



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA  
COLEGIO DE INGENIERÍA AMBIENTAL



TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE INGENIERO  
AMBIENTAL

PRESENTA:  
IVONNE JISSET HERNÁNDEZ GALICIA

EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE GASOLINA POR  
EL HONGO *TRAMETES VERSICOLOR*, (L.:FR.) QUÉL. Y LA  
GENERACIÓN DE UNA PROPUESTA DE  
BIORREMEDIACIÓN DE UN ÁREA CONTAMINADA

DIRECTOR  
DR. MARCO ANTONIO MARÍN CASTRO  
CO DIRECTOR  
M.I. ÁNGEL SILVETI LOEZA

ASESORES  
DRA. MIRIAM VEGA HERNÁNDEZ  
M.I.Q MONTSERRAT GONZÁLEZ LIMÓN

PUEBLA DE ZARAGOZA, PUEBLA, MÉXICO

JUNIO DE 2023

## Índice general

<b>Agradecimientos .....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>2</b>
<b>Planteamiento del problema .....</b>	<b>2</b>
<b>Justificación .....</b>	<b>4</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>6</b>
<b>Objetivo general .....</b>	<b>6</b>
<b>Objetivos particulares.....</b>	<b>6</b>
<b>Hipótesis .....</b>	<b>6</b>
<b>CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES .....</b>	<b>7</b>
1.1 Hidrocarburos.....	7
1.1.1 Destilación Fraccionada.....	8
1.1.2 Octanaje.....	8
1.2 Contaminación de suelos por hidrocarburos.....	9
1.2.1 Impacto ambiental.....	11
1.2.2 Casos de derrames de hidrocarburos mundialmente .....	12
1.2.3 Derrames en México .....	14
1.3 Remediación de suelos .....	15
1.3.1 Tratamiento de suelos contaminados por hidrocarburos .....	17
1.3.2 Biorremediación de suelos.....	18
1.3.3 Micorremediación de suelos .....	19
1.4 Legislación ambiental en derrames de hidrocarburos.....	22
1.5 Enzimas.....	24
1.5.1 Enzima ligninolíticas.....	25
1.5.2 Peroxidasas .....	27
1.5.3 Oxidasas .....	29
1.5.4 Lacasas.....	29
1.5.5 Mecanismos de degradación .....	30

1.6	Hongos utilizados en la biorremediación.....	31
1.6.1	Uso de hongos ligninolíticos para la biorremediación .....	32
1.6.2	Hongos ligninolíticos en México.....	33
CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA.....		38
2.1	Obtención cepas fúngicas .....	38
2.2	Aislamiento y purificación del micelio.....	38
2.2.1	Preparación del medio PDA.....	40
2.2.2	Preparación medio líquido .....	41
2.2.3	Cultivo del micelio de las cepas fúngicas en el caldo mineral .....	42
2.2.4	Condiciones del crecimiento de la biomasa.....	42
2.3	Contacto de cepas fúngicas con el hidrocarburo de alto octanaje.....	42
2.3.1	Soporte inerte.....	42
2.3.2	Diseño del ensayo.....	43
2.3.3	Extracción de alícuotas .....	43
2.3.4	Obtención del hidrocarburo.....	43
2.4	Determinación de degradación de gasolina por espectrofotometría infrarroja .....	44
2.4.1	Espectrofotómetro IR .....	44
2.4.2	Programa del espectrofotómetro IR .....	46
2.4.3	Utilización del espectrofotómetro IR .....	46
2.4.4	Gráficas de hidrocarburos.....	47
2.4.5	Gráficas de degradación del hidrocarburo .....	48
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		50
3.1	Obtención cepas fúngicas .....	50
3.2	Aislamiento y purificación del micelio.....	50
3.3	Contacto de cepas fúngicas con el hidrocarburo de alto octanaje.....	51
3.3.1	Reacción del micelio .....	51
3.3.2	Contenido neto de biomasa .....	53
3.3.3	Características del micelio .....	57
3.3.4	Muestras en alícuotas .....	60

3.4	Fundamento de la degradación del hidrocarburo por Espectrofotometría infrarrojo .....	62
3.4.1	Diseño del Espectrofotómetro infrarrojo.....	62
3.4.2	Tablas de Espectroscopía Infrarroja .....	62
3.4.3	IR: Absorciones infrarrojas características de los grupos funcionales .....	63
3.4.4	Comparación de tablas .....	64
3.4.5	Grupos funcionales degradados .....	66
3.5	Diseño de una propuesta de biorremediación.....	68
3.5.1	Contenedores de micelio – vehículos de inoculación .....	69
3.5.2	Utilización de los sacos de micelio.....	70
	<b>Conclusión.....</b>	<b>75</b>
	<b>Mejoras del proyecto .....</b>	<b>76</b>
	<b>Referencias .....</b>	<b>77</b>
	<b>Diagrama de actividades .....</b>	<b>89</b>

## Índice de figuras

Figura 1.	Estructura química de la celulosa.....	26
Figura 2.	Diferentes especies de hongos y su función en la micorremediación 32	
Figura 3.	Caja petri sembrada con <i>Pleurotus Djamor</i> .....	38
Figura 4.	Bandas del hidrocarburo, gasolina tipo magna, en el espectrofotómetro IR.....	48
Figura 5.	Crecimiento sano de micelio.....	50
Figura 6.	Micelio perforado con círculos.....	51
Figura 7.	Crecimiento de micelio en caldo nutritivo .....	52
Figura 8.	Extracción de micelio para colocarlo en soporte .....	52
Figura 9.	Micelio sobre soporte.....	53
Figura 10.	Medición de Biomasa en balanza.....	53
Figura 11.	Fases de desarrollo de un microorganismo.....	56
Figura 12.	Disminución de micelio .....	57
Figura 13.	Microscopia de barrido en 500x de la estructura de <i>Pleurotus Djamor</i> , A) micelio sin alteración, B) micelio con gasolina .....	58
Figura 14.	Estructuras microscópicas de <i>Trametes Versicolor</i> en 500x, A) micelio sano, B) micelio expuesto a gasolina.....	58
Figura 15.	Diagrama simplificado de las interacciones fúngicas con hidrocarburos del petróleo y metales tóxicos (QIANWEI, et al., 2020) .....	59
Figura 16.	Extracción de la gasolina para colocarla en alícuotas.....	61
Figura 17.	Espectrofotómetro listo para muestrear.....	61
Figura 18.	Equipo de Espectrofotometro completo.....	62

Figura 19.	Blanco de bandas de gasolina en IR.....	62
Figura 20.	Bandas de Espectrofotómetro IR para <i>Pleurotus Djamor</i> .....	65
Figura 21.	Bandas de Espectrofotómetro IR para <i>Trametes Versicolor</i> .....	65
Figura 22.	Bandas en Espectrofotómetro IR de <i>Pleurotus Djamor</i> y <i>Trametes Versicolor</i> en los 4 días, respectivamente.....	68
Figura 23.	Panorama general del uso de sacos de micelio para micorremediación.....	72

## **Índice de Gráficas**

Gráfica1.	Capacidad de crecimiento de la biomasa experimental .....	55
Gráfica2.	Comparación de transmitancia en IR .....	67

## Índice de tablas

Tabla 1.	Repeticiones con cada cepa y su total de repeticiones .....	51
Tabla 2.	Gramos de Biomasa utilizada en cada unidad experimental de <i>Pleurotus Djamor</i> y <i>Trametes Versicolor</i> .....	54
Tabla 3.	Comparación de porcentaje de transmitancia en cada hongo .....	66

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a todos mis profesores y compañeros, es imposible que no nos influyan de una manera u otra las personas que están a nuestro alrededor.

Mis amigos han sido una parte fundamental en mi crecimiento, han sido pilares en mi educación, los de mi carrera, los de idiomas y los que he conocido de más tiempo, les agradezco las palabras de aliento, los apapachos, el estar presentes. A mis tres mejores amigos, les agradezco el siempre estar, el escuchar mis emociones y nunca invalidarlas, por eso y mucho más, merecen estar aquí, son las personas que cuidan con mucho cuidado mi corazón y mi salud.

A mis hermanos en la fe, agradezco sus oraciones, yo sé que Dios escuchó más de mí por ustedes, gracias por preguntar y por haber sido pilares cuando más me sentía vulnerable.

A mi familia en general, agradezco cuando me han cuidado y protegido como a una hija, como una hermana, cuando de diferentes maneras me han demostrado su cariño, siempre atesorare los mejores momentos que he tenido con ustedes, gracias por querer saber siempre más de mi carrera y tesis.

A mi papá, mamá y hermana, quiero agradecer su paciencia, su amor y la posibilidad que me dieron de poder continuar estudiando, sus sacrificios hechos serán siempre valorados en mi corazón, ustedes han sido un parámetro para continuar este camino y siempre querer dar lo mejor de mí.

A mis sinodales y asesores, sin ustedes este trabajo no sería posible, me alentaron con mucho cariño, como a una hija, me escucharon y dieron los mejores consejos que podría haber escuchado, cuando me sentía débil fueron sus palabras como un unguento a mis heridas, gracias por abrir su corazón y su inteligencia a mí.

Por último y más importante a Jehová, gracias por nunca cansarse de mí, Él fue mi oasis en todo momento, sin Él verdaderamente nada de mí sería posible. ILSM.

## **Introducción**

### **Planteamiento del problema**

El uso de hidrocarburos ha mejorado nuestra calidad de vida como seres humanos, por lo que la obtención de estos ha sido una prioridad a nivel mundial.

En México se cuenta con pozos petroleros, aproximadamente con nueve mil, los cuales utilizan ductos para su distribución en todo el país. Desafortunadamente el manejo de hidrocarburos está vinculado con posibles accidentes ya sea con derrames o con fugas, los cuales son ocasionados por fallas industriales, errores humanos o por actos de vandalismo. De acuerdo con el INSC (Inventario Nacional de Sitios Contaminados) que tiene la SEMARNAT, a diciembre de 2018 en México existían 913 sitios contaminados, de los cuales 756 se localizan en zonas rurales y 157 en zonas urbanas; (SEMARNAT, 2021)

La mayoría de estos accidentes de derrames por ducto llegan al suelo y se filtran en los mantos acuíferos. Cuando la contaminación llega al agua es más difícil el remediarla, por lo que es importante enfocarse en tratar de descontaminar el suelo antes de que alcance este recurso natural, las afectaciones que tiene la contaminación en el suelo implican la perturbación a la flora, fauna, microorganismos y específicamente a la fertilidad de los suelos. El crecimiento de especies y el ciclo de la vida en esas áreas son afectadas, impactando negativamente los sistemas de producción y a la salud, ya que una mezcla de hidrocarburos con fracción pesada produce daños físicos y neurológicos en los humanos, pues estos son mutagénicos, carcinogénicos. Cabe destacar que algunos de los hidrocarburos que están en la mezcla de fracción pesada pueden producir daños neurológicos, también en riñón, hígado y pulmones. (Santillán, 2012)

En la búsqueda de diversas técnicas de recuperación y tratamiento de suelos, se ha llegado a una propuesta más natural y amigable con el ambiente con un impacto mínimo a la naturaleza, además de apoyar al ecosistema, la cual es la micorremediación, este es un tipo de biorremediación, que utiliza hongos como su principal fuente de remediación.

La micorremediación es el uso de los hongos para degradar o remover toxinas del medio ambiente, los hongos desarmen (hidrolizan o fermentan) moléculas, pues rompen cadenas largas de toxinas y las vuelven más simples.

En el orden natural de los organismos que viven en los ecosistemas dañados el primero que llega a habitar ese suelo son los hongos, ya que el ecosistema será tan saludable como su diversidad en población fúngica. La vida surge del micelio. Los hongos controlan el flujo de nutrientes, y como consecuencia son los principales gobernadores del equilibrio ecológico. (P. Stamets, 2005)

Por esta razón cuando un suelo es contaminado se trata de restaurar su equilibrio ecológico con los hongos, se debe de generar o proponer, una metodología en la cual en contenedores de algún material orgánico y el micelio de los hongos, se excava en estos lugares contaminados y se colocan estos contenedores, los cuales al cabo de unas semanas restaurarán lentamente el ciclo de nutrientes, dando la bienvenida a diferentes especies de bacterias, plantas y hasta de insectos, así como de animales.

## Justificación

México al ser uno de los países que producen más hidrocarburos en el mundo, ocupando el cuarto lugar en América. En el 2021, México fue el doceavo lugar globalmente productor de crudo y el quinto lugar en logística de infraestructura, significando que tiene la tecnología para poder producir billones de barriles y también las medidas de seguridad para la extracción de hidrocarburos sin dañar o sin perjudicar nuestro medio ambiente, pero hay ocasiones en las cuales esto no es suficiente y nos enfrentamos a derrames, así como a fugas. (ITA, 2022)

Las empresas tienen un plan de contingencia ambiental, contamos con un “plan nacional de contingencia para derrames de hidrocarburos y sustancias nocivas potencialmente peligrosas en las zonas marinas mexicanas” (PNC), en los cuales se gastan millones de pesos en remediación ex situ e in situ, incluso estas son las opciones de tecnología que se dan en empresas privadas, estos métodos dejan un ambiente sin vida, el cual ecológicamente debería estar conectado con la naturaleza.

La micorremediación es un tipo de biorremediación que tiene como principal objetivo recuperar el ecosistema perdido por diferentes tipos de contaminantes y a un precio accesible, así como una metodología simple en su elaboración comparada con las demás tecnologías de descontaminación. Las enzimas segregadas por hongos pueden romper un amplio grupo de enlaces, como los que se encuentran en la madera. (PNC, 2016)

Los hongos macroscópicos basidiomicetos en el contexto de biorremediación se pueden subclasificar en dos grupos, los causantes de la fermentación blanca y fermentación marrón de la madera, actualmente solo un bajo porcentaje de hongos se les ha investigado su potencial degradador. México al ser un país megadiverso no tiene ninguna dificultad al encontrarse este tipo de reino en sus boques y con una extensa variedad, por lo que adquirirlos puede ser relativamente sencillo.

Un tipo de hongo que ya se ha confirmado por diferentes estudios su degradabilidad es el *Pleurotus Ostreatus*. Investigación realizada por el micólogo Paul Stamets, muestra cómo se utilizó el micelio de esta especie para remediar una zanja que

contenía suelo saturado con diésel, este fue degradado después de 8 semanas. (P. Stamets, 2005)

La población universitaria tiene acceso a información sobre la biorremediación de la cual hay diferentes tipos. En esta se emplean bacterias, plantas y hongos y en este trabajo se busca emplear la micorremediación.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Determinar y evaluar el potencial degradador del hongo *Trametes Versicolor* en hidrocarburos por espectrofotometría en infrarrojo.

### **Objetivos particulares**

Comparar la degradación enzimática entre *Pleurotus Djamor* y *Trametes Versicolor*

Generar una propuesta de biorremediación

Mediante la microscopía electrónica de barrido, observar las estructuras internas del hongo.

### **Hipótesis**

- El *Trametes Versicolor* es mejor degradador que *Pleurotus Djamor*.
- Si el *Trametes Versicolor* realiza fermentación blanca de la madera, tendrá la capacidad de degradar el hidrocarburo.
- Por las características morfológicas del *Trametes Versicolor* se podría presentar una mayor degradación de hidrocarburos que la del *Pleurotus Djamor*.

## **Capítulo 1: Antecedentes**

### **1.1 Hidrocarburos**

Los Hidrocarburos son un grupo de compuestos orgánicos que contienen principalmente carbono e hidrógeno. Son los compuestos orgánicos más simples y pueden ser considerados como las sustancias principales de las que se derivan todos los demás compuestos orgánicos.

Pueden encontrarse de forma líquida natural (petróleo), líquida por condensación (condensados y líquidos del gas natural), gaseoso (gas natural) y sólido (en forma de hielo como son los hidratos de metano). (SENER, 2015)

El petróleo crudo y las fracciones que provienen de él están conformados de moléculas denominadas hidrocarburos y por una combinación de átomos de carbono tetravalentes con átomos de hidrógeno monovalentes. (MINEM, 2003)

Usualmente en las gasolineras se manejan diferentes tipos de combustible, la principal de todas es la gasolina ( $C_8H_{18}$ ), que es una mezcla de compuestos orgánicos que procede de una fracción del petróleo, la cual contiene cuatro tipos diferentes de hidrocarburos (compuestos de Carbono e Hidrógeno), todos ellos con un número de carbonos de entre 4 y 11, y que son los siguientes: 1. Parafínicos o saturados cuyas cadenas en las que el enlace C-C (carbono-carbono) es siempre sencillo; 2. Olefínicos en los que existe algún enlace C-C múltiple; 3. Nafténicos o cíclicos que poseen cadenas de enlaces C-C y se cierran formando anillos; y 4. Aromáticos que están formadas básicamente por anillos de enlaces C-C entre los cuales se conforma una estructura electrónica compleja que se extiende por todo el anillo (PEMEX, 2010).

Se manejan dos tipos de gasolina, la magna, contiene 87 octanos y es de un color verdoso, la segunda es premium, contiene 92 octanos, la cual es de un color rojizo. (CONUEE, 2022)

### **1.1.1 Destilación Fraccionada**

La función de una refinería es transformar el petróleo en productos derivados que satisfagan las necesidades de la sociedad.

Una refinería es un centro de trabajo donde el petróleo crudo se transforma en sus derivados. Esta transformación se logra mediante los procesos de: destilación atmosférica, destilación al vacío, hidrodesulfuración, desintegración térmica, desintegración catalítica, alquilación y reformación catalítica entre otros. (SENER, 2011 )

El método para obtener la gasolina es el siguiente: Se extrae el petróleo del subsuelo mediante torres de extracción, también se utilizan balancines que funcionan como bombas. Se transporta a las refinerías, donde el combustible se separa en fracciones de hidrocarburos que tienen propiedades parecidas . Este proceso se denomina destilación fraccionada (el petróleo se calienta hasta que los compuestos que lo forman se evaporan). Los compuestos se enfrían y se condensan a medida que suben por la columna de destilación. En primer lugar, se obtienen los menos volátiles y, al final, los más volátiles. Los grupos de compuestos que se van separando tienen propiedades parecidas. Una de las fracciones obtenidas es la gasolina, también llamada gasolina de destilación. (CONUEE, 2022)

Se debe de calentar el petróleo crudo a aproximadamente 400 grados centígrados, se convertirá en un aceite viscoso a un vapor caliente y fluido, así es como ingresa a la torre de fraccionamiento. El vapor sube, se condensa en diferentes recipientes recolectores, según la variación de las temperaturas.

### **1.1.2 Octanaje**

El ciclo de otto es la operación que tiene la mayoría de autos de cuatro tiempos del motor, se ha buscado controlar la combustión de la mezcla de la gasolina y aire en el interior de cada cilindro para que la expansión de este sea suave por la mezcla gaseosa. Ya que si la mezcla se quema rápidamente el pistón recibe un tirón duro, se produce un cascabeleo lo que se busca es que sea suave con mucha fuerza.

Los hidrocarburos aromaticos crean esta reaccion suave tan buscada, las gasolinas se clasifican por el indice de octanaje, que es una medida de su tendencia a causar este famoso cascabeleo. Cuanto más alto sea el indice de octanaje de un hidrocarburo, mejor será su desempeño en el motor. Para minimizar este cascabeleo, las gasolinas sin plomo contienen metil.ter-butil eter (MTBE), pero se han encontrado mantos acuíferos contaminados con esta sustancia por lo que se ha buscado un sustituto idoneo. (Chang, 2010)

El índice de octano se relaciona con la capacidad del combustible para permitir una combustión más completa y por tanto, la generación de mayor energía durante su quemado. El índice de octano reportado en este proyecto presentó valores de 89 a 90, lo cual cumple con el valor establecido por la normatividad ambiental (87 mínimo). (SEDEMA, 2017)

El octanaje es la capacidad antidetonante, es decir, el control que se tiene al hacer combustión dentro de un motor, aprovechando al máximo la energía liberada. (CONUEE, 2022)

## **1.2 Contaminación de suelos por hidrocarburos**

El suelo es uno de los recursos naturales disponibles que tenemos a nuestro alcance, desempeña varias funciones todos los días, regula el ciclo del agua, los ciclos biogeoquímicos, de la misma manera, es el medio por el cual se filtra el agua de las lluvias y llega a los mantos acuíferos, por lo tanto el suelo es la capa protectora de otro de nuestros recursos vitales.

El suelo alberga un sinfín de especies animales y vegetales, incluso a organismos que son fundamentales para nuestra existencia por lo que preservarlo se ha convertido en una prioridad.

Cuando al suelo, por diversas actividades cotidianas e indispensables, se le empiezan a agregar sustancias que no son propios de su naturaleza, hay un impacto negativo en el ambiente y en la población. La estructura molecular de los

hidrocarburos es una cadena hidrocarbonada ramificada con diferentes grupos funcionales que van desde OH, hidroxilos, metilos, carbonilos, grupos cetónicos, grupos aromáticos, entre otros. Algunos llevarán diferentes elementos como benceno, tolueno, xileno y a hasta plomo, principalmente estos sirven como antidetonantes, como aditivos para la optimización del rendimiento mecánico y para reducir su impacto ecológico. (Baird, 2012)

De acuerdo con el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (2017), los contaminantes en suelo degradan la biodiversidad y funcionamiento del suelo y pueden reducir la productividad agrícola, así como causar enfermedades e incluso la muerte en los humanos y en la flora y fauna silvestre. (SEMARNAT, 2018)

En el momento en el que una sustancia desconocida entra en contacto con los organismos vivos de un suelo, hay una afectación, un desequilibrio y un daño a un ecosistema, esta alteración trae consecuencias. Se ha reconocido que diferentes empresas han contaminado suelos mexicanos, con miles de litros de hidrocarburos, ya sea por accidente o en algunas ocasiones, son actos de vandalismo.

Con esta problemática el gobierno y el sector privado se ha dado la tarea de investigar tecnologías que ayuden a la recuperación total o parcial de este recurso indispensable. (Tang *et al.*, 2012).

