BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EVALUACIÓN DE LA BIORREMEDIACIÓN DE DIÉSEL A NIVEL MICROCOSMOS

Tesis para obtener el título de

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Presenta:

ROSALBA GUEVARA AVENDAÑO

Director de Tesis

DRA. AMPARO MAURICIO GUTIÉRREZ

CONACYT-BUAP-ICUAP-Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas

Co-Director:

M. en C. R. ARMANDO TAPIA HERNÁNDEZ

ICUAP - Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas.

Diciembre 2019

El presente trabajo de investigación fue revisado por integrantes del Cuerpo Académico (CA) BUAP 99 “Microbiología del suelo”, por lo que agradece la participación de:

M. en C. Refugio Armando Tapia Hernández

M. en C. Moisés Graciano Carcaño Montiel

Dra. en C. Amparo Mauricio Gutiérrez

Dra. en C. Lucía López Reyes

c.M. en C. Teresita Jiménez Salgado

Diciembre 2019

Dedicatoria

A mis padres

Por toda su comprensión y apoyo

AGRADECIMIENTOS

A la vida por permitirme estar aquí.

A la Universidad Autónoma de Puebla y a la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme estudiar aquí y brindarme todos los conocimientos.

A mi directora de tesis Dra. Amparo Mauricio Gutiérrez por todo su apoyo, comprensión, tiempo, paciencia, amistad, confianza y sobre todo por sus transmitirme sus conocimientos.

Al Dr. Gerardo Landeta por brindarme su apoyo con algunos instrumentos de laboratorio.

Al Dr. Daniel Sihuanca M. por su ayuda en la esterilización de material microbiológico.

A mis sinodales Dra. Dalia Molina R. y el Dr. Daniel Sihuanca M. por sus comentarios referente a mi trabajo.

A mis padres por todo su cariño, comprensión, confianza, apoyo, y sobre todo por la educación y valores que me inculcaron. Gracias por regalarme esta oportunidad.

A mis hermanas y a mi hermano, pero en especial a mis hermanas Cris y Moni, porque siempre están conmigo y para mí.

A mis amigas Carmina y Erika, a quienes les agradezco de todo corazón por toda la ayuda que me brindaron, por su compañía, por todos los momentos agradables, y desagradables que pasamos juntas, sin ellas esta etapa hubiera sido más difícil.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Héctor, Diana, Raúl, por su compañía y ayuda.

A las valiosas amistades que esta hermosa carrera me permitió conocer primeramente a mi amiga Ale Romero, por compartir conmigo su tiempo y por todo su cariño. A Lolita, Azucena, Margarita, Dani, Jazmín y Nancy por todos los buenos momentos.

A mis amiguitos de viajes Josué y Fer, quienes estuvieron en el mejor momento de mi vida, aunque no lo supieron.

A mi amigo Rodrigo por ayudarme en diversas situaciones.

A todas las personas que han sido importantes en mi vida y hemos compartido sonrisas.

INDICE

Dedicatoria

Agradecimientos

RESUMEN……....1

1.INTRODUCCIÓN……..2

2. ANTECEDENTES

2.1 problemática ambiental por el derrame de hidrocarburos en México…...5

2.2 Hidrocarburos…….6

2.3 Técnicas de biorremediación……..……6

2.4 Cometabolismo…….....8

2.5 Aplicación de bacterias en procesos de biorremediación……...8

2.6 Bacterias del género *Pseudomonas*……9

2.7 Bacterias del género *Azospirillum*……9

2.8 Bacterias Termorresistentes (Género *Bacillus*)……...…11

2.9 Aplicación de consorcios bacterianos para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos…….11

2.10 Selección del consorcio bacteriano A5……..…...11

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA…….14

4. JUSTIFICACIÓN……15

5. HIPOTESIS……...16

6. OBJETIVOS……...……17

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diagrama de trabajo……..……18

7.2 Preparación del suelo agrícola para experimentos de biodegradación

7.2.1 Tindalización del Suelo Blanco……..19

7.2.2 Determinación de la densidad del diésel……19

7.2.3 Contaminación con diésel del suelo blanco……..……..20

7.2.4 Determinación parámetros físico y químicos en los tratamientos…….....20
7.2.5 Selección de cepas bacterianas……20

7.3 Diseño experimental…….……22
7.4 Desarrollo del experimento a nivel microcosmo en Sistemas Batch…….…..23
7.4.1 Cuantificación de poblaciones bacterianas en sistemas batch……24

7.4.2 Determinación de la concentración de diésel en los sistemas batch...24

7.4.3 Cromatografía de gases……26

7.5. Análisis de Datos……27
8. Resultados……28
9. Discusión……..43

10. Conclusiones…….....45

11. Referencias bibliográficas……..46

12. Anexos……50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características generales de cepas bacterianas inoculadas…….……21

Tabla 2. Características de los medios específicos de cultivo donde se seleccionaron las diferentes cepas……..……..……24

Tabla 3. Perfil de antibióticos……..25

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.-Determinación de pH en suelo estéril y no estéril de Acatzingo y San Martin Texmelucan……....28

Cuadro 2. Tasa de respiración microbiana de CO_2 acumulativa a 90 días en suelo agrícola de Acatzingo……29

Cuadro 3. Tasa de respiración microbiana de CO_2 acumulativa a 90 días en suelo agrícola de San Martin Texmelucan……..30

Cuadro 4. Capacidad de biodegradación en suelo agrícola de Acatzingo……31

Cuadro 5. Capacidad de biodegradación de diésel en el suelo agrícola de San Martin Texmelucan…….……...31

Cuadro 6: Conteo de bacterias inoculadas en suelo estéril y no estéril de Acatzingo……..……..36

Cuadro 7: Conteo de bacterias inoculadas en suelo estéril y no estéril de San Martin……..….36

Cuadro 8. Conteo de la población bacteriana mesofílica en suelo estéril y no estéril de Acatzingo……...……...….38

Cuadro 9. Conteo de la población bacteriana mesofílica en suelo estéril y no estéril de Acatzingo …..……...38

Cuadro 10. Población bacteriana tolerante a diésel en suelo estéril y suelo no estéril de San Martin…….....40

Cuadro 11. Población bacteriana tolerante a diésel de suelo estéril y suelo no estéril de San Martin ……...…….40

Cuadro 12: Población total fijadora de Nitrógeno en suelo estéril y no estéril de Acatzingo…….42

Cuadro 13. Población total fijadora de Nitrógeno en suelo estéril y no estéril de San Martin……...42

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Gráfica de influencias…….……...……32

Grafica 2. Gráfica de doble proyección…….……..…...……33

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Frasco serológico con mezcla húmeda suelo**+**sustrato, b) titulación con HCl 0.1 N para medir el CO2 y c) sistema de aireación……..……..23

Figura 2. a) Viales de medio NFB semigel con antibióticos, b) microplaca de 24 pozos con caldo nutritivo, para el conteo de las diferentes poblaciones……..……..25

Figura 3. Extracción e inyección del diésel de los tratamientos, a) filtrado de la muestra, b) concentración en viales de 2 ml, c) inyección de la muestra en el cromatógrafo de gases…….…….26

ABREVIATURAS

c/sustrato	Con sustrato
s/sustrato	Sin sustrato
P. ostreatus	*Pleurotus ostreatus*
N_2	Nitrógeno
BHm	Bushnell Hass modificado
CG-FID	Cromatógrafo de Gases con detector de ionización de flama
g	Gramos
NFB	Medio libre de nitrógeno
ml	Mililitro
NMP	Número más probable
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
C:N:P	Carbono, Nitrógeno, Fosforo
SE+S	Suelo estéril más sustrato
SE	Suelo estéril sin sustrato
SNE+S	Suelo estéril más sustrato
SNE	Suelo estéril sin sustrato
°C	Grados centígrados

RESUMEN

Debido a la explotación masiva del petróleo y la falta de medidas de seguridad, en México ocurren derrames de hidrocarburos con frecuencia, donde el estado de Puebla ocupa el tercer lugar a nivel nacional, siendo los municipios de Acatzingo y San Martín Texmelucan los más afectados en derrames de diésel en suelos agrícolas. Se ha recurrido a la biorremediación, que mediante procesos de bioestimulación (adición de nutrientes) y bioaumentación (inoculación de microorganismos) mitiguen este daño ambiental. El diésel contiene de 2000 a 4000 componentes, y se requiere de más de una especie microbiana para la degradación total, por lo tanto, se utilizan consocios microbianos para mayor efectividad. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la biodegradación de diésel por un consorcio bacteriano en suelos agrícolas contaminados de Acatzingo y San Martin Texmelucan Puebla, aprovechando sustratos post-cosecha de *Pleurotus ostreatus* a nivel microcosmos. Fueron ajustados a una relación C:N:P 100:10:1. Se desarrollaron 48 tratamientos: suelo estéril y no estéril con 24000 ppm de diésel enriquecido con/sin sustrato post-cosecha de *Pleurotus ostreatus,* inoculados con un consorcio bacteriano (*Bacillus pumilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas frederiksbergensis* y *Azospirillum brasilense*) y monocultivos alrededor de 10^8 Ufc ml^{-1}; incubados a 29 ^oC por 90 días. Se cuantificó el diésel residual por GC-FID, de acuerdo a la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, pH, humedad y la producción de CO_2 acumulativo a través de la titulación con HCl 0.1 N como producto de la respiración bacteriana. Se cuantificaron las poblaciones bacterianas inoculadas en medios selectivos cada 30 días. Los tratamientos con sustrato post-cosecha e inoculados con el consorcio bacteriano mostraron mayor biodegradación de diésel (54 y 49.6 %) en los suelos de Acatzingo y San Martín Texmelucan, Puebla, así como una mayor respiración microbiana (19.64 y 17.37 x 10^{-4} mmoles de CO_2 /m^2 d). Por lo que, la respiración está ligada al metabolismo degradativo. Además, la inoculación con el consorcio bacteriano presentó un efecto sinérgico al aumentar la degradación de diésel en el rango de 9.7 a 34.2 % con respecto a los monocultivos inoculados. Al final del experimento, el consorcio presentó una población final de 7.41 Log Ufc g^{-1}_{ss} en los dos suelos de diferente lugar, lo que represento el éxito de su sobrevivencia en el sistema contaminado. Las zonas agrícolas afectadas por hidrocarburos necesitan medidas de mitigación ecológicas, este consorcio bacteriano fue obtenido de zonas agrícolas y es promisorio para estudios de escalamiento que permitan recuperar sitios contaminados con hidrocarburos.

1. INTRODUCCIÓN

Los recursos naturales se han explotado para satisfacer las diferentes necesidades del hombre, uno de ellos es el petróleo, este es el resultado de la degradación anaeróbica de materia orgánica durante largos periodos de tiempo y bajo condiciones específicas de temperatura y presión. El petróleo es explotado en muchas partes del mundo por la gran importancia que tiene en diferentes sectores como: el transporte, industria y también como generador de electricidad siendo así el elemento energético más importante de la humanidad (Pardo *et al.,* 2004).

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos alifáticos, y aromáticos también contiene una menor proporción de compuestos que no son hidrocarburos como ácidos nafténicos, fenoles, tioles, compuestos heterocíclicos de nitrógeno, compuestos de azufre y metaloporfirinas. Cada tipo de crudo tiene varios cientos de componentes diferentes; la composición varía según la procedencia del petróleo (Atlas y Bartha, 2002).

La producción de diésel es menos compleja que la producción de gasolina. La composición química del diésel depende en mayor medida del tipo de crudo procesado, debido a que son pocos los procesos químicos destinados a transformar el petróleo crudo en diésel. El diésel se obtiene mayormente de procesos de fraccionamiento o destilación. Un volumen importante proviene del proceso de destilación primaria del cual se separa la fracción de hidrocarburos que destilan aproximadamente entre los 175 y los 370 ^{o}C. En el diésel que produce PEMEX ya sea automotriz, industrial o marino; predominan los hidrocarburos no volátiles de tipo parafínico, arreglados principalmente en cadenas lineales de entre 11 y 22 átomos de carbono, también están presentes algunos compuestos de la familia de los aromáticos, cuya concentración por cuestiones normativas, no puede ser superior a 30% en volumen (Instituto Mexicano del Petróleo, 2014).

Debido a esta explotación masiva del petróleo y la falta de medidas de seguridad al hacerlo, uno de los problemas ambientales más importantes de la actualidad es la contaminación de ecosistemas terrestres y acuáticos por derrames de hidrocarburos de petróleo y sus derivados. En el caso de los suelos, las principales

consecuencias ambientales que se presentan después de un evento de contaminación por hidrocarburos son: la reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal, cambios en la dinámica poblacional de la fauna, la biota microbiana y contaminación por infiltración a cuerpos de agua subterráneos. Además del impacto ambiental negativo, los derrames de hidrocarburos generan impactos de tipo económico, social y de salud pública en las zonas aledañas al lugar afectado (Pardo *et al.,* 2004).

Para la recuperación de zonas contaminadas como suelo y agua, se emplea la biorremediación que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos fundamentalmente bacterias, pero también hongos y levaduras para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples (Glazer y Nikaido, 2007).

Para esto, los compuestos requieren de más de una especie microbiana pues cada microorganismo tiene una capacidad limitada para degradar diferentes moléculas que los conforman. Por lo tanto, se crean consocios microbianos para mayor efectividad en degradación. Dado que los microorganismos se encuentran en una película de agua mientras que el contaminante es hidrofóbico los microorganismos tienen que buscar, generar o aprovechar algún metabolito que favorezca la transferencia de contaminante, esto permite que el toxico se vuelva relativamente soluble en el agua y mediante el proceso de lixiviación se encuentre más disponible para los microorganismos (Arrieta *et al., 2012*).

En el sistema de biorremediación se tiene una tecnología llamada bioestimulación la cual posee un alto porcentaje de efectividad. Esta técnica está basada en la adición de nutrientes (NO_3 y PO_4), sustratos aditivos con actividad superficial para estimular el crecimiento de microorganismos endógenos, como bacterias y hongos, capaces de biodegradar compuestos contaminantes del ambiente. Esta técnica se aplica cuando existen poblaciones autóctonas con capacidad degradativa en la zona contaminada. En consecuencia, los productos del proceso de biodegradación son: dióxido de carbono, agua y biomasa de microorganismos (Pardo *et al.,* 2004). Por lo que, en los últimos veinte años, la producción en México de hongos comestibles ha tenido un crecimiento significativo. Durante el periodo de 1991 a

2011, la producción pasó de 9 mil 036 a 62 mil 374 toneladas de hongos frescos por año. Por lo cual, México se posicionó como el mayor productor de hongos comestibles de Latinoamérica, al generar el 80.8 %. El estado de Puebla ocupa décimo primer lugar en la producción de hongos comestibles a nivel nacional (FORDECYT, 2016). La producción nacional actual de hongos cultivados se estima en poco más de 55 mil toneladas. Más del 85% de la producción corresponde a *Agaricus bisporus* (champiñón), 10% *Pleurotus ostreatus* (seta) y 0.1% a (*Lentinula edodes)* shiitake. Durante la fructificación de los hongos *Pleurotus ostreatus* se liberan enzimas como son: lacasas, manganeso peroxidasas, peroxidasa versátil, veratril alcohol oxidasa estas enzimas se quedan en el sustrato. Después de la cosecha los hongos son comercializados, y el sustrato donde fueron cultivados en la mayoría de las ocasiones son desechados, los sustratos postcosecha son una aportación de nutrientes, microorganismos y mejoradores de suelo (Instituto de Ecología, A.C, Gayosso *et al, (2011*). En el presente estudio el objetivo fue evaluar la biodegradación de diésel con el consorcio bacteriano en suelos agrícolas contaminados de Acatzingo y San Martin Texmelucan Puebla, aprovechando sustratos post-cosecha de *Pleurotus ostreatus* a nivel microcosmos.

2. ANTECEDENTES

2.1 problemática ambiental por el derrame de hidrocarburos en México

Como consecuencia de varios siglos de actividad minera en México y posteriormente, debido a la industria de la química básica, petroquímica y de refinación del petróleo, se han producido cantidades muy grandes, pero muy difíciles de cuantificar de residuos peligrosos (Volke y Velasco, 2002).

Cada año en México se destruye el ambiente por distintas vías, el impacto de la degradación ambiental aumenta progresivamente pues los daños ambientales se suman unos a otros. De acuerdo a datos de INEGI en 2016, los costos por agotamiento y degradación ambiental fueron equivalentes a 4.3% del PIB, de ellos, los relacionados con el agotamiento de hidrocarburos represento el 0.1% y el costo por la degradación del suelo fue de 0.4%.

De acuerdo con PROFEPA se recibieron 655 notificaciones de emergencias ambientales, 259 por derrames de hidrocarburos y otras sustancias químicas, 126 por explosiones, 106 por fugas, 152 por incendios y 12 por otras causas (PROFEPA, 2018). El daño ambiental por hidrocarburos es de 8.7% (INEGI, 2018). La toma clandestina de combustible a Petróleos Mexicanos (Pemex) aumento 50% durante enero de 2019. Durante el primer mes de este año (2019), Pemex sufrió 1,565 tomas clandestinas. El estado de Hidalgo encabezó el mayor número de tomas clandestinas del país con 508 perforaciones, un crecimiento de 265%. En segundo lugar, está el Estado de México (169), y en tercer lugar Puebla (156 tomas) (Forbes, 2019).

En el periodo 2012-2018 San Martín Texmelucan fue el municipio con el mayor número de tomas clandestinas en el estado de Puebla, con un aumento del 404% en los años 2016-2017 y de 273% en el intervalo 2017-2018. El siniestro del pasado 19 de diciembre del 2010 que causó un grave problema ambiental y social por la explosión de un ducto y derrame de petróleo crudo.

Otro de los siniestros con mayor difusión ocurrió el 16 de enero de 2002 en Acatzingo, Puebla, debido a una fuga de petróleo crudo, involucrando víctimas humanas. En esta región, año con año se han detectado otros derrames que han llegado a afectar la vida humana, así como cultivos, sistemas de riego, suelos, animales y medio ambiente (Cavazos *et al*., 2014).

2.2 Hidrocarburos

Los hidrocarburos son los derivados del carbono más sencillos resultan únicamente de la unión de átomos de carbono con átomos de hidrógeno y de carbono entre sí formando cadenas que pueden ser abiertas o cerradas y cuyos “eslabones” pueden estar unidos por enlaces simples o por enlaces múltiples. De esta manera podemos clasificar los hidrocarburos de acuerdo con el tipo de cadena y el tipo de enlace. Según la cadena se clasifican en alifáticos que corresponden a los compuestos de cadena abierta (Demque *et al*.,1997)

2.3 Técnicas de biorremediación

El proceso de biorremediación incluye reacciones de óxido-reducción, procesos de sorción e intercambio iónico e incluso reacciones de acomplejamiento y quelación que resultan en la inmovilización de metales. La biorremediación puede emplear organismos propios del sitio contaminado (autóctonos) o de otros sitios (exógenos), puede realizarse in situ o ex situ, en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno) a fin de reducir la concentración de los mismos hasta niveles permitidos sin la generación de compuestos nocivos (Adams *et al*., 2008).

La biorremediación de suelos contaminados con Hidrocarburos requiere de la aplicación de húmedad y nutrientes básicos como nitrógeno y fósforo o bioestimulación a fin de aumentar la actividad de la microbiota nativa e inducir la mineralización de tales compuestos orgánicos. La proporción óptima de C:N:P para llevar a cabo la biorremediación de suelos contaminados con HC es de 100:10:1 (Acuña *et al*., 2012).

