UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

ZONA: POZA RICA – TUXPAN

Maestría en Ciencias del Ambiente

TRABAJO DE INTERVENCIÓN

“Biorremediación de sedimentos contaminados por hidrocarburos empleando la bacteria *Ochrobactrum anthropi* a diferentes técnicas de estimulación”

PRESENTA:

Biól. Vicky Estefany Reyes Solís

Director:

Dr. Pablo San Martin del Ángel

Asesora:

Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera

Tuxpan, Veracruz Febrero, 2021

Tuxpan de Rodríguez Cano Veracruz, marzo de 2020

El presente trabajo de intervención titulado: **Biorremediación de sedimentos contaminados por hidrocarburos empleando la bacteria *Ochrobactrum anthropi* a diferentes técnicas de estimulación**, realizado por la C. Lic. en Biología Vicky Estefany Reyes Solís, bajo la dirección del Dr. Pablo San Martín del Ángel y la asesoría de la Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera, ha sido revisado y aprobado como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

Dr. Pablo San Martín del Ángel

DIRECTOR

Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera

ASESOR

Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

Revisión del Trabajo de Intervención de la alumna: **Vicky Estefany Reyes Solís**

JURADO EXAMINADOR

NOMBRE	FECHA	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Juan Manuel Pech Canche	28-02-2020	Aprobado	
Dr. Leandro Chaires Martínez	28/02/20	Aprobado	
Dra. Rebeca Rojas Ronquillo	28/02/2020	Aprobado	

En la presente revisión se acordó que el Trabajo de Intervención titulado "**Biorremediación de sedimentos contaminados por hidrocarburos empleando la bacteria *Ochrobactrum anthropi* a diferentes técnicas de estimulación**" que presenta el sustentante para obtener el Grado de Maestro, está terminado por lo que puede proceder a su inmediata impresión.

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mi familia, principalmente a mi madre Virginia Solís Marcial quién incansablemente me ha brindado su apoyo, confianza y amor. Mis hermanos, Lic. Karina Mariel Reyes Solís, Lic. Mildred Janel Reyes Solís, Isis Yarem Reyes Solís, Mayrin Yoleth Reyes Solís y José Luis Reyes Solís por su apoyo incondicional y creer en mí en todo momento, por todas las muestras de cariño que de cierta manera me han ayudado a salir adelante, a Nicky por continuar alegrando mis días.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgar la beca durante el periodo del posgrado Maestría en Ciencias del Ambiente y para el desarrollo del proyecto de intervención.

A mi máxima casa de estudios la Universidad Veracruzana por el espacio brindado para el desarrollo de mi formación profesional.

Al Dr. Pablo San Martín del Ángel y la Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera por dirigir y asesorarme durante la realización de este proyecto, por su tiempo, paciencia y confianza en mi trabajo, además de todas las enseñanzas, consejos, amistad y apoyo brindado.

A la Comisión Revisora, Dr. Juan Manuel Pech Canché, Dra. Rebeca Rojas Ronquillo y Dr. Leandro Chaires Martínez, por sus observaciones y críticas constructivas en el mejoramiento del trabajo de intervención.

A la Ing. Rocío Rodríguez Cabrero por su apoyo para el análisis fisicoquímico del sedimento en el Laboratorio de suelos y a la Dra. Diana Laura Díaz Inocencio por permitirme el uso del material y equipo del laboratorio de Bromatología Veterinaria.

Al laboratorio de Biotecnología Ambiental por aceptarme para continuar siendo parte del equipo de trabajo y facilitarme el material y equipo para los análisis del presente proyecto. Además de brindarme la oportunidad de conocer y compartir aprendizajes con mis compañeros, Biól. Sharon Azareel Cervantes Angulo, Biól. Zayda Patricia Navarrete Sánchez, Biól. Yolanda Hernández de la Cruz, Biól. Josefina, M.C. Dulce Maripaz Hernández Mendoza, Ing. Irving Vidal, Biól. Néstor Romero García y Biól. Shayra Yaritza Islas Arenas, por su amistad, apoyo y compañía que sin duda hicieron de esta experiencia una bonita y amena estancia.

DEDICATORIA

A los amores de mi vida:

A mi mamá

Porque en ella encuentro al mayor ejemplo de fortaleza y nobleza.

Porque a pesar de las adversidades siempre es alegre y bondadosa.

Porque siempre ha sabido sacarme adelante y creer en mí.

Por todos esos sacrificios que ha hecho para que pudiera alcanzar mi meta.

Por ser el mejor ejemplo de mujer y de persona.

Y simplemente por ser la mejor.

A mis hermanos

Porque al tenerlos tan unidos como siempre, me muestran las verdaderas riquezas de la vida.

Porque tanto los mayores como los menores me han demostrado que se puede luchar con determinación ante cualquier adversidad.

Porque siempre han creído en mí y me han alentado a perseguir cada una de mis metas.

Así como también me han regalado la dicha de ser tía de dos hermosos niños, Alexander y Gael a los que amo con mi vida.

Estoy tan orgullosa de que Dios me haya dado una familia como ustedes, pues fueron el pilar más importante para la realización de este proyecto tanto en inspiración como fortaleza para alcanzar mi meta y lograr el éxito.

Los amo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN 11

II. ANTECEDENTES 14

2.1.- La industria del petróleo en México 14

2.2.- Hidrocarburos 15

2.3.- Impacto ambiental de los hidrocarburos 16

2.4.- Hidrocarburos en sedimento 18

2.5.- Legislación ambiental 19

2.6.- Tecnologías de remediación 19

2.7.- Biorremediación 20

2.8.- *Ochrobactrum anthropi* 21

2.9.- Procesos de biorremediación de hidrocarburos 22

III. OBJETIVOS 29

3.1.- Objetivo general 29

3.2.- Objetivos particulares 29

IV. ÁREA DE ESTUDIO 30

4.1.- Localización del punto de muestreo 30

4.2.- Fase experimental del proceso de biorremediación 31

V. MATERIAL Y MÉTODOS 32

5.1.- Toma de muestras 32

5.2.- Análisis fisicoquímicos del sedimento 32

5.3.- Preparación del sedimento para la extracción de hidrocarburos 33

5.4.- Determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo 33

5.5.- Medición del crecimiento bacteriano por espectrofotometría 34

5.6.- Producción de la biomasa bacteriana 34

5.7.- Diseño experimental y tratamientos 35

5.8.- Monitoreo de parámetros fisicoquímicos en el proceso de biorremediación 36

5.9.- Análisis estadísticos 36

VI. RESULTADOS 37
6.1.- Análisis fisicoquímico del sedimento 37
6.2.- Monitoreo de pH durante el proceso de biorremediación 38
6.3.- Determinación del porcentaje de humedad 39
6.4.- Concentración inicial de HTP en sedimento 40
6.5.- Hidrocarburos Totales del Petróleo a los 30 días 41
6.6.- Hidrocarburos Totales del Petróleo a los 60 días 42
6.7.- Hidrocarburos Totales del Petróleo a los 90 días 44
VII. DISCUSIÓN 48
VIII. CONCLUSIONES Y APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO 54
8.1.- Conclusiones 54
8.2.- Aplicación práctica del trabajo 55
IX. BIBLIOGRAFÍA 58
X. ANEXOS 68
10.1.- Textura por medio del hidrómetro de Bouyoucos 68
10.2.- Densidad aparente por el método de la probeta 70
10.3.- Determinación del pH y conductividad eléctrica por la técnica del multiparámetro. 71
10.4.- Determinación de la materia orgánica por la técnica de Walkley y Black 72
10.5.- Determinación de carbonatos por el método valorimétrico 74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Área de estudio……..…30

Figura 2. Diseño experimental…….36

Figura 3. Registro de pH de los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5 durante las 13 semanas del proceso de biorremediación……39

Figura 4. Valores del porcentaje de humedad en los tratamientos, durante la fase experimental……....40

Figura 5. Valores promedio de la concentración de HTP a los 30 días del proceso de biorremediación…….41

Figura 6. Valores promedio de la biodegradación de HTP a los 30 días del proceso de biorremediación…….42

Figura 7. Valores promedio de la concentración de HTP a los 60 días del proceso de biorremediación…….43

Figura 8. Valores promedio de la biodegradación de HTP a los 60 días del proceso de biorremediación…….44

Figura 9. Valores promedio de la concentración de HTP a los 90 días del proceso de biorremediación…….45

Figura 10. Valores promedio de la biodegradación de HTP a los 90 días del proceso de biorremediación…….46

Figura 11. Valores promedio de la biodegradación de HTP a los 30,60 y 90 días del proceso de biorremediación……..…47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis físicos del sedimento del estero Emiliano Zapata Tuxpan, Ver……37

Cuadro 2. Análisis Químicos del sedimento del estero Emiliano Zapata Tuxpan, Ver……...…38

Biorremediación de sedimentos contaminados por hidrocarburos empleando la bacteria *Ochrobactrum anthropi* a diferentes técnicas de estimulación

RESUMEN

La creciente demanda mundial de hidrocarburos representa una gran preocupación a nivel ambiental, debido a la contaminación de sedimentos costeros, por ende se han desarrollado diversos procesos *in situ* y *ex situ* para la recuperación de estos sitios afectados. Por lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar un proceso de biorremediación *ex situ*, utilizando las técnicas de bioaumentación, bioestimulación y bioventeo, aplicando la cepa bacteriana *Ochrobactrum anthropi* en sedimentos contaminados del estero adyacente a la playa Emiliano Zapata ejido el Sacrificio, Tuxpan, Veracruz. Para el desarrollo del experimento se cultivó la biomasa bacteriana de la cepa seleccionada en caldo de soya tripticaseína., el proceso constó de cinco tratamientos todos con sedimento contaminado, medio enriquecedor de bacterias, inóculo bacteriano y aireación, variando para cada tratamiento. Al inicio del proceso los sedimentos contaminados tenían un valor inicial de HTP de 103, 714.47 mg/kg, el experimento tuvo una duración de 90 días, durante los cuales se monitorearon temperatura, pH (semanalmente) y humedad (mensualmente). La mayor degradación de HTP para los cinco tratamientos se obtuvo en los primeros 30 días del proceso de biorremediación. Al finalizar el experimento la degradación significativamente mayor se obtuvo en el tratamiento T1 con un valor de 36,372.74 mg/kg de HTP con un 64.93 % de remoción, mientras que la menor degradación se presentó en el tratamiento T2 con un valor de 94,062.82 mg/kg de HTP y con 13.06 % de remoción. Con los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye que la mayor tasa de degradación se obtuvo de los tratamientos con bioaumentación bacteriana mostrando que la capacidad hidrocarburolítica de la cepa *Ochrobactrum anthropi* es mejor con bioestimulación y bioventeo.

Palabras clave: Bioaumentación, Bioestimulación, Bioventeo, Degradación.

I. INTRODUCCIÓN

La industria petrolera contribuye de manera importante a la economía de México, razón por la cual las actividades de exploración, explotación, refinación, transporte y consumo de productos del petróleo se ven incrementados cada día (Alemán, 2009). Puesto que su empleo se ha constituido en un propulsor importante para el desarrollo de la humanidad, no obstante, ha dado paso a diferentes eventos catastróficos a nivel ambiental por la contaminación de ecosistemas terrestres y acuáticos producto del derrame de estos compuestos de petróleo y sus derivados, ocasionando uno de los problemas más serios en materia de contaminación, donde el derrame de hidrocarburos derivados del petróleo ocupa uno de los primeros lugares (Martínez-Prado *et al.,* 2011; Ñústez *et al.,* 2014), debido a que estos compuestos se acumulan en el suelo y ecosistemas marinos, siendo responsables de su deterioro (Alemán, *op cit*). Las fuentes por las cuales los hidrocarburos son introducidos al ambiente marino son numerosas (Botello, 2005). Su presencia se debe, fundamentalmente, a las actividades antropogénicas; sobre todo a las relacionadas con la combustión de cualquier tipo de materia orgánica y/o el transporte y utilización de combustibles fósiles (Viñas *et al.,* 2012).