Por otro lado, la contaminación llega a los humanos por el consumo de agua, por interacción con el suelo o por un derrame cerca de una zona habitada, se han logrado hacer investigaciones sobre esta exposición. Los estudios realizados en personas demuestran que las que son expuestas a través de la respiración o al contacto con la piel durante largos periodos de tiempo con mezclas que contienen PAH pueden contraer cáncer, también provocan problemas reproductivos, así como defectos congénitos y disminución del peso corporal. (ATSDR, 2016).

Generalmente Las etapas de manejo y control de suelos contaminados se dividen en identificación, estudio preliminar, investigación y remediación. En ellas se ha

detectado una clara dispersión de los esfuerzos individuales es el caso de algunos estados miembros de la Unión Europea.

En algunos casos no se ha producido avance en programas de identificación de emplazamientos desde 2006, mientras que en otros como Bélgica, a fecha de 2014 había avances significativos en la fase final de la remediación de suelos. En el caso de España se ha observado un avance en la identificación de emplazamientos contaminados y en la investigación de los suelos identificados pero no en la fase de remediación (JRC EC 2014).

### **1.2.1 Impacto ambiental**

Después de la rotura de un tanque de almacenamiento, la gasolina viaja a través del material poroso hacia la capa freática, adhiriéndose a las partículas del suelo a lo largo del camino. Si se derrama suficiente gasolina y se satisface el requisito de saturación residual, la gasolina libre entra en la capa freática.

Dado que los hidrocarburos de gasolina son tóxicos en concentraciones por debajo de los límites de solubilidad y el material saturado puede entrar en contacto con las capas freáticas fluctuantes y/ o recarga de agua subterránea, suelo saturado puede plantear una amenaza en un periodo largo a los suministros de agua subterránea debido a los constituyentes aromáticos relativamente solubles (IARC, 1989).

La contaminación por hidrocarburos trae efectos colaterales a la naturaleza, no podemos notar a simple vista el impacto de una sustancia externa a los mantos acuíferos o a la estructura de la flora y fauna, pero se ha investigado que es cierto que los derrames de gasolina son tóxicos, particularmente para flora y fauna acuática. Las películas formadas sobre el agua pueden afectar la transferencia de oxígeno y por lo tanto a los organismos que viven ahí. La mezcla es altamente tóxica debido a la presencia de hidrocarburos aromáticos, como el benceno, tolueno y xilenos (Tang *et al.*, 2012).

Los efectos que tienen los derrames de hidrocarburos en el suelo son: propiedades físicas del suelo, lo que daña su estructura original por lo que se ve afectado su porosidad, densidad aparente, su pH, la actividad biótica, la conductividad eléctrica, las condiciones de óxido-reducción, sus reacciones biogeoquímicas.

Es importante mencionar que el suelo no es el único con un daño significativo, sino que también el agua, ya que como se mencionó anteriormente, se filtra a los mantos acuíferos. Y en el aire, aumenta la cantidad de CO<sub>2</sub> en la atmósfera, estos actúan como gases de efecto invernadero. (Chavarría, 2019)

### **1.2.2 Casos de derrames de hidrocarburos mundialmente**

Los hidrocarburos son utilizados en todo el mundo, por lo que desafortunadamente ha habido diferentes accidentes a lo largo de la historia, se mencionarán los más importantes y significativos, que los más grandes derrames hayan sido en aguas abiertas no quiere decir que el suelo o las costas no hayan sido contaminadas o afectadas.

- Golfo Pérsico

Se dice que el peor derrame de la humanidad ocurrió en enero de 1991, en la guerra del Golfo Pérsico. A principios de 1991 se explotaron más de 800 pozos de petróleo, de los cuales más de 600 se incendiaron y quemaron con llamas y unos 50 pozos arrojaron petróleo al suelo. La cantidad máxima de petróleo y gas quemado en los incendios de petróleo fue de aproximadamente 355.000 toneladas y 35 millones de m<sup>3</sup>, respectivamente, por día. Las emisiones de petróleo y gas se han estimado en unas 20.000 toneladas por día y las emisiones totales de SO<sub>2</sub> en unas 24.000 toneladas por día (Linden et al., 2004)

- Mar Caribe

Dos superpetroleros, Atlantic Empress y Aegean Captain, colisionaron en julio de 1979 cerca de Venezuela, produjo el derrame de casi 290.000 toneladas de petróleo.

- Uzbekistán

En marzo de 1992, el valle de Fergana en Uzbekistán fue invadido por más de 88 millones de galones de petróleo tras la explosión de un pozo de crudo.

- Ciudad del Cabo

El petrolero español Castillo de Bellver se incendió en la Bahía de Saldanha (Ciudad del Cabo, Sudáfrica) en agosto de 1983, derramó más de 78 millones de galones de petróleo y, si bien el impacto ambiental se minimizó tras el incendio y posterior captura del crudo, es considerado uno de los peores desastres de la historia.

- Francia

En marzo de 1978, el tanquero petrolero ultra largo Amoco Cadiz encalló sobre rocas filosas en Portsall (Francia) tras una fuerte tormenta, ocasionando el derrame de 1.6 millones barriles de crudo y la contaminación y exterminio de la fauna marítima de la zona.

- Canadá

La plataforma petrolera Odyssey -de propiedad estadounidense- explotó causando el derrame de 43.1 millones de galones de petróleo al noreste de Terranova, Canadá, en noviembre de 1988.

- EUA

El 24 de marzo de 1989, en medio de una tormenta, el barco petrolero Exxon Valdez, propiedad de ExxonMobil, encalló en el arrecife Blight Reef en el distrito del Príncipe Guillermo en la costa de Alaska, derramando más de 11 millones de galones de petróleo y generando 250 kilómetros cuadrados de marea negra.

Tres millones de galones de petróleo brotaron de una fuga en el pozo de Union Oil a 1,066 metros de profundidad a unos 8 km. de la costa de Santa Bárbara, California. Ocurrió en enero de 1969, el crudo cubrió 2.071 km cuadrados de océano y 56 km. de costa, ocasionando la muerte de miles de aves, peces y otros animales salvajes.

(Gestión, 2022)

### 1.2.3 Derrames en México

En México a lo largo de los años se han registrado diferentes derrames de hidrocarburos, ya sea en el mar o en el suelo. Lo que se ha mencionado que es a causa de mantenimiento por parte de las petroleras o por error humano, así como por vandalismo.

- El 22 de abril de 1992 una ciudad jalisciense sufrió una serie de explosiones de gasolina en el sistema de alcantarillado. (CENAPRED,2020)
- Junio de 1979, Ixtoc 1, un pozo exploratorio, explota, derramando 140 millones de galones de petróleo en la Bahía de Campeche frente a la costa de México. (CNN,2021)
- El 20 de abril de 2010 Se produce una explosión a bordo de la plataforma petrolera Transocean Ltd. Deepwater Horizon, contratada por BP, que libera aproximadamente 168 millones de galones de petróleo en el Golfo de México. El derrame de petróleo inició el 20 de abril del 2010 y no fue hasta el 19 de septiembre de 2010 en que fue extinguido en su totalidad. (SIMAR,2022)
- 16 de agosto de 2014 Una toma clandestina en un oleoducto de 24” en el poblado La Fragua en Cadereyta, Nuevo León. El petróleo contaminó 11.5 km de canales de riego y 6.5 km del río San Juan.
- 24 de agosto de 2014 Una toma clandestina en un ducto que transportaba gasolina en el poblado Pico de Oro, en el municipio de Huimanguillo en Tabasco, generó el derrame de miles de litros del combustible, mismo que inundó un arroyo de la comunidad.
- Derrame de gasolina contamina arroyo Hondo en Tierra Blanca, Veracruz El 27 de agosto de 2014 fue descubierta una fuga de gasolina Premium al fugarse del poliducto de 12 pulgadas Minatitlán-México por una toma clandestina contaminó más de dos kilómetros del arroyo Hondo en Tierra Blanca, Veracruz.
- El 13 de mayo de 2017 Tierra Blanca Veracruz Toma clandestina de un ducto que transportaba gasolina ocasionó el derrame y posterior **explosión** dejando cuatro muertos

- El 29 de noviembre de 2018 Huimanguillo Tabasco Tres explosiones en un ducto de 16 pulgadas que transportaba combustible, presuntamente por toma clandestina, se reportaron tres personas con quemaduras de tercer grado en el 90 %
- El 1 de diciembre de 2018 Cárdenas Tabasco Toma clandestina provocó explosión de combustible ocasionando tres muertos y cuatro heridos con quemaduras de tercer grado.

(CNPC,2020)

- 18 de enero de 2019 en Tlahuelilpan, Hidalgo, se registró la expulsión descontrolada de gasolina en el kilómetro 226 del oleoducto que corre del puerto veracruzano de Tuxpan a la ciudad de Tula. (CENAPRED,2022)

### **1.3 Remediación de suelos**

La remediación se define como un conjunto de medidas a las que se someten los sitios contaminados para eliminar o reducir los contaminantes hasta un nivel seguro para la salud y el ambiente o prevenir su dispersión en el ambiente sin modificarlos. (SEMARNAT, 2018)

De hecho en la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos(LPGIR) da la responsabilidad de remediar un sitio contaminado a las personas físicas o morales que afectaron este lugar, directa o indirectamente. De la misma manera las entidades federativas, propietarias de algún sitio que se encuentre en esta situación deben de remediarlo.

Lamentablemente no siempre se cuenta con la capacidad técnica o el recurso económico para que esto suceda de la manera correcta y especificada. En el 2018, con base a la revisión del Inventario Nacional de Sitios Contaminados (INSC), identificó 232 sitios contaminados que no tienen ningún programa de remediación que se haya aprobado, en la cual recae la responsabilidad de los propietarios. (INSC, 2021)

Una pérdida del valor ambiental y económico son representados por estos sitios, de por lo menos 10.7 millones de m<sup>3</sup> de suelo que ocupan aproximadamente una superficie de 4.1 millones de m<sup>2</sup> por estar contaminado con distintos tipos de residuos peligrosos, según lo establecido por SEMARNAT en el 2019. Para un mejor control de la remediación se deben de establecer criterios del grado de contaminación antropogénica en los suelos y en algunos casos las concentraciones de estas, internacionalmente estos son los criterios tomados en cuenta para la base de los valores y evaluaciones del riesgo de salud. (SEMARNAT,2019)

Todo este procedimiento y marco normativo ya está regulado por el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y por las Normas Oficiales Mexicanas (NOM), con límites máximos permisibles de diferentes sustancias contaminantes, el criterio para determinar las concentraciones de estos mismos, el lineamiento para su muestreo, recolección y caracterización. De la misma manera esto da la certidumbre de que realmente se está remediando un sitio.

Hay distintos grados de dificultad en la remediación de suelos, por lo que dependiendo de esto se escoge que actividad se empleará. Cada caso es único, ya que esto depende de las condiciones del suelo, el clima, el contaminante y las causas que lo generan. Para escoger que proceso de tratamiento se ocupara también se toma en consideración la localización, tipo de suelo, cuerpos de agua, el uso que estaba teniendo el suelo y la aplicabilidad de la tecnología. Los procesos de tratamiento para la remediación de un suelo contaminado pueden clasificarse de maneras distintas, como el lugar donde se aplicará que sería un tratamiento en el sitio, a un lado del sitio o fuera del sitio. De la misma manera por el tipo de tratamiento, biológicos, físicos, químicos o térmicos. (SEMARNAT,2021)

En México opera una gran diversidad de prestadores de servicio que ofrecen diferentes procesos de tratamiento para remediar suelos contaminados. Sin embargo, no fue sino a partir de 1997 que la autoridad ambiental estableció un programa de verificación y certificación de este tipo de empresas, de lo cual se formó

un padrón de prestadores de esta clase de servicio. A lo que se enfrenta esta solución es al recurso económico ,ya que comparado con otras soluciones es más elevado su costo y también no se cuenta en todos los sitios el acceso a estas tecnologías. (SEDEMA, 2023)

### **1.3.1 Tratamiento de suelos contaminados por hidrocarburos**

En México existen extensas áreas de suelos contaminados por hidrocarburos, debido a las tareas de exploración, extracción, refinación, falta de mantenimiento y robo de combustible. Tan solo en 2017, el Centro de Orientación para la Atención de Emergencias Ambientales (COATEA) de la PROFEPA junto con la Agencia de Seguridad, Energía y Ambiente (ASEA), atendieron 258 notificaciones sobre derrames de hidrocarburos. Por otro lado, en 2016 PEMEX reportó 213 derrames de hidrocarburos en tierra, lo que representa mil 284 hectáreas contaminadas. (Barois, et al., 2018)

Antes de considerar la aplicación de cualquier tecnología de remediación, es fundamental conocer ciertas características, tanto del suelo (ambientales), como del contaminante y de los organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.) presentes en el sitio, con potencial metabólico para degradar los contaminantes. De esta manera, los procesos de remediación dependen de estos tres factores que deben encontrarse en equilibrio.

Algunas de las técnicas aplicadas fueron: Bioremediación, Biopilas, Bioventeo, *Air Sparging* (chorros de aire), los cuales permitieron el saneamiento del terreno alcanzando niveles de limpieza que no representan riesgo a la salud y al medio ambiente.

Las tecnologías existentes para remediar los suelos contaminados pueden ser de naturaleza fisicoquímica, térmica o biológica y tanto unos como otros pueden aplicarse en el lugar de la contaminación *in situ* o fuera del sitio, *ex situ*.

Las tecnologías fisicoquímicas utilizan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para degradar, separar o contener los

contaminantes. Las tecnologías térmicas utilizan calor para incrementar la volatilización (separación), quemar, descomponer o fundir (inmovilización) los contaminantes en un suelo. En cambio, las tecnologías biológicas, también llamadas de biorremediación, utilizan la capacidad metabólica de ciertos organismos (plantas, hongos, bacterias) presentes en ambientes afectados para degradar, transformar o remover los contaminantes tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos.

### **1.3.2 Biorremediación de suelos**

La biorremediación es una técnica o tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos que viven en el suelo y subsuelo, para limpiar suelos o aguas contaminadas. También se definen como una categoría de tratamientos contra la contaminación de un medio aplicando solamente sistemas biológicos para la transformación o canalización, total o parcial, de compuestos químicos. Los microorganismos utilizan su potencial enzimático para degradar los compuestos complejos. (Stamets, 2005)

La biorremediación de un suelo implica su descontaminación por vía biológica. En el caso de sitios contaminados con metales, los microorganismos pueden modificar su movilidad en el ambiente a través de cambios en sus características físicas o químicas. (Barois, et al., 2018)

Desde un punto de vista oficial, la academia americana de microbiología define la biorremediación como “la utilización de organismos vivos para reducir o eliminar riesgos medioambientales resultantes de la acumulación de compuestos químicos tóxicos y otros residuos peligrosos” (Gibson & Saylor, 1992).

La biorremediación tiene un amplio entorno de aplicación como en los diferentes estados de la materia.

- Sólido: en suelos o sedimentos, lodos, residuos, etc.

- Líquido: aguas superficiales y subterráneas, aguas residuales, mantos acuíferos.
- Gaseoso: emisiones industriales, así como los productos derivados del tratamiento de aguas o suelos.

Una vez que ya está identificado el suelo, se debe de decidir que tipos de biorremediación se aplicaran ya que hay diferentes con características específicas para su eficiencia. Desde la biorremediación *in situ* o *ex situ*, hasta las biopilas, la biolabranza, bioventing, air sparging, bioslurry, landfarming, el compostaje, fitorremediación y micorremediación.

Algunas ventajas que tiene este tipo de saneamiento es que resulta en un 50% más económico, comparando la remediación común, tiene técnicas sencillas aplicables y enseñables a la población, técnica poco invasiva, sin generar desechos, sin demanda excesiva de energía, se complementa con otras tecnologías. Pero es importante tener en cuenta que se requieren periodos extensos de tiempo para que se puedan obtener resultados y es poco factible cuando la contaminación es demasiada. (Bordino, 2021)

Pero, aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, la biorremediación es la tecnología más empleada en México y en el mundo pues se ha usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con hidrocarburos del petróleo, solventes, explosivos, clorofenoles, pesticidas, conservadores de madera e hidrocarburos aromáticos policíclicos, usando organismos propios del sitio contaminado (autóctonos o nativos) o de otros sitios (exógenos o exóticos), ya sea *in situ* o *ex situ*, en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno). (Barois, et al., 2018)

### **1.3.3 Micorremediación de suelos**

Los hongos se han utilizado desde tiempos remotos para su consumo, ya que son ricos en proteínas, son los mayores degradadores de nuestro planeta y son parte del reino biológico fungi, por lo que no son ni plantas o animales.

Ellos han sido misteriosos y temidos por generaciones, pero también pueden ser nuestros aliados al querer proteger el planeta de todo el daño por la contaminación que causamos. El micelio de los hongos es una red que está como tejida en todo el suelo ya que ellos son los más grandes degradadores de materia, ya que ellos desarman largas moléculas orgánicas en formas más simples, lo cual ayuda en la nutrición de los miembros de la comunidad ecológica. Los hongos son la interface de los organismos entre la vida y la muerte. ( P. Stamets, 2003)

Hay diferentes tipos de hongos, se han utilizado como alimento, medicina y ahora como biorremediadores, al haber una gran variedad de estos se les ha clasificado en: basidiomicetos, ascomicetos, glomeromicetos, zigometos y quitridiomycetos. En esta clasificación los hongos tipo basidiomicetos tienen dos subdivisiones que son en base al tipo de fermentación que tienen, la blanca o la marrón. (Okerentugba, 2003)

Los hongos que son de la primera subdivisión, de la fermentación blanca, se les llama así porque descomponen la madera, dejando residuos que son blancos y estos son los considerados micorremediadores de las toxinas que están unidas por enlaces de hidrógeno y carbono. Es el micelio quien las segrega, incluyen lignina peroxidasas, manganeso peroxidasas y lacasas (P. Stamets, 2003).

Estas complejas mezclas de enzimas permiten que el micelio descomponga materiales resistentes creados por la naturaleza o el hombre. Algunos enlaces hidrogeno-carbono que están en la naturaleza se repiten en productos derivados del petróleo, los subproductos obtenidos de esta reacción se liberan en forma de agua y dióxido de carbono, por lo que las enzimas miceliales son las apropiadas para la descomposición de sustancias químicas que son tóxicas, de una manera completamente natural.

Una de las especies fungi, que tiene este tipo de fermentación, ha sido examinada para comprobar su habilidad en romper suelo saturado con diésel fue el *Pleurotus Ostreatus*, se mezclaron el micelio con aserrín y astillas de aliso sin esterilizar y después de 8 semanas esta degradado, en tan solo tres días se puede analizar su degradación. De la misma manera se comprobó que reduce eficientemente las toxinas en los suelos contaminados.

Por otra parte, cuando se inocula un hongo que se ha encontrado en la naturaleza tienen una ventaja por haber convivido e interactuado con diferentes organismos como las bacterias. Por lo que tiene una defensa natural y tiene la mejor oportunidad de micorremediar exitosamente.

El *Pleurotus Ostreatus*, es el hongo que utilizaremos como base de medición para el potencial de degradación, este hongo es de color rosa melocotón a rosa rojizo en color; superficie apilada lisa, aterciopelada, plana, en forma de abanico en forma de concha en la madurez; ampliamente convexa y casi plana con textura grasosa. La superficie del margen era lisa inscrita hacia el estípote y más tarde se vuelve ondulada. Las láminas eran de color rosado a rosa rojizo con branquias decurrentes, cerradas y lanceoladas que estaban casi unidas al estipe (Muzzafar *et al.*, 2023).

El *Trametes Versicolor* es el hongo que se usará para la comparación de potencial de degradación, esta especie, también conocida por el apodo de cola de pavo, es un poliporo omnipresente en los bosques de todo el planeta, es uno de los hongos más comunes en el mundo. Sus características morfológicas son que se observan tapas aplanadas delgadamente formadas, a menudo en grandes racimos de fructificados que se desbordan y que son finamente borrosas en las superficies superiores, concéntricamente coloreadas con distintas zonas de color marrón, de color beige a marrón rojizo, a veces azulado, desvaneciéndose en la edad, rara vez blanquecino a color crema. Carne dura, flexible, de color crema, con una fina capa negra en la superficie de la tapa . (Stamets, 2005)

#### **1.4 Legislación ambiental en derrames de hidrocarburos**

Debido a las diferentes catástrofes ecológicas por accidentes de derramamiento de diversos hidrocarburos, se crearon leyes para proteger el medio ambiente y que las personas involucradas en esta situación, así como las empresas asuman su responsabilidad.

NORMA Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-138-ECOL-2002, Que establece los límites máximos permisibles de contaminación en suelos afectados por hidrocarburos, la caracterización del sitio y procedimientos para la restauración. La cual tiene como campo de aplicación el de la observancia obligatoria en todo el territorio nacional para quienes lleven a cabo actividades en cuyo desarrollo se produzcan derrames de hidrocarburos, sus mezclas y/o sustancias derivadas de los mismos. (SEGOB, 2002)

NORMA oficial mexicana NOM-143-SEMARNAT-2003, que establece las especificaciones ambientales para el manejo de agua congénita asociada a hidrocarburos. Que tiene como objetivo el establecer especificaciones en materia ambiental para el manejo e inyección en formaciones receptoras, del agua congénita que se asocia a hidrocarburos y los límites máximos permisibles de los parámetros para su descarga a cuerpos receptores. (SEMARNAT, 2005)

#### **LEY DE LA AGENCIA NACIONAL DE SEGURIDAD INDUSTRIAL Y DE PROTECCIÓN AL MEDIO AMBIENTE DEL SECTOR HIDROCARBUROS**

Se expide la ley de los órganos reguladores coordinados en materia energética; se reforman, adicionan y derogan diversas disposiciones de la ley orgánica de la administración pública federal y, se expide la ley de la agencia nacional de seguridad industrial y de protección al medio ambiente del sector hidrocarburos. (SEGOB)

#### NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-149-SEMARNAT-2006

La presente Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones de protección ambiental que deben observarse durante las etapas de la perforación, mantenimiento y abandono de pozos petroleros en zonas marinas mexicanas, con objeto de prevenir y mitigar los impactos ambientales que puedan generar estas actividades. (PROFEPA, 2016)

Oficial Mexicana NOM-133-SEMARNAT-2000, Protección Ambiental-Bifenilos Policlorados (BPCs) Especificaciones de manejo.

