



DOI: <https://doi.org/10.70208/3007.8245.v6.n1.359>

*Cinética de degradación del petróleo durante la biorremediación de un suelo tropical con *Bacillus subtilis* en un reactor por lote*

Jayr Humberto Centeno Díaz

jayr.centenod@gmail.com

<https://orcid.org/0009-0008-7309-0058>

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
Tabasco-México

Yolanda Córdova Bautista

yolanda.cordova@ujat.mx

<https://orcid.org/0000-0001-5680-9640>

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
Tabasco-México

Marcia Eugenia Ojeda Morales

marcia.ojeda@ujat.mx

<https://orcid.org/0000-0003-0360-4654>

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
Tabasco-México

José de los Santos López Lázaro

jose.lazaro@ujat.mx

<https://orcid.org/0000-0002-6461-1623>

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
Tabasco-México

Juan Gabriel Álvarez Ramírez

gabriel.alvarez@ujat.mx

<https://orcid.org/0000-0001-5485-5950>

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
Tabasco-México

RESUMEN

En la degradación de hidrocarburos totales del petróleo (HTP), la cepa *B. subtilis* se utilizó para evaluar la eficiencia de remoción de HTP y la cinética de degradación de HTP en un suelo tropical agrícola. Se estableció un diseño experimental unifactorial con cinco tratamientos: suelo + 1% de arena + sin aire; suelo + 1% de arena + aire; suelo + 1% de arena + lombricomposta + aire; suelo + 1% de arena + lombricomposta + sin aire; y atenuación natural. La mayor degradación de HTP fue de 86 ± 1.25 % en el tratamiento compuesto por suelo + 1 % de arena + lombricomposta + aireación. Con una producción de CO_2 de 167 ± 3 mg, pH de 7.5 y tasa de degradación de HTP con 0.031 día^{-1} . La cinética de degradación de los hidrocarburos fue de 1er orden ($R^2 > 0.88$). En este trabajo *B. subtilis* fue estimulada por los nutrientes de la lombricomposta, lo que propició una bioaumentación que favoreció la degradación de los HTP en un suelo agrícola de textura franco-limoso.

Palabras clave: Remoción de HTP, Cinética de remoción, Bioaumentación, hidrocarbonoclasta



*Degradation kinetics of crude-oil during bioremediation of tropical soil using *Bacillus subtilis* in batch reactor*

ABSTRACT

In the degradation of total petroleum hydrocarbons (TPH), the *B. subtilis* strain was used to evaluate TPH removal efficiency and degradation kinetics in a tropical agricultural soil. A one-factor experimental design with five treatments was established: soil + 1% sand + no air; soil + 1% sand + air; soil + 1% sand + vermicompost + air; soil + 1% sand + vermicompost + no air; and natural attenuation. The highest TPH degradation was $86 \pm 1.25\%$ in the treatment consisting of soil + 1% sand + vermicompost + aeration. This treatment produced 167 ± 3 mg of CO₂, had a pH of 7.5, and a TPH degradation rate of 0.031 day^{-1} . The hydrocarbon degradation kinetics were first order ($R^2 > 0.88$). In this work, *B. subtilis* was stimulated by the nutrients in the vermicompost, which led to bioaugmentation that favored the degradation of TPH in an agricultural soil with a silty-loam texture

