



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
REGIÓN POZA RICA-TUXPAN

---

---

ESPECIALIZACIÓN EN GESTIÓN E IMPACTO AMBIENTAL

**“Uso de *Bacillus coagulans* para la biorremediación de sedimento contaminado por hidrocarburos en el ejido el Sacrificio Tuxpan, Veracruz.”**

PROYECTO DE INTERVENCIÓN  
Que para obtener el título de:  
ESPECIALISTA EN GESTIÓN E IMPACTO AMBIENTAL

PRESENTA:

Biol. Yolanda Hernández de la Cruz

DIRECTOR:

Dr. Pablo San Martín Del Ángel

CO-DIRECTORA:

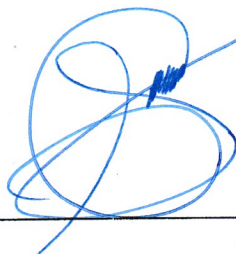
Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera

Tuxpan, Ver.

Junio, 2019

El presente trabajo de intervención titulado “Uso de *Bacillus coagulans* para la biorremediación de sedimento contaminado por hidrocarburos en el ejido El Sacrificio, Tuxpan, Veracruz”, realizado por la bióloga Yolanda Hernández de la Cruz, 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:

**ESPECIALISTA EN GESTIÓN E IMPACTO AMBIENTAL**



---

DR. PABLO SAN MARTÍN DEL ÁNGEL

Director



---

DRA. ROSA IDALIA HERNÁNDEZ HERRERA

Codirectora



Universidad Veracruzana

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

Revisión del Trabajo de Intervención de la estudiante: Biol. Yolanda Hernández de la Cruz.

**JURADO EXAMINADOR**

<b>NOMBRE</b>	<b>FECHA</b>	<b>DICTAMEN</b>	<b>FIRMA</b>
<u>María Rebeca Rojas Rengillo</u>	<u>23/Mayo/2019</u>	<u>APROBADO</u>	<u>[Firma]</u>
<u>Leandro Chaives Martinez</u>	<u>23/Mayo/2019</u>	<u>APROBADO</u>	<u>[Firma]</u>
<u>AMADO JUSFRAN ORTIZ</u>	<u>29/MAYO/2019</u>	<u>APROBADO</u>	<u>[Firma]</u>

En la presente revisión se acordó que el Trabajo de Intervención denominado “**USO DE *BACILLUS COAGULANS* PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE SEDIMENTO CONTAMINADO POR HIDROCARBUROS EN EL EJIDO EL SACRIFICIO, TUXPAN, VERACRUZ**”, que presenta la sustentante para obtener el Título de Especialista, está terminado por lo que puede proceder a su impresión.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el número de beca otorgada: 705690, durante el periodo del programa con el de la Especialización en Gestión e Impacto Ambiental y para el desarrollo del proyecto de intervención.

A la Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Región Poza Rica-Tuxpan, por el espacio brindado para el desarrollo de mi formación profesional.

Al coordinador del posgrado de la especialización, Dr. Juan Manuel Pech Canché, por la gestión y atención durante mis estudios.

A mi director Dr. Pablo San Martín del Ángel y co-directora Dra. Rosa Idalia Herrera, por la aceptación e integración a su línea de investigación, así como por sus asesorías, enseñanzas y consejos durante el desarrollo del proyecto de intervención.

A la Comisión Revisora, Dra. Rebeca Rojas Ronquillo, Dr. Amado Insfrán Ortiz y al Dr. Leandro Chaires Martínez. Por sus observaciones y críticas constructivas en el mejoramiento del proyecto de intervención.

A los responsables de los laboratorios de la Universidad Veracruzana, Dra. Rocío Rodríguez Cabrera, por permitirme realizar los análisis de mis muestras, en el laboratorio de suelos y por el aprendizaje de nuevas técnicas. Dra. Diana Laura Díaz Inocencio, por la facilitación del equipo y material para la cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo en el laboratorio de bromatología. Así como, al Mtro. Jordán Gutiérrez Vivanco

por la confianza brindada y facilitarme el equipo del laboratorio de Química. Finalmente, al Dr. Pablo San Martín del Ángel por el aprendizaje de nuevos métodos en el laboratorio de biotecnología ambiental.

A los integrantes del laboratorio de biotecnología ambiental por los consejos, apoyo compañerismo y amistad brindada.

A mis compañeros de la generación de la Especialización en Gestión e Impacto Ambiental y especialmente a Paola, Seth, Cintia y Mari por brindarme su amistad, confianza y hacer más ameno la realización del proyecto.

## DEDICATORIA

A mi madre, Esperanza con todo el amor y cariño por impulsarme a lograr mis metas, a vencer mis miedos, siendo la mejor versión de mí. Eres y serás uno de mis principales ejemplos para esforzarme a vivir en armonía y para alcanzar mis propósitos con disciplina y dedicación. Porque contigo aprendí a sonreírle a la vida, de manera optimista.

A mi hermana, Lola por tus palabras de apoyo y confianza. Por ser mi mejor amiga, por defender la verdad, las conductas donde no caben traiciones, sin importar el fragor de la batalla, el crudo invierno y la distancia siempre te llevo conmigo.

## RESUMEN

La influencia de las actividades antropogénicas sobre los sedimentos ha perturbado su composición original. Por lo que el presente proyecto de intervención tuvo como objetivo la evaluación de *Bacillus coagulans* para la biorremediación del sedimento contaminado por hidrocarburos a de nivel microcosmos. En primer lugar, se realizó el análisis físico-químico del sedimento, donde se reportó una clase textural franco-arenosa y la materia orgánica fue extremadamente rica con 14.04%. Se realizó la bioaumentación de la cepa bacteriana en medio nutritivo con 5 tratamientos y 4 repeticiones: el tratamiento T1 (sin estímulos), T2 (todos los estímulos), T3 (sin bacterias), T4 (sin nutrientes) y T5 (sin agitación mecánica). La concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) inicial fue de 87,482.96 mg/kg sobrepasando los límites máximos permisible de la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. El porcentaje máximo de biodegradación de HTP a los 30 días fue de 44% en T2 (todos los estímulos). A los 60 días la biodegradación máxima de HTP ocurrió en el T2 (todos los estímulos) con un 50% similar al T4 (sin nutrientes) y T5 (sin agitación mecánica) con una biodegradación de HTP de 48% y 40%. Finalmente, a los 90 días el máximo valor de biodegradación continuo en el T2 (todos los estímulos) con 52% y una concentración de HTP de 41,351.00 mg/kg. similar al T4 (sin nutrientes) y T5 (sin agitación mecánica) con una biodegradación de HTP de 51% y 45%, y una concentración final de HTP de 42,473.00 mg/kg y 47,798.00 mg/kg respectivamente. Los tratamientos T1 (sin estímulos) y T3 (sin bacterias) presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con una biodegradación de HTP de 11% y 13% con una concentración de HTP de 75,714.00 mg/kg y 77,436.00 mg/kg respectivamente. Los resultados demostraron la eficacia de la bioaumentación de *Bacillus coagulans* para la biodegradación de hidrocarburos de petróleo en sedimento.

**Palabras clave:** *Bacillus coagulans*, biodegradación, sedimento, HTP, bioaumentación, estimulación.

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>4</b>
2.1 Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) .....	4
2.2 Contaminación por hidrocarburos sobre los recursos ambientales ....	5
2.3 Contaminación del sedimento por hidrocarburos .....	6
2.4 Biorremediación.....	7
2.5 Bioaumentación .....	9
2.6 Bioestimulación .....	11
2.7 Biorremediación en sedimento por bacterias del género <i>Bacillus</i> ....	13
2.8 Biorremediación con <i>Bacillus coagulans</i> .....	15
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 Objetivo general .....	19
3.2 Objetivos específicos .....	19
<b>IV. ÁREA DE ESTUDIO .....</b>	<b>20</b>
4.1 Fase experimental.....	20
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
5.1 Procesamiento de la muestra .....	21
5.2 Análisis de los parámetros fisicoquímicos .....	21
5.3 Análisis de hidrocarburos totales de petróleo .....	22
5.4 Extracción de hidrocarburos .....	22
5.5 Medición del crecimiento bacteriano por espectroscopia .....	23
5.6 Incremento de la biomasa bacteriana .....	23
5.7 Diseño experimental y tratamientos del proceso de biorremediación	25
5.8 Monitoreo de parámetros físicos durante el experimento .....	26
5.9 Análisis estadísticos .....	26
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
6.1 Composición fisicoquímica del sedimento contaminado por hidrocarburos .....	27
6.2 Monitoreo de la temperatura y pH en el proceso de biorremediación	29
6.3 Determinación del porcentaje de humedad.....	32



6.4 Valores de HTP con base a los límites máximos permisibles .....	33
6.5 Cuantificación de HTP a los 30 días.....	36
6.6 Cuantificación de HTP a los 60 días.....	37
6.7. Cuantificación de HTP a los 90 días.....	38
6.8 Porcentajes de biodegradación de los tratamientos a los 30, 60 y 90 días.....	39
VII. DISCUSIÓN.....	41
VIII. CONCLUSIONES Y APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO .....	52
8.1 Conclusiones .....	52
8.2 Aplicación práctica del trabajo .....	53
IX. BIBLIOGRAFIA.....	55

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Biorremediación de sitios contaminados por hidrocarburos con <i>Bacillus</i> sp. y <i>Bacillus coagulans</i> .....	17
<b>Cuadro 2.</b>	Diseño experimental y características de los tratamientos.....	25
<b>Cuadro 3.</b>	Resultados de los análisis físicos del sedimento.....	27
<b>Cuadro 4.</b>	Resultados de los análisis químicos del sedimento.....	29
<b>Cuadro 5.</b>	Comparación de los límites máximos permisibles de hidrocarburos para uso de suelo agrícola (mg/kg) con respecto al valor inicial de la concentración de hidrocarburos del estero el Sacrificio, Tuxpan Veracruz.....	34
<b>Cuadro 6.</b>	Concentraciones de hidrocarburos obtenidos en los tratamientos sometidos al proceso de biorremediación.....	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Localización del punto de muestreo en el ejido el Sacrificio Tuxpan, Veracruz.....	20
<b>Figura 2.</b>	Proceso para el incremento de biomasa bacteriana de <i>Bacillus coagulans</i> .....	24
<b>Figura 3.</b>	Sedimento franco-arenoso contaminado por hidrocarburos.....	28
<b>Figura 4.</b>	Registró del pH para el T1, T2, T3, T4 y T5 durante las 13 semanas.....	30
<b>Figura 5.</b>	Registró de la temperatura en los 5 tratamientos durante las 13 semanas...	31
<b>Figura 6.</b>	Valores del porcentaje de humedad a los 90 días.....	33
<b>Figura 7.</b>	Concentración de hidrocarburos totales de petróleo en el proceso de biorremediación a nivel microcosmos a los 30 días.....	36
<b>Figura 8.</b>	Concentración de hidrocarburos totales de petróleo en el proceso de biorremediación a nivel microcosmos a los 60 días.....	37
<b>Figura 9.</b>	Concentración de hidrocarburos totales de petróleo en el proceso de biorremediación a nivel microcosmos a los 90 días.....	38
<b>Figura 10.</b>	Valor promedio de la biodegradación de HTP a los 30, 60 y 90 días. Letras distintas en los tratamientos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).....	40
<b>Figura 11.</b>	Localización de la aplicación en campo del proceso de biorremediación en el ejido el Sacrificio Tuxpan, Veracruz.....	54

## I. INTRODUCCIÓN

Las partículas suspendidas en las aguas superficiales se depositan y forman el sedimento. Las condiciones químicas y biológicas que ocurren en el sedimento son similares a las de los humedales. Sin embargo, el sedimento registra diferentes condiciones químicas y biológicas según el contenido de contaminantes orgánicos, metales pesados, restos fósiles, polen entre otras sustancias; brindando información acerca de las condiciones pasadas de los cuerpos de agua y la cuenca hidrográfica. Además, la presencia de materia orgánica en los sedimentos promueve el crecimiento de microorganismos en condiciones de difusión lenta de oxígeno (Hemond y Fechner, 2015).

De manera que los sedimentos desempeñan un funcionamiento primordial en los ecosistemas, proporcionando el alimento y hábitat para los organismos invertebrados, nematodos y bacterias entre otros grupos; el movimiento de los sedimentos y la dinámica de los ciclos biogeoquímicos conservan el funcionamiento saludable de los ecosistemas acuáticos (Burton y Johnston, 2010).

Actualmente, la salud de los sedimentos ha sido alterada por contaminantes orgánicos como los hidrocarburos que se distribuyen ampliamente en el ambiente (Yao *et al.*, 2015). Por otro lado, desde el siglo XVIII cuando comenzó la revolución industrial, el uso de combustibles fósiles, especialmente derivados del petróleo aumentaron continuamente a nivel mundial. Factores como el mal

estado de equipos entre otros, ha ocasionado un alto número de derrames accidentales en las últimas décadas (Aguilera *et al.*, 2010).

Entre los diferentes efectos negativos de los hidrocarburos, la persistencia sobre el ambiente ocasiona la pérdida de los recursos naturales, composición y flujo de energía en los ecosistemas alterando el equilibrio ecológico, asimismo el daño producido por la persistencia de hidrocarburos depende principalmente de las características químicas y físicas de estos, acumulándose mayormente en el sedimento cuando la estructura es halógena e hidrofóbica. Durante los procesos biogeoquímicos de absorción, desorción y transformación la presencia de hidrocarburos representa un peligro para los organismos bentónicos y en los cuerpos de agua de la interfaz sedimento-agua, generalmente los hidrocarburos son tóxicos recalcitrantes y cancerígenos, con el riesgo latente de ingresar a las cadenas alimenticias y bioacumularse (Dominic, 2014).

Las bacterias tienen la capacidad para degradar eficientemente N-alcanos de cadena larga, debido a que lo utilizan como fuente de carbono, tal es el caso de *Bacillus coagulans* que crece en amplios rangos de temperatura (Lu *et al.*, 2011).

*B. coagulans* ha sido aplicada en la biorremediación de contaminantes de petróleo, por lo que se considera para su manejo en la biorremediación de sedimento contaminado.

Para la realización de un proceso de biorremediación en sedimento contaminado por hidrocarburos aplicados en campo, es importante realizar ensayos previos a

nivel de microcosmo en laboratorio, así como análisis del suelo e identificación de la población microbiana. De tal forma que durante el proceso se optimiza la bioestimulación (adición de nutrientes) para posteriormente implementarse a gran escala (Pelaez *et al.*, 2013). A través del desarrollo y generación de tecnologías sostenibles para recuperar los sedimentos contaminados por hidrocarburos contribuyendo a la solución de los procesos de transformación de los ecosistemas de la línea de generación y aplicación del conocimiento perteneciente a la especialización.

