



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

REGIÓN POZA RICA –TUXPAN

ESPECIALIZACIÓN EN GESTIÓN E IMPACTO AMBIENTAL

“Aplicación de biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales en sedimentos”

TESIS

Que para obtener el título de:

ESPECIALISTA EN GESTIÓN E IMPACTO
AMBIENTAL

PRESENTA:

Biol. Guadalupe Hernández Cervantes

DIRECTOR:

Dr. Pablo San Martín Del Ángel

CO-DIRECTORA:

Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera

Tuxpan, Ver

2016



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS ESPECIALIZACIÓN EN GESTIÓN E IMPACTO AMBIENTAL

Revisión del trabajo de intervención de la alumna: Guadalupe Hernández Cervantes

JURADO EXAMINADOR

NOMBRE	FECHA	DICTAMEN	FIRMA
<u>César Aldo Javier Enciso Díaz</u>	<u>07/04/16</u>	<u>Aprobada</u>	<u>[Firma]</u>
<u>Marisela López Ortega</u>	<u>07/04/16</u>	<u>Aprobada</u>	<u>[Firma]</u>
<u>He. Rebeca Rojas Ronquillo</u>	<u>07/07/16</u>	<u>Aprobada</u>	<u>[Firma]</u>

En la presente revisión se acordó que el trabajo de intervención denominado “Aplicación de biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales en sedimentos” que presenta la sustentante para obtener el Título de Especialista, está terminado por lo que puede proceder a su inmediata impresión.

En el presente trabajo de intervención: “**Aplicación de biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales en sedimentos**”, realizada por la C. Guadalupe Hernández Cervantes, bajo la dirección del Dr. Pablo San Martín Del Ángel y codirección de la Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera, ha sido revisado y aprobado como requisito parcial para obtener el grado de:

Especialización en Gestión e impacto ambiental



**DRA. PABLO SAN MARTÍN DEL ÁNGEL
DIRECTOR**



**DRA. ROSA IDALIA HERNÁNDEZ HERRERA
CODIRECTORA**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Pablo San Martín del Ángel y a la Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera por comprensión y apoyo en todo momento para la realización de este trabajo.

A mi comisión revisora formada por el Mtro. Oswaldo Javier Enciso Díaz, la Dra. Rebeca Rojas Ronquillo y la Dra. Marisela López Ortega, gracias por su tiempo y valiosos comentarios.

A la Ing. Rocío Rodríguez Cabrero y al Biol. José Manuel Maruri García, por su apoyo para el análisis fisicoquímico del sedimento en el Laboratorio de suelos y a la M. V. Z. Diana Díaz por permitirme el uso de equipo del Laboratorio de Bromatología Veterinaria.

A mis compañeros y amigos, M. C. Ana Catya Jiménez Torres, Biol. Mar. Arizbeth Ramos Sánchez, Biol. Dulce Maripaz Hernández Mendoza, Estefany Reyes Solís y Bernardo Barbosa, por sus consejos y buenos momentos juntos en el Laboratorio.

Finalmente, agradezco a todas las personas que de alguna forma apoyaron a la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres, por el apoyo incondicional que me brindaron durante esta etapa de mi vida, los amo.

Al Dr. Felipe Barrera Méndez, mi amigo y futuro compañero de vida, por apoyarme en todo momento y no dejarme sola, te amo.

“Ninguna de las cosas que valen la pena en esta vida son fáciles”

Nicholas Sparks

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Hidrocarburos	3
2.2 Contaminación por hidrocarburos en lagunas costeras.....	4
2.3 Contaminación de sedimentos por hidrocarburos	5
2.4 Efecto de los hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas del suelo	6
2.5 Biorremediación	7
2.5.1 Métodos de biorremediación	8
2.5.2 Factores que determinan la eficacia del proceso de biorremediación	9
2.6 Estudios realizados para la degradación de hidrocarburos	10
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 OBJETIVO GENERAL	13
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	13
4. ÁREA DE ESTUDIO	14
4.1 Fase experimental	14
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
5.1 Preparación de las muestras.....	15
5.2 Análisis físicos y químicos del sedimento.....	15
5.3 Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP)	16
5.4 Preparación del sedimento para la extracción de hidrocarburos	16
5.5 Extracción de hidrocarburos y cuantificación	17
5.6 Aislamiento de las bacterias.....	19
5.7 Cultivo en agar	20
5.8 Purificación de las cepas bacterianas	20
5.9 Selección de cepas bacterianas hidrocarburofíticas	20
5.10 Incremento de la biomasa bacteriana	21
5.11 Diseño experimental y tratamientos	22

5.12 Proceso de biorremediación.....	23
5.13 Análisis estadísticos.....	24
6. RESULTADOS.....	25
6.1 Análisis físico químico del sedimento contaminado.....	25
6.1.1 Análisis físico del sedimento	25
6.1.2 Análisis químico del sedimento	26
6.1.3 Valores del Potencial de Hidrógeno durante el proceso de biorremediación	27
6.1.4. Valores de Temperatura durante el proceso de biorremediación	28
6.2 Purificación de las cepas hidrocarburoclíticas.....	29
6.3 Cuantificación de HTP en sedimento	31
6.3.1 HTP de 0 a 30 días	31
6.3.2 HTP de 30 a 60 días	33
6.3.3 HTP de 60 a 90 días	35
6.3.4 Valores promedio del contenido de HTP en el periodo de 0 a 30, 30 a 60, y 60 a 90 días.....	37
7. DISCUSIÓN.....	39
8. CONCLUSIONES Y APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO.....	47
8.1 Conclusiones	47
8.2 Aplicación práctica del trabajo.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	50

Índice de tablas

Tabla 1. Composición química del medio Bushnell-Hass.....	19
Tabla 2. Resultados del análisis químico del sedimento contaminado.	26

Índice de figuras

Figura 1. Diseño del método de bioventeo.....	8
Figura 2. Localización del ejido Emiliano Zapata, Tuxpan, Ver.	14
Figura 3. Tratamientos aplicados durante el proceso de Biorremediación.	23
Figura 4. Proporción de arena, limo y arcilla del sedimento contaminado.	25
Figura 5. Valores de Potencial de Hidrógeno obtenidos durante el proceso de biorremediación.	27
Figura 6. Valores de Temperatura obtenidos durante el proceso de biorremediación.	28
Figura 7. Presencia de bacterias hidrocarburoclíticas extraídas del sedimento.	29
Figura 8. Morfología microscópica: formas bacilares Gram negativas.	30
Figura 9. Valores promedio de contenido de HTP en mg/kg a los 30 días del proceso de biorremediación.	32
Figura 10. Valores promedio de contenido de HTP en mg/kg a los 60 días del proceso de biorremediación.	34
Figura 11. Valores promedio de contenido de HTP en mg/kg a los 90 días del proceso de biorremediación.	36
Figura 12. Valores promedio de contenido de HTP en mg/kg durante el proceso de biorremediación (CA= control abiótico, CB= con bacterias y CE= control endógeno).	38

RESUMEN

Como respuesta a la creciente contaminación de suelo y sedimentos, generada por derrames accidentales de hidrocarburos del petróleo, se han implementado diversos sistemas biológicos encaminados a la limpieza y recuperación de las áreas impactadas por estos contaminantes. En el presente trabajo se evaluó el proceso de biorremediación utilizando bacterias hidrocarburohílicas autóctonas del estero de la localidad de Emiliano Zapata, Tuxpan, Veracruz. El aislamiento bacteriano se realizó en medio de cultivo Bushnell-Hass, adicionando petróleo como única fuente de carbono. Una vez aisladas las cepas bacterianas, se cultivaron y purificaron en agar de soya tripticaseína. Se realizaron pruebas cualitativas para seleccionar la cepa con mayor capacidad para degradar hidrocarburos y posteriormente se aumentó la biomasa bacteriana en caldo de soya tripticaseína. El proceso constó de tres tratamientos, al primer tratamiento CA se le aplicó aireación constante (bioventeo) y nutrientes (bioestimulación), el segundo tratamiento CB se le adicionó el incremento bacteriano (bioaumentación), nutrientes y aireación constante, finalmente el tercer tratamiento CE contenía únicamente el incremento bacteriano. Al inicio del experimento se obtuvo una concentración de hidrocarburos en los sedimentos de 25,811.13 mg/kg, posterior a los 90 días de experimentación, los mayores porcentajes de degradación de HTP estadísticamente significativos se obtuvieron en el tratamiento CB, con 8,556.44 mg/kg, correspondiente al 66.85 %. Los tratamientos CA y CE no mostraron diferencias estadísticamente significativas (lapso de 30 a 90 días, $p > 0.05$) obteniendo bajos porcentajes de degradación, con 34.19 % y 29.6 % respectivamente. Con los resultados de esta investigación, se sustenta que la adición de microorganismos nativos (bioaumentación), aplicación de nutrientes (bioestimulación) y aireación constante (bioventeo), tienen efectos positivos en la reducción de las concentraciones de hidrocarburos en sedimentos contaminados.

Palabras clave: aislamiento, degradación, bioaumentación, bioestimulación, bioventeo.

1. INTRODUCCIÓN

Los humedales y las lagunas costeras son ecosistemas frontera entre el medio marino y terrestre. Existen diversos tipos de humedales (marismas; manglares; lagunas oligohalinas, mesohalinas y euhalinas; etc.) en los que se alberga buena parte de la biodiversidad del planeta (EEA, 2010). Desde un punto de vista socioeconómico, estos ecosistemas son importantes proveedores de bienes y servicios, tales como alimentos, materias primas, patrimonio cultural, regulación del clima, indicadores de cambio global, recreación y turismo, entre otros, que tienen una notable influencia en los niveles de bienestar de la sociedad (Hanley *et al.*, 2003). Numerosos ecosistemas costeros presentan impactos en la calidad de sus aguas y en sus comunidades biológicas (EEA, 2000, Pérez-Ruzafa y Marcos, 2008). 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. Además del impacto ambiental negativo, los derrames de hidrocarburo generan impactos de tipo económico, social y de salud pública en las zonas aledañas al lugar afectado (Pardo *et al.*, 2004).

Por lo cual, existen diferentes tecnologías y métodos para la recuperación de suelos contaminados con derivados de petróleo, sin embargo la biorremediación es una tecnología que en los últimos años se ha venido desarrollando como una alternativa más económica y ambientalmente sostenible para el tratamiento de suelos

contaminados (Filonov *et al.*, 2006). Dicha tecnología utiliza microorganismos autóctonos, éstos en el suelo pueden degradar un gran número de constituyentes de lodo pero su eficacia y su población son afectadas cuando algunos contaminantes tóxicos están presentes en altas concentraciones. La reintroducción de microorganismos aislados de un sitio contaminado ayuda a resolver este problema ya que los microorganismos pueden degradar los constituyentes del petróleo crudo y tiene una gran tolerancia a la toxicidad (Drysdale *et al.*, 1999).

La biorremediación puede llevarse a cabo con dos enfoques: la bioaumentación que se realiza con la adición externa de microorganismos degradadores y la bioestimulación que se realiza con la adición de nutrientes para favorecer el crecimiento de los microorganismos y de esta manera aumentar la velocidad de la degradación (Margesin y Schinner, 2001).