Las técnicas *in situ* buscan estimular y crear un ambiente favorable para el crecimiento microbiano a partir de los contaminantes. Este objetivo generalmente

puede lograrse con el suministro de aire u oxígeno (bioventeo), nutrientes (bioestimulación), microorganismos (bioaumentación) y/o humedad, además del control de temperatura y pH (Singh *et al*., 2011)

- **Bioventeo:** Cuyo objetivo es estimular la biodegradación natural de cualquier compuesto biodegradable en condiciones aerobias. El aire se suministra en el sitio contaminado a través de pozos de extracción, por movimiento forzado (extracción o inyección), con bajas velocidades de flujo, con el fin de proveer solamente el oxígeno necesario para sostener la actividad de microorganismos degradadores. Se utiliza para tratar compuestos orgánicos biodegradables semivolátiles o no volátiles. Favorece la degradación de contaminantes adsorbidos. Se ha utilizado con éxito para remediar suelos contaminados con hidrocarburos, solventes no clorados, pesticidas y conservadores de la madera, entre algunos otros químicos, y se utiliza para tratar compuestos orgánicos biodegradables semivolátiles (COS) o no volátiles. Además de favorecer la degradación de contaminantes adsorbidos, pueden degradarse compuestos orgánicos volátiles (COV), por medio de su movimiento a través del suelo biológicamente activo (Volke y Velasco., 2002).
- **Bioestimulación**: Implica la circulación de soluciones acuosas (que contengan nutrientes y/u oxígeno) a través del suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos o bien, la inmovilización de contaminantes inorgánicos in situ (Singh *et al.,* 2011).
- **Bioaumentación:** Consiste en la adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante en cuestión, para promover su biodegradación o su biotransformación. El tamaño del inóculo a utilizar, depende del tamaño de la zona contaminada, de la dispersión de los contaminantes y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores (Adams *et al*., 1999).
- **Biolabranza:** El método consiste en que al mezclar suelo contaminado con suelo limpio es tratado por medio del arado. El suelo contaminado se mezcla con agentes de volumen y nutrientes, y se remueve periódicamente para

favorecer su aireación. Las condiciones del suelo (pH, temperatura, aireación) se controlan para optimizar la velocidad de degradación y generalmente se incorporan cubiertas u otros métodos para el control de lixiviado. Los contaminantes tratados con éxito por biolabranza, incluyen diésel, gasolinas, lodos aceitosos, pentaclorofenol (PCP), creosota y coque, además de algunos pesticidas e Hidrocarburos totales de Petróleo (HTP) (Alexander, 1994).

2.4 Cometabolismo

El término cometabolismo define la transformación de un compuesto llamado cosustrato, en presencia obligada de un sustrato durante el crecimiento o por células en reposo en ausencia del sustrato de crecimiento El cosustrato o cometabolito no aporta energía, carbono o algún otro nutriente y en consecuencia es incapaz de soportar la replicación celular. El sustrato de crecimiento actúa como un donador de electrones que proporciona poder reductor y energía para el crecimiento y el mantenimiento celular (Perry, 1979).

En un sistema donde coexisten el sustrato y el cosustrato, la tasa de consumo del cosustrato (cometabolismo) está ligada a la tasa de consumo del sustrato y tiende a disminuir con el agotamiento del sustrato o con la acumulación de productos tóxicos (Garcia *et al*., 2008).

2.5 Aplicación de bacterias en procesos de biorremediación

La microbiota edáfica da soporte a la biorremediación de suelos contaminados con derivados del petróleo, lo que ayuda a disminuir la concentración del contaminante en el suelo, transformándolo a CO2, agua y biomasa microbiana. La actividad de los microorganismos presentes en un suelo contaminado con hidrocarburos se puede favorecer al mejorar las condiciones edáficas, con adición de nutrimentos, agua y aplicando aireación (Marín *et al*., 2005).

Uno de los géneros bacterianos más explotados en procesos de biorremediación es *Rhodococcus sps*, un grupo único consistente en microorganismos que presentan una gran diversidad metabólica, capaz de transformar, biodegradar y utilizar como única fuente de carbono compuestos hidrófobos; el *Rhododoccus* poseen una gran variedad de vías metabólicas para la degradación y modificación de compuestos aromáticos, incluyendo las actividades de di-oxigenasa y mono-oxigenasa sobre anillos, así como la actividad de ruptura de catecol. Tienen una amplia capacidad de crecimiento en medios con escasos nutrientes, la carencia de un sistema de represión catabólica y su persistencia ambiental las hacen excelentes candidatas para los tratamientos de biorremediación (Correa, *et al*., 1999).

2.6 Bacterias del género *Pseudomonas*

Las *Pseudomonas* son bacterias productoras de biosurfactantes como los ramnolipidos involucrados en procesos de remoción de aceites y productos relacionados, Bushnell y Hass fueron de los primeros en describir bacterias productoras de biosurfactantes, como el *Corynebacterium simplex* y cepas de *Pseudomonas*.

Las *Pseudomonas* son las bacterias más eficientes en la degradación de compuestos tóxicos (Golovleva *et al*.,1990). La capacidad de estas bacterias para degradar estos compuestos depende del tiempo de contacto con el compuesto, las condiciones ambientales en las que se desarrollen y su versatilidad fisiológica. (Vásquez *et al*., 2002).

2.7 Bacterias del género *Azospirillum*

El género *Azospirillum* fue descrito por Beijerinck en el año 1925, describió una nueva especie de bacteria, aislada a partir de suelo holandés, a la que primeramente nombró *Azotobacter spirillum* y que posteriormente denominó *Spirillum lipoferum*. En 1978, se sugirió agrupar estos organismos en un nuevo género al que se denominó *Azospirillum*. Inicialmente dos especies, *Azospirillum*

lipoferum y *Azospirillum brasilense,* fueron identificadas basándose en diferencias morfológicas y fisiológicas entre varias cepas y en experimentos de homología del DNA (Tarrand *et al*.,1978)

Las bacterias pertenecientes a este género son organismos fijadores de N2 que poseen una amplia distribución ecológica, ya que ha sido posible detectar su presencia en zonas templadas, tropicales y subtropicales. Se describen en la literatura como Gram negativas. Todas las cepas de *Azospirillum* son capaces de fijar nitrógeno atmosférico eficientemente, ya sea como bacteria de vida libre o en asociación con plantas, además de participar en varias transformaciones en el ciclo del nitrógeno (Bashan *et al*.,1990)

Al menos 21 especies de *Azospirillum* han sido descritas, y se han aislado de diferentes plantas, suelos agrícolas, suelos forestales, asfaltos, aguas sulfurosas, humus, suelos contaminados con hidrocarburos. Las cuales son: *A. lipoferum*, *A. brasilense A. amazonense, A. halopraeferans, A. irakense, A. largimobile, A. doebereinerae, A. oryzae, A. melinis, A. canadense, A. zeae, A. rugosum, A. palatum, A. picis, A. thiophilum, A. formosense, A. humicireducens, A. fermetarium, A. himalayense, A. soli,* y *A. agrícola* (Lavrinenko *et al*., 2010; Lin *et al*., 2015; Lin *et al*., 2016; Lin et al., 2013; Lin *et al*., 2012; Lin *et al*., 2009; Tyagi *et al*., 2014; Zhou *et al*., 2013).

Se ha investigado la capacidad de *Azospirillum* en la degradación de compuestos xenobióticos (como el petróleo crudo) y pesticidas (como el glifosato) a nivel in vitro y en prácticas de rizorremediación con plantas de maíz y trigo (Díaz *et al*., 2014; Muratova *et a*l., 2005; Travagliaa *et al*., 2015).

A nivel *in vitro A. brasilense* SR80 degrada 56.5% de petróleo crudo suplementado al 1 % en medio de cultivo (Muratova *et a*l., 2005). En prácticas de rizoremediación se han observado efectos positivos en la promoción del crecimiento, estimulando el sistema de la raíz y la capacidad de degradación del contaminante en maíz y trigo. Se ha reportado que *Azospirillum* puede degradar un 42.4 % de petróleo crudo en suelos agrícolas con una concentración inicial de 32,970 ppm en plantas de maíz, y

un 28.1 % en cultivos hidropónicos con trigo (Díaz *et al*., 2014; Muratova *et al.,* 2005).

2.8 Bacterias Termorresistentes (Género *Bacillus*)

El género *Bacillus* se caracterizan por tener forma de bacilos, son Gram positivos, aerobios estrictos o anaerobios facultativos encapsulados, miden alrededor de 4-10 µm. Una característica que distingue a este género es la formación de sus endoesporas con morfología oval o cilíndrica las cuales resisten condiciones estresantes, estas esporas poseen la capacidad de dispersarse en el aire, por lo que migran a grandes distancias hasta encontrar las condiciones óptimas para su crecimiento, que se desarrolla favorablemente en ambientes con pH ácido y básico entre un rango (5.5- 8.5) y a diferentes temperaturas (-5 ºC a 75 ºC), cuenta con una gran capacidad metabólica que conlleva a una colonización exitosa en la rizósfera, la mayoría de las especies presentan catalasa positiva, también presentan flagelos laterales que le permiten desplazarse de un lugar a otro; producen colonias blanquecinas, grandes, extendidas y son irregulares al crecer Agar Nutritivo o Agar Sangre (Layton *et al*., 2011).

Por otra parte, son microorganismos distribuidos ampliamente en el ambiente suelen encontrarse en el suelo, raíces de las plantas, agua dulce y salada, materia vegetal en descomposición. Igualmente *B. subtilis* se ha aislado en alimentos, incluidas las especias, cacao, legumbres, semillas, y pan (Layton *et al*., 2011).

2.9 Aplicación de consorcios bacterianos para la biorremedición de suelos contaminados por hidrocarburos

Realizaron un estudio de biorremediación de suelo contaminado por diésel, se aisló y caracterizó bioquímica y molecularmente un consorcio bacteriano capaz de degradar los diferentes hidrocarburos presentes en un combustible diésel, conformado por los siguientes géneros: *Enterobacter* sp*, Bacillus* sp*,*

Staphylococcus aureus, Sanguibacter soli, Arthrobacter sp *y Flavobacterium* sp*,* a partir de un suelo contaminado con diesel a escala de laboratorio, y tratado mediante 2 tecnologías de biorremediación: atenuación natural y bioestimulación (Arrieta *et al.,* 2010).

Los géneros aislados han mostrado tener la capacidad metabólica de transformar los hidrocarburos, contenidos en el combustible diésel, transformando las moléculas con características de peligrosidad en subproductos y metabolitos, convirtiendo los elementos tóxicos y mutagénicos en productos que pueden ser reincorporados a los ciclos biogeoquímicos naturales.

En el 2008 Samanez evaluó la capacidad degradador de bacterias, frente a los componentes del petróleo crudo de maneta cuantitativa y cualitativa, mediante el uso de bioestimulación con nitrógeno y potasio, y la bioaumentación. Para el proceso de biodegradación bacteriana, seleccionaron consorcios bacterianos de acuerdo a su capacidad degradativa y emulsificante: *Pseudomonas aeruginosa* TX-5, *Acinetobacter calcoaceticus* T2X-1, *Bacillus* sp. TX-4; y para el proceso de bioestimulación se seleccionó una mezcla de componentes inorgánicos y se formuló la concentración de estos fertilizantes inorgánicos. Sus resultados arrojaron que los componentes del petróleo que sufrieron mayor degradación fueron: n-pentano, n-hexano y n-decano. La reintroducción de microorganismos nativos, tiene mayor efectividad en la biodegradación de petróleo crudo, cuando el microorganismo dispone de fertilizantes inorgánicos (Thijs *et al*., 2014)

2.10 Selección del consorcio bacteriano A5

La Bióloga Karla Marleny Sánchez Varguez realizó su proyecto de tesis en el laboratorio de Microbiología del Suelo “Dr. Jesús Caballero Mellado”-CICM-ICUAP-BUAP y tuvo como objetivo Evaluar consorcios bacterianos para la biodegradación de diésel a nivel *in vitro*. Estudió seis cepas bacterianas del genero *Azospirillum*, cuatro termorresistentes del genero *Bacillus*, cuatro solubilizadoras de fosfatos y dos hidrocarbonoclastas.

Los consorcios seleccionados: C-A1, C-A4, C-A5, y C-C; fueron evaluados de acuerdo a su capacidad de biodegradación a 14 días en medio HBm suplementado con 25308.9 ppm de diésel. De los cuatro consorcios se obtuvo un mayor porcentaje de degradación de diésel en el consorcio A5 (93.27 %) integrado por bacterias: fijadora de nitrógeno *Azospirillum brasilense* (M1HC A5), solubilizadora de fósforo *Pseudomonas frederiksbergensis* (M1HC s-b), termorresistentes *Bacillus pumilus* (M1HC 1b) e hidrocarboclasta *Pseudomonas aeruginosa* (M1HC 15a). Además, esta bacterias fueron identificadas por secuenciación del gen 16S RNA ribosomal.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La explotación de petróleo es una de las actividades más destructivas a nivel mundial por su impacto ambiental ya que se alteran las interrelaciones en el ecosistema involucrado. México es uno de los países con mayor actividad petrolera; siendo PEMEX la industria con mayor peso en la economía del país, por lo tanto, también con mayor contaminación por diversas actividades asociadas en la explotación del Petróleo. De acuerdo con PROFEPA en el 2018 se recibieron 655 notificaciones de emergencias ambientales de los cuales 259 corresponden a derrames de hidrocarburos. En el 2014 la CNH reporto los derrames de petróleo crudo, donde Puebla ocupa el cuarto lugar con el 5 % de derrames registrados. El mantenimiento, derrames, robos y fugas en los ductos de Pemex ha provocado incendios, y daños a cultivos en al menos 20 hectáreas, afectando aproximadamente a 300 ejidatarios y 120 productores en 25 localidades diferentes (Proceso, 2017).

Dentro de los principales municipios afectados se encuentran Acatzingo y San Martin Texmelucan, Puebla, a la fecha se continúan registrando derrames de hidrocarburos, los cuales han llegado a afectar la vida humana, cultivos, sistemas de riego, suelos, y animales. Por lo tanto, es importante rescatar y restaurar los suelos agrícolas con técnicas amigables con el ambiente como la biorremediación.

4. JUSTIFICACIÓN

La contaminación ambiental causada es una consecuencia del progreso industrial. Para evitar el desarrollo de residuos peligrosos, se ha sugerido al proceso de biorremediación como alternativa amigable con el ambiente donde se emplean microorganismos, plantas o productos metabólicos de estos para acelerar el proceso de degradación y transformación de los contaminantes a compuestos menos tóxicos. Los suelos agrícolas de los municipios de Acatzingo y San Martín Texmelucan, Puebla están afectados por derrames de diésel, por lo que es necesario mitigarlos. La presente investigación tiene como objetivo aplicar consorcios bacterianos autóctonos para la biodegradación de diésel a nivel microcosmos. En los consorcios bacterianos existe la interacción de más de una especie con diferentes actividades metabólicas para lograr una degradación completa. La mitigación de suelos agrícolas contaminados con diésel mejorara el sector agrícola, social, económico y ecológico.

5. HIPOTESIS

El consorcio tendrá un efecto sinérgico en cuanto a la capacidad de biodegradación de diésel a nivel microcosmos, que permitirá aprovechar sustratos post-cosecha de *Pleurotus ostreatus* y mitigar la contaminación de los suelos agrícolas.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general:

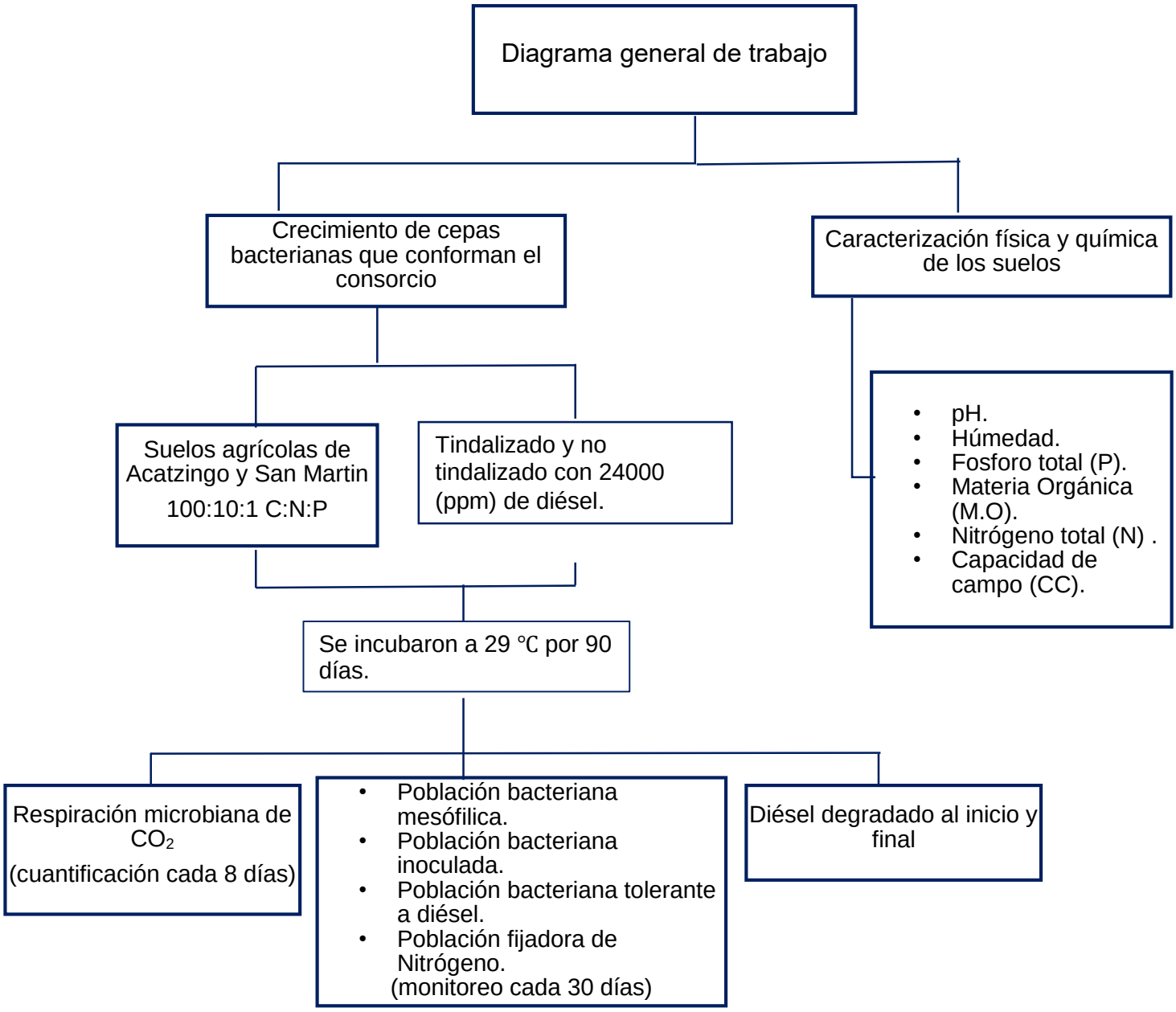
El objetivo del presente trabajo fue evaluar la biodegradación de diésel por un consorcio bacteriano en suelos agrícolas contaminados de Acatzingo y San Martin Texmelucan Puebla, aprovechando sustratos post-cosecha de *Pleurotus ostreatus* a nivel microcosmos.

6.2 Objetivos específicos:

- Análizar parámetros físicos y químicos del suelo y sustrato post-cosecha.
- Evaluar el metabolismo microbiano a través de la producción de CO_2 como consecuencia del proceso de biodegradación del diésel a nivel microcosmos.
- Determinar la biodegradación del diésel a nivel microcosmos.
- Determinar pH en suelos a nivel microcosmos durante la biodegradación.
- Cuantificar las poblaciones bacterianas totales e inoculadas en suelos a nivel microcosmos.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Diagrama de trabajo



Los experimentos se llevaron a cabo en sistemas batch por triplicado con/sin sustrato post-cosecha de *Pleurotus ostreatus* en suelo estéril y no estéril con 24000 ppm de diesel, inoculados por el consorcio bacteriano (*Bacillus pumilus, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas frederiksbergensi, y Azospirillum brasilense*) y monocultivos alrededor de 10^{-8} Ufc/ml^{-1}; incubados a 29 ^{o}C por 90 días.

7.2 Preparación del suelo agrícola para experimentos de biodegradación

Se obtuvo suelo agrícola blanco (no contaminado) y suelo real (contaminado con diésel) de los dos sitios de estudio (Acatzingo y San Martin Texmelucan).

7.2.1 Tindalización del Suelo Blanco

Se esterilizaron muestras de suelo blanco a 10 psi durante dos horas en autoclave cada tercer día (se repitió tres veces este procedimiento) en una semana.

7.2.2 Determinación de la densidad del diésel

Se determinó la densidad del diésel de acuerdo a la fórmula de densidad.

$$\rho = \frac{M}{V}$$

Donde:

ρ = Densidad del diésel, g/ml

M= Masa del diésel registrada en balanza analítica, g

V= Volumen de diésel pesado, ml

La densidad determinada fue de 0.866 g/ml, dicha densidad sirvió para calcular la cantidad que se le adicionó al suelo tindalizado para su contaminación con diésel.

7.2.3 Contaminación con diésel del suelo blanco

Se contaminó el suelo blanco con diésel comercial a 24000 ppm previamente esterilizado (pasar por un filtro con una membrana de tamaño de poro de 0.22 µm de diámetro). Esto se llevó a cabo en un frasco de vidrio de 1L de capacidad con ayuda de una espátula, todo en condiciones de esterilidad.

7.2.4 Determinación parámetros físico y químicos en los tratamientos

Se determinó el porcentaje de Materia orgánica (MO), Nitrógeno (N), al inicio del experimento. El pH se monitoreo al inicio y fin del experimento, conforme a la NOM-021-SEMARNAT-2000.