Keywords TPH removal, Removal kinetics, Bioaugmentation, Hydrocarbonoclasts



INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental ha aumentado debido a la rápida industrialización. Entre los contaminantes que preocupan por su alta toxicidad y el daño que causan al medio ambiente y a la salud se encuentra el petróleo. Existe una contaminación frecuente de suelos y aguas por este tipo de contaminante. Cuando el petróleo se derrama en el suelo, se adhiere a las arcillas y partículas del suelo, lo que impide el movimiento de iones y afecta a la microbiota y a la cobertura vegetal del suelo. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) reportó que el suelo está degradado en un 26% debido a un gran número de factores, entre los que se encuentran los contaminantes orgánicos derivados de la industria del petróleo (FAO, 2021). Los derrames de hidrocarburos no solo afectan el medio ambiente, sino que también impactan en la economía y en la salud pública (Trevor et al., 2021). Por eso, se han desarrollado diversas tecnologías a fin de recuperar sitios contaminados, tales como: electrorremediación, lavado, solidificación/estabilización, vitrificación, desorción térmica y biorremediación. En esta última, la rehabilitación del suelo contaminado se realiza mediante procesos microbianos en los que ciertos microorganismos transforman los contaminantes en productos metabólicos inocuos (Ogbeh et al., 2019). Los microorganismos empleados pueden ser autóctonos del sitio contaminado o exógenos, procedentes de otros sitios (exógenos). La biorremediación se considera eficaz y fiable debido a sus características ecológicas. Además, el tratamiento puede realizarse in situ o ex situ, en condiciones aerobias o anaerobias. Los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Sin embargo, es importante mencionar que el éxito de la biorremediación dependerá de las características fisicoquímicas del suelo a tratar. Estudiar la eficiencia del proceso mediante la cinética de degradación del contaminante ha permitido desarrollar tecnologías eficientes en procesos por lotes para el tratamiento de aguas (Sarioglu y Begun, 2016; Cordova et al., 2018). Pero existen pocos estudios que reporten la degradación del contaminante considerando la cinética de degradación del hidrocarburo en suelos. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la cinética de degradación de los HTP según las diferentes opciones de tratamiento y comparar las tasas de degradación para seleccionar el tratamiento adecuado para futuras aplicaciones.



MATERIALES Y MÉTODOS

Suelo y características

Muestras compuestas del suelo tropical sin petróleo fueron recolectadas de la capa superior (0-20 cm) de un campo agrícola cultivado con banano con historial de derrames de hidrocarburos. El suelo se secó a la sombra, se molió con un mazo de madera y se tamizó con un tamiz de malla de 2 mm. Las características físicas y químicas del suelo y los métodos de determinación se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características físicas y químicas del suelo

Parámetro	Magnitud	Método de determinación*
pH	7.6	AS-02
CaCO ₃ (%)	1.06	AS-29
N-total (%)	0.16	AS-08
Conductividad eléctrica (ms cm ⁻¹)	0.34	AS-18
Fósforo disponible (mg kg ⁻¹)	15.81	AS-10
Cationes intercambiables (Cmol kg ⁻¹)	K=0.48, Na=0.25, Ca=38.28, Mg=6.51	AS-13
Capacidad de intercambio catiónico (%)	25.56	AS-13
Materia orgánica (%)	2.9	AS-07
Textura (%)	Arcilla=15.26, Limo=48.35, Arena= 36.37 (Franco-limoso)	AS-09
Densidad real (g cm ⁻³)	1.8	AS-04
Densidad aparente (g cm ⁻³)	1.07	AS-03

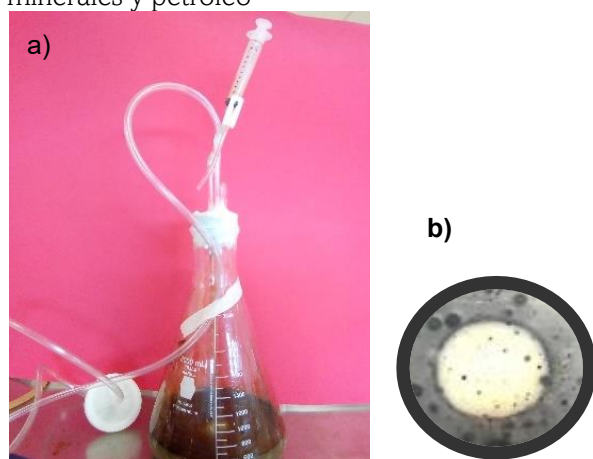
Rutinas analíticas recomendadas por la NOM-021-RECNAT-2000 (SEMARNAT, 2000)