Por ello se hace necesario crear tratamientos eficaces, amigables con el ambiente y de bajo costo enfocados hacia un desarrollo sostenible, en este sentido una de las alternativas para el tratamiento de sedimento, suelo y cuerpos de agua contaminados por hidrocarburos es la biorremediación utilizando bacterias (Rassi *et al.*, 2015). En el presente proyecto de intervención se evaluó la biodegradación de Hidrocarburos Totales (HTP) usando *B. coagulans* a nivel de microcosmos; donde se implementaron las condiciones para un proceso de biorremediación en cuanto a las características edáficas del sitio, condicionales nutricionales y de agitación para su aplicación en los sedimentos de un estero contaminado por hidrocarburos en el ejido el Sacrificio en Tuxpan, Veracruz.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP)

Las sustancias químicas de origen antrópico como los contaminantes orgánicos persistentes se producen, usan y liberan de forma acelerada impactando de manera negativa al medio ambiente y la salud humana (García, Rosado y Salas, 2012). Además, se bioacumulan en las cadenas tróficas y se transportan en medios como el aire y agua, incluso las especies migratorias son capaces de transportar y liberar contaminantes a ecosistemas terrestres y acuáticos (Arbeli, 2009).

En los ecosistemas marinos se vierten grandes cantidades de aguas residuales tratadas y sin tratamiento que transportan contaminantes orgánicos persistentes tales como bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, éteres, pesticidas y difenil polibromado. Así como, tensioactivos de metales pesados estos contaminantes, se almacenan en los sedimentos y cuerpos de agua. El plancton absorbe y bioacumula e ingresa los compuestos tóxicos en la cadena alimenticia. Esta situación se agrava con el uso indiscriminado de los productos químicos representando una amenaza para los ecosistemas, salud y seguridad humana (Dominic, 2014). A nivel mundial, esta situación es una problemática por lo que es urgente desarrollar métodos de remediación y control de contaminantes orgánicos persistentes a través de la reducción de la producción de estas

sustancias e impulsar el desarrollo de tecnologías con métodos de biorremediación (Alharbi *et al.*, 2018).

## **2.2 Contaminación por hidrocarburos sobre los recursos ambientales**

La contaminación por hidrocarburos en el mundo es una de las principales problemáticas ambientales ocasionada por la deficiente gestión en el uso, refinación, operación del recurso y derrames accidentales.

Los derivados del petróleo se encuentran disponibles en el ambiente, por su naturaleza química y física pueden provocar diversos niveles tóxicos en el ambiente, con base al tiempo de exposición y susceptibilidad del ambiente expuesto. Los hidrocarburos son capaces de migrar rápidamente y afectar los ecosistemas acuáticos terrestres y a la población humana (Abha *et al.*, 2012).

La amplia distribución y puntos de ebullición que tienen las moléculas de hidrocarburo del petróleo provocan, diversos niveles de toxicidad en el ambiente de acuerdo con la naturaleza química, concentración de HTP (ppm) , tiempo de exposición y susceptibilidad, estos contaminantes son capaces de migrar rápidamente y afectar los ecosistemas acuáticos terrestres y a la población humana (Abha *et al.*, 2012).

En cuanto a los efectos de la contaminación por hidrocarburos, sobre ambientes acuáticos estudios en el Golfo Pérsico indicaron que la bioacumulación de éstos



en los arrecifes de coral amenaza la salud y supervivencia de las especies (Ranjbar *et al.*, 2018). Además, estudios realizados en tortugas marinas de las islas canarias, España y las islas de Cabo Verde, en África detectaron altas concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el plasma sanguíneo, esta situación expone a un estado de riesgo la salud fisiológica de las tortugas marinas (Camacho *et al.*, 2012). Igualmente, las serpientes marinas presentan indicios de contaminación en diferentes tejidos con niveles muy altos de sustancias petroquímicas en la piel de acuerdo con los estudios realizados del área protegida Hara del Golfo Pérsico (Heydari *et al.*, 2014).

Por otro lado, el efecto negativo por los derrames de hidrocarburos en el Golfo de Gabes en Túnez, es un riesgo para las poblaciones de *Aphanius fasciatus*, que pueden ocasionar deformaciones espinales (Kessabi *et al.*, 2013). Además, estudios en el Puerto de Lingshui Hainan, China revelaron que exposiciones a hidrocarburo aromático policíclico del tipo benzopireno en concentraciones de 10 µg/L alteran el metabolismo, sistema inmunológico, la regulación osmótica y el crecimiento de ostras (Chen *et al.*, 2018).

### **2.3 Contaminación del sedimento por hidrocarburos**

El sector industrial y portuario son fuentes emisoras de hidrocarburos, por lo que las instalaciones cercanas a fuentes de agua ponen en riesgo el equilibrio ecológico del sedimento, pudiendo alterar el hábitat y las cadenas tróficas de los organismos (Nirmala *et al.*, 2018). Diversos estudios demuestran que los

sedimentos son mejores indicadores de contaminación por hidrocarburos en comparación a los análisis de calidad de agua. A su vez, los derrames ocasionados en los ríos afectan las zonas intermareales sometiendo a una zona vulnerable a las especies que habitan el fango (Wokoma, 2014).

Las concentraciones de hidrocarburos se reportan más altas durante la estación húmeda en comparación con la estación seca por lo que es necesario el monitoreo durante las diferentes estaciones (Gong *et al.*, 2018). Los factores bióticos se ven afectados. Dentro de ellos, la diversidad bacteriana recibe un impacto negativo a largo plazo, sobreviviendo aquellas comunidades bacterianas tolerantes a ambientes contaminados por hidrocarburos (Gao *et al.*, 2018).

## **2.4 Biorremediación**

En los últimos años se ha incrementado el interés por desarrollar tecnologías de tratamiento que degraden o remuevan totalmente los derrames petroquímicos. Una de las técnicas utilizadas es la oxidación química aplicada en la biodegradación de benceno, tolueno y xileno de un suelo contaminado, durante el proceso se alcanzó una eliminación del 70% en 60 min, sin embargo, se generaron subproductos y los costos de esta técnica fueron elevados (De Souza *et al.*, 2018).

La biorremediación se define como el proceso por el cual los desechos orgánicos son degradados biológicamente a un estado inocuo bajo condiciones

controladas, o a niveles por debajo de los límites de concentración establecidos por las autoridades reguladoras (Sharma, 2012).

Debido a su naturaleza, la biodegradación comprendida como un proceso de biorremediación se puede considerar dentro del concepto de tratamiento biológico, el cual está dirigido por microorganismos o sus productos dando como resultado la descomposición de una sustancia, es decir a través de la bioestimulación de un organismo o la obtención de macromoléculas como las enzimas derivadas del organismo por medio de la bioestimulación del organismo, la biodegradación se clasifica de la siguiente forma: catalizada por enzimas en pruebas experimentales con la purificación de la enzima o el desarrollo y estimulación del organismo que la produce, clasificándose de la siguiente forma:

**Primaria.** La alteración de la estructura de una sustancia que da como resultado la pérdida de una propiedad específica de la misma.

**Ambientalmente aceptable.** Eliminación de propiedades indeseables del compuesto. A menudo, esto corresponde a una biodegradación primaria.

**Última.** Ruptura completa de un compuesto donde es totalmente oxidado o reducido llegando a sustancias como dióxido de carbono / metano, nitrato / amonio y agua (Noroberg, Duffus y Templeton, 2013).

Los microorganismos poseen un enorme potencial biotecnológico con características fisiológicas versátiles y un metabolismo capaz de metabolizar compuestos químicos recalcitrantes. El conocimiento de las bacterias nativas

puede ser utilizado para el desarrollo de tecnologías de biorremediación específicas para las características particulares del sitio. Por otro lado, el diseño de un ambiente ecosistémico minimizado también denominado microcosmos permite controlar las condiciones de las comunidades de los microorganismos para su posterior aplicación en campo (Grenni *et al.*, 2012).

Una de las mayores catástrofes ocasionada por un derrame de petróleo ocurrió en el año 2010 en el Golfo de México donde se derramaron más de 4 millones de barriles en la plataforma Deepwater Horizon. Sin embargo, estudios han demostrado que los microorganismos han reducido una parte de la contaminación, convirtiéndola en una alternativa biotecnológica para el desarrollo de estrategias que disminuyan el daño ambiental (Mason *et al.*, 2014).

## **2.5 Bioaumentación**

La bioaumentación consiste en añadir cultivos microbianos aumentados en condiciones específicas, en cultivos especializados en la degradación de algún contaminante para ser aplicados en un proceso de biorremediación ambiental en medios *in situ* (Alvarez y Illman, 2006).

La efectividad de la bioaumentación dependerá del tipo de sistema al que sea dirigido, para los sistemas de lodos activados de aguas residuales se logra eficientemente debido a que los microorganismos se mezclan fácilmente con el reactor con lo que mejora las condiciones de reacción, sin embargo, en medios acuáticos es más difícil ya que se debe asegurar la supervivencia de las cepas

inoculadas, y el crecimiento homogéneo en el sitio contaminado., las bacterias son los microorganismos más utilizados en la bioaumentación, sin embargo los hongos lignolíticos también son utilizados para la biorremediación de suelo ex situ., de manera que la bioaumentación puede ser a través de consorcios bacterias autóctonos obtenidas del ambiente contaminado para posteriormente enriquecerse y aplicarse (Da Silva y Alvarez, 2014).

Por otra parte, se pueden utilizar cultivos puros de cepas bacterianas con potencial para degradar contaminantes, como el tetracloruro de carbono; o través de la introducción de vectores genéticos naturales como las enzimas que cuentan con el potencial metabólico, para la transferencia a bacterias autóctonas del área contaminada ( Da Silva y Alvarez, 2014).

Para la biorremediación de sitios contaminados por petróleo, antes de aplicar los microorganismos con capacidad hidrocarburolytica, se deben considerar los requerimientos nutricionales, condiciones de temperatura, potencial redox, salinidad, pH entre otros factores, estos se deben determinar antes en el laboratorio y ensayos de campo junto al conocimiento de redes metabólicas, resistencia celular y mecanismos de adaptación de una variedad microbiana adecuada al sitio de contaminación, con el fin de prevenir las condiciones limitantes en la biodegradación de petróleo aplicado in situ (Tyagi, da Fonseca y Carvalho, 2010).

La bioaumentación puede ser aplicada mediante la inyección de microorganismos con capacidad metabólica específica para la degradación de ciertos compuestos,

un consorcio bacteriano puede complementar o reemplazar a la población nativa, debido a que sobreviven y ocupan el nicho metabólico específico en el ambiente contaminado (Nagata *et al.*, 2016). Las inyecciones líquidas son aplicadas a altas concentraciones microbianas típicamente  $10^9$ – $10^{12}$  cells/mL en medio nutritivo usando bombas. Otra forma para aplicar los microorganismos es mediante la inmovilización con biosólidos, o encapsulación en microperlas para luego inyectarse (Da Silva y Alvarez, 2014).

La bioaumentación se ha empleado con *Bacillus* sp. para la biorremediación del sedimento contaminado con 2,4,6-tribromofenol, indicando la efectividad de la bioaumentación con una biodegradación de 40.7% durante 7 semanas, con la adición de aditivos de NaCl, ácido húmico, lactato de sodio, propionato de sodio, y en especial con glucosa y extracto de levadura (Xiong, Li y An, 2016). El género *Bacillus* ha sido bioaumentado en microcosmos evidenciando la reducción de altas concentraciones de bisfenol A para la biorremediación de sedimento contaminado, además la adición de co-sustratos como el ácido húmico, NaCl, glucosa y extracto de levadura mejoran los procesos de biorremediación (Xiong *et al.*, 2017).

## **2.6 Bioestimulación**

Es una técnica que consiste en la introducción de estimulación de nutrientes (N y P), aireación, adición de aceptores de electrones como oxígeno y nitratos, ajuste de pH y cometabolitos para favorecer o potenciar la biorremediación intrínseca (López, Cisneros y Ochoa, 2016). Ya que las tasas de biodegradación

microbiana, en ambientes acuáticos contaminados por petróleo es limitada principalmente por nutrientes como el nitrógeno y fósforo además, de la salinidad, la presión y el oxígeno; en profundidades mayores también pueden ser un factor limitante, en cambio para las tasas de biodegradación de suelo la humedad y pH son uno de los principales factores determinantes en la remoción de contaminantes del petróleo (Leahy y Colwell, 1990).

Por otro lado, para lograr la efectividad de la bioestimulación con nutrientes para la degradación de petróleo es necesario considerar la biodisponibilidad, puesto que la adición de nutrientes como fósforo puede no estar disponible para los microorganismos debido a la baja solubilidad (Bento *et al*, 2004). Sin embargo, la velocidad a la que biodegrade un contaminante también depende de la calidad ambiental del sitio, el tipo y concentración de microorganismo utilizados, así como de la estructura química del contaminante además de la adaptabilidad genética de los microorganismos expuesto a altos niveles de contaminación, por lo que se recomienda la adición de suplementos para aumentar la disponibilidad del petróleo, otro factor a considerar para el aumento de las tasas de biodegradación es lograr, la sinergia de los aspectos físicos, biológicos y químicos del sitio a biorremediar (Haritash y Kaushik, 2009).

La deficiencia de nutrientes en un factor ambiental que disminuye, la actividad catabólica de los microorganismos autóctonos en ambientes contaminados por hidrocarburos, de modo que la bioestimulación con la adición de fuentes de nitrógeno en la biorremediación in situ, ha sido comprobado en un estudio de

biodegradación de hidrocarburos totales añadiendo fuentes de nitrógeno a los microorganismos autóctonos durante 90 días en microcosmos alcanzando porcentajes de remoción mayores al 80% (Sarkar *et al.*, 2016).

Estudios recientes indican que la bioestimulación, es una de las mejores estrategias para la biorremediación de suelo meteorizado y contaminado por petróleo con niveles crónicos y antiguos de contaminación, con la adición de oxígeno, humedad, temperatura constante y la mezcla homogénea del suelo se logra reducir hasta en un 99% los hidrocarburos de petróleo, en antiguos derrames sobre el suelo; por ello se sugiere que la bioestimulación es una tecnología económica, amigable con el medio ambiente y sostenible (Haleyur *et al.*, 2019).

Por otra parte, la bioestimulación de bacterias hidrocarburolicas autóctonas, del género *Bacillus* y *Pseudomonas*, ha sido evaluado para la biorremediación de suelo contaminado por petróleo, en pruebas piloto a nivel de microcosmos mediante la caracterización físico-química del suelo, selección de cepas hidrocarburolicas y la viabilidad en costos y tiempo para el escalamiento a nivel *in situ*, con resultados eficaces alcanzando una biodegradación de naftaleno de 94.4% durante 161 días (Pelaez *et al.*, 2013).