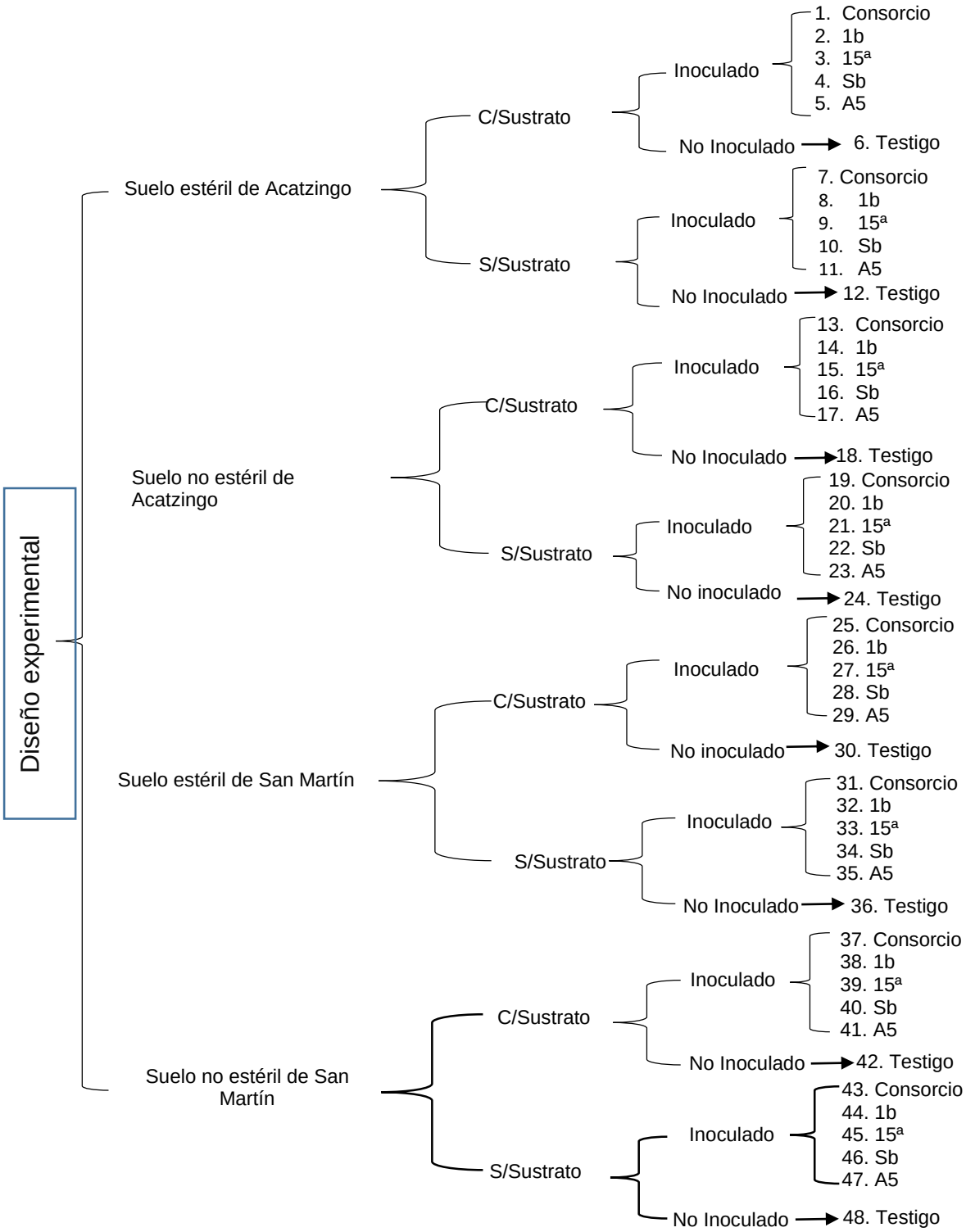
7.2.5 Selección de cepas bacterianas

Se analizó un consorcio microbiano a nivel microcosmos en 8 muestras de suelo cada uno con 6 tratamientos diferentes: 1) suelo no estéril de San Martin y Acatzingo contaminado con diésel con y sin sustrato *Pleurotus ostreatus*. 2) suelo estéril de San Martin y Acatzingo contaminado a la misma cantidad que el suelo no estéril con y sin sustrato *Pleurotus ostreatus*. El consorcio bacteriano está integrado por bacterias: fijadora de nitrógeno *Azospirillum brasilense* (M1HC A5), solubilizadora de fósforo *Pseudomonas frederiksbergensis* (M1HC s-b), termorresistentes *Bacillus pumilus* (M1HC 1b) e hidrocarboclasta *Pseudomonas aeruginosa* (M1HC 15a) pertenecientes al Laboratorio de Microbiología del Suelo “Dr. Jesús Caballero Mellado. Las cepas son originarias de suelos agrícolas contaminados con diésel del municipio de Acatzingo, Puebla (Tabla 1).

Tabla 1. Características generales de cepas bacterianas inoculadas.

Cepa	Clave	Características
Fijadoras de N_2		
Azospirillum brasilense	M1HC A5	Fijadora de N_2, tolerante y biodegradadora de diésel, aislada de suelo agrícola de Acatzingo, Pue.
Termoresistentes		
Bacillus pumilus	M1HC 1b	Termoresistente, tolerante a diésel, emulsificadora y biodegradadora, aislada de suelo agrícola de Acatzingo, Pue.
Solubilizadoras de fosfatos		
Pseudomonas frederiksbergensis	M1HC s-b	Solubilizadora de fosfatos, tolerante a diésel y emulsificadora, aislada de suelo agrícola de Acatzingo, Pue.
Hidrocarbonoclastas		
Pseudomonas aeruginosa	M_1HC 15a	Tolerante a diésel y emulsificadora, aislada de suelo agrícola de Acatzingo, Pue.

7.3 Diseño experimental



7.4 Desarrollo del experimento a nivel microcosmo en Sistemas Batch

El experimento se llevó a cabo con 48 tratamientos diferentes durante 90 días en condiciones de esterilidad a 29 ºC.

Para cada tratamiento se emplearon frascos serológicos de 120 ml de capacidad sellados, previamente se adicionaron 35 g de la mezcla húmeda, suelo + sustrato post coseha de *Pleurotus ostreatus,* en una relación 97:3 es decir el 97% de la mezcla corresponde al suelo y el 3% al sustrato. Así mismo se realizaron los cálculos pertinentes para mantener una dosis de fertilización 100:10:1 (C:N:P) para una óptima realización de los procesos metabólicos para ello se utilizaron soluciones estériles de $(NH_4)_2SO_4$, 4N y K_2HPO_4, 1N; así como también los cálculos para mantener una humedad del 30% con respecto a la capacidad de campo.

También, se evaluó la cantidad de CO_2 producida cada 8 días como una manera indirecta de medir la actividad biológica en el sistema. Se calculó a través de la titulación con HCl 0.1 N. Posteriormente, se aplicó un sistema de aireación con un flujo de aire húmedo de 11.9 ml aire/s.

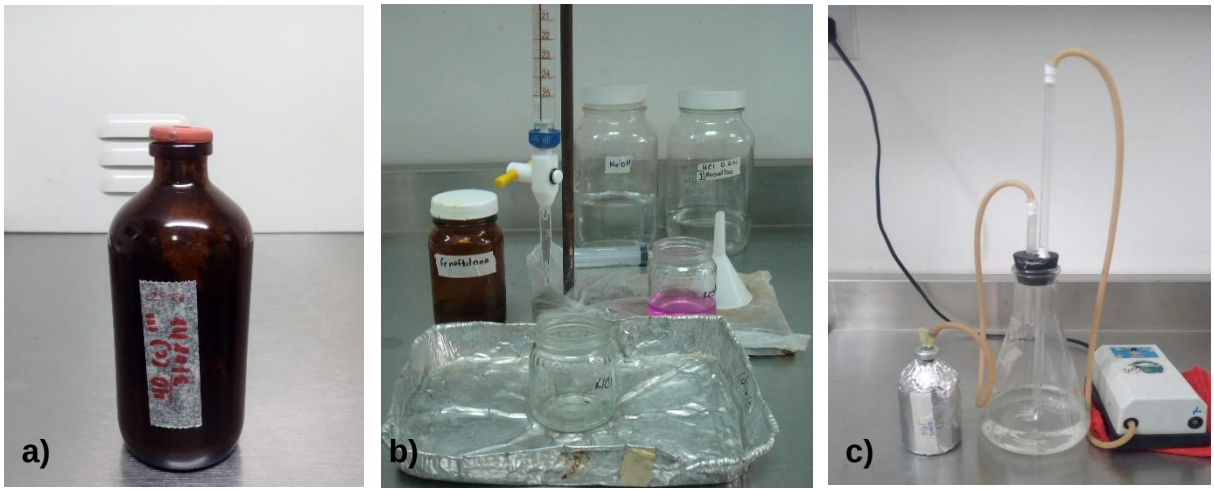


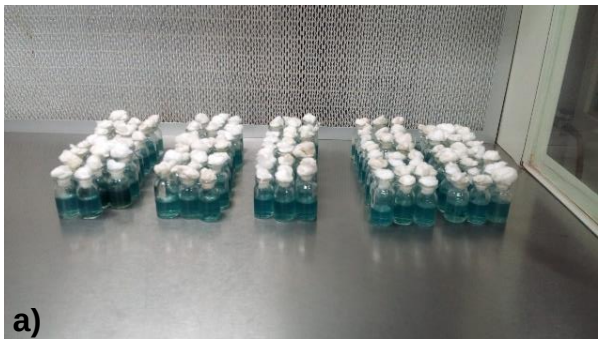
Figura 1. a) Frasco serológico con mezcla húmeda suelo**+**sustrato, b) Titulación con HCl 0.1 N para medir el CO_2 y c) sistema de aireación.

7.4.1 Cuantificación de poblaciones bacterianas en sistemas batch

Se determinó la población bacteriana total e inoculada por técnicas de conteo diferentes. Se utilizaron medios de cultivo selectivos, para las bacterias mesofílicas se utilizó caldo nutritivo; la población bacteriana inoculada (bacteria termoresistente, solubilizadora de fósforo e hidrocarbonoclasta) fueron cultivados en agar nutritivo con antibióticos, y en medio NFB (medio libre de nitrógeno) semigel con antibióticos para la bacteria fijadora de N_2. Así mismo, se determinó la población bacteriana tolerante a diésel endémica del suelo en medio HBm (Bushnell Hass modificado) suplementado con diésel y la población bacteriana total fijadora de N_2 en medio NFB. La cuantificación de las poblaciones bacterianas fue por el método de Número más probable (NMP) (Tabla 2 y Figura 2).

Tabla 2. Medios específicos de cultivo donde se seleccionaron las diferentes cepas.

Poblaciones	Medio de cultivo	Conteo
Bacteriana mesofílica	Caldo nutritivo	Número más probable
Bacteriana inoculada	Agar nutritivo +antibióticos (heterotróficas) NFB semigel + antibióticos (bacteria fijadora de N_2)	Directo en placa
bacteriana fijadora	NFB semigel	Número más probable
bacteriana tolerante a diésel	HBm+diésel	Número más probable



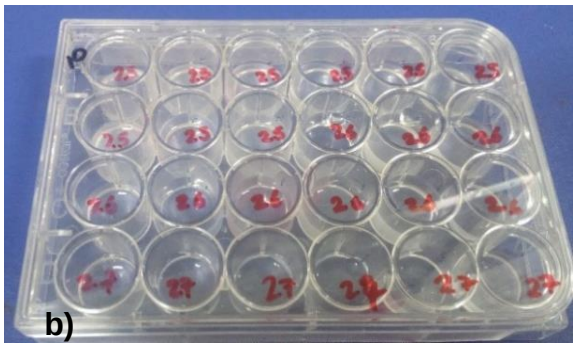


Figura 2. Cuantificación de la cepa fijadora de N_2 a) M1HC A5, y b) Población bacteriana mesófilica.

Se realizó un análisis de perfil antibiótico con las cepas microbianas para poderlas seleccionar en los diferentes lotes analizados, para la cepa *Azospirillum brasilense (*M1HC A5) se utilizó: Ampicilina, cefuroxima, y dicloxacilina; para *Bacillus pumilus* fueron: Ampicilina, cefuroxima, diclofenaco; *Pseudomonas frederiksbergensis:* Ampicilina, eritromicina, cefuroxima, trimetropina dicloxacilina; *Pseudomonas aeruginosa:* Ampicilina, cefuroxima, dicloxacilina (ver Tabla 3).

Tabla 3. Perfil de antibióticos

Cepa	Clave	Antibioticos
Azospirillum brasilense	M1HC A5	Ampicilina, cefuroxima, dicloxacilina
Bacillus pumilus	M1HC 1b	Ampicilina, cefuroxima, dicloxacilina
Pseudomonas frederiksbergensis	M1HC s-b	Ampicilina, eritromicina, cefuroxima, trimetropina dicloxacilina
Pseudomonas aeruginosa	M_1HCAcat15a	Ampicilina, cefuroxima, dicloxacilina

7.4.2 Determinación de la concentración de diésel en los sistemas batch

Para ello se realizó el análisis de hidrocarburos de fracción media, diésel (C10 – C28). Se llevó a cabo la extracción y cuantificación de diésel inicial y final de cada uno de los tratamientos con base al método de extracción EPA 3550C (Ultrasonic Extraction). Consiste en añadir sulfato de sodio anhidro (activado a 400 ºC durante 4 horas en una mufla) y silica gel, en relación 1:1 con la finalidad de eliminar la húmedad del suelo para luego sonicar en presencia de un disolvente orgánico

Cloruro de metileno o también llamado diclorometano (grado HPLC, marca Fermont). El extracto obtenido fue filtrado y posteriormente evaporado a 45 ºC hasta aforar a un volumen de 1 ml el cual se almacenó en viales de 2 ml.

7.4.3 Cromatografía de gases

Se realizó un análisis cuantitativo de la fracción media (diésel) de acuerdo al método EPA 8015B (Nonhalogenated Organics using CG-FID), se inyecto 1 μL de muestra extraída en un cromatógrafo de gases GC System-FID, Modelo HP 6890 con una columna capilar HP-5 (0.25 mm* 30 m* 0.25 Um) cuyo flujo inicial fue de 1.0 ml/min. Las condiciones de análisis del horno fueron: Temperatura inicial 45 ºC, Temperatura máxima 280 ºC.

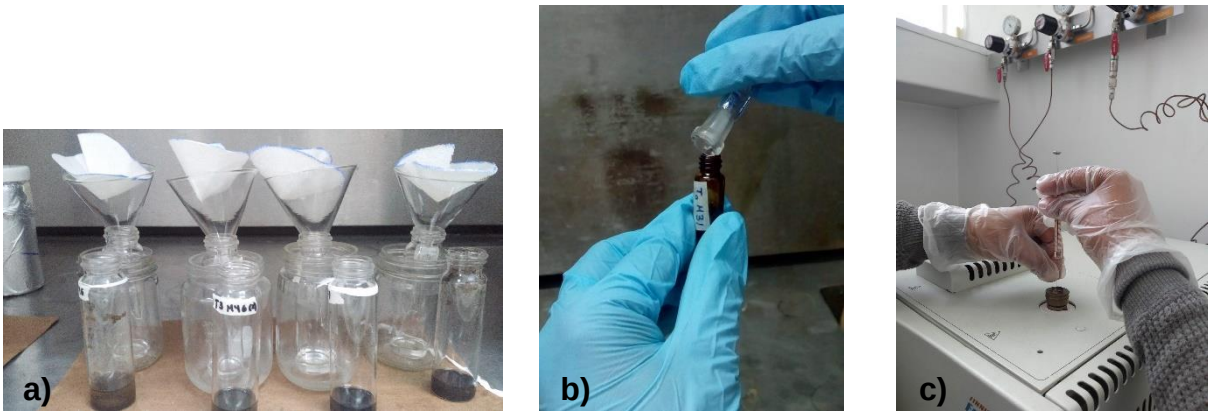


Figura 3. Extracción e inyección del diésel de los tratamientos, a) filtrado de la muestra, b) concentración en viales de 2 ml, c) inyección de la muestra en el cromatógrafo de gases.

7.5. Análisis de Datos

Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos utilizando Minitab, Versión 16.1.0. Para la interpretación de los resultados se hizo la ejecución de un ANOVA, la cual es una prueba de hipótesis ya que supone verdadera una afirmación inicial y luego prueba esta afirmación mediante los datos proporcionados. Asimismo, utilizamos la prueba de Tukey la cual nos proporciona información de agrupación y dos conjuntos de intervalos de comparación múltiple. Esto nos permitió determinar cuál de los tratamientos fue el más eficiente y el efecto sinérgico del consorcio.

También se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para analizar cómo están correlacionadas entre sí todas las variables: pH, poblaciones bacterianas, y la capacidad de biodegradación del diésel en todos los tratamientos (48 tratamientos).

8. RESULTADOS

8.1 Determinación de pH y poblaciones bacterianas en el sistema a nivel microcosmos

Se determinó el pH al inicio y final del experimento en los suelos agrícolas de Acatzingo y San Martín Texmelucan.

Cuadro 1. Determinación de pH en suelo estéril y no estéril de Acatzingo y San Martin Texmelucan.

Tratamiento	Con sustrato				Sin sustrato			
	Suelo estéril							
	pH							
	Acatzingo		San Martín		Acatzingo		San Martín	
	días							
	0	90	0	90	0	90	0	90
Consorcio	7.87	7.76	6.03	6.09	7.93	7.97	6.70	6.13
1b	7.87	7.84	6.03	6.02	7.93	7.99	6.70	6.10
15ª	7.87	7.82	6.03	6.05	7.93	8.08	6.70	6.10
s-b	7.87	7.83	6.03	6.04	7.93	7.92	6.70	6.09
A5	7.87	7.78	6.03	6.10	7.93	7.83	6.70	6.10
Testigo	7.87	7.81	6.03	5.87	7.93	7.77	6.70	6.03
	Suelo no estéril							
Consorcio	7.24	8.1	5.55	6.27	7.33	7.64	6.73	4.66
1b	7.24	7.89	5.55	6.14	7.33	7.53	6.73	5.87
15ª	7.24	7.51	5.55	6.36	7.33	7.67	6.73	5.50
s-b	7.24	7.69	5.55	6.36	7.33	7.37	6.73	7.49
A5	7.24	7.71	5.55	6.76	7.33	7.42	6.73	5.29
Testigo	7.24	7.59	5.55	6.11	7.33	7.64	6.73	5.69

El pH en el suelo de Acatzingo (ver Cuadro 1), se mantuvo medianamente alcalino durante el experimento, sin importar la presencia del sustrato post-cosecha, *P. ostreus,* así mismo con o sin inoculante. Respecto a los tratamientos de San Martín Texmelucan se mantuvieron con el pH ácido en todos los tratamientos.

8.2 Cuantificación de la tasa de respiración microbiana de CO_2

La tasa de respiración microbiana de CO_2 acumulativa a 90 días en ambos sitios de estudio Acatzingo y San Martin Texmelucan, se muestran en los cuadros 3 y 4.

Cuadro 2. Tasa de respiración microbiana de CO_2 acumulativa a 90 días en suelo agrícola de Acatzingo**.**

Tratamiento	Con sustrato	Sin sustrato
	10^{-4} mmol CO_2 /m^2 d	
	Suelo estéril	
Consorcio	16.58 **a** ±0.46*	14.77 **a** ±0.25
1b	15.71 **b** ±0.12	13.39 **b** ±0.11
15[a]	14.36 **c** ±0.26	13.24 **bd** ±0.12
s-b	13.24 **d** ±0.12	11.33 **c** ±0.38
A5	13.79 **d** ±0.23	12.27 **d** ±0.25
Testigo	10.27 **e** ±0.49	10.39 **e** ±0.12
	Suelo no estéril	
consorcio	19.64 **a** ±0.38	11.17 **a** ±0.25
1b	16.71 **b** ±0.25	9.94 **b** ±0.25
15[a]	16.20 **b** ±0.63	9.66 **b** ±0.12
s-b	14.21 **d** ±0.25	7.84 **c** ±0.38
A5	15.45 **c** ±0.25	9.35 **b** ±0.25
Testigo	9.65 **e** ±0.12	6.91 **d** ±0.25

***Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia mínima significativa con un valor de $p \leq 0.05$, de biodegradación después de 90 días.

Cuadro 3. Tasa de respiración microbiana de CO_2 acumulativa a 90 días en suelo agrícola de San Martin Texmelucan.