Microorganismo hidrocarbonoclasta

B. subtilis es una bacteria autóctona electrogénica aislada de las aguas residuales de la industria azucarera (Córdova-Bautista y col., 2018). Para evaluar el potencial de crecimiento de *B. subtilis* en medio con petróleo, se adicionaron 100 mL de un inóculo de 10 mL de medio mineral (g/L: 10 NaCl, 1.5 NH₄NO₃, 0.5 KH₂PO₄, 0.5 K₂HPO₄, 0.02 FeSO₄, 0.1 MgSO₄, 0.1 CaCl₂, 0.0005 MnSO₄ y 0.00064 ZnCl₂) y 10 g de petróleo como única fuente de carbono (Ma y col., 2015). Después de 30 días de incubación a temperatura ambiente, se realizó la siembra de *B. subtilis* con el método de siembra por extensión en placa en medio mineral-petróleo con la adición de 23 g de agar-agar (Bradley D y col., 1997). Después de 72 horas de incubación, se realizó el conteo de *B. subtilis* (Figura 1).



Figura 1. a) Cultivo de *B. subtilis* en medio mineral con petróleo y b) colonia de *B. subtilis* en agar con minerales y petróleo



Diseño de experimento

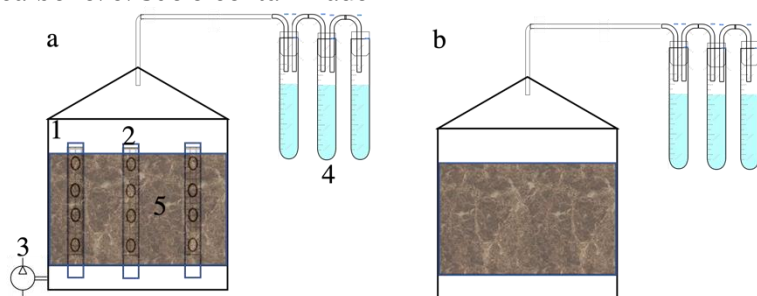
Cinco tratamientos se establecieron en un diseño experimental unifactorial completamente aleatorizado por triplicado (Tabla 2). La concentración de petróleo con 22.2 °API en el suelo de estudio fue de 10 000 ppm de HTP. Cada unidad experimental consistió en una celda rectangular de plástico (15 cm de altura, 2 cm de base y 10 cm de ancho) con una masa de suelo de trabajo de 1000 g (Figura 2). La entrada de aire en la celda experimental se realizó mediante un compresor. El aire se distribuyó en el sistema a través de tubos de pvc perforados y empacados con malla de nylon. El suelo utilizado se esterilizó a calor húmedo en autoclave a 1.3 kg cm⁻² durante 3 horas y el recipiente de plástico se esterilizó con alcohol etílico al 98 %. A cada unidad experimental se adicionó agua destilada estéril para alcanzar la humedad del 40%. A cada tratamiento se adicionaron 10 mL de inóculo de *B. subtilis*.

Tabla 2. Descripción de los tratamientos de biorremediación en suelos con petróleo

Tratamiento	Composición
Trat 1	Suelo + 1% de arena + sin aire
Trat 2	Suelo + 1% de arena + aire
Trat 3	Suelo + 1% de arena + lombricomposta + aire
Trat 4	Suelo + 1% de arena + lombricomposta + sin aire
Trat 5	Atenuación natural

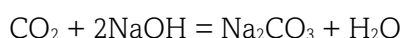
Características de la lombricomposta (50 % cascara de cacao, 25 % bovinaza y 25 % tallo de plátano: pH = 7.5, CE=3.5 ds m⁻¹, relación C/N= 10, humedad= 40%, densidad aparente= 0.61 g mL⁻¹. Rutina analítica de la NMX-FF-109-SCFI-2008.