## **2.7 Biorremediación en sedimento por bacterias del género *Bacillus***

En la biorremediación de sedimento marino contaminado por petróleo crudo se ha diseñado un sistema de tratamiento con biosurfactantes, provenientes de



bacterias hidrocarburohílicas de las especies *Bacillus algicola*, *Rhodococcus soli*, *Isoptericola chiayiensis* y *Pseudoalteromonas agarivorans* capaces de eliminar los contaminantes petroquímicos de un 48% a 72% en un medio de sal mineral incubado en matraces Erlenmeyer de 250 mL a 28 °C por 14 días a 180 rpm (Lee *et al.*, 2018). Por otro lado, un estudio evaluó el proceso de remoción de bacterias del género *Bacillus* a nivel de microcosmos en recipientes con muestras de suelo contaminado por hidrocarburos, arena fina y suelo biológicamente activo a temperatura ambiente, durante tres meses en la que se degradó el 40% de hidrocarburos totales de petróleo (Rezaei *et al.*, 2018).

Estudios de los últimos años señalan el potencial biotecnológico de *Bacillus licheniformis*, para la biorremediación de petróleo crudo, las pruebas a nivel microcosmos se realizaron con 1 g de aceite crudo en un medio de sales minerales y la adición de 0.2 g de nanopartículas de óxido de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) y clorohidróxido monohidratado de zinc ( $\text{Zn}_5(\text{OH})_8\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) y el uso de biosurfactantes, la biodegradación de 60 % durante 7 días a 30° C, pH 7.5 a 150 rpm ( El-Sheshtawy y Ahmed, 2017). De igual manera *Bacillus licheniformis* ha sido evaluada junto con *Bacillus subtilis* aisladas de un suelo contaminado por petróleo se probó la capacidad de biorremediación de estas especies bacterianas en un sistema de microcosmo. El medio contenía fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), nitrógeno y fuentes de fósforo bajo condiciones de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , con un flujo de 3 L/h durante 90 días con una biodegradación superior al 70% (Asadirad *et al.*, 2016).

## **2.8 Biorremediación con *Bacillus coagulans***

*Bacillus coagulans* es una bacteria formadora de ácido láctico que forma esporas, Gram positiva con un tamaño aproximado de 0,9 µm por 3,0 µm a 5,0 µm, además es catalasa positiva, móvil, anaeróbica facultativa, positiva a las pruebas Vogues Proskeur y rojo de metilo crece óptimamente a 30 °C, asimismo tolera temperaturas de hasta 55°C (Ranganath *et al.*, 2015). Además, *Bacillus coagulans* no es patógena siendo una cepa segura en animales y seres humanos aplicándose como probiótico (AIBMR, 2016).

Por otro lado, el nivel de biorremediación alcanzado en un proceso depende de la capacidad de optimizar las condiciones físicas, químicas y biológicas para la aplicación de *Bacillus coagulans*, se han optimizado algunos parámetros, como el pH 7 a una temperatura de 30 °C con una concentración del 1% de diésel, para determinar el efecto de la temperatura, se aplicaron diferentes temperaturas de 15 °C, 30 °C y 45 °C, utilizando medio mínimo de sal incubado a 37 °C a pH 7.5 con 150 rpm el crecimiento se monitoreo a un longitud de onda de 620 nm (Sivagamasundari y Jayakumar, 2017).

Al mismo tiempo *Bacillus coagulans*, tiene la capacidad para biodegradar alcanos de cadenas largas eficientemente, esto ha sido probado en experimentos con frascos Erlenmeyer con 40 ml de medio liquido Bushnell Haas, 2 ml de células en suspensión y 0.1% de cera de parafina mg/mL y un control sin inoculó bacteriano, incubado a 37 °C a 170 rpm durante 7 días. Además, crece

en un rango amplio de temperatura, ideal para ser aplicado en procesos de biorremediación de suelos contaminados por petróleo (Lu *et al.*, 2011).

*Bacillus coagulans* es capaz de crecer y utilizar como única fuente de carbono al petróleo crudo, en tubos de ensayo con 9 mL medio mínimo salino y 1 % de aceite crudo estéril, se inoculó la cepa aislada previamente, incubada a 30 °C durante 14 días con agitación intermitente resultando una biodegradación del 95% (Fagbemi *et al.*, 2017).

Estudios realizados en un estero contaminado perteneciente al ejido Emiliano Zapata de Tuxpan, Veracruz, identificaron a nivel molecular la especie *Bacillus coagulans*, y se evaluó su capacidad hidrocarburofítica. Esta cepa cultivada en medio Bushnell-Hass a 35 °C durante 72 h alcanzó una biotransformación del 95% (Lira, 2014).

En el siguiente cuadro, se puede observar de forma resumida de algunas de las condiciones utilizadas en diseños experimentales para procesos de biorremediación con *Bacillus coagulans*, con un rango de temperatura de 30 °C a 37 °C (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Biorremediación de sitios contaminados por hidrocarburos con *Bacillus sp.***

**y *Bacillus coagulans.***

<b>Muestra</b>	<b>Medio nutritivo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Agitación (rpm)</b>	<b>pH</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Remoción (%)</b>	<b>Referencias</b>
Suelo	Mínimo de sal	30	180	7	72 h	Sin dato	(Sivagamasundari y Jayakumar <i>et al.</i> , 2017).
Sedimento	Bushnell Haas	37	170	Sin dato	7 días	Sin dato	(Lu <i>et al.</i> , 2011)
Agua	Mínimo de sal	30	Sin agitación	Sin dato	14 días	95	(El-Sheshtawy y Ahmed, 2017).
Sedimento	Bushnell Haas	35	Sin agitación	Sin dato	72 h	95	(Lira, 2014).

*Bacillus coagulans* alcanza niveles altos de biorremediación de hidrocarburos en pocos días. De manera que los estudios anteriores confirman la eficacia de biodegradar contaminantes de petróleo. En el presente proyecto de intervención se evaluó la aplicación de la cepa *Bacillus coagulans* a nivel microcosmos en sedimento contaminados por hidrocarburos, comprendiendo una fase primordial para garantizar la viabilidad de un proceso de biorremediación con respecto a las condiciones del sitio y factores ambientales.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

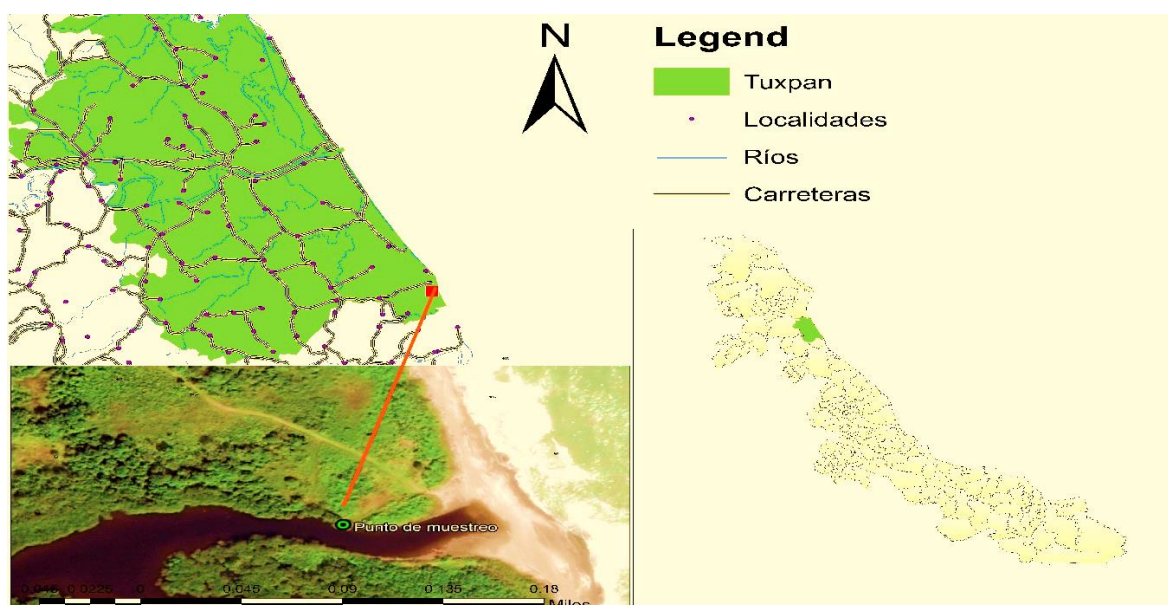
Evaluar la biodegradación de Hidrocarburos Totales (HTP), usando *Bacillus coagulans* a nivel de microcosmos sobre sedimentos contaminados del estero del ejido el Sacrificio Tuxpan, Veracruz.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Analizar los parámetros fisicoquímicos del sedimento del estero contaminado por hidrocarburos del ejido el Sacrificio Tuxpan, Veracruz.
- Comparar los hidrocarburos totales de petróleo en los tratamientos sometidos a diferentes estímulos en el proceso de la biorremediación del sedimento contaminado por hidrocarburos del ejido el Sacrificio Tuxpan, Veracruz.
- Estimar la capacidad hidrocarburofítica de *Bacillus coagulans* con el porcentaje de biodegradación de hidrocarburos totales (HTP), durante el primer, segundo y tercer mes a nivel microcosmos de sedimento contaminado del ejido el Sacrificio.

## IV. ÁREA DE ESTUDIO

Se obtuvo la muestra de sedimento del estero conectado a la playa Emiliano Zapata ubicado en el ejido el Sacrificio Tuxpan, Veracruz. Cerca de la zona se encuentra instalada una batería de producción de petróleo, la cual ha presentado derrames accidentales. Las coordenadas geográficas del sitio son: 20° 48' 34.5" N y 097° 13' 31.1" W.



**Figura 1.** Localización del punto de muestreo en el ejido el Sacrificio Tuxpan, Veracruz.

### 4.1 Fase experimental

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

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Procesamiento de la muestra**

Se extrajo a una profundidad de 30 cm, 2 kg de sedimento el cual fue secado y extendido sobre una superficie plana y uniforme, posteriormente fue cribado en un tamiz de 10 mm y después almacenado en frascos de vidrio. Para los análisis de los parámetros físico-químicos y la concentración de hidrocarburos totales de petróleo se realizó el siguiente procedimiento.

### **5.2 Análisis de los parámetros fisicoquímicos**

El sedimento tamizado fue analizado para la obtención de los parámetros físicos como la textura mediante el hidrómetro de Bouyoucos. Luego el sedimento fue categorizado con base a la densidad aparente utilizando el método de la probeta. Otro de los parámetros físicos medidos fue la conductividad eléctrica con un conductímetro. En cuanto a los parámetros químicos, el pH fue medido con un multiparámetro (Oakton PCSTestr 35 Waterproof). La concentración de carbonatos fue estimada con el método valorimétrico, para la materia orgánica se aplicó la técnica de Walkley Black. Los parámetros anteriores se realizaron con base a lo descrito por Barón (2014).



### 5.3 Análisis de hidrocarburos totales de petróleo

Las muestras de sedimento fueron analizadas, para la determinación de hidrocarburos mediante la extracción por reflujo (Soxhlet) descrita por Fernández *et al.*, (2006).

La humedad del sedimento se determinó con el peso constante de 10 g de muestra, está se colocó en la estufa a 30 °C durante 72 horas, en seguida en el desecador se colocaron las muestras por 2 h hasta alcanzar la temperatura ambiente. A continuación, se expresa la siguiente formula que se empleó para obtener el peso final (Fernández *et al.*, 2006).

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

### 5.4 Extracción de hidrocarburos

La extracción por reflujo (Soxhlet), se realizó con base a los métodos D5369-93 de la ASTM (2003) y 3540 C de la US EPA (1994-1996). Para la cuantificación de hidrocarburos se tomaron muestras al inicio, primer, segundo y tercer mes de duración del proceso. La cuantificación de los hidrocarburos se determinó utilizando la siguiente ecuación.

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

Donde:

HTP<sub>s</sub> (mg kg<sup>-1</sup> 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.

### **5.5 Medición del crecimiento bacteriano por espectroscopia**

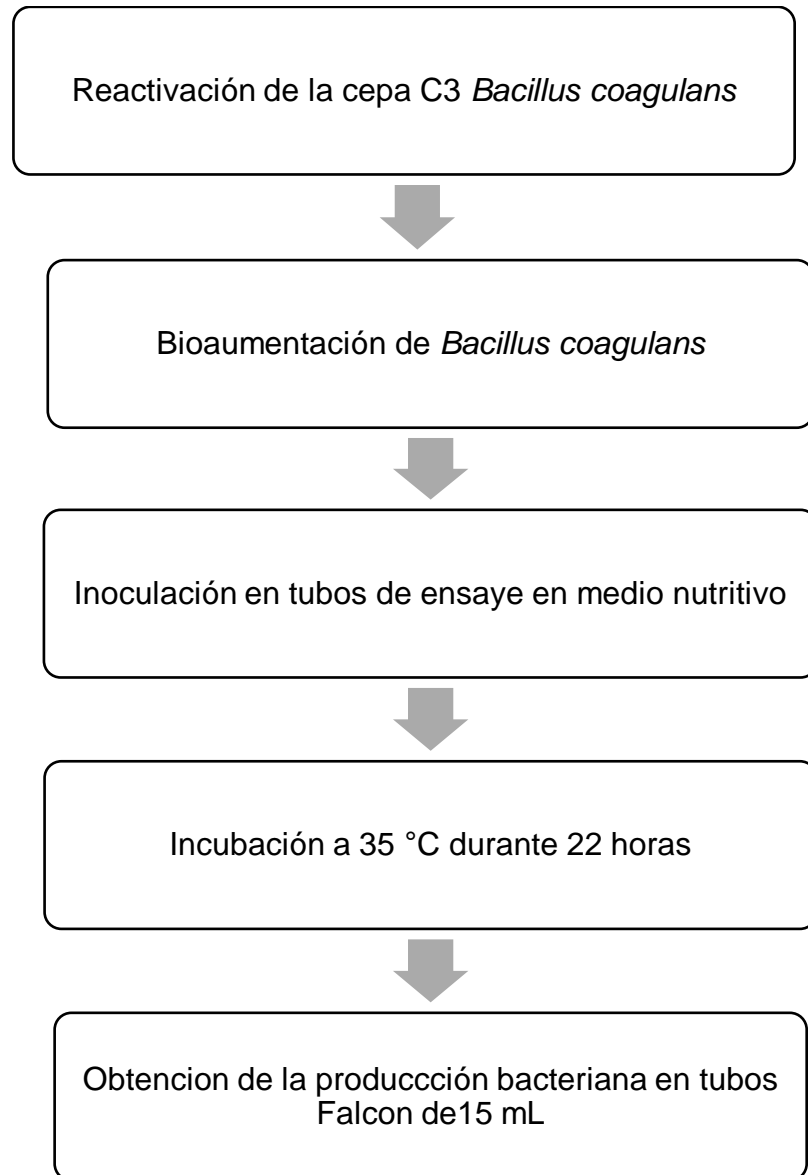
Se monitoreó el crecimiento de la cepa *Bacillus coagulans* en un espectrofotómetro 20 Genesys siguiendo el procedimiento descrito por Fletcher, 2000. La cepa bacteriana se obtuvo del cepario del laboratorio de biotecnología ambiental de la Universidad Veracruzana, Tuxpan, México. Los datos obtenidos se graficaron en Originpro 8.5 Lab.