Por todo lo anterior, la contaminación por petróleo, está considerada como uno de los principales problemas ambientales en la zona costera del Pacifico y Golfo de México, la cual se incrementa día con día debido al uso del petróleo como el principal recurso energético del planeta (Botello, *op cit*). Es importante señalar que además del impacto ambiental negativo, los derrames de hidrocarburos generan impactos de tipo económico, social y de salud pública en las zonas cercanas al lugar

afectado, puesto que presentan un alto grado de persistencia y toxicidad incluso aunque se encuentre en bajas concentraciones (Ñústez *et al*., 2014; Sadeghi *et al*., 2016). Estos compuestos pueden ser mutagénicos y carcinógenos para muchos organismos vivos y por ello, se han desarrollado diferentes metodologías para remediar dichos impactos; sin embargo, los costos asociados a estas técnicas las vuelven difíciles de implementar (Ñústez *et al*., 2014; Fonti *et al*., 2015; Guttman *et al*., 2016; Sadeghi *et al*., 2016).

No obstante en los últimos años, han surgido diversas tecnologías para la gestión de los residuos de petróleo y efluentes contaminados con hidrocarburos (Farag y Soliman, 2011). Tratamientos tanto físicos y químicos, como biológicos, siendo estos últimos sostenibles y económicos cuando se trata de limpiar las zonas afectadas por hidrocarburos (Petro y Mercado, 2014). Así, la biorremediación surge como una alternativa ecotecnológica para reducir o mitigar el daño causado en el suelo y agua por los derrames de estos compuestos (Ñústez, *op cit*), ya que es una técnica de recuperación de sitios impactados que utiliza tecnologías las cuales estimulan la biodegradación del contaminante por procesos biológicos (Pucci *et al*., 2010), puesto que emplea una serie de reacciones bioquímicas por una población o consorcios de microorganismos inoculados en la zona contaminada, para convertir la estructura de los hidrocarburos en componentes menos tóxicos (Benavides *et al*., 2006). Además de que puede emplear organismos autóctonos del sitio contaminado o de otros sitios (exógenos), puede realizarse *in situ* o *ex situ*, en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno) (Martínez-Prado *et al.,* 2011).

Por otra parte, las comunidades microbianas son muy importantes en los procesos ambientales marinos, así como su capacidad para responder a la contaminación, puesto que tienen una gama extraordinaria de actividades que incluyen la descomposición de los contaminantes y la producción de biomoléculas originales, se caracterizan por ser las principales degradadoras de contaminantes orgánicos (Aujoulat *et al*., 2012; Wu *et al*., 2014; Akoijam *et al*., 2015; Catania *et al*., 2015; Reda *et al*., 2016).

Teniendo en cuenta la relevancia del tema, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo principal realizar un proceso de biorremediación *ex situ* empleando las técnicas de bioaumentación, bioventeo y bioestimulación en sedimentos contaminados por hidrocarburos del estero adyacente a la playa Emiliano Zapata, Tuxpan, Veracruz, utilizando a la cepa bacteriana *Ochrobactrum anthropi*, puesto que se ha documentado en estudios de caracterización de bacterias hidrocarburolíticas (Mendo, 2014; Reda *et al.,* 2016) que posee un potencial prometedor para la degradación de contaminantes de petróleo, además de ser una especie bacteriana muy versátil con capacidad para colonizar de forma excepcionalmente amplia variedad de hábitats, por ende se considera como buena perspectiva para su aplicación en sedimentos, ya que en esta matriz de contaminantes se acumula la mayoría de los compuestos de origen antrópico que son introducidos en el ambiente marino y proporciona con certeza el grado de contaminación de una zona afectada (Romano *et al*., 2009; Aujoulat *et al*., 2012; Viñas *et al*., 2012; Quirino *et al*., 2014).

II. ANTECEDENTES

2.1.- La industria del petróleo en México

La industria petrolera en México ha tenido un papel preponderante, puesto que se ha desarrollado aceleradamente debido a la gran demanda de este recurso no renovable, generando así, diversos satisfactores económicos (Volke y Velasco, 2002; Crescencio, 2007; Vidal, 2018). Por tal motivo el petróleo tiene una gran importancia en la sociedad moderna. Por un lado, el petróleo equivale a energía, transporte y la calidad de vida actual de las personas. A su vez, el petróleo muestra varios aspectos negativos como la enorme dependencia económica mundial generada, tan solo nuestro país depende en un alto porcentaje de las reservas, venta y distribución de este recurso, sin embargo se deben considerar seriamente sus consecuencias negativas actuales y futuras, sobre todo los problemas ambientales derivados de su explotación y uso (Ponce-Vélez y Vázquez-Botello, 2005; Muñoz *et al*., 2010).

Es impresionante el acelerado desarrollo industrial que la transformación y refinación del petróleo ha traído consigo a la región del Golfo de México, originando a la vez problemas de contaminación en la zona costera con sus consecuentes impactos y efectos sobre los valiosos recursos que habitan estos ecosistemas, puesto que esta región es una de las más grandes productoras de petróleo en el mundo (Botello, 2005). Ya que se considera uno de los espacios oceánicos de mayor densidad de líneas de transporte de hidrocarburos a nivel mundial (Caso *et al*., 2004).

2.2.- Hidrocarburos

Los hidrocarburos y sus derivados son sustancias de alto peso molecular, insolubles en agua, que resultan muy tóxicos para los organismos vivos. Químicamente, el petróleo está formado por una mezcla compleja de hidrocarburos, compuesto de carbono e hidrógeno, y en menor cantidad nitrógeno, azufre y oxígeno, así como trazas de metales (Campillay, 2006).

Su estructura molecular consiste en un armazón de átomos de carbono a los que se unen los átomos de hidrógeno. Las cadenas de átomos de carbono pueden ser lineales o ramificadas y abiertas o cerradas. A diferencia de otros contaminantes, entre los que destacan los plaguicidas, los fármacos y las sustancias de origen industrial, el petróleo es de origen natural ya que son compuestos de la química básica por lo que muchos organismos están adaptados a su presencia e incluso hay bacterias y hongos que los degradan (Caso *et al*., 2004; Ñustez, 2012).

Entre los hidrocarburos existen los de tipo biogénico, que son sintetizados en el mar por la biota, por ejemplo el plancton (fito y zooplancton), las algas bentónicas, los microorganismos y los peces. Por otro lado están los hidrocarburos diagenéticos, que son resultado de una transformación microbiana o química que ocurre en los sedimentos a partir de moléculas biogénicas precursoras como terpenos, esteroles, carotenos; los componentes principales de este tipo de hidrocarburos son alifáticos, cicloalcanos, esteranos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y triterpenos pentacíclicos. Por último los hidrocarburos antrópicos que son los introducidos como resultado de la actividad humana (Ponce-Vélez y Vázquez-Botello, 2005).

Los términos hidrocarburos totales de petróleo (abreviados TPH en inglés) se usan para describir a una gran familia de varios cientos de compuestos químicos originados del petróleo crudo (US EPA 1996; Campillay, 2006); que de acuerdo a la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, se clasifican en fracción ligera, que se refiere a la mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contienen cadenas lineales entre cinco y diez átomos de carbono (C_5 a C_{10}); hidrocarburos de fracción media, estos contienen cadenas lineales entre diez y veintiocho átomos de carbono (C_{10} a C_{28}) y por último en hidrocarburos de fracción pesada, cuyo peso molecular es mayor a C_{18}.

2.3.- Impacto ambiental de los hidrocarburos

Actualmente la contaminación de ecosistemas terrestres y acuáticos a causa de los derrames de hidrocarburos de petróleo y sus derivados, representa uno de los problemas ambientales más importantes; consecuencia del manejo inadecuado, los accidentes durante el transporte, así como la toma clandestina de dicho combustible (Alemán, 2009; Crescencio, 2007; Ñustez, 2012). Es importante señalar que la contaminación por petróleo se caracteriza por su persistencia en el ecosistema, a pesar de los procesos de degradación natural y/o antrópica al que puedan ser sometidos (Campillay, 2006). En el sureste mexicano existen un número considerable de sitios con distintos niveles de impacto ambiental, como consecuencia de la actividad petrolera de varias décadas atrás, la cual ha producido grandes cantidades de residuos peligrosos difíciles de cuantificar (Adams *et al*., 1999; Martínez-Prado *et al*., 2011). Entre los estados con mayores niveles de

contaminación por hidrocarburos Campeche se encuentra en primer lugar por concentraciones de hidrocarburos dispersos en aguas costeras y marinas, seguido por Tabasco, Veracruz y Quintana Roo (Ponce-Vélez y Vázquez-Botello, 2005).

Frecuentemente los contaminantes en el ambiente marino como hidrocarburos (sólidos suspendidos en el fondo, así como líquidos disueltos), son trasladados a zonas de relativa calma (dársenas portuarias, estuarios, marismas, playas y bahías), por influencia del viento, oleaje, mareas y corrientes, llegándose a estancar y acumular en ellas; es importante mencionar que los daños no sólo dependen de la cantidad vertida, sino también del lugar, época del año y tipo de petróleo (Ponce-Vélez y Vázquez-Botello, *op cit*).

Además del impacto negativo al ambiente, estos compuestos del petróleo tienen un rol importante en el desarrollo económico y social al incidir directamente en la producción de alimentos (pesca y acuacultura), el transporte, la construcción y la administración de puertos e industrias, también se han registrado afectaciones a zonas urbanas y recreativas, consecuencia de la expansión de las mismas, cabe mencionar que debido a su potencial toxico a través de la cadena alimentaria, tiene como principal consecuencia la afectación a la salud humana (Ponce-Vélez y Vázquez-Botello, 2005).

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).

2.4.- Hidrocarburos en sedimento

Los sedimentos son capas de partículas minerales y orgánicas, a menudo muy finas que se encuentran en el fondo de reservorios de aguas naturales y son un componente importante en los ecosistemas acuáticos, en ellos pueden acumularse sustancias tóxicas mediante mecanismos complejos de adsorción físicos y químicos y dependen de la naturaleza de la matriz sedimentaria y las propiedades de los compuestos adsorbidos, sin embargo estos no solo actúan como reservorio para los contaminantes, sino que sirven como fuente de tóxicos para la fauna marina (Baird, 2004 en Rodríguez, 2014; Viñas *et al*., 2012). Por otra parte, los procesos de adsorción, que involucran un intercambio dinámico entre los materiales absorbidos y el agua, está influenciado por diversos parámetros fisicoquímicos y químicos como el pH, el potencial oxido reductivo, el oxígeno disuelto, el contenido de carbono orgánico e inorgánico (Ponce-Vélez y Vázquez-Botello, 2005).

Frecuentemente los contaminantes ambientales en sedimentos se presentan en mezclas complejas, los sedimentos se pueden considerar una fuente de contaminantes persistentes en el ambiente acuático, debido a que almacena estos compuestos eliminándolos de la columna de agua y a consecuentemente su biodisponibilidad. La composición de los hidrocarburos fósiles en los sedimentos varía en función del tiempo de almacenamiento que tengan y de la composición

original de donde se derivaron. Por ende el análisis de sedimentos es de gran utilidad para detectar la presencia de contaminantes en los ecosistemas acuáticos (Ponce-Vélez y Vázquez-Botello, *op cit*). Y son preferibles a las muestras de agua como matriz para el seguimiento de la calidad ambiental, siendo mayoritariamente utilizados en los programas de vigilancia establecidos nacional e internacionalmente (Viñas *et al*., 2012).

2.5.- Legislación ambiental

En México existe un gran número de sitios contaminados, principalmente por hidrocarburos derivados del petróleo. Esta situación ha propiciado que en los últimos años se genere legislación, que controle y regule dicha situación (Mendo, 2014). Sin embargo, no se han establecido normas que establezcan límites máximos permisibles de hidrocarburos en sedimento, por lo cual se toma como referencia la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, que establece los límites permisibles de hidrocarburos en suelo y lineamientos para muestreo, caracterización y remediación. En esta norma se establecen los límites en función de las fracciones ligera, media y pesada, así como el uso del suelo.