Figura 2. Esquema de la celda para el proceso de biorremediación con aire (a) y sin aire (b). 1. Celda experimental. 2. Entrada de aire en la matriz de suelo. 3. Compresor de aire. 4. Sistema de captura de carbono. 5. Suelo contaminado



Actividad microbiana por respirometría

El CO₂ liberado durante el metabolismo microbiano es una medida del índice de la tasa de respiración. La concentración de CO₂ generada por los microorganismos se midió cada 72 horas y se realizó mediante el método de incubación en medio cerrado, donde el CO₂ fue capturado en 5 mL de NaOH 1N (Tapeiro y col., 2019). La producción de CO₂ se estimó mediante titulación con HCl 0.1 N en presencia de tres gotas de fenolftaleína al 1% y 3 mL de BaCl₂ al 2%. El BaCl₂ se utilizó para precipitar los carbonatos. La reacción con la cual el CO₂ se capturó es:



La cantidad de CO₂ adsorbido es equivalente a la cantidad de NaOH consumida. Para determinar la concentración de CO₂ se precipitó el carbonato (CO₃²⁻) con BaCl₂ se tituló el remanente y se calculó con la siguiente ecuación:

$$R = (B - M)NE \quad \text{Ec. 1}$$

donde:

R = respiración microbiana en mg de CO₂, B = volumen de ácido necesario para titular el NaOH en el blanco (mL), M = cantidad de ácido necesaria para titular el NaOH de la muestra (mL), N = normalidad del ácido y E = peso equivalente del CO₂.

Análisis de HTP por espectrofotometría

Durante la biorremediación, la concentración de HTP se midió durante 30 días utilizando la técnica propuesta por Vu-Duc y col. (2002). Para la extracción de los HTP se tomaron 5 g de muestra de suelo y se le adicionaron 20 mL de hexano, después se llevó al sonicador donde se mantuvo por 20 minutos.



Seguidamente, se filtró con papel Whatman 40 y se pipetearon 5 mL que se aforaron a 10 mL. Después se midió la absorbancia a 400 nm, a la vez se preparó una curva de calibración ($Abs = 0.0028 HTP_{(ppm)} + 0.004, R^2 = 0.99$) para estimar la concentración de la muestra problema y después se calculó la concentración de HTP (ppm) con la siguiente ecuación:

$$HTP = HTP_{(ppm)} \left(\frac{mg}{L} \right) \frac{0.02 L}{0.005 kg} * \frac{0.01 L}{0.005 L} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

$HTP_{(ppm)}$ es la concentración de la muestra problema estimada de la curva de calibración.

$$HTP_{PPM} = (ABS - 0.004) / 0.0028$$

Análisis de hidrocarburos fracción pesada

El efecto de las condiciones sobre los tratamientos se determinó mediante la eficiencia de remoción del HTP, tomando como referencia la norma oficial NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (SEMARNAT, 2012). Las muestras de suelo se recolectaron 90 días después de establecerse el experimento, y el petróleo se extrajo con hexano de grado analítico durante 30 minutos en baño ultrasónico. El material extraíble fue tratado con gel de sílice estandarizado para la separación de compuestos polares y determinación gravimétrica.

Cinética de degradación de HTP

Los modelos cinéticos se utilizan para determinar la importancia de las relaciones entre variables para guiar el diseño de experimentos y constituyen una herramienta útil para la predicción de procesos activos de biorremediación tanto en sistemas aerobios como en anaerobios (Sarioglu y Begun, 2016). Para el análisis de los datos correspondientes a la remoción del contaminante, se utilizaron los siguientes modelos cinéticos: ecuaciones de cero, de primer y de segundo grado.

$$HTP_t = HTP_0 - k_0 t \quad \text{Ec. 3}$$

El valor de k_0 se obtuvo al graficar HTP_t en función del tiempo t , y el valor de K_0 se tomó de la ecuación 3 (la ecuación ajustada).

$$HTP_t = HTP_0 e^{-k_1 t} \quad \text{Ec. 4}$$



El valor de k_1 se obtuvo al graficar ($\ln HTP_i$) versus el tiempo t y el valor de k_1 se tomó de la ecuación 4.

$$\frac{1}{HTP_i} = \frac{1}{HTP_0} + k_2 t \quad \text{Ec. 5}$$

El valor de k_2 se obtiene al graficar ($1/HTP_i$) versus el tiempo t y el valor de K_2 se obtiene de la ecuación 5. El valor de k_2 puede obtenerse de la ecuación ajustada.