Tratamiento	Con sustrato	Sin sustrato
	10^{-4} mmol CO_2 /m^2 d	
	Suelo estéril	
consorcio	10.70 **a** ±0.38	8.34 **a** ±0.25
1b	9.14 **ab** ±0.25	8.13 **a** ±0.26
15[a]	8.97 **b** ±0.38	7.86 **b** ±0.38
s-b	7.59 **c** ±0.25	7.42 **b** ±0.12
A5	8.38 **b** ±0.76	7.51 **b** ±0.13
Testigo	6.82 **d** ±0.25	6.33 **c** ±0.38
	Suelo no estéril	
consorcio	17.37 **a** ±0.50	12.43 **a** ±0.25
1b	15.71 **b** ±0.12	12.32 **a** ±0.88
15[a]	12.68 **c** ±0.25	11.59 **b** ±0.63
s-b	11.60 **cd** ±0.25	9.87 **d** ±0.12
A5	12.51 **c** ±0.38	10.70 **c** ±0.38
Testigo	11.46 **d** ±0.25	6.66 **e** ±0.63

*****Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia mínima significativa con un valor de $p \leq 0.05$, de biodegradación después de 90 días.

La respiración microbiana monitoreada como acumulación de CO_2 fue mayor en los suelos de Acatzingo con respecto a San Martin Texmelucan. En ambos sitios los tratamientos con suelo no estéril y sustrato e inoculados con el consorcio bacteriano tuvieron la mayor actividad metabólica (0.0019 y 0.0017 mmoles de CO_2 /m^2 d). Seguido de los tratamientos inoculados con el monocultivo *Bacillus pumillus* cepa 1b (0.0016 y 0.0015 mmoles de CO_2 /m^2 d), y los tratamientos con menor acumulación de CO_2 fueron los testigos del suelo estéril de San Martin Texmelucan con y sin sustrato (0.0068 y 0.0063 mmoles de CO_2 /m^2 d) debido a que los tratamientos presentan menor carga bacteriana.

8.3 Biodegradación de diésel

Se obtuvo el porcentaje de degradación, y diésel residual de cada uno de los tratamientos después de 90 días, se muestran en los cuadros 5 y 6.

Cuadro 4. Capacidad de biodegradación en suelo agrícola de Acatzingo

Tratamiento	Con sustrato		Sin sustrato	
	Suelo estéril			
	Degradación (%)	Diésel residual (ppm)	Degradación (%)	Diésel residual (ppm)
Consorcio	54.03**a** ± 0.72	11720.21 ± 183.70	47.76**a** ± 0.23	13526.58 ± 59.57
1b	44.29**b** ± 0.89	13887.26 ± 225.80	33.97**b** ± 0.76	17070.63 ± 192.33
15[a]	31.69**c** ± 0.58	17329.18 ± 148.51	26.38**c** ± 0.64	18416.87 ± 163.74
s-b	19.79**e** ± 0.57	20587.25 ± 144.96	18.95**d** ± 0.37	20488.09 ± 95.28
A5	26.07**d** ± 0.63	18800.94 ± 159.48	24.07**c** ± 0.68	18995.84 ± 174.16
Testigo	9.27**f** ± 0.09	23029.56 ± 218.03	6.53**e** ± 0.62	22856.23 ± 817.34
	Suelo no estéril			
Consorcio	53.19**a** ± 0.30	17599.16 ± 33.98	34.85**a** ± 0.55	16256.23 ± 137.99
1b	34.95**b** ± 0.56	19946.07 ± 82.67	28.39**b** ± 0.32	17912.01 ± 82.24
15[a]	29.26**c** ± 0.23	20859.71 ± 36.52	22.63**c** ± 0.12	19647.09 ± 18.88
s-b	13.75**d** ±0.08	23720.10 ± 17.54	12.41**e** ± 0.27	22035.48 ± 68.99
A5	23.26**c** ± 0.86	20624.96 ± 143.57	16.41**d** ± 0.35	20665.56 ± 62.63
Testigo	15.26**d** ± 0.91	23029.56 ± 218.03	14.29**f** ± 0.16	21571.97 ± 129.82

*****Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia mínima significativa con un valor de $p \leq 0.05$, de biodegradación después de 90 días.

Cuadro 5. Capacidad de biodegradación de diésel en el suelo agrícola de San Martin Texmelucan.

Tratamiento	Con sustrato	Sin sustrato		
	Suelo estéril			
	Degradación %	[Diésel] ppm	Degradación %	Diésel [ppm]
Consorcio	49.63**a** ± 0.73*****	12760.56 ± 187.07	40.43**a** ± 0.44	17130.15 ± 54.10
1b	39.37**b** ± 0.69	15110.45 ± 175.79	30.76**b** ± 0.18	18455.18 ± 25.38
15[a]	29.74**c** ± 0.47	17909.09 ± 119.07	23.32**c** ± 0.53	19143.00 ± 132.88
s-b	15.41**d** ± 0.48	20827.59 ± 86.87	14.88**e** ± 0.51	21439.55 ± 129.81
A5	22.49**d** ± 0.59	22115.82 ± 214.58	18.65**d** ± 0.27	20627.94 ± 163.94
Testigo	4.28**e** ± 0.43	24195.00 ± 234.66	3.00**f** ± 0.14	24413.89 ± 184.26
	Suelo no estéril			
Consorcio	34.57**a** ± 0.48	18845.69 ± 67.54	32.25**a** ± 0.11	19254.00 ± 16.48
1b	31.02**b** ± 0.71	19233.83 ± 104.01	27.03**a** ± 0.46	19983.30 ± 71.83
15[a]	29.03**b** ± 0.45	19556.57 ± 68.78	19.82**b** ± 0.44	21293.77 ± 77.39
s-b	12.99**d** ± 0.09	22509.16 ± 18.79	10.45**d** ± 0.32	22855.37 ± 67.30
A5	20.50**c** ± 0.85	20624.96 ± 143.57	15.30**c** ± 0.34	22026.09 ± 64.18
Testigo	7.80**e** ± 0.19	23747.00 ± 680.64	6.90**e** ± 0.98	23944.50 ± 369.48

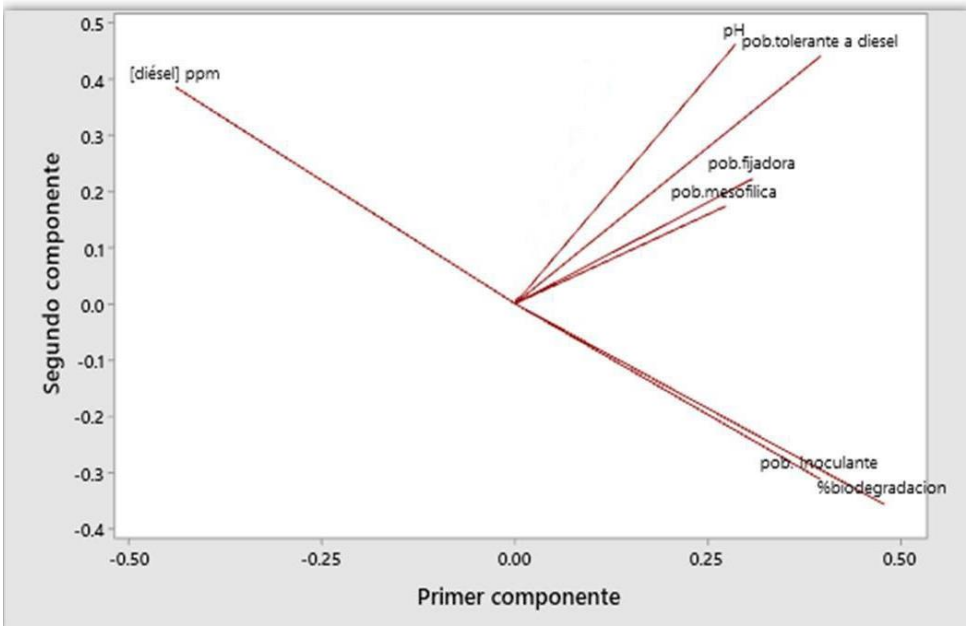
*****Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia mínima significativa con un valor de $p \leq 0.05$, de biodegradación después de 90 días.

En los cuadros 5 y 6 se muestran los resultados de biodegradación en el suelo agrícola de Acatzingo y San Martín Texmelucan. Se obtuvo mayor degradación en los suelos de Acatzingo con respecto al suelo de San Martin. Tanto estéril y no estéril los tratamientos inoculados con el consorcio y con sustrato post-cosecha presentaron el mayor porcentaje de degradación (54.03 y 53.19 % de degradación**)** y por consiguiente una menor cantidad de diésel residual. Seguido de los tratamientos 1b > 15a > A5 > sb > testigo.

8.4 Análisis de componentes principales

Se realizó un análisis de componentes principales para observar la relación que existe en todos los tratamientos, con cada una de las variables, las cuales son: población bacteriana inoculada, población bacteriana mesofílica, población bacteriana fijadora de nitrógeno, población bacteriana tolerante a diésel, pH, capacidad de biodegradación de diésel y diésel residual [ppm], se muestran en las gráficas 1 y 2.

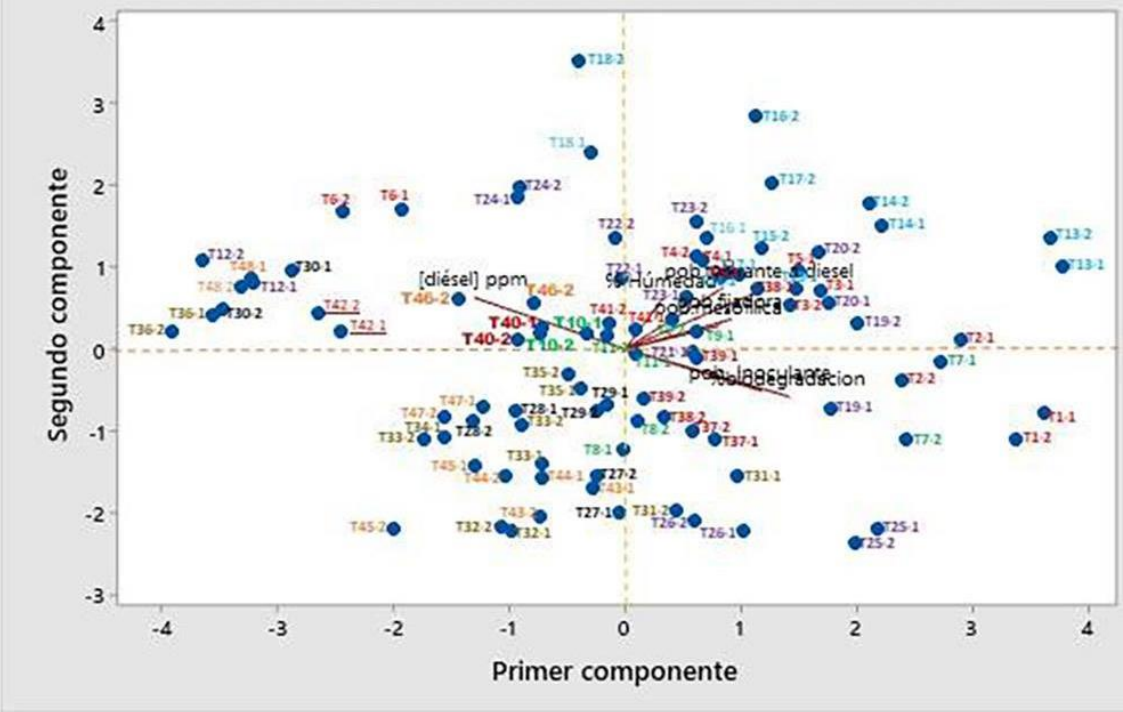
Grafica 1. Gráfica de influencias de la biorremediación de diésel a nivel microcosmos.



De acuerdo al análisis de componentes principales, la población bacteriana inoculada (0.396) y tolerante a diésel (0.397) están participando en la

biodegradación de hidrocarburos (0.479). El resto de las poblaciones bacterianas (mesofílica y fijadora de nitrógeno) no están relacionadas con la biodegradación, sin embargo, sus poblaciones son afectadas negativamente por los cambios de pH, y contaminante en el sistema de estudio (ver Gráficas 1 y 2).

Grafica 2. Gráfica de doble proyección (gráfica de puntuaciones y de influencias)



Los diferentes colores muestran cada uno de los lotes: *rojo: suelo estéril de Acatzingo con sustrato, *verde: suelo estéril de Acatzingo sin sustrato, *azul: suelo no estéril de Acatzingo con sustrato, *morado: suelo no estéril de Acatzingo sin sustrato, *negro: suelo estéril de San Martin Texmelucan con sustrato, *café: suelo estéril de San Martin Texmelucan sin sustrato, *vino: suelo no estéril de San Martin Texmelucan con sustrato, *naranja: suelo no estéril de San Martin Texmelucan sin sustrato.

Las muestras testigo en suelos estériles (T6-1, T6-2, T12-1, T12-2, T18-1, T18-2, T24-1, T24-2, T30-1, T30-2, T36-1, T36-2, T42-1, T42-2, T48-1 y T48-2) mostraron una mayor cantidad de diésel residual, debido a que no cuenta con poblaciones bacterianas capaces de degradar el diésel, así mismo los tratamientos testigos en suelos no estériles presentaron una menor degradación con respecto a los inoculados. Los tratamientos inoculados con el consorcio tienen una mayor

degradación de diésel residual, por otro lado, se observa como la población inoculada se mantiene más alta que el resto de los tratamientos.

8.5 Análisis de poblaciones bacterianas

8.5.1 Población bacteriana inoculada

Se realizó el conteo de la población bacteriana inoculada en medios selectivos agar nutritivo y Nfb semigel, ambos con un perfil de antibióticos para monitorear a las bacterias inoculadas la cuantificación se llevó acabo a las 24 y 120 horas respectivamente.

En los cuadros 7 y 8 se muestra el conteo de la población bacteriana inoculada de tratamientos de Acatzingo y San Martin Texmelucan respectivamente. En los cuatro tratamientos (SE+S, SE, SNE+S, SNE) de los suelos de Acatzingo y San Martín se obtuvo en el tiempo 0 un mayor crecimiento de la población inoculada. Las poblaciones inoculadas siempre se mantuvieron menor en los suelos provenientes de San Martín con respecto a los de Acatzingo.

Así, en ambos sitios obtuvimos mayor crecimiento bacteriano en los suelos no estéril con sustrato post-cosecha de *P. ostretus*. Los tratamientos testigo en todos los lotes con un crecimiento bacteriano muy por debajo con el resto de los tratamientos (4.58, 4.81, 3.68, 3.90, 4.32, 4.13, 3.21, 2.68, 3.98, 3.58, 2.56, 1.78. 3.54, 2.35 06 Log Ufc g^{-1}_{ss}).

En Acatzingo el consorcio presentó mayor crecimiento bacteriano en los cuatro tiempos monitoreados (8.96, 8.72, 8.32, 8.19 Log Ufc g^{-1}_{ss}), y el monocultivo que presento un mayor crecimiento fue la cepa A5 (*Azospirillum brasilense*) en los 4 monitoreos de tiempo diferente (8.99, 8.42, 8.19 Log Ufc g^{-1}_{ss}).

En San Martin (ver cuadro 8) en los 4 tratamientos (SE, SE+S, SNE, SNE+S) no existe una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre el consorcio y los monocultivos, a excepción de los testigos los cuales están por debajo de los tratamientos antes

mencionados. Las poblaciones muestran una notable disminución de su población a los 60 días.

Cuadro 6: Conteo de bacterias inoculadas en suelo estéril y no estéril de Acatzingo, Puebla.

Tratamiento	Días																							
	Log Ufc g^{-1}_{ss}																							
	0						30						60						90					
	C	**1b**	**15a**	**Sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15ª**	**sb**	**A5**	**T**
SE+S	8.78 ±0.0 2 **a**	8.44 ±0.0 8 **ac**	8.48 ±0.0 5 **ac**	8.35 ±0.0 5 **c**	8.73 ±0.0 2 **ad**	4.58 ±0.0 1 **b**	8.53 ±0.0 5 **a**	8.00 ±0.7 2 **a**	8.44 ±0.1 3 **a**	8.99 ±0.1 3 **a**	8.33 ±0.1 0 **a**	3.90 ±0.0 2 **b**	7.96 ±0.0 3 **a**	7.53 ±0.0 3 **a**	7.64 ±0.0 6 **a**	7.82 ±0.0 6 **a**	7.66 ±0.0 6 **a**	3.21 ±0.0 2 **b**	7.41 ±0.0 7 **a**	7.44 ±0.0 5 **a**	7.14 ±0.0 2 **a**	7.14 ±0.0 2 **a**	7.16 ±0.2 0 **a**	2.56 ±0.1 8 **a**
SE	8.28 ±0.0 2 **a**	8.10 ±0.0 3 **a**	8.19 ±0.0 5 **a**	8.00 ±0.1 0 **a**	8.45 ±0.6 1 **a**	4.58 ±0.3 **b**	7.58 ±0.0 2 **a**	7.56 ±0.0 3 **a**	7.82 ±0.0 2 **a**	7.90 ±0.0 2 **a**	8.40 ±0.0 7 **b**	3.68 ±0.2 0 **c**	7.33 ±0.1 0 **a**	7.19 ±0.0 6 **a**	7.14 ±0.0 7**a**	7.32 ±0.0 3 **a**	7.64 ±0.1 0 **a**	2.68 ±0.0 6 **b**	7.11 ±0.0 4 **a**	7.04 ±0.0 2 **b**	7.06 ±0.0 1 **a**	7.24 ±0.1 0 **b**	6.90 ±0.2 0 **b**	1.78 ±0.1 0 **c**
SNE+S	8.96 ±0.0 4 **a**	8.73 ±0.0 3 **a**	8.68 ±0.0 4 **a**	8.63 ±0.2 0 **a**	8.99 ±0.0 2 **a**	4.81 ±0.0 3 **b**	8.72 ±0.2 0 **a**	8.46 ±0.0 3 **a**	8.48 ±0.0 8 **a**	8.45 ±0.0 5 **a**	8.42 ±0.0 1 **a**	4.32 ±0.0 1 **b**	8.32 ±0.0 2 **a**	8.21 ±0.0 3 **a**	8.38 ±0.0 1 **a**	8.33 ±0.0 5 **a**	8.19 ±0.0 1 **a**	3.98 ±0.0 1 **b**	8.19 ±0.0 6 **a**	7.66 ±0.2 0 **a**	8.33 ±0.0 5 **a**	8.19 ±0.1 0**a**	8.19 ±0.0 4 **a**	2.54 ±0.0 4 **b**
SNE	8.64 ±0.0 4**ae**	8.23 ±0.0 2 **ce**	8.41 ±0.0 4**ac e**	8.55 ±0.0 5**ac e**	8.89 ±0.0 2 **ad**	4.81 ±0.0 7 **b**	8.54 ±0.0 08 **a**	7.82 ±0.0 4 **b**	8.39 ±0.0 03 **a**	8.39 ±0.0 01 **a**	8.51 ±0.0 3 **a**	4.13 ±0.0 2 **c**	8.23 ±0.0 2 **a**	7.56 ±0.0 1 **b**	8.00 ±0.3 0 **ac**	7.82 ±0.0 2 **ab**	7.44 ±0.0 1 **b**	3.58 ±0.0 03 **d**	8.09 ±0.0 2 **a**	7.41 ±0.0 4 **a**	7.90 ±0.0 1 **a**	7.16 ±0.0 1 **a**	7.29 ±0.0 3 **a**	2.35 ±0.0 1 **b**

Cuadro 7: Conteo del inoculante de suelo estéril y no estéril de San Martín Texmelucan, Puebla.