En el presente trabajo se evaluó el proceso de biorremediación en sedimentos contaminados por hidrocarburos mediante las técnicas de bioventeo, bioaumentación y bioestimulación como una alternativa frente al deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente en el estero Emiliano Zapata, Tuxpan, Veracruz, donde la problemática ambiental se ha asociado principalmente a la cercanía de instalaciones petroleras.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hidrocarburos

En México existe un gran número de sitios contaminados, principalmente con hidrocarburos del petróleo. Por ello, en los últimos años, se ha generado gran interés por parte de las instituciones gubernamentales y privadas por la legislación ambiental y remediación de estos sitios. El conocimiento del tipo de contaminación y su concentración es fundamental para establecer las condiciones del sitio, el riesgo que representa y la selección de posibles tecnologías de recuperación (Alemán, 2009).

El crudo de petróleo se caracteriza por ser un líquido negro, viscoso y con una composición química sumamente compleja, pudiendo contener miles de compuestos, básicamente de la familia de los hidrocarburos (Rosini, 1960). Los hidrocarburos forman parte de la familia predominante de compuestos, por lo que constituyen uno de los grupos de contaminantes ambientales más importantes, tanto por su abundancia, como por su persistencia en distintos compartimentos ambientales (Casellas *et al.*, 1995). La composición elemental de un crudo está condicionada por la predominancia de los compuestos tipo hidrocarburo: 84-87 % de carbono, 11-14 % de hidrogeno, 0-8 % de azufre y de 0-4 % de oxígeno y nitrógeno (Rahman *et al.*, 2007).

Mayoritariamente son alcanos de cadena lineal (*n*-alcanos o *n*-parafinas), alcanos ramificados (en menor cantidad), cicloalcanos (o naftenos) y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos (Fernández *et al.*, 1992).

2.2 Contaminación por hidrocarburos en lagunas costeras

Las lagunas costeras son cuerpos acuáticos litorales separados del mar por algún tipo de barrera y con el eje mayor paralelo a la línea de costa (Lankford, 1977). Además la comunicación con el mar puede ser permanente o efímera y son el resultado del encuentro entre dos masas de agua de diferentes características (Contreras, 2010).

Actualmente uno de los principales problemas ambientales que se presenta en las áreas marinas y costeras del Golfo de México es la contaminación proveniente de los asentamientos humanos, las actividades agrícolas, turísticas o industriales; así como de la extracción, procesamiento y transporte de petróleo y gas (Rivera y Borges, 2006).

En lagunas costeras, gran parte de los contaminantes como plaguicidas e hidrocarburos, al igual que los metales se adhieren fuertemente a las partículas del sedimento. En la fracción fina de los sedimentos se encuentran generalmente minerales arcillosos y materia orgánica, es decir, la fracción de limos y arcillas es donde estarán las mayores concentraciones de estos contaminantes debido a que

el área de contacto entre ellos favorece su adhesión a estas partículas finas (Hansen y León, 1995). Es por ello que los sedimentos son un factor fundamental en el control de los ambientes costeros, ya que generalmente presentan concentraciones considerables de elementos traza y nutrientes (Calva y Torres, 2011).

2.3 Contaminación de sedimentos por hidrocarburos

Debido a los procesos sedimentarios muchos constituyentes del petróleo cuando se derraman o vierten en áreas costeras, tienen como destino final los sedimentos. Este fenómeno es más agudo en los estuarios y otras áreas costeras someras, donde es baja la acción de las olas y, en cambio, es alta la tasa de sedimentación. Consecuentemente, los sedimentos actúan como reservorios de los desechos petroleros y de otros contaminantes (Alemán, 2009).

El petróleo y sus componentes pueden permanecer en los sedimentos durante largos periodos gracias a la lentitud de la biodegradación (Botello y Villanueva, 1987), ya que cuando éstos se derraman en una columna de agua se presentan en un área superficial grande, con lo cual se facilita el ataque microbiano, mientras que en los sedimentos se acumulan como una delgada película o membrana con un área superficial menos efectiva, reduciendo la velocidad de biodegradación. La degradación microbiana de manera natural puede tardar aproximadamente 20 años

para que algunos compuestos sean completamente degradados (Christensen y Larsen, 1993).

2.4 Efecto de los hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas del suelo

Suelos contaminados con gas natural o crudo han mostrado incrementos en materia orgánica, carbono total y nitrógeno comparado con suelos normales (Ellis y Adams, 1960). Plice (1948) encontró grandes incrementos en la materia orgánica en suelos que se han contaminado con crudo y también encontró que los suelos contaminados con gas natural tienen pH alrededor del punto neutral. Evgin *et al.* (1989) determinaron efectos de los hidrocarburos en algunas propiedades mecánicas del suelo como la cohesión. Obteniendo que dicha contaminación provoca un cambio considerable en las características de deformación y también se traduce en una reducción significativa en el ángulo de fricción interna.

En cuanto a los efectos en las propiedades físicas y químicas del suelo, suceden cambios en las condiciones de fertilidad, donde se observan incrementos en nitrógeno y contenido de materia orgánica (Plice, 1948). De manera similar, Dobson y Wilson (1964) observaron mayor actividad microbiológica en suelos impregnados con hidrocarburos que en suelos libres del mismo.

Martínez *et al.* (2001) señalan que es muy importante conocer las características físicas y químicas de un suelo que se ha impactado con hidrocarburos y que son básicos si se requiere diseñar algunas tecnologías de restauración. Así, por ejemplo, la porosidad, pH, humedad, temperatura y contenido de nutrimentos son indispensables para los procesos de biorremediación (Morgan y Watkinson, 1989).

2.5 Biorremediación

La biorremediación consiste en el uso de organismos como plantas, hongos, bacterias naturales o modificadas genéticamente para neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o convirtiéndolas en inocuas para el ambiente y la salud humana (Benavides y Quintero, 2005). Las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, aunque también se han empleado otros organismos como algas y hongos para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo.

La Biorremediación es considerada como la más deseable aproximación a la remediación de suelos contaminados en contraste a alternativas más costosa y de menor aceptación pública como la incineración. Los tratamientos biológicos de degradación en sitios contaminados pueden ser eficientes y económicos si las condiciones de biodegradación son optimizadas (Álvarez *et al.*, 2001, Belloso *et al.*, 1998 y Cursi & Calleja, 2000). Este tipo de remediación se puede acelerar por adición de nutrientes como nitrógeno y fósforo, la modificación de variables

operacionales como humedad, pH, oxígeno, y la inoculación microbiana (Ercoli *et al.*, 2001).

2.5.1 Métodos de biorremediación

El **bioventeo**, consiste en la ventilación forzada del suelo mediante la inyección de O_2 en la zona saturada mediante pozos de inyección; debido a la aireación se va a favorecer la degradación de hidrocarburos por volatilización y migración de la fase más volátil del contaminante, y por biodegradación, ya que al incrementar la oxigenación del suelo se estimula la actividad microbiana (Benavides y Quintero, 2005).

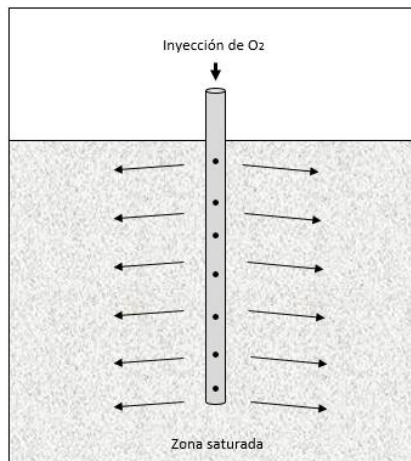


Figura 1. Diseño del método de bioventeo.

La **bioestimulación** consiste en la adición de nutrientes, sustratos o aditivos que estimulen el crecimiento y actividad metabólica de los microorganismos

degradadores presentes en la zona impactada (Núñez, 2003). Esta alternativa se aplica cuando existen poblaciones autóctonas con capacidad degradativa en la zona contaminada.

La **bioaugmentación** comprende el uso de enzimas o cultivos de microorganismos con alta capacidad de oxidación con el propósito de eliminar sustancias indeseables (Shmaefsky, 1999), donde se asegura que estén presentes los microorganismos específicos capaces de degradar al compuesto contaminante no deseado hasta sus moléculas básicas.

2.5.2 Factores que determinan la eficacia del proceso de biorremediación

Necesidad de nutrientes: El metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y éstos requieren que los constituyentes químicos se encuentren disponibles para su asimilación y sintetización. Los nutrientes principalmente requeridos son el fósforo y el nitrógeno. Por lo general suele haber en el suelo una concentración de nutrientes suficiente, sin embargo, si éstos no se encontrasen en el rango normal se puede adicionar mayor cantidad al medio. (Arroyo *et al.*, 2004).

pH del suelo: afecta significativamente en la actividad microbiana. El mayor crecimiento por parte de los microorganismos es dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8.

Temperatura: generalmente las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 15 °C y 45 °C (condiciones mesófilas), decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40 °C e inhibiéndose a inferiores a 0 °C (Arroyo *et al.*, 2004).

Humedad: los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células. Un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo.

Estructura química del hidrocarburo: la inherente biodegradabilidad de un hidrocarburo depende, en gran medida, de su estructura molecular. Siendo los parámetros que más van a afectar la halogenación, la existencia de ramificaciones, la baja solubilidad en el agua y la diferente carga atómica (Arroyo *et al.*, 2004).

2.6 Estudios realizados para la degradación de hidrocarburos

Durante el año 2012, San Martín *et al.*, aplicaron un proceso de biorremediación en sedimentos que se encontraban contaminados por hidrocarburos, dicho proceso consistió en bioaumentar bacterias autóctonas y adicionarlas a un sistema de tratamiento en matraces, logrando un mayor porcentaje de remoción de HTP a los 60 días con un valor de un 72 %.

En el año 2013, García empleó un sistema de biorremediación por bioaugmentación en microcosmos, para evaluar la remoción de hidrocarburos totales de petróleo presentes en sedimentos obtenidos de un estero de la localidad de Emiliano Zapata, Tuxpan, Ver. Lo cual consistió en aislar bacterias hidrocarburohólicas exógenas en medio Bushnell-Hass, las cuales se cultivaron y purificaron en agar de soya tripticaseína (AST). Al concluir el experimento se logró una remoción de HTP de 80.54 %, logrando un mayor porcentaje de remoción en los primeros 30 días al obtener un valor de 57.52 %.

En el mismo año, Santiago llevó a cabo un proceso de biorremediación *ex-situ* en lodos de perforación, lo cual consistió en aislar bacterias de las muestras, posteriormente se realizaron resiembras sucesivas hasta purificar las bacterias. Se procedió a la aumentación de masa bacteriana en CST. El experimento duró 90 días, en el cual se logró una degradación del 30 %.

En el año 2014, Lira efectuó una caracterización bioquímica y molecular de bacterias hidrocarburohólicas procedentes del estero aledaños al ejido Emiliano Zapata, Tuxpan, Veracruz. De los cuales se obtuvieron cuatro cepas bacterianas, todas en forma bacilar, tres Gram negativas y una Gram positiva con capacidad de degradación de hidrocarburo. En base a las pruebas bioquímicas empleadas se determinaron taxonómicamente dos géneros *Bacillus* y *Enterobacter*, correspondientes a *Listeria fleischmannii*, *Bacillus coagulans* y *Ochrobactrum intermedium*.