Esta Norma Oficial Mexicana establece las especificaciones para el manejo y eliminación ambientalmente adecuados de los residuos peligrosos que contengan o estén contaminados con Bifenilos Policlorados, a partir de que son desechados, así como para el manejo y tratamiento de equipos BPCs. (SEGOB, 2014)

NMX-AA-105-SCFI-2014 Suelos–hidrocarburos fracción ligera por cromatografía de gases con detectores de ionización de flama o espectrometría de masas.

Esta Norma Mexicana describe el método para determinar hidrocarburos fracción ligera en suelos. Los compuestos a determinar son los siguientes: Hidrocarburos Fracción Ligera que cubran el intervalo de átomos de carbono de C5 a C10. (SEGOB, 2014)

NMX-AA-134-SCFI-2006 SUELOS – HIDROCARBUROS FRACCIÓN PESADA POR EXTRACCION Y GRAVIMETRIA – MÉTODO DE PRUEBA Tiene como primer objetivo detener y revertir la contaminación de los recursos naturales, agua, aire y suelo, con el propósito de garantizar su conservación para las generaciones futuras. (SEGOB, 2006)

#### NMX-AA-145-SCFI-2008

SUELOS - HIDROCARBUROS FRACCIÓN MEDIA POR CROMATOGRFÍA DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACIÓN DE FLAMA – MÉTODO DE PRUEBA.

Tiene, entre sus objetivos, contar con una gestión integral y transversal que sea eficiente y eficaz para la remediación de sitios contaminados. (SEGOB, 2008)

NMX-AA-146-SCFI-2008

SUELOS - HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP) POR CROMATOGRFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG/EM) O CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECTORES DE FLUORESCENCIA Y ULTRAVIOLETA VISIBLE (UV-VIS) – MÉTODO DE PRUEBA. tiene como primer objetivo detener y revertir la contaminación de los recursos naturales, agua, aire y suelo, con el propósito de garantizar su conservación para las generaciones futuras. (SEGOB, 2008)

### **1.5 Enzimas**

Las enzimas son proteínas, polímeros formados por aminoácidos covalentemente unidos entre sí, que catalizan en los organismos una gran variedad de reacciones químicas. La actividad catalítica de las enzimas depende de que mantengan su plegamiento, es decir, su estructura tridimensional. En esta estructura tridimensional se forman cavidades, llamadas “sitio activo”, las cuales muestran afinidad por las moléculas específicas (sustratos) que se convertirán en productos. La combinación de grupos funcionales químicos presentes en estas cavidades genera un conjunto de interacciones covalentes y no covalentes entre la proteína y el sustrato, que hacen que la conversión de éste en un producto se vea favorecida. La efectividad de las enzimas depende de gran manera de la temperatura y del pH.

(UNAM, 2014)

Es importante destacar que la producción de algunas enzimas específicas puede ser asociada a situaciones de estrés, ya que en algunas investigaciones, se pusieron a prueba diferentes tipos de hongos y dependiendo de cómo los desafiaban, producían enzimas ligninolíticas. (Papinutti, 2003).

### 1.5.1 Enzima ligninolíticas

Esta palabra proviene del latín lignum, que significa madera; así, a las plantas que contienen gran cantidad de lignina se las denomina leñosas. Está formada por la extracción irreversible del agua de los azúcares, creando compuestos aromáticos. (CONAFOR)

La lignina es un componente estructural que se sintetiza en la pared celular de las plantas vasculares. Se encuentra distribuida junto con hemicelulosa en el espacio de microfibras de celulosa en la pared celular primaria y secundaria para conferirle dureza a los tejidos del xilema, y en la lamela media como un componente de unión de las células. La matriz de lignina cubre las fibras de celulosa y hemicelulosa para protegerlas contra el ataque microbiano (Cabrera, 2010).

La lignina es el polímero aromático más abundante de la naturaleza. Es un compuesto insoluble en agua y amorfo. (Papinutti, 2003).

De las enzimas ligninolíticas se conoce que pueden actuar de forma separa o formando un complejo, lo cual dependerá de la capacidad de su fuente para su producción y tienen un alto potencial de aplicaciones.

Se hicieron diferentes investigaciones en los años setenta y se dio como resultado que la degradación de la lignina da lugar a productos que provienen de la ruptura de anillos aromáticos. Por esto, se pensó que las oxigenasas extracelulares podían estar involucradas en la transformación de la lignina. Consecutivamente, tres grupos reportaron de manera independiente, el descubrimiento de una ligninasa capaz de oxidar y despolimerizar la lignina y compuestos modelo (Higuchi, 1993), y cuya actividad enzimática depende del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). A esta enzima se le conoce ahora como lignino peroxidasa (LiP). Después se descubrieron también una peroxidasa dependiente de Manganeseo (manganeseo-peroxidasa) y otra enzima llamada versátil-peroxidasa, ya que posee tanto la actividad dependiente de manganeseo como la actividad de lignino peroxidasa. (Laura Torres, 2020)

### 1.5.1.1 Estructura química de la madera

La madera es un material natural, biológico, renovable, orgánico, poroso, higroscópico, anisotrópico y heterogéneo.

Químicamente la madera tiene dos formas de composición: a) composición elemental y b) composición química.

Composición elemental. La madera está compuesta en valores aproximados de 50% de carbono (C), 43% de oxígeno (O), 6% de hidrógeno (H), 0.8% de nitrógeno y 0.2% de sustancias minerales (cenizas).

Composición química: los compuestos principales son holocelulosa (65 a 75%), lignina (20 a 30%) y los compuestos extraíbles (3 al 7%). La holocelulosa a su vez se divide en celulosa y hemicelulosa, la cual a su vez se divide en hexosanos y pentosanos.

La celulosa, mostrada en la figura 1, es un polisacárido compuesto exclusivamente por moléculas de glucosa; homopolisacárido (compuesto por un solo tipo de monosacárido); es rígido, insoluble en agua y contiene desde varios cientos, hasta varios miles de unidades de  $\beta$ -glucosa. La celulosa es la biomolécula orgánica más abundante ya que forma la mayor parte de la biomasa terrestre. La celulosa se forma por la unión de moléculas de  $\beta$ -glucosa mediante enlaces  $\beta$ -1,4-O-glucosídico. Por hidrólisis de glucosa. La celulosa es una larga cadena polimérica de peso molecular variable, con fórmula empírica  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , con un valor mínimo de  $n = 200$ . (CONAFOR, )

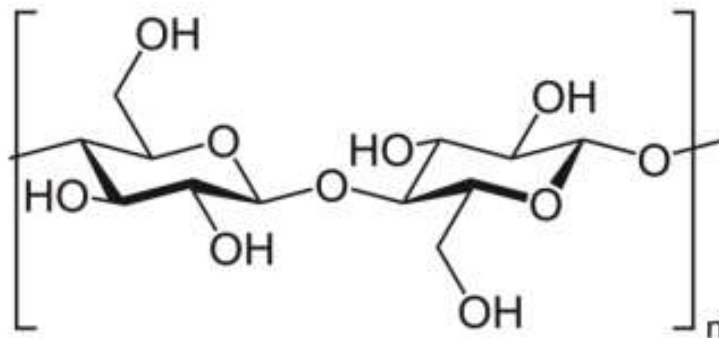


Figura 1. Estructura química de la celulosa

De estos tres componentes, la lignina es la más recalcitrante a la degradación, seguida por la celulosa que, debido a su estructura cristalina altamente ordenada, es más resistente a la hidrólisis que la hemicelulosa. La lignina se encuentra unida tanto a hemicelulosas como a la celulosa, formando una protección física alrededor de éstas y creando una barrera que impide la penetración de soluciones y enzimas. (Castillo, 2010)

### **1.5.2 Peroxidasas**

Las peroxidasas son enzimas que catalizan la oxido-reducción de  $H_2O_2$  y una gran variedad de donadores de hidrógeno. Debido a que la peroxidasa es relativamente estable a altas temperaturas y su actividad puede medirse fácilmente con simples reacciones cromogénicas, es empleada como una enzima modelo en el estudio de estructura de proteínas, reacciones y función de enzimas así como varias aplicaciones biotecnológicas. (Pérez, et al., 2010)

Las hemoligninasas constituyen una familia de enzimas responsables de numerosas funciones biosintéticas y degradativas. En este grupo se encuentran lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y peroxidasa versátil. (Cabrera, 2010)

#### **1.5.2.1 Lignina-Peroxidasa (LiP)**

Esta enzima es por sí misma oxidativa pero también es capaz de formar radicales libres a partir de diversos compuestos orgánicos como el alcohol veratrílico (AV). Estos radicales libres son capaces de penetrar y difundirse mejor en matrices de suelo en las que la enzima en sí misma no puede, aumentando de esta manera la biodisponibilidad de nutrientes y al mismo tiempo de los contaminantes. (Cárdenas, 2017)

Es una enzima relativamente poco específica para sus sustratos con un peso molecular de 42 000 Da, contiene un grupo protohemo IX por molécula. Cataliza una serie de reacciones de oxidación en la cadena lateral alquil de la lignina, entre estas, la escisión de oxidación de alcohol bencílico a aldehídos o cetonas, escisión

intradiol en estructuras fenilglicol, e hidroxilación de grupos metileno bencílicos. También cataliza la oxidación acoplada de fenoles. Todas las reacciones requieren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (Cabrera, 2010)

### **1.5.2.2 Manganese-Peroxidasa (MnP)**

La MnP es muy similar a la LiP, se diferencia porque esta depende de Mn<sup>2+</sup> para terminar de completar su ciclo catalítico.

Su acción oxidativa es indirecta, ya que es por medio de radicales Mn<sup>3+</sup>, estos radicales forma quelatos estables con ácidos carboxílicos, los cuales actúan como mediadores y generalmente son de bajo peso molecular, una vez que están presentes estos ácidos, actúan eliminando electrones e hidrógenos de manera inespecífica a moléculas orgánicas varias. (Cárdenas, 2017)

Esta enzima contiene un grupo prostético hierro protoporfirina IX, es una glicoproteína de 46 000 Da. Cataliza la oxidación de Mn (II) a Mn (III), el cual a su vez oxida sustratos fenólicos, incluyendo lignina, tioles, y aminas (Wariishi et al., 1992). Es estimulada por ácidos orgánicos, tales como gliconato, malonato, glucoronato y 2-hidroxitirato (Cabrera, 2010)

### **1.5.2.3 Versátil-Peroxidasa (VP)**

Estudios en especies de Pleurotus han demostrado la existencia de un tercer tipo de peroxidasa ligninolítica, denominada peroxidasa versátil. Se ha demostrado que esta enzima combina las características de LiP y MnP, para llevar a cabo la oxidación de compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos de manera similar al mecanismo de LiP, y la oxidación de Mn (II) a Mn (III) de forma similar a MnP (Camarero, 1999).

La versátil peroxidasa es una peroxidasa del grupo hemo que posee una estructura híbrida entre una manganeso y lignino peroxidasa, por lo cual estas enzimas pueden oxidar Mn<sup>2+</sup> y también alcohol veratrílico, compuestos fenólicos y no fenólicos, compuestos aromáticos de alto peso molecular incluyendo colorantes. (Cruz, et al., 2015)

### **1.5.3 Oxidasas**

Son enzimas REDOX en los que el aceptor es el O<sub>2</sub>, están involucradas en la degradación de lignina son oxidasas generadoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La función de estas enzimas es reducir los radicales que se forman en la primera etapa de la ligninólisis para evitar la repolimerización de la lignina. Dentro de este grupo se han identificado aril-alcohol oxidasa y veratril alcohol oxidasa. (Cabrera, 2010)

#### **1.5.3.1 Aril-alcohol oxidasa (AAO)**

Esta enzima presenta amplia especificidad por grupos bencil, cinamil, naftil y alcoholes primarios alifáticos, como sustratos. Está involucrada en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mediante ciclos redox de aldehídos aromáticos. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un co-sustrato de las ligninasas ligninolíticas, por lo que su generación es importante para que el proceso de degradación de lignina se realice de forma continua. (Cabrera, 2010)

#### **1.5.3.2 Veratril Alcohol Oxidasa (VAO)**

Es otra oxidasa que evita la repolimerización de la lignina. Presenta un amplio rango de especificidad de sustrato por alcoholes y quinonoides. Su función es reducir los radicales fenoxi realizando de forma acoplada la oxidación de alcohol veratrílico a aldehído veratrílico. (Cabrera, 2010)

### **1.5.4 Lacasas**

La enzima Lac es una enzima oxidoreductasa que tiene como principal característica que cataliza la oxidación de sustratos fenólicos (fenol oxidasa), gracias a que son glucoproteínas que tienen cobre en su estructura, de esta manera el sustrato es oxidado y la Lac es reducida, produciendo agua y una Lac que podrá oxidar un nuevo sustrato. Las lacasas pueden atacar directamente a los sustratos o utilizar un mediador redox, que es una sustancia de bajo peso molecular y altamente inestable, que permite romper sustancias más complejas; (Cárdenas, 2017)

Cataliza la sustracción de un electrón de compuestos fenólicos empleando O<sub>2</sub> como aceptor de electrones originando radicales fenoxi, los cuales posteriormente oxidan el C $\alpha$ , provocando la ruptura del enlace aril-C $\alpha$  y/o del enlace C $\alpha$ -C $\beta$ . El rompimiento de los anillos aromáticos de las subunidades fenólicas y no fenólicas de la lignina ocasiona la generación de especies reactivas de oxígeno. (Cabrera, 2010)

Son enzimas que están ampliamente distribuidas en la naturaleza; se ha reportado su presencia en animales, plantas y microorganismos (Camarero, 1999).

### **1.5.5 Mecanismos de degradación**

El modelo involucrado en la degradación macromolecular de lignina por hongos de la pudrición blanca está formado por tres etapas: 1) rompimiento oxidativo de cadenas laterales de propilo entre el carbono  $\alpha$ - y  $\beta$ - originando la formación de ácido benzoico, 2) escisión de los enlaces  $\beta$ -aryl éter y modificación de las cadenas laterales estructurales, y 3) degradación de núcleos aromáticos a partir de la oxidación de los anillos (Higuchi, 1990).

Para que el proceso de degradación de lignina inicie, es necesaria la activación de una enzima por especies reactivas de oxígeno como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta enzima realizará la catálisis para la producción de mediadores catiónicos (compuestos orgánicos o Mn III-quelante) que llevarán a cabo el ataque electrofílico en las subunidades de lignina, sustrayendo un electrón del sustrato. Una vez que el polímero es oxidado, el sustrato es oxigenado provocando el rompimiento de enlaces y produciendo dos fragmentos, uno de los cuales es un radical (Hammel et al., 1985).

Los aldehídos aromáticos son el sustrato para la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por acción de aril alcohol oxidasas mediante reacciones de oxidación (los radicales fenólicos generados que no son reducidos por oxidasas a compuestos fenólicos pueden repolimerizarse). Posteriormente los compuestos fenólicos formados son reoxidados por acción de lacasas y ligninasas. Los radicales fenoxi también pueden sufrir ruptura en el enlace C $\alpha$ -C $\beta$  para formar p-quinonas.

Las quinonas contribuyen en la activación de oxígeno mediante ciclos de reacciones redox del hierro (III) presente en la madera, por radicales catiónicos superóxido o directamente por radicales semiquinonas, y su reoxidación con la correspondiente reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a radicales hidroxilos libres. Los grupos hidroxilos formados son importantes oxidantes que pueden iniciar el ataque de la lignina en la etapa inicial de biodegradación de la madera (Gutiérrez y Martínez, 1996). En la etapa final de la ligninólisis, los productos simples generados entran a las hifas fúngicas y se incorporan a las rutas catabólicas intracelulares (Martínez et al., 2005).

### 1.6 Hongos utilizados en la micorremediación

A lo largo de los años se han descubierto los usos de diferentes hongos para los problemas ambientales que tenemos, esta lista mostrada en la figura 2 agrupa algunos de ellos.

Cepa fúngica	Contaminante/residuo	Comentarios	Referencia
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Plásticos oxo biodegradables	El hongo degradó el plástico y creció sobre él.	(da Luz et al 2013)
<i>Lintinula edodes</i>	2,4 dichlorophenol	El hongo degradó 2,4 dichlorophenol, usando vainillin como activador	(Tsujiyama et al 2013)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Residuos radioactivos con base celulósica	Residuos basados en micelio del hongo fueron solidificados con cemento y utilizados como barrera primaria frente a la liberación de radiocontaminantes	(Eskander et al 2012)
<i>Jelly sp.</i> <i>Schizophyllum commune</i> , <i>Polyporus sp.</i>	Verde malaquita	99,7% <i>Jelly sp.</i> , 97,5% <i>Schizophyllum commune</i> , 68,5% <i>Polyporus sp.</i> , de degradación del colorante en 10 días	(Rajput et al 2011)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Petróleo	Se obtuvo degradación del petróleo	(Olusola et al 2010)
<i>Coriolus versicolor</i>	PAH		
<i>Melanized fungi</i>	Metales pesados Radionucleidos	Se obtuvo adsorción de metales pesados y contaminantes radioactivos de efluentes industriales	(Dadachova et al 2007)
<i>Pleurotus platypus</i> , <i>Agaricus bisporus</i> , <i>Calocybe indica</i>	Cobre, Zinc, Hierro, Cadmio, Plomo, Niquel	Hongos eficaces como bioabsorbentes de estos iones en soluciones acuosas	(Lamrood et al 2013)

Figura 2. Diferentes especies de hongos y su función en la micorremediación

### **1.6.1 Uso de hongos ligninolíticos para la micorremediación**

Los hongos ligninolíticos se encuentran en la familia de los basidiomicetos, los cuales, al pudrir a la madera muerta, degradan lignina y celulosa, por lo que son conocidos como hongos de pudrición de la madera, existiendo alrededor de 1,600 especies conocidas. (Luz Cárdenas, 2017)

Los hongos lignocelulósicos han desarrollado un sistema enzimático no específico que funciona en el ambiente extracelular. El mecanismo degradador de lignina está basado en la producción de radicales libres. Este sistema permite que las enzimas sean catalíticamente activas sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos. La amplia variedad estructural de los contaminantes que son degradados por estos hongos, les confiere uso potencial en biorremediación (Méndez-Matías *et al.*, 2018).

A partir de los estudios realizados con hongos lignocelulósicos en los años setenta, se ha comprobado que la degradación de la lignina da lugar a productos que provienen de la ruptura de anillos aromáticos. Por lo que se ha investigado más profundamente la relación de las enzimas de las diferentes especies de hongos con la degradación de compuestos complejos que se componen por ciclos aromáticos

Los hongos de pudrición blanca son micoremediadoras de toxinas unidas por enlaces hidrógeno-carbono. Las enzimas secretadas por las micelias de este grupo incluyen lignina peroxidasas, peroxidasas de manganeso y lacases. Solo las setas blancas podridas parecen producir peroxidasa dependiente del manganeso, una enzima que mineraliza la madera y es particularmente eficiente para romper los enlaces hidrógeno-carbono. El micelio también produce lignasas y enzimas celulósicas. (Stamets, 2005)

En ese sentido los hongos ligninolíticos, gracias a sus enzimas extracelulares, tienen la capacidad de utilizar otros sustratos que se encuentran en el suelo como nutrientes debido a su semejanza estructural con la lignina, por lo que resultan más efectivos para poder degradar sustancias de alto peso molecular. (Luz Cárdenas, 2017)

Es importante mencionar que dependiendo de las enzimas que se encuentren en el hongo, estas podrían estar trabajando solas o en cooperación con las demás.

### **1.6.2 Hongos lignolíticos en México**

México es uno de los países megadiversos por lo que cuenta con diferentes zonas boscosas como: bosque de coníferas, bosque de encino y bosque mesófilo de montaña, que a su vez incluye vegetación primaria, vegetación secundaria arbórea, vegetación secundaria arbustiva y vegetación secundaria herbácea.

Las agrupaciones por formación vegetal incluyen todos los tipos de vegetación relacionados que a su vez agrupan: vegetación primaria, vegetación secundaria arbórea, vegetación secundaria arbustiva y vegetación secundaria herbácea. Por esta razón, no es ningún problema el encontrarnos con diferentes especies de hongos a lo largo de todo el país, ya que en estas áreas se cuenta con las características esenciales para el crecimiento de hongos. (INEGI)

En México podemos encontrar seis especies del género *Pleurotus*, *P. djamor*, *P. smithii*, *P. levis*, *P. agaves*, *P. pulmonarius* y *P. ostreatus*. Algunas son cultivadas, como es el caso de *P. pulmonarius* (Bernabé-González et al., 2004) y *P. ostreatus* (de León-Monzón et al., 2004), y otros más son nativos, por ejemplo, de *P. djamor*. (Calderón, 2022)

#### **1.6.2.1 *Pleurotus Ostreatus***

Nombres comunes: Cazahuate, Cemita, Hongo de cazahuate, Hongo de encino, Hongo de jonote. Este hongo de talla grande posee un sombrero que puede medir entre 6 cm a 20 cm de diámetro y cuya peculiar forma simula una concha de mar. Su cutícula de color gris varía en tonalidades, por lo que se puede presentar en gris

oscuro, gris pardo o gris violeta; sus láminas son de color blanco o crema; su pie es corto y de color blanco; su carne es blanca algo dura y fibrosa; posee un olor típico de hongo y un sabor dulce. El cultivo de este hongo tiene un gran impacto comercial en México, específicamente en el negocio de los hongos curativos y comestibles. (INPI, 2022)

Su alimento lo obtiene de materia orgánica inerte, tiene una gran importancia ecológica al eliminar residuos del ecosistema y promueve el reciclaje de elementos esenciales, ya que pueden degradar algunos polisacáridos de difícil degradación. La especie *Pleurotus ostreatus*, además de ser ampliamente distribuido por su uso comestible, también ha sido utilizado para temas de micorremediación. Los contaminantes tratados han sido de lo más variados. García Sánchez (2007) y Martínez-Berra (2007), utilizaron *P. ostreatus* para tratar un colorante azo directo; Byss (2008) lo utilizó para remover hidrocarburos aromáticos policíclicos. Y la lista continúa con plaguicidas, sulfatos, petróleo y metales pesados (Kapahi y Sachdeva, 2017). (Calderón, 2022)

*P. ostreatus* tiene grupos carboxílicos, amino, tiol, fosfato e hidróxido en la pared celular ayudando en la biosorción de metales pesados. (Kapahi & Sachdeva, 2017)

En el trabajo realizado por Paul Stamets el confirma que TAH (Hidrocarburos Aromáticos Totales) en suelo contaminado con diésel se redujeron de 10.000 ppm a < 200 ppm en 16 semanas de una tasa de inoculación del 25% de *Pleurotus ostreatus*, permitiendo que el suelo remediado sea aprobado para su uso como suelo paisajista a lo largo de carreteras. (Thomas et al., 1999; Thomas, 2000)

El micelio envejecido de setas de ostra (*Pleurotus ostreatus*) mezclado con 'compost' a partir de virutas de madera y residuos de jardín (50:50 en volumen) produjo una degradación de los hidrocarburos mucho mejor que el micelio de setas de ostra o el compost solos.