### **5.6 Incremento de la biomasa bacteriana**

La cepa C3 *Bacillus coagulans* fue reactivada en medio nutritivo incubándose a 35 °C durante una semana según el procedimiento de Fletcher, 2000. Por último, la biomasa obtenida se centrifugó en tubos Falcon de 15 mL, a 2000 rpm por 10 min. Con una densidad celular final de  $4.72 \times 10^7$  cel/mL a 35 °C en medio

nutritivo, tomando como referencia lo descrito por Arrieta, Leskiw y Kaufman (2006) donde indican que 1.0 de absorbancia corresponde a  $5 \times 10^7$  cel/mL.

En el diagrama de flujo (figura 2) se representa el proceso de bioaumentación de *Bacillus coagulans*.



**Figura 2.** Proceso para el incremento de biomasa bacteriana de *Bacillus coagulans*

## 5.7 Diseño experimental y tratamientos del proceso de biorremediación

Para el experimento se emplearon frascos de vidrios herméticos de 175 mL. Las unidades experimentales presentaron las siguientes condiciones: el control sin estímulo (T1), otro tratamiento con todos los estímulos (T2), sin bacterias (T3), sin nutrientes (T4) y el último fue sin agitación mecánica (T5). Los tratamientos en agitación estuvieron en un agitador a 100 oscilaciones durante 8 h por 90 días. En el siguiente cuadro se describe los tratamientos con la presencia o ausencia de estímulos.

**Cuadro 2.** Diseño experimental y características de los tratamientos

<b>Tratamientos (4repeticiones)</b>	<b>Sedimento contaminado</b>	<b>Bacterias</b>	<b>Nutrientes</b>	<b>Agitación mecánica</b>	<b>Condiciones</b>
1	<b>Si</b>	No	No	No	sin estímulos
2	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	todos los estímulos
3	<b>Si</b>	No	<b>Si</b>	<b>Si</b>	sin bacterias
4	<b>Si</b>	<b>Si</b>	No	<b>Si</b>	sin nutrientes
5	<b>Si</b>	<b>Si</b>	<b>Si</b>	No	sin agitación mecánica

## **5.8 Monitoreo de parámetros físicos durante el experimento**

Durante toda la duración del experimento se monitoreó semanalmente la temperatura con un termómetro de mercurio 10-60 °C Brannan. Con respecto al pH se usó un potenciómetro Hanna HI 9813-6. Finalmente, la humedad se obtuvo a través de la diferencia de peso de acuerdo a Fernández *et al.* (2006).

## **5.9 Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos como resultado de la degradación de hidrocarburos totales (HTP) se analizaron bajo los criterios de normalidad (Kolmogorov Smirnov, Liliefors y Shapiro-Wilks) y de los análisis estadísticos de la prueba no paramétrica ANOVA de Kruskal-Wallis con el programa Statistica versión 8.

## VI. RESULTADOS

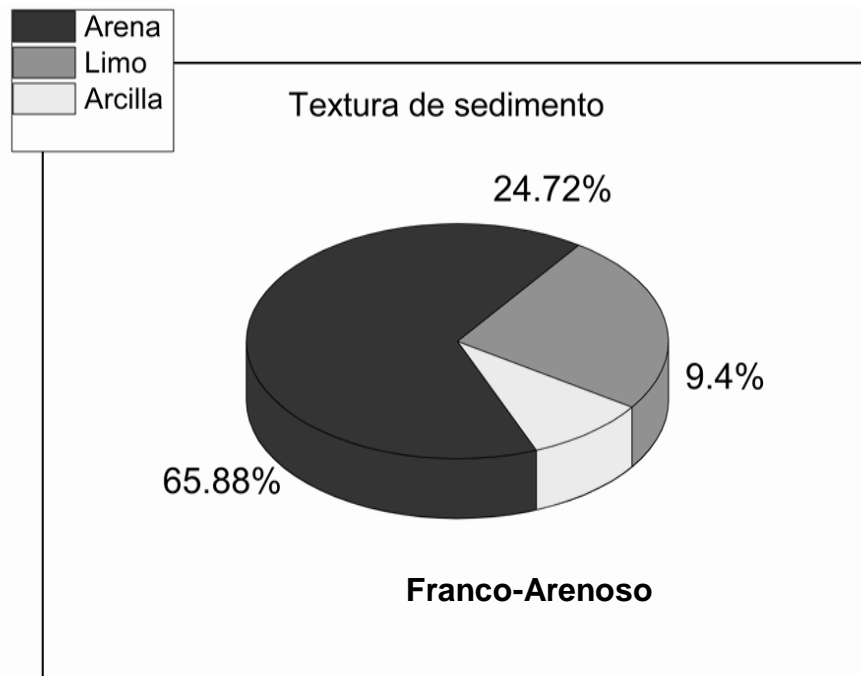
### 6.1 Composición fisicoquímica del sedimento contaminado por hidrocarburos

En el cuadro número 3, se observan los resultados obtenidos de los análisis físicos del sedimento contaminado. El valor de la densidad aparente fue de 1.08 g/cm<sup>3</sup> lo cual indica un nivel medio, para la conductividad eléctrica el valor fue de 5,510 µS lo cual expone un sedimento moderadamente salino, con una temperatura de 27 °C y una salinidad de 3.35 ppm muy fuertemente salino con base a la clasificación de suelos. Por otro lado, la clase textural del sedimento fue franco-arenosa.

**Cuadro 3. Resultados de los análisis físicos del sedimento**

<b>Parámetros</b>	<b>Valores</b>	<b>Clasificación de suelos</b>
Densidad aparente	1.08 g/cm <sup>3</sup>	Baja
Conductividad eléctrica	5,510 µS	Muy fuertemente salino
Salinidad	3.35 ppm	Muy alta salinidad
Clase Textural	65.88 % Arena 24.72 % Limo 9.4 % Arcilla	Franco-arenoso
Temperatura	27 °C	No aplicá

El sedimento del estero “El Sacrificio” presentó una textura franco-arenosa compuesta de 65.88 % Arena, 24.72 % Limo y 9.4 % Arcilla. El mayor porcentaje fue de arena sobre limo.



**Figura 3.** Porcentajes de arena, limo y arcilla del sedimento contaminado por hidrocarburos.

En el cuadro número 4, se observan los resultados obtenidos del análisis químico con un valor de pH de 6.75, lo que indica un sedimento muy ligeramente ácido. Por otro lado, el valor de los carbonatos fue de 24.9% clasificado como bajo con base a la clasificación agronómica de suelos descrito en la guía de análisis de suelo de laboratorio por Maruri (2007). Con respecto a la materia orgánica el valor fue de 14.04% clasificado, como extremadamente rico.

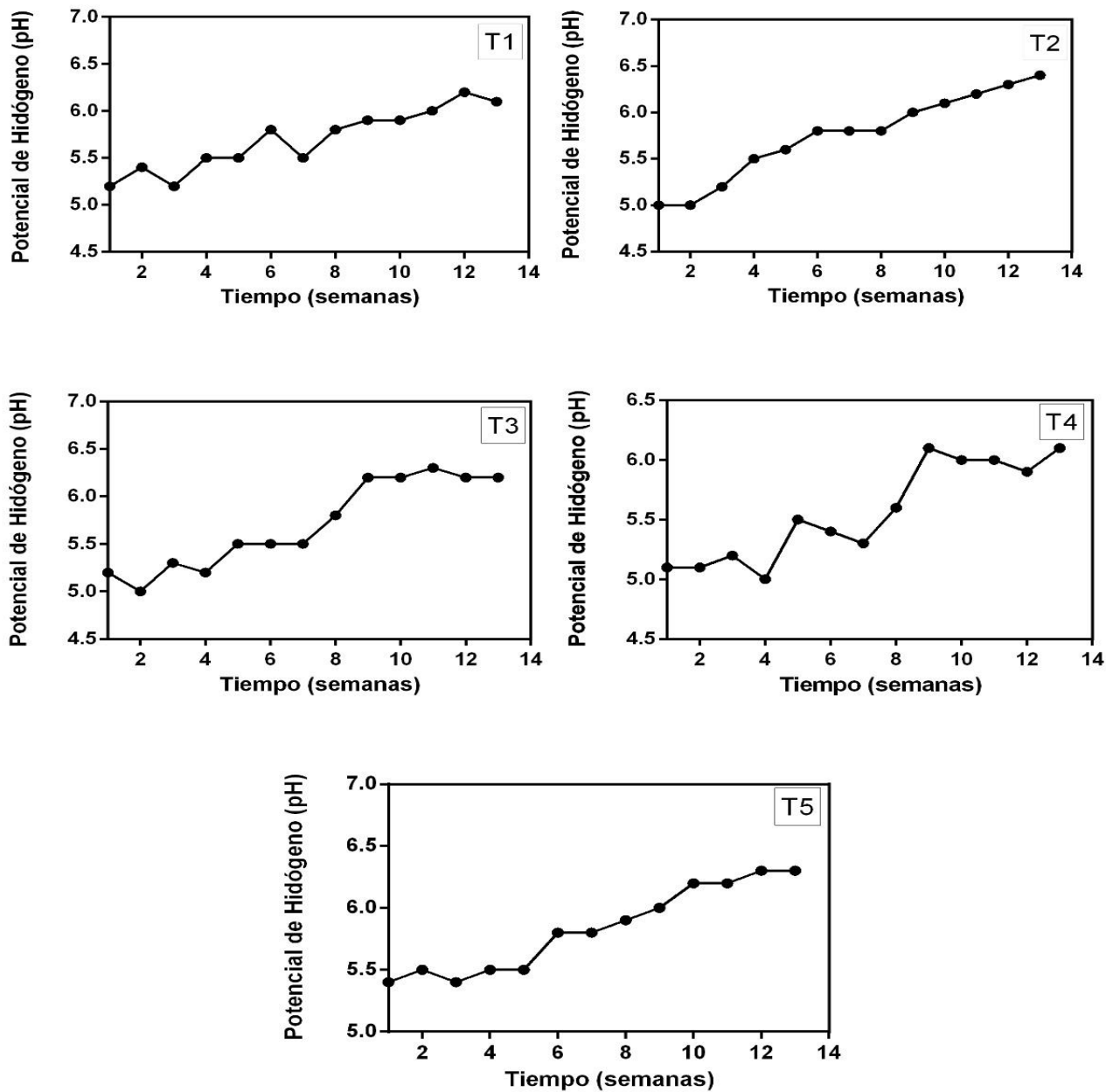
**Cuadro 4. Resultados de los análisis químicos del sedimento**

<b>Parámetros</b>	<b>Valores</b>	<b>Clasificación de suelos</b>
pH	6.75	Muy ligeramente ácido
Carbonatos	24.9%	Bajo
Materia Orgánica	14.04 %	Extremadamente rico

## **6.2 Monitoreo de la temperatura y pH en el proceso de biorremediación**

Los tratamientos sometidos a diferentes estímulos fueron monitoreados semanalmente durante 13 semanas. Con un valor promedio de pH de 5 a 6 para los 5 tratamientos. Como se observa en la siguiente figura.





**Figura 4.** Registró del pH para el T1, T2, T3, T4 y T5 durante las 13 semanas

Los 5 tratamientos registraron una temperatura promedio de 24 °C. En la semana 11, se registró la temperatura mínima con un valor de 21 °C y se alcanzó la máxima temperatura de 26 °C en las semanas 2 y 5 para todos los tratamientos.

