BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
COLEGIO DE INGENIERÍA AMBIENTAL

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE SUELOS
"DR. JESÚS CABALLERO MELLADO"
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS-ICUAP

EVALUACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL PARA DEGRADAR HIDROCARBUROS LIGEROS Y COMPUESTOS AROMÁTICOS (BTX)

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA:

ALEXIA MARÍA CORONA GALICIA

DIRECTOR DE TESIS:

M.C. REFUGIO ARMANDO TAPIA HERNÁNDEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS:

cM.C. TERESITA JIMÉNEZ SALGADO

Puebla, Pue. Junio 2018

Ingeniería AMBIENTAL

BUAP

Oficio No. FIQ/AC/437/2018
Asunto: Registro de Tema de Tesis

C. ALEXIA MARÍA CORONA GALICIA
PASANTE DE LA LICENCIATURA
EN INGENIERÍA AMBIENTAL
P R E S E N T E:

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería Ambiental cuyo título es el siguiente:

"EVALUACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL PARA DEGRADAR HIDROCARBUROS LIGEROS Y COMPUESTOS AROMÁTICOS (BTX)"

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	**ANTECEDENTES**
CAPÍTULO 2	**METODOLOGÍA**
CAPÍTULO 3	**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA

Director de Tesis: M.C. Refugio Armando Tapia Hernández
Co-Directora de tesis: M.C. Teresita Jiménez Salgado

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **ÚNICAMENTE POR UN AÑO.**

A T E N T A M E N T E
"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"
H. Puebla de Z., a 9 de mayo de 2018

M.I.C. MA. GPE. TITA VÁZQUEZ E. DE LOS MONTEROS
SECRETARIA ACADÉMICA

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
SECRETARÍA ACADÉMICA
1578

C.c.p. Director de Tesis: M.C. Refugio Armando Tapia Hernández
C.c.p. Co-Directora de Tesis: M.C. Teresita Jiménez Salgado
C.c.p. Minutario Facultad de Ingeniería Química

Facultad de Ingeniería Química
Av. San Claudio s/N, Col. San Manuel, Ciudad Universitaria, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00
Ext. 7250 y 7251

CTAI01

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA

ASUNTO:
AUTORIZACIÓN
IMPRESIÓN DE TESIS

Mtro. Omar Gerardo Aguirre Ibarra
Director de la Administración Escolar
De la BUAP.
Presente

Por este conducto me permito presentar a Ud. al C. pasante de la carrera de Ingeniería Ambiental

Alexia María Corona Galicia

Quién presenta como tema de tesis:

Evaluación de cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal para degradar hidrocarburos ligeros y compuestos aromáticos (BTX)

La cual ha sido debidamente revisada y se autoriza para su impresión correspondiente.

Sin otro particular y para los fines que se estimen conducentes reitero mi distinción.

ATENTAMENTE
"Pensar Bien, para Vivir Mejor"
H. Puebla de Z., a .22. de Junio de 2018

Director de Tesis
MC. Refugio Armando Tapia Hernández

Índices

Índice de contenido

Introducción 1

Planteamiento del problema 3

Justificación 4

Objetivos 5

Objetivo General 5

Objetivos Específicos 5

Hipótesis 5

Capítulo I Antecedentes 6

1.1. Suelo 6

1.2. Hidrocarburos de Petróleo 6

1.3. Contaminación del suelo 7

1.3.1. Suelos agrícolas en México 7

1.3.2. Suelos contaminados por hidrocarburos en Puebla 8

1.4. Fijación de Nitrógeno 9

1.5. Bacterias asociadas a plantas 10

1.5.1. *Azospirillum* 11

1.6. Biodegradación 13

1.6.1. Biodegradación de hidrocarburos ligeros 14

1.6.2. Biorremediación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal 15

1.7. Trabajos predecesores 15

Capítulo II Metodología 17

2.1 Material biológico 17

2.2 Preparación de precultivos y cuantificación de población bacteriana 17
2.3 Determinación de la actividad reductora de acetileno (ARA) 18
2.4 Crecimiento en presencia de Hidrocarburos: Gasolina 18
2.5 Crecimiento de las cepas en Hidrocarburos aromáticos 19
2.5.1 Concentración máxima tolerable de crecimiento 19
2.5.2 Preparación de cepas en un medio enriquecido 19
2.6 Resistencia a compuestos aromáticos: Benceno Tolueno y Xilenos (BTX) 19
2.7 Degradación de compuestos aromáticos 20
2.8 Actividad Reductora de Acetileno en presencia de diésel..... 20
Capítulo III Resultados y Discusión..... 22
3.1 Población bacteriana..... 22
3.2 Actividad reductora de acetileno 23
3.3 Crecimiento de las cepas bacterianas en hidrocarburos..... 25
3.4 Ensayos con BTX 29
3.5 Actividad reductora de acetileno más diésel 35
Conclusiones..... 37
Referencias..... 38
Anexo: Medios de Cultivo 49

Índice de figuras

Figura 1 Reacciones durante el ciclo del nitrógeno..... 9
Figura 2 Rutas metabólicas más utilizadas para la degradación de BTEX 14

Índice de tablas

Tabla 1 Especies del género Azospirillum. 12
Tabla 2 Origen y morfología colonial en medio de Rojo congo de las Cepas bacterianas utilizadas. 17
Tabla 3 Densidades Ópticas y poblaciones bacterianas 22
Tabla 4 Cantidad de acetileno residual y etileno producido por las cepas. 24
Tabla 5 Poblaciones de bacterianas en caldo NFb con Gasolina 25
Tabla 6 Crecimiento de las cepas con Benceno 27
Tabla 7 Poblaciones de las cepas a diferentes concentraciones de fuente de carbono primaria y secundaria 29
Tabla 8 Poblaciones de las cepas a diferentes concentraciones de Benceno 30
Tabla 9 Poblaciones de las cepas a diferentes concentraciones de Tolueno 31
Tabla 10 Poblaciones de las cepas a diferentes concentraciones de Mezcla de Xilenos 32
Tabla 11 Poblaciones de las cepas en mezcla de Benceno, Tolueno y Xileno (1:1:1) 33
Tabla 12 Porcentaje de degradación de hidrocarburos 34
Tabla 13 Etileno producido por la actividad de la nitrogenasa en presencia de diésel 35

Abreviaturas

°C	Grados Centígrados
µL	Microlitros
AIA	Ácido Indol Acético
ARA	Actividad Reductora de Acetileno
BPCV	Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal
BTEX	Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xilenos
BTX	Benceno, Tolueno, Xileno
CICM	Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
Co	Cobalto
Cu	Cobre
DO	Densidad Óptica
g	Gramo(s)
h	Horas

ICUAP	Instituto de Ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla
INAFED	Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
M	Moles
NFb	Nitrogen-free medium (medio libre de nitrógeno)
nm	Nanómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
PEMEX	Petróleos Mexicano
PIB	Producto Interno Bruto
ppm	Partes Por Millón
PROFEPA	Procuraduría Federal de Protección al Ambiente
RC	Rojo congo
RPM	Revoluciones Por Minuto
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SSA	Secretaría de Salud
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV-VIS	Ultravioleta-Visible

Introducción

Al entorno físico y biológico en el que habitamos se le conoce como ambiente, en éste, coexisten seres que viven en equilibro, pero cuando sufre cualquier alteración, se le conoce como contaminación. Existen diversos elementos que causan el deterioro del ambiente: el crecimiento demográfico y por ende el desarrollo de grandes urbes, la sobreexplotación de los recursos naturales y el crecimiento industrial por mencionar algunos. En palabras simples, al cambio físico, químico o biológico del aire, agua o suelo que afecta a humanos u otras especies de seres vivos se le define como contaminación ambiental (Gupta, 2006).

En México, una de las industrias más importantes es la petrolera ya que la comercialización de crudo tiene un valor económico muy importante en las finanzas del país, pero tanto, la extracción del petróleo como el transporte de los productos refinados de éste causan el deterioro de nuestro medio. El envío de los derivados de petróleo se realiza por transporte en carretera (autotanques) y por debajo del suelo, a través de una red de ductos con una longitud superior a los 17,000 kilómetros (conformados por 48 oleoductos, 78 gasoductos, 11 gasolinoductos y 4 oleogasoductos) siendo crudo, diésel, gas, gas licuado de petróleo, gasolinas, gasóleo, gas natural, condensados o naftas algunos de éstos (PEMEX, 2017).

En materia ambiental, es de suma importancia el tema de los derrames de hidrocarburos cualquiera que sea la causa, ya que de las principales consecuencias de éstos es la contaminación que genera, agravando aún más el problema si éstos suceden sobre suelos agrícolas, haciendo que los terrenos afectados ya no sean adecuados para la siembra de cultivos, así como el agua contaminada tampoco debería de utilizarse para riego.

En el suelo existe una gran cantidad de microorganismos, capaces de realizar procesos biológicos donde pueden utilizar o degradar diferentes compuestos, esto gracias a la diversidad metabólica que poseen. Al realizar un análisis microbiológico del suelo podemos encontrar poblaciones bacterianas entre 10^7 y 10^{10} UFC/g de suelo, todo dependiendo de la vocación de éste (Torsvik, Ovreas, & Thingstad, 2002). Por tanto, a pesar del impacto negativo de los hidrocarburos en el suelo, se

puede suponer que existen bacterias en esos sitios, las cuales pueden resistir o degradar los hidrocarburos a través de su cadena trófica.

Leahy & Colwell (1990), mencionan que existen diferentes géneros de bacterias capaces de degradar hidrocarburos en suelo como *Achromobacter*, *Acinetobacter, Bacillus,* y *Pseudomonas*. Poco se sabe de la capacidad degradadora de hidrocarburos por bacterias del género *Azospirillum,* solo se ha descrito dos especies aisladas de sitios contaminados: *A. rugosum* y *A. picis* (Young, y otros, 2008; Lin, y otros, 2009); además, este género bacteriano se encuentra más asociado a plantas por su capacidad de producir fitohormonas, fijar nitrógeno y producir sideróforos (Bashan, Holguin, & de-Bashan, 2004).

Por lo tanto, aislar cepas de sitios contaminados con hidrocarburos que además de degradar y resistir el contaminante, tengan la capacidad para fijar nitrógeno o solubilizar elementos, así como producir sustancias que ayuden a otros organismos a disminuir los efectos de los contaminantes, es un camino para la restauración de los suelos agrícolas.

Planteamiento del problema

El petróleo en México es extraído en su mayoría de yacimientos marinos, posteriormente es refinado para la obtención de diferentes productos y finalmente es transportado para su comercialización y uso; durante estos procesos se pueden ocasionar derrames y con ello afectar al ambiente. Cuando los derrames ocurren en suelos, éstos comienzan a degenerarse, perdiendo nutrientes, la incapacidad de permear agua o aire y la limitación de llevar a cabo de manera normal sus ciclos geobiológicos algunas de las afectaciones que tiene el suelo.

Durante los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas, éstos se ven seriamente afectados, tanto por la disminución de la permeabilidad de agua como por el desequilibrio en los nutrientes que tiene el suelo. Uno de estos nutrientes es el nitrógeno; su relación con el suelo puede ser favorecida de manera antropogénica a través de fertilizantes o agroquímicos, pero si estos son usados de forma continua, podrían causar infertilidad en el suelo.

Finalmente, los daños ambientales que ocasionan los derrames de hidrocarburos se traducen en afectaciones económicas para el agricultor, ya que en la mayoría de los casos, los suelos se vuelven inutilizables por la baja fertilidad presentan. Para restaurar un suelo agrícola, pueden pasar muchos años y durante este tiempo los agricultores continuarían perdiendo sus cosechas.

Justificación

Existen técnicas físicas, químicas y biológicas que ayudan a la recuperación de sitios contaminados, pero antes de utilizar estas tecnologías se deben tener en cuenta ciertas consideraciones, como los costos y los subproductos que son liberados al ambiente después de su aplicación. Las técnicas biológicas no perjudican al ambiente, además de que los costos para su implementación son relativamente bajos. Estas técnicas también son conocidas como técnicas de biorremediación.

La Biorremediación ayuda a reducir el impacto negativo o el deterioro de un sitio contaminado, haciendo que éste se vea beneficiado por los metabolitos que producen diversos organismos. Las bacterias asociadas a plantas tienen la capacidad de producir sustancias o participar en ciclos biológicos, aportando nutrientes como nitrógeno y fósforo a plantas o al suelo. El utilizar estas bacterias en un proceso de fitorremediación, le brindará un mayor soporte a las plantas encargadas de la recuperación del sitio contaminado.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el crecimiento y la Actividad Reductora de Acetileno (ARA) a nueve cepas de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en diferentes concentraciones de hidrocarburos.