Tratamiento	Días																							
	Log Ufc g^{-1}_{ss}																							
	0						30						60						90					
	C	**1b**	**15a**	**Sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15ª**	**sb**	**A5**	**T**
SE+S	8.56 ±0.0 2 **a**	8.52 ±0.0 8 **a**	8.51 ±0.0 3 **a**	8.40 ±0.0 3 **a**	8.52 ±0.0 4 **a**	4.32 ±0.0 3 **b**	8.22 ±0.0 2 **a**	8.29 ±0.0 4 **a**	8.42 ±0.0 2 **a**	8.19 ±0.0 3 **a**	8.26 ±0.0 3 **a**	3.57 ±0.0 4 **b**	7.42 ±0.0 1 **a**	7.96 ±0.1 2 **b**	8.16 ±0.1 2 **b**	7.80 ±0.0 3 **ab**	7.99 ±0.0 9 **b**	3.38 ±0.0 1 **c**	7.41 ±0.0 5 **a**	7.66 ±0.1 5 **ab**	7.78 ±0.0 4 **a**	7.75 ±0.0 4 **a**	7.19 ±0.0 4 **ac**	2.79 ±0.2 1 **d**
SE	8.13 ±0.0 2 **a**	8.14 ±0.0 6 **a**	8.13 ±0.0 9 **a**	8.12 ±0.0 2 **a**	8.22 ±0.0 3 **a**	3.82 ±0.0 4 **b**	8.12 ±0.1 1 **a**	8.03 ±0.1 1 **a**	8.02 ±0.0 4 **a**	8.02 ±0.1 9 **a**	8.02 ±0.0 2 **a**	3.12 ±0.0 4 **b**	7.41 ±0.0 9 **a**	7.42 ±0.0 3 **a**	7.99 ±0.1 3 **b**	7.82 ±0.0 5 **a**	7.99 ±0.0 9 **c**	2.47 ±0.0 2 **d**	7.19 ±0.0 1 **a**	7.32 ±0.1 2 **a**	7.19 ±0.0 1 **a**	7.00 ±0.1 0 **a**	7.43 ±0.0 3 **a**	1.55 ±0.0 9 **b**
SNE+S	8.66 ±0.0 3 **a**	8.62 ±0.0 2 **a**	8.66 ±0.0 2 **a**	8.65 ±0.0 2 **a**	8.77 ±0.0 1 **a**	4.39 ±0.0 1 **b**	8.41 ±0.0 2 **a**	8.49 ±0.0 4 **a**	8.42 ±0.0 3 **a**	8.42 ±0.0 3 **a**	8.66 ±0.0 9 **a**	3.58 ±0.0 2 **b**	8.16 ±0.0 2 **a**	8.42 ±0.4 1 **a**	8.22 ±0.0 2 **a**	8.42 ±0.0 2 **a**	8.42 ±0.0 3 **a**	2.58 ±0.0 3 **b**	8.08 ±0.0 5 **a**	8.02 ±0.0 5 **a**	8.02 ±0.0 2 **a**	8.19 ±0.0 6 **a**	8.22 ±0.0 4 **a**	2.12 ±0.0 3 **b**
SNE	8.35 ±0.0 1 **a**	8.39 ±0.0 3 **a**	8.35 ±0.0 1 **a**	8.44 ±0.0 3 **a**	8.41 ±0.0 2 **a**	4.39 ±0.0 2 **b**	8.42 ±0.0 4 **a**	8.00 ±0.1 0 **a**	8.12 ±0.0 2 **a**	8.41 ±0.0 2 **a**	8.19 ±0.0 3 **a**	3.37 ±0.0 5 **b**	8.23 ±0.0 2 **a**	7.72 ±0.0 7 **b**	8.02 ±0.0 2 **ab**	7.66 ±0.0 6 **b**	8.01 ±0.0 3 **ab**	2.16 ±0.0 3 **c**	7.89 ±0.0 1 **a**	7.60 ±0.0 3 **a**	7.82 ±0.0 2 **a**	7.25 ±0.0 5 **b**	7.10 ±0.0 3 **c**	1.03 ±0.0 6 **d**

*Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia mínima significativa con un valor de $p \leq 0.05$ a los distintos tiempos 0, 30, 60 y 90 días. SE: suelo estéril; SE+S: suelo estéril con sustrato; SNE: suelo no estéril; SNE+S: suelo no estéril con sustrato;**C:** consorcio; **1b, 15a, sb, A5:** monocultivos; **T:** testigo. g_{ss}: gramo de suelo seco

8.5.2 Población bacteriana mesofílica

La población mesofílica, se monitoreo en medio de caldo nutritivo en microplacas de 24 pozos en un tiempo de incubación de 24 horas.

Los tratamientos de Acatzingo (cuadro 9) a los 30 días de incubación el suelo estéril con sustrato inoculado con el consorcio presentó mayor población (8.60 Log Cel $g^{-1}{}_{ss}$), que el resto de los tratamientos seguido de la cepa sb (8.78 Log Cel $g^{-1}{}_{ss}$). A los 90 días, en todos los tratamientos disminuyó la población, siendo más significativa esta disminución en los testigos.

Con respecto a los tratamientos del suelo de San Martín Texmelucan no existió diferencia estadística (cuadro 10). Se observa que en el día 0 se tiene una mayor población comparando con el monitoreo del día 30, 60 y 90, es decir hubo una disminución de la población bacteriana mesofílica con respecto al tiempo.

Cuadro 8. Conteo de la población bacteriana mesofílica en suelo estéril y No estéril de Acatzingo, Puebla

Tratamiento	Días																							
	Log Cel g^{-1}_{ss}																							
	0						30						60						90					
	C	**1b**	**15a**	**Sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15[a]**	**sb**	**A5**	**T**
SE+S	8.80 ±0.0 3 **a**	8.66 ±0.0 3 **a**	8.67 ±0.0 1 **a**	8.77 ±0.0 1 **a**	8.60 ±0.0 4 **a**	8.70 ±0.0 1 **a**	8.60 ±0.0 3 **ab**	8.30 ±0.0 3 **ab**	8.26 ±0.0 6 **ab**	8.73 ±0.0 5 **ac**	8.48 ±0.0 1 **abc**	8.48 ±0.0 2 **abc**	8.36 ±0.0 2 **ab**	8.26 ±0.0 1**ab**	8.13 ±0.0 2**ab** **d**	8.48 ±0.0 1**ab** **c**	8.27 ±0.0 3**ab**	8.39 ±0.0 1 **ab**	8.30 ±0.0 3 **a**	8.17 ±0.0 1 **a**	8.19 ±0.0 4 **a**	8.27 ±0.0 1 **a**	8.00 ±0.2 0 **a**	8.04 ±0.0 7 **a**
SE	8.42 ±0.0 2 **a**	8.17 ±0.0 4 **ab**	8.27 ±0.0 5 **a**	8.36 ±0.0 2 **a**	8.27 ±0.0 2 **a**	8.60 ±0.0 6 **ac**	8.29 ±0.0 4 **a**	8.15 ±0.0 1 **a**	8.23 ±0.0 1 **a**	8.31 ±0.0 1 **a**	8.23 ±0.0 2 **a**	8.41 ±0.0 2 **a**	8.13 ±0.0 2 **a**	8.07 ±0.0 1 **a**	8.19 ±0.0 1 **a**	8.27 ±0.0 1 **a**	8.15 ±0.0 5 **a**	8.08 ±0.0 3 **a**	8.07 ±0.0 4 **a**	7.49 ±0.0 4 **b**	7.97 ±0.0 2 **a**	7.60 ±0.1 4 **ac**	7.27 ±0.0 2 **bc**	7.09 ±0.0 3 **b**
SNE+S	8.92 ±0.0 2 **a**	8.87 ±0.0 1 **ac**	8.78 ±0.0 2 **ac**	8.86 ±0.0 1 **ac**	8.97 ±0.0 4 **ab**	8.66 ±0.0 1 **c**	8.78 ±0.0 5 **a**	8.52 ±0.0 2 a**b**	8.47 ±0.0 5 **b**	8.78 ±0.0 3 **a**	8.60 ±0.0 3 **a**	8.57 ±0.0 1 **ab**	8.43 ±0.0 2 **a**	8.28 ±0.0 1 **a**	8,27 ±0.0 5 **a**	8.33 ±0.2 0 **a**	8.27 ±0.0 4 **a**	8.43 ±0.0 1 **a**	8.25 ±0.0 6 **a**	8.12 ±0.0 2 **a**	8.03 ±0.0 1 **a**	8.27 ±0.0 1 **a**	8.06 ±0.0 1 **a**	8.15 ±0.0 2 **a**
SNE	8.60 ±0.0 4 **a**	8.49 ±0.0 2 **a**	8.52 ±0.0 3 **a**	8.43 ±0.0 3 **a**	8.43 ±0.0 4 **a**	8.52 ±0.1 1 **a**	8.53 ±0.0 4 **a**	8.27 ±0.0 3 **a**	8.49 ±0.0 5 **a**	8.32 ±0.0 2 **a**	8.26 ±0.0 1 **a**	8.27 ±0.1 3 **a**	8.35 ±0.0 2 **a**	8.15 ±0.0 2 **a**	8.43 ±0.1 2 **a**	8.20 ±0.0 4 **a**	8.19 ±0.0 3 **a**	8.21 ±0.0 5 **a**	8.01 ±0.0 8 **a**	8.00 ±0.0 2 **a**	8.07 ±0.0 1 **a**	8.10 ±0.0 3 **a**	8.08 ±0.0 1 **a**	8.01 ±0.1 0 **a**

Cuadro 9. Conteo de la población bacteriana mesofílica en suelo estéril y no estéril de San Martín Texmelucan, Puebla

Tratamiento	Días																							
	Log Cel g^{-1}_{ss}																							
	0						30						60						90					
	C	**1b**	**15a**	**Sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15[a]**	**sb**	**A5**	**T**
SE+S	8.30 ±0.1 1 **a**	8.32 ±0.0 5 **a**	8.30 ±0.1 4 **a**	8.27 ±0.0 6 **a**	8.27 ±0.1 7 **a**	8.37 ±0.0 5 **a**	8.27 ±0.0 5 **a**	8.27 ±0.0 1 **a**	8.27 ±0.0 2 **a**	8.20 ±0.0 8 **a**	8.20 ±0.0 4**a**	8.27 ±0.0 3 **a**	8.16 ±0.0 2 **a**	8.12 ±0.1 0 **a**	8.16 ±0.0 1 **a**	8.13 ±0.0 3 **a**	8.17 ±0.1 1**a**	8.12 ±0.0 3 a	8.06 ±0.0 1 **a**	8.01 ±0.1 0 **a**	8.07 ±0.0 1 **a**	8.02 ±0.4 1 **a**	8.09 ±0.1 1 **a**	8.02 ±0.1 0 **a**
SE	8.27 ±0.0 1 **a**	8.27 ±0.0 2 **a**	8.27 ±0.0 4 **a**	8.23 ±0.0 3 **a**	8.30 ±0.0 1 **a**	8.27 ±0.0 2 a	8.13 ±0.0 2 **a**	8.13 ±0.0 2 **a**	8.15 ±0.0 1 **a**	8.27 ±0.0 2**a**	8.27 ±0.0 1**a**	8.08 ±0.0 5 **a**	8.05 ±0.0 2 **a**	7.73 ±0.0 8 **a**	8.01 ±0.1 0 **a**	8.10 ±0.0 4**a**	8.13 ±0.0 6 **a**	7.78 ±0.0 2 **a**	7.72 ±0.1 5 **a**	7.53 ±0.0 2 **a**	7.73 ±0.0 2 **ab**	7.72 ±0.0 4 **a**	7.82 ±0.0 6 **a**	7.58 ±0.0 2 **a**
SNE+S	8.77 ±0.0 5 **a**	8.41 ±0.0 5**ab**	8.70 ±0.0 5**a**	8.50 ±0.0 4**a**	8.36 ±0.0 2**ac**	8.52 ±0.0 2**a**	8.52 ±0.0 8 **a**	8.37 ±0.0 5 **ab**	8.49 ±0.0 1 **a**	8.27 ±0.0 3 **a**	8.20 ±0.1 1 **a**	8.42 ±0.0 6 **a**	8.27 ±0.0 6 **a**	8.27 ±0.0 1 **a**	8.27 ±0.0 1 **a**	8.15 ±0.0 2 **a**	8.17 ±0.0 3 **a**	8.23 ±0.1 2**a**	8.10 ±0.0 3 **a**	8.13 ±0.0 2 **a**	8.13 ±0.0 2 **a**	8.07 ±0.0 1 **a**	8.10 ±0.0 3**a**	8.10 ±0.0 3 **a**
SNE	8.33 ±0.0 8**a**	8.20 ±0.0 3 **ab**	8.26 ±0.0 1 **a**	8.60 ±0.1 3 **ac**	8.45 ±0.0 3 **a**	8.26 ±0.0 3 **a**	8.26 ±0.0 6 **a**	8.10 ±0.0 3 **a**	8.18 ±0.0 4 **a**	8.33 ±0.0 4 **a**	8.28 ±0.0 4 **a**	8.13 ±0.0 2 **a**	8.20 ±0.1 2 **a**	8.06 ±0.0 2 **a**	8.00 ±0.0 8 **b**	8.27 ±0.0 1 **a**	8.12 ±0.0 7 **a**	8.05 ±0.0 1**a**	8.07 ±0.0 4 **a**	7.87 ±0.0 2**a**	7.77 ±0.1 2**a**	8.15 ±0.1 6 **a**	8.00 ±0.0 3 **a**	7.99 ±0.0 1 **a**

*Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia mínima significativa con un valor de $p \leq 0.05$ a los distintos tiempos 0, 30, 60 y 90 días. SE: suelo estéril; SE+S: suelo estéril con sustrato; SNE: suelo no estéril; SNE+S: suelo no estéril con sustrato; **C:** consorcio; **1b, 15a, sb, A5:** monocultivos; **T:** testigo. g_{ss}: gramo de suelo seco

8.5.3 Población bacteriana tolerante a diésel

El monitoreo de la población bacteriana tolerante a diésel fue en medio líquido de HBm en un tiempo de incubación de 240 horas.

En el suelo agrícola de Acatzingo (cuadro 11) se muestra una población mayor en los suelos no estériles con y sin sustrato, siendo el consorcio (8.77 y 8.56 Log Cel g^{-1}_{ss}) y el tratamiento A5 (8.85 y 8.70 Log Cel g^{-1}_{ss}) los que muestran un mejor crecimiento al inicio (0 días) y final del experimento (90 días) obtuvimos 8.77 Log Cel g^{-1}_{ss} en ambos tratamientos.

A diferencia del suelo de San Martín Texmelucan (cuadro 12) la cepa sb obtuvo el mayor crecimiento (8.52 Log Cel g^{-1}_{ss}) en todos los tratamientos. A los 90 días obtuvimos una reducción en la población bacteriana de manera general, siendo el consorcio del suelo no estéril con y sin sustrato quien finaliza con una población bacteriana de 7.10 Log Cel g^{-1}_{ss}**,** el cual se encuentra por encima del resto de los tratamientos.

Cuadro 10. Población bacteriana tolerante a diésel en suelo estéril y suelo no estéril de Acatzingo, Puebla.

Tratamiento	Días																							
	Log Cel g^{-1}_{ss}																							
	0						30						60						90					
	C	**1b**	**15a**	**Sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15ª**	**sb**	**A5**	**T**
SE+S	8.56	8.47	8.27	8.26	8.29	8.17	8.47	8.11	8.06	8.16	8.10	7.70	8.20	8.08	7.97	8.07	8.08	7.10	7.90	7.48	7.72	7.78	7.68	7.02
	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.2	±0.0	±0.0	±0.0
	4 **a**	1 **a**	2 **a**	1 **a**	3 **a**	4 **a**	3 **a**	3 **b**	2 **b**	4 **ab**	3 **ab**	2**c**	2 **a**	5 **a**	4 **a**	2 **a**	3**a**	2**b**	2**a**	2 **a**	4 **a**	3 **a**	3 **a**	6 **ab**
SE	8.49	8.27	8.17	8.30	8.14	8.06	8.28	8.16	8.27	8.27	0.08	7.37	8.27	8.16	8.16	8.16	7.77	7.08	7.27	7.60	7.27	7.10	7.48	6.70
	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0
	1**a**	4 **a**	5 **a**	1 **ab**	1 **a**	1 **ab**	4 **a**	1 **a**	4 **a**	5 **a**	5 **a**	5 **b**	1 **a**	5**a**	5 **a**	2**ab**	4 **c**	1 **d**	4 **a**	3 **a**	2 **a**	5**ab**	1 **ac**	5 **d**
SNE+S	8.77	8.47	8.67	8.42	8.77	8.85	8.66	8.60	8.16	8.26	8.26	8.47	8.27	8.72	8.66	8.52	8.17	8.09	8.07	8.27	7.77	8.22	8.01	8.07
	±0.1	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±8.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.1	±0.0	±0.0	±0.0	±0.1	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.1	±0.0	±0.0
	0 **a**	1 **b**	4**ab**	1 **ab**	5 **ac**	1 **abc**	8 **a**	4 **a**	3 **ab**	5 **ab**	6 **ab**	2 **a**	4 **a**	2 **b**	1 **ab**	4 **a**	3 **ac**	2 **ad**	2 **a**	1 **a**	1 **ab**	8 **a**	7 **a**	4 **a**
SNE	8.56	8.77	8.26	8.26	8.66	8.70	8.47	8.72	8.10	8.10	8.30	8.48	8.27	8.37	7.53	8.02	8.26	8.27	7.52	8.17	7.48	7.30	8.09	7.97
	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.1	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.1	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.1	±0.1	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0
	2 **a**	4 **a**	1 **ab**	3 **ab**	3 **ac**	3 **ad**	4 **a**	2 **ab**	2 **ac**	3 **ac**	0 **a**	3 **ad**	1 **a**	3 **a**	7 **b**	2 **abc**	2 **a**	5 **ac**	8 **a**	7**b**	2**a**	2**a**	3**b**	2 **b**

Cuadro 11. Población bacteriana tolerante a diésel de suelo estéril y suelo no estéril de San Martín Texmelucan, Puebla

Tratamiento	Días																							
	Log Cel g^{-1}_{ss}																							
	0						30						60						90					
	C	**1b**	**15a**	**Sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15ª**	**sb**	**A5**	**T**
SE+S	7.31	7.27	7.42	7.52	7.60	7.37	7.18	7.07	7.17	7.48	7.17	7.07	7.07	7.00	6.87	7.27	7.07	6.90	6.90	6.18	6.16	6.16	6.77	6.04
	±0.0	±0.0	±0.1	±0.1	±0.2	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.1	±0.0	±0.1	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0
	2 **a**	4 **a**	7 **a**	0 **a**	2 **a**	4 **a**	6 **a**	1 **a**	8 **a**	3 **a**	9 **a**	4 **a**	5 **ab**	1 **ab**	3 **a**	0 **ab**	4 **ab**	2 **ab**	2 **a**	4 **b**	8 **b**	4 **b**	4 **a**	5 **b**
SE	7.10	7.17	7.29	7.86	7.40	7.11	7.07	7.04	7.02	7.29	7.30	7.07	7.00	6.77	6.88	7.27	7.27	6.29	6.80	6.00	6.48	6.16	6.96	6.07
	±0.1	±0.0	±0.0	±0.0	±0.1	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.1	±0.0	±0.5	±0.0	±0.0	±0.0	±0.1	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0
	3 **a**	7 **a**	4 **a**	8 **a**	0 **a**	8 **b**	7 **a**	7 **a**	6 **a**	3 **a**	0 **a**	3 **a**	**a**	3 **ab**	2 **ab**	8 **a**	2 **a**	3 **b**	7 **a**	3 **b**	6 **a**	2 **b**	1 **a**	8 **b**
SNE+S	7.77	7.27	7.77	7.52	7.42	7.10	7.26	7.25	7.48	7.42	7.27	7.27	7.17	7.10	7.42	7.27	7.08	7.02	7.10	7.07	7.10	7.02	7.05	6.57
	±0.0	±0.0	±0.0	±0.1	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.1	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.2
	5 **a**	3**b**	5 **a**	0 **a**	1 **ab**	2 **b**	2 **a**	4 **a**	2 **a**	7 **a**	2 **a**	3 **a**	7 **a**	2 **a**	3 **a**	0 **a**	3 **a**	6 **a**	2 **a**	5 **a**	5 **a**	2 **a**	4 **a**	5 **b**
SNE	7.10	7.27	7.27	7.27	7.30	7.01	7.26	7.12	7.07	7.18	7.26	7.10	7.10	7.04	6.77	7.12	7.17	6.42	7.10	7.02	6.10	6.77	7.10	5.81
	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.1	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0	±0.0
	8 **a**	1 **a**	1**a**	6 **a**	3**a**	1**a**	3 **a**	2 **a**	3 **a**	4 **a**	7 **a**	2 **a**	5 **a**	3 **ab**	3 **ab**	3 **a**	2 **a**	8 **b**	1 **a**	3 **a**	5 **b**	2 **a**	2 **a**	4 **b**

*Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia mínima significativa con un valor de $p \leq 0.05$ a los distintos tiempos 0, 30, 60 y 90 días. SE: suelo estéril; SE+S: suelo estéril con sustrato; SNE: suelo no estéril; SNE+S: suelo no estéril con sustrato; **C:** consorcio; **1b, 15a, sb, A5:** monocultivos; **T:** testigo. g_{ss}: gramo de suelo seco

8.5.4 Población bacteriana total fijadora de Nitrógeno

La población total fijadora se monitoreo en medio Nfb semigel con un tiempo de incubación de 120 horas.

La población total fijadora de Nitrógeno en suelo agrícola de Acatzingo y San Martin Texmelucan respectivamente como se muestra en el cuadro 13 y 14. Se obtuvo una población menor en San Martin respecto a Acatzingo, a los 90 días los tratamientos mostraron una disminución en la población bacteriana en Acatzingo, los inoculados con consorcio y suelos no estériles con sustrato (3.21, 2.78, 3.06 Log Cel g^{-1}_{ss}) son las que mostraron una mayor población bacteriana fijadora de nitrógeno. Mientras que en San Martin a los 90 días el suelo estéril con sustrato e inoculado con consorcio fue el que mostro mayor, respecto a los demás (2.40, 3.06 Log Cel g^{-1}_{ss}).