Durante el 2014, Mendo evaluó el proceso de biorremediación en columnas de acrílico a sedimentos contaminados por hidrocarburos empleando bacterias autóctonas de la laguna de Tamiahua, Veracruz. El proceso constó de dos tratamientos, el primero sin bacterias y el segundo con bacterias. El experimento tuvo una duración de 90 días al cual se le inyectó aire de manera constante (bioventeo). Como resultado de dicho experimento se obtuvo que para el tratamiento sin bacterias se logró un 6.44 % de degradación y para el tratamiento con biomasa bacteriana una remoción del 68.36 %.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el proceso integral de biorremediación en sedimentos contaminados por hidrocarburos en el estero de la localidad de Emiliano Zapata, utilizando bacterias nativas hidrocarburolíficas.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar los parámetros físicos y químicos del sedimento.
- Obtener las cepas bacterianas axénicas e hidrocarburolíficas del sedimento contaminado.
- Aplicar el proceso de biorremediación mediante las técnicas de bioventeo, bioestimulación y bioaumentación.
- Determinar el contenido de hidrocarburos totales de petróleo en las muestras de sedimento a los 30, 60 y 90 días.

4. ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras de sedimento se tomaron de un estero ubicado en el ejido Emiliano Zapata del municipio de Tuxpan, Veracruz que se encuentra en las coordenadas: 20°48'33.66"N y 97°13'37.55"O, limita al norte con la playa de Chile Frío y al sur con Cazones de Herrera (INEGI, 2013).

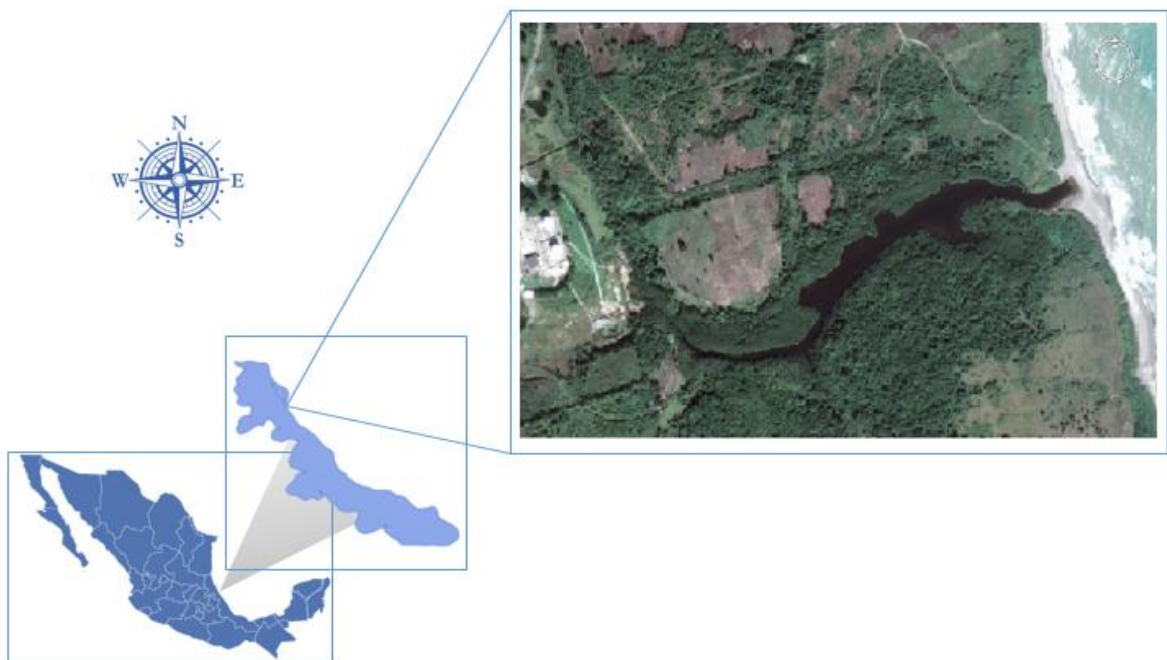


Figura 2. Localización del ejido Emiliano Zapata, Tuxpan, Ver.

4.1 Fase experimental

La fase experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Ambiental en la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Veracruzana Campus Poza Rica- Tuxpan, Veracruz.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Preparación de las muestras

Las muestras de sedimento se trasladaron en bolsas oscuras al laboratorio de Biotecnología Ambiental, en la Universidad Veracruzana, donde se secaron a temperatura ambiente, posteriormente se pasaron por un tamiz de 10 mm de diámetro para eliminar cualquier tipo de basura u otro material no deseado.

Para el análisis físico-químico se tomaron 500 g de sedimento contaminado previamente tamizado. Respecto al aislamiento bacteriano se utilizaron 50 g de sedimento contaminado los cuales fueron almacenados en frascos de vidrio transparente.

5.2 Análisis físicos y químicos del sedimento

Los análisis físicos y químicos se realizaron conforme a la: NOM-021-RECNAT 2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreos y análisis, debido a que no existe una norma que establezca las especificaciones para sedimentos.

Para los análisis físicos y químicos, la muestra de sedimento se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se tamizó y se realizaron los siguientes análisis:

Físicos.- clase textural (hidrómetro de Bouyoucos), densidad aparente (método de la probeta), salinidad, temperatura y conductividad eléctrica (potenciómetro).

Químicos.- pH (potenciómetro), nitrógeno total, fósforo y potasio (técnica colorimétrica, del kit HANNA), calcio, magnesio, hierro, aluminio, cloruros, sulfatos y capa de intercambio catiónico (CIC) del kit LAMOTTE y materia orgánica (Walkley Black, 1932). Los análisis se realizaron en el “Laboratorio de suelos” de la Universidad Veracruzana.

5.3 Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP)

La determinación de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) del sedimento se efectuó por medio del método de reflujo utilizando el equipo de Soxhlet (Fernández *et al.*, 2006).

5.4 Preparación del sedimento para la extracción de hidrocarburos

Para llevar a cabo la extracción de hidrocarburos primero se determinó la humedad de la muestra, se colocó 10 g de sedimento contaminado en un recipiente a peso

constante en la estufa a 30 °C durante 72 horas, hasta que la muestra perdió toda la humedad posible.

Posteriormente, la muestra se sacó de la estufa y se colocó en el desecador para que tomara la temperatura ambiente, después la muestra se pesó nuevamente, registrando el peso final.

El porcentaje de humedad fue determinado por la diferencia de pesos de acuerdo a Fernández *et al.*, (2006) utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(\text{Peso final} - \text{Peso inicial})}{(\text{Peso inicial})} (100)$$

5.5 Extracción de hidrocarburos y cuantificación

Este proceso se realizó con el método de reflujo con equipo Soxhlet, tomando como referencia los métodos, D5369-93 de la ASTM (2003) y 3540 C de la US EPA (1996, 1994).

El proceso consistió en colocar 5 g de sedimento seco, finamente molido en un cartucho de celulosa y después el cartucho fue puesto en la columna extractora del equipo Soxhlet.

Posteriormente, un matraz bola con capacidad de 500 mL se colocó en la estufa para obtener el material a peso constante, después de un lapso de 48 horas se retiró de la estufa. Después se puso en un desecador y se registró el peso inicial, posterior a esto se adicionó 400 mL de hexano A.C.S., se ensambló el matraz con la columna extractora, a continuación se inició el calentamiento hasta alcanzar el punto de ebullición, se mantuvo el reflujo en esas condiciones durante 8 horas de tal manera que se efectuaron de 6 a 8 reflujos por hora.

Al terminar dicho proceso el matraz fue colocado en la estufa 24 horas y después se introdujo en el desecador hasta que llegó a temperatura ambiente, finalmente se registró el peso final del matraz que contenía el extracto orgánico. La extracción y cuantificación de los hidrocarburos se efectuó al inicio del experimento y posteriormente a los 30, 60 y 90 días.

La cuantificación de los HTP se llevó a cabo utilizando la siguiente fórmula.

$$HTPs (mg\ kg^{-1}\ de\ s.s.) = \frac{(RB - RA)(FC)}{(P)(FH)}$$

Dónde:

HTP (mg kg⁻¹ de s.s.)= Hidrocarburos totales de petróleo en mg/kg de sedimento.

RA= Peso (mg) del recipiente vacío a peso constante.

RB= Peso (mg) del recipiente con el extracto orgánico concentrado.

P= Cantidad de suelo extraído (g).

FH= Factor de corrección de humedad (1-(% humedad/100)).

FC= Factor de corrección para transformar a kg de s.s. = 1000.

5.6 Aislamiento de las bacterias

El proceso de aislamiento de bacterias se realizó del sedimento contaminado, obtenido del área de estudio con la finalidad de determinar el tipo de bacterias presentes. Para poder aislar las bacterias se utilizó el medio de cultivo Bushnell-Hass, el cual fue previamente esterilizado en autoclave a 15 libras de presión por 15 minutos. El proceso consistió en agregar 5 g de sedimento en frascos estériles con 50 mL de medio Bushnell-Hass y 0.5 mL de petróleo, los frascos fueron colocados en la estufa a 30 °C por un lapso de 72 horas. Posteriormente, se procedió a realizar el cultivo en AST.

Tabla 1. Composición química del medio Bushnell-Hass.

Reactivo	Formula	c.b.p 1000 mL
Sulfato de magnesio	(MgSO ₄)	0.2 g/L
Cloruro de calcio	(CaCl ₂)	0.029 g/L
Monofosfato de potasio	(K ₃ PO ₄)	1 g/L
Nitrato de amonio	(NH ₄ NO ₃)	1 g/L
Cloruro férrico	(FeCl ₃)	0.5 g/L

5.7 Cultivo en agar

Después del proceso de aislamiento, se efectuó el cultivo bacteriano en cajas Petri medianas que contenían 20 mL de AST estéril.

A partir del cultivo bacteriano que se aisló en el medio Bushnell-Hass, estas cepas se incubaron a una temperatura de 35 °C en un período de 24, 48 y 72 horas (Fletcher, 2000).

5.8 Purificación de las cepas bacterianas

Durante la purificación de las cepas bacterianas se realizaron cultivos sucesivos hasta alcanzar el grado de pureza; para verificar el proceso se efectuaron tinciones de Gram.

Una vez reconocidas las colonias fueron almacenadas en cajas Petri medianas con 20 mL de AST bajo condiciones de refrigeración (4 °C) con el fin de preservar su viabilidad.

5.9 Selección de cepas bacterianas hidrocarburolíficas

Las cepas bacterianas que se obtuvieron fueron seleccionadas de acuerdo a su eficiencia en la biodegradación de hidrocarburos con respecto al tiempo. Se realizó

una prueba cualitativa que consistió en hacer crecer en forma individual las bacterias en frascos que contenían 50 mL de caldo de Bushnell-Hass y 0.5 mL de petróleo, las muestras se incubaron a 35 °C por lapsos de 24, 48 y 72 horas, registrando la degradación que presentaron.

5.10 Incremento de la biomasa bacteriana

La bioaumentación se desarrolló en condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar, con ayuda del mechero, asa bacteriológica, guantes y cubre boca, las bacterias fueron inoculadas en tubos de ensaye que contenían 10 mL de CST que es un medio enriquecedor de bacterias, y se evaluaron mediante el grado de turbidez.

Cuando las bacterias proliferaron en los tubos de ensaye, se vaciaron a matraces con capacidad de 100 mL que contenían CST respectivamente y se repitió el proceso de incubación. Al término de la incubación el contenido se vertió en matraces de 500 mL de CST correspondientemente y se incubaron a 35 °C por 48 hrs.

Una vez que se obtuvo el aumento bacteriano deseado las bacterias se aplicaron al sedimento contaminado para comenzar el proceso de biorremediación.