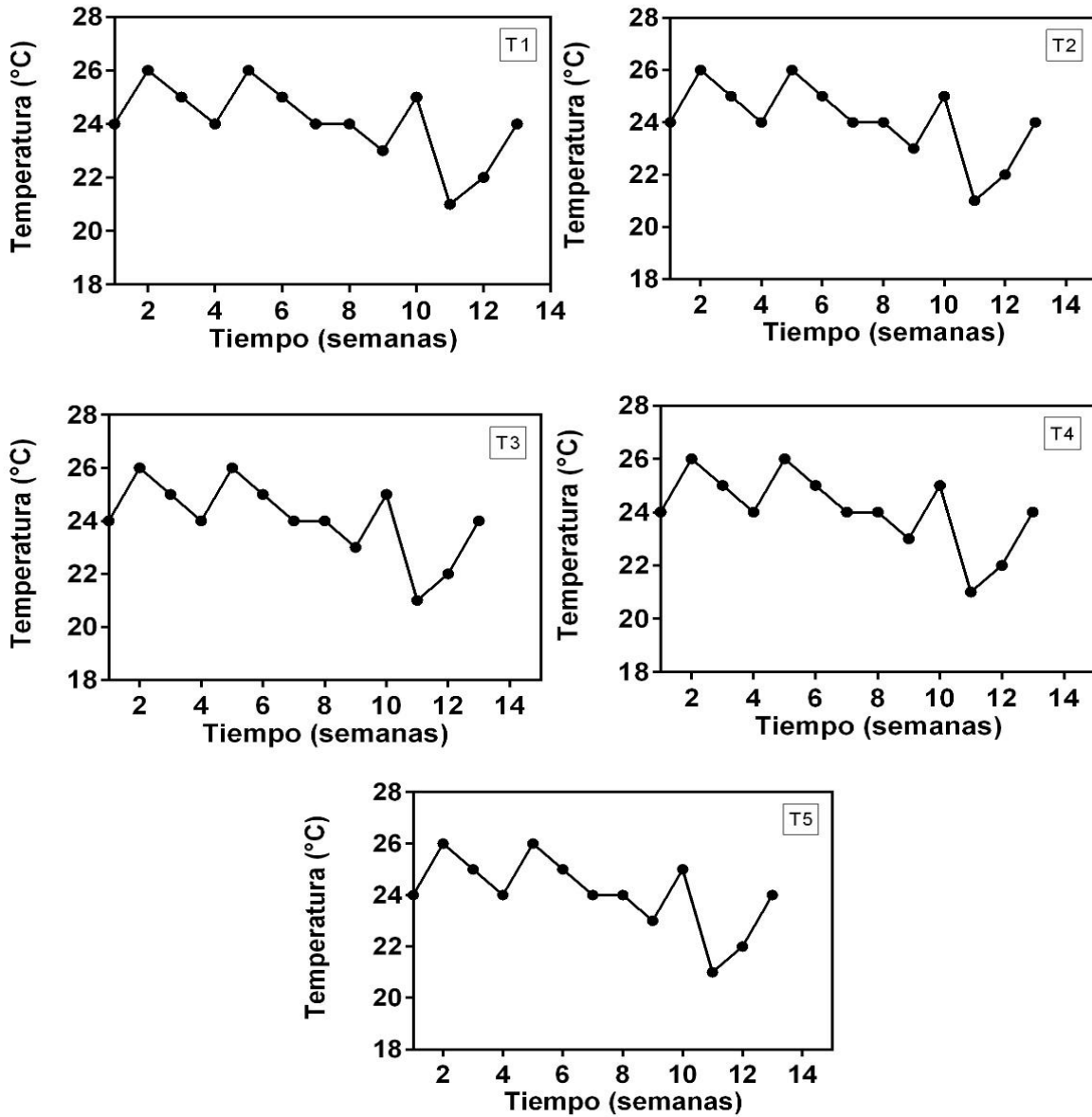
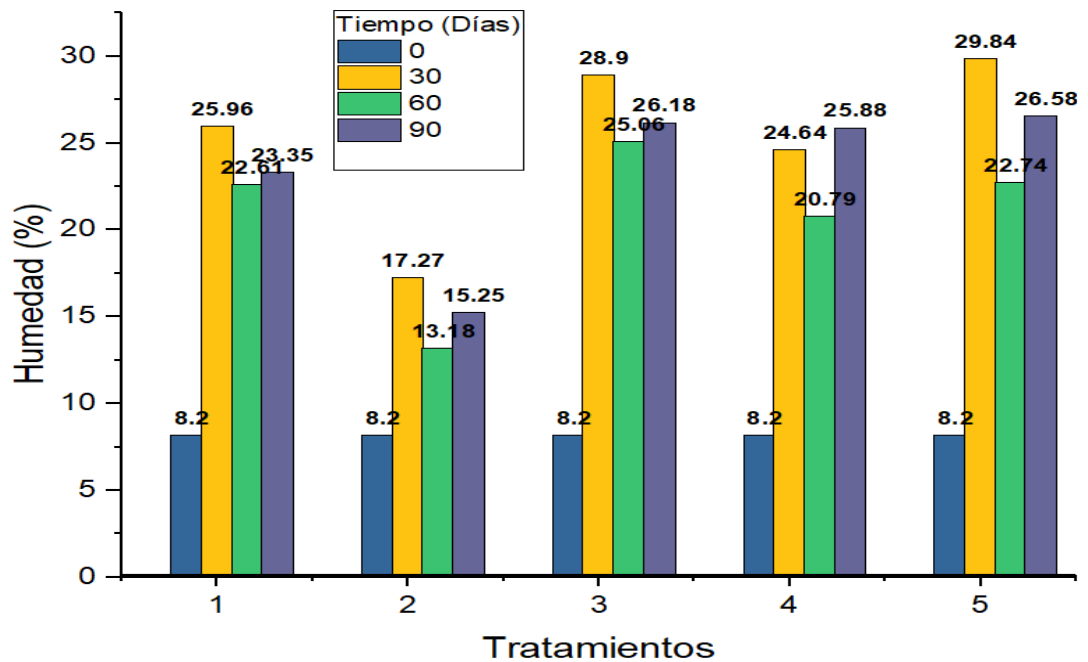


Figura 5. Registró de la temperatura en los 5 tratamientos durante las 13 semanas

### **6.3 Determinación del porcentaje de humedad**

La figura 6 muestra el porcentaje de humedad durante el proceso de biorremediación a nivel microcosmos, con un valor inicial de 8.2%. Durante los primeros 30 días el T5 (sin agitación mecánica) fue el más alto con 29.84% de humedad, los tratamientos T1 (sin estímulo), T3 (sin bacterias), T4 (sin nutrientes) también presentaron valores muy similares sin embargo, el T2 (todos los estímulos) presentó el porcentaje más bajo con 17.27%. En el segundo periodo a los 60 días el tratamiento T3 (sin bacterias) mostró el valor más alto con 25.06% de humedad, siendo los valores muy semejantes a los tratamientos T1 (sin estímulo), T4 (sin nutrientes) y T5 (sin agitación mecánica) por su parte el valor más bajo continuó en el tratamiento T2 (todos los estímulos) con la humedad de 13.18%. Finalmente, en el último periodo que correspondió a los 60-90 días los porcentajes de humedad no mostraron mucha diferencia con el mes anterior, el valor más alto fue para el tratamiento T5 (sin agitación mecánica) con 26.58 % de humedad semejante a los tratamientos T1 (sin estímulo), T3 (sin bacterias), T4 (sin nutrientes), y T5 (sin agitación mecánica). Por otro lado, el porcentaje mínimo se mantuvo en el tratamiento T2 (todos los estímulos) con el 15.25% humedad.



**Figura 6.** Valores del porcentaje de humedad en los tratamientos, durante la fase experimental.

#### 6.4 Valores de HTP con base a los límites máximos permisibles

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012), que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos. La muestra de sedimento contaminado por petróleo corresponde a una fracción pesada debido a que sobrepasa el límite permisible en la Norma Oficial Mexicana los valores iguales o mayores a los 3000 mg/kg de hidrocarburos, el valor inicial del presente estudio mostró un valor de HTP de 87,482.96 mg/kg. Este valor supera los valores límites permisibles para uso de suelo agrícola, actividad

realizada principalmente en la zona, como se puede apreciar en el siguiente cuadro número 5.

**Cuadro 5. Comparación de los límites máximos permisibles de hidrocarburos para uso de suelo agrícola (mg/kg) con respecto al valor inicial de la concentración de hidrocarburos del estero el Sacrificio, Tuxpan, Veracruz.**

Periodo	Fracción de Hidrocarburos	Uso de suelo predominantes (mg/kg Base seca)
		Agrícola
Inicial	Pesada	3000
<b>Inicial</b>	<b>Pesada</b>	<b>87,482.96</b>

En el cuadro 6 se observan las fracciones de hidrocarburos obtenidos en los tratamientos sometidos al proceso de biorremediación con base a la Norma Oficial Mexicana (NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012). A los 30 días el valor de HTP para el tratamiento 1 (sin estímulos) fue de 81,072.00 mg/kg. A los 60 días la concentración de HTP fue de 77,572.00 mg/kg y a los 90 días el valor de HTP fue de 75,714.00 mg /kg. Para el tratamiento 2 (todos los estímulos) a los 30 días el valor de HTP fue de 48,381.00 mg/kg, a los 60 días fue de 43,339.00 mg/kg y a los 90 días de 41,351.00 mg/kg. En el tratamiento 3 (sin bacterias) a los 30

días el valor de HTP fue de 80,977.00 mg/kg a los 60 días de 80,092.00 mg/kg y a los 90 días el valor fue de 77,436.00 mg/kg. Para el tratamiento 4 (sin nutrientes) el valor de HTP a los 30 días fue de 79,730.00 mg/kg. A los 60 días fue de 45,529.00 mg/kg y a los 90 días de 42,473.00 mg/kg.

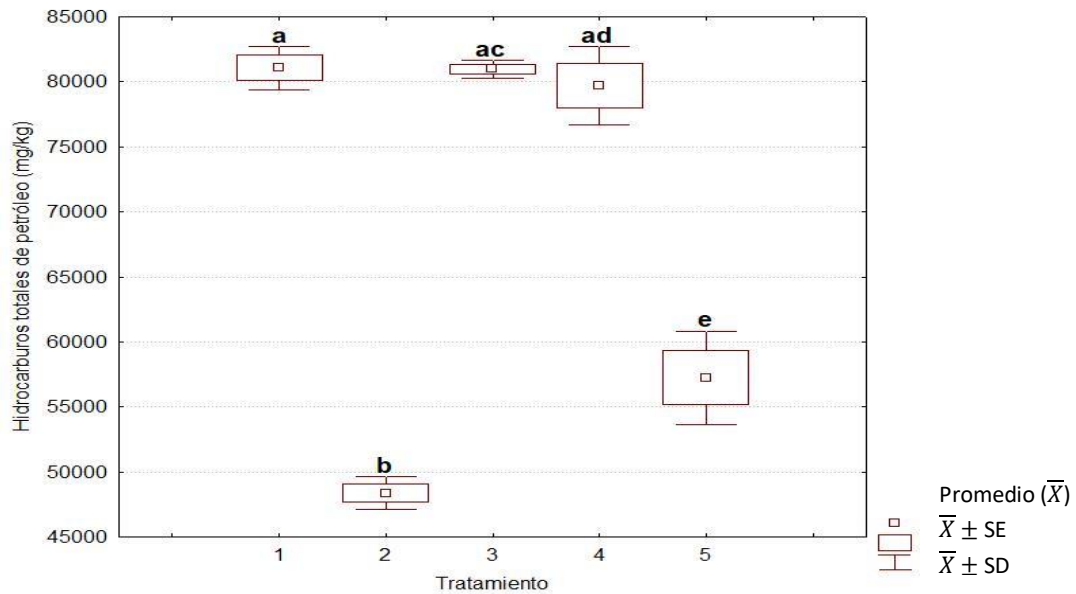
En cuanto al tratamiento 5 (sin agitación mecánica) a los 30 días el valor de HTP fue de 57,240.00 mg/kg, a los 60 días de 51,882.00 mg/kg y a los 90 días fue de 47,798.00 mg/kg.

**Cuadro 6. Concentraciones de hidrocarburos obtenidos en los tratamientos sometidos al proceso de biorremediación.**

Tratamientos	Concentración de HTP mg/kg			
	Tiempo (Días)			
	Inicial	30	60	90
T1	87,482.96	81,072.00	77,572.00	75,714.00
T2	87,482.96	48,381.00	43,339.00	41,351.00
T3	87,482.96	80,977.00	80,092.00	77,436.00
T4	87,482.96	79,730.00	45,529.00	42,473.00
T5	87,482.96	57,240.00	51,882.00	47,798.00

## 6.5 Cuantificación de HTP a los 30 días

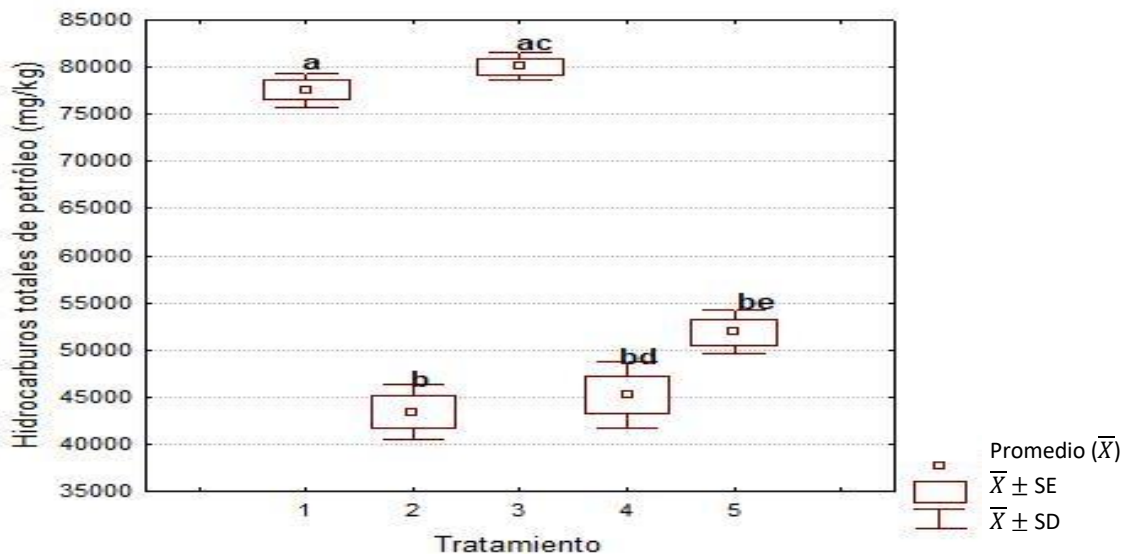
La cuantificación de HTP a los 30 días del proceso de biorremediación de los sedimentos en los microcosmos, registraron el máximo valor de HTP en el tratamiento 1, (sin ningún estímulo) con un valor de 81,072.00 mg/kg siendo estadísticamente igual al tratamiento 3 (sin bacterias) y al tratamiento 4 (sin nutrientes) con valores de 80,977.00 mg/kg y 79,730.00 mg/kg respectivamente. Por el contrario, el valor mínimo de HTP se registró en el tratamiento 2 (todos los estímulos), con un valor de 48,381.00 mg/kg, presentaron diferencias significativas a los tratamientos anteriores mencionados, y al tratamiento 5 (sin agitación mecánica) con un valor de HTP de 57,240.00 mg/kg,



**Figura 7.** Valor promedio de la concentración de HTP en la biorremediación a los 30 días. Letras distintas en los tratamientos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). La grafica muestra el valor promedio ( $\square$ ), error estándar del promedio ( $\square$ ) y la desviación estándar del promedio ( $I$ ).

## 6.6 Cuantificación de HTP a los 60 días

La cuantificación de HTP a los 60 días del proceso de biorremediación en los microcosmos, registró el valor máximo en el tratamiento 3 (sin nutrientes) con una concentración de 80,092.00 mg/kg, siendo similar estadísticamente al tratamiento 1 (sin estímulos) con un valor de 77,572.00 mg/kg. En cuanto al valor mínimo, se observó en el tratamiento 2 (todos los estímulos) con un valor de 43,390.00 mg/kg, presentando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) al tratamiento 1 (sin estímulos). Pero similar, a los tratamientos tratamiento 4 (sin nutrientes) y al tratamiento 5 (sin agitación mecánica) con valores de 45,229.00 mg/kg y 51,882.00 mg/kg respectivamente, a los 60 días del proceso de biorremediación.