Donde, HTP_t es la concentración de hidrocarburos (ppm) en el tiempo t , HTP_0 es la concentración inicial de hidrocarburos en el tiempo cero, K_0 es la constante de degradación o tasa de degradación de cero órdenes en (ppm)*t, k_1 es la tasa de degradación de primer orden dada en $1/t$ y k_2 es la tasa de degradación de segundo orden dada en ($1/\text{ppm} \cdot t$) y t es el tiempo dado en días, horas o segundos.

Análisis estadístico

Con el modelo estadístico de la ecuación 6 se realizó el ANOVA unidireccional para analizar los datos de eficiencia en la remoción de HFP y concentración de CO_2 . Cuando el ANOVA mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) se utilizó la prueba de Tukey para la comparación de medias. Previo al ANOVA, la prueba de normalidad y homogeneidad de varianzas fueron verificadas.

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ji} \quad i = 1, 2, 3 \dots t \quad j = 1, 2, 3 \dots r \dots \dots \text{(ec. 6)}$$

donde:

Y_{ij} = variable respuesta en tratamiento i , repetición j .

μ = media general.

α_i = efecto del tratamiento i .

ϵ_{ij} = error aleatorio; $\epsilon_{ji} \sim N(0, \sigma^2)$.

Los datos obtenidos fueron analizados en el software Rstudio 2026.01-392.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

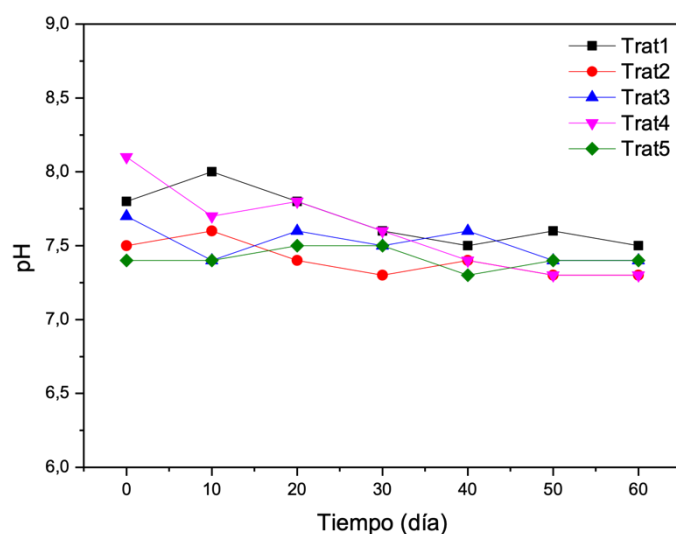
Dinámica del pH y producción de CO_2 en la remoción de HTP

El pH juega un papel imprescindible en el proceso de degradación del contaminante, ya que valores por encima o por debajo del pH adecuado pueden inhibir la actividad enzimática (Córdova-Bautista et al., 2018). La figura 2 muestra el comportamiento del pH con respecto al tiempo. Debido a las diferentes



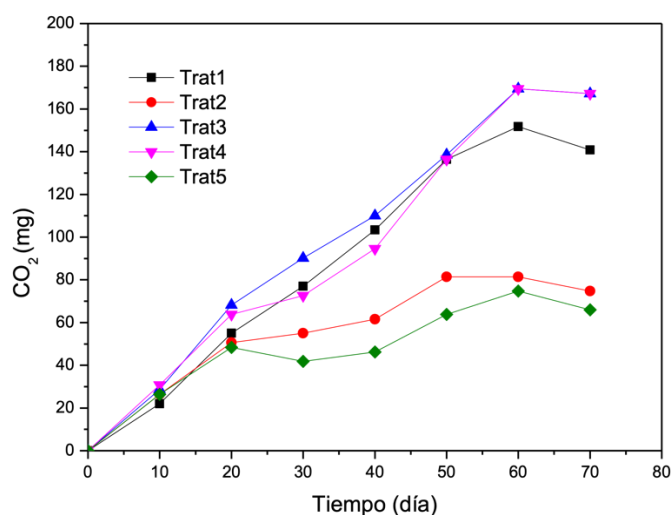
condiciones de cada tratamiento, el pH en un principio fue variable, pero durante el proceso de biorremediación se fue estabilizando en torno a 7.5 hasta los 60 días del proceso.