5.11 Diseño experimental y tratamientos

Para el proceso de biorremediación se elaboró el siguiente diseño: constó de 6 columnas de acrílico con medidas de 45 cm de altura y un diámetro de 5.5 cm. Además de 3 probetas de vidrio con capacidad de 1000 mL.

Las columnas fueron divididas en tres tratamientos: el control abiótico (CA) es una mezcla de sedimento contaminado con hidrocarburos previamente esterilizado enriquecido con CST y triple 17. El tratamiento con bacterias (CB) que contenía sedimento contaminado por hidrocarburos previamente esterilizado con CST y triple 17 y la bioaugmentación de bacterias, las seis columnas fueron conectadas con mangueras a un tubo de material de pvc, por donde se suministró aireación constante a las bacterias (bioventeo) en las columnas. Por último el control endógeno (CE) el cual contenía el sedimento contaminado con hidrocarburos previamente esterilizado más la bioaugmentación de bacterias (Figura 3).



Figura 3. Tratamientos aplicados durante el proceso de Biorremediación.

5.12 Proceso de biorremediación

Durante el proceso de biorremediación las muestras del tratamiento CE y el tratamiento CB se mantuvieron en constante aireación (bioventeo) y se le adicionó continuamente nutrientes (mezcla de CST y triple 17), se monitoreo de forma quincenal la temperatura, humedad y pH del sedimento en los tres tratamientos durante todo el experimento. Se tomaron muestras al inicio, a los 30, 60 y 90 días del experimento, para realizar la cuantificación de hidrocarburos.

5.13 Análisis estadístico

Se realizaron los análisis estadísticos con el programa STATISTICA 7, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la prueba de Tukey (0.05) a los resultados obtenidos de los tratamientos.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis físico químico del sedimento contaminado

6.1.1 Análisis físico del sedimento

Los resultados obtenidos de los análisis físicos de las muestras de sedimento indican que sus principales componentes son: arena 51.32 %, arcilla 31.96 % y limo 16.72 %, dando como resultado una textura Franco-Arcillo-Arenoso de acuerdo a su clasificación agronómica (Figura 4). La densidad aparente que presentó fue media, con un valor de 1.4285 g/cm^3 , posteriormente la conductividad eléctrica fue de $20,958.75 \text{ } \mu\text{S}$, lo que se interpreta como extremadamente salino.

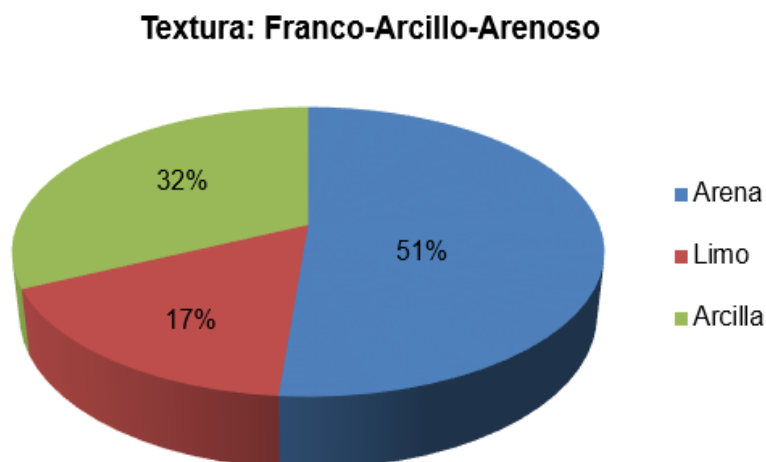


Figura 4. Proporción de arena, limo y arcilla del sedimento contaminado.

6.1.2 Análisis químico del sedimento

De acuerdo a los resultados obtenidos, el pH del sedimento se encuentra en 7.29, lo que indica que es neutro. Por otro lado, la materia orgánica obtuvo un 6.49 % demostrando que es extremadamente rico. En cuanto a los minerales no mostró presencia de carbonatos, nitrógeno total, magnesio, cloruros y cobre. Se obtuvieron valores muy bajos para fósforo, hierro, aluminio y sulfatos, mientras que para potasio y calcio se obtuvieron valores altos. El manganeso obtuvo valores medios, mientras que la capacidad de intercambio catiónico registró 46.58 eq/100g lo que indicó un valor muy alto (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados del análisis químico del sedimento contaminado.

PARÁMETRO	RESULTADO	INTERPRETACIÓN (NOM-021-RECNAT 2000)
PH	7.29	NEUTRO
CARBONATOS	0 %	N/D
MATERIA ORGÁNICA	6.49 %	EXTREMADAMENTE RICO
NITRÓGENO TOTAL	0 ppm	N/D
FÓSFORO	18.25 ppm	BAJO
POTASIO	200 ppm	ALTO
CALCIO	6192 ppm	MUY RICO
MAGNESIO	0 ppm	N/D
MANGANESO	12 ppm	MEDIA
HIERRO	2.5 ppm	MARGINAL
ALUMINIO	10 ppm	BAJO
CLORUROS	0 ppm	N/D
SULFATOS	50 ppm	MUY BAJO
COBRE	0	N/D
CIC	46.58 eq/100g	MUY ALTA

6.1.3 Valores del Potencial de Hidrógeno durante el proceso de biorremediación

Los valores obtenidos del potencial de hidrógeno en los tratamientos variaron entre ellos. El tratamiento CA y el tratamiento CB iniciaron con un pH neutro con 7.7, mientras que el tratamiento CE registró un valor ligeramente ácido de 6.8. Transcurridos los primeros 45 días se registraron valores levemente alcalinos de 8.8 en los tres tratamientos, los valores alcalinos se mantuvieron al final del periodo experimental con 8.6 en el CA, 8.5 para el tratamiento CB y 8.2 en el CE. De acuerdo a los datos registrados se obtuvo un valor promedio para el CA 8.4, para el tratamiento CB fue de 8.2, mientras que para el CE fue de 8.1, siendo ligeramente alcalino en los tres tratamientos. Dichos valores no mostraron diferencias estadísticamente significativas a lo largo del proceso, con un valor de significancia de $p= 0.1310$.

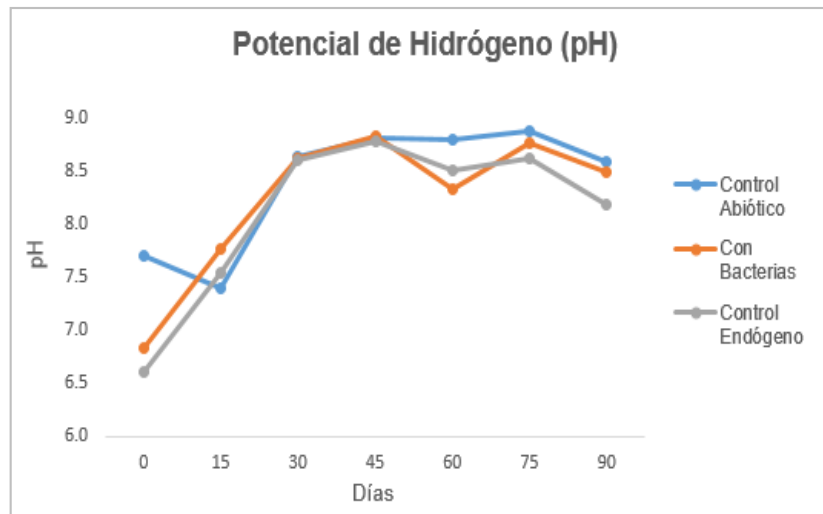


Figura 5. Valores de Potencial de Hidrógeno obtenidos durante el proceso de biorremediación.

6.1.4. Valores de Temperatura durante el proceso de biorremediación

La temperatura que se registró al inicio del proceso de biorremediación para el control abiótico fue de 28.9 °C, para el tratamiento CB y el CE se registró una temperatura de 29 °C respectivamente. Transcurridos los primeros 45 días la temperatura osciló entre 25.7 °C para el CA y para el tratamiento CB, mientras que para el CE se obtuvo un valor de 26.2 °C. Al final del experimento disminuyó ligeramente la temperatura a 24.8 °C para el CA y el tratamiento CB, para el CE 24.7 °C. Se obtuvo un valor promedio para el CA y el tratamiento CB de 26.8 °C, mientras que para el CE el valor promedio fue de 27 °C. De acuerdo a las pruebas estadísticas dichos valores no mostraron diferencias significativas durante el proceso de biorremediación ($p= 0.9003$).

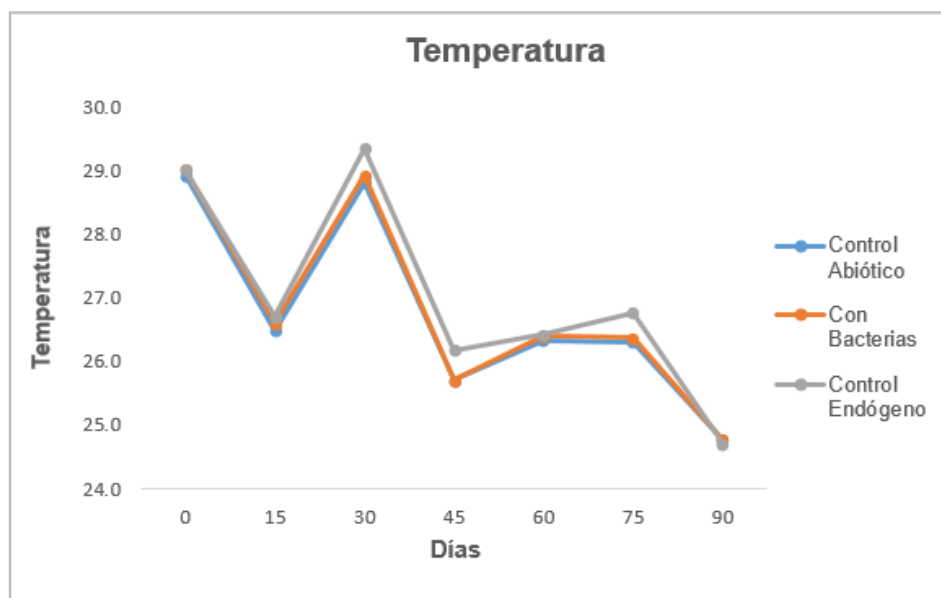


Figura 6. Valores de Temperatura obtenidos durante el proceso de biorremediación.

6.2 Purificación de las cepas hidrocarburoclíticas

Derivado del proceso de aislamiento en el medio Bushnell-Hass, se realizaron resiembras sucesivas de las bacterias en AST para su purificación y se obtuvieron cepas de aspecto cremoso de color beige, agrupadas en colonias de un solo morfotipo (Figura 7).

