su crecimiento en tubos de ensayo por triplicado. Se consideraron como positivas las cepas que crecieron en dos o tres tubos de ensayo, mientras que se clasificaron como negativas aquellas que crecieron en solo uno o en ningún tubo. La evaluación se realizó comparando la nitidez del caldo en los tubos de ensayo con respecto al tubo de control, como se muestra en la figura 5.

En primer lugar, se realizó un ensayo por triplicado para cada cepa (Tabla 4) en caldo BH con glucosa, utilizando cuatro concentraciones diferentes de diésel (1000, 2000, 4000 y 8000 ppm), bajo condiciones de agitación para garantizar la aireación. Los tubos se revisaron cada tercer día para monitorear el crecimiento bacteriano.

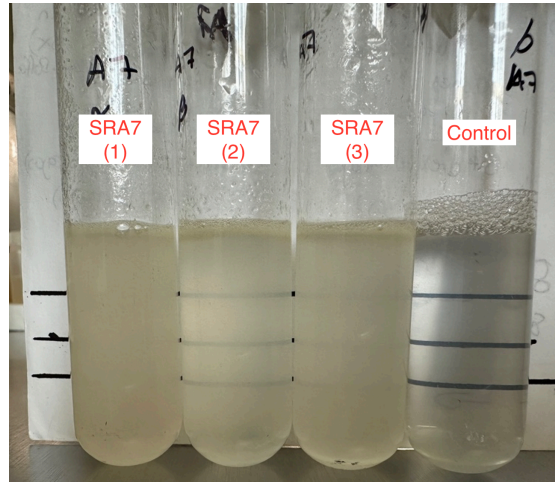


Figura 5. Tubos de ensayo con caldo HB y 8000 ppm de diésel sembrados con la cepa aislada SRA7 (los primero tres tubos) junto a el tubo de control (cuarto tubo). Imagen de autoría propia.

Durante las primeras 72 horas, se observó crecimiento en algunos tubos con concentraciones de 1000, 2000 y 4000 ppm de diésel. Para el séptimo día, fue posible distinguir entre las cepas que mostraron un resultado positivo y aquellas en las que la prueba había fallado. Sin embargo, en los tubos con 8000 ppm, se observaron partículas de diésel emulsificado, por lo que se decidió extender el periodo de incubación tres días más.

Al décimo día, se descartaron las cepas que no mostraron crecimiento o que no crecieron en todas las concentraciones de diésel. En el caso de las cepas que habían logrado emulsificar el diésel previamente, para el décimo día ya se observaban partículas de diésel significativamente más pequeñas o, en algunos casos, la ausencia completa de diésel. Esto sugiere que las cepas requirieron un tiempo más prolongado para metabolizar el hidrocarburo a concentraciones más altas.

En la segunda etapa de la prueba de resistencia al diésel, se repitió el ensayo con las cepas que lograron crecer a la concentración más alta de hidrocarburo, pero esta vez sin la adición de glucosa en el caldo BH. Estas cepas se incubaron bajo las mismas condiciones durante 14 días.

TABLA 4. Cepas aisladas de suelo rizosférico, rizoplano y raíz de higuera. Autoría propia.

Procedencia	Medio	Cepas encontradas	Prueba de crecimiento en caldo BH y diésel	
			Con glucosa	Sin glucosa
Suelo rizosférico	TSA	SRA4	+	-
		SRA5	+	-
		SRA6	+	-
		SRA7	+	+
		SRB1	+	-
		SRB2	+	-
		SRB3	+	-
		SRB4	+	-
		SRC1	+	-
	BH	SRJ1	+	-
		SRJ2	+	-
		SRJ3	+	+
		SRBK1	+	+
		SRBK2	+	+
SRBK3		+	-	
Suelo rizoplano	TSA	SPD1	+	-
		SPD2	+	-
		SPD4	+	-
		SPE1	+	-
	HB	SPN2	+	-
		SPN4	+	+
		SPN5	+	+
Raíz	TSA	RF3	+	-

Alrededor del 50% de las cepas aisladas demostraron capacidad de crecimiento en presencia de diésel, lo que sugiere una adaptación inicial a este hidrocarburo como fuente de carbono. Sin embargo, al eliminar la glucosa del caldo de cultivo y someter las cepas a condiciones más restrictivas, solo el 12.8% de las 47 cepas evaluadas (equivalente a 6 cepas) mostraron la capacidad de utilizar el diésel como única fuente de carbono, superando así la prueba de resistencia al hidrocarburo. Este resultado es consistente un estudio del 2019 (Gao, S. et al; 2019) que indica que las bacterias aisladas de la rizosfera de plantas que crecieron en suelo contaminados por petróleo, solo el 25% mostraron capacidad para degradar el contaminante. Pacwa-Plociniczak, M, et al; (2014) mencionaron que un 20% de su total de cepas aisladas de rizosfera pudieron degradar hidrocarburos.

De las seis cepas resistentes identificadas, cinco fueron aisladas en medio BH y se asociaron con la rizosfera, destacando el papel de este nicho ecológico como reservorio de microorganismos con potencial biorremediador. Tres de estas cepas provinieron específicamente del suelo rizosférico y fueron aisladas en medio BH, mientras que una cuarta cepa se aisló de medio TSA. Las dos cepas restantes se obtuvieron del rizoplano, lo que refuerza la idea de que las raíces de las plantas y su entorno inmediato son zonas críticas para la selección de microorganismos con capacidad de degradación de contaminantes.