Cuadro 12: Población total fijadora de Nitrógeno en suelo estéril y No estéril de Acatzingo, Puebla.

Tratamiento	Días																							
	Log Cel g^{-1}_{ss}																							
	0						30						60						90					
	C	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15ª**	**sb**	**A5**	**T**
SE+S	3.36 ±0.0 2 **a**	3.24 ±0.0 2 **a**	3.21 ±0.0 1 **a**	3.08 ±0.0 5 **ab**	3.19 ±0.0 2 **a**	3.24 ±0.0 3 **ab**	3.02 ±0.0 8 **a**	2.83 ±0.0 2 **a**	3.15 ±0.0 2 **ab**	2.71 ±0.0 8 **a**	3.06 ±0.0 1 **a**	2.60 ±0.0 2 **ac**	2.40 ±0.0 2**a**	2.67 ±0.0 7**b**	2.98 ±0.0 3**b**	2.40 ±0.0 5**a**	2.98 ±0.0 3 **ab**	1.29 ±0.0 5 **c**	2.18± 0.01**a**	2.30 ±0.0 5**b**	1.84 ±0.0 2 **c**	1.95 ±0.0 4**cd**	2.40 ±0.0 5 **a**	0.95 ±0.0 2 **ce**
SE	3.13 ±0.0 3 **a**	3.06 ±0.0 2 **a**	3.04 ±0.0 2 **a**	3.10 ±0.0 7 **a**	3.09 ±0.0 3 **a**	3.03 ±0.0 6 **a**	3.05 ±0.0 3 **a**	2.40 ±0.0 2**b**	3.04 ±0.0 6**a**	2.40 ±0.0 3**b**	2.90 ±0.0 2 **a**	2.98 ±0.0 4 **a**	2.98 ±0.0 7 **a**	1.63 ±0.0 2**b**	2.40 ±0.1 0 **a**	1.75 ±0.0 7 **b**	2.69 ±0.0 4 **a**	1.90 ±0.0 2 **bc**	2.57± 0.03 **a**	1.00 ±0.0 2 **a**	1.71 ±0.0 1 **a**	1.48 ±0.0 8 **a**	2.30 ±0.0 5 **a**	1.48 ±0.0 1 **a**
SNE+S	3.65 ±0.0 4 **a**	3.61 ±0.0 4 **a**	3.55 ±0.0 2 **a**	3.61 ±0.0 3 **a**	3.66 ±0.0 5 **a**	3.35 ±0.0 5 **a**	3.52 ±0.0 2 **a**	3.15 ±0.0 3 **b**	3.46 ±0.0 3**ab**	3.40 ±0.0 5 **ab**	3.61 ±0.0 2**ac**	3.28 ±0.0 5**abc**	3.15 ±0.0 5**a**	2.98 ±0.0 3 **a**	3.26 ±0.0 7 **a**	3.20 ±0.0 5 **a**	3.36 ±0.1 0 **a**	3.04 ±0.0 2 **a**	3.21± 0.04 **a**	2.65 ±0.0 3 **a**	2.40 ±0.0 6 **ab**	2.98 ±0.0 6 **a**	2.78 ±0.0 3 **a**	2.98 ±0.0 4 **b**
SNE	3.61 ±0.0 5 **a**	3.33 ±0.0 1 **a**	3.60 ±0.0 3 **a**	3.60 ±0.0 3 **a**	3.50 ±0.0 4 **a**	3.45 ±0.0 3 **a**	3.36 ±0.0 2 **a**	3.11 ±0.0 3 **ab**	3.15 ±0.0 1 **a**	3.40 ±0.0 3 **ac**	3.15 ±0.0 1 **a**	3.23 ±0.0 2**abc**	3.21 ±0.0 3 **a**	3.06 ±0.0 1**a**	2.57 ±0.0 4**b**	3.21 ±0.0 2 **a**	2.57 ±0.0 2**b**	3.21 ±0.0 2 **a**	2.78± 0.04 **a**	2.61 ±0.0 3 a	2.57 ±0.0 2**b**	2.36 ±0.0 3**ab**	2.33 ±0.0 6 **ac**	2.02 ±0.0 2 **d**

Cuadro 13 Población total fijadora de Nitrógeno en suelo estéril y No estéril de San Martín Texmelucan, Puebla

Tratamiento	Días																							
	Log Cel g^{-1}_{ss}																							
	0						30						60						90					
	C	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15a**	**sb**	**A5**	**T**	**C**	**1b**	**15ª**	**sb**	**A5**	**T**
SE+S	3.33 ±0.0 4 **a**	3.15 ±0.0 1 **ab**	3.05 ±0.0 1 **ab**	3.05 ±0.0 7 **ab**	3.04 ±0.0 1**b**	3.16 ±0.0 5 **ab**	3.09 ±0.0 1 **a**	3.01 ±0.0 3 **a**	2.88 ±0.0 1 **a**	2.67 ±0.0 3**b**	2.90 ±0.0 4 **a**	2.85 ±0.0 2 **ab**	2.57 ±0.0 4 **a**	2.39 ±0.0 1 **ab**	2.15 ±0.0 2 **b**	2.57 ±0.0 2 **a**	2.57 ±0.0 3 **a**	2.46 ±0.0 2 **ac**	2.40 ±0.0 4 **a**	2.20 ±0.0 3 **a**	1.98 ±0.0 3 **ab**	1.85 ±0.0 3 **ab**	2.28 ±0.0 5 **ab**	2.02 ±0.0 2 **ab**
SE	3.17 ±0.0 6 **a**	3.10 ±0.0 3 **a**	3.15 ±0.0 3 **a**	3.11 ±0.0 2 **a**	3.20 ±0.0 2 **a**	3.15 ±0.0 1 **a**	2.70 ±0.0 3 **a**	3.02 ±0.0 1 **a**	2.40 ±0.0 5 **ab**	3.02 ±0.0 2 **ac**	3.08 ±0.1 6**abc**	2.84 ±0.0 5**a**	2.65 ±0.0 4 **a**	2.32 ±0.0 2 **a**	2.30 ±0.0 3 **a**	2.64 ±0.0 2 **a**	3.04 ±0.0 6**b**	2.40 ±0.0 5 **a**	2.40 ±0.0 3 **a**	2.02 ±0.0 1**b**	1.75 ±0.0 9 **b**	2.09 ±0.0 3**ab**	2.71 ±0.0 3**a**	2.02 ±0.0 2**c**
SNE+S	3.37 ±0.0 2 **a**	3.36 ±0.0 2 **a**	3.15 ±0.0 3 **a**	3.11 ±0.0 3 **a**	3.25 ±0.0 4 **a**	3.35 ±0.0 3 **a**	3.23 ±0.0 3 **a**	3.15 ±0.0 4 **a**	2.98 ±0.0 3 **a**	2.40 ±0.0 4 **a**	3.20 ±0.0 3 **a**	2.58 ±0.0 3 **a**	2.40 ±0.1 0 **a**	2.73 ±0.0 3 **a**	2.78 ±0.0 1 **a**	2.14 ±0.0 6 **ab**	2.88 ±0.0 2**abc**	2.40 ±0.0 4 **a**	2.36 ±0.0 6 **a**	2.40 ±0.0 4 **a**	2.02 ±0.0 3 **a**	2.07 ±0.0 4 **a**	2.02 ±0.0 8 **a**	2.10 ±0.0 3 **a**
SNE	3.39 ±0.0 1 **a**	3.15 ±0.0 1 **a**	3.23 ±0.0 4 **a**	3.15 ±0.0 1 **a**	3.04 ±0.0 6 **a**	3.15 ±0.0 1 **a**	3.02 ±0.0 5 **a**	3.10 ±0.0 3**ab**	3.02 ±0.0 2**ab**	3.05 ±0.0 2 **ab**	2.76 ±0.0 4 **b**	2.78 ±0.0 2 **ab**	2.41 ±0.0 4 **a**	2.58 ±0.0 4 **ab**	2.43 ±0.0 3 **a**	2.10 ±0.0 4 **ac**	2.36 ±0.0 1 **a**	2.02 ±0.0 7 **a**	1.60 ±0.0 8 **a**	1.40 ±0.1 2 **ab**	1.96 ±0.0 6 **ab**	1.60 ±0.0 6 **ab**	1.60 ±0.0 1**ac**	1.95 ±0.0 4**bc**

*Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia mínima significativa con un valor de $p \leq 0.05$ a los distintos tiempos 0, 30, 60 y 90 días. SE: suelo estéril; SE+S: suelo estéril con sustrato; SNE: suelo no estéril; SNE+S: suelo no estéril con sustrato; **C:** consorcio; **1b, 15a, sb, A5:** monocultivos; **T:** testigo. g_{ss}: gramo de suelo seco

9. DISCUSION

Los tratamientos con sustrato post cosecha de *Pleurotus ostreus* mostraron mayor biodegradación siendo el suelo de Acatzingo con mayor biodegradación esa fue de 54.06 % y San Martin de 49.63 **%.** Se han realizado otros estudios con diferentes sustratos post-cosecha de hongos, un estudio reciente por Liu *et al*., (2019) utilizó el sustrato post-cosecha de A*uricularia auricular* para la biorremediación de suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos, el cual obtuvo que el suelo tratado con sustrato de A*uricularia auricular* promovió la riqueza, diversidad, y uniformidad de las bacterias, aumento el contenido de materia orgánica y nutrientes así mismo mejoro la biodegradación de 56.5 en 84 días.

Por otro lado, García-Delgado *et al*. (2015) comprobaron que la reutilización del sustrato de *Agaricus bisporus* en suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) fue factible el aprovechamiento este sustrato. También señala que la aplicación de sustrato *A. bisporus* esterilizado no biodegrada la HAP en el suelo contaminado, por lo que el uso del sustrato sin tratamiento previo proporciona mayor biodegradación debido a la inoculación de un microbiota inherente capaz de degradar HAP. Con respecto a los resultados obtenidos en nuestro estudio obtuvimos una población bacteriana mesofílica más elevada en los suelos que contenían sustrato (8.92 Log Cel g^{-1}_{ss}), y en los suelos no estériles ya que aún conservaban la microbiota nativa. Así mismo, también se obtuvo de manera general mayor biodegradación (54.03 %) comparando con los suelos que no fueron tratados con sustrato. Además, la respiración estuvo ligada al metabolismo degradativo ya que los hidrocarburos que componen al diésel fueron utilizados como fuente de carbono. Se concuerda con Akwukwaegbu (2019) que la dinámica de crecimiento se debe a las capacidades de asimilación de hidrocarburos y a la adaptación de las cepas. En nuestra investigación todas las cepas fueron originarias de Acatzingo, y mostraron mayor degradación del diésel y se obtuvo el mayor crecimiento microbiano.

La inoculación con el consorcio bacteriano presentó un efecto sinérgico al aumentar la degradación de diésel en el rango de 9.7 a 34.2 % con respecto a los monocultivos

inoculados. Al final del experimento, el consorcio presentó una población de 7.41 Log Ufc g^{-1}_{ss} en los dos suelos de diferente lugar, lo que represento el éxito de su sobrevivencia en el sistema contaminado. Los microorganismos individuales suelen metabolizar un rango limitado de hidrocarburos; por lo tanto, se necesitarían consorcios bacterianos con amplias capacidades enzimáticas generales para lograr una considerable biodegradación de los hidrocarburos de petróleo, como se puede obtener en un entorno natural (Akwukwaegbu, 2019).

Con los datos obtenidos en la respiración microbiana coincidimos con lo que reporta Zamora (2017), concluye que en los tratamientos con sustrato de hojarasca seca y suelo no estéril obtuvieron una mayor respiración microbiana. En el presente trabajo nosotros obtuvimos una mayor tasa de respiración microbiana (19.64 x 10^{-4} mmoles de CO_2 /m^2 d) y carga bacteriana después de 90 días en los suelos no estériles con sustrato de *P. ostreus* inoculados con el consorcio, y en los tratamientos esterilizados obtuvimos menor población bacteriana y respiración (7.41 Log Ufc g^{-1}_{ss}, 16.58 x 10^{-4} mmoles de CO_2 /m^2 d).

En este proyecto observamos una sinergia en la biodegradación de diésel, aumentando la actividad biodegradativa esto fue resultado de la interacción del consorcio bacteriano así mismo como la correlación con los tratamientos que tenían el sustrato post-cosecha de *P.ostreus.* Por lo que, el sustrato post-cosecha aportó microorganismos que se adaptaron al sistema de estudio

Por lo que la bioaumentación y bioestimulación aceleraron la degradación de diésel en suelos agrícolas. Las zonas agrícolas afectadas por hidrocarburos necesitan medidas de mitigación ecológicas, en este trabajo el consorcio bacteriano fue obtenido de zonas agrícolas y el porcentaje de degradación de diésel que se obtuvo aporta una opción para estudios de escalamiento que permitan recuperar sitios contaminados con hidrocarburos.

10. CONCLUSIONES

La biaumentación por parte del consorcio microbiano y el aprovechamiento de los residuos de *P. ostreatus* lograron disminuir el contaminante (diésel) de un 49.63 % a un 54.03.

Los consorcios presentaron una mayor respiración microbiana (19.64 y 17.37 x 10^{-4} mmoles de CO_2 /m^2 d) en comparación a los monocultivos en suelos no estéril y estéril suplementado con *P. ostreatus*.

La inoculación con el consorcio bacteriano presentó un efecto sinérgico al aumentar la degradación de diésel en el rango de 9.7 a 34.2 % con respecto a los monocultivos inoculados.

El consorcio presentó una población final de 7.41 Log Ufc g^{-1}_{ss} en los dos suelos de diferente lugar, lo que represento el éxito de su sobrevivencia en el sistema contaminado.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Acuña A.J., Tonín N.L., Diaz V., Pucci G.N. y Pucci O.H. (2012). Optimización de un sistema de biorremediación de hidrocarburos a escala de laboratorio. Ing. Invest. y Tecnol. 13 (1), 105-112.
2. Adams R.H., Zavala-Cruz J., y Morales-García F. (2008). Concentración residual de hidrocarburos en el suelo del trópico II: afectación a la fertilidad y su recuperación. Interciencia 33 (7), 483-489.
3. Alexander N. Glazer and Hiroshi Nikaido (2007). Microbial Biotechnology, fundamentals of applied microbiology. 2da ed. Cambridge, 45-90.
4. Atlas R.M. y Bartha R. (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental. 6ª ed. Editorial Pearson, Madrid, España, 677.
5. Akwukwaegbu R., Okerentugba P, Okpokwasili G,. Stanley H. and Ugboma C.J. (2019). Hydrocarbon Degradation Potential of Heterotrophic Bacteria Isolated from Oil Polluted Sites in Sakpenwa Community in Rivers State. *South Asian Journal of Research in Microbiology*, 4(2), 1-12.
6. Bashan Y and Levanony, H. (1990). Current status of Azospirillum inoculation technology: Azospirillum as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol., vol. 36, p. 591-608.
7. Cavazos, A., Pérez, A., & Mauricio, G. (2014). Impacts and consequences from hydrocarbon spills on agricultural soils in Acatzingo, Puebla, México. Centro Interdisciplinario de Posgrados. Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, (11): 539-550.
8. Demque D.E., Biggar K.W., and. Heroux J.A. (1997). Land treatment of diesel contaminated sand. Can. Geotech J, 34, 421-431
9. García-Rivero M y Peralta-Pérez M. (2008). Cometabolism in the biodegradation of hydrocarbons. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 7(1), 1-12.
10. García-Delgado C., Yunta F., Enrique E. (2015). Bioremediation of multi-polluted soli by spent mushroom (*Agaricus bisporus*) substrate: Polycyclic

aromatic hydrocarbons degradation and Pb availability. Journal of Hazardous Materials 300, 281–288.

11. Gaitán-Hernández R. (2019). Cultiva hongos comestibles, de INECOL. Sitio web: https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/484-cultiva-hongos-comestibles.
12. Golovleva L., Aharonson R., Greenhalg N., Sethunathan, N. y Vonk, W. (1990). The rol and limitations of microorganism in the conversión of xenobiotics. Puer and apl.. Chem 62: 351-364.
13. Gayosso Canales, M., Esparza García, F., Ríos Leal, E., Rodríguez Vázquez, R. (2007). Evaluación de la actividad enzimática de Pleurotus ostreatus en presencia de bifenilos policlorados en: El cultivo de setas Pleurotus spp en México. Instituto Politécnico Nacional 191-197.
14. Gayosso-Canales M., Esparza-García F., Bermúdez-Cruz R., Tomasini A., Ruiz-Aguilar G and Rodríguez-Vázquez, Refugio (2011). Application of 2_{III}^{7-3} fractional factorial experimental design to enhance enzymatic activities of Pleurotus ostreatus with high concentrations of polychlorinated biphenyls. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 46(3), 298-305.
15. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/StmaCntaNal/CtasEcmcasEcolgicas2018_11.pdf
16. Layton C., Maldonado E., Monroy L., Lucia Constanza Corrales L., Sánchez L. (2011). *Bacillus* spp; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos, NOVA 9 (15). 177-187.
17. Lin, S., Hameed, A., Liu, Y., Hsu, Y., Lai, W., Shen, F., Young, C. (2015). *Azospirillum soli* sp. a nitrogen-fixing species isolated from agricultural soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65. 4601-4607.
18. Lin, S., Liu, Y., Hameed, A., Hsu, Y., Huang, H., Lai, W., Young, C. (2016). *Azospirillum agricola* sp. a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66 (3): 1453-1458.

19. Lin, S., Liu, Y., Hameed, A., Hsu, Y., Lai, W., Shen, F., Young, C. (2013). *Azospirillum fermentarium* sp. a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 1185-1190.
20. Lin, S., Shen, F., Young, L., Zhu, Z., Chen, W., Young, C. (2012). *Azospirillum formosense* sp. a diazotroph from agricultural soil. International *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 3762-3768.
21. Lin, S., Young, C., Hupfer, H., Siering, C., Arun, A., Chen, W., Lai, W., Shen, F, Rekha, P., & Yassin, A. (2009). *Azospirillum picis* sp. isolated from discarded. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 761–765.
22. Marín J. A., Hernández T and García C. (2005). Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. *Environ. Res*. 98, 185-195.
23. Muratova AY, Turkovskaya OV, Antonyuk LP, Makarov OE, Pozdnyakova LI, Ignatov V. (2005). Oil-Oxidizing Potential of Associative Rhizobacteria of the Genus *Azospirillum*. *Microbiology* 74, 210-215.
24. Singh A., Parmar N., Ramesh C., and Owen P. (2011). Bioaugmentation, Biostimulation, Biocontrol in Soil Biology. Springer,108, 1-23.
25. Thijs S, Weyens N, Sillen W, Gkorezis P, Carleer R, Vangronsveld (2014). Potential for plant growth promotion by a consortium of stress-tolerant 2,4-dinitrotoluene-degrading bacteria: isolation and characterization of a military soil. *Microbial Biotechnology* 7(4), 294–306
26. Travagliaa C, Masciarelli O, Fortuna J, Marchetti G, Cardozo P, Lucero M, Zorza E, Luna V, Reinoso H. 2015. Towards sustainable maize production: Glyphosate detoxification by *Azospirillum* sp. and *Pseudomonas* sp. Crop Protection 77: 102-1-9.
27. Tyagi, S., Singh, D. (2014). *Azospirillum himalayense* sp. a nifH bacterium isolated from Himalayan valley soil, India. Annals of Microbiology, 1 (6): 259-266.

28. Pardo-Castro J., Perdomo-Rojas M y Benavides-Lopez de Mesa J. (2004). Efecto de la adicion de fertilizantes inorganicos compuestos en la degradacion de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *NOVA* 2, 40-49.
29. Perry J.J. (1979). Microbial cooxidations involving hydrocarbons. Microbiology Reviews 43, 5972.
30. Vasquez, M. y Reyez, W. (2002). Degradación de Arocloro por Pseudomas sp. Biblioteca Nacional del Perú, Perú.
31. Volke Sepúlveda Tania, J. Antonio Velasco Trejo (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT), 18-24.
32. Zamora-Figueroa A., Ramos-Oropeza J, Arias M. and Hernández-Valencia I., (2017). Respuesta de la comunidad microbiana al biotratamiento de un suelo contaminado con un crudo mediano. Revista. Int. Contaminacion. Ambiental, 33 (4), 629-639.