2.6.- Tecnologías de remediación

En los últimos años se han desarrollado tecnologías de remediación, las cuales representan una alternativa para la disposición de desechos peligrosos a los que no se les ha dado tratamiento, es importante mencionar que la posibilidad de éxito puede variar ampliamente de acuerdo a las condiciones específicas del sitio, por tal

motivo, se debe seleccionar la tecnología de remediación adecuada teniendo en consideración los siguientes aspectos (Volke y Velasco 2002; Lladó, 2012):

- Características del sitio
- Tipo de contaminante, concentración y características fisicoquímicas
- Propiedades fisicoquímicas y tipo de suelo a tratar
- Costo

Por otra parte existen tres tipos de tratamientos:

1. Tratamientos biológicos: La biorremediación se caracteriza por la aplicación de organismos vivos, ya sean plantas, hongos o bacterias para que a través de sus actividades metabólicas lleven a cabo la degradación, transformación o remuevan los contaminantes a productos inocuos.

2. Tratamientos fisicoquímicos: En estos tratamientos se utilizan las propiedades físicas o químicas del medio contaminado o del contaminante en cuestión, para lograr así, destruir, separar o contener la contaminación del sitio afectado.

3. Tratamientos térmicos: Se caracterizan por la utilización de energía calorífica para llevar a cabo la volatilización, quemar o descomponer los contaminantes (Volke y Velasco, *op cit*).

2.7.- Biorremediación

La biorremediación se basa en la transformación química de contaminantes mediante el uso de microorganismos que satisfacen sus requerimientos

nutricionales y energéticos con dichos contaminantes, contribuyendo a la disipación o degradación de los contaminantes orgánicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos. Las rutas de biodegradación varían en función de la estructura química del compuesto, así como también de las especies microbianas degradadoras que se apliquen al proceso de biorremediación (Volke y Velasco 2002; Torri *et al*., 2018).

- El bioventeo. Es una tecnología basada en la adición de oxígeno, para estimular la biodegradación natural de cualquier compuesto en condiciones aerobias.
- Bioaumentación. Esta consiste en la adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante en cuestión, para promover su biodegradación o su biotransformación a productos menos tóxicos.
- Bioestimulación. Es una técnica basada en la adición de nutrientes, sustratos o aditivos con actividad superficial para estimular el crecimiento microbiano y el metabolismo de los contaminantes (Volke y Velasco 2002; Vallejo *et al*., 2005; Arrieta *et al*., 2012).

2.8.- *Ochrobactrum anthropi*

Ochrobactrum anthropi es un bacilo aerobio gramnegativo no fermentador que se encuentra generalmente en el medio ambiente puesto que es una alfaproteobacteria altamente versátil con capacidad para colonizar de forma excepcionalmente amplia

variedad de hábitats, debido a que cuyas cepas individuales pueden prosperar y adaptarse sin mayores problemas (Romano *et al*., 2009; Quirino *et al*., 2014). La presente cepa bacteriana ha demostrado en algunos estudios realizados tener potencial para muchas aplicaciones biotecnológicas, debido a su capacidad para transferir electrones fuera de la célula a aceptores de electrones insolubles, como óxidos de metal o los ánodos de las células de combustible microbianas (Calvo *et al*., 2008; Zuo *et al*., 2008; Aujoulat *et al*., 2012; Quirino *et al*., 2014).

Es importante mencionar que se ha documentado a *Ochrobactrum anthropi* en estudios de caracterización de bacterias hidrocarburolíticas así como en procesos de biorremediación, donde ha demostrado poseer un potencial prometedor para la degradación de contaminantes de petróleo, puesto que ha registrado porcentajes de degradación de hidrocarburos totales del petróleo, mayores al 50% (Mendo, 2014; Reda *et al.,* 2016).

2.9.- Procesos de biorremediación de hidrocarburos

Vallejo *et al* (2005) evaluaron el efecto de la adición de nutrientes (N y P) en forma de sales inorgánicas simples (SIS) y un fertilizante inorgánico compuesto (FIC) en la biodegradación de TPHs. Se emplearon mesocosmos con suelo contaminado y se evaluó un control abiótico y un control sin nutrientes. El estudio tuvo una duración de 125 días. Aunque no hubo diferencias significativas en las concentraciones de TPHs a través del tiempo, entre los tratamientos y el control sin nutrientes, las SIS mostraron un mayor porcentaje de degradación (39% y 41% por los métodos D-

5831y EAMG, respectivamente). *Stenotrophomonas maltophilia* fue la especie predominante durante su estudio (34%).

Gómez *et al* (2009) realizaron un estudio de biorremediación a escala de laboratorio, para evaluar la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación. La reducción en la concentración de los HTP en un periodo de tres meses fue del 52.79 % para el tratamiento por atenuación natural, 60.45 % para el tratamiento por bioestimulación y del 64.92 % para el tratamiento por bioaumentación. Para la inoculación del tratamiento por bioaumentación se aisló una bacteria hidrocarburolítica, identificada como *Bacillus sp*.

Ordaz *et al* (2011) realizaron pruebas de biorremediación a nivel microcosmos a un suelo arcilloso, contaminado con petróleo crudo, del sureste de México. En el estudio utilizaron como texturizante y enmienda al bagazo de caña. La máxima remoción de HTP fue del 30% después de 20 días, se logró con un tamaño de partícula de 4,76 mm. En su estudio se observó que a mayor tamaño de partícula se mejora la remoción de HTP.

En el 2012 se aplicó un proceso de biorremediación a sedimentos contaminados por hidrocarburos, que consistió en bioaumentar bacterias nativas de la laguna de Tamiahua del norte de Veracruz y adicionarlas a un sistema de tratamiento los cuales contenían 300 g de sedimento y 100 mL de caldo de soya tripticaseína

(CST). Los matraces se mantuvieron diariamente en un baño de agua con agitación durante 8 horas. El proceso de biorremediación duró 3 meses, durante los cuales se realizaron análisis de HTP al inicio, 30, 60 y 90 días; registrándose un valor inicial de 440.088 mg/kg obteniendo al final del experimento una remoción de hidrocarburos totales del petróleo de 72 %, con un valor de 120.04 mg/kg logrando el mayor porcentaje de remoción de HTP a los 60 días (San Martin *et al*., 2012).

Arrieta *et al* (2012) llevaron a cabo un estudio en el cual se aisló y caracterizó bioquímica y molecularmente un consorcio bacteriano capaz de degradar hidrocarburos, conformado por los siguientes géneros: *Enterobacter sp, Bacillus sp, Staphylococcus aureus, Sanguibacter soli, Arthrobacter sp* y *Flavobacterium sp*, a partir de un suelo contaminado con diesel a escala de laboratorio, en su investigación aplicaron dos tecnologías de biorremediación: atenuación natural y bioestimulación. Obteniendo una reducción en la concentración de HTP en un periodo de 4 meses de 36,86% para atenuación natural y 50,99% para bioestimulación.

García (2013) aplicó un sistema de biorremediación por bioaumentación en microcosmos durante 90 días, con la finalidad de evaluar la remoción de HTP presentes en sedimentos obtenidos del estero de la playa Emiliano Zapata, municipio de Tuxpan Ver. En el trabajo se aislaron, cultivaron y purificaron bacterias hidrocarburolíticas exógenas, a las cuales se les aplicó una prueba de degradación

para confirmar su capacidad para remover HTP y al obtener las cepas con mayor capacidad para degradar, se aumentó la biomasa bacteriana en CST y se aplicó a 6 microcosmos los cuales fueron incubados en un baño de agua con agitación. Se obtuvo una remoción de HTP de 80.54 %, presentando la mayor remoción de HTP en los primeros 30 días con un valor de 57.52 % y la menor remoción se obtuvo en el periodo de 31 a 60 días con un porcentaje de 9.2 % en comparación a la remoción total.

Muskus *et al* (2013) realizaron un estudio con el fin de dar solución a una problemática que se presenta en las zonas de manejo de hidrocarburos. Evaluando las técnicas de bioventeo, atenuación natural, bioaumentación y bioventeo-Bioaumentación, utilizando columnas durante cuatro meses. Sus resultados mostraron que en la técnica de bioventeo se obtuvieron porcentajes de remoción de hasta el 97%. Con la técnica de bioventeo-bioaumentación de 75% y con las técnicas de Atenuación Natural y bioaumentación, los porcentajes no fueron mayores al 48%. En su estudio mostraron que el consorcio bacteriano utilizado, no potencializó la eficiencia de los procesos de biorremediación.

Ruiz-Marín *et al*., (2013) aislaron e identificaron un consorcio de bacterias capaces de degradar hidrocarburos en sedimento de manglar: *Pseudomonas aeruginosa, P. luteola, Sphingomonas paucimobilis y P. fluorescens* y llevaron a cabo un proceso de biodegradación, la cual fue evaluada por procesos de atenuación natural y bioaumentación en sedimento de manglar. Se colectaron muestras cada 30 días

durante 3 meses y se analizaron por cromatografía de gases. La degradación con la bioaumentación fue de 40.3%, mientras que en el proceso de atenuación únicamente el 4.51% fue removido, sugiriendo que el bajo número de bacterias y contenido de nutrientes en el sedimento de mangle pudo haber causado una limitación en la biodegradación de hidrocarburo. Por lo tanto, se obtuvieron mejores resultados de degradación a través de la técnica de bioaumentación.

Mendo (2014) realizó un proceso de biorremediación en columnas a sedimentos contaminados por hidrocarburos empleando bacterias autóctonas de la laguna de Tamiahua, Veracruz, su trabajo tuvo una duración de 90 días y se aplicaron las técnicas de bioaumentación y bioventeo, constó de dos tratamientos, el primero sin bacterias y el segundo con bacterias, obteniendo como resultado que para el primer tratamiento 6.44 % de degradación, mientras que el segundo tratamiento presentó una remoción del 68.36%. La cepa aplicada en la biorremediación fue identificada mediante pruebas bioquímicas por el sistema API 20 NE y complementada por pruebas moleculares de ARNr 16s teniendo como resultado a la especie *Ochrobactrum anthropi.*

Vallejo *et al* (2015) evaluaron el efecto de la bioestimulación en la biorremediación de un suelo contaminado. Se montaron ocho mesocosmos, simulando condiciones de biolabranza bajo un entorno controlado en laboratorio por un periodo de 60 días. Se evaluaron dos tratamientos: fertilizante inorgánico compuesto (FIC) y urea más K_2HPO_4 (U), además de dos controles: atenuación natural y abiótico. Obteniendo el

mayor porcentaje de remoción de TPHs en el tratamiento con FIC (28%), seguido del tratamiento con U (24%) y por último, el control de Atenuación Natural (6%). Concluyendo que la adición de nutrientes estimuló la densidad de microorganismos, lo cual optimizó el proceso de biodegradación.

Hernández (2016) evaluó un proceso de biorremediación en sedimentos contaminados por hidrocarburos aplicando las técnicas de bioaumentación, bioestimulación y bioventeo con bacterias hidrocarburolíticas autóctonas del estero de la localidad de Emiliano Zapata, Tuxpan, Veracruz. El experimento tuvo una duración de 90 días y constó de tres tratamientos, al primero (CA) se le aplicó bioventeo y bioestimulación, para el segundo tratamiento (CB) se adicionó bioaumentación bacteriana, bioventeo y bioestimulación, finalmente al tratamiento número tres (CE) solamente se le aplicó bioaumentación bacteriana, el mayor porcentaje de degradación de HTP se registró en el tratamiento número dos (CB) con un valor de 66.85% mientras que para los tratamientos uno (CA) y tres (CE) se obtuvieron porcentajes bajos de degradación con 34.19% y 29.6% respectivamente.

Torri *et al* (2018) estudiaron el efecto disipador de los microorganismos edáficos nativos en un suelo contaminado artificialmente con dos HAP (antraceno y fenantreno), además de evaluar el efecto en la disponibilidad de macro y micro nutrientes. También se estudió la influencia de la estructura química del contaminante en el proceso de biorremediación. En sus resultados obtuvieron que la concentración de antraceno y de fenantreno disminuyó un 75 - 77 % y un 89 - 91

%, respectivamente. Lo que indica la capacidad de los microorganismos nativos edáficos para degradar rápidamente ambos contaminantes. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos con y sin nutrientes, por lo que concluyeron que la disponibilidad de éstos no fue limitante para la actividad catabólica de los microorganismos.

III. OBJETIVOS

3.1.- Objetivo general

- Evaluar bajo condiciones de laboratorio la degradación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) utilizando la bacteria *Ochrobactrum anthropi* a diferentes estímulos en sedimentos contaminados del estero adyacente a la playa Emiliano Zapata, ejido el sacrificio, Tuxpan, Veracruz.