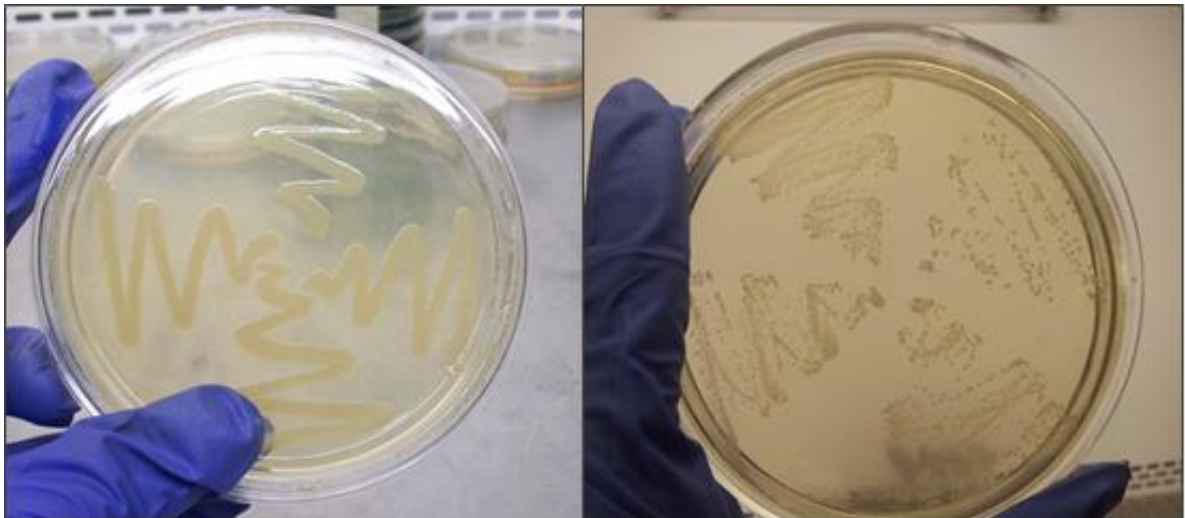


Figura 7. Presencia de bacterias hidrocarburoclíticas extraídas del sedimento.

De igual manera al realizar la Tinción de Gram a las bacterias presentes en el sedimento contaminado, se determinó la presencia de bacterias Gram negativas (color rosa) en forma de bacilos (Figura 8).

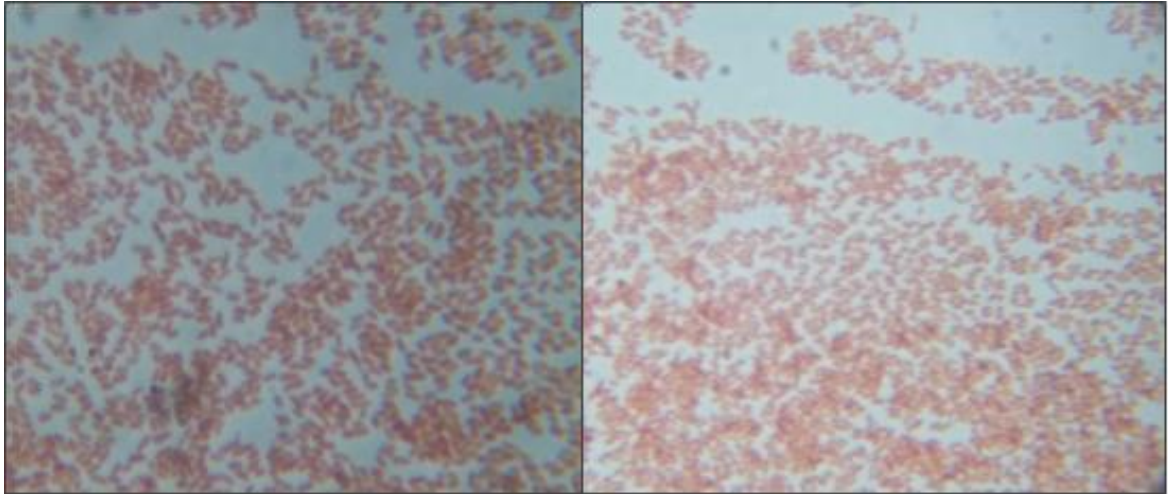


Figura 8. Morfología microscópica: formas bacilares Gram negativas.

6.3 Cuantificación de HTP en sedimento

6.3.1 HTP de 0 a 30 días

Al inicio del proceso de biorremediación para el tratamiento **CA** se obtuvo el valor de 25,811.13 mg/kg de HTP. Durante el lapso de 0 a 30 días del experimento se obtuvo un valor de 22,904.55 mg/kg de HTP. Dicho valor fue estadísticamente más alto con respecto a los otros tratamientos. La diferencia entre el valor inicial y el valor final en este lapso de tiempo, corresponde al 11.27 % de degradación de hidrocarburos. Relativo al tratamiento **CB** los valores promedio de HTP al inicio del proceso de biorremediación fue de 25,811.13 mg/kg de HTP, durante el mismo periodo de tiempo se registró 14,462.37 mg/kg de HTP. Dicho valor fue estadísticamente más bajo respecto a los otros tratamientos, correspondiente al 43.97 % de degradación de hidrocarburos. Respecto al tratamiento de **CE** se inició con 25,811.13 mg/kg de HTP, durante los 0 a 30 días se obtuvo un valor de 18,899.07 mg/kg de HTP. Este valor fue estadísticamente diferente a los valores registrados para los otros tratamientos. Lo que corresponde al 26.78 % de degradación de hidrocarburos (Figura 9). Dichos valores mostraron diferencias estadísticamente significativas durante este lapso de tiempo, con un valor de significancia de $p= 0.000051$.

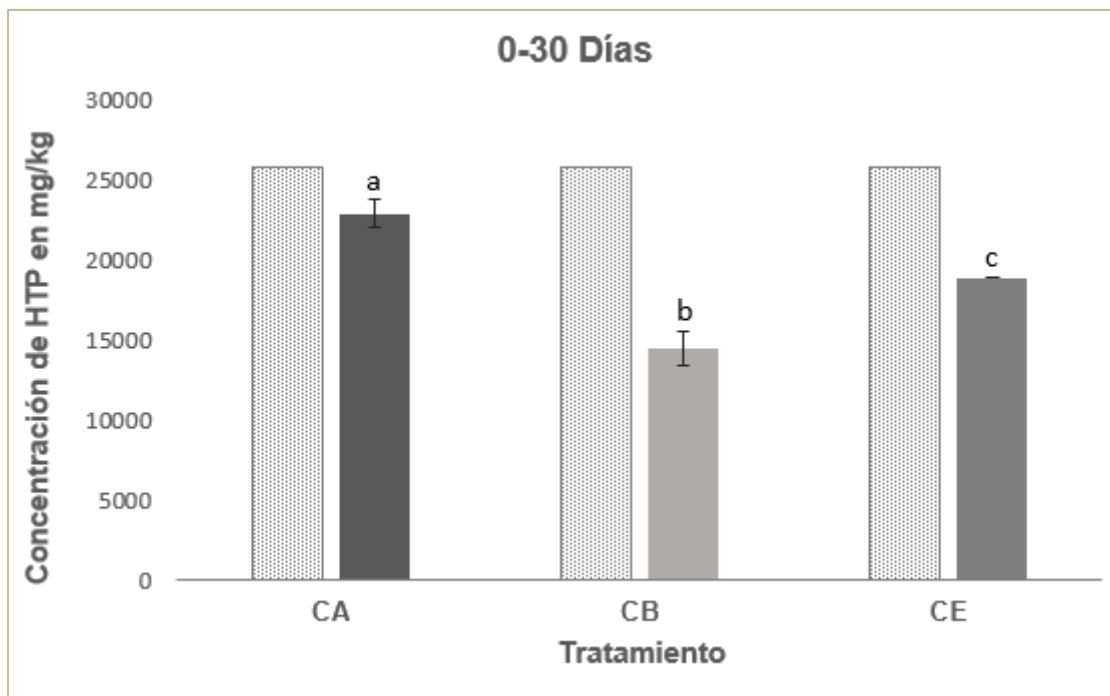


Figura 9. Valores promedio de contenido de HTP en mg/kg a los 30 días del proceso de biorremediación.

6.3.2 HTP de 30 a 60 días

El tratamiento **CA** en el lapso de los 30 a los 60 días del proceso de biorremediación obtuvo un valor de 18,285.02 mg/kg de HTP. Dicho valor fue estadísticamente igual al registrado en el tratamiento del **CE** en el mismo lapso de tiempo ya que registró un valor de 18,290.14 mg/kg de HTP. Respecto al porcentaje de degradación de HTP el **CA** obtuvo un 17.89 % de degradación, mientras que el **CE** un 2.36 % de degradación, partiendo del valor de concentración inicial de HTP de 25,811.13 mg/kg. Por otra parte, el tratamiento **CB** registró el valor más bajo con 8,577.72 mg/kg de HTP. Este valor fue estadísticamente significativo respecto a los otros tratamientos ($p= 0.000013$), lo cual corresponde al 22.8 % de degradación del valor inicial de HTP (Figura 10).

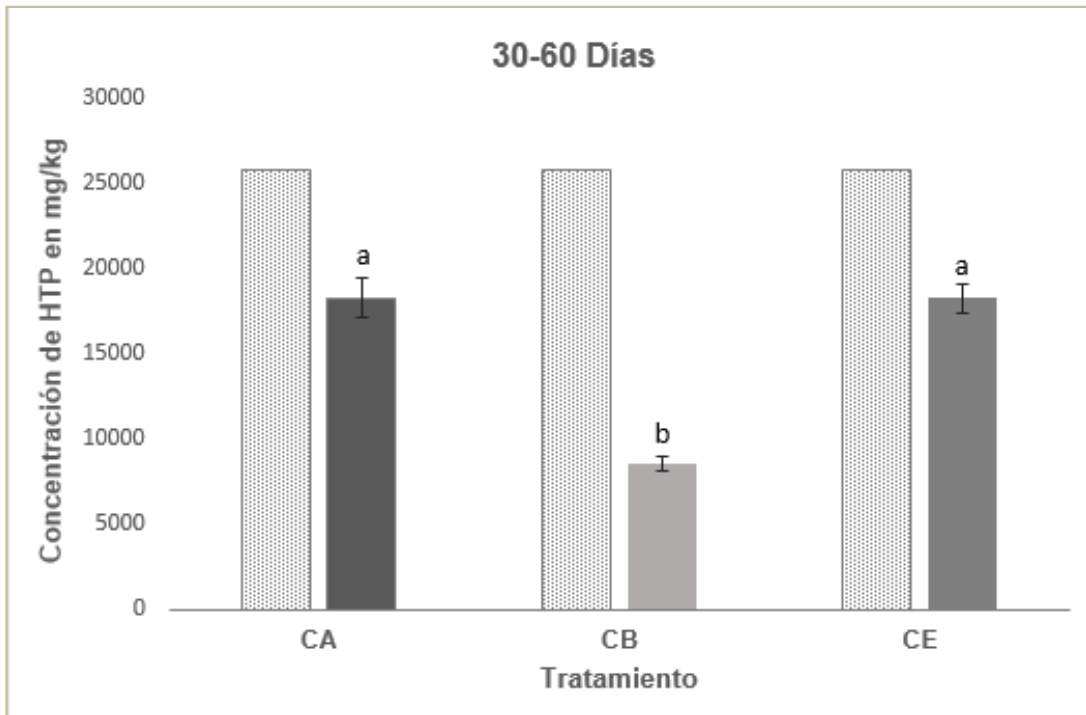


Figura 10. Valores promedio de contenido de HTP en mg/kg a los 60 días del proceso de biorremediación.