### 1.6.2.2 *Pleurotus Djamor*

El tamaño del sombrero varía de 3-6 cm a 4-14 cm de ancho, rosa melocotón a rosa rojizo en color; superficie apilada lisa, aterciopelada, plana, en forma de abanico en forma de concha en la madurez; ampliamente convexa y casi plana con textura grasosa. La superficie del margen era lisa inscrita hacia el estípite y más tarde se vuelve ondulada. Las láminas eran de color rosado a rosa rojizo con branquias decurrentes, cerradas y lanceoladas que estaban casi unidas al estípite. El estípite era corto y grueso, mide 1,0-3,5 cm de largo y 0,6-1,3 cm de espesor, y era de color rosado. Las basidiosporas variaban en tamaño desde 7-8.1x3-4.4  $\mu\text{m}$  y eran lisas, elipsoidales, cilíndricas o en forma de riñón. (Muzzafar, et al., 2023)

Es interesante destacar que la permanencia del color rosa en los basidiomas es una parte de la biología del hongo aún no concluyente, que ha generado conclusiones opuestas en los trabajos publicados. (Salmones, 2017)

En el continente americano se le ha encontrado creciendo silvestre en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Guadalupe, Guatemala, Martinica, México, Panamá, Puerto Rico y Venezuela, aunque probablemente tiene una distribución más amplia. (Salmones, 2017)

En la investigación de Castro, et al. (2015) donde se tuvo como conclusión que la adsorción del metal, en este caso el Plomo fue optima con las cepas de *Pleurotus* (*pleurotus ostreatus*, *pleurotus djamor* y *Pleurotus sp*) aproximadamente una adsorción de 90%.

Los hongos del género *Pleurotus* son especialmente interesantes porque ellos pueden crecer en residuos lignocelulósicos con muy bajo contenido de nitrógeno, teniendo la capacidad de producir biomasa con mayor contenido de nitrógeno que el sustrato en el que están creciendo. (Salmones, 2017)

### 1.6.2.3 *Trametes Versicolor*

La cola de pavo, un polímero forestal omnipresente que crece en los bosques de todo el planeta, es uno de los hongos más comunes del mundo. Las colas de pavo han sido veneradas en Asia y Europa por sus propiedades medicinales. Su uso se remonta a cientos, y probablemente miles, de años. Estudios realizados en los últimos 20 años han revelado que las enzimas secretadas por su micelio son algunos de los agentes destructores de toxinas más poderosos que se han identificado a partir de una fuente natural. Esta especie ofrece herramientas únicas para curar tanto a las personas como al planeta de los estragos de la contaminación.

Abundan diversos tipos, pueden ser de color púrpura, marrón grisáceo a marrón a marrón negruzco en tono. Las setas que pueden confundirse con esta especie incluyen la falsa cola de pavo (*Stereum ostrea*), que a menudo tiene vientres marrones. La *Lenzites betulina*, un polipropileno branquial, tiene una apariencia general similar cuando se ve desde lejos.

Desde tiempos antiguos se han utilizado para tratar cáncer y como antibióticos.

Los *Pleurotus ostreatus* y la cola de pavo (*Trametes versicolor*) se pueden encontrar en prácticamente todos los bosques, y las cepas indígenas de estas especies pueden ser manipuladas por micoremediadores.

Aquí hay otra aplicación prometedora de micoremediación, esta para la limpieza de la lixiviación de agua de suelos contaminados con metales pesados: Arica y otros investigadores (2003) utilizaron cola de pavo (*Trametes versicolor*) y ostra fénix (*Pleurotus pulmonarius* var. 'sajor- caju') micelia para eliminar el 97 por ciento de los iones mercúricos del agua.

Es probable que otros competidores de hongos se arraiguen, siendo las colas de pavo (*Trametes versicolor*) el principal, si no el competidor más benigno. Las colas de pavo están empoderadas con excelentes propiedades medicinales, micoforestrias y micoremediación, por lo tanto, es un capricho fortuito de la naturaleza que el competidor más agresivo sea uno de nuestros aliados más

fuertes. Así que si la cola de pavo es el invasor, debe ser bienvenida y puesta en uso.

*Trametes versicolor* para tener la actividad enzimática más alta de convertir D-glucosa en azúcares dicarbonilos, consideraciones importantes para la fabricación de fermentación y para aquellos que emplean métodos de fermentación para la producción de enzimas, un mercado de creciente interés comercial.

(Stamets, 2005)

## Capítulo 2: Metodología

La metodología de este trabajo se dividió en 3 etapas, en la primera etapa se obtuvo el micelio de los hongos experimentales.

### 2.1 Obtención cepas fúngicas

El primer hongo que se quiso aislar fue el *Trametes Versicolor*, se buscaron cuerpos fructíferos frescos que se recolectaron en el campo, estos se encuentran en zonas boscosas, específicamente se buscó y encontró en una zona de Acajete, Veracruz.

El segundo hongo que se aisló fue el *Pleurotus Djamor*, el cual se obtuvo del cepario del CICA del laboratorio de biotecnología salón 103 de la BUAP, como se observa en la figura 3.

Las cepas de los dos hongos utilizados se mantuvieron viables realizando resiembras en forma oportuna, en cultivos inclinados de agar PDA. (Potato Dextrose Agar)

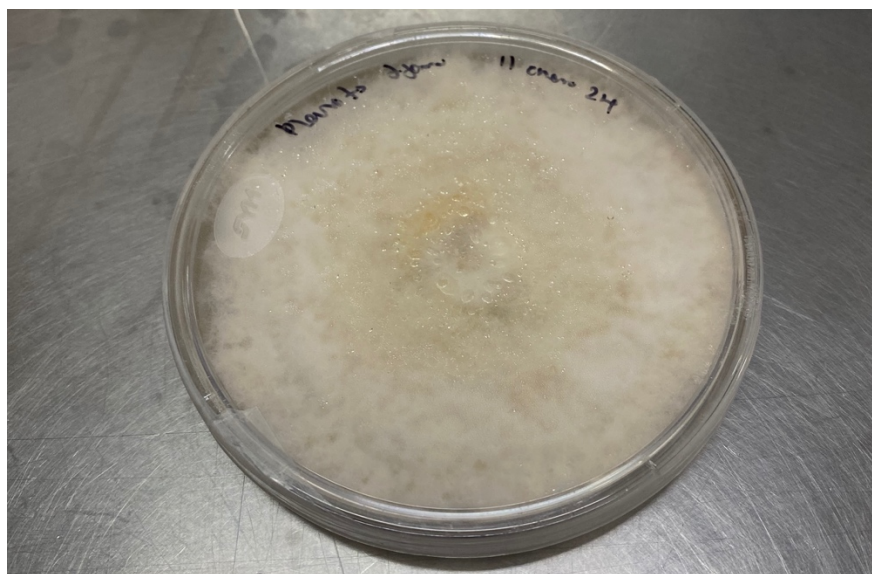


Figura 3. Caja petri sembrada con *Pleurotus Djamor*.

### 2.2 Aislamiento y purificación del micelio

Se aísla una especie cuando parte del hongo se coloca en una caja Petri para esperar su crecimiento.

Para este proceso se utilizó la siguiente metodología con el *Trametes Versicolor* que fue la indicada por Paul Stamets, después de su recolección, se aplicó el cultivo de su tejido, esto se hizo en un periodo de veinticuatro a cuarentaiocho horas.

Como el hongo está conformado por micelio comprimido, las mejores ubicaciones para cortar tejido limpio son áreas de tejido interno y este se puede romper a la mitad y tomar muestra del interior, el cuerpo fructífero se corta longitudinalmente con una navaja estéril y con la ayuda de unas pinzas de disección con puntas delgadas y también estériles, se extrae un fragmento de dicha "carne" de la zona central del cuerpo fructífero y se coloca inmediatamente en una caja de Petri con agar papa dextrosa, por lo menos dos veces se colocará el micelio en la caja, para que haya un crecimiento uniforme, es preferible repetirla en diferentes cajas Petri. Las cajas se sellan con cinta adhesiva y los tubos se tapan con algodón o con su tapadera de rosca, según el tipo de tubo, para evitar la contaminación y se incuban. En 2 o 3 días se observará crecimiento micelial sobre la superficie del medio a partir del fragmento del cuerpo fructífero, lo que nos indicará un desarrollo normal del hongo que se ha sembrado. (P. Stamets, 2005)

Para la purificación del *Trametes Versicolor* se considera que es un organismo que mantiene constante su pureza genética y fisiológica y del cual se pueden obtener muchas réplicas. Al hacer transferencias periódicas del micelio de las cepas. En este caso la resiembra debe hacerse cuando el micelio haya crecido completamente sobre el medio de cultivo y no esté demasiado envejecido. Dicha resiembra se hará tomando con una aguja de disección o una asa de platino estéril, un fragmento del micelio del hongo, procurando no maltratarlo demasiado y colocándolo en un tubo de ensaye o caja de Petri con medio de cultivo nuevo. (Guzmán, et al., 1993)

Para el *Pleurotus Djamor*, fue un proceso más simple ya que este estaba purificado, por lo que solamente se tuvo que resembrar en más cajas Petri para obtener más biomasa. Lo que se hizo fue tomar la caja Petri dentro de una campana esterilizada

y cortar cuadrados con un asa purificada, estos cuadrados se colocaron en las cajas Petri y se esperó dos semanas. (Stamets, 2005)

### **2.2.1 Preparación del medio PDA**

Para el desarrollo y el cultivo de hongos en el laboratorio, su micelio, en tubos de ensayo o en cajas Petri, se deben de utilizar medios de cultivo, los cuales son específicos para proporcionar nutrientes. Usualmente se emplean medios de cultivos sólidos de agar, estos solidifican como una gelatina. Lo más común y sencillo, cuando se preparan los medios de cultivo es comprar los disponibles en el mercado, estos vienen en forma de polvo. Para elaborar los medios de cultivo, se colocará el material requerido en un matraz limpio y seco de acuerdo a las indicaciones de la etiqueta del frasco. Se debe utilizar agua destilada para disolver dicho polvo. Una vez disuelto se calienta y se agita constantemente y se deja hervir durante un minuto hasta que el líquido se torna transparente, tomando la precaución de que no se derrame al hervir. (Guzmán, et al., 1993)

En las cajas Petri se debe de llevar este procedimiento para su esterilización, La cantidad de medio de cultivo vertido en cada caso debe ser solamente la necesaria para que el tubo o frasquito se pueda inclinar sin que el medio llegue hasta la boca de los mismos. La esterilización se debe realizar en autoclave o en olla de presión a 15 libras (121°C) durante 15 minutos. (Guzmán, et al., 1993)

Una vez esterilizada, coloque la olla en el laboratorio o en una sala semiestéril y deje que la presión regrese a 15 psi antes de abrirla. Si solo se están preparando uno o dos bolsitas de placas de petri, las placas deben estar dispuestas una al lado de la otra en la superficie de trabajo. Si se vierten más de dos bolsitas o se limita el espacio de la mesa, verter las placas de petri estériles en una pila vertical suele ser más conveniente. Deje que los medios de agar se enfríen y solidifiquen antes de usar. La condensación a menudo se forma en la superficie interior de La tapa superior de una placa de Petri cuando el medio de agar que se vierte todavía está a una temperatura alta. Para reducir la condensación, se puede esperar un período de tiempo antes de verter. (Chilton & Stamets, 1983)

Se considera el texto anterior como los pasos que se deben de seguir para la elaboración de cajas Petri, las cuales se utilizaron para el procedimiento de purificación del micelio, para preservar el micelio y también para tener aros de micelio para su siembra en el medio líquido de caldo nutritivo y que el micelio tuviera un crecimiento mayor, para posteriormente utilizarlo en el contacto con el hidrocarburo.

### **2.2.2 Preparación medio líquido**

Se usó un medio líquido de caldo nutritivo en el cual la peptona de gelatina y el extracto de carne, proveen nutrientes esenciales para el crecimiento, como son el nitrógeno, aminoácidos, minerales y vitaminas.

Caldo nutritivo se encuentra comercializado bajo diferentes denominaciones, cada una depende de los diversos grados de suplementos nutritivos que lo puede hacer más o menos rico.

Su método de preparación es: Suspender 8 gramos del medio en un litro de agua purificada. Calentar con agitación constante hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para su completa disolución. Dispensar en tubos de vidrio o en recipientes estériles adecuados, tapar y esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) por 15 minutos.

Se utiliza este procedimiento para obtener el micelio del hongo ya que su crecimiento varía según si se realiza en un medio líquido o sólido. En el líquido crece sobre la superficie, se permite producir mayor cantidad de biomasa, de mejor calidad en un menor tiempo. (Aguilar, 2007)

El inóculo en cultivo líquido, ya que permite producir mayor cantidad de biomasa de mejor calidad en menor tiempo, favorece la dispersión y adaptación del hongo y facilita su manipulación durante la siembra en el sustrato final. Esto a su vez, disminuye el tiempo de fructificación y mantiene la capacidad productiva. (Guillén, et al., 1998)

### **2.2.3 Cultivo del micelio de las cepas fúngicas en el caldo mineral**

Al ya tener al hongo purificado en las cajas Petri, se llevaron a la campana de extracción y se hicieron círculos en el agar de aproximadamente 1 cm, para colocar tres círculos dentro de los matraces con caldo nutritivo. Se esperó que el micelio creciera en este estado líquido para obtener una biomasa de buen tamaño. Esta biomasa se utilizó para el contacto con el hidrocarburo, se mantuvieron a temperatura ambiente para observar su desarrollo y maduración por 10 días.

### **2.2.4 Condiciones del crecimiento de la biomasa**

Cuando se seleccionaron las cajas Petri con mayor crecimiento del micelio, se les llevó a la campana de flujo laminar. Con un tubo de ensayo ya esterilizado, se les cortaron círculos al agar, se obtuvieron 5 círculos de cada caja Petri. Para hacer el sembrado en el medio líquido, se prepararon 8 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL del caldo papa dextrosa (caldo nutritivo), por lo que estos círculos se colocaron en estos medios y 2 gr de all – bran como fuente de carbono se incubaron a  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24 días. (Stamets, 2005)

La meta de la incubación del micelio fue la obtención de biomasa abundante para el siguiente paso.

## **2.3 Contacto de cepas fúngicas con el hidrocarburo de alto octanaje**

### **Etapas**

Esta etapa corresponde al contacto que la biomasa tendrá con el hidrocarburo.

### **2.3.1 Soporte inerte**

Existen varios tipos de soportes, estos no reaccionan en el proceso experimental, por lo que en este trabajo se utilizó por conveniencia el material denominado Tezontle, el cual es una roca volcánica de color rojo que ha sido molida hasta partículas pequeñas que nos sirven de soporte en el matraz, con la biomasa.

El soporte, como primer paso fue lavado para que se quitara cualquier materia orgánica y que no hubiese ninguna interferencia, después de haberla dejado secar, fue esterilizado en la autoclave, con el fin de asegurar que los únicos microorganismos presentes en ellos fueran los dos hongos en estudio que se inocularon. Las condiciones de esterilización fueron 121 °C y 15 lb/pg<sup>2</sup> durante 20 minutos.

### **2.3.2 Diseño del ensayo**

Este trabajo se realizó con 2 unidades Experimentales con 3 repeticiones cada uno. Se seleccionaron micelio de *Trametes Versicolor* y *Pleurotus Djamor*, de los cuales se hizo crecer biomasa. Se comparó el trabajo que hace cada hongo.

La biomasa generada será expuesta al entrar en contacto con el hidrocarburo, se harán 3 repeticiones de cada matraz Erlenmeyer de 250 ml con un soporte inerte y 50 ml del hidrocarburo.

### **2.3.3 Extracción de alícuotas**

Después de cada veinticuatro horas se extraerán alícuotas de los matraces y se determinarán su degradación por medio de espectrofotometría infrarroja.

Las alícuotas se obtendrán de cada matraz después de veinticuatro horas durante cuatro días.

Se tomará este tiempo de cuatro días ya que en diferentes experimentos antes realizados, el mínimo de tiempo en el que se realizan pruebas de resultados es de cuatro días en adelante, por lo que hacer las pruebas en los primeros 4 días sería algo poco común pero en el que podríamos ver el crecimiento con detalle.

Las alícuotas tomadas fueron de un mililitro y el hidrocarburo se colocó en un frasco de vidrio, las cuales fueron transportadas hasta el laboratorio de química analítica.

### **2.3.4 Obtención del hidrocarburo**

El hidrocarburo utilizado fue adquirido en un expendio oficial de Petróleos Mexicanos (PEMEX), en una gasolinera de Puebla.

La gasolina utilizada fue magna.

## **2.4 Determinación de degradación de gasolina por espectrofotometría infrarroja**

### Etapa 3

En esta etapa se realizará el análisis infrarrojo en el espectrofotómetro, espectroscopía IR o espectroscopía vibracional.

#### **2.4.1 Espectrofotómetro IR**

La espectrofotometría es el análisis de la luz que es emitida o absorbida por sustancias, el instrumento utilizado para este estudio es el espectrofotómetro. La espectrofotometría usa el hecho de que los átomos emiten luz de diferentes colores cuando sus compuestos son quemados o expuestos a una descarga eléctrica.

Un espectrofotómetro esta compuesto por una fuente de luz, un plato para muestra y un detector (Atkins & Jones, 1998)

La espectroscopia IR fue la primera técnica espectroscópica estructural ampliamente utilizada por los químicos orgánicos. (Peter J., 2011)

Las moléculas diatómicas y más complejas pueden, frecuentemente, absorber o emitir radiaciones de longitud de onda, las absorciones y emisiones se asocian a los cambios de estado de la energía vibracional y rotatoria de las moléculas. Las longitudes de onda más cortas con transiciones vibratorias que implican hidrógenos ligados con otros átomos. (Strobel, 1979)

La absorción de radiación infrarroja corresponde al cambio de energía, la radiación en este rango de energía corresponde al rango que abarca las frecuencias vibratorias de estiramiento y flexión de los enlaces en la mayoría de moléculas covalentes. Solamente los enlaces que tienen un momento de dipolo que cambia como función de tiempo, son capaces de absorber radiación infrarroja.

La transmitancia es más específica con los picos más pequeños por lo que visualmente sería más apreciable, la literatura más antigua la utilizaba con más frecuencia. En otras palabras la transmitancia es una medida de cuanta radiación

infrarroja pasa a través de una muestra y la absorbancia sería la medida de cuanta radiación se absorbe por una muestra. (*FTIR FAQs*, n.d.)

Durante el análisis FTIR, un punto en la muestra se somete a un haz IR modulado. La transmitancia del espécimen y la reflectancia de los rayos infrarrojos a diferentes frecuencias se traduce en una gráfica de absorción IR que consiste en picos inversos. El patrón espectral FTIR resultante es luego analizado y emparejado con firmas conocidas de materiales identificados en la biblioteca FTIR. (*FTIR (Fourier Transform Infrared) Spectroscopy*, n.d.)

La espectroscopía de absorción infrarroja (IR), recibe su nombre por la región del espectro electromagnético implicada, esta región se encuentra entre lo que se compone por tres zonas de  $12800-10\text{cm}^{-1}$ . En la región media que se compone por  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ , es en la cual se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas. Pero el IR cercano (NIR) compuesto por  $12800-4000\text{ cm}^{-1}$  ha tenido un auge en su implementación por la necesidad mínima de preparar sus muestras y por ofrecer un análisis cuantitativo.

Una de las ventajas de la espectrofotometría IR es su versatilidad, pues permite un análisis de cualquier muestra sin importar su estado físico.

Esta técnica es factible ya que se usa por el espectro vibracional de las moléculas, ya que esta es una propiedad física única, de cada una de ellas y es una característica de las mismas. (Mondragón, 2020)

Un espectro es una secuencia de bandas o picos de absorción en un intervalo de frecuencias dentro del infrarrojo. Cada pico en el espectro representa un tipo de vibración que ocurrió en un enlace atómico, cuando interaccionó el haz de infrarrojo con dicha muestra. Estas vibraciones provienen de específicos enlaces atómicos que tienen las moléculas de la muestra analizada. (Mondragón, nd.)

La espectroscopia IR mide las transiciones entre los niveles de energía vibratoria molecular como resultado de la absorción de la radiación de IR medio. Esta interacción entre la luz y la materia es una condición de resonancia que involucra la transición mediada por dipolo eléctrico entre los niveles de energía vibratoria.

Las bandas vibratorias IR, se caracterizan por su frecuencia (energía), intensidad (carácter polar o polarizabilidad) y forma de banda (entorno de enlaces). (Peter J., 2011)

#### **2.4.2 Programa del espectrofotómetro IR**

El espectrofotómetro utiliza un programa descargado en una PC, el cual, según el fabricante combina los últimos avances en diseño, muestreo y manejo de datos. Al incorporar un sofisticado rango automatizado de conmutación, este increíble instrumento le proporciona un rendimiento totalmente optimizado en todo el rango de medición. Lo que complementa que Elección de microscopios IR de alto rendimiento permite la identificación de impurezas diminutas en prácticamente cualquier matriz, también la configuración automatizada y el cambio de rango le permiten pasar rápidamente a su siguiente muestra sin reconfiguración manual.