Figura 2. Variación del pH en los diferentes tratamientos



En la figura 3 se muestra el desprendimiento de CO_2 acumulado durante 70 días del bioensayo, la producción de CO_2 es un indicativo de la actividad metabólica de los microorganismos. La combinación en los tratamientos tuvo efecto en la variación de la producción de CO_2 . En los tratamientos 3 y 4 se registró la mayor producción de CO_2 (~170 mg). Este comportamiento puede ser atribuido a la adición de la composta, ya que posiblemente los ácidos húmicos y los nutrientes disponibles fueron utilizados por las bacterias degradadoras de petróleo, lo que aumentó su población. La menor concentración de CO_2 se encontró en el tratamiento 5 que fue la atenuación natural.

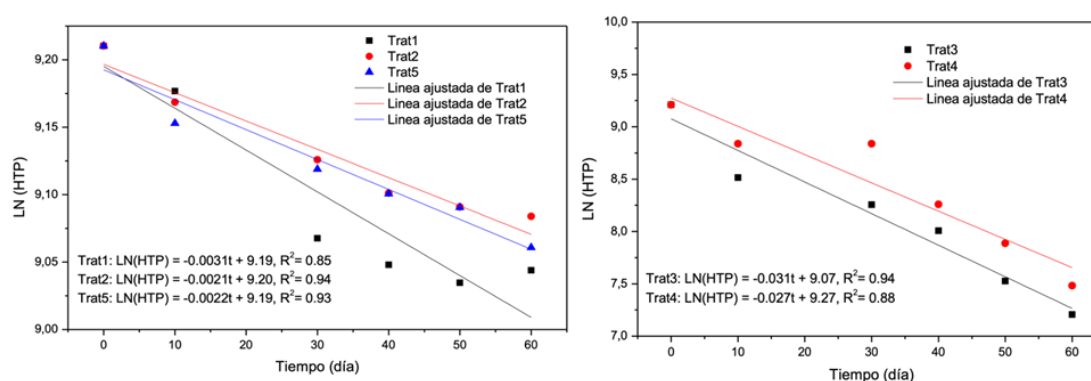
Figura 3. Producción acumulada de CO_2 (mg) durante 70 días para los tratamientos de biorremediación