6.3.3 HTP de 60 a 90 días

Al iniciar el proceso de biorremediación los tratamientos obtuvieron una concentración de 25,811.13 mg/kg de HTP. Durante el lapso de 60 a 90 días del experimento el tratamiento **CA** obtuvo un valor de 16,988.50 mg/kg de HTP. Dicho valor es estadísticamente igual al registrado en el tratamiento **CE** durante el mismo lapso de tiempo ya que registró un valor de 18,172.03 mg/kg de HTP, con porcentajes de degradación de hidrocarburos de 5.03 % y 0.46 % respectivamente. Relativo al tratamiento **CB** se obtuvo un valor de 8,556.44 mg/kg de HTP. Dicho valor fue estadísticamente más bajo con respecto a los otros tratamientos, mostrando un porcentaje de degradación de 0.08 % para esta etapa del experimento (Figura 11). Los valores obtenidos durante los 60 a 90 días fueron estadísticamente significativos ($p= 0.000002$).

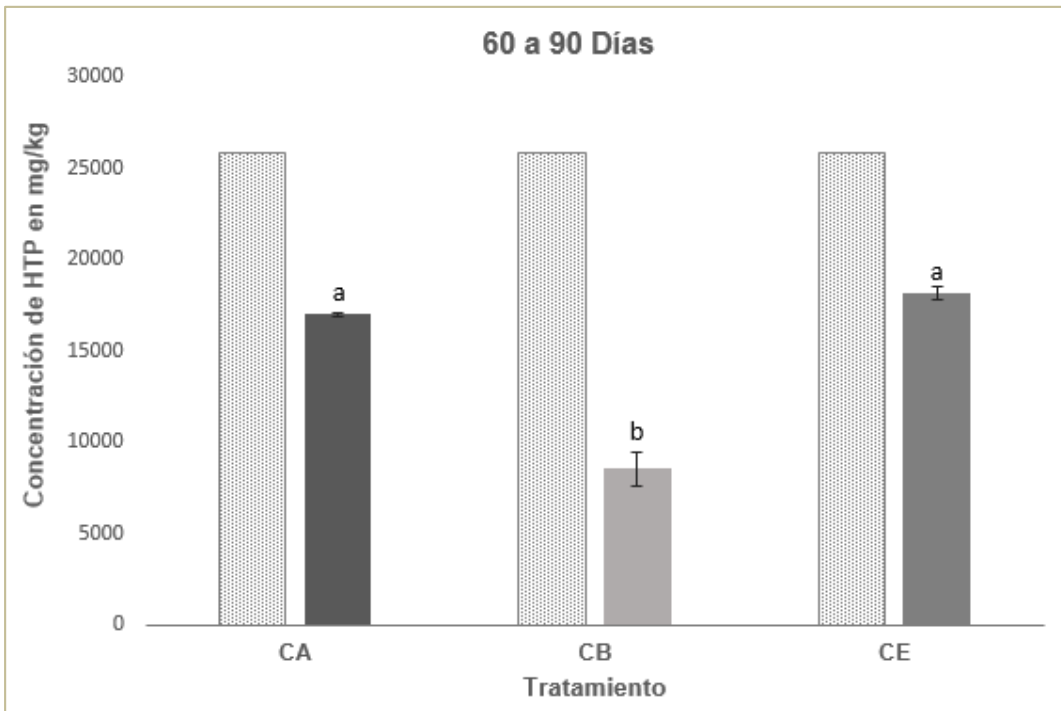


Figura 11. Valores promedio de contenido de HTP en mg/kg a los 90 días del proceso de biorremediación.

6.3.4 Valores promedio del contenido de HTP en el periodo de 0 a 30, 30 a 60, y 60 a 90 días

En relación al porcentaje de degradación de HTP en el lapso de tiempo de 0 a 30, 30 a 60 y 60 a 90 días del proceso de biorremediación, se observó el mismo patrón de comportamiento para el tratamiento **CB** y **CE** durante el transcurso de 0 a 30 días de experimentación, donde se obtuvo el mayor porcentaje de degradación de HTP durante este periodo de tiempo en ambos tratamientos, con el 43.97 % y 26.78 % respectivamente. En contraste con el tratamiento **CA** el cual presentó un mayor porcentaje de degradación de HTP a partir de los 30 a los 60 días del experimento con un 17.89 % de degradación, cabe destacar que el tratamiento **CB** siguió presentando el mayor porcentaje de degradación durante este periodo de tiempo con 22.8 %. A partir del lapso de 60 a 90 días de experimentación se presentó un mínimo porcentaje de degradación de HTP en los tres tratamientos, con valores de 5.03 % para el tratamiento **CA**, 0.08 % en el tratamiento **CB** y con respecto al tratamiento **CE** un porcentaje de 0.46 % (Figura 12).

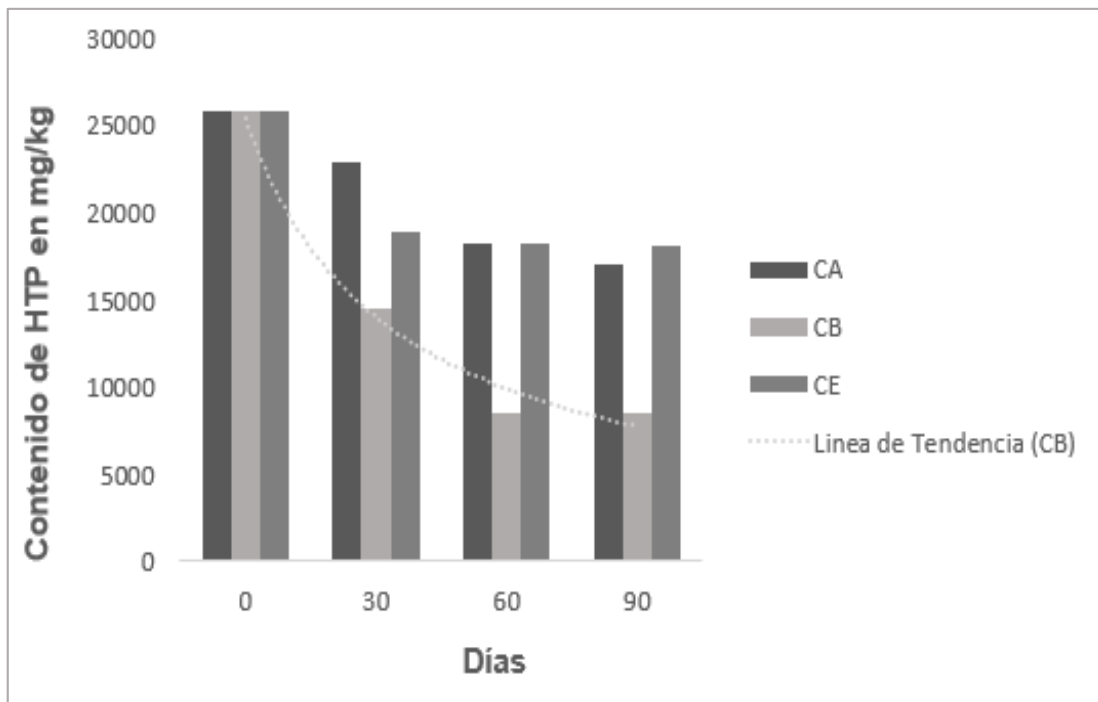


Figura 12. Valores promedio de contenido de HTP en mg/kg durante el proceso de biorremediación (CA= control abiótico, CB= con bacterias y CE= control endógeno).

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de la caracterización del sedimento contaminado por hidrocarburos en el estero del ejido Emiliano Zapata, mostraron una textura Franco-Arcillo-Arenosa. De acuerdo a trabajos previos se considera que la clase textural es una propiedad muy importante, ya que la disponibilidad y contacto microorganismo-hidrocarburo es clave en un proceso de biorremediación (Andreas *et al.*, 2010). Trabajos previos como el de Lira (2014) clasificó el sedimento de la misma área con una textura Franco-Arenosa y Torres (2015) como Franco con apariencia de sedimento, estos resultados difieren del presente estudio, esto puede atribuirse a que fueron diferentes puntos de muestreo, ya que las muestras de la presente investigación se tomaron en un área más alejada de la costa. Rodríguez-Castro (2012) menciona que estos cambios en la textura pueden estar influenciados por las temporadas de lluvias, ya que la velocidad de arrastre acrecienta la columna de agua y se incrementa la magnitud del esfuerzo sobre el lecho del sedimento, dando lugar al movimiento de los sedimentos no cohesivos, provocando el desplazamiento de los sedimentos más grandes y una nueva distribución por tamaño de partícula.

Por otra parte, la cantidad de materia orgánica registrada en las muestras de sedimento que se utilizó en el presente estudio fue de 6.49 %, considerado como extremadamente rico. Estos valores se ven influenciados por los hidrocarburos, debido a que ésta se encuentra conformada por la suma de materia biogénica

(descomposición de especies vegetales y animales) y materia petrogénica (hidrocarburos) como lo reportan Martínez *et al.* (2001). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Santiago (2013) y Mendo (2014) quienes reportan un sedimento extremadamente rico en materia orgánica, con 13.27 % y 5.78 % respectivamente, dichos sedimentos presentaron valores altos de contaminación por hidrocarburos. En el trabajo realizado por Martínez *et al.* (2001) mencionan que la materia orgánica es uno de los parámetros que sufre variaciones importantes, ya que aumenta en forma proporcional a la concentración de hidrocarburos (gasolina y combustóleo), además mencionan que el diésel es el hidrocarburo que causa un mayor aumento, disparándose a partir de concentraciones de 30,000 mg/kg obteniéndose hasta el 347 % de incremento, comparado con muestras sin hidrocarburos. En la presente investigación se reportó un porcentaje alto de materia orgánica, esto podría deberse a que el sedimento fue tomado en un estero que se encuentra cercano a una instalación petrolera, por ello los sedimentos presentan un elevado grado de contaminación, influyendo en la concentración de materia orgánica.

Durante el proceso de biorremediación se obtuvieron valores en el pH entre 8.4 y 8.1, siendo ligeramente alcalino para los tres tratamientos. De acuerdo a la literatura un pH próximo a la neutralidad de 6 a 9 es un rango favorable para el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos (Boopathy *et al.*, 2012). Vallejo *et al.* (2005) obtuvieron bajas tasas de degradación (34 %) durante su proceso de biorremediación, lo cual se atribuyó a los bajos valores de pH presentes al final de

su estudio (4.0), pudiendo inhibir el desarrollo y crecimiento de las poblaciones utilizadas. Por otra parte Arrieta Ramírez (2011) obtuvo durante el proceso de biorremediación valores iniciales en el pH de 5.6, seguido por un valor de 8.8 en la segunda semana, después se registró un descenso paulatino hasta alcanzar un valor promedio de 7.8. Obteniendo una reducción en la concentración de HTP de 60.6 %. Esto es similar a lo reportado en el presente experimento donde se registraron valores de 8.4 y 8.1 logrando una degradación del 66.85 %, esto se podría atribuir a que los valores del pH se mantuvieron dentro del rango recomendado, favoreciendo el crecimiento de los microorganismos. Ríos (2005) menciona que el pH afecta las poblaciones microbianas, por la biodisponibilidad de fuentes de carbono y energía, además influye en la asimilación de los nutrientes, ya que modifica la solubilidad y el estado de los compuestos.