Objetivos Específicos

- Determinar la capacidad para fijar nitrógeno de las cepas bacterianas por el método de reducción de acetileno
- Determinar la resistencia inicial de las cepas a diferentes concentraciones de gasolina sin pre-adaptación
- Cuantificar el crecimiento de las cepas utilizando como fuente de carbono Gasolina, Benceno y Tolueno
- Evaluar la resistencia de las cepas a diferentes concentraciones de Benceno, Tolueno y mezcla de Xilenos (BTX)
- Evaluar la degradación de Benceno, Tolueno y mezcla de Xilenos
- Evaluar la fijación de nitrógeno a diferentes concentraciones de diésel.

Hipótesis

Las cepas bacterianas promotoras del crecimiento vegetal son capaces de crecer y fijar nitrógeno en presencia de hidrocarburos.

Capítulo I Antecedentes

1.1. Suelo

El suelo es la consecuencia de la transformación del material geológico de la tierra por cambios físicos, químicos y biológicos, por lo tanto, minerales, materia orgánica, aire y agua son los componentes del suelo. Los minerales se agrupan en partículas finas y gruesas, la materia orgánica del suelo son los residuos de plantas y animales hasta elementos descompuestos (humus). Este conjunto de elementos orgánicos y minerales constituyen una matriz sólida con poros variados, los cuales le dan cabida a aberturas por las cuales el aire y el agua se desplazan. El contenido de cada suelo, dado por la naturaleza de sus componentes tendrá características físicas, químicas y biológicas definidas (Casas Flores, 2011).

1.2. Hidrocarburos de Petróleo

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos formados por dos elementos: Hidrógeno y Carbono, dividiéndose en alifáticos y aromáticos (Morrison & Boyd, 2002). Los combustibles fósiles son básicamente hidrocarburos y también la mayor fuente de energía, pero su consumo ha provocado serios problemas ambientales (Olah, Molnár, & Prakash, 2018). Del petróleo, se pueden obtener diferentes productos entre los que se encuentran el Gas Licuado de Petróleo, el Nafta, Turbosina, Parafinas, Gasolina, etc. (Speight, 2014).

De acuerdo a la norma NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, que establece los *límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación*, define como fracción pesada la mezcla hidrocarburos que contengan entre veintiocho y cuarenta átomos de carbono (C_{28} a C_{40}), la fracción media son los que tienen entre diez y veintiocho átomos de carbono (C_{10} a C_{28}) y la fracción ligera entre cinco y diez átomos de carbono (C_5 a C_{10}).

Dependiendo de la fracción, se pueden saber las posibles consecuencias para el ambiente, por ejemplo, cuando se trata de hidrocarburos fracción pesada (crudo) o media (diésel), muchos de los elementos necesarios para la estabilidad del

ecosistema disminuyen en su proporción, causando que mucha de la microbiota nativa perezca y poca vegetación sobreviva después del incidente. Para el caso de los hidrocarburos fracción ligera (gasolina) su remediación resulta más compleja, ya que al volatilizarse, estos contaminantes se trasladan al aire. Algunos elementos de la fracción ligera como BTEX son altamente tóxicos, por ejemplo, se ha demostrado que el Benceno es un compuesto causante de anemia, leucemia además de que produce muchos tipos de daño genético (Yardley-Jones, Anderson, & Parke, 1991). En México la producción de BTEX se lleva acabo con el complejo petroquímico "Cangrejera", la cual representa casi el 20% de los aromáticos elaborados en dicho centro los cuales equivalen a 270 mil toneladas de estos compuestos (PEMEX, 2016).

1.3. Contaminación del suelo

Cuando el suelo presenta o acumula sustancias químicas, sales, radioactividad o cualquiera que sea considerado un agente que no permita el crecimiento libre de plantas o que perturbe la salud de los animales a través de éste y que además afecte la estructura física o química, se le conoce como contaminación del suelo (Ashraf, Maah, & Yusoff, 2014). La contaminación por hidrocarburos es generada por la liberación de hidrocarburos en el suelo siendo ejemplos la extracción ilegal de hidrocarburos o derrames por volcadura de autotanques.

1.3.1. Suelos agrícolas en México

Una de las capacidades del suelo es soportar la vegetación, por tanto, éste debe de ofrecer las condiciones necesarias para que las plantas se desarrollen de manera óptima en conjunto con los organismos que lo habiten. Por lo anterior, la importancia del cuidado del suelo radica en que éste cuente con las propiedades para una buena producción de plantas y para hallar una manera de mejorarlo y conservarlo (Navarro García & Navarro Blaya, 2003).

Desde el punto de vista económico, la agricultura en México aportó en el 2006 el 3.2% del PIB y para el 2016 el 3.8% al PIB (Banco Mundial, 2017), lo cual representa una mayor demanda en el uso del suelo. En el 2016, casi 50 millones de hectáreas de terrenos fueron destinados a la agricultura, lo cual representa casi una cuarta

parte de la superficie terrestre del territorio mexicano (INEGI, 2016)[b]. La agricultura le da trabajo a más de 5 millones de personas mayores de 15 años en México (INEGI, 2016)[a], por tanto, si los suelos comienzan a erosionarse, contaminarse o a cambiar sus condiciones naturales no solo el campo se vería afectado, las familias y la economía del país sufrirían los daños colaterales de estos sucesos.

1.3.2. Suelos contaminados por hidrocarburos en Puebla

En 2016, la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) recibió 1,961 emergencias ambientales a nivel nacional, de las cuales 1,822 fueron a causa de derrames de hidrocarburos (PROFEPA, 2016). Para noviembre de 2017, PEMEX reportó que de las 9,509 tomas clandestinas halladas en el país, 1,343 son en el estado de Puebla, colocando a este estado en el segundo lugar a nivel nacional, solo por debajo de Guanajuato con 1,696 de tomas reportadas (PEMEX, 2018). Entre los municipios afectados se encuentran Acatzingo, Acajete, Coronango, San Matías Tlalancaleca, Tepeaca y Tlahuapan, cerca de los cuales 71 hectáreas se han visto afectadas por los derrames de combustible (Pérez, 2017).

Acatzingo es un municipio ubicado al centro del Estado de Puebla, sus coordenadas geográficas son los paralelos 18º56’48” - 19º06’18” de latitud norte y los meridianos 97º49’54” - 92º34’18” de longitud occidental, sus principales actividades económicas son la agricultura y el comercio (INAFED, 2017). Los riesgos naturales o antropogénicos a los que este municipio se enfrenta pueden poner en peligro a la población y a su medio ambiente; ya que en zonas habitacionales pasan líneas de conducción de energía eléctrica en alta tensión así como ductos de PEMEX (Gobierno del Estado de Puebla, 2014). Acatzingo es uno de los municipios qué más ha sido afectado por el derrame de hidrocarburos; de éstos tal vez el más significativo fue el del año 2002 que dentro de los daños, además de humanos y patrimoniales, están los ambientales; considerando que los más afectados fueron el suelo (limitando la permeabilidad y tornándolo infértil), los cultivos (que en su mayoría eran comestibles) y el agua (ya que por los canales corría agua que era utilizada para riego) (Cavazos Arroyo, Pérez Armendáriz, & Mauricio Guitiérrez, 2014).

El marco legal regula la cantidad de hidrocarburos en el suelo bajo la norma *NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación*, en ésta se indica que la gasolina debe analizarse como hidrocarburos fracción ligera y como BTEX; al tratarse de un suelo agrícola, los límites de contaminantes en base seca son: 200mg/kg en fracción ligera, 6mg/kg de Benceno, 40mg/kg de Tolueno, 10mg/kg de Etilbenceno y 40mg/kg de la suma de los isómeros de Xileno.

1.4. Fijación de Nitrógeno

El nitrógeno es el elemento más abundante en la atmósfera (79% de ésta es nitrógeno), además es un bioelemento importante ya que forma parte de las proteínas y ácidos nucleicos, pero la estructura química del N_2 atmosférico lo hace un elemento muy estable y necesita diversos mecanismos para poder ser asimilado.

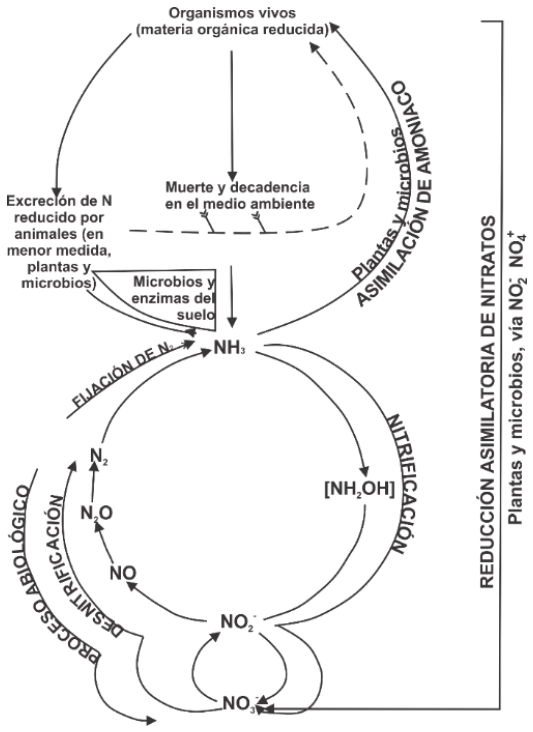

Figura 1 Reacciones durante el ciclo del nitrógeno
Tomado de (Sprent, 1987)

El ciclo del nitrógeno (*Figura 1*) es uno de los ciclos geológicos más importantes, en éste se llevan a cabo diferentes reacciones para hacerlo disponible, puesto que en

casi todas las zonas agrícolas del planeta, donde la escasez de luz solar y/o suministro de agua no limitan el crecimiento de los cultivos, la producción biológica está determinada por el nitrógeno inorgánico disponible en el suelo (Postgate, 1998).

La fijación de nitrógeno se considera la etapa más importante durante el ciclo del nitrógeno, ya que en ésta se rompe el triple enlace del nitrógeno molecular (N≡N) y se transforma en amoniaco o amonio. Esta ruptura se puede llevar a cabo a través de procesos biológicos o termodinámicos (ecuación 1), sin embargo, éstos últimos no pueden realizarse de manera espontánea en el ambiente; para ello se utiliza proceso de Haber-Bosch que se basa en el uso de temperaturas y presiones altas para obtener amoniaco y así la industria que lo necesite pueda darse abasto. En la actualidad se están probando nuevos métodos para la obtención de amoniaco como la fotocatálisis (Chen, Li, Kong, Ong, & Zhao, 2017).

$$\mathrm{N_{2(g)}} + 3\mathrm{H_2} \rightarrow 2\mathrm{NH_{3(g)}}$$

Ecuación 1. Reacción termodinámica para la obtención de amoniaco.

Por otro lado, la fijación biológica del nitrógeno es un proceso natural que lo pueden llevar a cabo bacterias diazotróficas simbióticas o de vida libre a través de la conversión del nitrógeno molecular (N_2) en amonio y así ser añadido como nutriente al suelo; ya que este proceso es de gran importancia para la agricultura. La enzima nitrogenasa es la responsable de llevarlo a cabo y es a través de los genes *nif* con los que cuentan las bacterias diazotróficas. La fijación de nitrógeno es un proceso que demanda mucha energía, en la ecuación 2 se muestra el consumo de los ATPs (Franche, Lindström, & Elmerich, 2009):

$$\mathrm{N_2} + 16\mathrm{ATP} + 8\mathrm{e^-} + 10\mathrm{H^+} \rightarrow 2\mathrm{NH_4^+} + \mathrm{H_2} + 16\mathrm{MgADP} + 16\mathrm{Pi}$$

Ecuación 2. Reacción general de la fijación biológica de nitrógeno

1.5. Bacterias asociadas a plantas

Las bacterias asociadas a plantas son microorganismos que pueden promover el crecimiento vegetal con diversos mecanismos, algunos ejemplos son las bacterias de los géneros *Azospirillum, Pseudomonas, Bacillus* y Enterobacterias como

Klebsiella, Enterobacter y *Erwina*, las cuales tienen la capacidad de fijar de nitrógeno (Elmerich, Zimmer, & Vieille, 1992). Por otro lado, se habla de que la microbiota existente en el suelo contiene bacterias que producen sustancias, las cuales regulan el crecimiento de las plantas como auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido abscísico (Arshad & Frankenberger, 1997). También existen bacterias que solubilizan nutrientes como fosfatos (Rodríguez & Fraga, 1999).

1.5.1. *Azospirillum*

El género *Azospirillum* es uno de más estudiados por los aportes que estos microorganismos realizan a la flora y al suelo. El aislamiento de estas cepas empleando un medio semisólido libre de nitrógeno, fue fundamental para descubrir que las bacterias diazotróficas están asociadas a diferentes partes de las plantas, crecidas en diversos tipos de suelos y regiones (Reis, Baldani, & Baldani, 2015).

Las bacterias del Género *Azospirillum* son Gram negativo, para diferenciarlas de colonias de otros géneros de bacterias diazotróficas, se pueden emplear un medio diferencial que contenga Rojo Congo donde crecerán colonias de color escarlata y forma irregular (Rodríguez Cáceres, 1982). Existen casos en los que estas bacterias no generan un polisacárido, sin el cual, pueden presentar una coloración blanca y rugosa (Bastarrachea, Zamudio, & Rivas, 1988).