Cinética de degradación de HTP

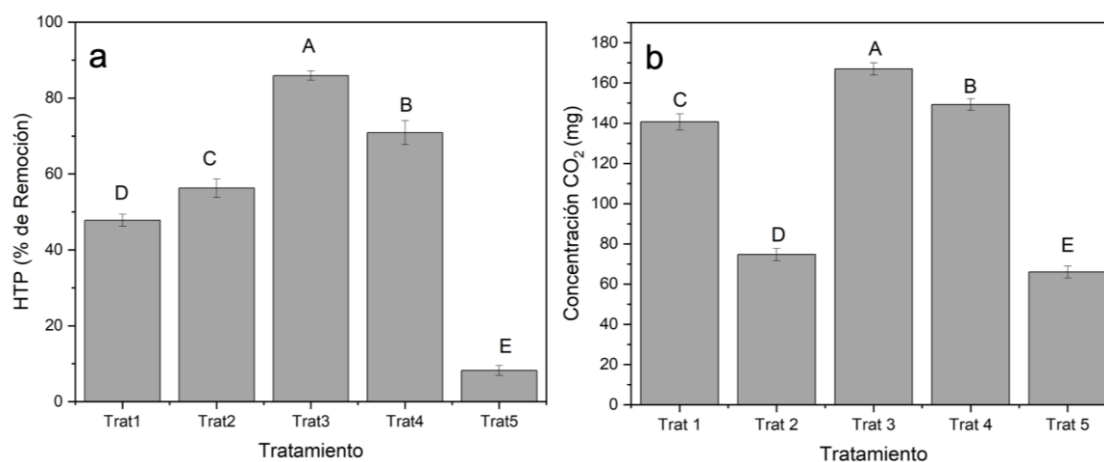
En este estudio, la cinética de biodegradación de los hidrocarburos totales del petróleo se evaluó mediante las tasas de primer orden obtenidas a partir de las gráficas lineales de LN (HTP), según la ecuación 4. Los modelos de cero y segundo orden se consideraron no adecuados, ya que los coeficientes de correlación (R^2) resultaron inferiores a 0.8. Para los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 5 el R^2 fue de 0.85, 0.94, 0.94, 0.88 y 0.93, respectivamente. Esto indica que el ajuste es adecuado, ya que el modelo explica más del 85% del comportamiento de la variable dependiente. La mayor tasa de degradación de 0.03 día^{-1} se presentó en el tratamiento 3, seguida del tratamiento 4 con una tasa de degradación de 0.027 día^{-1} . La única diferencia en estos tratamientos fue el aire, así que la adición de composta fue el factor que tuvo un efecto positivo en la aceleración de la degradación del hidrocarburo del suelo. Esto pudo deberse a que se bioaumentó la población microbiana degradadora de petróleo. Estudios similares en los que utilizaron bacterias aisladas de sedimentos con petróleo aledaños a una refinería reportaron tasas de degradación de petróleo de 0.038 día^{-1} (Chetri et al., 2021). Sarioglu M. and Begun demostraron que la cinética de degradación de un contaminante dependerá de la naturaleza del mismo y de las condiciones a las que es sometido el proceso. Ellos reportaron que, en un sistema por lotes, como en este trabajo, los modelos cinéticos de primer orden son los adecuados y pueden ser útiles para escalar el proceso.

Figura 4. Cinética de 1er orden para la degradación de HTP bajo diferentes tratamientos durante 60 días



Degradación de hidrocarburos del petróleo

Figura 5. a) Comparación de la eficiencia en la remoción de HTP y b) Comparación en la producción de CO₂ en tratamientos



La remoción de HTP en los diferentes tratamientos mostró diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ($p = 2.549E^{-12}$), y los resultados indicaron una degradación de HTP del 86 ± 1.25 % en el tratamiento Trat3 (suelo + 1 % de arena + lombricomposta + aireación), frente a 8.21 ± 1.3 % bajo atenuación natural (Figura 5a). Aunado a la producción de CO₂ (Figura 5b), los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% ($p = 3.526E^{-12}$), con la mayor producción de CO₂ (167 ± 3 mg) en el tratamiento Trat3 (suelo + 1 % de arena + lombricomposta + aireación). Estos resultados evidencian que la bioestimulación/bioaumentación, acoplada a mejoras físicas y de oxigenación, supera ampliamente los procesos espontáneos del suelo. Este patrón es congruente con estudios piloto y de campo, donde la combinación de lombricomposta + consorcios microbianos + manejo de la humedad y la aireación alcanza 70–90 % de remoción de HTP en ≈ 60 –90 días, mientras que la atenuación natural suele limitarse a pérdidas ≤ 15 % atribuibles, en gran parte, a la volatilización y a la biodegradación moderada de fracciones livianas (Curiel-Alegre et al., 2025).

Trabajo a futuro

Para el tratamiento que presentó la mayor tasa de degradación, se propone evaluar el efecto de la temperatura, el pH y la cantidad de composta para mejorar el proceso de degradación.