En la tabla 5 se muestra que las cepas que mostraron mejor crecimiento en presencia de diésel y que además pudieron disminuir la concentración del contaminante fueron bacterias Gram-negativas. Diversos estudios han identificado bacterias Gram-negativas capaces de degradar compuestos hidrofóbicos como el diésel. Una de las características principales de estas bacterias es su membrana externa rica en lipopolisacáridos, lo que les confiere resistencia a ambientes contaminados (Das & Chandran, 2011).

Tabla 5. Descripción morfológica de las cepas aisladas que dieron positivo en la prueba de resistencia a diésel. Autoría propia.

CEPA	Descripción morfológica	Origen	Resultado tinción Gram	Morfología celular
SRA7	Circular de bordes redondos, elevación convexa, tamaño pequeño, superficie lisa blanquecina translúcida, aspecto brillante y húmedo mucoide.	Suelo rizosférico (TSA)	-	bacilos cortos
SRBK1 (figura 6)	Circular de bordes irregulares, elevación planoconvexa, de superficie lisa y tamaño mediana de color amarillo claro, aspecto húmedo brillante mucoide.	Suelo rizosférico (BH)	-	bacilos
SRBK2 (figura 6)	Circular de bordes redondeados, elevación planoconvexa, de superficie lisa y tamaño mediana de color amarillo traslúcido, aspecto húmedo brillante mucoide.	Suelo rizosférico (BH)	-	bacilos cortos
SPN4 (figura 6)	Circular de bordes irregulares, de superficie plana y tamaño mediano, de color verde transparente, aspecto húmedo brillantes mucoide.	Suelo rizosférico (BH)	-	bacilos
SPN5	Circular de bordes redondos, de superficie plana y tamaño grande, de color blanco, aspecto húmedo brillantes mucoide.	Suelo rizoplano (BH)	-	bacilos
SRJ3 (figura 6)	Circulares con bordes redondeados, elevación planoconvexa de superficie lisa y tamaño pequeño de color beige claro, aspecto húmedo brillante mucoide.	Suelo rizoplano (BH)	-	bacilos cortos



Figura 6. Fotos de cepas aisladas descritas en la tabla 5. (1) Esquina superior izquierda SRBK2, (2) esquina superior derecha SRJ3, (3) esquina inferior izquierda SRK1, (4) esquina superior derecha SRN4. Autoría propia.

Las seis bacterias que mostraron degradar el diésel fueron aisladas de la rizosfera de la higuera. Las bacterias asociadas a la rizosfera de algunas plantas han mostrado un potencial significativo en la biodegradación de compuestos tóxicos orgánicos en suelos contaminados, contribuyendo así a mejorar la eficiencia de la fitorremediación (Glick et al., 2020; Bell et al., 2014; Molina et al., 2020). La rizosfera, al ser una zona de alta actividad microbiana, actúa como un entorno ideal para las interacciones entre plantas y bacterias, facilitando la degradación de contaminantes. Estas bacterias no solo pueden ayudar en la biodegradación de hidrocarburos, sino que también promueven el desarrollo de ciertas plantas, lo que favorece el proceso de fitorremediación (Khan et al., 2013).

Esto demuestra que la interacción entre las plantas y las bacterias de la rizosfera juegan un papel fundamental en la remediación de suelos contaminados con

hidrocarburos, fortaleciendo tanto el crecimiento de las plantas como la capacidad de degradación de los contaminantes presentes en el suelo.

La cepa SRA7 fue la única cepa que se pudo identificar a través de la prueba API correspondiente al género *Sphingomona*. En un estudio realizado por la Universidad de Campeche en el 2013, se utilizó un consorcio de bacterias aisladas de suelos para estudiar su potencial degradativo para diferentes compuestos de petróleo. Este grupo de géneros bacterianos fue conformado por *Pseudomonas* y *Sphingomonas paucimobilis* (Ruiz-Marin, et al., 2013). En otro estudio publicado en el 2016, la *Sphingomona* fue aislada de suelos contaminados por petróleo mostró una reducción significativa de los niveles de hidrocarburos totales del petróleo después de 21 días, donde además que observó un aumento en la diversidad microbiana nativa (Zhou, et al; 2016).