Azospirillum son bacterias que además de ser diazotróficas también producen sustancias que promueven el crecimiento vegetal, especialmente en plantas gramíneas. Las auxinas son llamadas fitohormonas que ayudan al crecimiento vegetal, dentro de éstas se encuentran diferentes derivados del Ácido-Indol-Acético (AIA), la producción *in vitro* depende de factores como pH o vitaminas presentes en el medio donde crece *Azospirillum*. Se ha visto que si existe una mayor producción de índoles, puede haber mayor cantidad de biomasa en las plantas y fijación de nitrógeno (Bashan, Holguin, & de-Bashan, 2004). Otras fitohormonas que produce *Azospirillum* son las giberelinas las cuales ayudan en la germinación de las semillas, el alargamiento del tallo, la expansión de hojas entre otros. Se han descubierto poco más de 130 giberelinas en plantas, hongos y bacterias, pero solo pocas son biológicamente activas (Castillo, y otros, 2015).

Se han descrito 21 especies del género *Azospirillum* de 1978 al 2016, éstas han sido aisladas de diferentes orígenes, medios de cultivo y fuentes de carbono (Tabla 1).

Tabla 1 Especies del género Azospirillum.

Azospirillum	Origen	Fuente de Carbono	Medio de aislamiento	Referencias
A. lipoferum	Raíz de pasto y trigo	Malato	NFb	Tarrand, Krieg, & Döbereiner, (1978)
A. brasilense	Rizósfera de trigo; raíces de maíz, *Digitaria decumbens, Cynodan dactylon*	Malato	NFb	Tarrand, y otros (1978)
A. amazonense	Raíces de *Digitaria decumbens, Pennisetum purpureum*	Sacarosa	LGI, FAM	Magalhães, Baldani, Souto, Kuykendall, & Döbereiner, (1983)
A. halopraeferens	Raíz de *Leptochloa fusca*	Malato	SM	Reinhold, y otros, (1987)
A. irakense	Raíz y rizósfera de arroz	Malato	NFb	Khammas, Ageron, Grimont, & Kaiser, (1989)
A. largimobile	Agua	Peptona	PYEA	Dekhil, Cahill, Stackebrandt, & Sly, (1997)
A. doebereinerae	Raíz de *Miscanthus sinensis*	Malato	NFb	Eckert, y otros, (2001)
A. oryzae	Rizósfera de arroz	Malato, Glucosa	M, NFG	Xie & Yokota, (2005)
A. melinis	Raíz y tallo de *Melinis minutiflora*	Malato	NFb, LGC	Peng, y otros, (2006)
A. canadense	Rizósfera de maíz	Malato	M	Mehnaz, Weselowski, & Lazarovits, (2007)[a]
A. zeae	Rizósfera de maíz	Malato	M	Mehnaz, Weselowski, & Lazarovits, (2007)[b]
A. rugosum	Suelo contaminado con hidrocarburos	Peptona de caseína, ICC	BHIA	Young, y otros, (2008)
A. palatum	Suelo forestal	Extracto de levadura, carne y triptona	TYB	Zhou, Wei, Wang, Xu, & Lai, (2009)
A. picis	Asfaltos	Triptona de soya	TSA	Lin, y otros, (2009)
A. thiophilum	Agua sulfurosa	Succinato de sodio	MPSS	Lavrinenko, y otros, (2010)
A. formosense	Suelo agrícola	Malato	NFb	Lin, y otros, (2012)
A. humicireducens	Humus presente en celdas de electroquímica microbiana	Medio enriquecido	NB	Zhou, y otros, (2013)
A. fermentarium	Tanque de fermentación	Triptona de soya	NB	Lin, y otros, (2013)
A. himalayense	Rizósfera de maíz	Sacarosa	Jensen libre de nitrógeno	Tyagi & Singh, (2014)
A. soli	Suelo agrícola	Peptona	NA	Lin, y otros, (2015)
A. agricola	Suelo cultivado	Peptona	NA	Lin, y otros, (2016)

En esta tabla, se pueden observar las 21 especies de Azospirillum ordenadas por año de aislamiento.

La fijación de nitrógeno fue la primera característica de *Azospirillum* como una bacteria promotora del crecimiento vegetal, aunque se ha demostrado que no cubre la cantidad de nitrógeno que necesitan las plantas. Algunos estudios sugieren que al inocular semillas de maíz con una mezcla de cepas de *Azospirillum spp.*, se tiene un aumento similar en el rendimiento de la planta que si se utilizara el equivalente de 100kg de N/ha de fertilizante, también se observó aumento en el nitrógeno total de la planta. Para saber si las bacterias del género *Azospirillum* son capaces de fijar nitrógeno, se busca que la actividad de la nitrogenasa sea expresada, ésta se puede determinar de forma indirecta con ensayos de laboratorio determinando la actividad reductora de acetileno (ARA) en un medio semisólido (Bashan, Holguin, & de-Bashan, 2004; Maltempi de Souza & de Oliveira Pedrosa, 2015).

La mayoría de las bacterias de este género han sido aisladas de raíces y plantas gramíneas, pero existen dos casos de aislamiento de interés para este trabajo *A. rugosum sp.* y *A. picis*; éstas especies han sido aisladas de ambientes contaminados con hidrocarburos; la primera fue encontrada en suelo contaminado con petróleo cercano a una refinería localizada en Kaohsiung, Taiwán (Young, y otros, 2008) y la segunda de alquitrán descartado de una carretera en la ciudad de Taichung, Taiwán (Lin, y otros, 2009). En el laboratorio de microbiología del suelo, se aisló una cepa de A. rugosum de suelo agrícola contaminado con diésel (Sánchez Varguez, 2018).

1.6. Biodegradación

Existen procesos biológicos en los cuales se presentan transformaciones de moléculas orgánicas, éstos se llevan a cabo por enzimas que funcionan como catalizadores y a través de éstas se puede modificar la estructura, propiedades toxicológicas o potenciales de un contaminante. La biodegradación puede definirse como la reducción de productos químicos catalizada biológicamente, estos productos pueden ser de origen orgánico y cuando son convertidos a inorgánicos se le conoce como mineralización. Para poder biodegradar diferentes compuestos, existen técnicas de biorremediación *in situ* (fitorremediación, bioventeo, biopilas, etc.) o *ex situ* (biorreactores, biofiltros, etc.) (Alexander, 1999).

1.6.1. Biodegradación de hidrocarburos ligeros

La biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos se puede realizar por diferentes técnicas, el usar microorganismos autóctonos de sitios contaminados es una ventaja para su remediación, ya que se encuentran adaptados al contaminante, pueden producir sustancias para que haya un desarrollo de biota y en el mejor de los casos, serán capaces de utilizar como fuente de energía los hidrocarburos.

Existen diferentes mecanismos para disminuir la cantidad de hidrocarburos en sitios contaminados y así poder degradarlos, pero durante el proceso de degradación, se producen ciertos intermediarios o metabolitos que serán considerados de importancia ambiental: los que se excretan, los que tengan concentraciones de importancia ambiental o toxicológica, los persistentes y los que son tóxicos o no se ha comprobado que no lo son (Alexander, 1999).

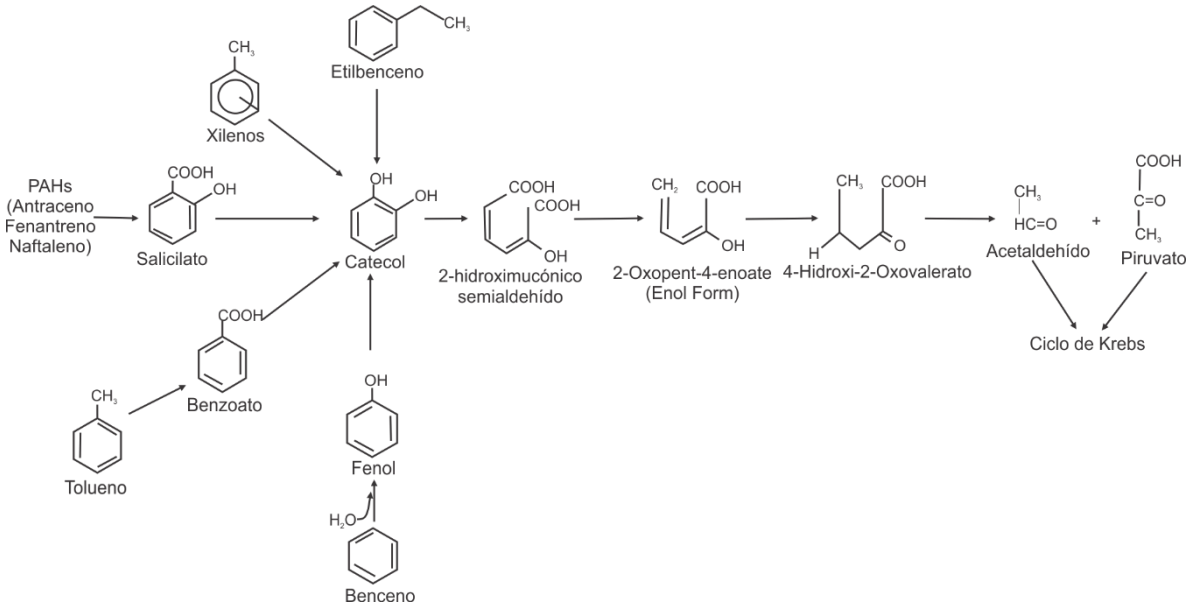

Figura 2 Rutas metabólicas más utilizadas para la degradación de BTEX
Tomado de Baker & Herson, (1994).

Durante la degradación de los BTEX se pueden predecir diferentes productos (*Figura 2*), de manera general, se han descrito rutas metabólicas en las que los compuestos aromáticos se reducen a Catechol, Protocatehuate, 3-metilCatechol entre otros. Cuando se llega a estos compuestos, romper el anillo es más fácil y así

los compuestos se transforman en Acetaldehído y Piruvato para poder unirse al ciclo de Krebs (Alvarez & Vogel, 1995, Baker & Herson, 1994).

1.6.2. Biorremediación con bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), además de favorecer el crecimiento de las plantas y ser un agente de biocontrol de enfermedades, en la actualidad de utilizan para biorremediar sitios contaminados, puesto que estas bacterias son capaces de mineralizar compuestos en asociación a plantas. Se ha reportado que algunas bacterias endófitas resisten concentraciones altas de hidrocarburos o metales pesados; por ejemplo, las BPCV que producen sideróforos, a través de ese mecanismo pueden adsorber/absorber metales en el suelo (Bishnoi, 2015).

La fitorremediación frecuentemente se fusiona con otras técnicas, ejemplo de esto es el inocular semillas con BPCV para remover hidrocarburos poliaromáticos y así mejorar el crecimiento de las plantas, se demostró que este proceso es un 23% más efectivo que sólo la fitorremediación (de Boer & Walgelmans, 2016), por lo tanto, usar BPCV con la fitorremediación, ayudan al crecimiento y resistencia de las plantas a los contaminantes del suelo que si sólo se usaran las plantas, dando como resultado la aceleración de la degradación de contaminantes (Zhou, Cai, Zhang, & Liu, 2011).

1.7. Trabajos predecesores

Las cepas utilizadas para este trabajo fueron asiladas de suelos contaminados en un medio para bacterias fijadoras de nitrógeno, han demostrado que tienen la capacidad de producir sideróforos y fitohormonas en presencia de hidrocarburos, son capaces de degradar hidrocarburos en un proceso de fitorremediación, además de que favorecen la germinación de semillas.

Cano García (2012), demostró que algunas de las cepas fijadoras tienen la capacidad de producir auxinas a concentraciones de hasta 10,000ppm de diésel.

Martínez Carrera (2016), probó las cepas con bacterias que producen biosurfactantes probando el antagonismo y la degradación de hidrocarburos entre ellas.

Por otro lado, para probar la degradación de hidrocarburos en un proceso de fitorremediación, se probaron los consorcios que con Martínez Carrera (2016) presentaron sinergismo, observando que incrementó la población bacteriana asociada a raíces de plantas cuando se encontraban en suelo contaminado, el favorecimiento de la germinación de las semillas de suelo contaminado y la degradación de hidrocarburos en suelo contaminado (Pérez Elizalde, 2018).

El uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal se ha aplicado como una forma de desarrollo de los microorganismos nativos del suelo, esto con la finalidad de reavivar la actividad microbiana en el suelo, ya que esto solo se había realizado por métodos indirectos como la biofertilización, rizoconstrucción, crecimiento de raíces, etc. Cuando un suelo se ve contaminado por hidrocarburos, la cantidad de nutrientes decrece, por lo tanto, la biota nativa comienza a utilizar el contaminante generando energía para ellos mismos teniendo como resultado compuestos menos tóxicos como agua y dióxido de carbono, haciendo que éstos se encuentren disponibles para otros organismos y así desarrollar un proceso de biorremediación más eficiente (Dos Santos & Maranho, 2018).