Otro parámetro que se midió durante el proceso de experimentación fue la temperatura, pues se sabe que influye en la velocidad de degradación de los hidrocarburos, siendo uno de los factores ambientales que afecta la actividad metabólica de los microorganismos y la tasa de biodegradación. Pardo *et al.* (2004) mencionan que los rangos de temperatura más apropiados para la degradación de hidrocarburos son de 18 a 30 °C, en la cual se intensifica la actividad enzimática de los microorganismos ayudando a los procesos de degradación. En su investigación Ñustez *et al.* (2014) reportaron durante las primeras siete semanas del proceso de biorremediación altas reducciones en las concentraciones de hidrocarburos, tiempo en el cual también evidenciaron un incremento en la temperatura (21 °C), esto

debido al aumento en el proceso metabólico de los microorganismos y su actividad enzimática, llegando a beneficiar la degradación del contaminante. El estudio realizado por Mendo (2014) registró temperaturas entre 26 °C y 28 °C, similares al presente trabajo donde obtuvieron valores alrededor de 26.8 °C a 27 °C los cuales se encuentran dentro del rango óptimo según la literatura citada, garantizando la actividad metabólica de los microorganismos y con ello se lograron obtener resultados benéficos durante el experimento.

Durante el proceso de biorremediación de este trabajo se utilizaron bacterias hidrocarburofíticas aisladas del sedimento contaminado por hidrocarburos, de acuerdo a la literatura la población microbiana es un factor determinante en el proceso de degradación, ya que estas deben estar adaptadas al compuesto contaminante y poseer la capacidad para degradar petróleo (Viñas *et al.*, 2005). Además Garduño *et al.* (1984) mencionan que estos microorganismos y su capacidad degradativa desempeñan el papel principal dentro de los mecanismos de biorremediación. En trabajos anteriores, Santiago (2013) y Mendo (2014) aislaron bacterias nativas del sitio contaminado en su proceso de biorremediación, obteniendo resultados favorables de degradación. Los resultados mencionados anteriormente coinciden con este trabajo en el cual durante el transcurso de la biorremediación se usaron bacterias aisladas del sitio contaminado logrando disminuir la concentración de hidrocarburos, esto podría deberse a que los microorganismos utilizados están adaptados al contaminante y por ello tienen gran tolerancia a la toxicidad.

Así mismo, las bacterias que se aislaron del sedimento contaminado y que fueron utilizadas en la bioaumentación de este experimento, presentaron un solo morfotipo, bacilos Gram negativos, los cuales coinciden con el trabajo realizado por García (2013) quien utilizó durante su proceso de biorremediación bacilos Gram negativos, los cuales se aislaron en sedimentos de la misma área de estudio del presente trabajo, logrando altos porcentajes de degradación de HTP. Por su parte Mendo (2014) aisló bacilos Gram negativos de la Laguna de Tamiahua, Veracruz, para su proceso de biorremediación obteniendo efectos favorables de degradación. Dichos resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo, donde se logró disminuir la concentración de hidrocarburos al utilizar bacilos Gram negativos, ya que al ser productores de biosurfactantes extracelulares solubilizan y facilitan la penetración de los hidrocarburos a través de la pared celular hidrofílica; además de contener enzimas degradadoras de hidrocarburos en la membrana citoplasmática, por lo que se considera que este morfotipo se encuentra mejor adaptado a los contaminantes.

En la presente investigación se evaluó el proceso de biorremediación en muestras de sedimento contaminado por HTP, usando tres tratamientos. El primer tratamiento **CA** estuvo compuesto por el sedimento contaminado sin bacterias, aplicando aireación durante todo el proceso (bioventeo), mostrando un porcentaje de degradación de HTP de 34.19 %. En el trabajo realizado por Gómez *et al.* (2009) obtuvieron disminuciones de HTP en su muestra control, ya que durante las primeras semanas del experimento evidenciaron crecimiento de bacterias heterótrofas, dicho comportamiento fue controlado con la adición de ácido

clorhídrico para limitar la actividad de las bacterias. Se deduce que quizá en este tratamiento pudo haber crecimiento de algún microorganismo, ya que las columnas que contenían el sedimento estaban conectadas con mangueras a un tubo de material de pvc, suministrando aireación por medio de una bomba la cual no contaba con un filtro para evitar la intervención en el proceso de otros microorganismos.

Por otro lado el tratamiento **CE** que solo contenía el sedimento contaminado y la bioaumentación bacteriana, mostró el mismo patrón de degradación de HTP que el tratamiento **CA**, obteniendo bajas tasas de remoción durante el experimento con un porcentaje de 29.6 %. Pino *et al.* (2012) realizaron una comparación entre las técnicas de bioestimulación y bioaumentación, donde obtuvieron un 41 % de degradación de HTP en el tratamiento donde solo contaba con la bioaumentación bacteriana, evidenciando una mayor degradación de HTP al adicionar nutrientes, con el 93 % de degradación. Estos resultados muestran que el uso de microorganismos nativos del área afectada representa una buena alternativa para disminuir la contaminación generada por hidrocarburos, siempre y cuando se estimule su desarrollo.

Es por ello que el tratamiento **CB** el cual contenía el sedimento contaminado y la bioaumentación bacteriana, se estimuló durante todo el experimento mediante la aplicación de nutrientes (CST-triple17) y bioventeo constante. Este tratamiento evidenció un mayor porcentaje de degradación de HTP con respecto a los demás tratamientos al final del proceso de biorremediación, logrando una disminución del

66.85 %. Sin embargo, la mayor tasa de degradación de HTP se observó durante los primeros 30 días del estudio, este resultado coincide con el trabajo realizado por Vallejo *et al* (2005) donde obtuvieron una mayor degradación durante los primeros 28 días del experimento. Estudios previos reportaron que la degradación de HTP disminuye con el tiempo, debido a que estos se vuelven menos disponibles para la biodegradación por su carácter recalcitrante y su limitada biodisponibilidad (Margesin y Schinner, 1997). Lo que coincide con el presente trabajo donde se obtuvo una mayor degradación durante los primeros días de tratamiento, dicho resultado se puede observar en la Figura 12.

Se destaca que al utilizar en conjunto las técnicas de bioventeo, bioaumentación y bioestimulación se logran mejores resultados. Muskus *et al.* (2013) combinaron las técnicas de bioventeo y bioestimulación teniendo porcentaje de hasta el 97 % de degradación, por otra parte Gómez *et al.* (2009) emplearon las técnicas de bioaumentación y bioestimulación obteniendo un porcentaje del 60.45 % en la reducción de los HTP. Autores como Cunningham y Philip (2000) mencionan que la bioestimulación es el método más empleado para reducir la concentración de contaminantes ya que la actividad natural de los microorganismos es estimulada por la circulación de soluciones a través del suelo contaminado, con nutrientes y oxígeno u otro aceptor de electrones. El resultado obtenido puede indicar que la bioestimulación y el manejo de las condiciones ambientales del sedimento fue exitosa, lo que coincide con Odukoma y Dickson (2003) que muestran que la biodegradación de hidrocarburos se puede favorecer eficientemente con la adición

adecuada de nutrientes y el manejo del contenido de humedad, temperatura, pH, nivel de aireación y otras condiciones de experimentación.

En este estudio se registró un contenido inicial de hidrocarburos de 25,811.13 mg/kg, dicho valor rebasa los límites permitidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, la cual establece que los límites máximos permisibles de hidrocarburos son de 6,000 mg/kg. En el presente experimento se consiguió disminuir un 66.85 % del valor total, con un contenido final de HTP de 8,556.44 mg/kg, este resultado es considerado favorable a pesar de estar por arriba de los límites permisibles, ya que se logró disminuir la mayor concentración del hidrocarburo. Logrando este resultado al aplicar la tecnología de biorremediación utilizando las técnicas de bioaumentación, bioestimulación y bioventeo. Dicho resultado coincide con el trabajo realizado por Mendo (2014) el cual logró un porcentaje de remoción de 68.36 % durante su proceso de biorremediación utilizando bacterias autóctonas del sedimento contaminado de la laguna de Tamiahua, Veracruz, adición de nutrientes y aireación durante todo el proceso de experimentación.

8. CONCLUSIONES Y APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO

8.1 Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que:

- Los parámetros físicos de las muestras de sedimento mostraron una textura Franco-Arcillo-Arenoso, y una densidad aparente de 1.4285 g/cm^3 . La temperatura oscilo en $26.8 \text{ }^\circ\text{C}$ a $27 \text{ }^\circ\text{C}$ durante el proceso de biorremediación.
- Los resultados de los análisis químicos del sedimento arrojaron un valor extremadamente rico en la materia orgánica, con 6.49% . El pH se mantuvo alcalino durante todo el proceso fluctuando entre 8.4 y 8.1 .
- Se obtuvieron bacterias Gram negativas hidrocarburohíticas del sedimento contaminado.
- La concentración inicial de hidrocarburos en los sedimentos fue de $25,811.13 \text{ mg/kg}$, posterior a los 90 días de experimentación, los mejores resultados de degradación de HTP se obtuvieron en el tratamiento CB, con $8,556.44 \text{ mg/kg}$ de HTP (66.85% de remoción). En los tratamientos CA y CE no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos, mostrando bajos porcentajes de degradación.
- Con los resultados de esta investigación, se sustenta que la adición de microorganismos nativos (bioaumentación), aplicación de nutrientes

(bioestimulación) y aireación constante (bioventeo), tienen efectos positivos en la reducción de las concentraciones de hidrocarburos en sedimentos contaminados.

8.2 Aplicación práctica del trabajo

Durante este trabajo se aplicó *ex situ* el método de biorremediación a muestras de sedimento contaminadas por hidrocarburos, en el cual se observó una mayor eficiencia de degradación al aplicar en conjunto las técnicas de bioventeo, bioaumentación bacteriana y bioestimulación. Siendo esta una tecnología eficiente para minimizar los impactos generados por derrames de hidrocarburos en el área. De acuerdo con lo anterior se propone una Biorremediación *in situ* de los sedimentos contaminados, la cual se describe a continuación:

La primera fase consistiría en realizar la metodología que se llevó a cabo en el presente trabajo, para demostrar que las poblaciones de microorganismos autóctonos tienen la capacidad degradativa de hidrocarburos y que la cinética de la degradación puede ser mejorada al adicionarle nutrientes y bioventeo. Requiriendo valorar ciertos factores físicos y químicos al llevar a cabo una biorremediación como son: temperatura, pH, y geoquímica del contaminante. Además de otros que son específicos de las costas: mareas, salinidad, concentración de nutrientes en la columna de agua, etc.

Se requeriría la instalación de un sistema de bioventilación en las zonas arenosas, para estimular la actividad metabólica por medio de la inyección de aire a través de los pozos de ventilación. Estos pozos se instalarán en varios puntos del área contaminada y a través de ellos se inyectará la cepa bacteriana bioaumentada para acelerar el proceso de biorremediación.

Una vez que se aplique la bioaumentación bacteriana se adicionaría un fertilizante de forma quincenal durante el proceso de biorremediación, el cual debería cumplir con las siguientes condiciones:

- Proporcionen nitrógeno y fósforo de forma que los microorganismos tengan acceso a ellos.
- Permanezcan en la zona pese a las mareas y a la existencia de estas.
- Que no presente riesgo toxicológico para el ecosistema marino.

Se debería realizar análisis del sedimento de forma quincenal para medir los niveles de nutrientes, además de monitorear las concentraciones de hidrocarburos mensualmente.