3.2.- Objetivos particulares

- Caracterizar física y químicamente el sedimento del estero adyacente a la playa Emiliano Zapata.

- Valorar las capacidades hidrocarburolíticas de la cepa bacteriana axénica bajo un diseño experimental en columnas.

- Comparar las técnicas de bioventeo, bioaumentación y bioestimulación en los sedimentos contaminados de los tratamientos durante el proceso de biorremediación.

IV. ÁREA DE ESTUDIO

4.1.- Localización del punto de muestreo

El estero se encuentra conectado con la playa Emiliano Zapata, ejido el Sacrificio perteneciente al municipio de Tuxpan, Veracruz ubicado en las coordenadas geográficas: 20°48’34.5” N y 097°13’31.1” W, con una altura de 7 msnm (Fig. 1). Sus límites se encuentran marcados, al norte con la playa de Chile Frio y al sur con Cazones de Herrera. Es importante mencionar que se eligió esta área de estudio debido a que presenta antecedentes de un alto grado de contaminación (Cervantes, 2017), a causa de constantes derrames de hidrocarburos emitidos por las instalaciones cercanas de la batería de PEMEX punta de piedra.

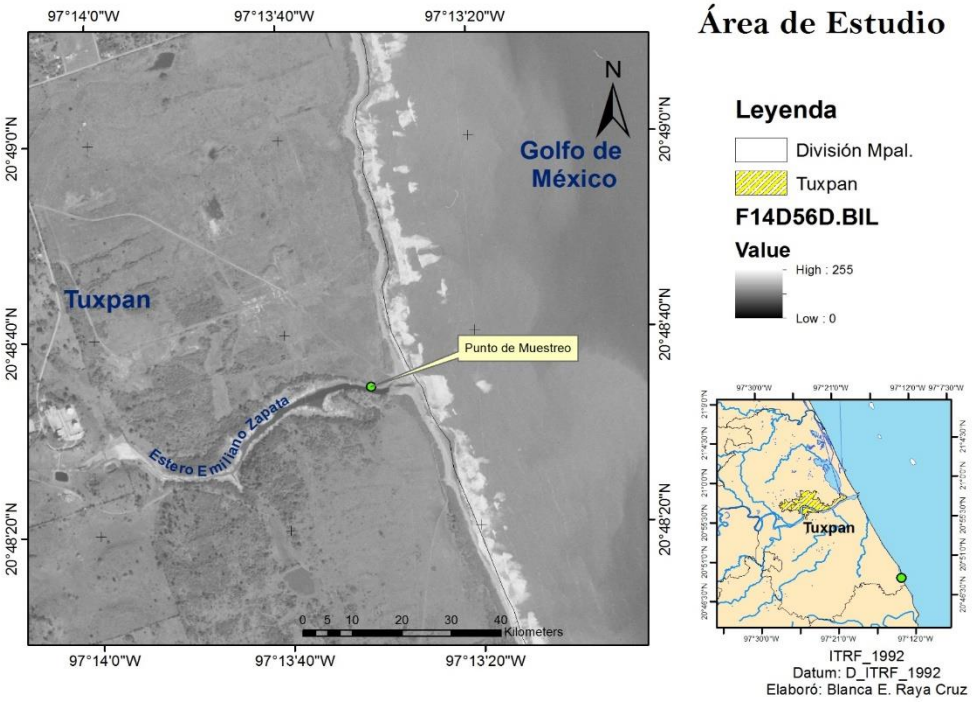


Figura 1. Área de estudio

4.2.- Fase experimental del proceso de biorremediación

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

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.- Toma de muestras

Primeramente se realizó un recorrido prospectivo en el sitio, para localizar el punto estratégico de muestreo, se tomó una muestra simple de 20 kg de sedimento superficial aproximadamente y se colocó en frascos de vidrio previamente esterilizados. Posteriormente las muestras se trasladaron al laboratorio de Biotecnología Ambiental donde se llevó a cabo el proceso de biorremediación.

5.2.- Análisis fisicoquímicos del sedimento

Para los análisis fisicoquímicos, se tomó aproximadamente 1 kg de muestra de sedimento, posteriormente se realizaron los siguientes análisis: clase textural por el hidrómetro de Bouyoucos, densidad aparente por el método de la probeta, conductividad eléctrica con un conductímetro, el pH fue medido con un multiparámetro (Oakton OCSTestr 35 Waterproof). La determinación de carbonatos con el método valorimétrico y la determinación de materia orgánica con la técnica de Walkley y Black (1934).

Los resultados fueron interpretados de acuerdo a la clasificación agronómica del manual “Uso y manejo de suelos” (Maruri, 2008) de la Universidad Veracruzana, bajo los lineamientos de la NOM-021-SEMARNAT-2000.

5.3.- 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 colocaron 10 gr de sedimento en un recipiente y se introdujo a una estufa marca Felisa a 30 °C por 72 horas. Posteriormente, la muestra se retiró de la estufa y se colocó en el desecador por 2 horas aproximadamente para que adquiriera la temperatura ambiente. Se pesó nuevamente y se registró el peso final.

La determinación del porcentaje de humedad se realizó por diferencia de pesos de acuerdo a Fernández *et al.* (2006) utilizando la siguiente formula:

% Humedad= (peso inicial-peso final) / (peso inicial) (100)

5.4.- Determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo

Este proceso se realizó con el método de reflujo en el 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 la muestra seca, finamente molida en un cartucho de celulosa, el cual se introdujo en la columna extractora del equipo Soxhlet, se inició el calentamiento hasta alcanzar el punto de ebullición y se mantuvo el reflujo en estas condiciones durante 8 horas de tal manera que se efectuaran de 6 a 8 reflujos por hora.

Finalmente se llevó a cabo la cuantificación de los hidrocarburos utilizando la siguiente fórmula:

HTPs= (RB-RA) (FC) / (P) (FH)

Dónde:

HTPs (mg kg^{-1} de s.s.) = hidrocarburos totales del petróleo en mg/kg de suelo seco.

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

RB = Peso (mg) del recipiente con 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

La determinación de HTP se realizó al inicio del experimento, a los 30, 60 y 90 días para el posterior análisis de datos.

5.5.- Medición del crecimiento bacteriano por espectrofotometría

El crecimiento de la cepa *Ochrobactrum anthropi* en medio líquido se monitoreó en un espectrofotómetro 20 Genesys mediante el procedimiento descrito por Fletcher (2000). La cepa bacteriana se obtuvo del cepario del laboratorio de biotecnología ambiental de la Universidad Veracruzana, Tuxpan, México.

5.6.- Producción de la biomasa bacteriana

La inoculación se desarrolló en condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar, con ayuda del mechero, asa bacteriológica, guantes y cubre boca. La cepa *Ochrobactrum anthropi* fue reactivada en medio enriquecedor de bacterias incubándose a una temperatura de 35 °C durante un periodo de una semana como lo describe el procedimiento de Fletcher (2000).

Una vez obtenida la biomasa las bacterias se vertieron en tubos falcon con capacidad de 15 mL y fueron separadas del medio de cultivo por centrifugación a

2000 revoluciones por minuto (RPM) durante 10 minutos. Por ultimo las células bacterianas centrifugadas (7.2 g de biomasa en peso seco por tratamiento) se resuspendierón en agua destilada y posteriormente se aplicaron al sedimento contaminado para iniciar el proceso de biorremediación.

5.7.- Diseño experimental y tratamientos

Para el proceso de biorremediación se elaboró el diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, el cual consta de 20 columnas de acrílico con medidas de 45 cm de altura y un diámetro de 10.5 cm con un volumen de trabajo para dos kilogramos de muestra. Las columnas fueron divididas en cinco tratamientos, cada tratamiento se realizó por cuadruplicado, a los cuales se les adicionó un kilogramo de sedimento contaminado, Medio Enriquecedor de Bacterias (MEB), inóculo bacteriano y aireación, variando para cada tratamiento respectivamente como se describen a continuación (Fig. 2):

T1= Sedimento contaminado + MEB + Bacterias + Aireación

T2= Sedimento contaminado

T3= Sedimento contaminado + MEB

T4= Sedimento contaminado + Bacterias

T5= Sedimento contaminado + Aireación

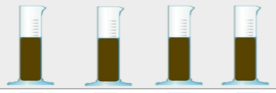
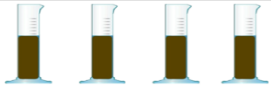
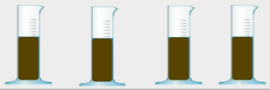
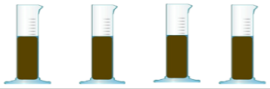
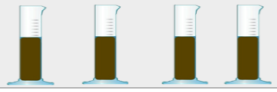
TRATAMIENTOS	REPETICIONES	ESTIMULOS			
T1		Sedimento contaminado	Bioestimulación	Bioaumentación	Bioventeo
T2		Sedimento contaminado	---	---	---
T3		Sedimento contaminado	Bioestimulación	---	---
T4		Sedimento contaminado	---	Bioaumentación	---
T5		Sedimento contaminado	---	---	Bioventeo

Figura 2. Diseño experimental.

5.8.- Monitoreo de parámetros fisicoquímicos en el proceso de biorremediación

Durante el proceso de biorremediación en el laboratorio, se monitorearon semanalmente los factores de temperatura ambiente con un termómetro de mercurio 10-60 °C Brannan y el pH de los tratamientos con un potenciómetro Hanna HI 9813-6. La humedad se determinó y se ajustó cada 30 días por diferencia de pesos de acuerdo a Fernández *et al*., (2006).

5.9.- Análisis estadísticos

Los datos de HTP se obtuvieron en porcentajes por lo que fueron transformados a arcoseno para su posterior análisis utilizando el estadístico de prueba ANOVA, adicionalmente se realizaron pruebas de comparación múltiple de medias con rangos Tukey a un nivel de significancia de 0.05 para determinar si existían o no diferencias significativas entre los tratamientos; utilizando el software Statistica versión 8.0.

VI. RESULTADOS

6.1.- Análisis fisicoquímico del sedimento

Al realizar los análisis físicos del sedimento contaminado, se obtuvo una densidad aparente de 1.04 g/cm^3 que se considera como baja dentro de la clasificación de suelos; se encontró el sedimento clasificado como muy fuertemente salino de acuerdo a la conductividad eléctrica obtenida de 4,819.2 µS, con una temperatura de 27°C y una salinidad de 3.03 ppm (Cuadro 1). Para los análisis de clase textural, que muestra el tamaño de los granos que conforman el sedimento y su proporción; se obtuvieron los siguientes resultados, 65.88% de arena, 24% de limo y 10.12% de arcilla, de acuerdo a la clasificación de suelos del triángulo de texturas, es considerado como franco arenoso.

Cuadro 1. Análisis físicos del sedimento del estero Emiliano Zapata Tuxpan, Ver.

Parámetros	Valores obtenidos	Clasificación
Densidad Aparente (g/cm$^{3)}$	1.04	Baja
Conductividad Eléctrica (µS)	4,819.2	Muy fuertemente salino
Salinidad (ppm)	3.03	Alta salinidad
Clase Textural	65.88% Arena 24% Limo 10.12% Arcilla	Franco Arenoso
Temperatura (°C)	27	----------

Con respecto a los análisis químicos del sedimento, se registró un pH de 6.61 clasificado agronómicamente como muy ligeramente ácido. De acuerdo a la determinación de carbonatos utilizando el método valorimétrico, se obtuvo un valor de 24.98% clasificado como alto. Por último, para la determinación de materia orgánica se encontró un valor de 16% lo que indica que el sedimento es extremadamente rico en cuanto a este parámetro (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis Químicos del sedimento del estero Emiliano Zapata Tuxpan, Ver.

Parámetros	Valores obtenidos	Clasificación
pH	6.61	Muy ligeramente Ácido
Carbonatos (%)	24.98	Alto
Materia Orgánica (%)	16	Extremadamente Rico

6.2.- Monitoreo de pH durante el proceso de biorremediación

Los cinco tratamientos con diferentes estímulos se monitorearon semanalmente durante 13 semanas. Obteniendo un valor máximo de 7.8 y un mínimo de 6.1 registrando un promedio de pH de 6.9 para todos los tratamientos (Fig. 3).