Capítulo II Metodología

2.1 Material biológico

Las cepas bacterianas que se utilizaron para este trabajo pertenecen a la colección del CICM Laboratorio “Dr. Jesús Caballero Mellado” del ICUAP, las cuales fueron asiladas de suelos contaminados con petróleo crudo de la zona de Acatzingo, Puebla. La identificación y características morfológicas en un medio selectivo (Rojo Congo) se presentan en la tabla 2:

Tabla 2 Origen y morfología colonial en medio de Rojo congo de las Cepas bacterianas utilizadas.

Clave	Origen	Características Morfológicas			
		Color	Elevación	Bordes	Luz Reflejada
CeH-1	Suelo y raíz de cebada (2003)	Rojo escarlata	Plana	Irregulares	Mate
CeH-1[a]		Rojo escarlata	Plana	Irregulares	Mate
IH-7	Suelo (2002)	Rojo escarlata	Plana	Irregulares	Mate
PaH-2	Raíz de pasto (2003)	Rojo escarlata	Plana	Irregulares	Mate
UH-3	Suelo (2002)	Rojo escarlata	Plana	Irregulares	Mate
CH-13	Suelo (2002)	Naranja	Irregular	Dentados	Mate
MH-3	Maíz (2002)	Naranja	Irregular	Dentados	Mate
PH-4	Suelo (2002)	Naranja	Irregular	Dentados y con halo	Mate
RH-13	Suelo (2002)	Naranja	Irregular	Dentados	Mate

Todas las cepas fueron aisladas ya sea de planta o suelo contaminado con petróleo crudo.

2.2 Preparación de precultivos y cuantificación de población bacteriana

Las cepas fueron tomadas de crioconserva a -80°C, se sembraron en placas de agar Rojo Congo (RC) (Rodríguez Cáceres, 1982) por método de estría cruzada para ser aisladas y después incubadas a 30°C ±2°C por 48 horas.

Para que todos los tratamientos fueran inoculados con una cantidad similar de células bacterianas, se tomó una colonia pura y se sembró en tubos con caldo NFb+NH_4Cl, éstos fueron incubados de 24 a 48h a 30°C ±2°C en agitación a 120 RPM y se ajustaron a una densidad óptica de 0.1 de la siguiente manera:

Los cultivos se centrifugaron a 5000RPM por 15min a 4°C; el paquete celular fue lavado dos veces con solución buffer de fosfatos estéril al 0.025M. Esta suspensión fue diluida con buffer de fosfatos estéril para ajustar la población celular a una densidad óptica (DO) de 0.1 ±0.003 en un espectrofotómetro a 610nm.

La población bacteriana fue determinada por el método de número más probable en gota de 5 μl en medio RC. Las densidades ópticas usadas fueron 0.05, 0.1 y la del precultivo crecido a 18h (Fuentes & Massol Deyá, 2002).

2.3 Determinación de la actividad reductora de acetileno (ARA)

En viales con 5mL de medio NFb semisólido (Baldani & Döbereiner, 1980) con tampones de algodón se inocularon 100µL de precultivo ajustado a 0.1DO de cada cepa y se incubaron a 30°C±2°C por 48 horas. Después se reemplazaron los tampones de algodón de los viales por tapones de goma y se intercambió el 12% de la atmósfera dentro del vial por acetileno. Los viales fueron sellados e incubados a 30°C por 18-24 horas más. El ensayo se realizó por quintuplicado.

El análisis cromatográfico se realizó inyectando cinco microlitros de la atmósfera de los viales en un Cromatógrafo de Gases de la marca Thermo Scientific, con una columna Thermo Scientific TG-BOND Alumina 30m x 0.53mm x 40µm y detector FID a las condiciones del método ARA: Temperatura del horno: **100°C**, Temperatura del inyector: **180°C**, Temperatura del detector: **100°C**, Modo de inyección: **Splitless**, Flujo de columna: **5mL/min.**

2.4 Crecimiento en presencia de Hidrocarburos: Gasolina

Para este ensayo se utilizó gasolina magna comercial estéril, ésta fue añadida a concentraciones de 1000, 3000, 5000 y 10000ppm en tubos de ensayo con 5mL de NFb+NH_4Cl, posteriormente se les agregó 100µL del inóculo ajustado a 0.1DO, se sellaron los tubos para evitar la pérdida de compuestos volátiles de gasolina y se

incubaron a 30°C ±2°C por 48h a 120RPM. Pasado el tiempo de incubación, se evaluó el crecimiento de las bacterias con el hidrocarburo a través de espectrofotometría UV-Vis a 610nm.

2.5 Crecimiento de las cepas en Hidrocarburos aromáticos

2.5.1 Concentración máxima tolerable de crecimiento

Para conocer la concentración máxima a la que pueden crecer las cepas, éstas fueron cultivadas en tubos con 5mL de caldo NFb+NH_4Cl, se añadieron 1000, 3000 y 5000 ppm de Benceno, se inocularon con 100µL del precultivo ajustado a 0.1DO de cada cepa. Los tubos fueron sellados e incubados por 48h. Pasado el tiempo, se observó el crecimiento cualitativo de los tratamientos. El ensayo fue por triplicado.

2.5.2 Preparación de cepas en un medio enriquecido

La gasolina contiene una gran cantidad de compuestos aromáticos, por lo tanto en este ensayo se utilizó benceno, tolueno y gasolina. Estos compuestos se colocaron en el medio de cultivo a 1000ppm, se pretende que estos contaminantes sean utilizados como fuente de carbono para las cepas. El medio de cultivo fue enriquecido con una solución de co-factores (Co y Cu), tiamina, nitrógeno y ácido málico, que es utilizado como la fuente principal de carbono en el medio de cultivo, se añadió en concentraciones de 100, 50 y 0%, esto para probar si las cepas pueden utilizar otra fuente de energía.

2.6 Resistencia a compuestos aromáticos: Benceno Tolueno y Xilenos (BTX)

La resistencia a los BTX fue probada con las cepas PaH-2, UH-3, CH-13, MH-13, PH-4, RH-13 y se utilizó el medio de cultivo en el que las bacterias crecieron en presencia de Benceno Tolueno y Gasolina.

En tubos de ensayo con 5 mL del medio de cultivo se añadió Benceno, Tolueno o mezcla de Xileno a concentraciones de 100, 200, 400, 800 y 1000 ppm; además se hizo un tratamiento de 1000 ppm de BTX en relación 1:1:1 en Metanol. Se agregó a cada tubo 100µL del inóculo ajustado a una DO de 0.1 para finalmente sellarlos e incubarlos de 36 a 38h a la agitación y temperatura ya mencionadas.

Para analizar el desarrollo de las bacterias, se midió el crecimiento de la población a través de la absorbancia con un espectrofotómetro a 610nm.

2.7 Degradación de compuestos aromáticos

En viales de 20mL, se colocaron 7.5mL de medio NFb modificado y se añadieron de forma individual 1000ppm de Benceno, 1000ppm de Tolueno y 800ppm de mezcla de Xilenos. Sólo las cepas RH-13 y UH-3 fueron utilizadas, por lo tanto se inocularon los viales con 150µL de precultivo ajustado, éstos fueron sellados e incubados por 72hrs a las condiciones ya mencionadas.

Pasado el tiempo de incubación, se extrajeron los BTX por la técnica de Headspace, manteniendo el vial a una temperatura de **85°C por 25 min**. Para determinar la cantidad de compuestos degradados, el producto de la extracción fue transferido a 130°C a un cromatógrafo de gases acoplado a **espectrofotometría de masas** marca Agilent Technologies con una columna **DB-624**, con las siguientes temperaturas: Horno: **Rampa** de 110°C/min por 1 min, 14°C/min hasta 194°C y mantener por 1 min, 30°C/min hasta 250°C y mantener por 5 min. Inyector: **200°C**. Detector: **150°C**. Vial **85°C por 25min**, y Modo de inyección: **Split**.

2.8 Actividad Reductora de Acetileno en presencia de diésel.

Las cepas que son capaces de reducir acetileno fueron probadas para determinar esta habilidad en presencia de hidrocarburos. Dadas las condiciones que requiere el análisis ARA, se utilizó diésel en lugar de gasolina, ya que considerando el tiempo y la temperatura de incubación, además de ser un sistema abierto (tampón de algodón), se perderían demasiados compuestos volátiles en el transcurso del ensayo, el diésel al contener compuestos menos volátiles, resulta ser la mejor opción para esta prueba.

En viales con capacidad de 10mL, se agregaron 5mL de medio NFb semisólido con y sin ácido málico como fuente principal de carbono; cuando el medio estaba líquido y estéril, se agregaron 5000 y 10000ppm de diésel estéril. Una vez que los viales estuvieron en forma semisólida, se inocularon con los precultivos ajustados a una DO de 0.1; se siguió el mismo procedimiento que el descrito en el ensayo de

Determinación de la actividad reductora de acetileno (ARA) y se realizaron las cromatografías en el mismo equipo a las mismas condiciones.

Después de cada ensayo, se tomó un vial o un tubo al azar y fue sembrado en una caja de agar Rojo Congo por estría cruzada, esto para comprobar que sólo se encuentra la bacteria de dicho tratamiento.

Capítulo III Resultados y Discusión

3.1 Población bacteriana

Las cepas ensayadas presentan dos morfologías coloniales en medio de Rojo congo, un grupo que presenta colonias rojas escarlatas características similar a lo reportado por Rodríguez Cáceres (1982) para el género *Azospirillum* y otro, que es de color naranja y con bordes irregulares (Tabla 2).

Las cepas CeH-1, CeH-1ª, IH-7, PaH-2 y UH-3 crecidas en caldo NFb+NH_4Cl y ajustada su DO a 0.1 presentaron poblaciones de 1.62 a $9.84x10^8$ UFC/mL, por otro lado, a la misma densidad óptica, las cepas CH-13, MH-3, PH-4 y RH-13 tuvieron poblaciones de 2.06 a $2.47x10^9$; la variación que presentaron éstas fue menor que las cepas color escarlata. En la tabla 3 se muestran las DO de las cepas a 610nm. Las poblaciones iniciales y finales en los ensayos fueron calculadas con base en su DO.

Tabla 3 Densidades Ópticas y poblaciones bacterianas

Cepas color rojo escarlata e irregulares			Cepas color naranja y rugosas		
Cepa	DO	Población	Cepa	DO	Población
	0.052	0.20		0.050	0.65
CeH-1	0.102	0.34	CH-13	0.100	2.47
	2.800	8.19		2.700	76.37
	0.054	0.33		0.053	0.91
CeH-1ª	0.103	0.98	MH-3	0.097	2.47
	2.720	18.06		2.390	72.28
	0.050	0.02		0.050	0.82
IH-7	0.099	0.31	PH-4	0.103	2.14
	2.890	11.84		2.050	43.42
	0.050	0.18		0.050	0.31
PaH-2	0.098	0.33	RH-13	0.103	2.06
	2.840	9.45		2.520	127.35
	0.050	0.11			
UH-3	0.098	0.16			
	2.930	6.85			

Los valores representan el promedio de 2 repeticiones del método NMP. DO=Densidad óptica. Población calculada en UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro) por 10^9.

Se ha visto que cepas bacterianas del mismo género (igual o diferente especie) pueden presentar diferente crecimiento poblacional y esto puede estar implícitamente demostrado con la producción de metabolitos. Dos cepas de *Bacillus subtilis* y cuatro de *Bacillus megaterium* fueron aislados de raíces de maíz donde *B. subtilis* tuvo diferencias en la solubilización de fosfatos y en la producción de Ácido Indol Acético. Por otro lado, *B. megaterium* solubiliza desde 22.05 hasta 27.4 mg/mL de fosfatos y produce de 1.4 hasta 5.3 µg/mL, estas últimas se dividen en 2 grupos donde la producción de cada uno es similar (Zahid, Abbasi, Hameed, & Rahim, 2015).

Se sabe que las poblaciones de 10^8 y 10^9 de las cepas color escarlata y las cepas blancas y rugosas respectivamente.se pueden conseguir con una DO alrededor de 0.1 del inóculo. Comercialmente existen diferentes cepas bacterianas liofilizadas, las cuales para que puedan ser utilizadas en un proceso de biodegradación es necesario propagarlas y utilizar una población bacteriana mínima de $2x10^8$UFC/mL (Gimsing, Hansen, Permild, Schwarz, & Hansen, 2009).

S. Cerqueira y otros (2012) aislaron cepas de suelo, efluente y lodo contaminado con residuos petroquímicos, las hicieron crecer en un medio sólido con nutrientes y para determinar la habilidad degradadora, prepararon pre-inóculos y así trabajar con una concentración inicial de 10^7 UFC/mL para los ensayos realizados.