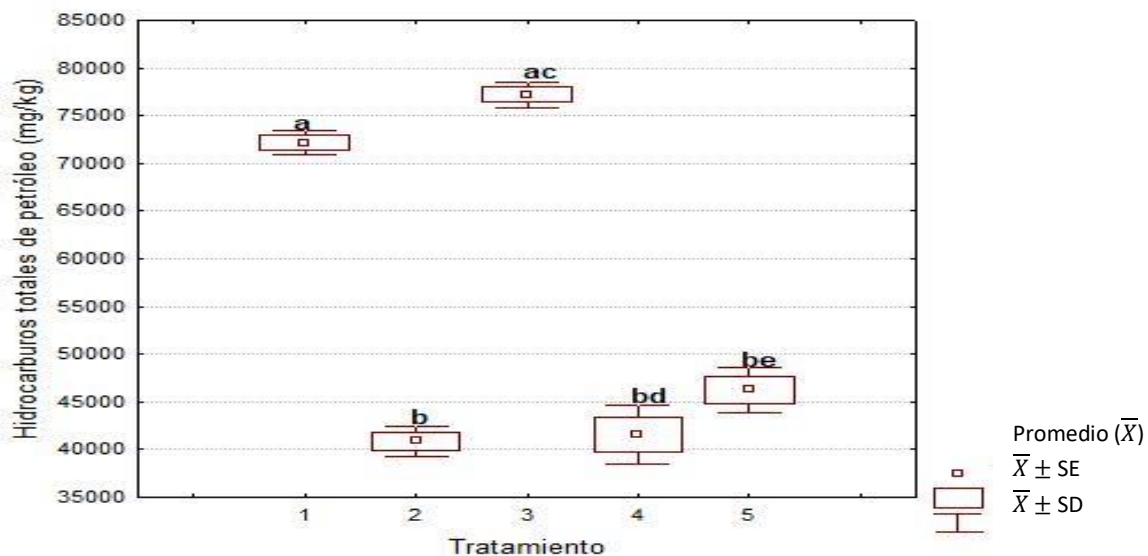


**Figura 8.** Valor promedio de la concentración de HTP en la biorremediación a los 60 días. Letras distintas en los tratamientos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). La grafica muestra el valor promedio ( $\bar{X}$ ), error estándar del promedio ( $\bar{X} \pm SE$ ) y la desviación estándar del promedio ( $\bar{X} \pm SD$ ).



### 6.7. Cuantificación de HTP a los 90 días

En la siguiente figura se observa la concentración de HTP del último periodo, del proceso de biorremediación del sedimento contaminado a nivel de microcosmos correspondiente a los 90 días. Dando como resultado los valores más altos de HTP en el tratamiento 3 (sin bacterias) con un valor de 77,436.00 mg/kg, estadísticamente similar al tratamiento 1 (sin estímulo) con un valor de 75,714.00 mg/kg. Por otra parte, los valores se mantuvieron en el tratamiento 2 (todos los estímulos) con un valor de 41,351.00 mg/kg estadísticamente similar a los tratamientos 4 (sin nutrientes) y al tratamiento 5 (sin agitación mecánica) con valores de 42,473.00 mg/kg y 47,798.00 mg/kg respectivamente.



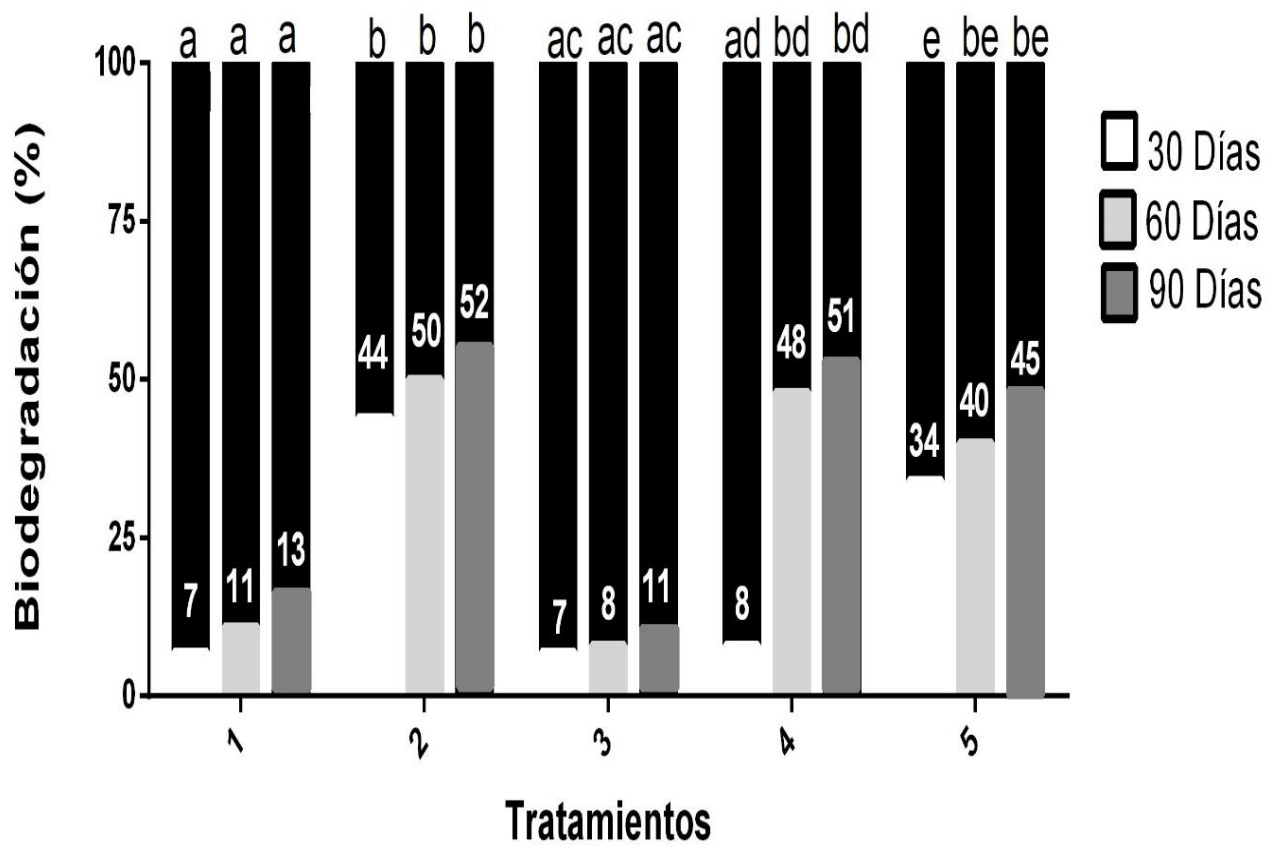
**Figura 9.** Valor promedio de la concentración de HTP en la biorremediación a los 90 días. Letras distintas en los tratamientos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). La grafica muestra el valor promedio ( $\bar{X}$ ) error estándar del promedio ( $\bar{X} \pm SE$ ) y la desviación estándar del promedio ( $\bar{X} \pm SD$ ).

## **6.8 Porcentajes de biodegradación de los tratamientos a los 30, 60 y 90 días**

En la figura 9, se observan los resultados de la biorremediación aplicados en los microcosmos al inicio, primer, segundo y tercer mes, a los 30 días el valor máximo de biodegradación de HTP fue en el tratamiento 2 (todos los estímulos) con 44% de biodegradación. Posteriormente, fue el tratamiento 5 (sin agitación), con un porcentaje de biodegradación del 34%. El valor mínimo de biodegradación de HTP se registró en el tratamiento 1 (sin estímulo), con valores similares a los tratamientos 3 (sin bacterias) y 4 (sin nutrientes) con porcentajes de biodegradación de 7% y 8% respectivamente.

Por otra parte, los resultados de los tratamientos aplicados en los microcosmos a los 60 días evidenciaron una máxima biodegradación de HTP en el tratamiento 2 (todos los estímulos) y en el tratamiento 4 (sin nutrientes) con un valor de 50% y 48%. El segundo mejor tratamiento fue el 5 (sin agitación) con porcentajes de biodegradación de HTP de 48% y 40% respectivamente. El valor mínimo de biodegradación de HTP fue en el tratamiento 3 (sin bacterias), con 8 % similar al tratamiento 1 (sin estímulos) con una biodegradación de 11%.

Finalmente, los resultados de los tratamientos aplicados en los microcosmos a los 90 días, indicaron los valores más altos en el tratamiento 2 (todos los estímulos) con 52% de biodegradación, así como en el tratamiento 4 (sin nutrientes) y en el tratamiento 5 (sin agitación) con porcentajes de biodegradación de HTP de 51% y 45% respectivamente. El valor mínimo obtenido fue en el tratamiento 3 (sin bacterias), con 11 % de remoción similar al tratamiento 1 (sin estímulos) con 13%.



**Figura 10.** Valor promedio de la biodegradación de HTP a los 30, 60 y 90 días. Letras distintas en los tratamientos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

## VII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de intervención se determinó la caracterización físico-química del sedimento del estero el Sacrificio, Tuxpan Veracruz., la clase textural fue categorizada como franco-arenoso, lo cual depende de la composición mineral, área superficial y el espacio entre los poros, los cuales influyen en el metabolismo e intercambio de gases de los microorganismos durante la biodegradación de suelos contaminados por petróleo (Kristensen *et al.*, 2010).

Los resultados de la clase textural están relacionados también con el nivel de profundidad, Cervantes (2017) reportó que a una profundidad de 40-45 cm el sedimento es de clase textural franco-arenosa. Esta composición textural favorece el proceso de biodegradación de los hidrocarburos totales, particularmente en los componentes saturados (García, Infante y López, 2012).

La eficacia de la bioaumentación con consorcios bacterianos dependerá de la composición textural del suelo, creciendo en mayores cantidades en suelos del tipo arcilla-arenosa en comparación de suelos franco-arenoso. Sin embargo, los suelos de clase textural franco-arenosa reducen los efectos tóxicos de los hidrocarburos en plantas de maíz (Borowik y Wyszowska, 2018).

Referente a la densidad aparente del sedimento fue considerado bajo, con un valor de  $1.08 \text{ g/cm}^3$  se sugiere que el valor alto de materia orgánica extremadamente rica influyó en el valor bajo obtenido. Debido a que se reporta que generalmente altos niveles de materia orgánica indican densidades

bajas (Hossain, Chen y Zhang, 2015). De manera que una baja densidad aparente genera una adecuada y óptima porosidad que facilita la aireación, el drenaje y almacenamiento de agua (Vallejo, 2013) factores que favorecen los mecanismos de biorremediación para el crecimiento de *Bacillus coagulans*. El valor de la densidad aparente depende de la estructura, expansión y contracción del suelo (Calvache, 2013). La densidad aparente es un factor clave para calcular los movimientos de humedad, los grados de formación de arcilla y la acumulación de los carbonatos en el suelo (Hernández, 2017).

Por otro lado, la conductividad eléctrica fue de 5,510  $\mu\text{S}$ , clasificado como muy fuertemente salino. Estos valores altos son influenciados por la cercanía a la playa Emiliano Zapata. Debido a que la concentración de sales en el mar puede, transportarse a los esteros aumentando la cantidad disuelta de sales en el agua y a su vez de los sedimentos. Por otra parte, *Bacillus coagulans* es una bacteria identificada como halófila, debido a que posee una enzima ornita amino transfera involucrada en la biosíntesis de prolina osmolito que brinda la tolerancia a concentraciones altas de sal (Yadav, *et al.*, 2007).

Otro parámetro fue la materia orgánica, el cual presentó en este trabajo, un valor de 14.04% lo que se considerada extremadamente rica. Los valores concuerdan con la cantidad de materia orgánica cerca de la zona de Emiliano Zapata (García, 2013). Así como los reportados por Lira (2014) quien señaló un valor 8.44% que se considera extremadamente rico. Se atribuye que las concentraciones elevadas de materia orgánica se ocasionan cuando ocurre un derrame, al

incrementarse el carbono orgánico, ya que el 75% del carbono del petróleo crudo es oxidable (Ortínez, Lema y García, 2003).

*Bacillus coagulans* fue bioaumentada en medio nutritivo con base en lo descrito por Fletcher (2000). Este tipo de medio enriquecido propicia el crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas (Vivas *et al.*, 2008). Por otro lado, la bioaumentación consiste en aumentar la población bacteriana, para posteriormente aplicarse los procesos de biorremediación, incrementando la eliminación de contaminantes de petróleo cuando estos son combinados con bioestimulación y el uso de bacterias autóctonas (Marín *et al.*, 2013).

Con referencia a *Bacillus coagulans*, se ha evaluado la degradación de alcanos de cadenas largas eficientemente, esto ha sido probado en experimentos con frascos Erlenmeyer con 40 mL de medio líquido Bushnell Haas, 2 mL de células en suspensión y 0.1% de cera de parafina mg/mL y un control sin inocular bacteriano, durante 14 días incubado a 37 °C alcanzando una biodegradación del 49% (Lu *et al.*, 2011).

También se ha reportado que el microorganismo puede crecer en un rango amplio de temperatura, ideal para ser aplicado en procesos de biorremediación de suelos contaminados por petróleo (Lu *et al.*, 2011). En el presente trabajo, se pudo observar que *Bacillus coagulans* fue capaz de biodegradar hidrocarburos de petróleo durante la estación invernal.

Otro de los factores que afectan la biodegradación son los nutrientes, estímulo importante para el proceso de biorremediación de hidrocarburos en sistemas acuáticos, la concentración de carbono aumenta y la disponibilidad de nitrógeno y fósforo se reducen convirtiéndose en un factor limitante para la degradación del petróleo (Atlas, 1985). Sobre las bases de las ideas expuestas, se consideró la bioestimulación con medio nutritivo como una fuente de nitrógeno y fósforo para el crecimiento óptimo de *Bacillus coagulans*.

Los microcosmos fueron estimulados con medio nutritivo, además de la agitación mecánica para favorecer la biodisponibilidad de los hidrocarburos y homogeneizar el medio de contacto entre el sedimento, medio nutritivo y *Bacillus coagulans*.

En el presente trabajo se demostró la importancia de la bioaugmentación bacteriana debido a que los valores más altos fueron los tratamientos que contenían *Bacillus coagulans*, y la bioestimulación con medio nutritivo y la agitación mecánica no impactaron notablemente a los tratamientos estimulados ya que a los 90 días se observó la versatilidad metabólica de *Bacillus coagulans*. Puesto que los tratamientos 4 (sin nutrientes) y 5 (sin agitación mecánica) no presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento 2 (todos los estímulos).

En la presente investigación, el proceso de biorremediación fue llevado a cabo en la época invernal, esto podría ser un factor limitante debido a que a bajas temperaturas la viscosidad del petróleo aumenta y la volatilidad de los

hidrocarburos de bajo peso molecular se reducen disminuyendo la tasa de biodegradación (Atlas, 1985). En cambio, el aumento de la temperatura favorece la degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Delille, Coulon y Pelletier, 2004). No obstante, *Bacillus coagulans* alcanzó una biodegradación del 52 %, lo que demuestra la versatilidad metabólica de la cepa bacteriana para adaptarse y metabolizar hidrocarburos de petróleo en la época invernal. Debido a que *Bacillus coagulans* es una bacteria mesófila facultativa capaz de crecer entre los 15 °C y 35 °C y en medio ácidos de pH 4.0- 4.5 (Gómez-Sánchez, 2007).