(PerkinElmer, 2007)

#### **2.4.3 Utilización del espectrofotómetro IR**

Para sacar estas alícuotas y evaluarlas en el espectrofotómetro se:

1. Limpiará el disco del espectrofotómetro con alcohol etílico
2. Sacará con una pipeta de la muestra
3. Colocará en el disco una vez que el programa de la computadora se haya abierto y esté listo para la lectura.
4. Deberá de mantenerse goteando con la pipeta en el disco porque la gasolina se evaporará y debe de haber un flujo constante durante el tiempo de lectura

Disco donde se coloca la muestra

1. Limpiara el disco después de cada una de las alícuotas con alcohol etílico y pañuelos de papel.
2. Tendrá un resultado después de aproximadamente 60 segundos. El cual se imprimirá y se interpretara la gráfica resultante. (BRUKER, 2019)

Se obtendrá la lectura de los diferentes matraces a diferentes horas y se les dará lectura, se compararán entre los hongos y entre los diferentes periodos de tiempo. La propuesta final de remediación será de acuerdo con los resultados obtenidos para un sitio contaminado.

#### **2.4.4 Gráficas de hidrocarburos**

La absorbancia es la energía que interacciona con la muestra.

Para la determinación de la absorbancia se debe de determinar el área total bajo una banda, por lo cual un pico máximo es el que se debe de escoger. Es ideal tener un punto de referencia para comprobar la longitud de la onda y para ver si corresponde, por lo que se recomienda tomar una muestra como un blanco, la cual es en este caso la gasolina tipo magna sin ninguna alteración. (Mondragón,2020)

Se debe de destacar que la gasolina está conformada por diferentes aditivos y tiene una estructura similar pero al final si cambia su composición química dependiendo de la empresa y del país. A pesar de estas diferencias se tiene una gráfica utilizada para más investigaciones, la cual es el estándar en el que se basan pero tenemos nuestra propia gráfica de la gasolina tipo magna, es la mostrada en la figura 4, al haberla examinado en el IR. (Quadri et al. , nd)

La gasolina, concretamente, está compuesta por una mezcla de hidrocarburos isoparafínicos, parafínicos, olefínicos, nafténicos y aromáticos. Su fórmula química esta compuesta por una cadena de siete carbonos, aunque puede variar en función de su procedencia. Como se ha comentado, la gasolina es una mezcla de un centenar de estas especies de compuestos y varían desde el butano hasta el metil naftaleno, es decir, las características de una gasolina están fuertemente relacionadas por el tipo de hidrocarburo que contiene. (Martín, 2004)

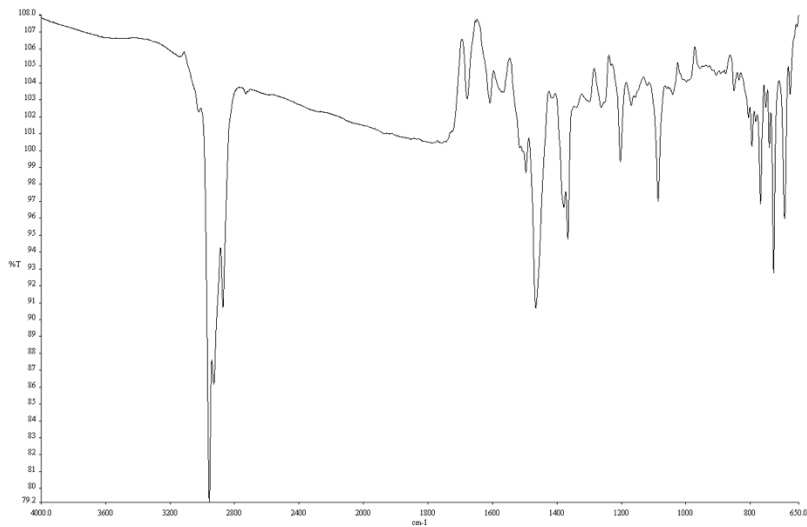


Figura 4. Bandas del hidrocarburo, gasolina tipo magna, en el espectrofotómetro IR

#### 2.4.5 Gráficas de degradación del hidrocarburo

Es fundamental tener una precisión al leer estas bandas de absorción por lo que se debe de trazar una línea perpendicular en el máximo de absorción y su transmitancia se mide en el eje Y. Se debe de evitar la extrapolación. (Mondragón,2020)

Hay diferentes frecuencias de absorción en el infrarrojo, para los hidrocarburos se da mediante la absorción generada por los enlaces C-H entre 3200 a 2700  $\text{cm}^{-1}$ . Se debe contar con una curva de calibración de referencia y compararla con la obtenida en la muestra. (Pinto & Sanchez, 2018)

Se debe de tener en cuenta que para una correcta lectura se deben de apreciar cambios como lo son la aparición de nuevos picos de absorción, lo que en su caso significaría en un líquido, que se puede dar la formación de nuevos compuestos, que tienen sus propios picos de absorción en el IR. De la misma manera el desplazamiento de las bandas de absorción, indicaría cambios en la estructura

molecular de diferentes compuestos presentes y la degradación de un líquido provoca cambios significativos en esta para su detección. (Mondragón,2020)

### **Capítulo 3: Resultados y discusión**

#### **3.1 Obtención cepas fúngicas**

En la etapa 1 se obtuvieron cajas Petri seguras, al cabo de 5 días, se observó que el micelio tenía un color blanco, estaba esponjoso y tenía un buen crecimiento como se muestra en la figura 5, no hubo contaminación de las cepas por lo que se prosiguió con los demás pasos.

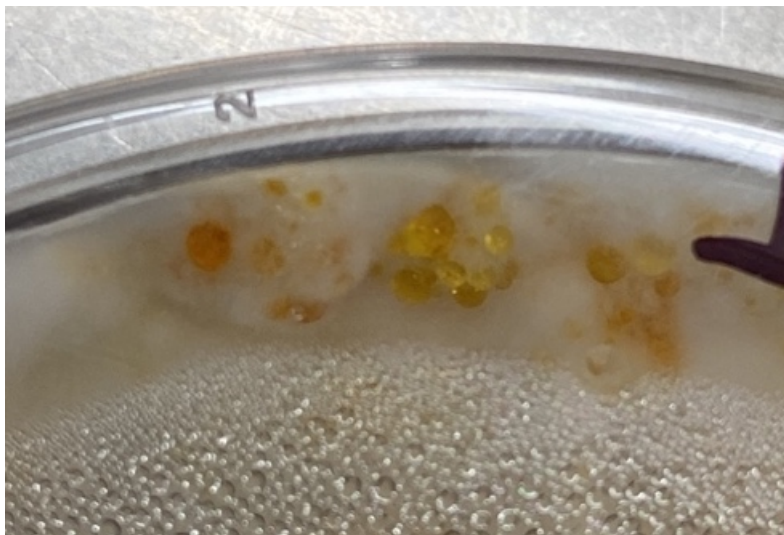


Figura 5. Crecimiento sano de micelio

#### **3.2 Aislamiento y purificación del micelio**

Al obtenerse cepas con un buen crecimiento y sin contaminación, se tomaron las cajas Petri, se abrieron en la campana de extracción y calentando la boca de tubo de ensaye, se sacaron del agar círculos con micelio, como se muestra en la figura 6. Posteriormente se introdujeron los círculos, de aproximadamente un centímetro de diámetro, al caldo nutritivo para obtener una biomasa de buen tamaño y se pudiera manipular de una mejor manera.

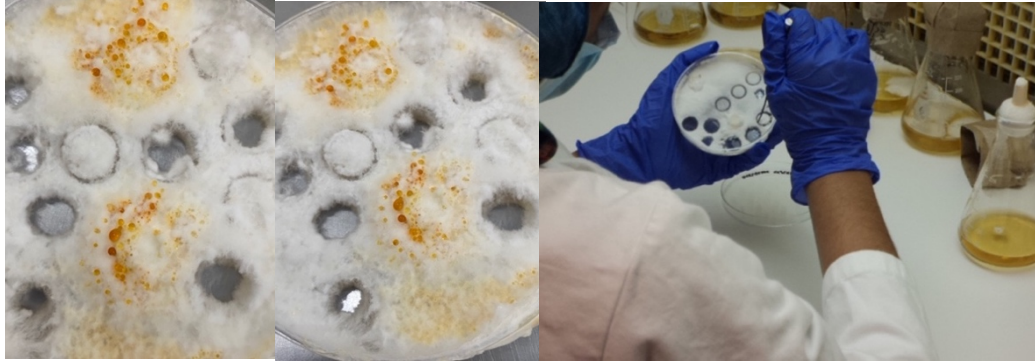


Figura 6. Micelio perforado con círculos

### 3.3 Contacto de cepas fúngicas con el hidrocarburo de alto octanaje

En la etapa dos, se puso en contacto a la biomasa con el hidrocarburo, se obtuvieron resultados positivos del espectrofotómetro y su interpretación.

Como se muestra en la tabla 1, se hicieron 4 repeticiones con cada hongo y se fueron evaluando cada 24 hrs.

Cepa	Repeticiones	Tiempo
TV	4	24 hrs
PD	4	24 hrs
TV	4	48hrs
PD	4	48 hrs
TV	4	72 hrs
PD	4	72 hrs
TV	4	96 hrs
PD	4	96 hrs

Tabla 1. Repeticiones con cada cepa y su total de repeticiones

#### 3.3.1 Reacción del micelio

El micelio se dejó crecer alrededor de dos semanas en el caldo nutritivo, un crecimiento sano de la biomasa da un color blanco y se ve una textura esponjosa, como se muestra en la figura 7.



Figura 7. Crecimiento de micelio en caldo nutritivo

Por otro lado, como se muestra en la figura 8, se trasvasó el micelio del matraz que estaba en el caldo nutritivo a los matraces que contenían el soporte inerte, de esta manera el micelio tiene un contacto con el ambiente y con la gasolina ya que el propósito no era hundirlo en el líquido.

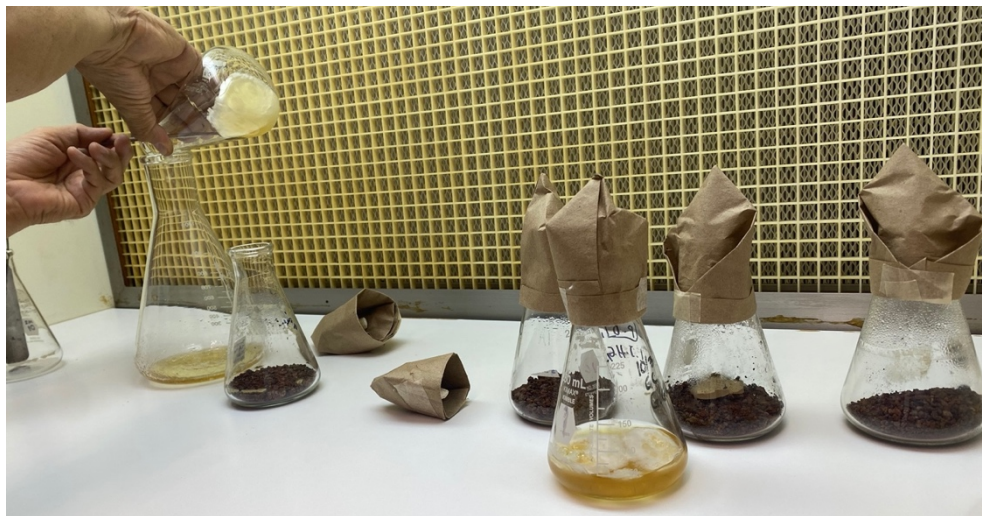


Figura 8. Extracción de micelio para colocarlo en soporte

En la figura 9 podemos observar cómo se ve el micelio acomodado en el soporte inerte y en contacto con la gasolina, el micelio cambia de una superficie esponjosa

a una capa delgada amarillenta y sumamente frágil, lo cual fue manejado de la manera más pulcra posible.

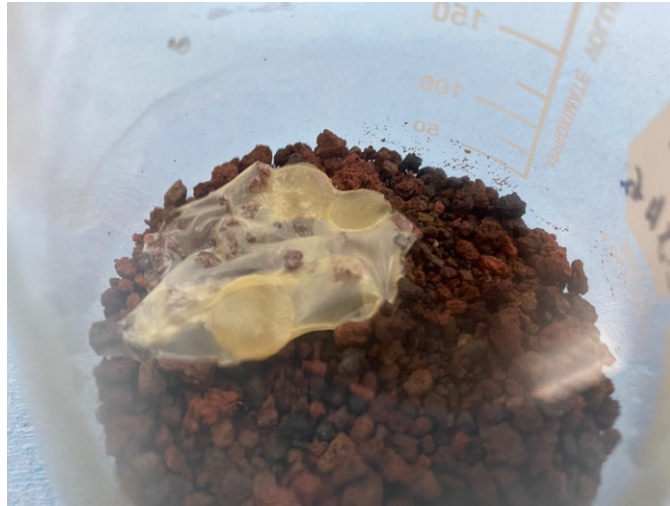


Figura 9. Micelio sobre soporte

### 3.3.2 Contenido neto de biomasa

Para un aproximado de cuanta biomasa se utilizó en este experimento, se midió su masa total seca, como se muestra en la siguiente figura 10, se dejó secar el micelio del contacto con la gasolina, su secado fue a temperatura ambiente y después se midió en una balanza analítica. Se hizo así con el micelio que se pudo recuperar, ya que en algunos casos la gasolina afectó tanto su estructura física que al momento de querer medirlo y transportarlo se desmoronaba.



Figura 10. Medición de Biomasa en balanza

En la siguiente tabla 2, se muestran las repeticiones que se hicieron y la biomasa que se logró obtener de cada matraz, como se puede observar, su crecimiento no es uniforme en la misma especie de hongo, ni en comparación con el otro hongo. Pero el *Pleurotus Djamor* crece con una mayor velocidad que el *Trametes versicolor* al cabo de dos semanas, este crecimiento se puede ver influenciado por varios factores externos pero en promedio el *Pleurotus Djamor* tiene una mejor capacidad de crecimiento.

Repetición	P.D.	T.V.
1	1.335	0.2355
2	0.7632	0.0752
3	0.2398	0.0259
4	0.0786	0
Promedio $\bar{X}$	0.60415	0.08415
Sumatoria $\Sigma$	2.4166	0.3366

Tabla 2. Gramos de Biomasa utilizada en cada unidad experimental de *Pleurotus Djamor* y *Trametes Versicolor*

En la gráfica 1, se da a conocer la biomasa que se obtuvo de los matraces, al final de la experimentación. Como se observa el *Pleurotus Djamor* tiene un potencial de crecimiento elevado, pero que su crecimiento sea exponencial no significa que su potencial degradador sea de esa misma magnitud, ya que el *Trametes Versicolor* tiene una reputación de ser una especie de hongo muy resistente a diferentes situaciones estresantes y también se puede decir que de una manera la gasolina afecto su estructura mayormente que la del *Pleurotus Djamour*.

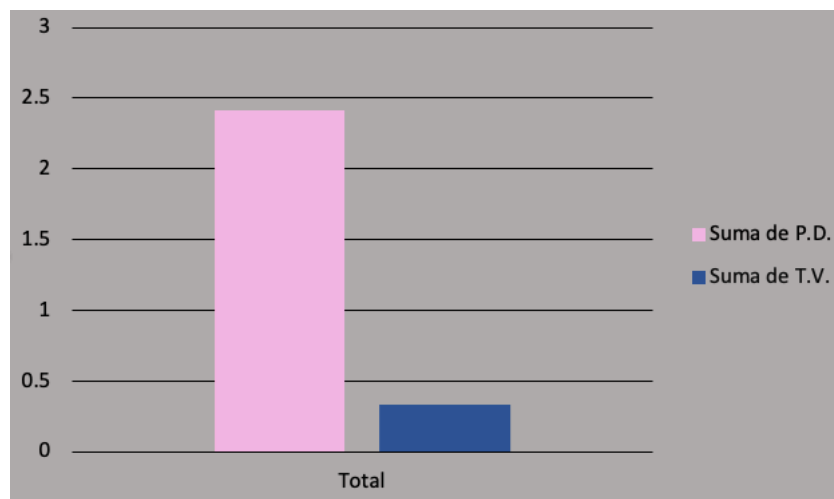
Teniendo en cuenta que el crecimiento fúngico depende tanto de factores físicos como químicos, los hongos toman de sus alrededores los nutrientes que necesitan, son fuente de energía para producir proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. (Juárez, 2013)

Se tiene un registro de cómo se debe de ver la biomasa antes de su alteración para cada una de las especies del hongo, para el *Pleurotus Djamor* Crecimiento grueso, compacto y rizomórfico; de color blanco brillante, en algunos casos comienza a verse un color salmón en el micelio, afieltrada con densidad alta. (Sindhu, 2022)

El micelio del *Trametes Versicolor*, Las colonias miceliales de *Trametes versicolor* eran de color blanquecino, con alta densidad, textura aterciopelada y abundantes hifas aéreas.(González et al., 2011)

La diferencia en la biomasa es que en el *Pleurotus Djamor*, es que después de haberla sometido a esa situación de estrés, el micelio se vuelve una capa delgada pero es flexible, cuando se seca es dura, con rigidez pero soporta movimiento al manejarlo, al contrario con *Trametes Versicolor* que su biomasa se encogió considerablemente y que al ponerse rígida, se rompía con facilidad al mínimo movimiento.

La sumatoria de toda la biomasa del *Pleurotus Djamor* es de 2.4166 g y la de *Trametes Versicolor* es de 0.3366 g.



Gráfica1.Capacidad de crecimiento de la biomasa experimental

Se puede medir el potencial de crecimiento de cada uno de los hongos por lo que sería la explicación de su diferencia al crecer el micelio, ya que podrían tener diferentes fases de crecimiento, pero el peso seco puede ser graficado contra el tiempo obteniéndose una curva que presenta las siguientes fases, como se muestra en la figura 11:

- Fase lag o retardada. Cuando es inoculado el hongo, este no crece inmediatamente sino que la población permanece inalterada por un tiempo. Lo que sucede internamente es que las células aumentan su tamaño, su actividad aumenta. A esta célula le podrían hacer falta enzimas o coenzimas, las cuales deben de existir para su correcto funcionamiento del mecanismo.
- Fase logarítmica o exponencial. La velocidad de crecimiento es máxima, la población en cuanto a composición, actividad metabólica y otras características fisiológicas es casi uniforme. La acumulación de micelio en peso seco es máxima.
- Fase estacionaria. La fase exponencial comienza a decaer en forma gradual, al punto de llegar a un estado de suspensión de crecimiento.
- Fase de autólisis o de muerte. Se generaliza por el agotamiento de elementos nutritivos.

La tasa de crecimiento medida durante la fase exponencial es conocida como tasa específica de crecimiento y es influenciada por el tipo de hongo y las condiciones ambientales empleadas. (Estrada & Ramirez, 2019)

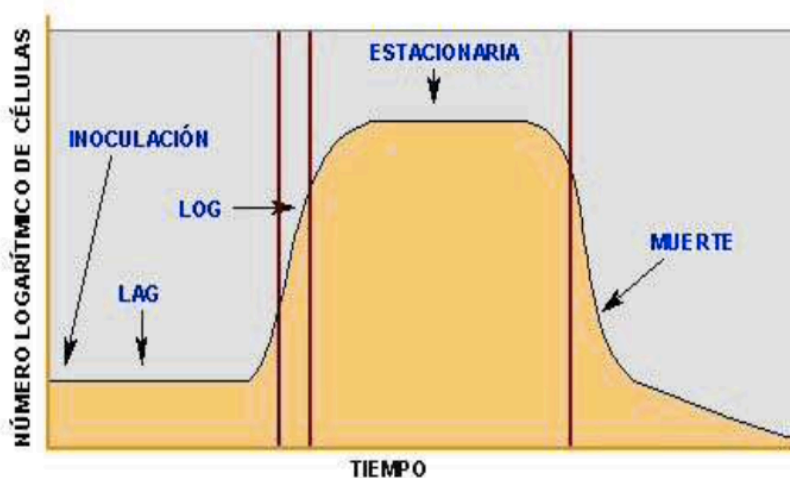


Figura 11. Fases de desarrollo de un microorganismo.

### 3.3.3 Características del micelio

El micelio que se observa en la figura 12, tiene un color amarillento, disminuyó su área en la que estaba expandida como se muestra en la siguiente figura, una vez ya seco completamente disminuyó notablemente su tamaño y era muy frágil al manejarlo.



Figura 12. Disminución de micelio

Se consideró importante realizar observaciones más detalladas de la estructura microscópica del micelio, por lo que se solicitaron generar fotografías en microscopia de barrido (SEM), las cuales se presentan a continuación describiendo los cambios morfológicos generados por el contacto con el hidrocarburo, realizó en un microscopio JECL modelo JSM-6610LV, complementado con un equipo de microanálisis EDX Inca Energy-350, Oxford Instruments, con detector de rayos X modelo X-Max 50, de 50 mm, con resolución teórica de 127 eV a la energía del pico K del Mn. Cada muestra se deshidrató y se cubrió con polvo de oro en un equipo de recubrimiento marca Balzers modelo SCD 004.