12. ANEXOS

Anexo1. Composición de Agar Nutritivo

Reactivo	Cantidad (g/l)
Agar Nutritivo	16g
Caldo Nutritivo	8g

Anexo 2. Composición caldo de cultivo NFB

Reactivo	Cantidad (g/l)
Ácido málico	5 g
K_2HPO_4 (10%)	5 ml
$MgSO_47H_2O$ (10%)	2 ml
NaCl (10%)	1 ml
$FeSO_4$ (40mg/10 ml)	1ml
$CaCl_2$ (1%)	2 ml
$NaMoO_4$ (0.1 %)	2 ml
KOH	4 g
Biotina	1 ml
Piridoxal	1 ml
NH_4Cl	0.5 g
Extracto de levadura	0.05 g
pH	6.8

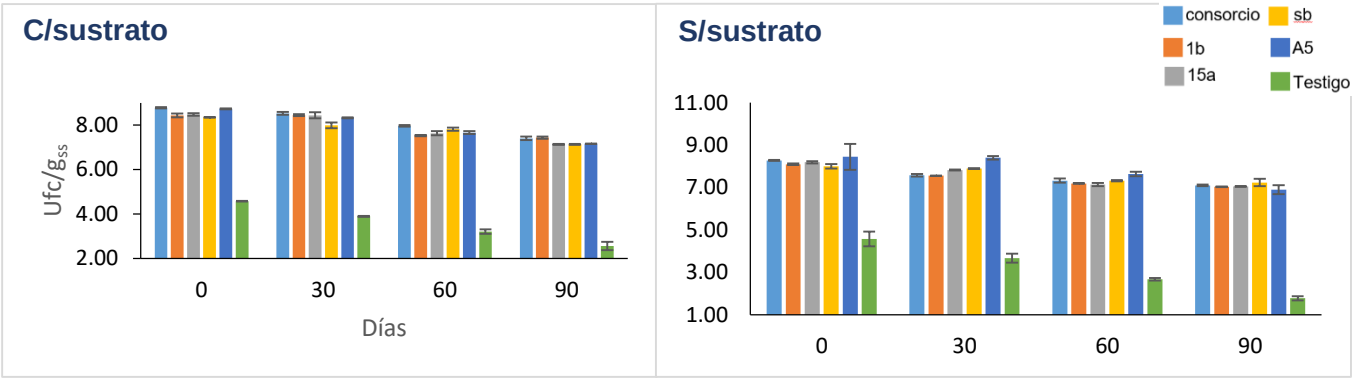
Anexo 3. Composición medio BH modificado

Reactivo	Cantidad (g/l)
$MgSO_4$	0.2 g
$CaCl_2$	0.02 g
K_2HPO_4	1 g
KH_2PO_4	1g
NH_4NO_3	1g
$FeCl_3$	0.5 g
*Ácido málico	2.5 g
*Glucosa	0.1 g
pH	7±0.2

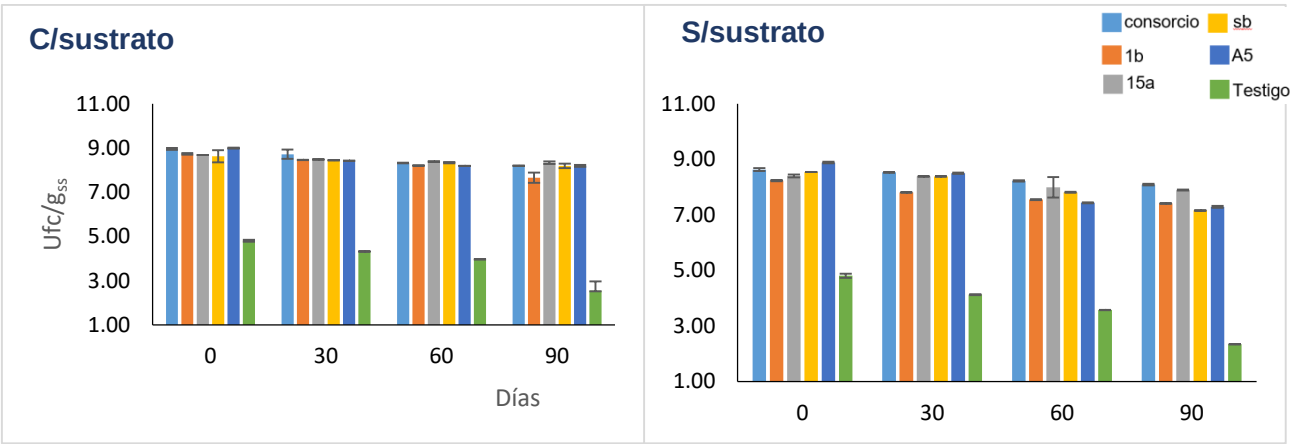
Anexo 4. Composición de solución Buffer de Fosfatos

Reactivo	Cantidad (g/l)
K_2HPO_4	2.1772 g
pH	7

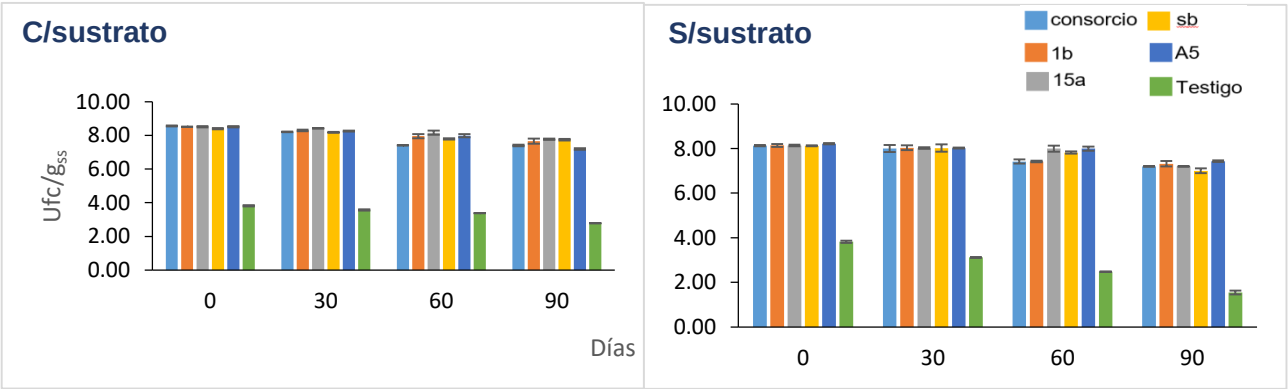
Anexo 5. Cuantificación de bacterias inoculadas en suelo estéril de Acatzingo



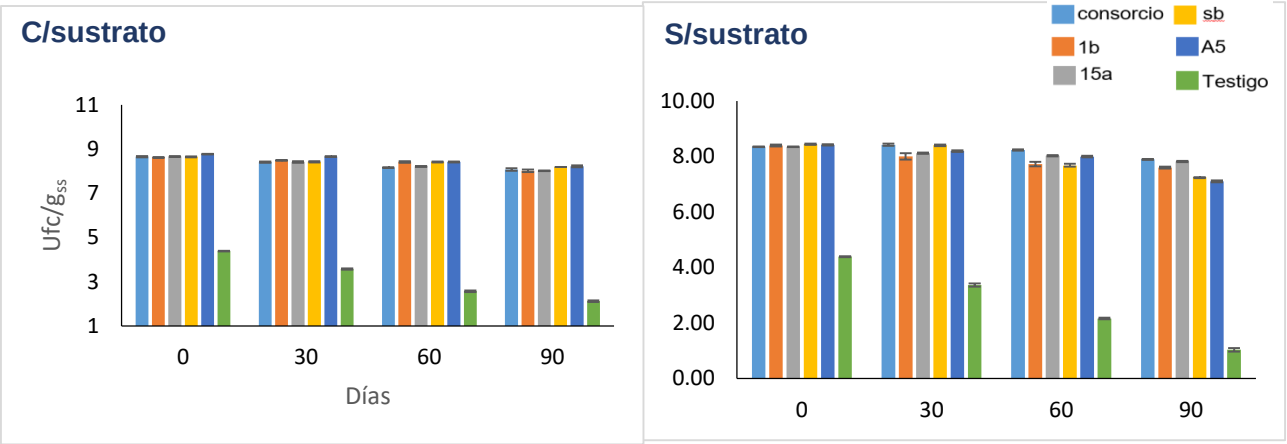
Anexo 6. Cuantificación de bacterias inoculadas en suelo no estéril de Acatzingo



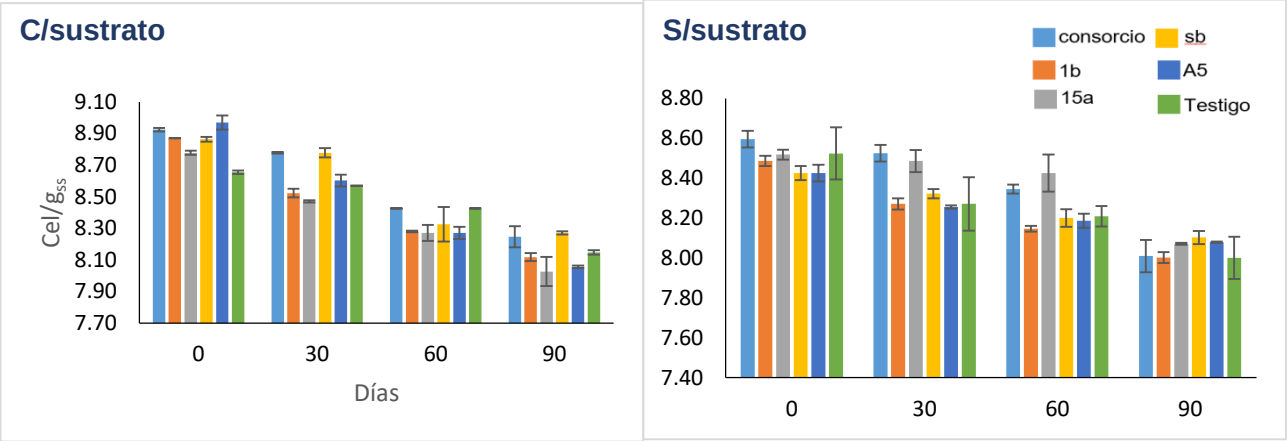
Anexo 7. Cuantificación de bacterias inoculadas en suelo estéril de San Martin



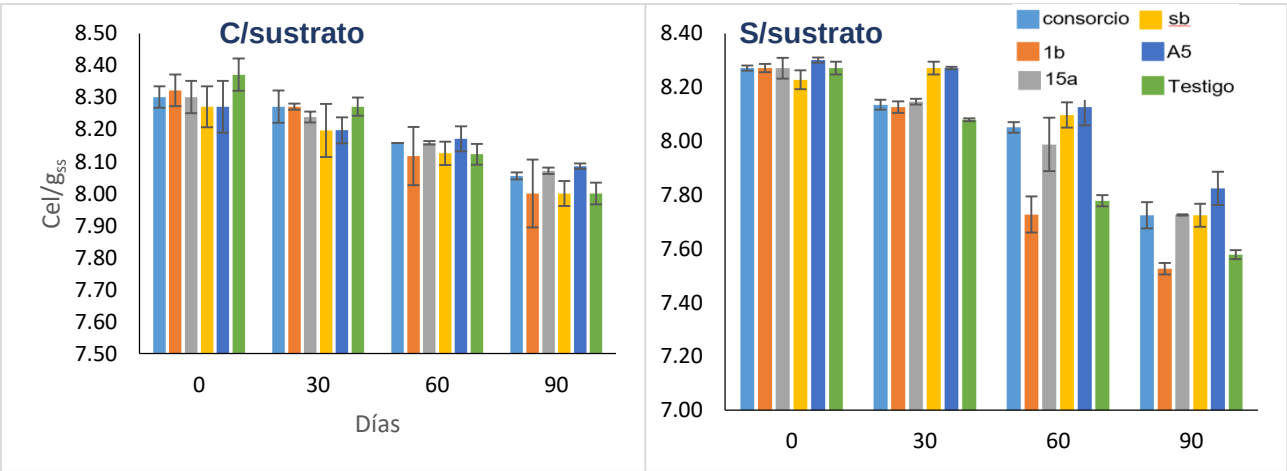
Anexo 8. Cuantificación de bacterias inoculadas en suelo no estéril de San Martin



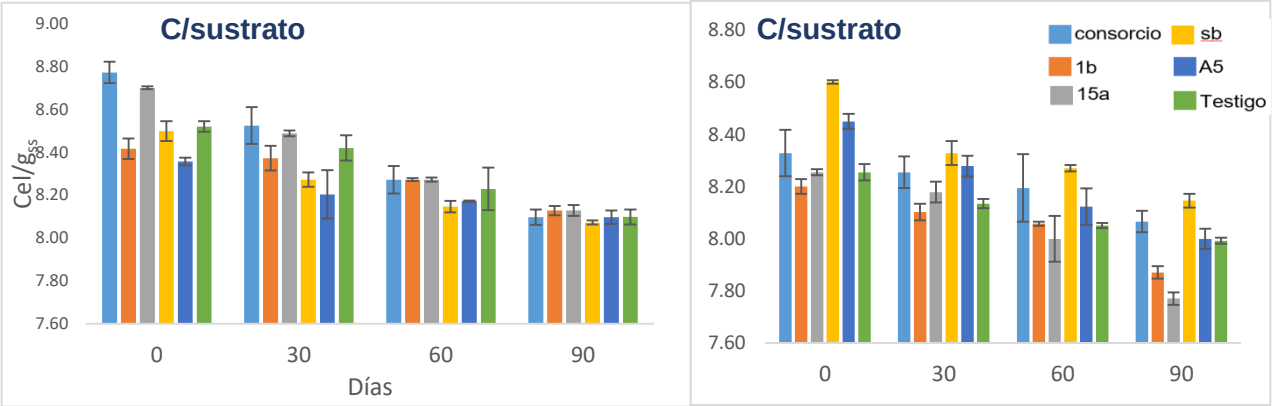
Anexo 9. Cuantificación de población mesofílica en suelo estéril de Acatzingo



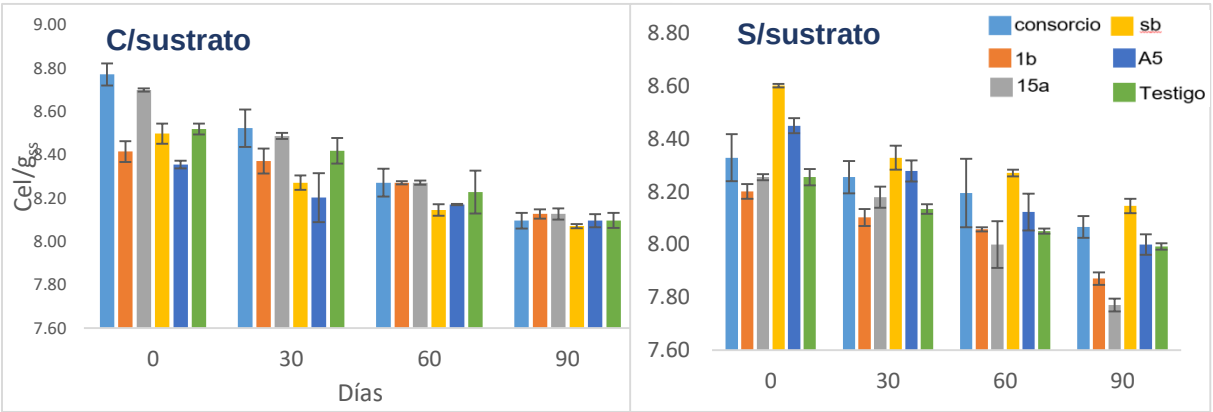
Anexo 10. Cuantificación de población mesofílica en suelo no estéril de Acatzingo



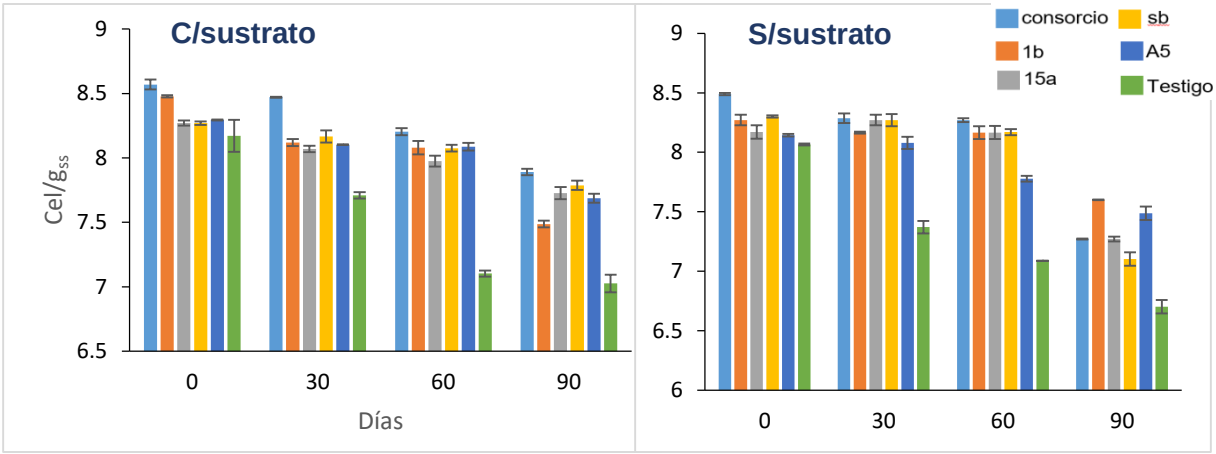
Anexo 11. Cuantificación de población mesofílica en suelo estéril de San Martin



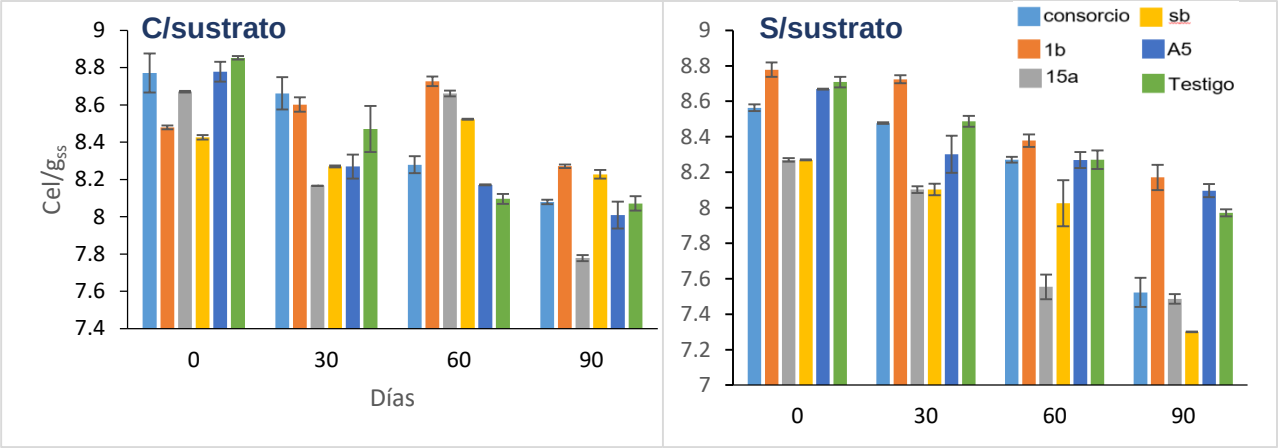
Anexo 12. Cuantificación de población mesofílica en suelo no estéril de San Martin



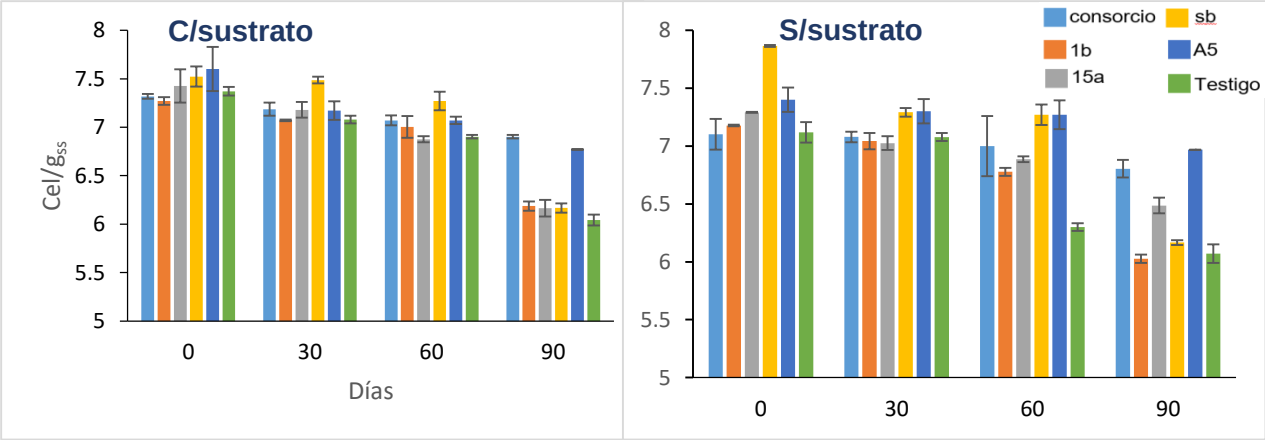
Anexo 13. Cuantificación de población bacteriana tolerante a diésel en suelo estéril de Acatzingo