En el proceso de biorremediación de los microcosmos se monitorearon los parámetros de temperatura con un valor mínimo de 21 °C y un máximo de 26 °C. Por otra parte, el pH fue ligeramente ácido con un valor promedio de 5 a 6. Estos factores pueden favorecer o limitar la capacidad metabólica de la bacteria y su adaptabilidad con el cambio de posición de los ácidos grasos de la membrana celular (Gómez *et al.*, 2008). *Bacillus coagulans* produce ácido láctico y diversas enzimas (Konuray y Erginkaya, 2018). Sin embargo, en el presente proyecto el valor del pH fue de 5-6 considerado ligeramente ácido incluyendo el control, por ende, la formación de ácido láctico por parte de *Bacillus coagulans* no puede estar asociada al valor de pH. No obstante, la ligera acidificación del sedimento puede atribuirse a la contaminación por hidrocarburos ya que se ha reportado que los suelos contaminados por hidrocarburos sufren alteraciones en el pH (Castellanos, Isaza y Torres, 2015).



Durante la presente investigación se monitoreo el pH, en el proceso de biorremediación manteniéndose con un pH de 5-6. Aunque se recomienda un pH neutro para los procesos de biodegradación, no existen condiciones óptimas para todos los casos (Dibble y Bartha, 1979). Estudios previos reportan un rango de pH de 4 a 8 para el de crecimiento de *Bacillus coagulans*, aplicada en la biorremediación de suelo contaminado con alcanos (Lu, 2011). Coincidiendo con los valores registrados durante la biorremediación del sedimento contaminado, en el presente estudio.

Por otra parte, con respecto a la humedad en el proceso de biorremediación Bahmani, Ahmad y Ali (2018) mencionan que, para obtener una adecuada biorremediación de sedimento contaminado por hidrocarburos el porcentaje de humedad debe mantener un porcentaje óptimo del 60% para suelos arcilloso-arenoso, además el porcentaje de humedad es importante para el desarrollo y crecimiento de microorganismos en el suelo, ya que la humedad interviene en la difusión de los nutrientes dentro y fuera de la célula, sin embargo estudios reportan que con porcentajes de 16.06% continua siendo eficiente la biodegradación de HTP (Pathak, Bhatnagar y Jaroli, 2011). Para la presente investigación, los tratamientos más eficaces en la biorremediación de sedimento fueron el tratamiento 2 (todos los estímulos), el tratamiento 4 (sin nutrientes) y el tratamiento 5 (sin agitación), con un porcentaje de humedad de 15.25%, 25.88% y 26.58%, respectivamente. El aumento y el decremento del porcentaje de humedad está asociado al proceso de biodegradación bacteriana y no a los

efectos abióticos, ya que los tratamientos se desarrollaron en la oscuridad, bajo condiciones herméticas y controladas para evitar pérdidas por volatilización o foto oxidación (Jiménez y Guerra, 2016). El ligero incremento de humedad con respecto al valor inicial en el porcentaje de humedad en el tratamiento 2 (todos los estímulos) es un indicador de la presencia y actividad metabólica, sin embargo, se obtuvo el porcentaje más bajo de humedad con un 15.25%, respecto a los otros tratamientos. La baja humedad en el tratamiento 2 (todos los estímulos) probablemente se debió a la presencia de la agitación mecánica y adición de nutrientes, favoreciendo el incremento de la biodisponibilidad de agua para el metabolismo bacteriano. En cambio, los tratamientos 4 (sin nutrientes) y el tratamiento 5 (sin agitación), evidenciaron un porcentaje de humedad similar con un 25.88 % y 26.58 %, respectivamente la presencia de actividad metabólica de estos tratamientos bioaumentados, se aprecia al observarse un incremento con respecto al valor inicial de 8.2%. No obstante, es probable que la actividad metabólica de *Bacillus coagulans* en ausencia de nutrientes y agitación mecánica disminuyan la disponibilidad de agua para la biodegradación de hidrocarburos por lo que el porcentaje de humedad en el sedimento es mayor.

Los 5 tratamientos inducidos a diferentes estímulos durante la biorremediación del sedimento contaminado por hidrocarburos presentaron diferentes tasas de biodegradación final a los 90 días. El tratamiento con menor porcentaje de biodegradación fueron los tratamientos sin *Bacillus coagulans* tratamiento 1 y 3 con un porcentaje de biodegradación de 11% y 13% respectivamente. Las

biodegradaciones bajas se deben a la usencia de estimulación bacteriana en ambos tratamientos. Del mismo modo, en un proceso de biorremediación de suelo contaminado por hidrocarburos, se aplicó la bioaumentación a nivel de microcosmos, en los tratamientos que solo contenían el suelo contaminado sin bacterias se obtuvo una biodegradación de 18.70% para fenantreno y de 5.38% para pireno, con diferencias significativas ( $P < 0.001$ ), en los microcosmos bioaumentados donde se alcanzó una biodegradación de 70.29% y 55.54% respectivamente (Mangwani, Kumari y Das 2017).

En cambio, los mejores tratamientos fueron a los que se les aplicó *Bacillus coagulans* en el proceso de biorremediación de sedimento contaminado durante el primer, segundo y tercer mes, para el tratamiento 2, 4 y 5 con una biodegradación final de 52%, 51% y 45%. Aunque el valor más alto continuo en el tratamiento 2 (todos los estímulos) con bioaumentación, bioestimulación y agitación mecánica. Los porcentajes de biodegradación en el tratamiento 4 (sin nutrientes) y el tratamiento 5 (sin agitación) mostraron resultados semejantes al final en el tercer mes, reflejando la versatilidad metabólica de *Bacillus coagulans* para degradar hidrocarburos de cadenas largas, de suelos contaminados por petróleo aprovechando los hidrocarburos como la única fuente de carbono (Lu, 2011).

El tratamiento 4 (sin nutrientes) con una biodegradación del 51%, coincidió con el valor más alto reportado por Reyes (2017), atribuyéndose a la capacidad adaptativa de respuesta metabólica en el ambiente de *Bacillus coagulans* aun

cuando la acción de respuesta es más lenta en comparación de otras especies como *Ochrobactrum anthropi* siendo estadísticamente similar al tratamiento 2 (todos los estímulos), el valor obtenido en el tratamiento 4 se atribuye a que cuando las bacterias carecen de nutrientes degradan con mayor eficiencia el contaminante usándolo como fuente de carbono, para su supervivencia junto a la estimulación de la agitación mecánica son factores claves para lograr altos valores de biodegradación (Reyes, 2017).

Para el tratamiento 5 (sin agitación) no existieron diferencias significativas con respecto a los tratamientos 2 (todos los estímulos) y al tratamiento 4 (sin nutrientes) incrementando la biodegradación hasta el 45%. De manera similar en un proceso de biorremediación a nivel de microcosmos, se obtienen resultados eficaces en la biodegradación de los tratamientos con la adición de bioaumentación y sin agitación mecánica (Reyes, 2017).

Los tratamientos más eficaces en la biorremediación del sedimento contaminado de los microcosmos tuvieron bioestimulación. Demostrando la tendencia que poseen las bacterias hidrocarburohíticas de disminuir los hidrocarburos en comparación de los microcosmos sin bacterias, sin evidenciar cambios importantes de biodegradación (García, 2013). Como sucedió en el tratamiento 3 (sin bacterias ) contribuyendo el presente trabajo al uso de tecnologías con biorremediación bacteriana usando *Bacillus coagulans*, para la biorremediación de sedimento contaminado por hidrocarburos en hasta un 52% en tres meses.

Por otro lado, la capacidad hidrocarburoлита de *Bacillus coagulans* depende de parámetros como el pH, concentración del contaminante (Sivagamasundari y Jayakumar,2017). El tratamiento 2 (todos los estímulos) obtuvo el mayor porcentaje de biodegradación a los 30 días, con un valor de biodegradación de 44%.

La combinación de la bioaumentación y bioestimulación mejoran notablemente la tasa de biodegradación acelerando el proceso en comparación de solo usar la atenuación natural (Semboing, 2016). Aunque a los 60 días los resultados indicaron los valores más altos en el tratamiento 2 (todos los estímulos), tratamientos 4 (sin nutrientes) y 5 (sin agitación) con una biodegradación de 50% de 48% y 40%. Las tasas de biodegradación de HTP en el presente trabajo fueron más bajas con otras reportadas en la literatura, a pesar de ello son consideradas satisfactorias, dada que la bacteria fue capaz de realizar el proceso de degradación con concentraciones altas de HTP iniciales de 87,482.96.00 mg/kg.

Por otro lado, a los 90 días se mantuvieron los valores más altos en el tratamiento 2 (todos los estímulos), tratamiento 4 (sin nutriente) y tratamiento 5 (sin agitación), sin mostrar cambios considerables en comparación del mes anterior con valores de biodegradación de 52%, 51% y 45%. Se comprobó la capacidad hidrocarburoлита de *Bacillus coagulans* en la biodegradación de hidrocarburos en sedimento contaminado con un 52% de biodegradación la bioaumentación.

De acuerdo a la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 la concentración inicial de hidrocarburos en el sedimento fue de 87,482.96.00 mg/kg categorizado como una fracción pesada, ya que sobrepasa el valor de los límites máximos permisibles de 3,000 mg/kg para uso de suelo agrícola, actividad desempeñada principalmente en la zona. Con la aplicación de la biorremediación usando *Bacillus coagulans* la concentración final fue de 41,351.00 mg/kg. Logrando reducir la contaminación por hidrocarburos a más de la mitad de la concentración inicial.

## VIII. CONCLUSIONES Y APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO

### 8.1 Conclusiones

- Los parámetros físico-químicos del sedimento contaminado por hidrocarburos del estero el Sacrificio Tuxpan Veracruz, evidenciaron una clase textural franco arenosa, densidad aparente baja de 1.08 g/cm<sup>3</sup>, una salinidad de 5,510 µS siendo fuertemente salina y la materia orgánica fue extremadamente rica con un valor de 14.04 %. El pH fue ligeramente ácido con un valor entre 5 y 6, y una temperatura promedio de 24 °C.
- Los mejores resultados se obtuvieron de los tratamientos bioaumentados siendo el tratamiento 2 con bioestimulación y agitación mecánica, junto al tratamiento 4 sin nutrientes y al tratamiento 5 sin agitación mecánica con una biodegradación de 52% 51% y 45% durante 90 días.
- La capacidad hidrocarburofítica de *Bacillus coagulans* es satisfactoria con bioaumentación, sin nutrientes y agitación mecánica.
- De acuerdo a la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 la muestra de sedimento fue una fracción pesada con una concentración inicial de Hidrocarburo Total de petróleo de 87,482.96 mg/kg. se alcanzó a disminuir la concentración final hasta un 41,351.00 mg/kg.

## 8.2 Aplicación práctica del trabajo

El proceso de la biorremediación de sedimento contaminado del ejido el Sacrificio Tuxpan, Veracruz., a nivel microcosmos usando *Bacillus coagulans*, fue satisfactorio con un 52% de biodegradación con la bioaumentación durante 90 días en la estación invernal. Por otra parte, la ausencia de nutrientes y agitación mecánica también mostraron resultados favorecedores. Lo que contribuye a confirmar la viabilidad de la aplicación de *Bacillus coagulans* para el tratamiento de sedimentos contaminado por petróleo, además representa una tecnología amigable con el ambiente a menor costo en comparación de los tratamientos convencionales.

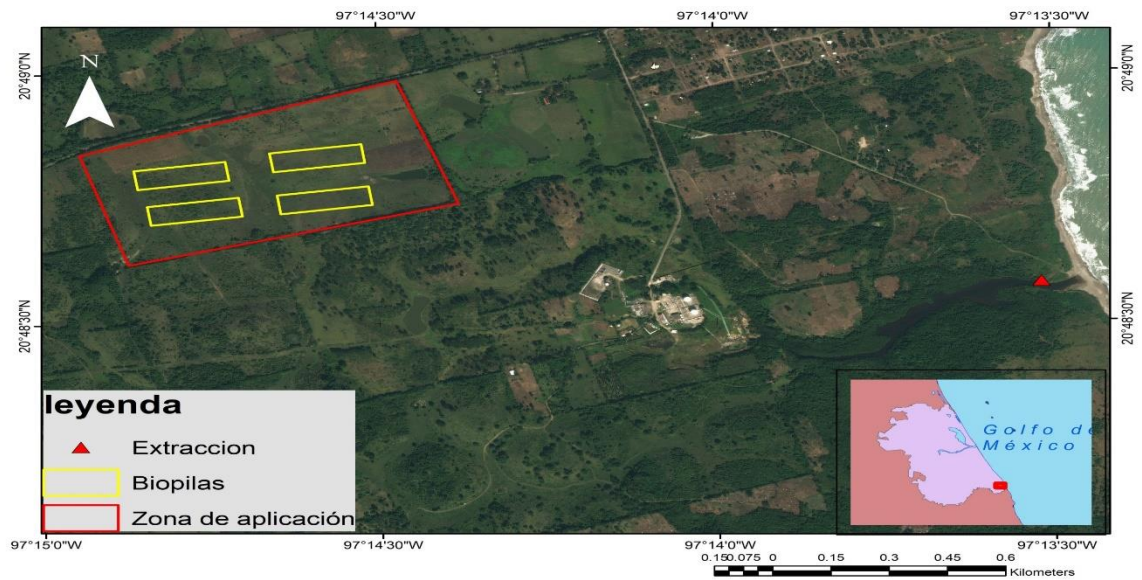
Como parte del proyecto de biorremediación del sedimento contaminado en el ejido el Sacrificio, una técnica eficaz para llevarse a cabo es el uso de biopilas con la bioaumentación de *Bacillus coagulans*. De manera que se deberá realizar una evaluación de impacto ambiental, estudio de costos y factibilidad.

Posteriormente se procederá a realizar la elección del sitio, ya que el uso de biopilas demanda grandes espacios, asegurando que el lugar de establecimiento sea impermeabilizado, así como la realización del polígono para la extracción y retiro del material.

Se recomienda que el proceso de biorremediación se aplicado en la estación de verano, sin la adición de nutrientes y agitación mecánica. Es importante considerar evitar el almacenamiento de lixiviados en la base de la biopila.



Una vez instalado la biopila los monitoreos se realizarán al inicio del proyecto y semanalmente para la medición de hidrocarburos totales de petróleo, pH, temperatura, humedad y la presencia bacteriana, así como la caracterización físico química de sedimentos durante los 6 meses que durará el proceso de biorremediación. También se recomienda evaluar los niveles de toxicidad de la biodegradación de los hidrocarburos de petróleo del sedimento mensualmente.



**Figura 14.** Localización de la aplicación en campo del proceso de biorremediación en el ejido el Sacrificio Tuxpan, Veracruz.