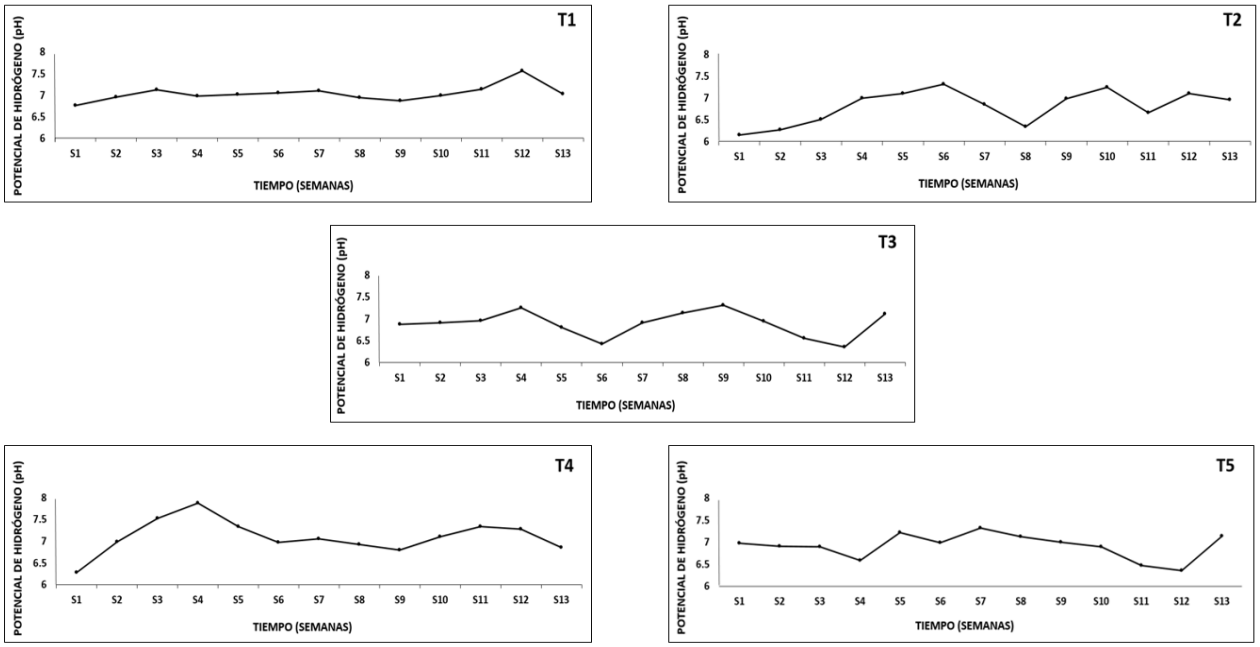


Figura 3. Registro de pH de los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5 durante las 13 semanas del proceso de biorremediación.

6.3.- Determinación del porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad se registró con un valor inicial de 7.1 % para los cinco tratamientos. Posteriormente a los 30 días el T1 registró el valor más alto con un 9.72 % de humedad, similar al tratamiento T2 con un 9.70 %, por su parte los tratamientos T3 y T4 también presentaron valores muy similares. Sin embargo el T5 obtuvo el valor más bajo con un 6.66 %. En el segundo periodo del proceso de biorremediación (60 días) el tratamiento T1 mantuvo el valor máximo con un 28.19 %, mientras que los tratamientos T2, T3 y T5 mostraron valores similares, registrando el valor más bajo para el T2 con un 16.30 %. Finalmente en el último periodo que corresponde a los 90 días el valor más alto de humedad se volvió a registrar en el tratamiento T1 con un 25.15 %, por su parte los tratamientos T3, T4

y T5 mostraron valores similares, mientras que el T2 conservó en menor porcentaje de humedad con un 14.69 % (Fig.4).

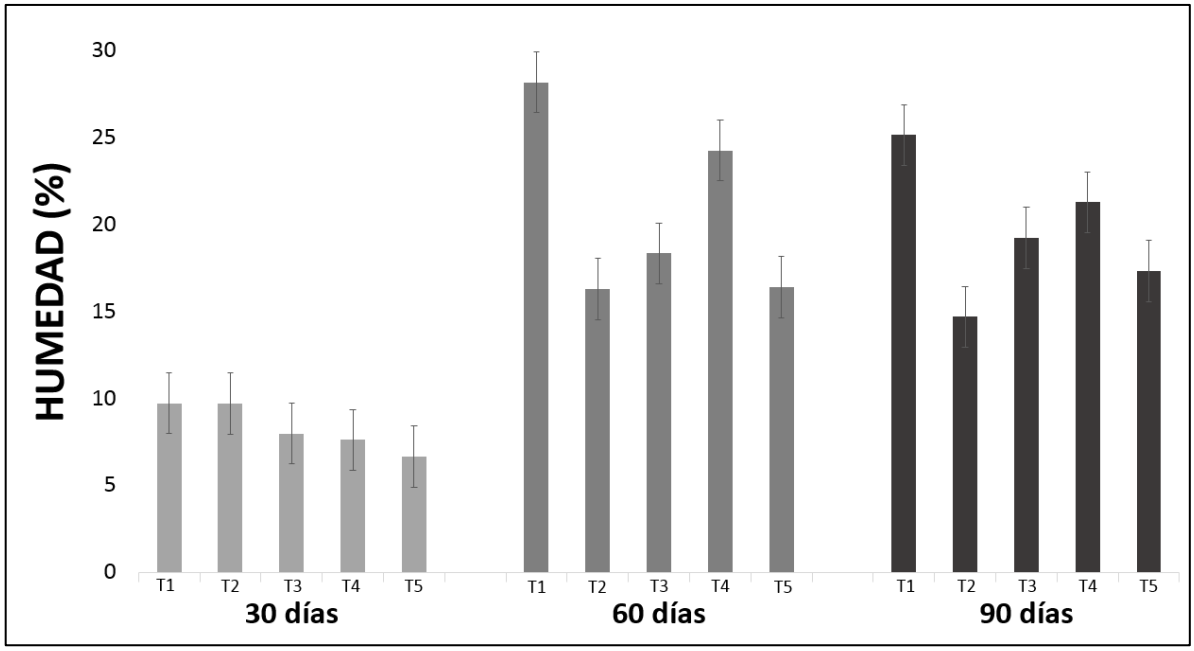


Figura 4. Valores del porcentaje de humedad en los tratamientos, durante la fase experimental.

6.4.- Concentración inicial de HTP en sedimento

Después de realizar la determinación inicial de hidrocarburos totales del petróleo (HTP), el sedimento presentó una concentración de 103, 714.47 mg de HTP /kg de sedimento, lo que indica que el valor de concentración de HTP se encuentra por arriba de los límites máximos permisibles establecidos en la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, donde el valor máximo permisible de HTP en suelo clasificado como de uso agrícola, forestal, recreativo y de conservación es de 3,000.00 mg/kg.

6.5.- Hidrocarburos Totales del Petróleo a los 30 días

La cuantificación de HTP a los 30 días del proceso de biorremediación presentaron valores de biodegradación significativos para ciertos tratamientos, el tratamiento T1 registró un valor de 66, 304.82 mg/kg de HTP, el tratamiento T2 mostró el valor más alto con 99, 335.54 mg/kg, mientras que el tratamiento T3 obtuvo un valor de 98, 750.40 mg/kg, el tratamiento T4 fue el que mostró el valor más bajo con 63, 572.89 mg/kg y finalmente el tratamiento T5 registró un valor de 87, 261.62 mg/kg (Fig. 5).

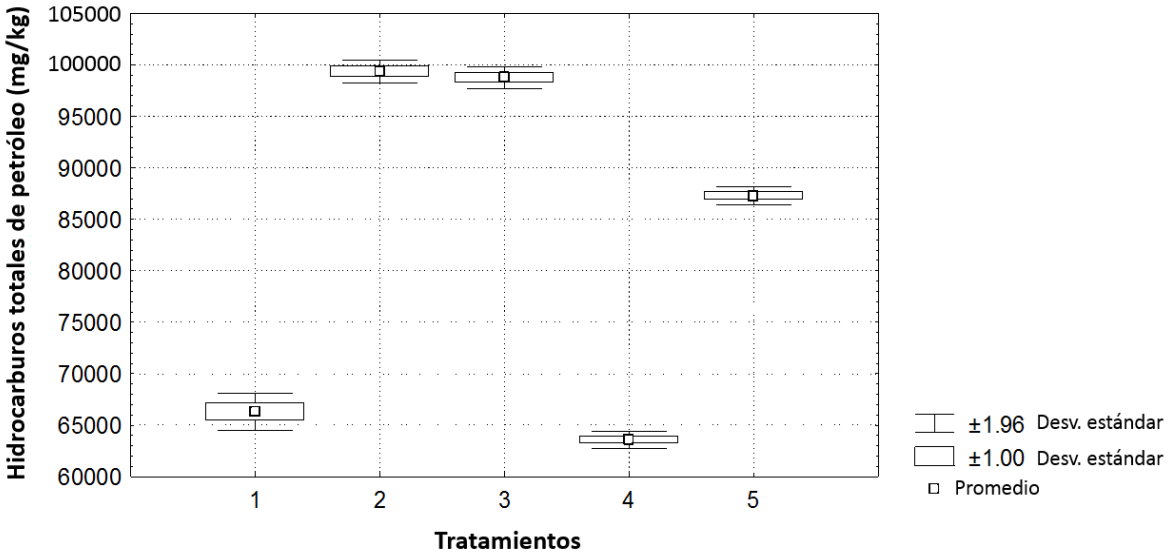


Figura 5. Valores promedio de la concentración de HTP a los 30 días del proceso de biorremediación.

La cuantificación de HTP a los 30 días del proceso de biorremediación mostró una degradación máxima y significativamente mayor de 38.70 % correspondiente al tratamiento T4 ($F=1561.900$, $p<0.05$), el cual es similar al obtenido en el tratamiento T1 con un valor de 36.06 %, sin embargo ambos tratamientos presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p<0.05$). Por otro lado los tratamientos T2 y

T3 no mostraron diferencias estadísticamente, registrando un valor de degradación de 4.22 % y 4.75 % respectivamente. Por último el tratamiento T5 presentó una degradación del 15.86 % (Fig.6).

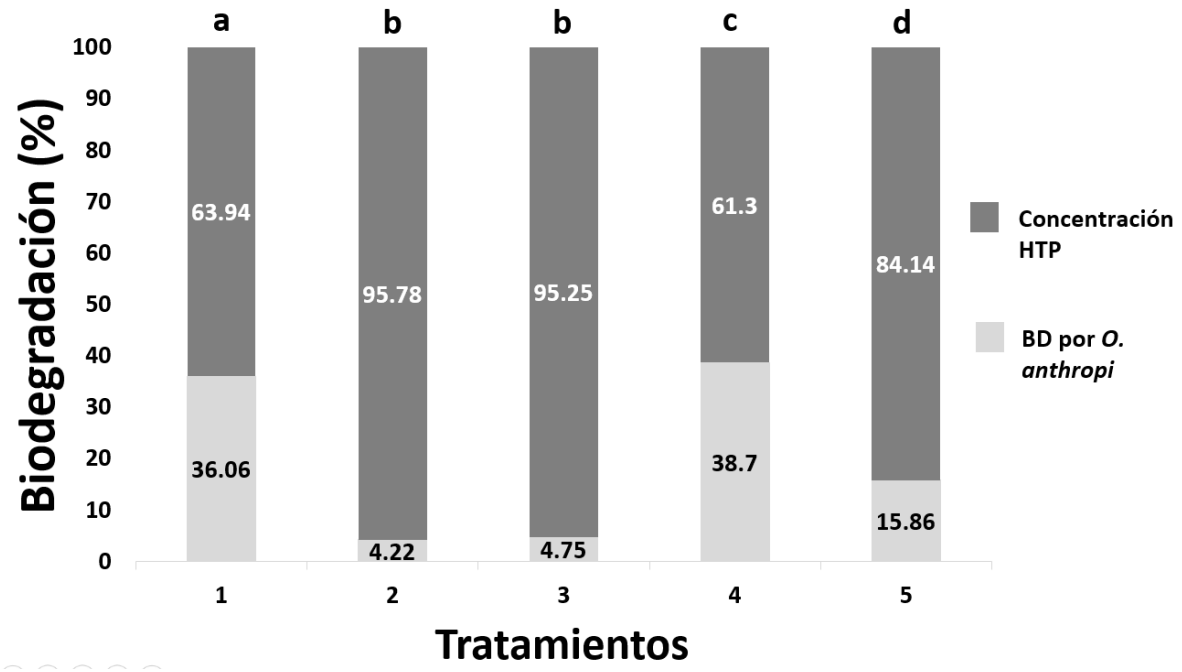


Figura 6. Valores promedio de la biodegradación de HTP a los 30 días del proceso de biorremediación. Las letras distintas en los tratamientos indican diferencias significativas ($p<0.05$).