3.2 Actividad reductora de acetileno

Todas las cepas ensayadas fueron capaces de reducir acetileno a etileno en un intervalo de 6.44 a 106.72 nmolesC_2H_4/h*mL. La actividad de reducción de acetileno presentada por las cepa IH-7 y PaH-2 fue cercana al control negativo, lo que nos indica que la cantidad de Etileno producido es muy poca, en contraste, las cepas CeH-1, CeH-1ª y PH-4 demostraron la capacidad de reducir alrededor del 50% del acetileno inyectado. La tabla 4 muestra la cantidad de acetileno y etileno después del tiempo de incubación.

La actividad reductora de acetileno es uno de los métodos indirectos más empleados para medir la actividad de la enzima nitrogenasa. La cantidad de acetileno en la atmósfera de los cultivo va entre el 10 y 12 %. Diversos ensayos con cepas bacterianas aisladas de

plantas, donde en muchas ocasiones se trata de bacterias del género *Azospirillum*, se obtienen concentraciones de 17.6 a 49.6 nMC2H4/h*mL (Mascarua Esparza, Villa González, & Caballero Mellado, 1988). Por otro lado, si se cambian las condiciones de las cepas, como la presión osmótica, las concentraciones pueden ser muy bajas (de 0.26 a 0,05 nmC2H4/h*mL) (García, y otros, 2017).

Tabla 4 Cantidad de acetileno residual y etileno producido por las cepas.

Cepa	nMC_2H_2/h*mL	nMC_2H_4/h*mL
Control negativo	236.22	5.82
CeH-1	90.06	106.72
CeH-1°	95.25	96.18
IH-7	177.15	6.44
PaH-2	169.63	10.75
UH-3	175.74	28.68
CH-13	143.10	97.25
MH-3	117.45	82.35
PH-4	132.14	106.07
RH-13	177.21	75.52

*nMC_2H_2/h*mL=nanomoles de acetileno entre el tiempo de incubación por mililitro. nMC_2H_4/h*mL=nanomoles de etileno entre el tiempo de incubación por mililitro. Control negativo=Vial sometido al tratamiento sin inocularlo con bacterias. Solo el 78% de las cepas demostró tener la capacidad de fijar nitrógeno.*

Venieraki y otros (2011) aislaron cepas del género *Azospirillum* donde probaron la actividad reductora de acetileno. Las cepas identificadas como *A. brasilense* presentaron diferencias significativas en la cantidad de nanomoles de etileno producidos, ya que éstas fueron aisladas de plantas y sitios diferentes, presentaron concentraciones de 7.1 hasta 44.3 nM de etileno/h/mg de proteína. Lo anterior nos indica que los ambientes de donde fueron aisladas las cepas, influyen en sus funciones fisiológicas.

No todas las bacterias promotoras del crecimiento vegetal aisladas de suelo o rizósfera realizarán la fijación de nitrógeno; Ashraf, Rasool & Mirza (2011) aislaron doce cepas de la rizósfera de la caña de azúcar, todas mostraron capacidad de producir Ácido Indol Acético, pero sólo en dos se detectó el gen *nifH*, que es uno de los encargados de llevar a cabo la fijación de nitrógeno.

3.3 Crecimiento de las cepas bacterianas en hidrocarburos

Gasolina

El crecimiento presentado por las cepas rojo escarlata en caldo NFb con gasolina a concentraciones de 1000, 3000, 5000 y 10,000 ppm, es menor que sin el hidrocarburo en todas las concentraciones ensayadas, lo cual indica que éstas podrían necesitar un proceso de pre-adaptación para poder sobrevivir a un ambiente contaminado. Por otra parte, las cepas color naranja a 1000ppm de gasolina superaron la población del tratamiento sin hidrocarburo, sin embargo, en concentraciones mayores muestran una disminución de la población, demostrando que pueden vivir en ambientes contaminados, inclusive en aquéllos que tengan una concentración de 10,000ppm de gasolina. En la tabla 5 se pueden observar el promedio de las poblaciones, siendo las cepas IH-7 y UH-3 las que presentaron las poblaciones más bajas en un ambiente contaminado, en contraste, la cepa RH-13 pudo crecer a concentraciones de 10,000ppm alcanzando una población bacteriana considerable, ya que ésta fue casi el 50% respecto al tratamiento sin hidrocarburo.

Tabla 5 Poblaciones de bacterianas en caldo NFb con Gasolina

Cepas	Gasolina (ppm)				
	0	1000	3000	5000	10000
CeH-1	5.56	0.00	0.59	0.11	0.06
CeH-1ª	11.35	4.46	0.31	0.32	0.53
IH-7	9.24	0.00	0.67	0.01	0.00
PaH-2	3.92	0.00	1.34	0.18	0.10
UH-3	9.47	0.04	0.22	0.04	0.00
CH-13	41.54	48.18	23.48	23.70	16.61
MH-3	54.19	56.97	21.47	15.86	16.44
PH-4	29.57	32.66	16.84	15.19	13.62
RH-13	80.99	114.56	61.48	41.12	36.03

Población en UFC/mL por 10^9. Los valores representan el promedio de 3 repeticiones.

En este trabajo, las bacterias no fueron pre-adaptadas al contaminante, lo cual explicaría el nulo crecimiento de las cepas color rojo escarlata ya que este pudo ser inhibido por

algún compuesto de la gasolina, por otro lado, las cepas blancas y rugosas crecieron sin problema en los medios contaminados.

da Cunha & Leite, (2000) utilizaron diferentes microcosmos para la remediación de suelo con gasolina, uno de los tratamientos fue de bacterias autóctonas más *P. putida*, donde se logró una degradación del 59.2% del n-nonano, en contraste, ese mismo tratamiento sólo degradó el 8.7% de n-tridecano. A pesar de que ambos compuestos se encuentran en la gasolina, uno de éstos puede ser degradado con mayor facilidad o puede inhibir el crecimiento de las cepas.

La variación en el crecimiento de las bacterias puede deberse tanto a la velocidad de reproducción y origen de las bacterias. También esta variación puede deberse a que las bacterias no fueron pre-aclimatadas, ya que fueron tomadas del ultracongelador (-80°C) y posteriormente se realizaron los ensayos. Al utilizar bacterias autóctonas (aguas residuales), los diferentes compuestos de la gasolina se degradan de la siguiente manera: alcanos mayores e isoalcanos > compuestos aromáticos simples y alquilados > n-alcanos e isoalcanos más pequeños y naftenos; los últimos compuestos degradados fueron butano, isobutano y 2,2 dimetilbutano (Prince, Parkerton, & Lee, 2007).

Concentración máxima de crecimiento en Benceno

Todos los microorganismos presentaron crecimiento a 1000ppm de Benceno, sin embargo, las cepas CeH-1, CeH-1ª e IH-7 mostraron un crecimiento apenas perceptible a 3000ppm, por lo que serán descartadas para los ensayos posteriores, además de que ninguna de las cepas bacterianas presentó crecimiento a 5000ppm (Tabla 6).

Benceno es el compuesto más tóxico de los BTEX y constituye casi el 3% de las gasolinas que se distribuyen en el país (PEMEX, 2014). Se ha visto que 50mg/kg de benceno pueden causar la muerte en humanos (ATSDR, 2010), lo cual nos indica la gran resistencia que tienen estos microorganismos a los compuestos aromáticos. Las bacterias que crecieron hasta en 3000ppm de este aromático, puede que sean capaces de tolerar concentraciones más altas de mezclas de hidrocarburos derramados. Al

conocer la concentración a la que aún pueden crecer las bacterias, se fijará la cantidad de contaminante en los tratamientos.

Tabla 6 Crecimiento de las cepas con Benceno

Cepa	Benceno (ppm)															
	0				1000				3000				5000			
	1	2	3	TCC	1	2	3	TCC	1	2	3	TCC	1	2	3	TCC
CeH-1	+++	+++	+++	3	-	-	++	1	-	-	-	0	-	-	-	0
CeH-1[a]	+++	+++	+++	3	+++	-	-	1	+++	-	-	1	-	-	-	0
IH-7	+++	+++	+++	3	-	+	++	2	-	-	-	0	-	-	-	0
PaH-2	+++	+++	+++	3	+++	+++	+++	3	-	-	+++	1	-	-	-	0
UH-3	+++	+++	+++	3	-	++++	+++	2	-	++	-	1	-	-	-	0
CH-13	++++	+++	+++	3	+++	++++	++++	3	-	++++	+++	2	-	-	-	0
MH-3	++++	++++	++++	3	++++	++++	++++	3	++++	++++	++++	3	-	-	-	0
PH-4	++++	++++	++++	3	++++	+++	++++	3	++++	-	-	1	-	-	-	0
RH-13	++++	++++	++++	3	-	+++	++++	2	+++	-	++++	2	-	-	-	0

TCC=Tubos con Crecimiento. ++++=Crecimiento abundante con formación de conglomerados. +++=Crecimiento abundante. ++=Crecimiento regular. +=Crecimiento apenas perceptible. -=Sin Crecimiento.

Medio enriquecido

Las concentraciones de los nutrientes añadidos se encuentran en el Anexo I Modificaciones al medio NFb.

El cobre se encuentra involucrado en reacciones de oxido-reducción en enzimas, oxidando de Cu^{+} a Cu^{2+}. Ejemplo de esto es que la plastocianina que es una cuproproteína involucrada en la transferencia de electrones durante la fotosíntensis. Se sabe que la deficiencia estrema de este metal en las plantas, puede provocar que las hojas desaparescan prematuramente (Taiz & Zeiger, 2010)

Por otro lado el cobalto puede ser utilizado como cofactor para la degradación de diferentes hidrocarburos. Oyetibo, Ilori, Obayori, & Amund, (2013) experimentaron con cepas bacterianas que toleran metales pesados para la degradación de hidrocarburos. Utilizaron el equivalnte a 5.0mM de Co^{2+} y Ni^{2+} en Cloruro de cobalto y Cloruro de niquel en el medio de cultivo y diferentes hidrocarburos como fuente única de carbono. En sus

ensayos observaron que las bacterias pueden utilizar más de tres hidrocarburos como fuente de carbono, además de que al utilizar altas concentraciones de metales pesados, en lugar de inhibir el crecimiento de las bacterias, se redujo la cantidad de metales biodisponibles, facilitando el proceso de degradación de hidrocarburos y más si se encuentra co-contaminado con metales pesados.

Ambos elementos son escenciales, ya que se encuentran en enzimas y co-enzimas, no todos los metales pueden presentar una co-tolerancia al cobalto, pero cuando se trabaja con plantas superiores, sólo el cobre pudo hacerlo pero en pocas familias. Se ha visto la tolerancia de *Ectocarpus siliculosus* al cobre y debido al mecanismo de tolerancia o de procesos fisiológicos, dicha alga mostró mayor tolerancia al cobalto (Palit, Sharma, & Talukder, 1994).

Durante el proceso de degradación de los BTEX, las condiciones de reducción de nitrógeno son importantes en remediaciones que se basan en la presencia de nitratos. Sin embargo, la degradación de benceno en condiciones anaerobias y de desnitrificación el benceno puede volverse recalcitrante. (Alvarez & Vogel, 1995), por lo tanto, la cantidad de nitrógeno en el medio líquido fue aumentada; sin embargo, se debe tener cuidado al añadir este elemento, ya que una cantidad excesiva puede provocar toxicidad por amonio y esto conlleva a inhibir el crecimiento de la microbiota en el suelo. Por otro lado, este efecto se puede evitar al añadir nutrientes, que en su conjunto podrían ser benéficos para la biodegradación (Zhou & Crawford, 1995).

Crecimiento en Benceno, Tolueno y Gasolina

Se utilizó el medio de cultivo enriquecido con nutrientes para este ensayo, además la fuente primaria de carbono (ácido málico) se añadió a diferentes concentraciones y la fuente secundaria (los hidrocarburos) fue usada a una concentración de 1000ppm. El comportamiento de las cepas puede observar en la Tabla 7.

Para continuar con los ensayos, se observó el comportamiento de las cepas a diferentes concentraciones de ácido málico, cuando los hidrocarburos fueron la única fuente de carbono en el medio, las cepas no presentaron crecimiento, lo cual indica que el ácido

málico es necesario para iniciar la reproducción bacteriana. Se observó el comportamiento de las bacterias al utilizar el 100 o 50% de ácido málico en el medio, puesto que no presentó una diferencia significativa entre estas dos concentraciones, se optó por utilizar el medio con el 50% de ácido málico en los siguientes tratamientos.

Tabla 7 Poblaciones de las cepas a diferentes concentraciones de fuente de carbono primaria y secundaria

Cepas	Control			Benceno			Tolueno			Gasolina		
	0	50	100	0	50	100	0	50	100	0	50	100
PaH-2	0.00	1.62	3.18	0.00	2.79	3.64	0.00	3.17	3.68	0.00	4.56	4.05
UH-3	0.00	1.79	3.39	0.00	2.29	1.49	0.00	1.58	6.14	0.00	0.00	1.58
CH-13	0.00	12.82	19.18	0.00	10.71	23.45	0.00	7.81	10.54	0.00	11.11	34.93
MH-3	0.00	19.00	22.90	0.00	13.16	20.58	0.00	4.69	31.42	0.00	6.40	31.79
PH-4	0.00	4.54	9.20	0.00	4.92	13.27	0.00	2.33	16.45	0.00	5.77	23.07
RH-13	0.00	10.40	35.49	0.00	12.27	39.74	0.00	6.88	55.71	0.00	11.13	61.20

100, 50, 0=Porcentaje de fuente de carbono primaria. Benceno, Tolueno, Gasolina=Fuente de carbono secundaria a 1000ppm. Población en UFC/mL por 10^9. Los valores representan el promedio de 3 repeticiones.

da Cunha & Leite, (2000) observaron la degradación en dieciséis diferentes microcosmos con seis compuestos de gasolina, los aromáticos fueron los que presentaron menor porcentaje de degradación comparados con cadenas de alcanos de 9, 11, 12 y 13 carbonos.