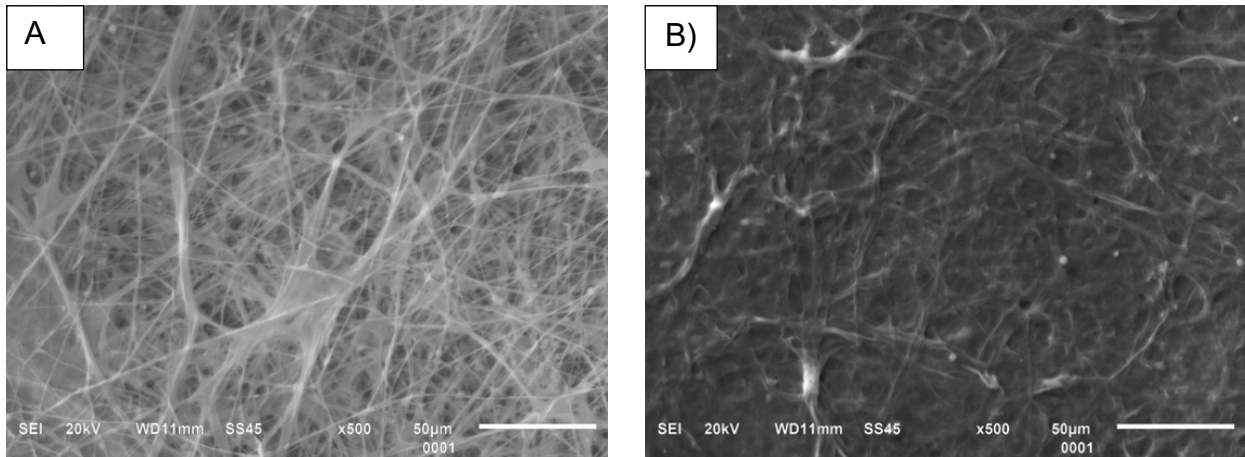


Figura 13. Microscopia de barrido en 500x de la estructura de *Pleurotus Djamor*,  
A) micelio sin alteración, B) micelio con gasolina

En la figura 13 A) se aprecia un micelio delgado y abundante, con profundidad y con sus estructuras de reproducción esféricas. Este hongo posee hifas hilianas delgadas y septadas, los basidios son largos y entrecruzados como una malla y las basidiosporas cilíndricas con paredes delgadas, hilianas y lisas(Elizabeth, 2018)

La figura 13 B) se puede ver sutilmente que el micelio se desdobra, una sola hifa se expande, tomando más espacio y cubriendo las que están detrás de ella.

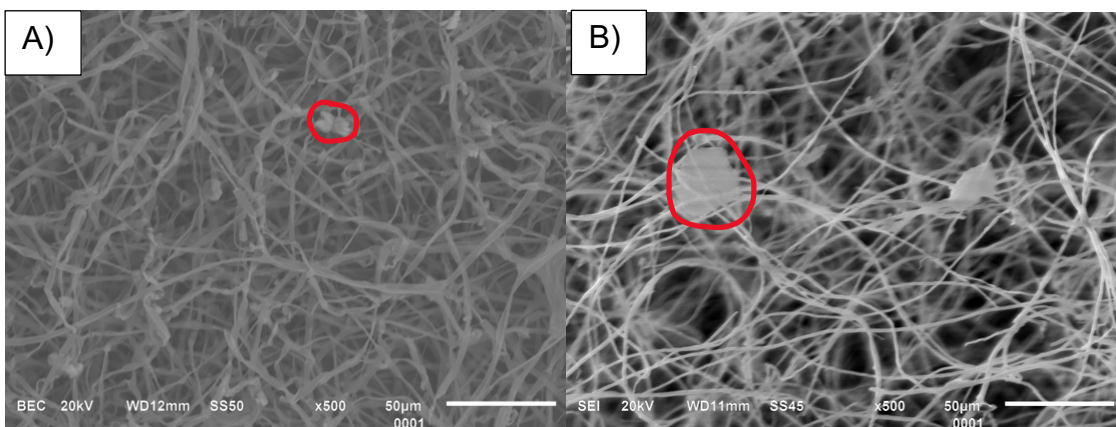


Figura 14. Estructuras microscópicas de *Trametes Versicolor* en 500x, A)  
micelio sano, B) micelio expuesto a gasolina

En la figura 14A) se aprecia aunque el micelio esta deshidratado todavía mantiene una estructura ramificada, se notan las hifas, aunque están deshidratadas, todavía son alargadas y tienen una notable densidad, las estructuras de reproducción son esféricas y abundantes. Se podría notar la presencia de conidios dentro del círculo rojo.

En la figura 14B) Se presentan cambios ocurridos en el micelio, en su morfología presenta una turgencia, por lo que se ve más grueso, hay menos presencia de micelio, se ve menos flexible. En el círculo rojo se puede observar un conidio, aplanado y su presencia disminuyó drásticamente.

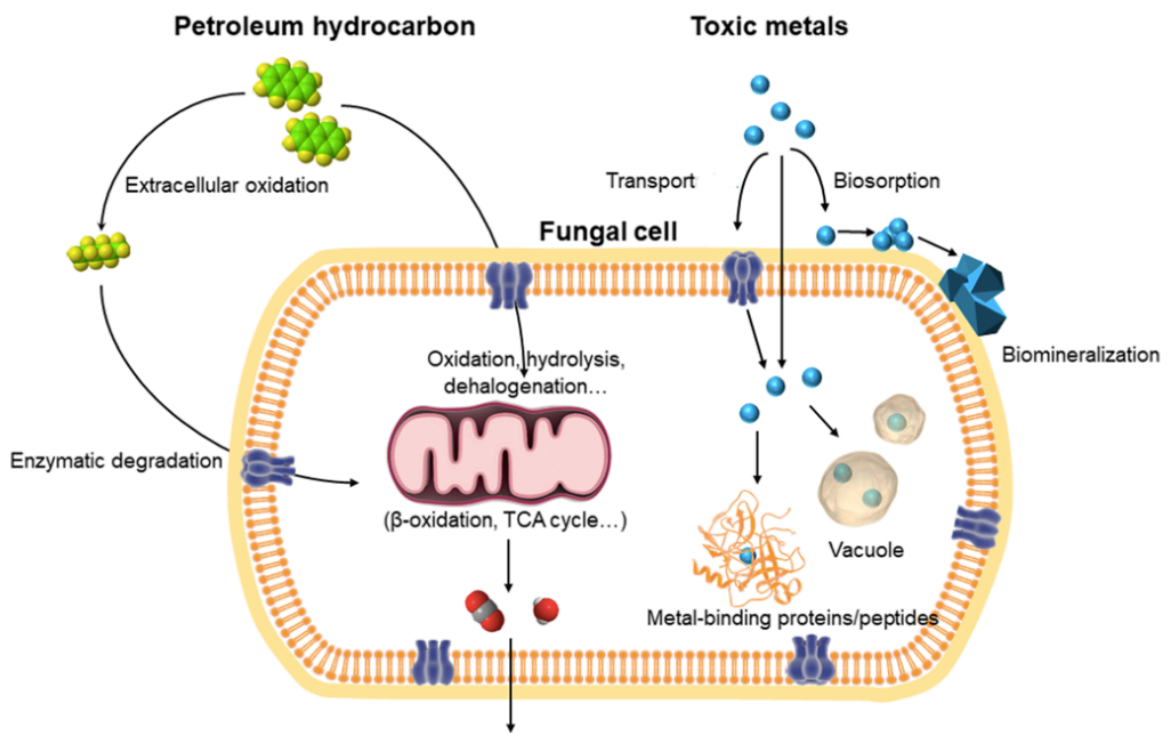


Figura 15. Diagrama simplificado de las interacciones fúngicas con hidrocarburos del petróleo y metales tóxicos (QIANWEI, et al., 2020)

Las membranas celulares de los hongos son permeables a los hidrocarburos del petróleo o a compuestos orgánicos más simples oxidados por enzimas extracelulares. Estos compuestos pueden sufrir un metabolismo posterior que incluye hidrólisis, deshalogenación,  $\beta$ -oxidación e ingreso al ciclo del ácido tricarbóxico (TCA). Por este motivo se pueden notar cambios morfológicos en las figuras 13 y 14. (QIANWEI, et al., 2020)

Los metales tóxicos pueden acumularse en las superficies celulares de los hongos a través de la biosorción, lo que puede provocar la nucleación y posterior precipitación de biominerales.

Además, algunos metales pueden acumularse intracelularmente mediante transporte activo o difusión a través de la membrana celular. Una vez dentro de la célula, estos metales pueden localizarse en compartimentos vacuolares u otros orgánulos, o ser secuestrados por sulfuros, proteínas/péptidos quelantes de metales y otras macromoléculas. (QIANWEI, et al., 2020)

#### **3.3.4 Muestras en alícuotas**

Como se muestra en la figura 16, en este proceso del experimento se tuvo extremo cuidado al que no se evaporara en ningún momento la gasolina, los matraces fueron tapados con plástico tipo film y un tapón, se sacaron las alícuotas de manera rápida y eficiente, si llega a haber alguna duda de la evaporación de la gasolina, queda recalcar que la meta de este experimento es crear una propuesta en la cual el suelo estará contaminado de hidrocarburo sin saber exactamente su concentración, la cual su mayor parte se habrá evaporizado.

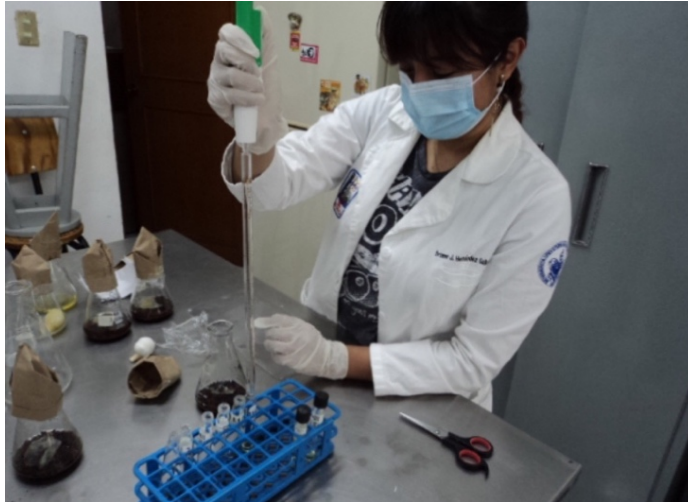


Figura 16. Extracción de la gasolina para colocarla en alícuotas

Las alícuotas fueron tomadas cada día alrededor de la misma hora y llevadas en ese mismo instante a leer, en el laboratorio de análisis instrumental de la facultad de ingeniería ambiental, en el edificio FIQ4, salón 301. Se siguieron exactamente y exhaustivamente las indicaciones para el uso del espectrofotómetro, el equipo que se usó fue el que se muestra en la siguiente figura 17.



Figura 17. Espectrofotómetro listo para muestrear

### 3.4 Fundamento de la degradación del hidrocarburo por Espectrofotometría infrarrojo

#### 3.4.1 Diseño del Espectrofotómetro infrarrojo

El espectrofotómetro tuvo mantenimiento justamente hace un año por lo que tiene una mayor exactitud de resultados, tal aparato es de la marca Perkin Elmer-Spectrum One del año 2004, como se puede ver en la imagen.



Figura 18. Equipo de Espectrofotómetro completo

#### 3.4.2 Tablas de Espectroscopía Infrarroja

La figura 19 muestra las bandas de radiación infrarroja obtenidas del hidrocarburo sin ninguna alteración, la cual será la base para saber si hubo degradación, de las demás gráficas.

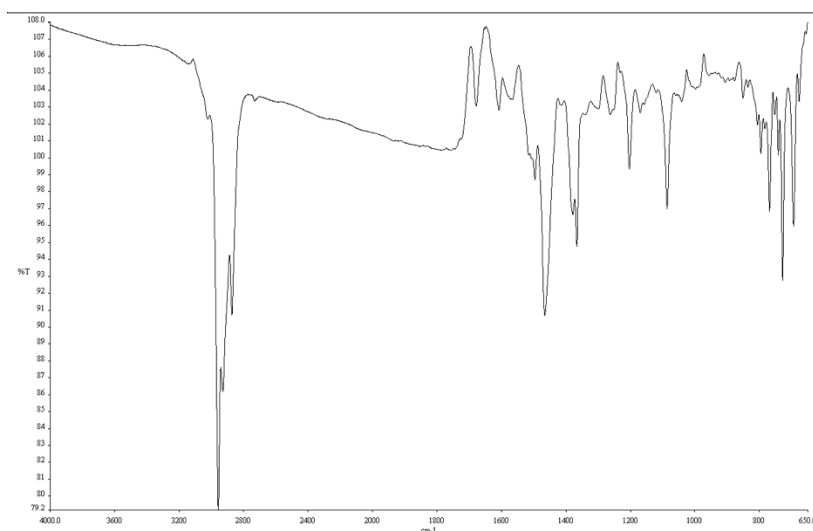


Figura 19. Blanco de bandas de gasolina en IR

Esta figura será nuestro parámetro de medición en la degradación de las siguientes gráficas.

### **3.4.3 IR: Absorciones infrarrojas características de los grupos funcionales**

En este apartado hablaremos de los principales grupos funcionales que se detectaron en las bandas de la gasolina sin ninguna alteración, que conformarían a este producto y que veremos su alteración.

Al tener en cuenta que el petróleo se lleva a fraccionar, en la torre atmosférica, una de esas fracciones más ligeras son las naftas, estas se mezclan con aditivos y mejoran su calidad, con este proceso se forma la gasolina. La gasolina de la misma manera se divide en fracción ligera, la cual contiene cadenas lineales entre cinco y diez átomos de carbono (C5 a C10), la fracción mediana es cuando las moléculas contengan cadenas lineales entre diez y veintiocho átomos de carbono (C10 a C28), por último los de fracción pesada son los de un peso molecular sea mayor a C18. (SEMARNAT, 2014)

Las bandas en el IR se identificarán, por la fracción de la gasolina, que serían en una banda a:

- 3000  $\text{cm}^{-1}$  indica la presencia de C-H en alcanos.
- 1600  $\text{cm}^{-1}$  indica la presencia de C=C en alquenos.
- 2200  $\text{cm}^{-1}$  indica la presencia de C $\equiv$ C en alquinos.
- 1500  $\text{cm}^{-1}$  indica la presencia de C=C en aromáticos

En la figura 16 al tomarse en cuenta las vibraciones de las bandas más significativas, se debe de obtener los grupos funcionales característicos de la gasolina, de la cual sabemos que son enlaces carbono, por lo que la muestra analizada tiene su primer estiramiento en el número de onda 2872  $\text{cm}^{-1}$  el cual corresponde a los enlaces C-H alcanos, seguido de ello se encuentra un segundo estiramiento en el número de onda 1464  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a los alcanos con

enlaces C-H, se encuentra en el número de onda de la zona de  $1365\text{ cm}^{-1}$  el grupo alcano gem-dimetilo con alcance C-H, en el número de onda  $1203\text{ cm}^{-1}$  se encuentran aminas alifáticas con vibraciones características C-N, en el número de onda  $1086\text{ cm}^{-1}$  se encuentran compuestos con azufre con vibraciones C=S y finalmente en el número de onda  $728\text{ cm}^{-1}$  corresponde a un enlace ch de cadena polimerica , carbono hidrogenado de  $\text{ch}_2$  con  $n+4$  .

#### 3.4.4 Comparación de tablas

Se compararán tablas obtenidas de las lecturas previamente seleccionadas de las que tuvieron una mayor degradación, para compararse con la gráfica 0.

Se escogieron las gráficas con mayor degradación, del *Pleurotus Djamor* y del *Trametes Versicolor*.

DÍA 1

R1P

Se puede observar en la figura número 20 que hay 3 bandas de tipo fuerte, el primer estiramiento notorio es el que tienen un número de onda aproximado de  $2950\text{-}2957\text{ cm}^{-1}$ , esta corresponde a los alquenos, de enlace C-H. Seguido con una vibración de flexión, en el segundo estiramiento de  $1464\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a los alcanos con enlace  $\text{CH}_3$ . El tercer estiramiento notorio, que sería la huella dactilar, tiene un número de onda de  $728\text{ cm}^{-1}$ , corresponde a que los alquenos cis-disustituidos presenan una banda de flexión C-H fuera del plano. Se debe de recalcar que en el blanco de gasolina, el primer estiramiento llegaba a un porcentaje de transmitancia de 79.2, en el primer día de tratamiento tiene un porcentaje de 75.1 y en el último día de 73.5, por lo que se observa una degradación en la intensidad. El segundo estiramiento era de 89%, en el primer día de 84.3% y el último de 83%. El tercer estiramiento era de 92%, en el primer y último día de 82%.

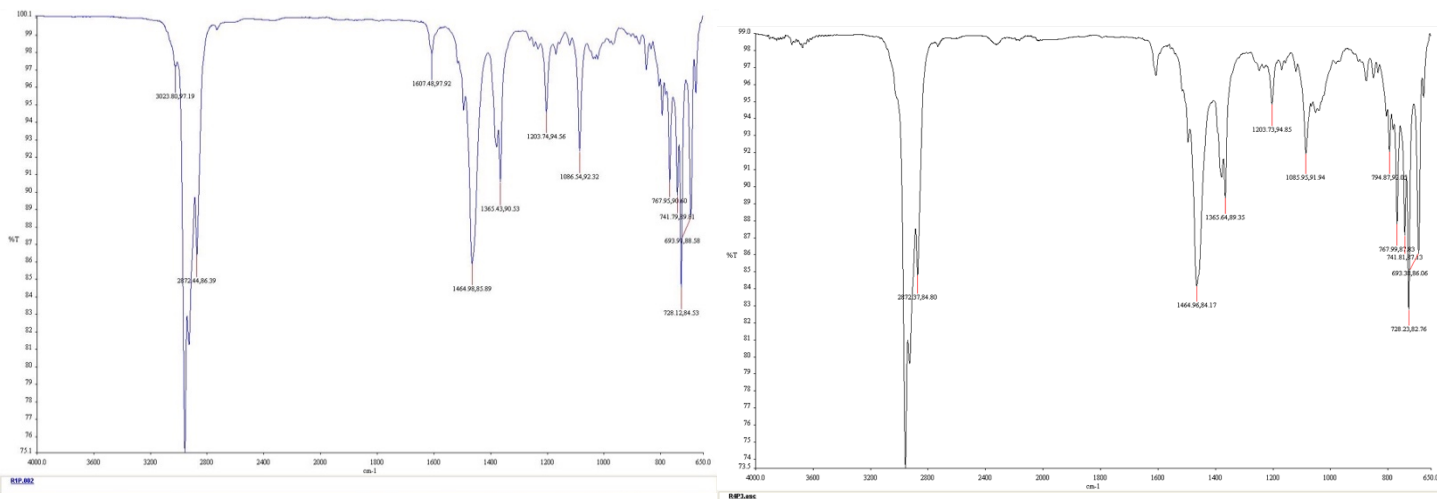


Figura 20. Bandas de Espectrofotómetro IR para *Pleurotus Djamor*

R1T

En la figura número 21, al tomarse en cuenta las frecuencias de absorción altas, en el primer estiramiento de  $2956\text{ cm}^{-1}$ , lo que resulta en las bandas indicadoras del metilo, su confirmación de este grupo es la banda que se observa en  $1465\text{ cm}^{-1}$  y en el lugar de su huella dactilar está la banda de  $728\text{ cm}^{-1}$  en la que los alquenos cis-disustituídos presentan una banda de flexión C-H fuera del plano.

El cambio más radical es que la transmitancia es de 75.7% el primer día y en el blanco de gasolina era de 79.2%, por lo que en las primeras 24 horas hay una degradación de 4.2%, en el último día es de 71.9%.

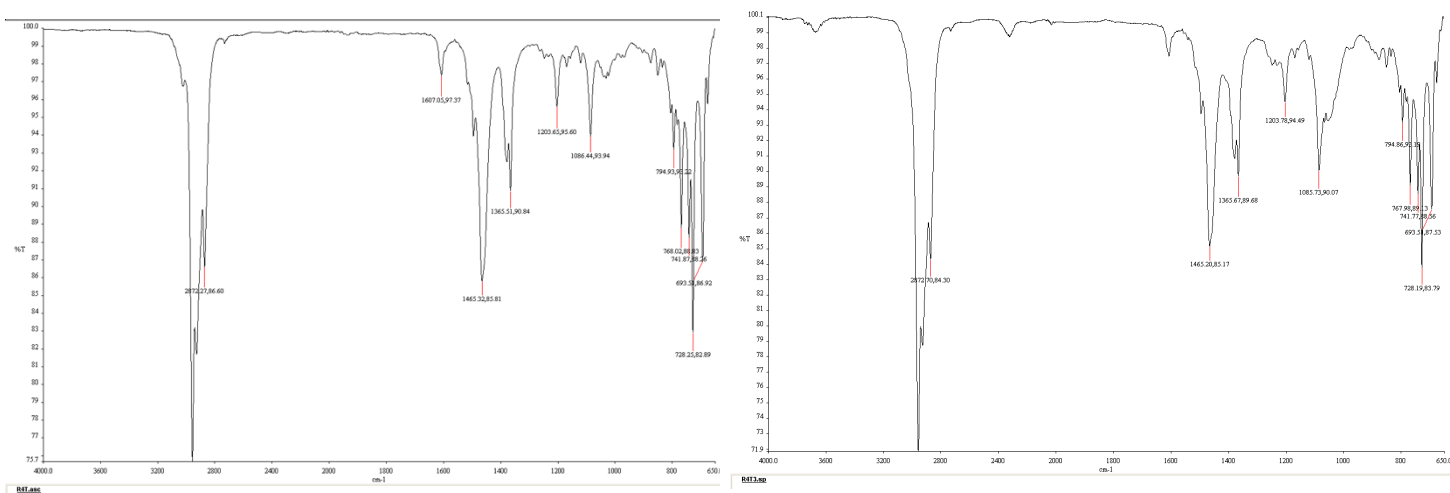


Figura 21. Bandas de Espectrofotómetro IR para *Trametes Versicolor*

### 3.4.5 Grupos funcionales degradados

En este apartado se comparará la degradación que tuvo con respecto del tiempo la gasolina, se tomará la gráfica obtenida de cada día y así obtener el porcentaje de degradabilidad.