6.6.- Hidrocarburos Totales del Petróleo a los 60 días

En el segundo mes del proceso de biorremediación la cuantificación de HTP mostró los siguientes valores, para el tratamiento T1 49, 568.30 mg/kg, el tratamiento T2 96, 493.42 mg/kg, similar al tratamiento T3 con un valor de 94, 636.29 mg/kg, por su parte el tratamiento T4 registró un valor de 50, 250.89 mg/kg y para el tratamiento T5 fue de 77, 562.49 mg/kg (Fig. 7).

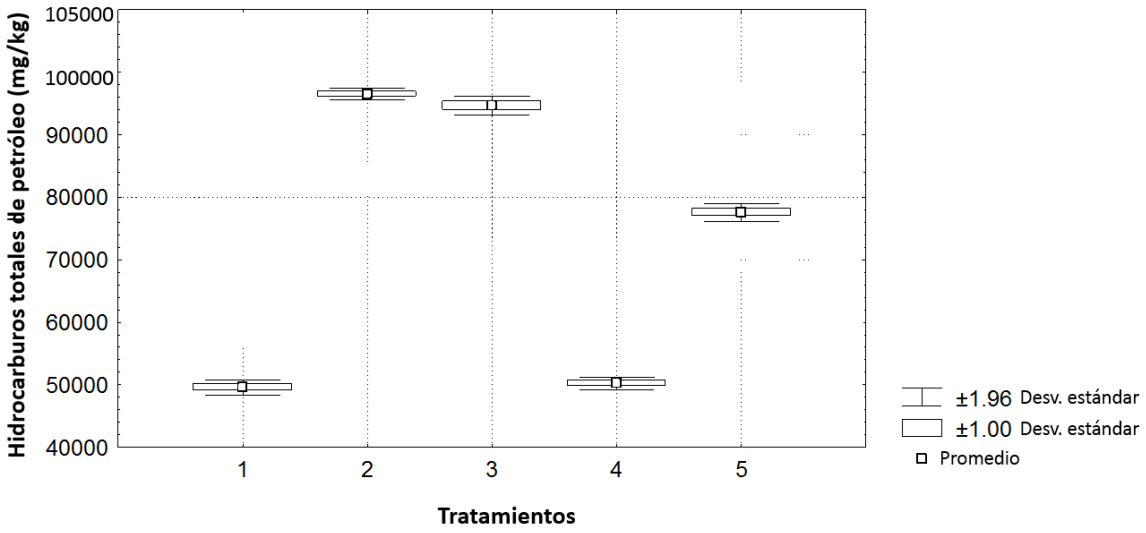


Figura 7. Valores promedio de la concentración de HTP a los 60 días del proceso de biorremediación.

Transcurridos los 60 días del proceso de biorremediación el tratamiento T1 mostró la mayor degradación con un 52.20 % (F= 2778.385, $p<0.05$) similar al tratamiento T4 con 51.54 % estadísticamente iguales entre ellos ($p=0.87$). Por otra parte el tratamiento T2 registró 11.18 % de degradación, mientras que el tratamiento T3 evidenció el menor valor con un 8.75 %, mostrando diferencias significativas a los tratamientos anteriormente mencionados. Finalmente el tratamiento T5 obtuvo un valor de 25.21 % como se muestra en la siguiente figura.

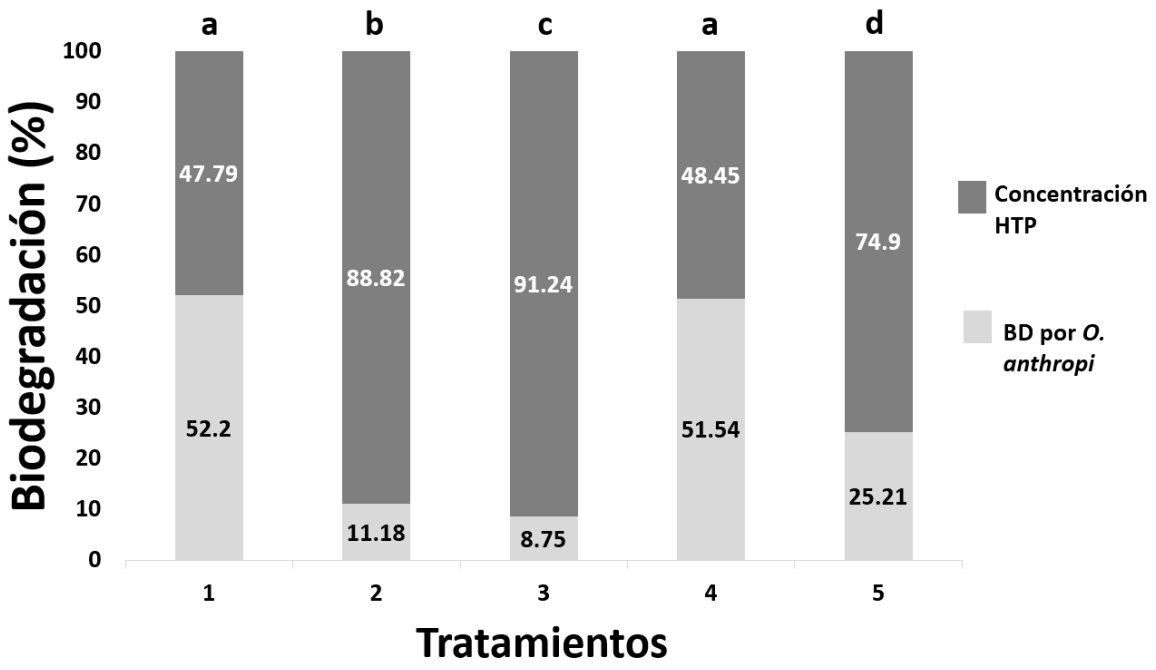


Figura 8. Valores promedio de la biodegradación de HTP a los 60 días del proceso de biorremediación. Las letras distintas en los tratamientos indican diferencias significativas ($p<0.05$).

6.7.- Hidrocarburos Totales del Petróleo a los 90 días

En el último periodo del proceso de biorremediación los resultados obtenidos por la cuantificación de HTP se mostraron de la siguiente manera, para el tratamiento T1 se obtuvo el menor valor con 36, 372.74 mg/kg, mientras que para el tratamiento T2 se registró el valor más alto con 94, 062.82 mg/kg, seguido del tratamiento T3 con 87, 628.48 mg/kg, por su parte el tratamiento T4 mostró el segundo valor más bajo con 43, 672.97 mg/kg y por último el tratamiento T5 con 72, 562.30 mg/kg de HTP (Fig. 9).

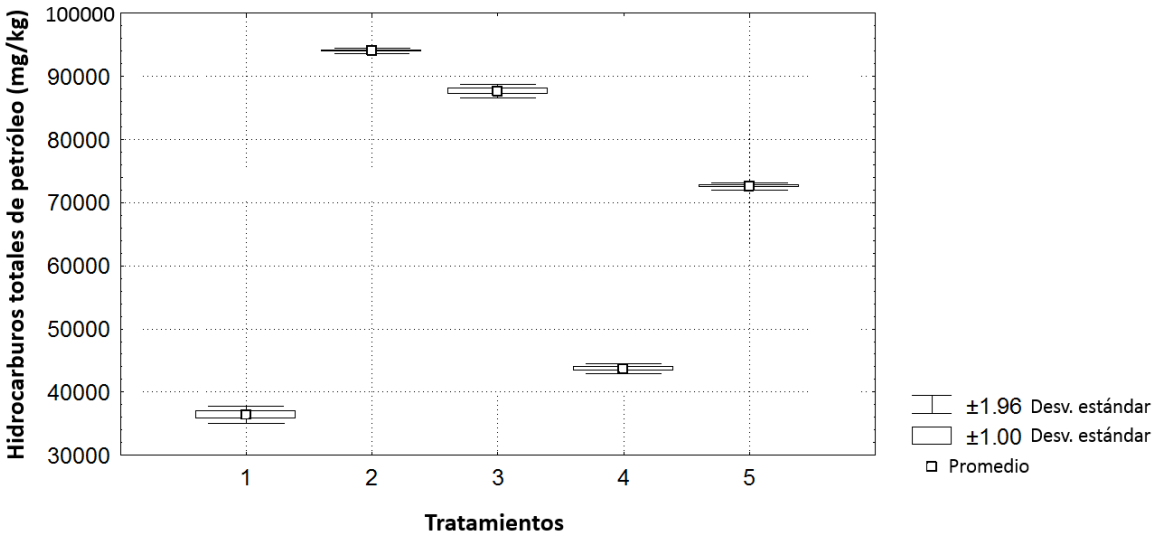


Figura 9. Valores promedio de la concentración de HTP a los 90 días del proceso de biorremediación.

Finalmente en el proceso de biorremediación a los 90 días se mantuvo la tendencia de mayor degradación para el tratamiento T1 con un valor de 64.93 % ($F=7651.330$, $p< 0.05$), disímil al valor obtenido en el tratamiento T4 con 57.89 % ambos tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$), por otro lado el resto de los tratamientos T2, T3 y T5 presentaron de igual manera diferencias estadísticamente significativas, obteniendo los siguientes valores 13.14 %, 15.50 % y 30.03 % respectivamente (Fig. 10).

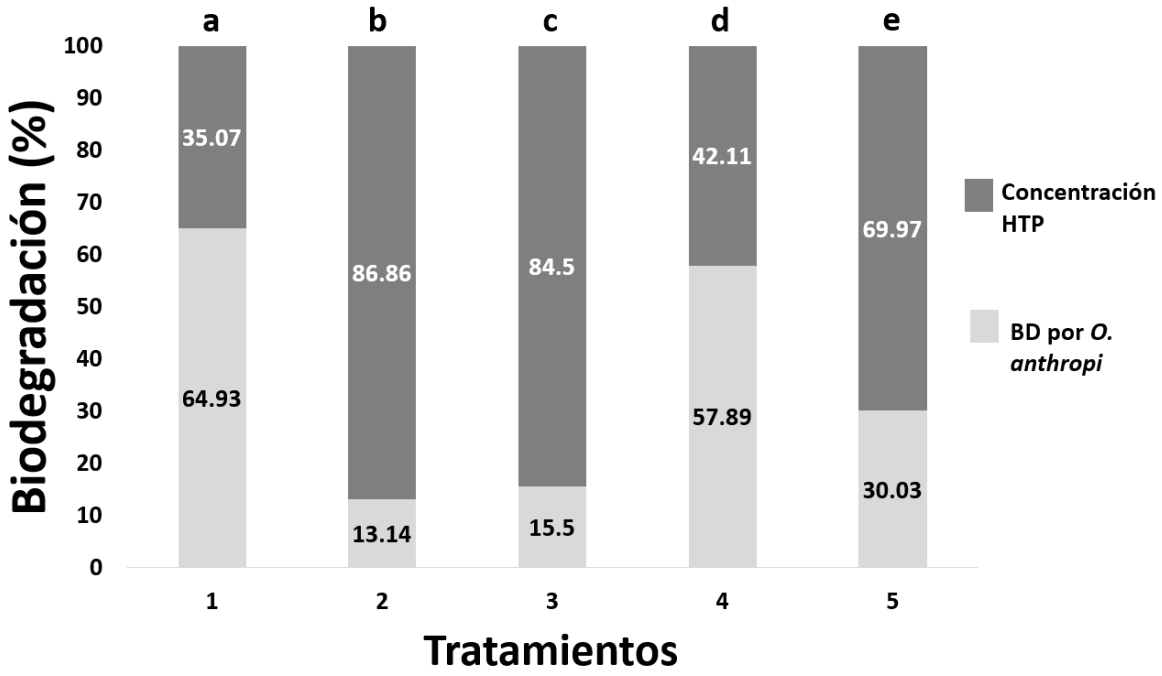


Figura 10. Valores promedio de la biodegradación de HTP a los 90 días del proceso de biorremediación. Las letras distintas en los tratamientos indican diferencias significativas (p<0.05).