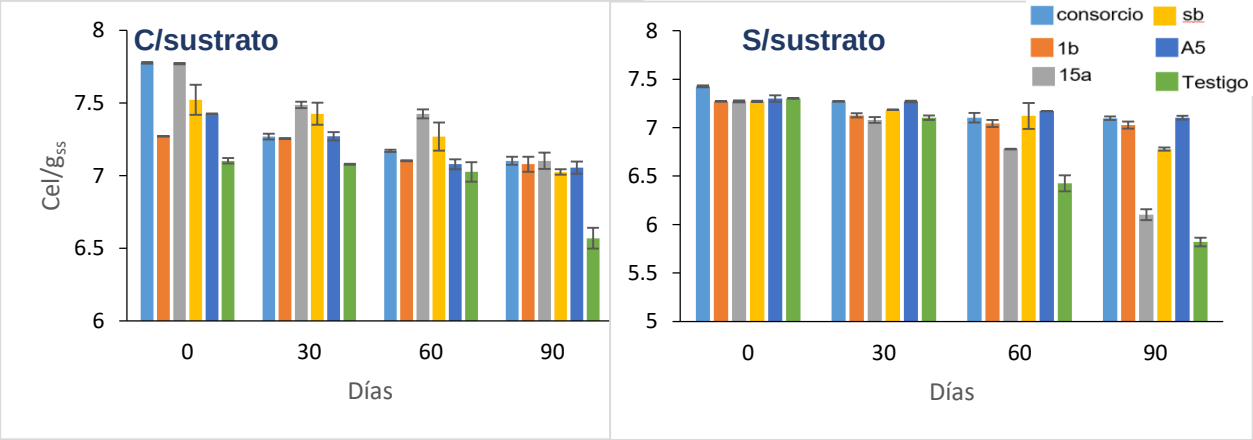
Anexo 14. Cuantificación de población bacteriana tolerante a diésel en suelo no estéril de Acatzingo



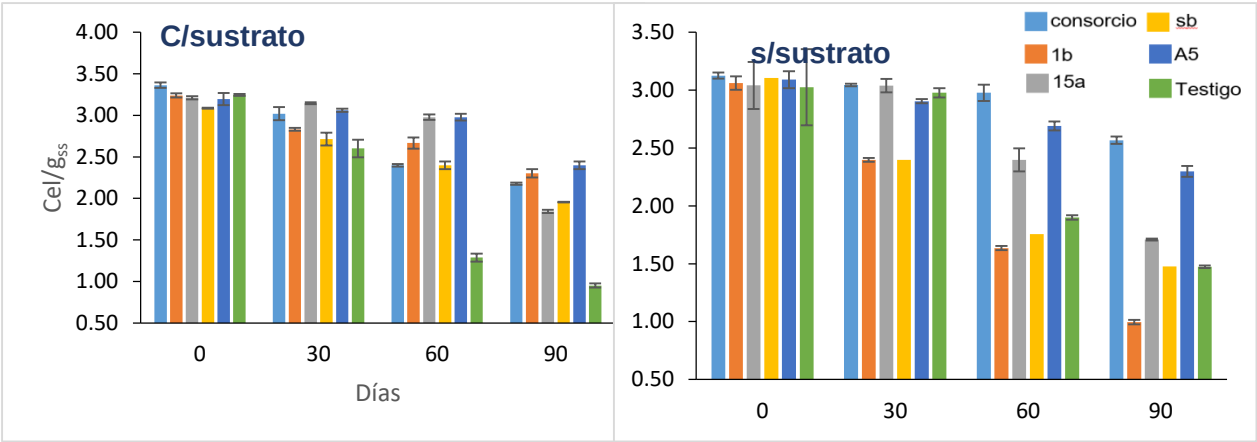
Anexo 15. Cuantificación de población bacteriana tolerante a diésel en suelo estéril de San Martin



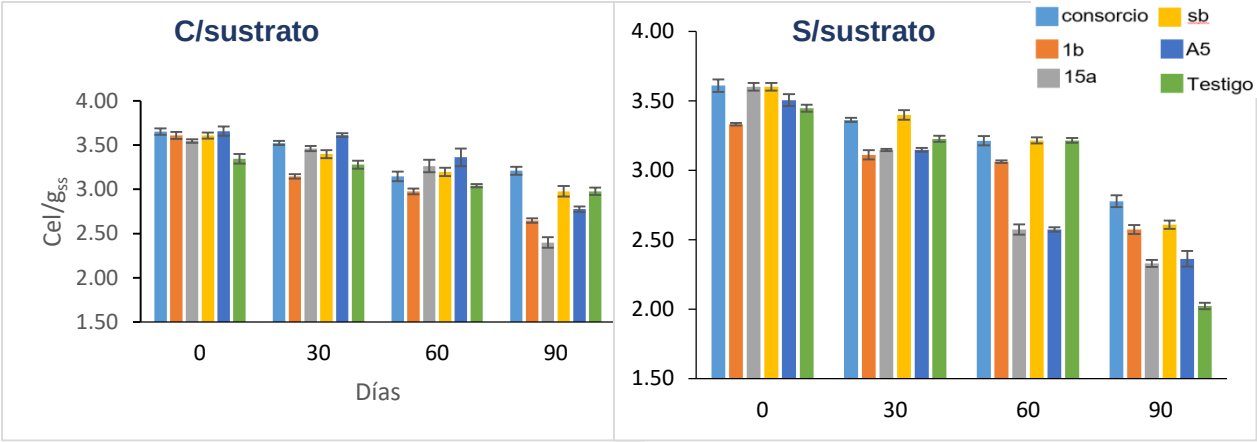
Anexo 16. Cuantificación de población bacteriana tolerante a diésel en suelo no estéril de San Martin



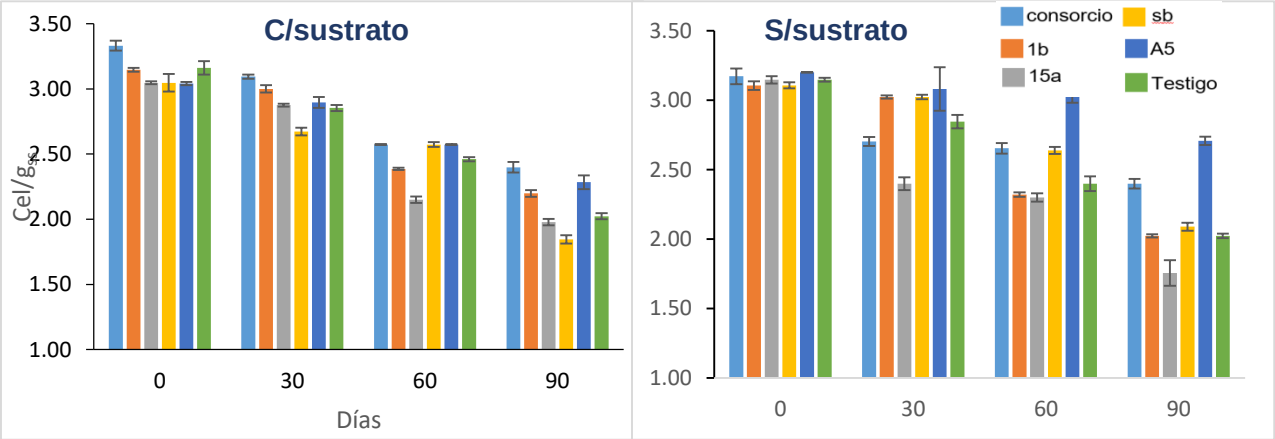
Anexo 17. cuantificación de población bacteriana fijadora suelo estéril de Acatzingo



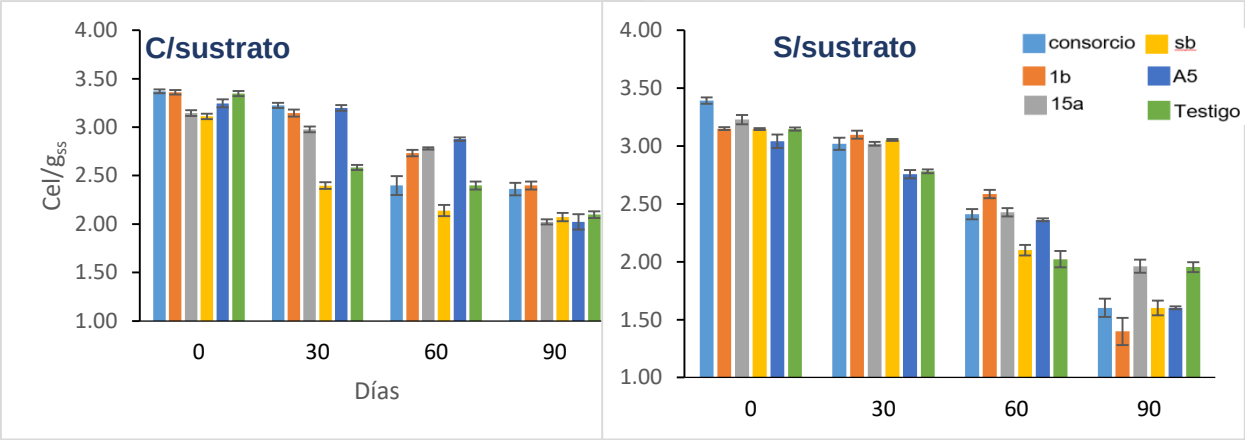
Anexo 18. Cuantificación de población bacteriana fijadora suelo no estéril de Acatzingo



Anexo 19. Cuantificación de población bacteriana fijadora suelo estéril de San Martin



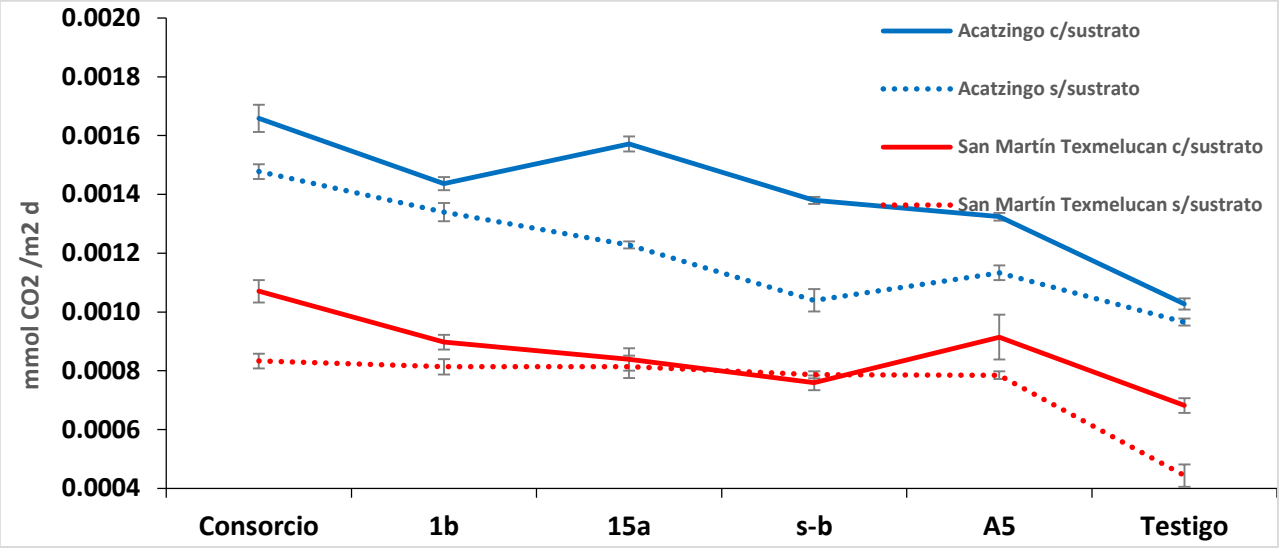
Anexo 20. Cuantificación de población bacteriana fijadora suelo no estéril de San Martin



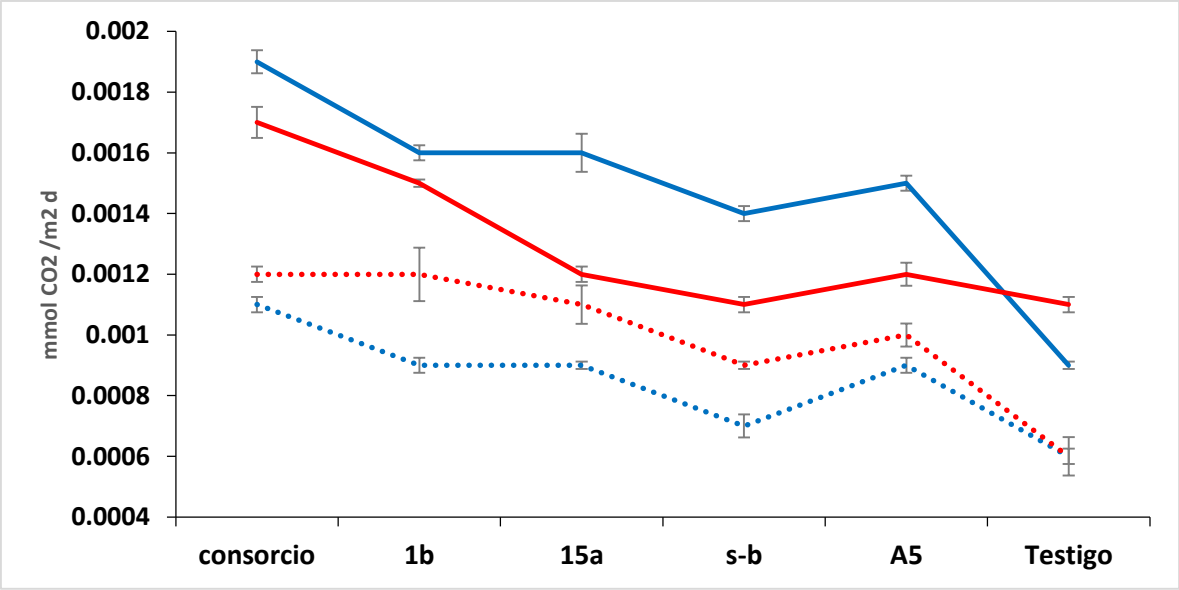
Anexo 21. Análisis de vectores propios de la matriz de correlación.

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8
pob.fijadora	0.308	0.222	0.508	0.039	-0.718	-0.227	-0.158	0.072
pob.tolerante a diesel	0.397	0.440	-0.158	0.290	0.025	0.110	0.721	0.085
pob. Inoculante	0.396	-0.312	0.120	0.073	-0.055	0.830	-0.166	0.086
pob.mesofilica	0.273	0.173	0.613	0.081	0.685	-0.143	-0.152	-0.031
pH	0.286	0.460	-0.507	0.217	0.050	-0.019	-0.623	-0.109
%biodegradacion	0.479	-0.356	-0.120	-0.181	-0.026	-0.231	0.123	-0.727
[diésel] ppm	-0.440	0.384	0.235	0.126	-0.090	0.378	0.032	-0.660

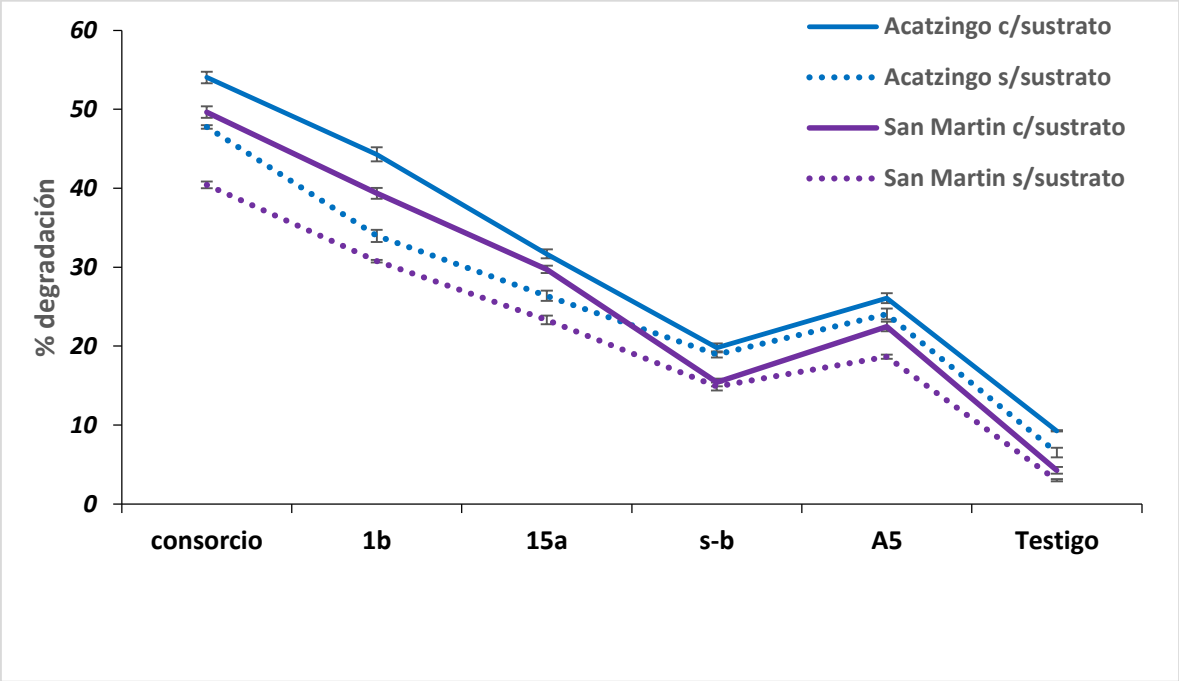
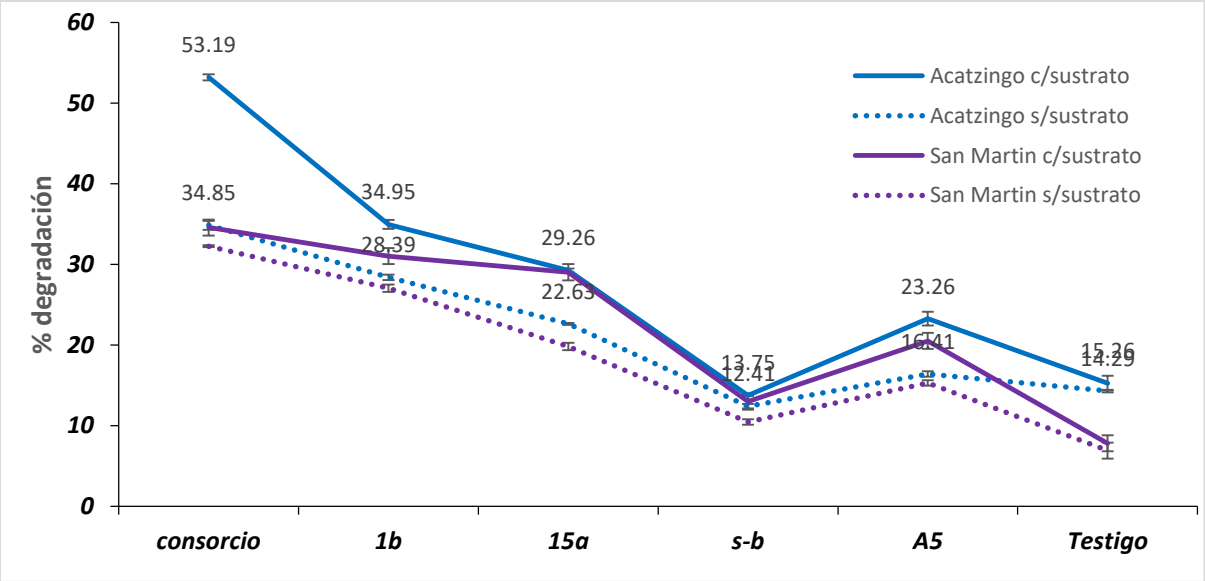
tasas de respiración de suelo estéril de Acatzingo y San Martin.



Tasa de respiración de suelo no estéril Acatzingo y San Martin.



Tasa de biodegradación de diésel a 90 días en suelos estéril de Acatzingo y San Martin.



Tasa de biodegradación de diésel a 90 días en suelos no estériles de Acatzingo y San Martin Texmelucan