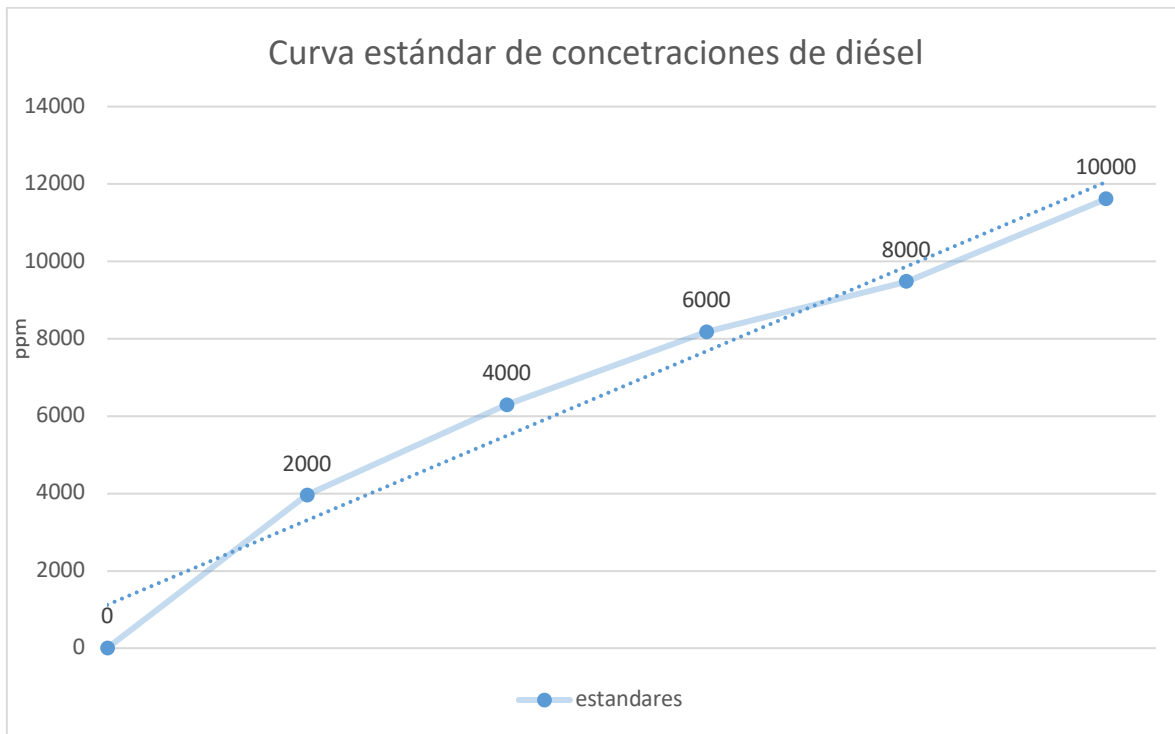
3.4 ANÁLISIS DE DEGRADACIÓN DE DIÉSEL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Para cuantificar la degradación del diésel en el caldo de cultivo BH de las seis cepas seleccionadas (tabla 5), se generó una curva estándar con concentraciones 2,000 (figura 7) a 10,000 ppm (figura 8) con diésel comercial atendiendo las recomendaciones de la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (gráfica 1). En la gráfica 2 se muestran de manera más clara los resultados de la degradación del diésel después de 20 días de incubación en caldo BH con la concentración inicial de 8000 ppm del hidrocarburo. Se puede apreciar resultados favorables donde las cepas aisladas lograron reducir alrededor de un 75% los niveles iniciales de diésel (gráfica 2), como se puede apreciar en la figura 9 y 10 que son los cromatogramas de los analitos correspondientes a las cepas SRBK2 y SPN4, respectivamente.

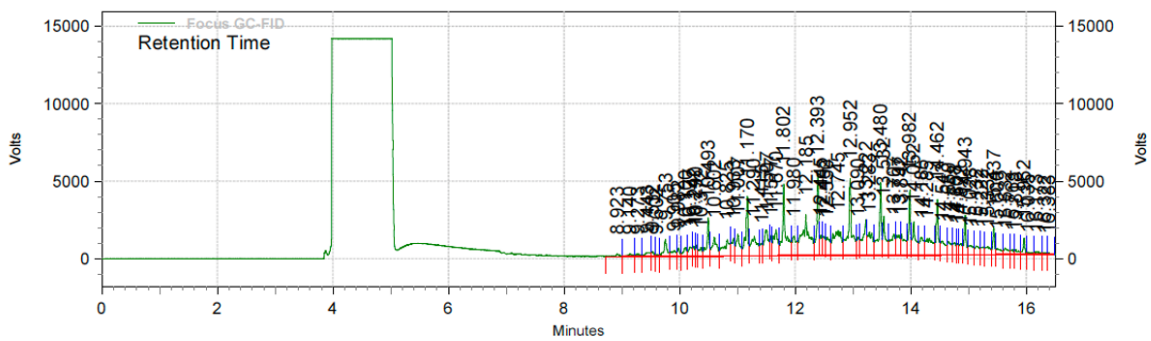
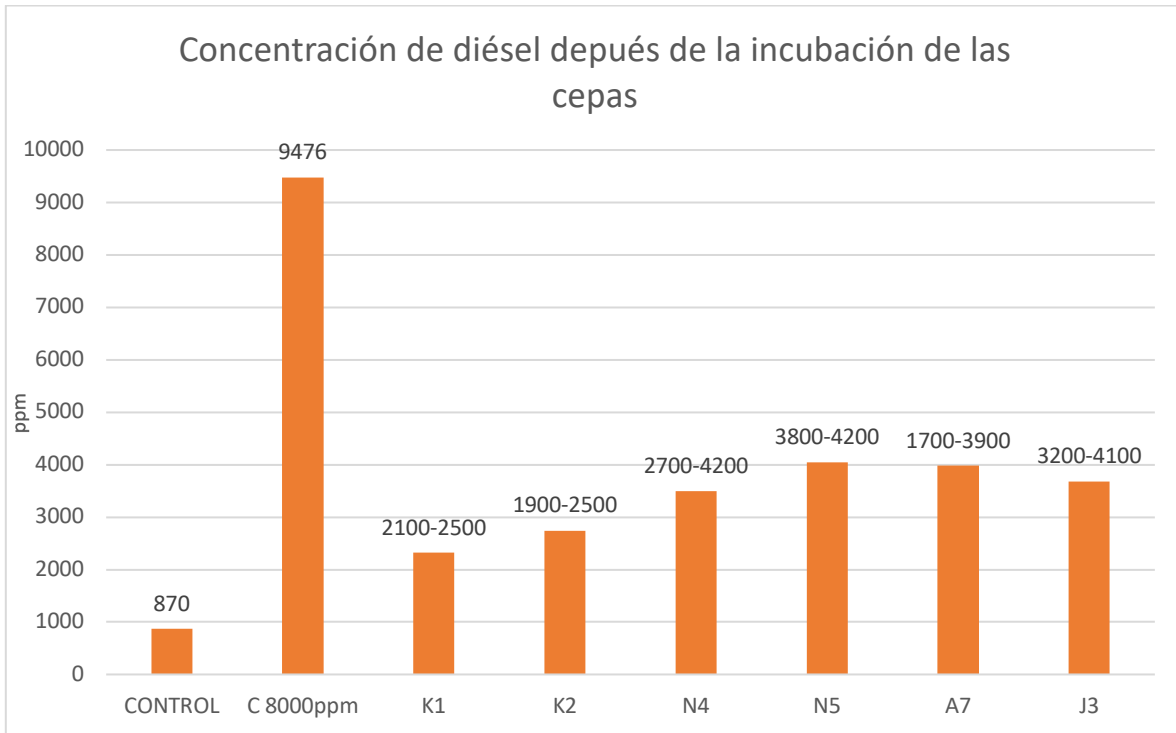
Un estudio publicado en septiembre de 2024 cuantificó la degradación de diésel utilizando cepas aisladas de muestras de suelo de Perú, encontrando que las cepas del género *Pseudomonas* lograron degradar hasta un $91.5\% \pm 0.7$ de la concentración inicial en un período de 10 días (Quiñoes-Cerna et al., 2024). Por otro