La volatilidad es un cambio físico, se evapora el líquido sin dejar residuos. (Sligh, 1926)

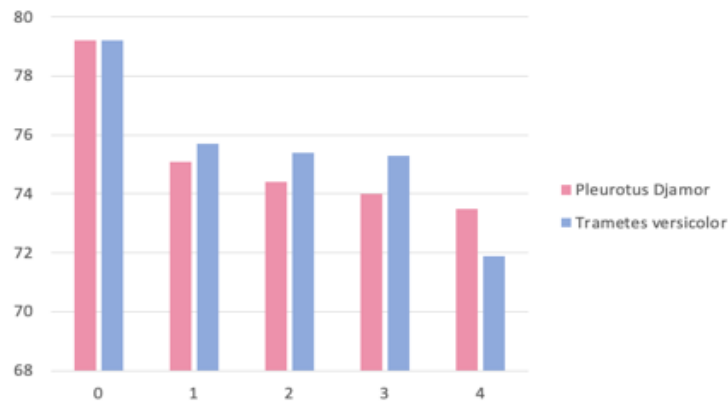
Por lo que en este experimento no se tomará en cuenta la volatilidad, ya que, como se vio anteriormente en las bandas de IR, hay residuos que se evaluaron e identificaron. Los hidrocarburos pueden sufrir también de oxidación química, fotólisis, bioacumulación y adsorción, la degradación microbiana, fúngica, etc., es el proceso principal que afecta la persistencia de los HAP en la naturaleza. Por lo tanto, la inoculación de cocultivos de hongos y bacterias puede mejorar la degradación de los HAP. (Li et al., 2008)

Como se muestra en la siguiente Tabla 3, al principio en el día cero para el hongo *Pleurotus Djamor* y *Trametes Versicolor*, hay un porcentaje de transmitancia del 79.2%, tomando esta cantidad como el 100% del porcentaje de transmitancia de la gasolina. Para *Pleurotus Djamor* podemos observar que el día 4 tiene una transmitancia de 73.5% por lo que su porcentaje de degradabilidad sería de un 7.1969%, mientras que el *Trametes Versicolor*, con una transmitancia final de 71.9% correspondería a la degradabilidad de 9.2171%

<i>Pleurotus Djamor</i>					
Día	0	1	2	3	4
% Transmitancia gasolina	79.2	75.1	74.4	74	73.5
<i>Trametes versicolor</i>					
Día	0	1	2	3	4
% Transmitancia gasolina	79.2	75.7	75.4	75.3	71.9

Tabla 3. Comparación de porcentaje de transmitancia en cada hongo

En la siguiente gráfica 2 se puede observar de mejor manera como se ve una mayor degradación por el hongo *Pleurotus Djamor*, ya que en los primeros 3 días degrada constantemente mientras que el hongo *Trametes Versicolor*, pareciera que no degrada más que el primer día y hasta el día 4 pero en ese último día su degradación es mayor que la del *Pleurotus Djamor*.



Gráfica2. Comparación de transmitancia en IR

En la figura 22, se tiene las absorbancias de primeramente *Pleurotus Djamor*, y como segunda del *Trametes Versicolor*, de los cuatro días con el blanco, que es el resultado en color negro.

En la figura 22 A) podemos ver esta degradación de gasolina realizada por las enzimas del hongo *Pleurotus Djamor*, se puede ver un cambio gradual, por otro lado en la figura 22 B) la degradación de las enzimas del *Trametes Versicolor*, son más sutiles en sus cambios, su mayor diferencia es el último día con una banda más baja.

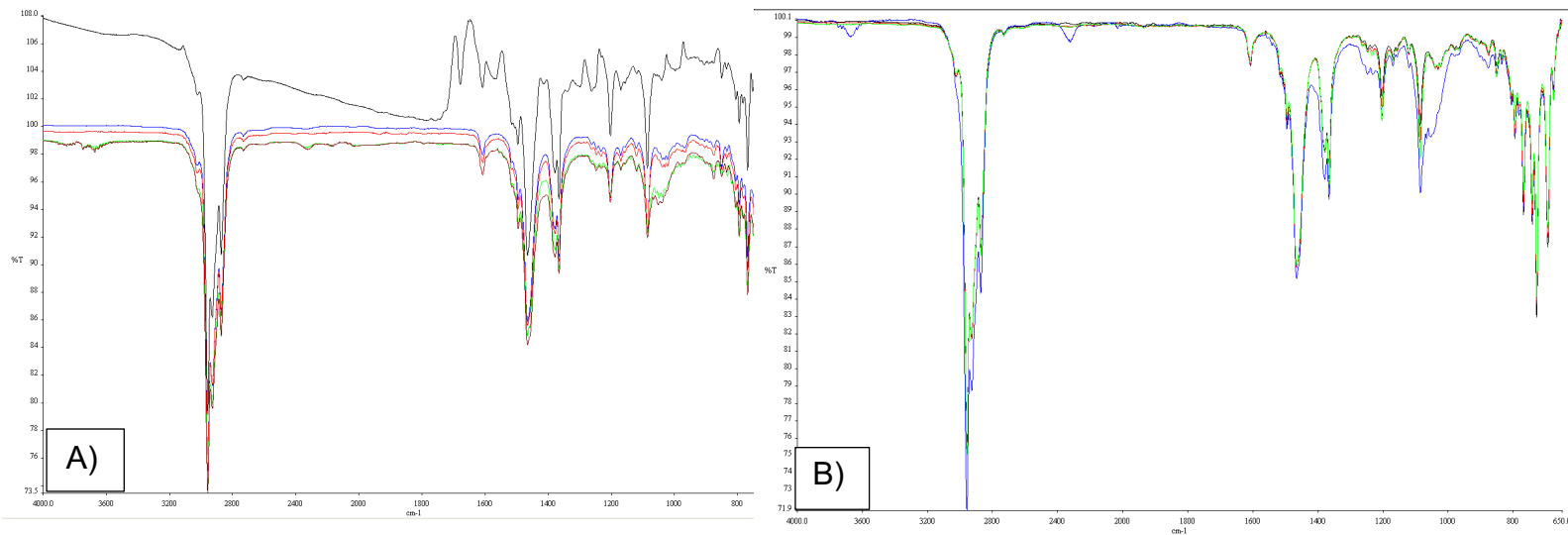


Figura 22. Bandas en Espectrofotómetro IR de *Pleurotus Djamor* y *Trametes Versicolor* en los 4 días, respectivamente

### 3.5 Diseño de una propuesta de biorremediación

La tercera etapa es la de una propuesta de biorremediación, con el uso de vehículos de inoculación, los cuales se emplearían en una zona contaminada por hidrocarburo.

El 28.3% de los suelos mexicanos es el denominado Leptosol, son suelos muy delgados, pedregosos y poco desarrollados que pueden contener una gran cantidad de material calcáreo. En segundo lugar esta el Regosol con un 13.7%, En general, son suelos muy jóvenes que se desarrollan sobre material no consolidado, de colores claros y pobres en materia orgánica. Y en tercer lugar con un 11.7% esta el suelo llamado Phaeozem, es oscuro y rico en materia orgánica, por lo que es muy utilizados en agricultura de temporal.

Por lo que los suelos mexicanos, en al menos un 42% son pedregosos o arcillosos, si hubiera una fuga de gasolina prolongada, esto facilitaría su esparcimiento, ya que principalmente, este se esparce verticalmente. La infiltración en el suelo disminuye las pérdidas por evaporación de los compuestos volátiles. (Ortega, 2012)

En este derrame, con galones de gasolina vertida, podría suceder que en algunos metros de profundidad en el suelo, se encuentren el líquido residual en la zona insaturada. Los hidrocarburos persistirán como un gran cuerpo líquido cuando ocurran fugas prolongadas y no cuando sean pequeñas. (Altamirano & Fernández, 2014)

Por lo que en esta propuesta se manejarán unos sacos de micelio, en los cuales la concentración de la gasolina no influya, con este método y se pueda utilizar en cualquier caso.

### **3.5.1 Contenedores de micelio – vehículos de inoculación**

Cuando este micelio es utilizado para inocular más material se le llama semilla madre. La manera más conocida de hacer semilla madre es con grano, aserrín, astillas de madera, entre otros, todos ellos esterilizados, la cual consiste en un material completamente colonizado de micelio. En 1932 el Dr. James Sinden patentó un nuevo proceso para hacer semilla madre, usando granos de cereal como sustrato para el micelio.

Debe de tener el inoculo un buen porcentaje de humedad, se recomienda contenedores de vidrios con una boca pequeña, una vez que los contenedores se llenaron y esterilizaron, se sacuden al salir de la autoclave para que se distribuyan los granos.

Se debe de seleccionar con cuidado cajas Petri de las cuales no haya mas de  $\frac{3}{4}$  del crecimiento de la superficie en el agar, estando en una campana de seguridad, se debe de cortar con un asa esterilizada un triangulo en el agar con sobre su superficie micelio, se debe de tener cuidado con los movimientos al transferir el agar al frasco con granos, por cada transferencia se debe de flamear el asa, estos frascos se convierten en los cultivos primario-base.

Posteriormente se deben de cerrar con cinta y agitar para que el micelio se esparza, ya que cuando el corte del agar se mueva y tenga contacto con las semillas se expone por un momento.

Se espera un crecimiento después de 7 a 14 días, después de inoculación, los contenedores deberán de estar completamente colonizados con el micelio del hongo, se debe de revisar con detenimiento para detectar alguna contaminación. (Stamets & Chilton, 1983)

Para llevar el contenido de los frascos con cultivos al campo, se deben de colocar en bolsitas biodegradables, ya que el contenido de cada frasco serviría para sembrar de 5 a 6 costales de micelio que se explicará a continuación.

### **3.5.2 Utilización de los sacos de micelio**

En este trabajo nos vamos a basar en estas bolsas de micelio hechas con cartón y con micelio de grano. Se debe de tener en cuenta que se ha hecho crecer el micelio en condiciones estériles en un laboratorio y que nunca se han expuesto a microbios competidores, por lo que el sistema inmune del micelio debe de trabajar para superar a sus competidores. Se le debe de dar una oportunidad para diseñar estrategias defensivas, así que días antes de su incorporación al suelo y se le debe de dar una pequeña cantidad de muestra a lo que se enfrentará. En efecto, se contamina a propósito el micelio, sucederá lo que normalmente se hace con las vacunas para las enfermedades como el COVID.

Para la creación de sacos de micelio los cuales se utilizarán para micorremediar zonas grandes contaminadas, se necesitarán algunos materiales. (Stamets, 2005)

El primero será tener las bolsas dosificadas e inoculadas con micelio.

Posteriormente se debe de conseguir cartón corrugado o también llamado cartón ondulado, incluso el cartón de cajas este se recomienda remojar hasta que este completamente empapado, durante una hora. Y se debe de cortar en secciones, se debe de colocar un poco del contenido de la bolsita en el papel, se recomienda que sea entre los paneles de ondulación del cartón, se tapan con más cartón, este proceso se hace repetitivamente, como una torre de micelio, una sobre otra. Se recomienda incubar durante 3 a 6 meses antes del trasplante. No esperar a que este un cien por ciento de crecimiento en la bolsa, ya que se debe de introducir al suelo cuando este llegando al punto máximo de su crecimiento, Se debe de mover

el micelio porque sino morirá, por lo que una replantación en el área contaminada es fundamental, se debe de tener varios paquetes de cartón en bolsas. (Stamets, 2005)

Este cartón se debe de poner en bolsas de tela, cuando una de estas bolsas se coloca sobre el suelo, puede cubrir  $1,858.06 \text{ cm}^2$ , significando que suficiente micelio puede cubrir desde  $18,580.608 \text{ m}^2$  hasta  $278,709.12 \text{ m}^2$  lo que sería equivalente a 1.82 ha o hasta 27.92 ha. Es probable que no todas las bolsas puedan hacer crecer el micelio, pero incluso si solo el 25 por ciento de las bolsas de telas, realmente colonizan, se puede utilizar como un método efectivo para la micorremediación de zonas y devolver la vida al suelo. De hecho se podría agregar suelo o pasto a estas bolsas para que sean como potenciadores del crecimiento. Incluso en algún punto estas bolsas se pueden utilizar como amortiguadores de la contaminación para proteger áreas en específico. Se debe de recalcar que este método a gran escala puede ayudar a reparar el daño en el ecosistema y se pueden crear amortiguadores entre ecosistemas sensibles y ambientes tóxicos, ya que estas bolsas crearían un filtro biológico. (Stamets, 2005)

Se deben de poner una bolsa arriba de la otra, máximo deben de ser 2. Se debe de tener en cuenta que la bolsa de tela ayuda a respirar el micelio y se degrada la tela, ya que esta misma tela no encapsula el micelio sino que lo ayuda a crecer porque los hongos pueden degradar incluso ese material. Ya que el micelio crece por dentro y para su exterior. La bolsa se degradaría en unos 6 a 12 meses, se puede ver esta degradación cuando la bolsa empieza a cambiar de color. Lo que produce que se rompa y se esparza el micelio en el suelo. La medida típica de este tipo de bolsas es de 12x24 pulgadas hasta 18x30 pulgadas. (Stamets, 2005)

Lo que pasa dentro de esta bolsa al estar enterrada es que el micelio sigue creciendo, sus células que son parecidas a una red, por lo que atrapa sedimentos y bacterias, por lo que el “sudor” del micelio desnaturaliza muchas toxinas, ya sean

químicas o biológicas, así mismo el micelio segrega antibióticos y enzimas con radicales libres. En cuanto a la colonización, una de estas bolsas que pesarían más de 13.60 kg, lo que la convertiría en un contenedor de microfiltración, el cual puede usarse para restaurar un área o si son establecidas para una mayor expansión del micelio. Son llamadas normalmente “Bunker Spawn”, en un similar punto funcionan al prevenir flujos de contaminantes poco profundos o sedimentos de suelo contaminado y a controlar la erosión, su funcionalidad es que se pueden poner como paredes verticalmente o se pueden acomodar como mejor funcione dependiendo de lo que se quiera lograr.

Cuando las bolsas son colocadas en el suelo, muchas veces, las lombrices rojas entran a las bolsas, consumen micelio y ayudan a nutrir el suelo, creando un impulso en el ecosistema de comunidades y otros organismos. (Stamets, 2005)

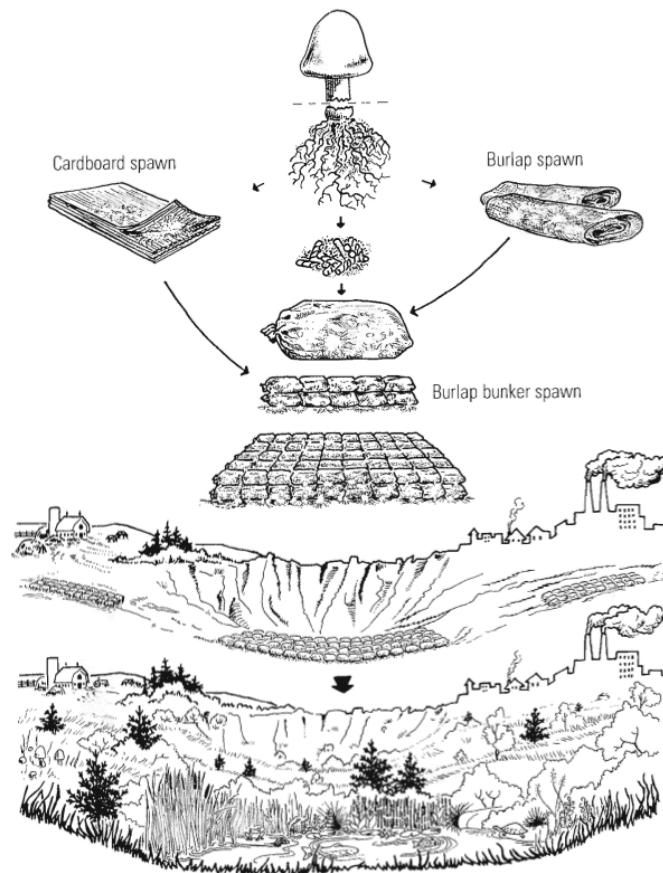


Figura 23. Panorama general del uso de sacos de micelio para micorremediación.

Un método inteligente para el crecimiento del micelio es la inoculación a temperaturas frías, después de algunos meses la temperatura subirá, suponiendo que se haga esto a finales de invierno, la llegada de la primavera hará que los microbios que estaban en reposo por el frío empiecen a atacar y el micelio responda.

Es posible que una vez que se hicieron los sacos con micelio y crezca, se introduzca en la superficie otro tipo de hongos, algún específico para el tipo de contaminación que se está tratando de degradar, por lo que estarían trabajando en conjunto. (Stamets, 2005)

La metodología sería tener un área dónde se harían hoyos en el suelo contaminado, ese mismo suelo contaminado se utilizará para poner los burlaps y taparlos, ya que la meta es que ese suelo contaminado, vaya bajando su porcentaje de contaminación. Al hongo estar bajo el suelo, buscará su alimento bajo tierra y se irá expandiendo el micelio, por lo que no es necesario poner burlaps en toda el área sino que solamente en áreas específicas para su expansión, ya que en algún punto estas coincidirán y llenarán toda el área contaminada. Así como se muestra en la figura 23. Depende la distribución de estos del total del área. Según la SEMARNAT: En cuanto al área contaminada las gasolinas generan las mayores extensiones de contaminación por accidente. (SEMARNAT, 2010)

Es importante recalcar que se utilizará la metodología de la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación, para algunas técnicas de conocimiento del grado de contaminación del suelo, las cuales son para los hidrocarburos de fracción ligera, en el método analítico: La determinación cuantitativa se deberá realizar con un cromatógrafo de gases con columna capilar no polar y detector de ionización de flama o detector selectivo de masas en modo TIC. Como resultado se obtiene un perfil de picos cuya separación está en función de los pesos moleculares de los hidrocarburos presentes.

Otra manera es la medición de las características cualitativas del suelo, ya que se ha encontrado que la contaminación con hidrocarburos ocasionó un aumento de la saturación con aluminio y disminución del pH, conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico del suelo, modificación de la comunidad bacteriana y reducción de su diversidad por selectividad de grupos funcionales.

Por ejemplo cambios en el pH, puede alterar a los hongos, bacterias, la comunidad estructurada y las actividades enzimáticas. De la misma manera la temperatura puede influenciar en la biorremediación de suelo contaminado, afectando la química de los contaminantes y la biodiversidad fúngica. (QIANWEI, et al., 2020)

Por lo que se confirmó con diferentes proyectos que la contaminación con hidrocarburos afecta la estructura funcional de la comunidad, pero aunque ésta no se restituye a su condición original, el funcionamiento del ecosistema no es afectado a largo plazo, ya que los procesos continúan ocurriendo. (Zamora, et al, 2012)

## Conclusión

En esta investigación se trabajaron con dos tipos diferentes de hongos. El hongo *Pleurotus Djamor* se utilizó como una medida para comparar el porcentaje degradador de *Trametes Versicolor*. Por lo que el objetivo general de determinar y evaluar el potencial degradador por IR del último hongo mencionado, se cumplió. El micelio de cada uno a de las especies es diferente, en crecimiento y en pigmentación. Los resultados al evaluar el micelio de *Trametes Versicolor* demostraron un 9.2171% de degradación final, mientras que del primer ejemplar se obtuvo un porcentaje de 7.1969%, esto al cabo de 4 días. Por lo tanto se cumplieron los objetivos particulares, el *Trametes Versicolor* superó degradando a *Pleurotus Djamor* con un porcentaje de 2.0202%.

*Trametes Versicolor*, tiene una buena capacidad de degradación, se podría atribuir esto también a su morfología, ya que se demostró en las imágenes de microscopía de barrido que su micelio no se ve de gran manera afectado, dicho esto, es mejor degradador que *Pleurotus Djamor*.

La propuesta de biorremediación se creó, pensando en una forma de aplicar la investigación y los resultados obtenidos, con ella los resultados esperados se podrán observar en 3 meses, esperando que esta información se ocupe de la mejor manera.

### **Mejoras del proyecto**

En cada situación está la oportunidad de mejorar, teniendo esto en mente hay algunas mejoras que se podrían aplicar en este trabajo, una de ellas es la incertidumbre de la volatilidad, con la cual se podrían sellar los matraces de mejor manera hermética, incluso manipular los matraces a una temperatura baja sin afectar a los micelios, en la cual la gasolina no se volatilice tan rápido.

Una opción para obtener mejores resultados de la degradación de la gasolina sería ocupar algún cromatógrafo de gases, ya que la cromatografía de gases (GC) es una técnica analítica común que se utiliza para separar y analizar compuestos volátiles y semivolátiles de una mezcla, técnica analítica popular al combinar un potencial de resolución excepcional con la velocidad y la sensibilidad. (Cromatografía De Gases (GC), n.d.)

Con los micelios de los hongos se podrían emplear consorcios con bacterias para la generación de menos residuos y para que al suelo se le hagan más fácil asimilarlos.