La gasolina contiene compuestos aromáticos y alifáticos, siendo estos últimos los más fáciles de degradarse (Prince, Parkerton, & Lee, 2007); por lo tanto, al ser una mezcla de hidrocarburos, la gasolina se degradará mejor que compuestos puros, es por ello que las poblaciones bacterianas se desarrollaron mejor en el medio que contenía gasolina.

3.4 Ensayos con BTX

Resistencia a BTX a diferentes concentraciones

Las seis de las cepas se hicieron crecer en caldo NFb+NH_4Cl por 48 horas en 6 concentraciones distintas de BTX. En las siguientes tablas (8, 9, 10, 11) se puede observar el comportamiento de las cepas con los contaminantes. De manera general, se

destaca que las cepas color rojo escarlata (PaH-2 y UH-3) pueden resistir altas concentraciones de aromáticos, pero no necesariamente utilizan el contaminante como fuente de carbono o de energía. Por otro lado, las bacterias color naranja aumentó la concentración de bacterias de manera *in vitro* en presencia de los hidrocarburos, lo cual nos indica que pudieron haberlo tomado como fuente de carbono y energía incluso en concentraciones de un mil partes por millón.

En algunos suelos contaminados con gasolina, se puede presentar el aumento en la actividad microbiana debido a los procesos de biodegradación. Los suelos contaminados con BTEX pueden aumentar en un 50% su actividad después del segundo día de contaminación y en días posteriores, esa actividad puede bajar ya que las bacterias pueden comenzar un proceso de readaptación (Österreicher Cunha, y otros, 2009).

Las poblaciones bacterianas también pueden variar por el contenido de átomos de carbono que contienen los hidrocarburos; petróleo crudo, queroseno, hexadecano, decano y hexano fueron usados como sustratos para *P. fluorescens* y así poder determinar su actividad celular. A las 48h se observan poblaciones celulares mayores en presencia de hexadecano, seguidas del hexano, el queroseno al tener hidrocarburos entre al tener de 10 a 14 átomos de carbono tuvo un comportamiento similar al del decano y por último, el crudo fue el compuesto que presentó menor conteo de bacterias (Barathi & Vasudevan, 2001).

Tabla 8 Poblaciones de las cepas a diferentes concentraciones de Benceno

Cepas	Benceno (ppm)					
	0	100	200	400	800	1000
PaH-2	4.66	4.68	4.62	4.45	4.56	4.55
UH-3	5.30	5.03	5.12	5.11	4.63	4.94
CH-13	32.15	28.95	28.12	27.82	28.77	28.39
MH-3	27.93	39.39	38.32	38.49	40.74	41.01
PH-4	21.52	22.92	22.31	24.91	22.51	21.68
RH-13	44.04	58.25	51.72	60.88	51.99	61.07

Población en UFC/mL por 10^9.Los valores representan el promedio de 3 repeticiones.

En la tabla 8 se observa que las cepas PaH-2 y PH-4 pueden crecer a diferentes concentraciones de benceno sin inhibir su crecimiento pero también sin usar el contaminante como fuente de carbono; por otro lado, las cepas UH-3 y CH-13 presentan un efecto ligeramente adverso en su población bacteriana ya que ésta se ve disminuida desde las 100ppm de Benceno. Sin embargo, las cepas MH-3 y RH-13 presentaron poblaciones mayores en presencia del contaminante, lo que podría indicar que estas cepas utilizan al Benceno como fuente de carbono.

Iqbal y otros (2017) probaron el crecimiento de bacterias endófitas aisladas de *Cannabis sativa*, observaron que *Bacillus sp., Acinetobacter sp*. y *Enterobacter sp.* tienen buena producción de biomasa a concentraciones de doscientos cincuenta, quinientas, setecientas cincuenta (DO arriba de 1.0 en 48h) y un mil (DO superior a 0.8) partes por millón de Benceno, también probaron la capacidad de las cepas para degradar este compuesto, obteniendo degradaciones del 100 al 80% de Benceno.

Tabla 9 Poblaciones de las cepas a diferentes concentraciones de Tolueno

Cepas	Tolueno (ppm)					
	0	100	200	400	800	1000
PaH-2	4.66	4.72	4.83	4.70	1.43	3.09
UH-3	5.30	4.92	5.15	4.39	4.98	5.12
CH-13	32.15	29.19	29.00	30.51	30.02	31.10
MH-3	27.93	34.99	38.42	18.81	32.05	38.48
PH-4	21.52	23.17	25.92	21.70	25.06	23.11
RH-13	44.04	56.54	56.04	56.45	48.47	53.65

Población en UFC/mL por 10^9. Los valores representan el promedio de 3 repeticiones.

Las cepas UH-3, PaH-2 y CH-13 mostraron un menor crecimiento respecto a su tratamiento sin tolueno. Por otro lado, las cepas PH-4 MH-3 y RH-13 presentaron un incremento en la población en presencia del tolueno (tabla 9).

Se han realizado diferentes cinéticas de crecimiento y éstas son relacionadas con la degradación de diferentes contaminantes como los BTEX. Abuhamed, Bayraktar, Mehmetoglu, & Mehmetoglu en 2004, observaron el crecimiento específico de *Pseudomonas putida* F1 en presencia de Tolueno, dónde el comportamiento de la cepa

muestra que puede usar este contaminante como fuente única de carbono aproximadamente a 30 ppm sin inhibir su crecimiento. Shim & Yang, (1999), observaron que el benceno y *o*-xileno son más tóxicos que el tolueno, este comportamiento no se notó en las cepas PaH-2 y RH-13, en la primera de éstas se puede suponer que tanto el xileno como el tolueno a 1000ppm pueden inhibir el crecimiento de la cepa, en tanto la cepa RH-13 claramente de observa que el tolueno puede ser tóxico para esta bacteria a concentraciones superiores a 400ppm.

Tabla 10 Poblaciones de las cepas a diferentes concentraciones de Mezcla de Xilenos

Cepas	Xilenos (ppm)					
	0	100	200	400	800	1000
PaH-2	4.66	4.68	4.47	3.08	4.62	2.98
UH-3	5.30	5.10	4.80	4.94	5.08	3.47
CH-13	32.15	31.66	21.57	32.63	32.88	10.05
MH-3	27.93	38.29	32.66	37.36	13.27	27.29
PH-4	21.52	21.53	23.46	26.09	12.21	6.54
RH-13	44.04	54.95	58.32	58.82	49.14	58.06

Población en UFC/mL por 10^9. Los valores representan el promedio de 3 repeticiones.

En la tabla 10 se muestra el comportamiento de las cepas en presencia de Xilenos, la cepa UH-3 presentó menor población en presencia de los Xilenos; las cepas MH-3 y PH-4 mostraron un decaimiento poblacional a partir de 800ppm, las cepas CH-13 y PaH-2 disminuyeron su población en presencia de 1000ppm de Xilenos. Este comportamiento se puede atribuir a que la Mezcla de Xilenos puede ser un compuesto tóxico para las bacterias en diferentes concentraciones. Por otro lado, la cepa RH-13 continuó presentando poblaciones altas en presencia del compuesto aromático.

Cepas de mismo género y especie pueden presentar o no crecimiento a diferentes compuestos aromáticos, la cepa RH-13 creció de forma similar a las concentraciones bajas de xileno, pero las cepas CH-13 y PH-4 disminuyeron drásticamente su población, una posible causa es que la toxicidad de los isómeros de xilenos para las bacterias. Se ha reportado que en dos cepas de *R. eutropha* que fueron crecidas en presencia de *o*-*m*-*p*-xileno de manera individual, sólo una presentó crecimiento en presencia de *o*-xileno. El

crecimiento de *R. eutropha* en *o*-xileno tuvo una población al rededor $1x10^8$ UFC/mL. Las poblaciones de las cepas probadas en este trabajo fueron mayores a de 10^9 UFC/ml en presencia de la mezcla de xilenos, aunque las cepas PaH-2, UH-3, CH-13 y PH-4 fueron menor que el tratamiento sin xilenos. Algunos autores describen que *o*-xileno es el isómero más recalcitrante y tóxico de los xilenos, lo cual explicaría el comportamiento de las cepas con este aromático. (Lee & Lee, 2001; Hutchins, 1991).

Tabla 11 Poblaciones de las cepas en mezcla de Benceno, Tolueno y Xileno (1:1:1)

Cepas	Benceno Tolueno Xileno (ppm)	
	0	1000
PaH-2	4.66	3.15
UH-3	5.30	3.16
CH-13	32.15	18.69
MH-3	27.93	0.00
PH-4	21.52	20.96
RH-13	44.04	18.61

Los valores representan el promedio de 3 repeticiones. Población en UFC/mL por 10^9.

Finalmente, el ensayo que se realizó con 1000 ppm de BTX relación 1:1:1 mostró que casi todas las cepas presenten poblaciones menores, a excepción de la cepa PH-4, que mostró un crecimiento similar a la concentración 00.

Se puede atribuir que a ciertas concentraciones de Benceno, Tolueno o Xileno, las bacterias los pueden utilizar como fuente de carbono, lo cual podría ayudar en un proceso de fitorremediación. An (2004), ensayó el crecimiento de *Sorghum bicolor* y *Cucumis sativus* en suelo con BTEX, observó que estas cepas tuvieron un mejor crecimiento de raíz y hojas en presencia de los contaminantes.

Degradación de BTX

Las cepas UH-3 y RH-13 fueron seleccionadas por su capacidad de crecimiento mostrado en presencia de los hidrocarburos ensayados. En tabla 12 se puede observar el comportamiento de la degradación de los hidrocarburos, el etilbenceno aparece debido a que la mezcla de xilenos contiene un ligero porcentaje de etilbenceno; esto se puede

atribuir a su modo de obtención. A pesar de que la población de la cepa UH-3 fue mucho menor a la RH-13, respecto a la degradación, esta cepa puede ocupar como fuente de carbono el benceno y tolueno, ya que los xilenos fueron los compuestos menos degradados. Por otro lado, la cepa RH-13 tiene la capacidad de degradar benceno pero el resto de los hidrocarburos son degradados en concentraciones más bajas. La presencia de los aromáticos no impide la producción de biomasa, lo cual nos indica que no son tóxicos para esta bacteria y pueden continuar con sus procesos fisiológicos sin problema.

Tabla 12 Porcentaje de degradación de hidrocarburos

Cepa	Porcentaje de los contaminantes degradados			
	Benceno	Tolueno	Mezcla de Xilenos	Etilbenceno
UH-3	76.76%	76.01%	1.48%	12.77%
RH-13	62.31%	33.47%	16.84%	25.09%

Benceno, Tolueno a 1000ppm, Mezcla de Xilenos con Etilbenceno a 800ppm. Los resultados mostrados son el promedio de 3 repeticiones.

La solubilidad que tienen los compuestos aromáticos debe ser considerada en un proceso de remediación. En algunos países como Brasil y EUA la gasolina es mezclada hasta con el 22 % de etanol, lo que ocasiona que los compuestos aromático sean más solubles en agua y con ello hacer más complejo el proceso de degradación de esos hidrocarburos (da Cunha & Leite, 2000). Österreicher Cunha, y otros, (2009) sugieren que la presencia de etanol puede cambiar sustancialmente los procesos de degradación, además de que al realizar los análisis por cromatografía observaron que se detectaron menor cantidad de BTEX cuando la gasolina contenía etanol.

Durante los ensayos de resistencia a BTX, se observó que los xilenos fueron los compuestos más tóxicos para las bacterias, por lo que en disminuyó la concentración a 800ppm, como reportado por Lee & Lee en el 2001, donde utilizaron 3.0mg de Benceno, Tolueno, Etilbenceno y 1.5mg de *o*-xileno debido a la toxicidad de este isómero.

La degradación de gasolina y BTEX por bacterias fijadoras de nitrógeno, ha sido reportada, siendo el primer día el de mayor degradación sin afectar la actividad de la nitrogenasa (Prantera, Drozdowicz, Gomes Leite, & Soares Rosado, 2002); en este trabajo se observa que las cepas RH-13 y UH-3 son capaces de degradar BTX.

El uso de estas bacterias en procesos de biorremedición-bioaumentación, pudiera ser factible, ya que al cultivarlos en suelo en combinación con otros géneros pueden ser fundamentales para los procesos del suelo como lo han sugerido otros autores (Prantera y otros, 2002).