lado, Patowary et al. (2016) llevaron a cabo un estudio en el que se cuantificó la degradación de hidrocarburos totales de petróleo mediante un consorcio bacteriano aislado de muestras de suelo de India. Este consorcio, compuesto por bacterias del género *Bacillus*, logró degradar hasta un 84.15% en un período de 5 semanas de incubación. Sugiriendo que las seis cepas aisladas podrían alcanzar un mayor porcentaje de degradación en un período de tiempo más largo que 20 días.

Gráfica1. Curva estándar que se usó para comparar las concentraciones de diésel de las cepas. Autoría propia.

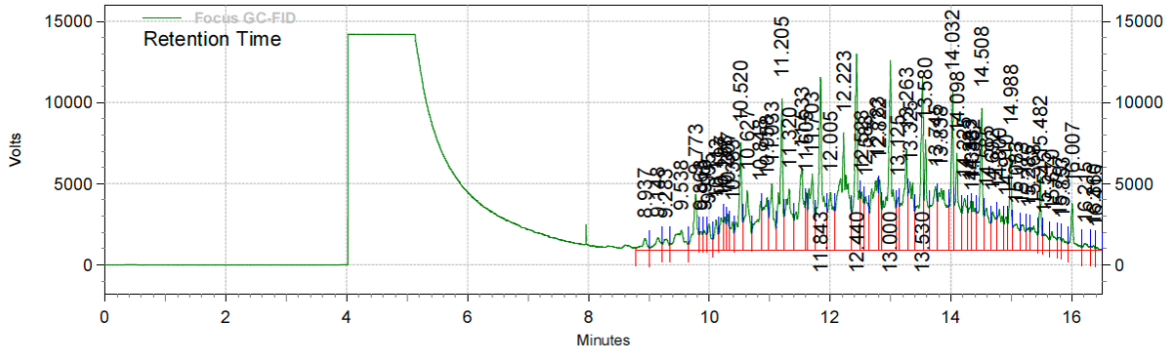


Gráfica 2. Niveles de concentración de diésel de los caldos de cultivo con las cepas seleccionadas después de estar 20 días en incubación. Autoría propia.



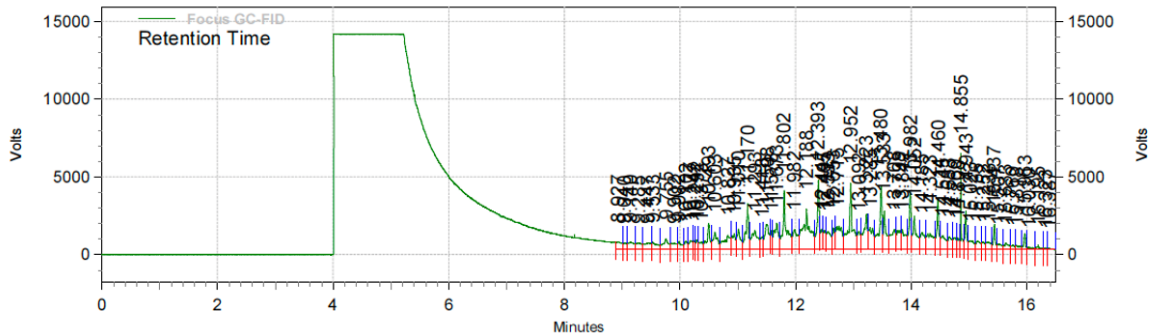
Totals	3609506136	100.00	894018977	100.00
--------	------------	--------	-----------	--------

Figura 7. Gráfica de la lectura por análisis cromatográfico de estándar con 2000 ppm de diésel.