## Referencias

- ¿Cómo se obtiene la gasolina? (2022, agosto 18). REPSOL. <https://www.repsol.es/autonomos-y-empresas/faqs/carburantes/como-se-obtiene-la-gasolina/>
- (2018). Inecol.mx. Recuperado el 22 de septiembre de 2023, de [https://www.inecol.mx/inecol/images/pdf/Folleto suelo petroleo VerFinal.pdf](https://www.inecol.mx/inecol/images/pdf/Folleto_suelo_petroleo_VerFinal.pdf)
- (S/f-a). 210.233. Recuperado el 8 de octubre de 2023, de [http://104.209.210.233/gobmx/repositorio/FRACCION\\_I/NMX145SCFISUELOSFACCIONMEDIA.pdf](http://104.209.210.233/gobmx/repositorio/FRACCION_I/NMX145SCFISUELOSFACCIONMEDIA.pdf)
- (S/f-b). Repositorioinstitucional.mx. Recuperado el 8 de octubre de 2023, de <https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/280/1/CABRERA-RUIZ-R10.pdf>
- (S/f-c). Utm.mx. Recuperado el 8 de octubre de 2023, de [http://jupiter.utm.mx/~tesis\\_dig/12566.pdf](http://jupiter.utm.mx/~tesis_dig/12566.pdf)
- (S/f-d). Org.mx. Recuperado el 8 de octubre de 2023, de <https://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v28n2/v28n2a7.pdf>
- (S/f-e). Recuperado el 8 de octubre de 2023, de [http://file:///Users/ivonnejissethernandezgalicia/Downloads/Pleurotus djamar un hongo con potencial aplicacion.pdf](http://file:///Users/ivonnejissethernandezgalicia/Downloads/Pleurotus_djamar_un_hongo_con_potencial_aplicacion.pdf)
- (S/f). Gob.mx. Recuperado el 12 de septiembre de 2023, de <https://www.sedema.cdmx.gob.mx/storage/app/uploads/public/5a6/90c/eea/5a690ceaa7509761801425.pdf>
- (S/f). Perkinelmer.com. Recuperado el 31 de enero de 2024, de [https://resources.perkinelmer.com/corporate/content/relatedmaterials/brochures/bro\\_spectrum400intl.pdf](https://resources.perkinelmer.com/corporate/content/relatedmaterials/brochures/bro_spectrum400intl.pdf)
- (S/f). Unam.mx. Recuperado el 6 de julio de 2023, de [https://www.dgdc.unam.mx/assets/cienciaboletocb\\_11.pdf](https://www.dgdc.unam.mx/assets/cienciaboletocb_11.pdf)

- Altamirano, E., Fernández, G. (2014). *Prácticas apropiadas para disminuir los riesgos ambientales por el manejo de gasolina en estaciones de servicio*. Unam.mx. Recuperado el 22 de abril de 2024, de <https://www.cenapred.unam.mx/es/Publicaciones/archivos/21-INFORMETCNICOPRCTICASAPROPIADASPARADISMINUIRLOSRIESGOSAMBIENTALESPORELMANEJODELASGASOLINASENESTACIONESDESERVICIO.PDF>
- Alvaro, C. E. S., Arocena, L. A., Martínez, M. Á., & Nudelman, N. S. (2017). BIODEGRADACIÓN AEROBIA DE FRACCIONES DE HIDROCARBUROS PROVENIENTES DE LA ACTIVIDAD PETROLERA EN UN SUELO DE LA REGIÓN PATAGONIA NORTE, ARGENTINA. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 33(2), 247–257. <https://doi.org/10.20937/rica.2017.33.02.06>
- Amaya, S. (2021, octubre 4). *Estos fueron los peores derrames de petróleo de la historia*. CNN. <https://cnnespanol.cnn.com/2021/10/04/lpeores-derrames-petroleo-trax/>
- Anaya, P., Regalado González, D. B., Rodríguez Cabrera, C., & A., N. (s/f). “PURIFICACIÓN DE UNA PEROXIDASA RECOMBINANTE DE NABO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD”. Uaq.mx. Recuperado el 8 de octubre de 2023, de <https://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2010/12%20Verano%20Ciencia%20Region%20Centro/UAQ%20Perez%20Anaya.pdf>
- Area, D. M. C. (s/f). *FIBRAS. ESTRUCTURA Y TOPOQUÍMICA*. Gov.ar. Recuperado el 31 de enero de 2024, de [https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/107046/CONICET\\_Digital\\_Nro.b58384a1-3eca-4c14-b0ef-62e8b64b8845\\_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/107046/CONICET_Digital_Nro.b58384a1-3eca-4c14-b0ef-62e8b64b8845_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- Baird, C. (2001). *Química ambiental*. Reverte Ediciones.
- Biomar, M. T. (2019, abril 15). *MICORREMEDIACIÓN. ¿PUEDEN LOS HONGOS AYUDAR A SALVAR EL MUNDO?* Biomar :: Microbial

Technologies. <https://biomarmt.com/micorremediacion-pueden-los-hongos-ayudar-a-salvar-el-mundo/>

- Bordino, J. (2021, septiembre 27). Biorremediación: qué es, tipos y ejemplos. *ecologiaverde.com*.  
<https://www.ecologiaverde.com/biorremediacion-que-es-tipos-y-ejemplos-3566.html>
- 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. <https://doi.org/10.22231/asyd.v11i4.16>
- Centro Nacional de Prevención de Desastres. (2022, enero 18). *A tres años de la explosión en Tlahuelilpan, Hidalgo*. gob.mx. Recuperado el 20 de septiembre de 2023, de <http://www.gob.mx/cenapred/articulos/a-tres-anos-de-la-explosion-en-tlahuelilpan-hidalgo>
- Centro Nacional de Prevención de Desastres. (22 de abril de 2020). *Efeméride: A 28 años de las explosiones en Guadalajara*. gob.mx. Recuperado el 20 de septiembre de 2023, de <http://www.gob.mx/cenapred/articulos/efemeride-a-28-anos-de-las-explosiones-en-guadalajara>
- Chavarría Jerónimo. Iberopuebla.mx. Recuperado el 19 de septiembre de 2023, de <https://repositorio.iberopuebla.mx/bitstream/handle/20.500.11777/4385/Jerónimo>
- Chen, S., & Zhong, M. (s/f). *Bioremediation of petroleum-contaminated soil*. Intechopen.com. Recuperado el 6 de julio de 2023, de <https://cdn.intechopen.com/pdfs/70249.pdf>
- Cordova, D. G., Flores, E. N., García, R. R., & Salvador, J. C. R. (s/f). *Suelos contaminados con hidrocarburos, riesgo para la salud humana*. Ciencia UNAM. Recuperado el 6 de julio de 2023, de

[https://ciencia.unam.mx/leer/107/Suelos\\_contaminados\\_con\\_hidrocarburos\\_riesgo\\_para\\_la\\_salud\\_humana](https://ciencia.unam.mx/leer/107/Suelos_contaminados_con_hidrocarburos_riesgo_para_la_salud_humana)

- *Cromatografía de gases (GC).* (n.d.).  
<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/applications/analytical-chemistry/gas-chromatography>
- De cada, E. C. (s/f). El petróleo crudo es separado en los distintos componentes que lo forman mediante un proceso físico que se denomina destilación. Edistribucion.es. Recuperado el 19 de septiembre de 2023, de [https://www.edistribucion.es/anayaeducacion/8450043/recursos/u\\_12/ep5/p\\_dest\\_fraccionada\\_petroleo.pdf](https://www.edistribucion.es/anayaeducacion/8450043/recursos/u_12/ep5/p_dest_fraccionada_petroleo.pdf)
- De enero del, 18. (2020, enero 18). *Características y consecuencias de los accidentes ocurridos durante el manejo de combustibles.* Gob.mx. Recuperado el 21 de septiembre de 2023, de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/539263/2\\_Consecuencias\\_accidentes.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/539263/2_Consecuencias_accidentes.pdf)
- De, F., & Biológicas, C. (s/f). UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS. Uaem.mx. Recuperado el 8 de octubre de 2023, de <http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/3367/CAGLRS06T.pdf?sequence=1>
- De, S. A. (s/f). En la elaboración de la presente norma mexicana participaron las siguientes empresas e instituciones. 210.233. Recuperado el 8 de octubre de 2023, de [http://104.209.210.233/gobmx/repositorio/FRACCION\\_I/NMX134SCFI2006I DROCARBUROSPESADO.pdf](http://104.209.210.233/gobmx/repositorio/FRACCION_I/NMX134SCFI2006I DROCARBUROSPESADO.pdf)
- del Medio Ambiente, S. (s/f). *Listado del Padrón de Prestadores de Servicios Ambientales.* Secretaría del Medio Ambiente. Recuperado el 24 de julio de 2023, de <https://www.sedema.cdmx.gob.mx/impacto-ambiental/impacto-ambientallistado-del-padron-de-prestadores-de-servicios-ambientales>
- Derrames de petróleo en el mar. (2022, septiembre 25). SIMAR. <https://simar.conabio.gob.mx/petroleo/>

- *Descontaminación de suelos.* (s/f). Litoclean. Recuperado el 6 de julio de 2023, de <https://www.litoclean.es/descontaminacion-de-suelos>
- *DOF - Diario Oficial de la Federación.* ( 20/08/2002). Gob.mx. Recuperado el 21 de septiembre de 2023, de [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=722091&fecha=20/08/2002#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=722091&fecha=20/08/2002#gsc.tab=0)
- *DOF - Diario Oficial de la Federación.* (s/f). Gob.mx. Recuperado el 8 de octubre de 2023, de [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5376038&fecha=16/12/2014](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5376038&fecha=16/12/2014)
- *Ductos, ¿por dónde circulan los hidrocarburos en México?* (2017, julio 26). CartoCrítica - Investigación, mapas y datos para la sociedad civil. <https://cartocritica.org.mx/2017/ductos/>
- Elizabeth, H. E. L. (2018, July 1). *Evaluación de la biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando Aspergillus niger, Pleurotus ostreatus y Pseudomonas aeruginosa.* <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15681>
- Estrada, G. (2019, March). *Micología general.* Retrieved April 3, 2024, from [https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://repositorio.ucm.edu.co/jspui/bitstream/10839/2654/1/Micologia\\_general.pdf&ved=2ahUKEwjTsa7FuKeFAxWXKEQIHS69BFAQFnoECB8QAQ&usq=AOvVaw3f3nl1WOyyoGSb9Lsm87tC](https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://repositorio.ucm.edu.co/jspui/bitstream/10839/2654/1/Micologia_general.pdf&ved=2ahUKEwjTsa7FuKeFAxWXKEQIHS69BFAQFnoECB8QAQ&usq=AOvVaw3f3nl1WOyyoGSb9Lsm87tC)
- *Estudio comparativo entre los combustibles tradicionales y las nuevas tecnologías energéticas para la propulsión de vehículos destinados al transporte.* (s/f). Upc.edu. Recuperado el 1 de febrero de 2024, de <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/3686/343051.pdf?sequence=1>
- *FTIR (Fourier Transform Infrared) spectroscopy.* (n.d.). <https://www.eesemi.com/FTIR.htm>

- *FTIR FAQs | Thermo Fisher Scientific - MX.* (n.d.). <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-faqs.html>
- Gabriel, I., De, Q., Torre, L., Fernández Bremauntz, A., Hugo, V., Figueroa, P., Jorge, M., Castillejos, M., Matilde, D., Rubio, E., Jorge, I., Rentería, S., Jesús, B., Franco, C., José, I., & Ávila, Z. (s/f). Epa.gov. Recuperado el 31 de enero de 2024, de <https://www3.epa.gov/ttnecatc1/dir1/curso.pdf>
- Gestión, R. (2022, enero 22). *Estos son los mayores derrames de petróleo en el mundo.* Gestión. <https://gestion.pe/mundo/golfo-de-mexico-golfo-persico-estos-son-los-mayores-derrames-de-petroleo-en-el-mundo-repsol-nndc-noticia/>
- Guerrero, D. G., Martínez, V. E., & De La Torre Almaráz, R. (2011). *CULTIVATION OF TRAMETES VERSICOLOR IN MEXICO.* Redalyc.org. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=68519085003>
- Hernández, D. M. M. (2002, agosto). Cambios en la actividad enzimática de *Pleurotus* spp. cultivado en pulpa de café en confrontación con *Trichoderma* spp. Wwww.uv.mx. <https://www.uv.mx/iif/files/2014/10/tesis-dulce-murrieta-mc.pdf>
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (1989). *GASOLINE.* International Agency for Research on Cancer.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (s/f). *Forestal.* Org.mx. Recuperado el 22 de septiembre de 2023, de <https://www.inegi.org.mx/temas/forestal/>
- Kapahi, M., & Sachdeva, S. (2017). Mycoremediation potential of *Pleurotus* species for heavy metals: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0162-8>
- Leandro, V. (s/f). *Enzimas ligninolíticas en Fomes* Enzimas ligninolíticas en *Fomes sclerodermeussclerodermeus.* Uba.ar. Recuperado el 8 de octubre de 2023, de

[https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n3584\\_Papinutti.pdf](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n3584_Papinutti.pdf)

- Li, Q., Liu, J., & Gadd, G. M. (2020). Fungal bioremediation of soil co-contaminated with petroleum hydrocarbons and toxic metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(21), 8999–9008. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10854-y>
- Li, X., Li, P., Lin, X., Zhang, C., Li, Q., & Gong, Z. (2008). Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. *Journal of Hazardous Materials (Print)*, 150(1), 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.04.040>
- Linden, O., Jerneloiev, A. and Egerup, J. (2004) The Environmental Impacts of the Gulf War 1991. IIASA Interim Report. IR04-019 Copyright © 2004 by the author(s). <http://pure.iiasa.ac.at/7427/>
- *Mexico - oil and gas*. (s/f). International Trade Administration | Trade.gov. Recuperado el 6 de julio de 2023, de <https://www.trade.gov/country-commercial-guides/mexico-oil-and-gas>
- Muzaffar, M., Rasool, F., Tariq, A., Shikari, A. B., Mir, S. A., Lone, G. M., Sofi, A. B., Shikari, S. A., & Mir, G. M. (s/f). *Morphological characterization of different Pleurotus species under Kashmir conditions*. Thepharmajournal.com. Recuperado el 15 de agosto de 2023, de <https://www.thepharmajournal.com/archives/2023/vol12issue7/PartAQ/12-8-81-716.pdf>
- Nmx-Aa-, Y. (s/f). Jueves 17 de julio de 2014 DIARIO OFICIAL (Primera Sección) 13 DECLARATORIA de vigencia de las normas mexicanas NMXAA105SCFI2014, NMXAA141SCFI2014. Itesm.mx. Recuperado el 8 de octubre de 2023, de <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/aa/nmx-aa-105-scfi-2014.pdf>
- NORMA MEXICANA NMX-AA-146-SCFI-2008 SUELOS - HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP) POR CROMATOGRFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG/EM)

O CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECTORES DE FLUORESCENCIA Y ULTRAVIOLETA VISIBLE (UV-VIS) -MÉTODO DE PRUEBA. (s/f). Org.mx. Recuperado el 8 de octubre de 2023, de

[https://www.cmic.org.mx/comisiones/Sectoriales/medioambiente/Varios/Leyes\\_y\\_Normas\\_SEMARNAT/NMX/Contaminación%20del%20Suelo/1.2009.pdf](https://www.cmic.org.mx/comisiones/Sectoriales/medioambiente/Varios/Leyes_y_Normas_SEMARNAT/NMX/Contaminación%20del%20Suelo/1.2009.pdf)

- *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-143-SEMARNAT-2003, QUE ESTABLECE LAS ESPECIFICACIONES AMBIENTALES PARA EL MANEJO DE AGUA CONGÉNITA ASOCIADA A HIDROCARBUROS.* (3 de marzo de 2005). Gob.mx. Recuperado el 22 de septiembre de 2023, de <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Federal/PE/APF/APC/SEMARNAT/Normas/Oficiales/03032005.pdf>
- Nueva Ley Publicada en el Diario Oficial, de la F. el. (11 de agosto de 2014). *LEY DE LA AGENCIA NACIONAL DE SEGURIDAD INDUSTRIAL Y DE PROTECCIÓN AL MEDIO AMBIENTE DEL SECTOR HIDROCARBUROS.* Gob.mx. Recuperado el 22 de septiembre de 2023, de <https://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LANSI.pdf>
- Okerentugba, P.O. and Ezeronye, O.U. (2003) *Petroleum Degrading Potentials of Single and Mixed Microbial Cultures Isolated from Rivers and Refinery Effluent in Nigeria.* *African Journal of Biotechnology*, 2, 288-292. - *References - Scientific Research Publishing.* (s/f). Scirp.org. Recuperado el 24 de agosto de 2023, de [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1692805](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1692805)
- Ortega, Marcelo. (2012). *MODELIZACIÓN DE UN PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON GASOIL.* Upm.es. Recuperado el 21 de abril de 2024, de [https://oa.upm.es/14727/1/MARCELO\\_FABIAN\\_ORTEGA\\_ROMERO.pdf](https://oa.upm.es/14727/1/MARCELO_FABIAN_ORTEGA_ROMERO.pdf)
- Pacheco, L. Á. J. (2013, noviembre). *Estudio Químico de una Cepa Comercial del Hongo Pleurotus sp.* Cdigital.uv.mx.

<https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/37318/juarezpachecoluisangel.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Pacheco, S. K. C., Nava Galicia, S. B., Díaz Godinez, R., & Bibbins, M. D. (s/f). Expression profile of versatile peroxidase (VP) enzyme during grown of *Pleurotus ostreatus* in the presence of dyes. Buap.mx. Recuperado el 8 de octubre de 2023, de [http://cmas.siu.buap.mx/portal\\_pprd/work/sites/rlac/resources/LocalContent/44/2/6\(13\)-4.pdf](http://cmas.siu.buap.mx/portal_pprd/work/sites/rlac/resources/LocalContent/44/2/6(13)-4.pdf)
- Papinutti, Víctor Leandro. (2003). Enzimas ligninolíticas en Fomes sclerodermeus. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3584\\_Papinutti.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3584_Papinutti.pdf)
- *Pemex registra 176 derrames y fugas de alto impacto ambiental de 2018 a 2021.* (s/f). Causa Natura. Recuperado el 6 de julio de 2023, de <https://causanatura.org/periodismo-cn/pemex-registra-176-derrames-y-fugas-de-alto-impacto-ambiental-de-2018-a-2021>
- Plan, N. (s/f). *Plan Nacional de Contingencia para Derrames de Hidrocarburos y Sustancias Nocivas Potencialmente Peligrosas en las Zonas Marinas Mexicanas.* Gob.mx. Recuperado el 6 de julio de 2023, de <http://www.semarnat.gob.mx/Plan%20Nacional%20de%20Contingencia%20V2016.pdf>
- Premium y Pemex Magna, G. P. (s/f). *Hoja de Datos de Seguridad.* Distribuidorariopanuco.com. Recuperado el 6 de julio de 2023, de <https://www.distribuidorariopanuco.com/pdfs/magna.pdf>
- Prenafeta-Boldú, F. X., Summerbell, R. C., & De Hoog, G. S. (2006). Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? *FEMS Microbiology Reviews*, 30(1), 109–130. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00007.x>
- Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. (13 de septiembre de 2023). *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-149-SEMARNAT-2006.* gob.mx.

Recuperado el 22 de septiembre de 2023, de <http://www.gob.mx/profepa/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-149-semarnat-2006>

- *Producing spawn from stem butts.* (s/f). Waldeneffect.org. Recuperado el 31 de enero de 2024, de <http://www.waldeneffect.org/20090314mushroom2/>
- Programa Nacional de Remediación de sitios contaminados 2021-2024. (s/f). Gob.mx. Recuperado el 6 de julio de 2023, de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/681183/PNRSC-2021-2024.pdf>
- Quintero, J. C., Feijoo, G., & Lema, J. M. (s/f). PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS CON HONGOS BASIDIOMICETOS CULTIVADOS SOBRE MATERIALES LIGNOCELULÓSICOS PRODUCTION OF LIGNINOLYTIC ENZYMES FROM BASIDIOMYCETE FUNGI ON LIGNOCELLULOSIC MATERIALS. Org.co. Recuperado el 8 de octubre de 2023, de <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v13n2/v13n2a08.pdf>
- RAMÍREZ Ramírez, Joaquín, Marcela Ayala Aceves "Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan?" Revista Digital Universitaria [en línea]. 1 de noviembre de 2014, Vol. 15, No.11 [Consultada:]. Disponible en Internet: <<http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/index.html>> ISSN: 1607-6079.
- Sánchez, C. O. L. (2022). TIERRA DE HONGOS. Gob.mx. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/727530/Libro-Mexico-tierra-de-hongos-INPI.pdf>
- SEMARNAT. (2010, November). *Programa Nacional de Remediación de Sitios Contaminados*. Retrieved January 8, 2024, from <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/Libros2011/CD000953.pdf>
- SEMARNAT. (s/f). Gob.mx:8443. Recuperado el 6 de julio de 2023, de [https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/compendio\\_2018/dgeiawf.semarnat.gob.mx\\_8080/ibi\\_apps/WFServletfe05.html](https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/compendio_2018/dgeiawf.semarnat.gob.mx_8080/ibi_apps/WFServletfe05.html)

- SEMARNAT.(2014).  
[https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/compendio\\_2014/dgeiawf.semarnat.gob.mx\\_8080/ibi\\_apps/WFServletbe16.html](https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/compendio_2014/dgeiawf.semarnat.gob.mx_8080/ibi_apps/WFServletbe16.html)
- Sindhu, S. (2022). *Cropping duration and non-rhizomorphic mycelial phenotype of Pleurotus djamor woody1 co-segregate in the hybrid progenies.*  
<https://www.redalyc.org/journal/5770/577073671025/html/>
- Sligh, T. S., Jr. (1926). VOLATILITY TESTS FOR AUTOMOBILE FUELS. *SAE Transactions*, 21, 182–217. <https://www.jstor.org/stable/44729941>
- Solís, A. (2021, julio 5). *Fugas y derrames de Pemex aumentaron 16% con AMLO.* Forbes México. <https://www.forbes.com.mx/negocios-fugas-derrames-pemex-aumentaron-amlo/>
- Stamets, P. (2010, junio 3). The petroleum problem. *Fungi Perfecti.*  
<https://fungi.com/blogs/articles/the-petroleum-problem>
- Stamets, P. (2011). *Mycelium Running.* Ten Speed Press.
- Stamets, P. (2018, julio 16). The Petroleum Problem. *Fungi Perfecti.*  
<https://fungi.com/blogs/articles/the-petroleum-problem>
- Stamets, P., & Chilton, J. (1985). *The mushroom cultivator: A practical guide for growing mushrooms at home.* Richmond Publishing.
- *ToxFAQs™: Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)[Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)].* (2021, enero 26). Cdc.gov.  
[https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts69.html](https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts69.html)
- Universidad de Quintana Roo. (s/f). Uqroo.mx. Recuperado el 19 de septiembre de 2023, de <https://www.uqroo.mx/transparencia/fondos-extraordinarios-2019/PADES>
- Varón, D. L. P. (s/f). *BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS A ESCALA DE LABORATORIO.* Edu.co. Recuperado el 31 de enero de 2024, de <https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/15451/Proyecto%2>

0de%20investigación%20Biorremediación%20de%20suelos%20contamina  
dos%20por%20hidrocarburos%20mediante%20la%20ut.pdf?sequence=1

- *Vista de CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL in vitro DE Pleurotus albidus PEGLER 1983 Y Pleurotus djamor BOEDIJIN 1959, EN TABASCO, MÉXICO. (n.d.).*  
<https://revistas.ujat.mx/index.php/kuxulkab/article/view/348/271>
- *Vista de Concepto y estrategias de biorremediación. (s/f). Edu.co.*  
Recuperado el 6 de julio de 2023, de  
<https://revistas.uan.edu.co/index.php/ingeuan/article/view/208/168>
- Zamora, A. C. (2012). *Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana.*  
Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5427072>

## Diagrama de actividades

Actividades	Meses (Semanas)											
	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	
Obtención del material biológico												
Selección de las cepas												
Cultivo del micelio												
Diseño de experimentos												
Lectura de IR												
Presentación de resultados												
Titulación												