BIBLIOGRAFÍA

- Alemán, A. 2009. Determinación de Hidrocarburos Totales del Petróleo en Suelos y Sedimentos de la Cuenca del Río Coatzacoalcos. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas. Coatzacoalcos, Veracruz. 111 pp.
- Álvarez, J. A., Ramos, E., Fernández, B., y Núñez, A. 2001. Gestión de residuos sólidos petrolizados. EUA: Petróleo Internacional (en imprenta).
- Arroyo, M., Quesada, J., Quesada, R., y Geocisa, J. 2004. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. Geocisa. División de Protección Ambiental, Guadalajara-México. 9 pp.
- Arrieta Ramírez, O. M. 2011. - Evaluación de la influencia del bioestímulo sobre un suelo contaminado con diésel y su integración a la gestión ambiental. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. 123 pp.
- ASTM D5369-93. 2003. Standard practice for extraction of solid waste samples for chemical analysis using Soxhlet extraction, Environmental assessment, Book of Standards, 11(4).
- Belloso, C., Carrario, J., y Viduzzi, D. 1998. Biodegradación de hidrocarburos en suelos contenidos en terrarios. Asociación Peruana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental; AIDIS. Gestión ambiental en el siglo XXI. Lima, APIS. 1-6.

- Benavides J., Quintero G. 2005, Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Nova – Publicación científica vol. 4 n° 5, Junio 2005: 82-90.
- Boopathy, R., Shields, S. y Nunna S. 2012. Biodegradation of crude oil the BP oil spill in the marsh sediments of Southeast Louisiana, USA, Applied biochemistry and biotechnology, 167(6): 1560-1568.
- Botello, A y Villanueva, S. 1987. Evaluación geoquímica del río calzadas: los impactos del petróleo. Centro de Ecodesarrollo, vol. 12: 37-99.
- Calva, B. L. G. y Torres, A. M. R. 2011. Textura de sedimentos de carbono orgánico en el sistema costero lagunar Alvarado, Veracruz. Laboratorio de ecosistemas costeros. Departamento de Hidrobiología. 16 pp.
- Casellas, M., P. Fernández, J. M. Bayona y A. M. Solanas. 1995. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban air bone particulate matter from Barcelona. Spain. Chemosphere 30: 725-740.
- Christensen, L. B. y Larsen, T. H. 1993. Method for determining age of diesel oil Spills in the soil. Ground Water Monit. Remediation 23: 142-149.
- Contreras, E. F. 2010. Ecosistemas costeros mexicanos una actualización. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, 514 pp.

- Cunningham, C. y Philip, J. 2000. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in *ex situ* treatment of diesel contaminated soil. Land Contamination and Reclamation. 8: 261-269.
- Cursi, E. y Calleja, C. 2000. Biorremediación de suelos contaminados con Hidrocarburos. Mendoza, Argentina: UE.
- Dobson, L. y H. A. Wilson. 1964. Respiration studies on soil treated with some hydrocarbons. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 21: 536-539.
- Drysdale, G., Kasan, H. y Bux, F. 1999. Denitrification bacteria during activated sludge treatment. Water SA; 25: 357-362.
- EEA, European Environment Agency. 2000. State and pressures of the marine and coastal Mediterranean environment. EEA Environmental Issues Series No. 5, Copenhagen, 137 pp.
- EEA, European Environment Agency. 2010. Ecosystem accounting and the cost of biodiversity losses: The case of coastal Mediterranean wetlands. EEA Tech. Rep. No. 3, Copenhagen, 96 pp.
- Ellis, R., y R. S. Adams. 1960. Contamination of soils by petroleum hydrocarbons. Department of Agronomy, Kansas State University, Manhattan. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 26: 197-216.

- Ercoli, E., Galvez, J., Aranzadi, E., Santos, A., y Cantassano, P. 2001. Tratamiento biológico ex situ de residuos semisólidos de oleoductos. Laboratorio de Bioprocesos. Argentina.
- Evgin, E., F. B. Amor y A. Altaee. 1989. Effect of an oil spill on soil properties. Eight International Conference on Offshore Mechanics and Arctic Engineering. The Hague, The Netherlands. 715-720.
- Fernández, L., N. Rojas, T. Roldan, M. Ramírez, H. Zegarra, R. Hernández, R. Reyes, D. Hernández y J. M. Arce. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. 180 pp.
- Fernández, P., M. Grifoll, A. M. Solanas, J. M. Bayona y J. Albaigés. 1992. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. *Environ. Sci. Technol.* 26:817-829.
- Filonov, A. E., Puntus, I. F., Karpov, A. V., Kosheleva, I. A., Akhmetov, L. I., Yonge, D., Petersen, J. y Boronin, A. M., 2006. Assessment of naphthalene biodegradation efficiency provided by microorganisms of genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* in soil model systems. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81: 216-224.
- García, I. 2013. Biorremediación en microcosmos de sedimentos contaminados por hidrocarburos mediante la técnica de bioaugmentación. Tesis de Licenciatura.

Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana.
Tuxpan, Veracruz. 71 pp.

Garduño R., P. Salazar M., F. J. Alba. T., J. Hebrero R. y G. Etienne B. 1984.
Microorganismos para degradar residuos de derrames de petróleo crudo en
suelos. Revista del instituto del petróleo crudo en suelos. Revista del instituto
del petróleo 16:61-77.

Gómez, W., Gaviria, J y Cardona, S. 2009. Evaluación de la Bioestimulación frente
a la Atenuación natural y la Bioaumentación en un suelo contaminado con
una mezcla de gasolina y diesel. DYNA, Vol 76: 83-93.

Hanley, N., Bell, D. y Álvarez-Farizo, B. 2003. Valuing the benefits of coastal water
quality improvements using contingent and real behaviour. Environ. Resour.
Econ. 24: 273-285.

Hansen A., León Z. 1995. Fuentes de contaminación y enriquecimiento de metales
en la cuenca Lerma-Chapala. Ingeniería Hidráulica en México. Setiembre-
Diciembre 1995, vol. X, núm. 3: 55-69.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2013. Censo de población y vivienda.
México: INEGI. [Actualizado al 03 de octubre de 2013] Página electrónica
([http://www3.inegi.org.mx/sistemas/ResultadosR/CPV/Default.aspx?texto=pl
aya%20emiliano%20zapata](http://www3.inegi.org.mx/sistemas/ResultadosR/CPV/Default.aspx?texto=pl
aya%20emiliano%20zapata)).

- Lankford, R. R. 1977. Coastal lagoon of Mexico. Their origin and classification. *En: Wiley, M. (ed.) Estuarine Processes. Academic Press Inc. 182-215.*
- Lira, K. 2014. Caracterización bioquímica y molecular de bacterias hidrocarburofílicas presentes del estero aledaño al ejido Emiliano Zapata, Tuxpan, Ver. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana. Tuxpan, Veracruz. 91 pp.
- Margesin, R. y Schinner, F. 2001. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Appl. Environ. Microb.* 3127-3133.
- Margesin, R. y Schinner, F. 1997. Biorremediation of diesel oil contaminated alpine soils at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology.* 47:462-468.
- Martínez, V. E.; López S., M. y Felipe. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra Latinoamericana.* 19(1): 9-17.
- Mendo, W. 2014. Alternativa de biorremediación con bacterias autóctonas de sedimento contaminado de la Laguna de Tamiahua, Veracruz, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana. Tuxpan, Veracruz. 90 pp.

- Morgan, P. y R. J. Watkinson. 1989. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soils biotreatment. *CRC Critical Rev. In Biotechnol.* 8: 308-310.
- Muskus, A., Santoyo, C. y Plata, L. 2013. Evaluación de las técnicas de atenuación natural, bioventing, bioaumentación y bioaumentación-bioventing, para la biodegradación de diesel en un suelo arenoso, en experimentos en columna, *Gestión y ambiente*, 16 (2): 83-94.
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. 73 pp.
- Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. 16 pp.
- Núñez, R. 2003. Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la bioremediación de derrames de hidrocarburos. Tesis de doctorado. Universidad de La Habana. Cuba. 45-60
- Ñustez, D., Paredes, D., y Cubillos, J. 2014. Bioremediation for degradation of total hydrocarbons present in the sediments of a fuel service station. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*. Vol. 37, N° 1, 20-28.
- Odukuma, L. y Dickson, A. 2003. Bioremediation of a crude oil polluted tropical rain forest soil. *Global J. Environ. Sci.* 2(1). 2003-2940.

- Pardo, J., Perdomo, M. y Benavides, J. 2004. Efecto de la Adición de Fertilizantes Inorgánicos Compuestos en la Degradación de Hidrocarburos en Suelos Contaminados con Petróleo. Ingeniería Ambiental y Sanitaria, Universidad De La Salle. Universidad de La Salle. Bogotá D.C., Colombia. ISSN: 1794-2370 VOL.2 No. 2: 40-49.
- Pérez-Ruzafa, A. y Marcos, C. 2008. Coastal lagoons in the context of water management in Spain and Europe. In: Gönenç İE, Vadineanu A, Wolflin JP, Russo RC (eds.), Sustainable Use and Development of Watersheds. Springer Netherlands. 299-321.
- Pino, N., Carvajal, S., Gallo, A., y Peñuela, G. 2012. Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diésel. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Vol.7, No.1: 101-108.
- Plice, M. J. 1948. Some effects of crude petroleum on soil fertility. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 14: 413-416.
- Rahman, K., Street, G., Lord, R., Kane, G., Rahman, T., Marchant, R. y Banat, I. 2007. Bioremediation of petroleum sludge using bacterial consortium with Biosurfactant, Environmental bioremediation technologies, 391-408.
- Ríos, R. 2005. Estudio de la Estimulación Biológica Para el Tratamiento de Residuos de Perforación Petrolera Empleando Lisímetros. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Casa Abierta al Tiempo. México D.F.

- Rivera, A. E. y Borges, S. G. 2006. El gran ecosistema marino del Golfo de México: Perspectivas para su manejo. *Jaina Boletín Informativo*. 16(1):30-48.
- Rodríguez-Castro, N. 2012. Criterios para el manejo y disposición de sedimentos extraídos de lagos y embalses. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rosini, F. D. 1960. Hydrocarbons in petroleum. *Journal of Chem. Educ.* 39:554-561.
- San Martín del Ángel, P., M. L. Salas - Salazar, E. Zarza - Meza y R. I. Hernández-Herrera. 2012. Biorremediación de sedimentos contaminados de la laguna de Tamiahua, Veracruz (una propuesta de biorremediación ambiental). *Academia Mexicana Multidisciplinaria*. 2(1): 1-5.
- Santiago, J. 2013. Proceso de biorremediación *ex situ* en lodo de perforación obtenidos de potrero del llano, Ver. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana. Tuxpan, Veracruz. 48 pp.
- Shmaefsky, B. R. 1999. Bioremediation: Panacea or fad? Access Excellence. The National Health Museum. Página electrónica (<http://www.accessexcellence.org/LC/ST/st3bg.html>).
- Torres, N. 2015. Evaluación de la expresión del gen CYP1A1 hepático de tilapia (*Oreochromis niloticus*) como bioindicador de contaminación por hidrocarburos presentes en sedimentos. Tesis de Licenciatura. Facultad de

Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana. Tuxpan, Veracruz. 68 pp.

US EPA 3540C. 1996. Soxhlet extraction organics. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical method.

US EPA 3541. 1994. Automated soxhlet extraction SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical method.

Vallejo, V., Salgado, L., y Roldan, F. 2005. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. Revista Colombiana de Biotecnología, 7(2), 67-78.

Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M. y Solanas, A. 2005. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote contaminated soil. Applied and environmental microbiology, 71: 7008, 1-8.

Walkley, A. y I. A. Black. 1932. An Examination of Degtjareff Method For Determining Soil Organic Matter and Proposed Modification of The Chromic Acid Titration Method. Soil Science: 37: 29-39.