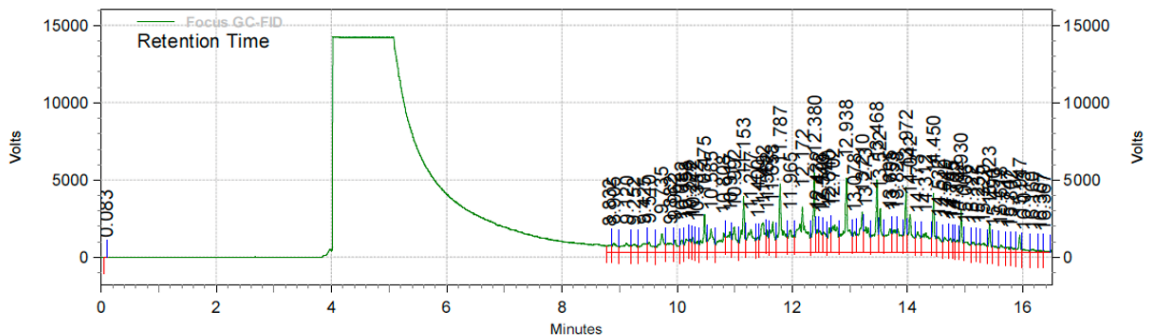
Totals	10658963396	100.00	2363066880	100.00
--------	-------------	--------	------------	--------

Figura 8. Gráfica de la lectura por análisis cromatográfico de estándar con 10,000 ppm de diésel.



Totals	3572312544	100.00	896904000	100.00
--------	------------	--------	-----------	--------

Figura 9. Gráfica de la lectura por análisis cromatográfico de la cepa SRBK2.



Totals	4234227284	100.00	995050954	100.00
--------	------------	--------	-----------	--------

Figura 10. Gráfica de la lectura por análisis cromatográfico de la cepa SPN4.

CONCLUSIONES

En México, los pasivos ambientales son un problema significativo, especialmente por la contaminación de suelos con hidrocarburos. Estos sitios resultan de actividades industriales abandonadas o mal gestionadas que afectan los ecosistemas y limitan el uso de suelo. Puebla ocupa el tercer lugar a nivel nacional en cuanto a superficie afectada. El área de estudio, ubicada en Coronango es un ejemplo que esta problemática.

La caracterización y determinación de propiedades fisicoquímicas del suelo la zona de estudio presentan un pH ácido, textura arenosa y un contenido de materia orgánica moderada, aportando nitrógeno total suficiente, que podría favorecer el desarrollo de algunas especies vegetales.

Se aislaron diecisiete cepas del suelo contaminado de la zona de estudio, en su mayoría Gram-negativo, de las cuales cinco mostraron crecimiento en presencia de diésel.

Se aislaron 47 cepas asociadas a la higuera con morfología colonial diferente, donde la población en rizoplano fue mayor que la presente en raíz y rizosfera.

El 12.8% de cepas (seis de un total de 47) presentaron capacidad de degradar el 75% de la concentración inicial de diésel en un período de 20 días, en caldo BH como medio de cultivo. Todas estas cepas resultaron ser todas Gram-negativo.

Solo una de las cepas se logró identificar como *Sphingomonas* sp. No obstante, el hecho de haberse identificado una cepa de seis señala que el sistema API no sería el más conveniente para esta metodología, por lo que el método de identificación API no sería el más conveniente para esta metodología.

Bibliografía

- Aali, K. A., Parsinejad, M., & Rahmani, B. (2009). Estimation of Saturation Percentage of Soil Using Multiple Regression, ANN, and ANFIS Techniques. *Comput. Inf. Sci.*, 2(3), 127-136.
- Agrologia. [17 de noviembre de 2020]. CIC: la Capacidad de Intercambio Catiónico de los suelos. Recuperado el 1 de octubre de 2023, de <https://agrologia.wordpress.com/2020/11/17/cic-la-capacidad-de-intercambio-cationico-de-los-suelos/>
- Aislabie, J., & Balks, M. R. (1999). Hydrocarbon spills on Antarctic soils: Effects and management. *Environmental Science & Technology*, 33(9), 1263-1271.
- Atlas, R. M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*, 45(1), 180-209.
- Ávila Salazar, & J. Trinidad. (2016). Estudio de la movilidad que presenta el diésel en un suelo contaminado empleando surfactantes [Tesis de Doctorado, Universidad Politécnica de Madrid]. Recuperado el 5 de enero de 2024, de <https://doi.org/10.20868/UPM.thesis.39207>
- Bauidh, K., & Singh, R. P. (2012). Growth, tolerance efficiency and phytoremediation potential of *Ricinus communis* (L.) and *Brassica juncea* (L.) in salinity and drought affected cadmium contaminated soil. *Ecotoxicology and environmental safety*, 85, 13-22.
- Bell, C. W., Asao, S., Calderon, F., Wolk, B., & Wallenstein, M. D. (2015). Plant nitrogen uptake drives rhizosphere bacterial community assembly during plant growth. *Soil Biology and Biochemistry*, 85, 170-182.
- Benavides, A. B. (2007). El biodiesel de aceite de higuera como combustible alternativo para motores diesel. *Dyna*, 74(153), 141-150.
- Berg, G., & Smalla, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 68(1), 1-13
- Bolan, N. S., Park, J. H., Robinson, B., Naidu, R., & Huh, K. Y. (2011). Phytostabilization: a green approach to contaminant containment. *Advances in agronomy*, 112, 145-204
- Brady, N. C., & Weil, R. R. (2008). *The Nature and Properties of Soils* (14th ed.). Pearson Education.
- Brito-Pinto, M. A., Reisser-Júnior, C., Carlos-Timm, L., Franke-Brixner, G., Silva, S., & Helwig-Penning, L. (2014). Desarrollo y crecimiento inicial de la higuera (*Ricinus communis*) sometida a diferentes tensiones de agua en el suelo. *Agrociencia*, 48(5), 501-510.