CONCLUSIONES

La cinética de degradación de HTP siguió una cinética de 1er orden y la tasa de degradación de los HTP está influenciada por la adición de composta en un suelo tropical, ya que posiblemente los ácidos húmicos de esta causan un aumento en la actividad microbiana medida en producción de CO₂. Para un tiempo de 60 días, el tratamiento con la combinación Suelo + 1% de arena + composta + aire presentó la mayor tasa de degradación (0.03 día⁻¹) con producción de CO₂ de 167±3 mg con un pH estable de ~7.5 y una remoción de HTP de 86 ± 1.25 %.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradley D., Jett, Kenneth, L. Hatter, Mark M. Huycke, Michael, S. Gilmore. (1997). Simplified Agar Plate Method for Quantifying Viable Bacteria. *BioTechniques*, 23(4), 648-650. <https://doi.org/10.2144/97234bm22>.
- Chettri, B., Singha, N.A. & Singh, A.K. "Efficiency and kinetics of Assam crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* an *Bacillus* sp.," *Arch Microbiol*, vol. 203, pp. 5793-5803, 2021.
- Córdova B.Y., Paraguay-Delgado F., Pérez-Hernández G., Martínez-Pereyra G., Ramírez.Morales E. "Influence of external resistance and anodic pH on power density in microbial fuel cell operated with *B. subtilis* BSC-2 Strain," *Applied Ecology and Environmental Research*, vol. 16, no 2, pp. 1983-1997, 2018.
- Córdova-Bautista, Y., Paraguay-Delgado, F., Pérez, H. B., Pérez, H. G., Martínez, P. G., Ramírez, M. E. (2018). Influence of external resistance and anodic pH on power density in microbial fuel cell operated with *B. subtilis* BSC-2 strain. *Applied Ecology and Environmental Research*, 16(2), 1983-1997. http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1602_19831997
- Curiel-Alegre, S., Khan, A.H.A., Rad, C. et al. (2025). Bioaugmentation and vermicompost facilitated the hydrocarbon bioremediation: scaling up from lab to field for petroleum-contaminated soils. *Environ Sci Pollut Res* 32, 16601–16616. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-32916-8>.
- FAO and UNEP. Global assessment of soil pollution: Report. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb4894en>. 2021.



<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.01.123>

- Ma, J., Yang, Y., Dai, X., Chen, Y., Deng, H., Zhou, H., ... Yan, G. 2016. Effects of adding bulking agent, inorganic nutrient-and microbial inocula on biopile treatment for oil-field drilling waste. *Chemosphere*, 150, 17–23.
- Ogbeh G.O., Tsokar T.O., Salifu E., " Optimization of nutrients requirements bioremediation of spent-engine oil contaminated soils," *Environmental Engineering Research*, vol. 24, no. 3, pp. 484-494, 2019.
- Sarioglu, M., Begun, O. (2016). Treatment of automotive industry wastewater using anaerobic batch reactors: The influence of substrate/inoculum and molasses/wastewater. *Process Safety and Environmental Protection*, 102, 648-654. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.05.021>.
- SCFI. 2008. Norma Mexicana NMX-FF-109-SCFI-2007. Humus de lombriz (lombricomposta) - Especificaciones y métodos de prueba. *Diario Oficial de la Federación*, junio 2008.
- SEMARNAT, 2000. NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/DO2280n.pdf>
- SEMARNAT, 2012. NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización, así como especificaciones para la remediación. NMX-AA-134-SCFI-2006. Suelos-Hidrocarburos fracción pesada por extracción y gravimetría. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5313544&fecha=10/09/2013#gsc.tab=0.
- Tapiero, J., Piñeros, R., Holguin, V. A. (2019) ¿Cómo la respirometría puede indicar una reducción de la biomasa microbiana en ensilajes? *Agroforestería Neotropical*, 4, 72-78.
- Trevor W. Sleight, Caitlin N. Sexton, Giannis Mpourmpakis, Leanne M. Gilbertson, Carla A. Ng. 2021. A Classification Model to Identify Direct-Acting Mutagenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Transformation Products. *Chemical Research in Toxicology* 34(11), 2273-2286. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00187>



Vu-Duc, T., Huynh, C. K., Lafontaine, M., Bonnet, P., Binet, S. (2002). A spectrometric method for the determination of organic soluble matter in bitumen fumes. Applied Occupational and Environmental. 17(7) 495-500. <https://doi.org/10.1080/10473220290035732>