Durante el periodo de 90 días que fue el tiempo de duración del proceso de biorremediación la degradación de los Hidrocarburos Totales del Petróleo fue estadísticamente significativa en los primeros 30 días de la fase experimental. Se obtuvo una degradación máxima de 38.70 % que corresponde al tratamiento T4, mientras que la menor degradación se registró en el tratamiento T2 con un 4.22 %. Posteriormente en el segundo periodo que corresponde del día 30 al día 60 se registró una degradación de 16.13 % más para el tratamiento T1, por otra parte se obtuvo 6.96 % más de degradación correspondiente al tratamiento T2, mientras que el tratamiento T3 evidenció la menor degradación con solo 3.99 %, en cuanto al tratamiento T4 se obtuvo un valor de 12.84 % y por último el tratamiento T5 registró

9.35 % más de remoción de HTP. Finalmente en el último periodo del proceso de biorremediación se logró obtener una remoción de 12.72 % más para el tratamiento T1, registrando un valor final de 64.93 % de degradación de HTP perfilándose como el mejor tratamiento, mientras que el tratamiento T2 obtuvo solo 1.96 % de degradación en este periodo de tiempo, posicionándose como el tratamiento con menor porcentaje de remoción de HTP con un valor final de 13.14 % (Fig.11).

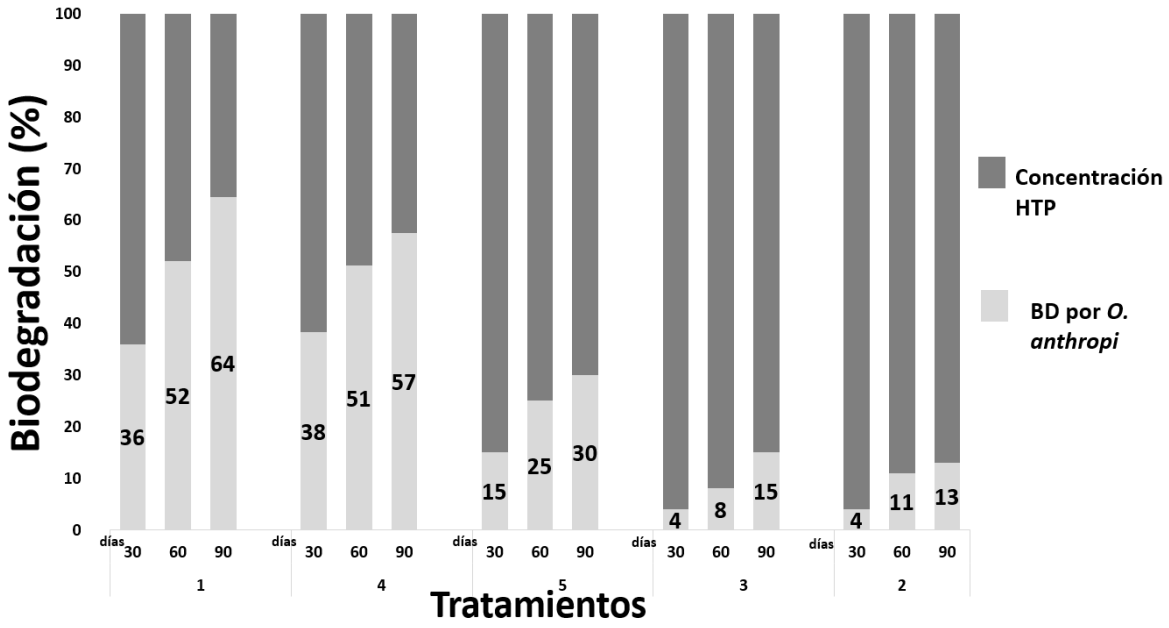


Figura 11. Valores promedio de la biodegradación de HTP a los 30,60 y 90 días del proceso de biorremediación.

VII. DISCUSIÓN

Entre los factores que influyen directamente en la degradación en un proceso de biorremediación se encuentra la composición, la concentración de la comunidad microbiana y la tasa de transformación de contaminantes, que a su vez, está influenciada por los factores ambientales, microbiológicos y de sustrato (Espinosa, 2006).

En los factores ambientales se incluyen humedad, aireación, temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes. Dentro de los factores microbiológicos se encuentran la presencia de microorganismos con rutas para la degradación de los compuestos de interés. Entre las propiedades del sustrato que pueden afectar a la biotransformación del contaminante se incluye la clase textural, debido a que desempeña un papel importante en los procesos de erosión y deposición. En el presente estudio los resultados obtenidos de la caracterización del sedimento contaminado por hidrocarburos en el estero adyacente a la playa Emiliano Zapata, municipio de Tuxpan mostraron una textura franco arenosa. De acuerdo a trabajos previos como el de García (2013) en el que también clasificó el sedimento de la misma área con una textura franco arenosa y Reyes (2017) que también presentó una composición textural franco arenosa proveniente del estero San Lorenzo municipio de Tamiahua, estos resultados se atribuyen principalmente a que ambos sedimentos fueron extraídos de esteros con influencia marina y por ende tienden a estar formados en su mayoría de arenas finas, lo que presenta una ventaja en

cuanto a la oxigenación en los procesos de biorremediación debido a que tiene más espacio entre sus partículas (Volkey Velasco, 2002; Reyes, 2017).

Por otro lado Muskus *et al*., (2013) y Torri *et al.*, (2018) obtuvieron la misma clase textural, en una matriz de estudio diferente a la del presente trabajo; sin embargo es importante mencionar que obtuvieron resultados de degradación mayores al 70% similar al porcentaje de degradación obtenido en el presente trabajo el cual fue de 64.93 %, lo cual se atribuye precisamente a la porosidad de la composición textural, ya que otros estudios llevados a cabo en la misma matriz de estudio pero con la clase textural franco arcillosa (Vallejo *et al*., 2005; Gómez *et al*., 2009; Ordaz *et al*., 2011 y Arrieta *et al*., 2012) han obtenido tasas de degradación menores.

En cuanto al pH registrado durante el proceso de biorremediación se obtuvo un valor promedio de 6.9, clasificado como muy ligeramente ácido, este valor se encuentra dentro del rango óptimo, el cual va de 6.0 a 8.0. El pH es un factor importante puesto que puede afectar significativamente la actividad microbiana por la biodisponibilidad de fuentes de carbono y energía, además influye en la asimilación de los nutrientes, ya que modifica la solubilidad, el estado y las características químicas de los compuestos contaminantes (Ríos, 2005; Lladó, 2012).

El resultado obtenido es similar al de Vallejo *et al*., (2015) quienes registraron un pH de 6.26 mientras que trabajos como los de Vallejo *et al*., (2005), Gómez *et al*., (2009), Arrieta *et al*., (2012) y Torri *et al*., (2018) registraron un pH entre 5.1 y 5.5 obteniendo para algunos casos bajos y altos porcentajes de degradación. Por otra parte Ordaz *et al*., (2011), San Martín *et al*., (2012), Garcia (2013), Muskus *et al*.,

(2013) y Mendo (2014) obtuvieron un pH entre 7.1 y 7.8 obteniendo en la mayoría de los casos porcentajes altos de degradación de hidrocarburos, similares a los obtenidos en el presente trabajo, ya que se logró una remoción de HTP mayor al 50 %. Por tal motivo es importante monitorear constantemente los niveles de pH debido a que condiciones altamente ácidas o alcalinas generalmente inhiben la actividad microbiológica (Espinosa, 2006).

La materia orgánica es una propiedad determinante en la biodegradación de contaminantes dado que favorece la absorción de compuestos, debido a que la fracción orgánica de los sedimentos está constituida por materia de desechos animal y vegetal que generalmente se le conoce como humus, lo cual tiene relación ya que dicha materia aumenta proporcionalmente al grado de contaminación a causa de los derrames de hidrocarburos en la zona, ya que provoca la muerte de organismos y con el paso del tiempo; la acumulación de materia orgánica en los sedimentos (Espinosa, 2006; Reyes, 2017). La materia orgánica registrada para esta investigación fue de 16 % que se considera extremadamente rica, de acuerdo con Gómez *et al*., (2009), Ordaz *et al*., (2011), Arieta *et al*., (2012), San Martín *et al*, (2012), Mendo (2014) y Vallejo *et al*., (2015), quienes también reportan la clasificación de extremadamente rica en cuanto a este parámetro.

Con respecto a la densidad aparente obtenida en los sedimentos contaminados se obtuvo un valor de 1.04 g/cm^3 que se consideró como baja al igual que García (2013) quién reportó para la misma área de estudio un valor de 1.08 g/cm^3 que es interpretado como baja, por su parte, San Martin *et al,* (2011) también registran una densidad aparente baja en un área de estudio diferente, con un valor de 1 g/cm^3 ,

así como también los estudios realizados por Vallejo *et al*., (2005), Gómez *et al*., (2009), Ordaz *et al*., (2011) Arrieta *et al*., (2012) y Vallejo *et al*., (2015) quienes reportan valores similares a los obtenidos, catalogados como densidad aparente baja. Sin embargo es importante mencionar que los valores de este parámetro pueden variar de acuerdo al estado de agregación del suelo, contenido de agua y la proporción del volumen ocupado por los espacios intersticiales. Cuando la densidad aparente aumenta, se incrementa la compactación y se afectan las condiciones de retención de humedad y disponibilidad de nutrientes (Haddad, 2004), aspectos importantes que se deben tomar en cuenta para lograr un proceso de biorremediación exitoso.

En el presente trabajo se evaluó el proceso de biorremediación de sedimentos contaminados con hidrocarburos mediante un diseño experimental con diferentes estímulos para cada tratamiento. El tratamiento T1 fue el que demostró la mayor remoción del contaminante con un valor de 64.93%, estadísticamente similar al tratamiento T4 con una remoción del 57.89 %, esto se atribuye a la actividad metabólica bacteriana, debido a que ambos tratamientos contenían el estímulo de la biaumentación, estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores quienes también obtuvieron mayores porcentajes de remoción mediante el incremento de la cepa bacteriana sometida a la degradación y para algunos casos la adición del bioventeo incrementó más la tasa de remoción de HTP, puesto que se destaca que al utilizar en conjunto las técnicas de bioventeo, biaumentación 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, similar a los obtenidos en este estudio.

Por otra parte el tratamiento T2 se posicionó como el tratamiento con el menor porcentaje de degradación con un valor de 13.06 %, debido a que no contenía ningún estímulo, sin embargo tampoco presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento T3 que contenía el estímulo de bioestimulación, ya que para este tratamiento se registró una degradación de 15.50 % y su resultado precisamente se atribuye a que no contenía inoculo bacteriano, como lo mencionan algunos autores en sus trabajos (Gómez *et al*. 2009; Muskus *et al*. 2013; Ruiz-Marín *et al.,* 2013; Hernández-Cervantes, 2016; Reyes, 2017; Hernández, 2019). Por último el tratamiento T5 que se le aplicó el estímulo de bioventeo obtuvo una degradación de HTP de 30.03 % que fue bastante buena para carecer de la bioaumentación, sin embargo la tasa de degradación pudo haberse elevado debido al efecto de volatilización de los hidrocarburos incluyendo la fotodegradación.

En el presente trabajo fue evidente la importancia de la bioaumentación bacteriana, debido a que los valores más altos de degradación se obtuvieron en los tratamientos que contenían la cepa bacteriana *Ochrobactrum anthropi*, similar a los resultados obtenidos por Ruiz-Marín *et al.,* (2013) quienes llevaron a cabo un proceso de biodegradación en sedimento de mangle, obteniendo mayores porcentajes de degradación mediante la técnica de bioaumentación con un valor de 40.3 %

mientras que por atenuación natural solo obtuvieron un 4.51 % de remoción de hidrocarburos.