- Brutti, L; Beltrán, M; & García de Salomone, I. (2018). Biorremediación de los Recursos Naturales. Ediciones INTA, Instituto de Suelos, Centro de Investigación de Recursos Naturales. pp: 15. Recuperado el 5 de noviembre del 2023, de <http://www.ecopuerto.com/Bicentenario/informes/TecnologiasRemediacion.pdf>
- Cavazos-Arroyo, J., Pérez-Armendáriz, B., & Mauricio-Gutiérrez, A. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*. 11(4), 539-550.
- CEUPE. (s.f.). ¿Cómo tratar los suelos contaminados? Centro Europeo de Posgrado. Recuperado el 5 de noviembre de 2023, de <https://www.ceupe.mx/blog/como-funciona-el-tratamiento-del-suelo-y-aguas-subterranas.html>
- Chan-Quijano, J. G. et al. (2013). Especies vegetales útiles para fitorremediar suelos contaminados con hidrocarburos totales del petróleo: un apoyo para la restauración ecológica. *Boletín Divulgativo de la Red Iberoamericana y del Cairbe de Restauración Ecológica*, 7 (3), 11-14
- Chan-Quijano, J. G; Jarquín-Sánchez, A; Ochoa-Gaona, S; Martínez-Zurimendi, P; López-Jiménez, L. N; López-Jiménez, L. N; & Lázaro-Vázquez, A. (2015). Directrices para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Teoría y Praxis*, (17), 123-144
- CONACYT. (2022). Reservas de crudo en México. Recuperado el 28 de abril de 2024, de <https://energia.conacyt.mx/planeas/hidrocarburos/reservas-crudo#>
- CONUEE. (s.f.). Derivados del petróleo. Diésel. Recuperado el 28 de abril de 2024, de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/241728/DieselFT.pdf>
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011(1), 941810.
- Delgadillo-López, González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R., & Acevedo-Sandoval, O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 14(2), 597-612.
- Del Carmen Rivera-Cruz, M; Ferrera-Cerrato, R; Volke-Haller, V; Fernández-Linares, L; Rodríguez-Vázquez, R. (2002). Poblaciones microbianas en perfiles de suelos afectados por hidrocarburos de petróleo en el estado de Tabasco, México. *Agrociencia*, 36(2), 149-160.
- De la Torre Romero, E., Moreno Quintero, E., Piña Bárcena, J., Montiel Moctezuma, C., & Jiménez Sánchez, J. (2022). Estudio exploratorio sobre el movimiento de hidrocarburos por autotransportes de carga en México. Recuperado el 30 de abril de 2024, de <https://imt.mx/archivos/Publicaciones/PublicacionTecnica/pt689.pdf>

- Elgazali, A., Althalb, H., Elmusrati, I., Ahmed, H. M., & Banat, I. M. (2023). Remediation Approaches to Reduce Hydrocarbon Contamination in Petroleum-Polluted Soil. *Microorganisms*, 11(10), 2577.
- Eneh, O. C. (2011). A review on petroleum: source, uses, processing, products, and the environment. *Journal of Applied Sciences*, 11(12), 2084-2091.
- FAO and UNEP. (2021). Global Assessment of Soil Pollution: Report Rome. Recuperado el 6 de mayo de 2024, de <https://doi.org/10.4060/cb4894en>.
- Gao, S., Liang, J., Teng, T., & Zhang, M. (2019). Petroleum contamination evaluation and bacterial community distribution in a historic oilfield located in loess plateau in China. *Applied Soil Ecology*, 136, 30-42.
- Gennadiev, A. N., Pikovskii, Y. I., Tsibart, A. S., & Smirnova, M. A. (2015). Hydrocarbons in soils: origin, composition, and behavior. *Eurasian Soil Science*, 48, 1076-1089.
- Glick, B. R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology advances*, 28(3), 367-374.
- González-Chávez, M. C. A., Ruíz Olivares, A., Carrillo-González, R., & Ríos Leal, E. (2015). Crude oil and bioproducts of castor bean (*Ricinus communis* L.) plants established naturally on metal mine tailings. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 12, 2263-2272.
- González, H. H. R., Bustillos, L. G. T., Fernández, I. M., Cortes, J. D. J. B., & Moroyoqui, P. G. (2010). Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Química viva*, 9(3), 120-145.
- Harekrushna, S., & Kumar, D. C. (2012). A review on: bioremediation. *Int J Res Chem Environ*, 2(1), 13-21.
- Herrera Navarrete, J., Ruíz Marín, A., Canedo López, Y., Zavala Loría, J. D. C., Campos García, S., Sabido Pérez, M. Y., ... & García Zarracino, R. (2011). Estudio de materia orgánica y nutrientes de suelos contaminados con hidrocarburos a tratamientos diferentes. *UNACAR tecnociencia*, (1), 48-55.
- INTAGRI. 2015. La Capacidad de Intercambio Catiónico del Suelo. Serie Suelos. Núm. 09. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 3 p. Recuperado el 4 de mayo de 2024, de <https://www.intagri.com/articulos/suelos/la-capacidad-de-intercambio-cationico-del-suelo>
- Islas-García, A., Peralta-Rodríguez, M., Vega-Loyo, L., López-Aguilar, R., & Rodríguez-Vázquez, R. (2016). Biorremediación por bioestimulación y bioaumentación con microorganismos nativos de un suelo agrícola contaminado con hidrocarburos. *Bioteología y Sustentabilidad*, 1(1), 82-82.