3.5 Actividad reductora de acetileno más diésel

Debido a la baja capacidad de reducción de acetileno de las cepas IH-7 y PaH2, éstas no fueron incluidas en este ensayo; las cepas CeH-1, CeH-1ª, UH-3, CH-13, MH-3, PH-4 y RH-13 fueron probadas para su actividad de ARA. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 13:

Tabla 13 Etileno producido por la actividad de la nitrogenasa en presencia de diésel

Tratamiento	N	N5	N10	D5	D10
Cepa	$nMC_2H_4/h*mL$				
Control	5.82	3.67	4.46	8.69	6.57
CeH-1	106.72	103.12	85.59	7.76	8.75
CeH-1°	96.18	125.89	108.75	8.25	6.43
UH-3	28.68	43.49	71.30	9.63	8.65
CH-13	97.25	69.78	115.24	6.85	9.01
MH-13	82.35	88.84	69.10	23.65	25.00
PH-4	106.07	87.10	134.45	10.37	26.25
RH-13	75.52	75.58	151.32	11.78	26.67

N=NFb con ácido málico y sin hidrocarburo. N5=NFb con ácido málico+5000ppm de diésel. N10=NFb con ácido málico+10000ppm de diésel D5=NFb sin ácido málico+5000ppm de diésel. D10=NFb sin ácido málico+10000ppm de diésel. $nMC_2H_4/h*mL$=nanomoles de etileno entre el tiempo de incubación por mililitro.

, Todas las cepas presentaron una mejor producción de etileno cuando el medio de cultivo tiene una fuente de carbono primaria, mostrando valores de 43.49 a 125.89$nMC_2H_4/h*mL$ en viales con 5,000ppm de diésel y de 69.10 a 151.32$nMC_2H_4/h*mL$ cuando los viales tienen 10,000ppm de diésel. En la tabla 13 se observa que el control negativo muestra la

presencia de etileno, esto se puede deber a que el acetileno se produce a través de la reacción exotérmica del carburo de calcio con agua, además de que el diésel puede tener compuestos que muestren alguna señal en el mismo tiempo de retención que el etileno, sin embargo, esto no cambia la actividad mostrada por las cepas MH-13, PH-4 y RH-13, que pudieran ser capaces de fijar pequeñas cantidades de nitrógeno en plantas o en suelo cuando éstos se encuentran contaminados por hidrocarburos fracción media como fuente única de carbono y energía.

Prantera y otros (2002), probaron el efecto que tiene la gasolina como fuente de carbono para las cepas que aislaron de suelo, mostrando que en una hora son capaces de producir hasta 20.95 nanomoles de etileno usando gasolina como única fuente de carbono al 5%(v/v).

Podemos suponer que mientras la fuente de carbono y energía sea un compuesto orgánico, se puede probar la fijación de nitrógeno de las cepas utilizando diferentes contaminantes orgánicos, La celulosa es un compuesto orgánico donde su elaboración causa diversos impactos ambientales, pero sus derivados pueden ser utilizados como fuente de carbono. *Paenibacillus polymyxa* es una especie bacteriana que al evaluar la capacidad que tiene para reducir acetileno, puede utilizar la carboximetilcelulosa como fuente de carbono y así poder formar azúcares solubles donde la actividad de la nitrogenasa para las 2 cepas evaluadas fue de 2.9nMC_2H_4/h*mL y 0.4nMC_2H_4/h*mL (Górska, y otros, 2015).

Conclusiones

- Las cepas CeH-1, CeH-1ª, UH-3, CH-13, MH-3, PH-4 y RH-13 mantuvieron la capacidad de fijar nitrógeno.
- Las cepas color Rojo Escarlata mostraron menor crecimiento en presencia de gasolina que aquellas que tienen coloración Naranja, lo cual indica que necesitan un proceso de adaptación.
- Las bacterias necesitan una fuente de carbono primaria en concentraciones adecuadas para poder metabolizar o co-metabolizar los hidrocarburos.
- Las cepas color Naranja presentaron mayor crecimiento en presencia de gasolina.
- Las cepas CH-13, MH-3 y RH-13 pueden resistir concentraciones hasta de 3000ppm de Benceno.
- La presencia de Benceno y Tolueno no inhibe el crecimiento de las cepas en concentraciones hasta de 1000ppm,
- La mezcla de Xilenos puede ser tóxica para la mayoría de las bacterias, ya que sólo las cepas MH-3 y RH-13 crecieron hasta en 1000ppm.
- Las cepas UH-3 y RH-13 son capaces de metabolizar o co-metabolizar Benceno y Tolueno como fuente secundaria de carbono.
- Las cepas CeH-1, CeH-1ª, UH-3, CH-13, MH-3, PH-4 y RH-13 son capaces de fijar nitrógeno en presencia de hidrocarburos acompañados de una fuente de carbono primaria.
- Sólo las cepas MH-3, PH-4 y RH-13 muestran actividad de la enzima nitrogenasa en presencia de hidrocarburos fracción media como fuente única de carbono.

Referencias

Abuhamed, T., Bayraktar, E., Mehmetoglu, T., & Mehmetoglu, Ü. (2004). Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. *Process Biochemistry, 39*(8), 983.988.

Alexander, M. (1999). *Biodegradation and Bioremediation* (Second Edition ed.). Academic Press.

Alvarez, P. J., & Vogel, T. M. (1995). Degradation of BTEX and their aerobic metabolites by indigenous microorganisms under nitrate reducing conditions. *Water Science & Technology, 31*(1), 15-28.

An, Y. J. (2004). Toxicity of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene (BTEX) Mixtures to *Sorghum bicolor* and *Cucumis sativus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 72*, 1006-1011.

Arshad, M., & Frankenberger, W. T. (1997). Plant Growth-Regulating Substances in the Rhizosphere: Microbial Production and Functions. *Advances in Agronomy, 62*, 45-151.

Ashraf, M., Maah, M., & Yusoff, I. (2014). Soil Contamination, Risk Assessment and Remediation. In M. Hernandez Soriano (Ed.), *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination* (Vol. 1, pp. 3-56). INTECH.

Ashraf, M., Rasool, M., & Mirza, M. (2011). Nitrogen Fixation and Indole Acetic Acid Production Potential of Bacteria Isolated from Rhizosphere of Sugarcane (*Saccharum officinarum L.*). *Advances in Biological Research, 5*(6), 348-355.

ATSDR. (2010). *Manangin Hazardous Materials Incidents.* Retrieved May 28, 2018, from Benzene: https://www.atsdr.cdc.gov/MHMI/mmg3.pdf

Baker, K. H., & Herson, D. S. (1994). Microbiology and Biodegradation. In K. H. Baker, & D. S. Herson (Eds.), *Bioremediation* (pp. 9-60). United States of America: McGraw-Hill.

Baldani, V. L., & Döbereiner, J. (1980). Host-Plant specifity in the infection of cereals with *Azospirillum spp. Soil Biol. Biochem., 12*, 433-439.

Banco Mundial. (2017). *Agricultura, valor agregado (% del PIB)*. Recuperado Enero 06, 2018, de https://datos.bancomundial.org/indicador/NV.AGR.TOTL.ZS?end=2016&start=2008&view=chart

Barathi, S., & Vasudevan, N. (2001). Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International, 26*, 413-416.

Bashan, Y., Holguin, G., & de-Bashan, L. E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology, 50*(8), 521-577.

Bastarrachea, F., Zamudio, M., & Rivas, R. (1988). Non-encapsulated mutants of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipofeum. Canadian Journal of Microbiology, 34*(1), 24-29.

Bishnoi, U. (2015). PGPR Interaction: An Ecofriendly Approach Promoting the Sustainable Agriculture System. In H. Bais, & J. Sherrier (Eds.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 75, pp. 81-113). Elsevier.

Cano García, V. d. (2012). *Producción de auxinas por bacterias del género Azospirillum aisladas de ambientes contaminados en presencia de diésel.* (Tesis de Licenciatura), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

Casas Flores, R. (2011). *El suelo de cultivo y las condiciones climáticas.* España: Paraninfo S.A.

Castillo, P., Molina, R., Andrade, A., Vigliocco, A., Alemano, S., & Cassán, F. D. (2015). Phytohormones and Other Plant Growth Regulators Produced by PGPR: The Genus *Azospirillum*. In F. D. Cassán, Y. Okon, & C. M. Creus (Eds.), *Handbook for Azospirillum Technical Issues and Protocols* (pp. 115-138). Springer.

Cavazos Arroyo, J., Pérez Armendáriz, B., & Mauricio Guitiérrez, A. (2014). Afectaciones y Consecuencias de los Derrames de Hidrocarburos en Suelos Agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo, 11*(4), 539-550.

Chen, X; Li, N; Kong, Z; Ong, W.-J.; Zhao, X. (2017). Photocatalytic fixation of nitrogen to ammonia: state-of-the-art advancements and future prospects. *Materials Horizons, 5*, (9-27).

da Cunha, C. D., & Leite, S. G. (2000). Gasoline biodegradation in different soil microcosms. *Brazilian Journal of Microbiology, 31*(1), 45-49.

de Boer, J., & Walgelmans, M. (2016). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil – Practical Options for Remediation. *Clean Soil Air Water, 44*, 648-653.

Dekhil, S. B., Cahill, M., Stackebrandt, E., & Sly, L. I. (1997). Transfer of *Conglomeromonas largomobilis subsp. largomobilis* to the Genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile comb. nov.*, and Elevation of *Conglomeromonas largomobilis subsp. parooensis* to the New Type Species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis sp. nov*. *Systematic and Applied Microbiology, 20*(1), 72-77.

Dos Santos, J. J., & Maranho, L. T. (2018). Rhizospheric microorganisms as a solution for the recovery of soils contaminated by petroleum: A review. *Journal of Environmental Management, 210*, 104-113.

Eckert, B., Weber, O. B., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M., & Hartmann, A. (2001). *Azospirillum doebereinerae sp. nov.*, a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass Miscanthus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51*, 17-26.

Elmerich, C., Zimmer, W., & Vieille, C. (1992). Associative Nitrogen-Fixing Bacteria. In G. Stacey, R. H. Burris, & H. J. Evans, *Biological Nitrogen Fixation* (pp. 212-258). New York: Chapman and Hall.

Franche, C., Lindström, K., & Elmerich, C. (2009). Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil, 321*, 35-59.

Fuentes, F., & Massol Deyá, A. (2002). Enumeración Bacteriana: El Número Más Problable. En *Manual de Laboratorios Ecología de Microorganismos.* Puerto Rico: Universidad de Puerto Rico. Recuperado de http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p4-nmpenumeracion.pdf

García, J. E., Maroniche, G. A., Creus, C. M., Suárez Rodríguez, R., Ramírez Trujillo, J. A., & Groppa, M. D. (2017). In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of diffetent *Azozpirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. *Microbiological research, 202*, 21-29.

Gimsing, A. L., Hansen, J. B., Permild, E., Schwarz, G., & Hansen, E. (2009). *In-situ bioremediation of oil contaminated soil practical experiences from Denmark.* Retrieved Enero 07, 2018, from EUGRIS: http://www.eugris.info/newsdownloads/GreenRemediation/pdf/D05_AnneLouiseGimsing_Paper.pdf

Gobierno del Estado de Puebla. (2014). *Plan de Desarrollo Municipal de Acatzingo, Puebla 2014-2018.* Orden Jurídico Poblano, Secretaría General de Gobierno, Puebla.

Górska, E., Dobrzyński, J., Jankiewicz, U., Kwasowski, W., Russel, S., Pietkiewicz, S., . . . Kowalczyk, P. (2015). Degradation and Colonization of Cellulose by Diazotrophic Strains of *Paenibacillus polymyxa* Isolated from Soil. *Journal of Bioremediation & Biodegradation, 6*(2), 271.

Gupta, R. D. (2006). *Environment Pollution: Hazards And Control* (First ed.). New Delhi, India: Concept Publishing Company.

Hutchins, S. R. (1991). Optimizind BTEX biodegradation under denitrifying conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry, 10*(11), 1437-1448.

INAFED. (2017). *Acatzingo*. Recuperado Enero 06, 2018, de Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México: http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM21puebla/municipios/21004a.html

INEGI. (2016)[a]. Recuperado Enero 22, 2018, de Estadísticas a Propósito del... Día del Trabajador Agrícola: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/agricola2016_0.pdf

INEGI. (2016)[b]. *Número de terrenos y superficie total principalmente con actividad agrícola según tipo de agricultura por entidad federativa y municipio.* INEGI, México. Recuperado Enero 25, 2018, de http://www.beta.inegi.org.mx

Iqbal, A., Arshad, M., Hashmi, I., Karthikeyan, R., Gentry, T. J., & Schwab, A. P. (2017). Biodegradation of phenol and benzene by endophytic bacterial strains isolated from refinery wastewater-fed *Cannabis sativa*. *Environmental Technology, 39*(13), 1705-1714.