## IX. BIBLIOGRAFIA

1. Abha, S. y Singh, C. S. 2012. Hydrocarbon Pollution: Effects on Living Organisms, Remediation of Contaminated Environments, and Effects of Heavy Metals Co-Contamination on Bioremediation. En: Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites (187-206). Croatia: INTECHOPEN.
2. Aguilera, F., Méndez, J., y Laffon, B. 2010. Review on the effects of exposure to spilled oils on human health. *Journal of Applied Toxicology*, 30, 291-301.
3. Allison, L. E., Brown, J. W., Hayward, H. E., Richards, L. A., Bernstein, L., Fireman, M., y Reeve, R. C. 1962. Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos (No. S595. D5218 1980.). INIA.
4. Asadirad M. H., Mazaheri Assadi A. M., Rashedi H. y T. Nejadiattari. 2016. Effects of Indigenous Microbial Consortium in Crude Oil Degradation: A Microcosm Experiment. *International Journal of Environmental Research*, 10, 491-498.
5. Arbeli Z. 2009. Biodegradación de Compuestos Orgánicos persistentes (COP): I. El Caso de los Bifenilospoliclorados (PCB). *Acta Biológica Colombiana*, 14, 57-88.
6. Arrieta, M. C., Leskiw, B. K., y Kaufman, W. R. 2006. Antimicrobial activity in the egg wax of the African cattle tick *Amblyomma hebraeum* ( Acari : Ixodidae ). *Springer Science*, 39, 297–313.
7. Alharbi O. M.L., Basheer A. A., Khattab R. A. y Ali. I. 2018. Health and environmental effects of persistent organic pollutants. *Journal of Molecular Liquids*, 263, 442-453.

8. Aulitto M., Fusco S., Bartolucci S., Franzén C. J. y Contursi P. 2017. *Bacillus coagulans* MA-13: a promising thermophilic and cellulolytic strain for the production of lactic acid from lignocellulosic hydrolysate. *Biotechnology for Biofuels*, 10, 1-15.
9. AIBMR Life Sciences. 2016. Notice to US Food and Drug Administration that *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 is Generally Recognized as Safe for use in Non-exempt Term Infant Formula. Seattle, Washington: Ganeden Biotech, Inc.
10. Barón A.C. 2014. Análisis físico-químicos de suelos y sedimentos. Escuela Nacional de Antropología e Historia. Ciudad de México. 25 pp.
11. Burton G. A. y Johnston E. L. 2010. Assessing contaminated sediments in the context of multiple stressors. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 29, 2625-2643.
12. Bento M. F., Camargo, A. O., y Okeke, B. C. 2004. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation , biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*. 96, 1049–1055.
13. Borowik, A. y Wyszowska, J. 2018. Bioaugmentation of soil contaminated with diesel oil. *Journal of Elementology*, 23, 1161-1178.
14. Calvache M. U. 2013. Densidad Real de las Partículas. pp 15. En: *Nutrientes de Plantas* Universidad del Ecuador.
15. Camacho, M., Boada, L. D., Orós, J., Calabuig, P., Zumbado, M., y Luzardo, O. P. 2012. Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in plasma of Eastern Atlantic juvenile and adult nesting loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *Marine Pollution Bulletin*, 64, 1974-1980.

16. Castellanos, M. L., Isaza, R. J., y Torres, J. M., 2015. Evaluación de los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) sobre suelos urbanos en Maicao Colombia. *Revista colombiana química*, 44 (3) 11-7.
17. Chen, H., Diao, X., Wang, H., y Zhou, H. 2018. An integrated metabolomic and proteomic study of toxic effects of Benzo[a]pyrene on gills of the pearl oyster *Pinctada martensii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156, 330-336.
18. Cervantes, A. A. S., 2017. Evaluación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) de sedimentos contaminados del estero Emiliano Zapata, Tuxpan, Veracruz. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas Tuxpan, Veracruz, México.
19. Da Silva, M. L. B. y Alvarez J. J. P. 2010. Bioaugmentation. *Research Gate*. 4 (356), 4532-4544
20. De Souza, D. T., Benetti, C. N., Sauer, E., Paula, V. C., Freitas, A. M., y Tiburtius, E. R. 2018. Decontamination of pure and ethanol/gasoline contaminated soil by Fenton-Like Process. *Water, Air, y Soil Pollution*, 229(4), 105.
21. Dominic, Jefferson 2014. Marine pollution: types, environmental significance and management strategies. Nova Science. New York. 1-20 pp.
22. El-Sheshtawy, H. S., y Ahmed, W. 2017. Bioremediation of crude oil by *Bacillus licheniformis* in the presence of different concentration nanoparticles and produced biosurfactant. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14(8), 1603-1614 .
23. EPA. 1996. Method 3540C. Soxhlet extraction. United States Environmental Protection Agency, SW-846 Manual. Washington, DC: Government Printing Office. 1-8.

24. Fao-UNESCO, 19974. Soil map of the word, 1:,5,000,000. Vol. 1 Leyend U.N.E.S.C.O. Paris, France.
25. Fletcher, R. 2000. Practical Considerations during Biorremediation. University of Pittsburg. Pittsburg Pennsylvania, Estados Unidos 39-51.
26. Fernández, L. L. C., N. G. Rojas, T. G. Roldam, M. E: Ramírez, H. G. Zegarra, R. Uribe, R. J. Reyes, D. Flores y J. M. Arce. 2006. Hidrocarburos totales del petróleo (HTPs). 100-115. En: Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Ed. Instituto Mexicano del Petróleo, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. Ciudad de México.
27. Fagbeni. O. k., y Isaac, S. A. 2017. Chromosomal and plasmid mediated degradation of crude oil by *Bacillus coagulans*, *Citrobacter koseri* and *Serratia ficaria* isolated from the soil. African Journal of Biotechnology .16(21), 1242–1253.
28. López Ritas, J. y López Melida, J. 1990. El diagnóstico de suelos y plantas. Métodos de campo y laboratorio. Mundi-Prensa 4a Ed. Madrid. 363 pp.
29. Spaargaren, O. C., y Deckers, J. 1998. The world reference base for soil resources. In Soils of Tropical Forest Ecosystems (pp. 21-28). Springer, Berlin, Heidelberg .
30. Gao, W., Yin, X., Mi, T., Zhang, Y., Lin, F., Han, B. & Zheng, L. 2018. Microbial diversity and ecotoxicity of sediments 3 years after the Jiaozhou Bay oil spill. Amb Express, 8(1), 79.
31. García, M. G., Infante, C., y López, L. 2012. Biodegradación de un crudo mediano en suelos de diferente textura con y sin agente estructurante. Bioagro, 24(2), 93-102.

32. Gong, X., Xiao, L., Zhao, Z., Li, Q., Feng, F., Zhang, L., y Deng, Z. 2018. Spatial variation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments from rivers in hilly regions of Southern China in the wet and dry seasons. *Ecotoxicology and environmental safety*, 156, 322-329.
33. Grenni, P., Falconi, F., y Caracciolo, A. B. 2012. Microcosm experiments for evaluating natural bioremediation of contaminated ecosystems. *Chemical Engineering*, 28, 7-12.
34. García, I. 2013. Biorremediación en microcosmos de sedimentos contaminados por hidrocarburos mediante la técnica de bioaumentación. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Tuxpan, Veracruz.
35. Haritash, A. K., y Kaushik, C. P. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ( PAHs ): A review. *Journal of hazardous materials* . 169, 1–15.
36. Heydari., y Riyahi, A. (2014). *Ecotoxicology and Environmental Safety* Distribution patterns of PAHs in different tissues of annulated sea snake (*Hydrophis cyanocinctus*) and short sea snake (*Lapemis curtus*) from the Hara Protected Area on the North Coast of the Persian. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 109: 116–123.
37. Hemond, H. and Fechner-Levy, E. (2015). *Chemical fate and transport in the environment*. 3rd ed. Elsevier Cambridge, Massachusetts. 220-225 pp.
38. Hossain, M. F., Chen, W., y Zhang, Y. 2015. Bulk density of mineral and organic soils in the Canada's arctic and sub-arctic. *Information processing in agriculture*, 2(3-4), 183-190.

39. Hernández, C. G. 2016. Aplicación de biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales en sedimentos. Tesis de Especialización. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Tuxpan, Veracruz, México.
40. Jackson, M. L., y Martínez, J. B. 1964. Análisis químico de suelos (No. 631.41 J335 1982.). Barcelona: Omega.
41. Jiménez, M. V., Benítez, M. S. M., de Muñoz, F. L. G. G., & Brito, R. S. 2008. Identificación y caracterización de una bacteria degradadora de parafinas. Investigación Universitaria Multidisciplinaria: Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar, (7), 2.
42. Jiménez H. V., Guerra S. R., 2016. Obtención de un medio enriquecido para hacer más eficiente la biodisponibilidad de los hidrocarburos intemperizados en un suelo costero. Revista Internacional contaminación ambiental, 32 (4), 413–424.
43. Kessabi, K., Annabi, A., Hassine, A. I. H., Bazin, I., Mnif, W., Said, K., y Messaoudi, I. 2013. Possible chemical causes of skeletal deformities in natural populations of *Aphanius fasciatus* collected from the Tunisian coast. Chemosphere, 90(11), 2683-2689.
44. Kristensen, A. H., Henriksen, K., Mortensen, L., Scow, K. M., y Moldrup, P. 2010. Soil Physical Constraints on Intrinsic Biodegradation of Petroleum Vapors in a Layered Subsurface. Vadose Zone Journal, 9(1), 137-147.
45. Khuman, S. N., Chakraborty, P., Cincinelli, A., Snow, D., y Kumar, B. 2018. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface waters and riverine sediments of the Hooghly and Brahmaputra Rivers in the Eastern and Northeastern India. Science of the Total Environment, 636, 751-760.

46. Leahy, J. G., y Colwell, R. R. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbial Reviews* .54(3), 305–315.
47. Lee, D. W., Lee, H., Kwon, B. O., Khim, J. S., Yim, U. H., Kim, B. S., y Kim, J. J. 2018. Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. *Environmental pollution*, 241, 254-264 .
48. Lira, R. K. A. 2014. Caracterización bioquímica y molecular de bacterias hidrocarburoclíticas procedentes del estero aledaño al ejido Emiliano Zapata, Tuxpan, Ver. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Tuxpan, Veracruz, México.
49. López, E., Cisneros, S., y Ochoa J. 2016. Procesos de bioestimulación para la remediación de suelos agrícolas contaminados con tebuconazol y  $\lambda$ -cicalotrina. *Revista de simulación y Laboratorio*. 3 (18), 1-9.
50. Lu, M., Zhang, Z., Wei, X., y Sun, S. 2011. Isolation and characterization of long-chain n-alkane-degrading *Bacillus coagulans* from contaminated soil. *Petroleum Science and Technology*, 29(18), 1895-1905.
51. Marulanda Arango, J. M. 2016. Variación de la densidad aparente y la concentración de carbono en el suelo a lo largo de un gradiente de niveles de agua en un humedal de alta montaña (Doctoral dissertation, Corporación Universitaria Lasallista).
52. Mason, M. (2014). *Transparency in global environmental governance*. Cambridge. MIT Press . Cambridge. pp. 1-10
53. Nagata Y., Tabata M., OhTsubo Y., y Tsuda M. 2016.5.1.2. Biodegradation of Organochlorine Pesticides. In *Manual of Environmental Microbiology* 4nd edn. Ed. ASM, Washington.



54. 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. pp.16.
55. Nordberg, M., Duffus, J. H., y Templeton, D. M. 2010. Explanatory dictionary of key terms in toxicology: Part II (IUPAC Recommendations 2010). *Pure and Applied Chemistry*, 82(3), 679-751.
56. Olivas, E. 2012. Manual de Prácticas: Laboratorio de Microbiología. Academia de Microbiología y Parasitología. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Instituto de Ciencias Biomédicas. Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez. México, 75.
57. Peláez, A. I., Lores, I., Sotres, A., Mendez-Garcia, C., Fernandez-Velarde, C., Santos, J. A., y Sanchez, J. 2013. Design and field-scale implementation of an “on site” bioremediation treatment in PAH-polluted soil. *Environmental pollution*, 181, 190-199.
58. Ranganath, S. B., Sharmila, T., y Balasubramanyam, B. V. 2015. Optimisation of media for the growth and production of bacteriocin from *Bacillus coagulans*. *International Journal of Innovative Research in Technology, Science Engineering* .1:109–114.
59. Ruiz-Marín, A., Zavala-Loria, J. C., Canedo-Lopez, Y., y Cordova-Quiroz, A. V. 2013. Aislamiento de bacterias tropicales en suelo de mangle contaminado por hidrocarburos: Biorremediación por atenuación natural y bioaumentación. *Revista mexicana de ingeniería química*, 12(3), 553-560.
60. Sarkar, J., Kazy, S. K., Gupta, A., y Dutta, A. 2016. Biostimulation of Indigenous Microbial Community for Bioremediation of Petroleum Refinery Sludge. *Frontiers in Microbiology*. 7 (1407) 1-20.

61. Sereshk, Z. H., y Bakhtiari, A. R. 2014. Distribution patterns of PAHs in different tissues of annulated sea snake (*Hydrophis cyanocinctus*) and short sea snake (*Lapemis curtus*) from the Hara Protected Area on the North Coast of the Persian Gulf, Iran. *Ecotoxicology and environmental safety*, 109, 116-123.
62. Sivagamasundari, T., y Jayakumar, N. (2017). Optimization of Diesel oil degrading Bacterial strains at various culture parameters. *International Journal of Research and Development in Pharmacy & Life Science*, 6, 2840–2844.
63. Tyagi, M., M. R. da Fonseca y C. R. de Carvalho 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22, 231–241.
64. Vallejo Q. E. V., 2013. Importancia y utilidad de la evaluación de la calidad de suelos mediante el componente microbiano : experiencias en sistemas silvopastoriles. *Colombia Forestal*, 16 (1), 83–99.
65. Yadav, V. K., Yadav, N., y Shono, M., 2007. Cloning of Salinity Tolerant Gene from a Soil-Borne Bacterium and its Characterization. *Journal Plant y Biotechnhnology*, 16 (2), 101-107.
66. Yao, L., Teng, Y., Luo, Y., Christie, P., Ma, W., Liu, F., y Li, Z. 2015. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Trichoderma reesei* FS10-C and effect of bioaugmentation on an aged PAH-contaminated soil. *Bioremediation Journal*, 19(1), 9-17.
67. Wokoma, O. A. F. 2014. Levels of Total Hydrocarbon In Water and Sediment of a Polluted Tidal Creek, Bonny River, Niger Delta, Nigeria. *International Journal of Science, Pharmacy and Technology Research*, 3(12), 351-354.
68. Xiong, J., Li, G., y An, T. 2016. The microbial degradation of 2 , 4 , 6-tribromophenol (TBP) in water / sediments interface : Investigating

bioaugmentation using *Bacillus*. Sp. GZT, *Science of the Total Environment*, 9 (17), 2-8.

69. Xiong, J., An, T., Li, G. y Peng, P. 2017. Accelerated biodegradation of BPA in water-sediment microcosms with *Bacillus* sp. GZB and the associated bacterial community structure, *Chemosphere*, 05(163) 120-126.