- Jarquín-Sánchez, A; Salgado-García, S; Palma-López, J; Camacho-Chiu, W; & Guerrero-Peña, A. (2011). Análisis de nitrógeno total en suelos tropicales por espectroscopía de infrarojo cercano (NIRS) y quimiometría. *Agrociencia*, 45(6), 653-662
- Jena, J; & Gupta, A. K. (2012). *Ricinus communis* Linn: a phytopharmacological review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(4), 25-29.
- Khan, S., Afzal, M., Iqbal, S., & Khan, Q. M. (2013). Plant–bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere*, 90(4), 1317-1332.
- Kiran, B. R; & Prasad, M. N. V. (2017). *Ricinus communis* L. (Castor bean), a potential multi-purpose environmental crop for improved and integrated phytoremediation. *The EuroBiotech Journal*, 1(2), 101-116.
- Massot, F. (2018). Estrategias de rizadorremediación de glifosato en suelos bajo explotación agrícola intensiva. [Tesis de Doctorado, Universidad de Buenos Aires]
- MERI, Método de Evaluación Rápida de Invasividad para especies exóticas en México. (s.f.). *Ricinus communis* L. Recuperado el 30 de mayo de 2024, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/221074/Ricinus_communis_final.pdf
- Malone, B., & Searle, R. (2021). Updating the Australian digital soil texture mapping (Part 1*): re-calibration of field soil texture class centroids and description of a field soil texture conversion algorithm. *Soil Research*, 59(5), 419-434.
- Merino Noriega, F. (6 de diciembre de 2020). Derrames de hidrocarburos, una amenaza contra el medio ambiente en Puebla. Recuperado el 30 de mayo de 2024, de <https://www.ladobe.com.mx/2020/12/derrames-de-hidrocarburos-una-amenaza-contrael-medio-ambiente-en-puebla/>
- Mesa, N. (12 de diciembre de 2023). Aceite de ricino: usos y beneficios. National Geographic España. Recuperado el 7 de mayo de 2024, de <https://www.nationalgeographic.es/ciencia/2023/12/aceite-ricino-uso-que-es#:~:text=Un%20antiguo%20texto%20m%C3%A9dico%20egipcio,el%20parto%20C%20entre%20otras%20cosas.>
- Molina, L., Segura, A., Duque, E., & Ramos, J. L. (2020). The versatility of *Pseudomonas putida* in the rhizosphere environment. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 110, pp. 149-180). Academic Press.
- Mueller, J. G. (1996). Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnology Research Series*, 6, 125-194.
- Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR), Artículo 5, Fracción XL, Diario Oficial de la Federación, 30 de noviembre de 2006. Recuperado el 7 de mayo de 2024 de, https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg_LGPGIR_311014.pdf

- Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR), Artículo 132, Fracción XL, Diario Oficial de la Federación, 30 de noviembre de 2006. https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/regley/Reg_LGPGIR_311014.pdf
- Olivares, A. R.; Carillo-Gonzalez, R.; Gonzáles-Chávez, M. D. C. A.; & Hernández, R. M. S. (2013). Potencia of castor bean (*Ricinus communis* L.) for phytoremediation of mine tailings and oil production. *Journal of environmental management*, 114, 316-323.
- Pacheco Chim, M. (2020). Remediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante los métodos de oxidación química y lavado de suelo. [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. Recuperado el 3 de junio de 2024, de <http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/132.248.52.100/17272/Tesis.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Pacwa-Plociniczak, M., Płaza, G. A., Poliwoda, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2014). Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 9385-9395
- Palanivel, T.M., Pracejus, B. & Victor, R. (2020). Phytoremediation potential of castor (*Ricinus communis* L.) in the soils of the abandoned copper mine in Northern Oman: implications for arid regions. *Environ Sci Pollut Res* 27, 17359–17369
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2016). Development of an efficient bacterial consortium for the potential remediation of hydrocarbons from contaminated sites. *Frontiers in microbiology*, 7, 1092.
- Partida-Sedas, S., Cabal-Prieto, A., González-Reséndiz, J. D. J., García Albortante, J., Carlos-Cano, J., & Ruiz-Rosado, O. (2021). Determinación y distribución espacial de nitrógeno total en suelos cafetaleros de una microcuenca hidrográfica. *Revista tediq*, 7(7), 181.
- Quiñones-Cerna, C., Castañeda-Aspajo, A., Tirado-Gutierrez, M., Salirrosas-Fernández, D., Rodríguez-Soto, J. C., Cruz-Monzón, J. A., ... & Esparza-Mantilla, M. (2024). Efficacy of Indigenous Bacteria in the Biodegradation of Hydrocarbons Isolated from Agricultural Soils in Huamachuco, Peru. *Microorganisms*, 12(9), 1896.
- Raya, J., Ramírez, J. C., Covarrubias, J., Chablé, F., & Aguirre, L. (2016). Manejo agronómico de la higuera (*Ricinus communis* L.). *Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica*. 4 (21)
- Rissato, S. R., Galhiane, M. S., Fernandes, J. R., Gerenutti, M., Gomes, H. M., Ribeiro, R., & de Almeida, M. V. (2015). Evaluation of *Ricinus communis* L. for the Phytoremediation of polluted soil with organochlorine pesticides. *BioMed research international*, 2015(1), 549863
- Rivera González, B. (6 de abril de 2023). El 53% de los suelos contaminados en Puebla siguen sin ser remediados. Central Puebla Irreverente. Recuperado el 24 de octubre

de 2024, de <https://www.periodicocentral.mx/puebla/el-53-de-los-suelos-contaminados-en-puebla-siguen-sin-ser-remediados/160928/#ixzz8mnjJiq00>

Rivera Ortiz, P; Rivera Lárraga, J. E; Andrade Limas, E. D. C; Heyer Rodríguez, L; Garza Requena, F. R. D. L; & Castro Meza, B. I. (2018). Bioestimulación y biorremediación de recortes de perforación contaminados con hidrocarburos. *Revista Internacional de contaminación ambiental*, 34(2), 249-262.