Khammas, K. M., Ageron, E., Grimont, P. A., & Kaiser, P. (1989). *Azospirillum irakense sp. nov.*, a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology, 140*(9), 679-693.

Lavrinenko, K., Chernousova, E., Gridneva, E., Dubinina, G., Akimov, V., Kuever, J., . . . Grabovich, M. (2010). *Azospirillum thiophilum sp. nov.*, a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60*, 2832-2837.

Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews, 54*(3), 305-315.

Lee, S. K., & Lee, S. B. (2001). Isolation and characterization of a thermotolerant bacterium *Ralstonia sp.* strain PHS1 that degrades benzene, toluene, athylbenzene, and o-xylene. *Applied Microbiology and Biotechnology, 56*(1-2), 270-275.

Lin, S. Y., Hameed, A., Liu, Y. C., Hsu, Y. H., Lai, W. A., Shen, F. T., & Young, C. C. (2015). *Azospirillum soli sp. nov.*, a nitrogen-fixing species isolated from agricultural soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 65*, 4601-4607.

Lin, S. Y., Liu, Y. C., Hameed, A., Hsu, Y. H., Huang, H. I., Lai, W. A., & Young, C. C. (2016). *Azospirillum agricola sp. nov.*, a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1453-1458.

Lin, S. Y., Liu, Y. C., Hameed, A., Hsu, Y. H., Lai, W. A., Shen, F. T., & Young, C. C. (2013). *Azospirillum fermentarium sp. nov.*, a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63*, 3762-3768.

Lin, S. Y., Shen, F. T., Young, L. S., Zhu, Z. L., Chen, W. M., & Young, C. C. (2012). *Azospirillum formosense sp. nov.*, a diazotroph from agricultural soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62*, 1185-1190.

Lin, S. Y., Young, C. C., Hupfer, H., Siering, C., Arun, A. B., Chen, W. M., . . . Yassin, A. F. (2009). *Azospirillum picis sp. nov.*, isolated from discarded tar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*(59), 761-765.

Magalhães, F. M., Baldani, J. I., Souto, S. M., Kuykendall, J. R., & Döbereiner, J. (1983). A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências, 55*, 417-430.

Maltempi de Souza, E., & de Oliveira Pedrosa, F. (2015). Inorganic Nitrogen Metabolism in *Azospirillum spp.* In F. D. Cassán, Y. Okon, & C. M. Creus (Eds.), *Handbook for Azospirillum Technical Issues and Protocols* (pp. 139-154). Springer.

Martínez Carrera, M. (2016). *Evaluación de inoculante mixto para la biorremediación en suelos contaminados con diésel.* (Tesis de Licenciatura), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

Mascarua Esparza, M. A., Villa González, R., & Caballero Mellado, J. (1988). Acetylene reduction and indoleacetic acid production by *Azospirillum* isolates from Cactaceous plants. *Plant and Soil, 106*, 91-95.

Mehnaz, S., Weselowski, B., & Lazarovits, G. (2007)[a]. *Azospirillum canadense sp. nov.*, a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57*, 620-624.

Mehnaz, S., Weselowski, B., & Lazarovits, G. (2007)[b]. *Azospirillum zeae sp. nov.*, a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57*, 2805-28-09.

Morrison, R. T., & Boyd, R. N. (2002). Benzene Aromatic Character. In *Organic Chemistry* (pp. 39-74). New Delhi: Prentice-Hall.

Navarro García, G., & Navarro Blaya, S. (2003). *Química Agrícola* (Primera ed.). Madrid, España: Mundi-Prensa.

NOM-138-SEMARNAT/SSA1. (2012). *Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación.* Recuperado Enero 22, 2018, de Diario Oficial de la Federación: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5313544&fecha=10/09/2013

Olah, G. A., Molnár, Á., & Prakash, G. S. (2018). Introduction and General Aspects. In *Hydrocarbon Chemistry* (Third ed., pp. 1-38). USA: Wiley.

Österreicher Cunha, P., Vargas, E. A., Guimara˜es, J. R., Lago, G. P., Antunes, F. S., & da Silva, M. I. (2009). Effect of ethanol on the biodegradation of gasoline in an unsaturated tropical spoil. *International Biodeterioration & Biodegradation, 63*, 208-216.

Oyetibo, G. O., Ilori, M. O., Obayori, O. S., & Amund, O. O. (2013). Biodegradation of petroleum hydrocarbons in the presence of nickel and cobalt. *Journal of Basic Microbiology, 53*, 1-11.

Palit, S., Sharma, A., & Talukder, G. (1994). Effects of cobalt on plants. *The Botanical Review, 60*(2), 149-181.

PEMEX. (2014, Agosto 8). *Hojas de seguridad.* Recuperado Enero 18, 2018, de Productos: Pemex Magna, Pemex Premium: http://www.pemex.com/comercializacion/productos/Paginas/default.aspx

PEMEX. (2016). *Anuario Estadístico.* Recuperado Enero 25, 2018, de PEMEX: http://www.pemex.com/ri/Publicaciones/Anuario%20Estadistico%20Archivos/anuario-estadistico-2016.pdf

PEMEX. (2017). *Petróleos Mexicanos*. Recuperado Abril 1, 2017, de http://www.pemex.com/nuestro-negocio/logistica/Paginas/ductos.aspx

PEMEX. (2018). *Reporte de tomas clandestinas*. Recuperado Enero 18, 2018, de PEMEX: http://www.pemex.com/acerca/informes_publicaciones/Paginas/tomas-clandestinas.aspx

Peng, G., Wang, H., Zhang, G., Hou, W., Liu, Y., Wang, E. T., & Tan, Z. (2006). *Azospirillum melinis sp. nov.*, a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56*, 1263-1271.

Pérez Elizalde, B. J. (2018). *Fitorremediación de suelo agrícola contaminado con diésel empleando plantas de maíz inoculadas.* (Tesis de Licenciatura), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

Pérez, C. (2017, Diciembre 04). 71 hectáreas de cultivo dañadas por derrames de huachicol en Puebla. *Diario Cambio*. Recuperado Enero 06, 2018, de http://www.diariocambio.com.mx/2017/zoon-politikon/item/27909-71-hectareas-de-cultivo-danadas-por-derrames-de-huachicol-en-puebla

Postgate, J. (1998). *Nitrogen Fixation* (Third ed.). United Kingdom: Cambridge University Press.

Prantera, M. T., Drozdowicz, A., Gomes Leite, S., & Soares Rosado, A. (2002). Degradation of gasoline aromatic hydrocarbons by two N2-fixing soil bacteria. *Biotechnology Letters, 24*(1), 85-89.

Prince, R. C., Parkerton, T. F., & Lee, C. (2007). The Primary Aerobic Biodegradation of Gasoline Hydrocarbons. *Environmental Science & Technology, 41*(9), 3316-3321.

PROFEPA. (2016). *Informe de Actividades 2016.* México: PROFEPA.

Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., Pot, B., Gillis, M., Kersters, K., . . . De Ley, J. (1987). *Azospirillum halopraeferens sp. nov.*, a Nitrogen-Fixing Organism Associated with Roots of Kallar Grass (Leptochloa fusca (L.) Kunth). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 37*, 43-51.

Reis, V. M., Baldani, V. L., & Baldani, J. I. (2015). Isolation, Identification and Biochemical Characterization of *Azospirillum spp.* and Other Nitrogen-Fixing Bacteria. In F. Cassán, Y. Okon, & C. Creus (Eds.), *Handbook for Azospirillum* (pp. 3-26). Springer Cham.

Rodríguez Cáceres, E. A. (1982). Improved Medium for Isolation of *Azospirillum spp. Applied and Environmental Microbiology, 44*(4), 990-991.

Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*(17), 319-339.

S. Cerqueira, V., B. Hollenbach, E., Maboni, F., O. Camargo, F. A., R. Peralba, M., & M. Bento, F. (2012). Bioprospection and selection of bacteria isolated from environments contaminated with petrochemical residues for application in bioremediation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28*, 1203-1222.

Sánchez Varguez, K. M. (2018). *Evaluación de cultivos mixtos bacterianos para la biorremediación de suelos contaminados con diésel.* (Tesis. de Licenciatura), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

Shim, H., & Yang, S. T. (1999). Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immbilized in a fibrous-bed bioreactor. *Journal of Biotechnology, 67*, 99-112.

Speight, J. G. (2014). *The Chemistry and Technology of Petroleum* (Fifth ed.). USA: Taylor & Francis Group.

Sprent, J. I. (1987). *The Ecology Of The Nitrogen Cycle.* Cambridge: Cambridge University Press.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology* (Fifth ed.). Sinauer Associates, Inc.

Tarrand, J. J., Krieg, N. R., & Döbereiner, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum gen. nov.* and two species, *Azospirillum lipoferum (Beijerinck) comb. nov.* and *Azospirillum brasilense sp. nov. Canadian Journal of Microbiology, 24*(8), 967-980.

Torsvik, V., Ovreas, L., & Thingstad, T. F. (2002). Prokaryotic Diversity-Magnitude, Dinamics, and Controlling Factors. *Environmental Microbiology, 296*(5570), 1064-1066.

Tyagi, S., & Singh, D. K. (2014). *Azospirillum himalayense sp. nov.*, a nifH bacterium isolated from Himalayan valley soil, India. *Annals of Microbiology, 64*(1), 259-266.

Venieraki, A., Dimou, M., Vezyri, E., Kefalogianni, I., Argyris, N., Liara, G., . . . Katinakis, P. (2011). Characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from field-grown barley, oat, and wheat. *The Journal of Microbiology, 49*, 525-534.

Xie, C. H., & Yokota, A. (2005). *Azospirillum oryzae sp. nov.*, a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55*, 1435-1438.

Yardley-Jones, A., Anderson, D., & Parke, D. V. (1991). The toxicity of benzene and its metabolism and molecular pathology in human risk assessment. *Occupational and Environmental Medicine, 48*, 437-444.

Young, C. C., Hupfer, H., Siering, C., Ho, M. J., Arun, A. B., Lai, W. A., . . . Yassin, A. F. (2008). *Azospirillum rugosum sp. nov.*, isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*(58), 959-963.

Zahid, M., Abbasi, M. K., Hameed, S., & Rahim, N. (2015). Isolation and identification of indigenous plant growth promoting rhizobacteria from Himalayan region of Kashmir and their effect on improving growth and nutrient contents of maize (*Zea mays L.*). *Frontiers in Microbiology, 6*, 1-10.

Zhou, E., & Crawford, R. L. (1995). Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. *Biodegradation, 6*(2), 127-140.

Zhou, Q., Cai, Z., Zhang, Z., & Liu, W. (2011). Ecological Remediation of Hydrocarbon Contaminated Soils with Weed Plant. *Journal of Resources and Ecology, 2*(2), 97-105.

Zhou, S., Han, L., Wang, Y., Yang, G., Zhuang, L., & Hu, P. (2013). *Azospirillum humicireducens sp. nov.*, a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63*, 2618-2624.

Zhou, Y., Wei, W., Wang, X., Xu, L., & Lai, R. (2009). *Azospirillum palatum sp. nov.*, isolated from forest soil in Zhejiang province, China. *The Journal of General and Applied Microbiology, 55*, 1-7.

Anexo: Medios de Cultivo

Rojo Congo pH 6.8

Compuesto	Cantidad por litro
Ácido Málico	5gr
Fosfato de potasio dibásico al10%	5mL
Sulfato de magnesio al 10%	2mL
Cloruro de sodio al 10%	1mL
Extracto de levadura	500mg
Cloruro férrico (150mg/10mL)	1mL
Rojo congo (1:400)	18mL
Hidróxido de potasio	4.2gr
Agar bacteriológico	18gr

NFb pH 6.8

Compuesto	Cantidad por litro
Ácido Málico	5gr
Fosfato de potasio dibásico al10%	5mL
Sulfato de magnesio al 10%	2mL
Cloruro de sodio al 10%	1mL
Cloruro de calcio al 1%	2mL
Sulfato ferroso (0.04gr/10mL)	1mL
Hidróxido de potasio	4.2gr
Biotina (1mg/100mL)	1mL
Piroxidal (1mg/100mL)	1mL
Medio líquido	
Cloruro de amonio	500mg
Extracto de levadura	500mg
Medio semisólido	
Azul de bromotimol	2mL
Agar bacteriológico	2gr

Modificaciones al medio NFb pH 6.8

Compuesto	Cantidad por litro
Ácido Málico	2.5gr
Fosfato de potasio dibásico al10%	5mL
Sulfato de magnesio al 10%	2mL
Cloruro de sodio al 10%	1mL
Cloruro de calcio al 1%	2mL
Sulfato ferroso (0.04gr/10mL)	1mL
Hidróxido de potasio	4.2gr
Biotina (1mg/100mL)	1mL
Piroxidal (1mg/100mL)	1mL
Tiamina (1mg/100mL)	1mL
Cloruro de amonio	763.6mg
Extracto de levadura	500mg
Cloruro de cobalto	25µg
Sulfato cúprico	25µg