Ruiz-Marín, A., Zavala-Loria, J. C., Canedo-López, Y., & Cordova-Quiroz, A. V. (2013). Tropical bacteria isolated from oil-contaminated mangrove soil: bioremediation by natural attenuation and bioaugmentation. *Revista mexicana de ingeniería química*, 12(3), 553-560.

Saadawi, S., Algadi, M., Ammar, A., Mohamed, S., Alennabi, K., & , . (2015). Phytoremediation effect of *Ricinus communis*, *Malva parviflora* and *Triticum repens* on crude oil contaminated soil. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(9).

Sanzano, A. (2006). El fósforo del suelo. Química del suelo. Recuperado el 23 de Julio de 2023, de:
<https://s9a0d11af78cd478d.jimcontent.com/download/version/1563476239/module/7956239776/name/EI%20Fosforo%20del%20suelo.pdf>

Singer, A. C., Crowley, D. E., & Thompson, I. P. (2003). Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends in Biotechnology*, 21(3), 123-130.

SEMARNAT. (1996). Los suelos de Tabasco. Restauración, conservación y uso. Gobierno del Estado de Tabasco, México. Recuperado el 10 de octubre de 2023, de:
https://www.researchgate.net/publication/293958174_Degradacion_y_Conservacion_de_los_Suelos_de_Tabasco

Severino, L. S., et al. (2012). Review on the challenges for increased production of castor. *Agronomy Journal*, 104(4), 853-880.

Severino, L; & Auld, D. L. (2013). A framewor fro the study of the growth and development of castor plant. *Industrial Crops and Products*, 46, 25-38.

Shainberg, I., Rhoades, J. D., & Prather, R. J. (1980). Effect of exchangeable sodium percentage, cation exchange capacity, and soil solution concentration on soil electrical conductivity. *Soil Science Society of America Journal*, 44(3), 469-473.

Sujatha, M; Reddy, T. P; & Mahasi, M. J. (2008). Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jathopha curcas* L. *Biotechnology advances*, 26(5), 424-435.

Sutormin, O. S., Goncharov, A. S., Kratasyuk, V. A., Petrova, Y. Y., Bajbulatov, R. Y., Yartsov, A. E., & Shpedt, A. A. (2024). Effects of Oil Contamination on Range of Soil Types in Middle Taiga of Western Siberia. *Sustainability*, 16(24), 11204

- Sutton, N. B., et al. (2013). "Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure and applied bioremediation." *Environmental Pollution*, 172, 20-28.
- Vieira, J. I. (2018). Expansión del robo de combustible en México: de actividad delictiva a fenómeno criminal. *bie3: Boletín IEEE* (12), 611-625
- Yavari, S; Malakama, A; & Sapari, N. B.(2015). A review on phytoremediation of crude oil spills. *Water Air Soil Poll.* 226, 279
- Yeboah, A., Lu, J., Gu, S., Yuzhen, S., Amoanimaa-Dede, H., Agyenim-Boateng, K. G., & Yin, X. (2020). The utilization of *Ricinus communis* in the phytomanagement of heavy metal contaminated soils. *Environmental Reviews*, 28(4), 466-477.
- Volke Sepúlveda, T; Velasco, J. A. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Editorial INE-SEMARNART pp: 29-32
- Wauquier, J. P. (1995). Petroleum Refining: Crude oil, petroleum products, process flowsheets (Vol. 1). Editions Technip.
- Zamora, A., Ramos, J., & Arias, M. (abril de 2012). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro*, 24(1), 5-12.
- Zhou, L., Li, H., Zhang, Y., Han, S., & Xu, H. (2016). Sphingomonas from petroleum-contaminated soils in Shenfu, China and their PAHs degradation abilities. *Brazilian journal of microbiology*, 47(2), 271-278.

Anexos

Anexo 1. Contenido de Buffer de peptonas en 1 L de agua destilada

Anexo 2. Contenido de medio agar BH en 1 L de agua destilada

Buffer de Peptonas	
REACTIVO	CONTENIDO [g/L]
K ₂ HPO ₄	2.1772
KH ₂ PO ₄	1.7008
TWEEN	0.1 mL
pH	7 ±0.2

Medio agar BH	
REACTIVO	CONTENIDO [g/L]
MgSO ₄	0.2
CaCl ₂	0.02
K ₂ HPO ₄	1.4
KH ₂ PO ₄	1.8
NH ₄ NO ₃	1.3
GLUCOSA	0.1
VITAMINAS	1 m/L c/u
ELEMENTOS TRAZA	10 m/L
AGAR BACTERIOLÓGICO	18
pH	7 ±0.2

*Biotina y Tiamina en una concentración de 1 mg/mL.

Nota: Las especificaciones para la preparación de vitaminas y elementos traza se encuentran especificados en las tablas 6.1 y 6.2.

Tabla 6.1. Preparación de Tiamina

Tiamina	
REACTIVO	CONTENIDO
Thiamina	1 mg/ml
Con agua destilada y se esteriliza por micromembrana	

Tabla 6.1. Preparación de elementos traza para 1 L de solución

Elementos traza	
REACTIVO	CONTENIDO
EDTA	5 g
FeCl ₂ ·6H ₂ O	0.83 g
ZnCl ₂	84 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	13 mg
H ₃ BO ₃	10 mg
GLUCOSA	10 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.6 mg
Primero se debe agrandar el EDTA al 80% del volumen de la solución y ajustar pH a 7.5 con NaOH, después agregar el resto de los reactivos. Esterilizar en autoclave	