En el presente estudio se registró un contenido inicial de hidrocarburos de 103, 714.47 mg de HTP /kg de sedimento, según la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 que establece los límites máximos permisibles de contaminación en suelos afectados por hidrocarburos, la caracterización del sitio y procedimiento para la restauración en suelos de uso agrícola, forestal, recreativo y de conservación; indica que el valor máximo permisible es de 3,000 mg/kg. Durante el proceso de biorremediación no se logró entrar dentro de los límites máximos permisibles según la norma antes mencionada, sin embargo se consiguió la disminución del contenido de Hidrocarburos Totales del Petróleo hasta un 64.93 % mediante la aplicación de las técnicas de bioestimulación, bioaumentación y bioventeo.

VIII. CONCLUSIONES Y APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO

8.1.- Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo de intervención se concluye que:

- Los parámetros físicos de las muestras de sedimento contaminado por hidrocarburos del estero adyacente a la playa Emiliano Zapata, ejido el sacrificio, Tuxpan, Veracruz, mostraron una textura franco arenosa y una densidad aparente baja de 1.04 g/cm^3, considerado como muy fuertemente salino de acuerdo al valor obtenido en la conductividad eléctrica de 4, 819 µS y una salinidad de 3.03 ppm.
- Los análisis químicos del sedimento evidenciaron un valor extremadamente rico en la materia orgánica, con 16 % y alto en carbonatos registrando un porcentaje de 24.98 %. El pH se mostró con un valor promedio de 6.9 durante el proceso de biorremediación.
- Los resultados más satisfactorios se obtuvieron de los tratamientos con bioaumentación bacteriana. El tratamiento T1 con bioestimulación, bioaumentación y bioventeo, al igual que el tratamiento T4 con biaumentación, registraron una biodegradación de HTP de 64.93 % y 57.89 % respectivamente durante los 90 días.

- La capacidad hidrocarburolítica de la cepa bacteriana *Ochrobactrum anthropi* es mejor con bioestimulación y bioventeo.
- La muestra de sedimento contaminado tuvo una concentración inicial de Hidrocarburos Totales del Petróleo de 103, 714.47 mg/kg logrando una disminución en la concentración final de 36, 372.74 mg/kg.

8.2.- Aplicación práctica del trabajo

El proceso de biorremediación a muestras contaminadas por hidrocarburos del presente trabajo se aplicó *ex situ* y bajo condiciones controladas, en el cual se obtuvo una mayor eficiencia de degradación al aplicar de manera conjunta las técnicas de bioestimulación, bioaumentación y bioventeo. Lo que contribuye a confirmar la capacidad hidrocarburolítica de la cepa bacteriana *Ochrobactrum anthropi* y su viabilidad en la aplicación de procesos de degradación de hidrocarburos. Siendo esta una tecnología eficiente para minimizar los impactos ambientales generados por derrames de productos del petróleo y sus derivados en el área afectada, además de ser una tecnología amigable con el ambiente es económica en comparación con los tratamientos convencionales de remoción de hidrocarburos, por tal motivo se propone un proceso de biorremediación a escala piloto de los sedimentos contaminados, para evaluar si se conserva la misma tasa de degradación con las nuevas condiciones ambientales.

La primera etapa consistiría en llevar a cabo la metodología como se explica en el presente trabajo, tomando en cuenta que la cinética de degradación puede ser

mejorada al adicionarle nutrientes y bioventeo. Se requerirá la valoración de los factores físicos y químicos tales como: temperatura, pH, materia orgánica, geoquímica del contaminante, entre otros.

Se requeriría la instalación de un sistema de bioventeo en la planta piloto donde se llevará a cabo el proceso de biorremediación para lograr estimular la actividad metabólica bacteriana por medio de la inyección de aire a través de una bomba de aireación. Para lograr una bioventilación adecuada, se deberán instalar un sistema de canales en varios puntos estratégicos y a través de ellos se adicionará la cepa bacteriana bioaumentada para acelerar el proceso de degradación del contaminante. Posterior a la aplicación de la bioaumentación se adicionarían los nutrientes de forma quincenal durante el proceso de biorremediación, cuidando las condiciones correctas y necesarias de nitrógeno y fósforo a manera de que los microorganismos tengan acceso a ellos.

Por último, se deberán realizar análisis del sedimento de forma periódica (quincenal) para medir los niveles de nutrientes, así como las concentraciones de hidrocarburos totales del petróleo (mensualmente).

Recomendaciones

- La aplicación de surfactantes anfóteros en un proceso de biorremediación es una alternativa recomendable, debido a que actúa en el incremento de la biodisponibilidad del hidrocarburo mediante la desorción y solubilización del contaminante, permitiendo así la transferencia de masa y consecuentemente la biodegradación.
- Adicionar algún texturizante orgánico al sedimento, ya que ayuda a elevar la tasa de degradación debido a que mejora la porosidad del sedimento y aporta nutrientes, algunas alternativas pueden ser la hoja de plátano, gabazo de caña, tallos de algodón, aserrín de pino, por mencionar algunos.
- Aumentar el tiempo de inyección de aire para evitar alguna limitación en la transferencia de oxígeno.
- Para lograr una mayor probabilidad de éxito se recomienda llevar a cabo el proceso de biorremediación en temporadas de temperaturas altas para evitar el aletargamiento de las bacterias.
- El uso de fertilizantes inorgánicos en sedimento de manglar coadyuva a acelerar la degradación de hidrocarburos, promoviendo los procesos naturales de eliminación de los mismos, transformándolos en sustancias inocuas (Ángeles, 2015).
- Se recomienda la aplicación de las técnicas de bioestimulación, bioaumentación y bioventeo como alternativas en el proceso de biorremediación que se propone a escala piloto.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Adams, R. H., Domínguez, V. I. Y García, L. 1999. Bioremediation Potential of Oil Impacted Soil and Water in the Mexican Tropics. *Terra*.17 (2) 331–349.

Ángeles, T. R. 2015. Evaluación de la degradación de hidrocarburos en microcosmos de manglares utilizando la tecnica de bioestimulación. Tesis de Maestría, Universidad Veracruzana, Tuxpan, México.

Akoijam, C., Sing, J., Chettri, B. y Kumar A. 2015. Cyanobacterial diversity in hydrocarbon-polluted sediments and their possible role in bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 103, 97-104.

Alemán, A. M. 2009. Determinación de hidrocarburos totales del petróleo en suelos y sedimentos de la cuenca del rio Coatzacoalcos. Tesis de Ingeniería. Universidad Veracruzana. Coatzacoalcos Veracruz.

Arrieta, R. O. M., Rivera, R. A. P., Arias, M. L., Rojano, B. A., Ruiz, O. y Cardona, G. S. A. 2012. Biorremediación de un suelo con diesel Mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Revista Gestión y Ambiente*. 15 (1): 27-39.

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)

Aujoulat, F., Roger, F., Bourdier, A., Lotthé, A., Lamy, B. y Jumas-Bilak, E. 2012. From Environment to Man: Genome Evolution and Adaptation of Human Opportunistic Bacterial Pathogens. *Genes*. 3 (2): 191-232.

Benavides, L. J., G. Quintero, A. L. Guevara, D. C. Jaimes, S. M. Gutierrez y J. Miranda. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA*. 4(5): 82-90.

Botello, A.V., 2005. Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo, p. 261 268. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, *2da Edición. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología*. 696 p.

Calvo, C., Silva-Castro, A., Uad, I., García, C., Laguna, J. y González-López, J. 2008. Efficiency of the EPS emulsifier produced by *Ochrobactrum anthropi* in different hydrocarbon bioremediation assays. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 35: 1493-1501.

Campillay, C. A. 2006. Determinación de hidrocarburos totales del petróleo. Tesis de licenciatura. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Caso, M, I. Pisanty y E. Ezcurra. 2004. Diagnóstico ambiental del Golfo de México, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología.Mexico.961p.

Catania, V., Santisi, S., Signa, G., Vizzini, S., Mazzola, A. Cappello, S., Yakimov, M. y Quatrini, P. 2015. Intrinsic bioremediation potential of a chronically polluted marine coastal área. *Marine Pollution Bulletin*. 1-12 pp.

Cervantes, S. A. 2017. Evaluación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) de sedimentos contaminados del estero Emiliano Zapata, Tuxpan, Veracruz. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana, Tuxpan, México.

Crescencio, H. 2007. Metodología analítica para la determinación de hidrocarburos fracción media en muestra de suelos. Tesis de Licenciatura. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas. México, D.F.

EPA. 1996. Method 3540C. Soxhlet extraction. United States Environmental Protection Agency, SW-846 Manual. Washington, DC: Government Printing Office. 1-8 pp.

Espinosa, E. I. 2006. Perfiles radiales de cinéticas de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, tratados en biopilas. Tesis de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF.

Fantroussi, S. y Agatha, S. 2005. Is Bioaugmentation a Feasible Strategy for Pollutant Removal and Site Remediation?. *Current Opinion in Microbiology*. 8: 268-275.

Farag, S. y Soliman N. A. 2011. Biodegradación del petróleo y ambientales contaminantes derivados del petróleo crudo por *Candida tropicalis* cepa. Braz. Arco. *Biology and Technology*. 54 (4): 821-830.

Fernández, L. L. C., N. G. Rojas, T. G. Roldan, M. E. Ramírez, H. G. Zegarra, R. Uribe, R. J. Reyes, D. Flores y J. M. Arce. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo, Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. México, D. F.

Fletcher, R. 2000. Practical Considerations during Biorremediation. University of Pittsburg. Pittsburg Pennsylvania.

Fonti, V., Beolchini, F., Rocchetti, L. y Dell'Anno, A. 2015. Bioremediation of contaminated marine sediments can enhance metal mobility due to changes of bacterial diversity. *Water Research*. 68, 637-650.

García, B. I. S. 2013. Biorremediación en microcosmos de sedimentos contaminados por hidrocarburos mediante la técnica de bioaumentación. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana, Tuxpan, México.

Gómez, W., Gaviria, J. y Cardona, S. 2009. Assessment of the biostimulation against bioaugmentation and natural attenuation on contaminated soil with diesel-gasoline mixing. *Dyna*. 160, 83-93.

Guttman, H. S., Youngren, S. y Tucker, K. P. 2016. The Biologists' Forum: Environmental microbial community analysis methods as applied to bioremediation. *BIOS*. 87 (3): 85-95.

Haddad, N. 2004. Introduction – Why Study Earth System Science. Pagina de internet. Cambridge, TERC. Disponible en:

http://serc.carleton.edu/files/eet/globe/EarthSysInt.pdf. (Consultado en septiembre de 2019).

Hernández, C. G. 2016. Aplicación de biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales en sedimentos. Tesis de Especialidad, Universidad Veracruzana, Tuxpan, México.

Lastra, B. M. M. 2010. Biorremediación ex-situ de un suelo contaminado de la laguna de Marland en Ebano, San Luis Potosí. Por la tecnología de biolabranza. Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Tuxpan. Veracruz. México. 62p.

Lladó, F. S. 2012. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas. Tesis de Doctorado, Universitat de Barcelona, Barcelona.

Martínez-Prado, A., Pérez-López, M. E., Pinto-Espinoza, J., Gurrola-Nevárez, B. A. y Osorio-Rodríguez, A. L. 2011. Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 27(3): 241-252.

Maruri, J. M. 2008. Uso y Manejo de suelos. Manual de prácticas. Universidad Veracruzana. 128 pp.

Mendo, P.W. 2014. Alternativa de biorremediación con bacterias autóctonas de sedimento contaminado de la Laguna de Tamiahua, Veracruz, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana, Tuxpan, Veracruz.

Muñoz, F., Barriga, R., Cabrera, M., Vera, E. y López, C. 2010. Identificación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) en peces y sedimentos en la zona de Shushufindi, Sucumbios, Ecuador (primera parte). *Revista Politécnica*. 29 (1): 143–149.

Muskus, M. A. M., Santoyo, M. C. y Plata, Q. L. S. Evaluación de las técnicas de atenuación natural, bioventing, bioaumentación y bioaumentación-bioventing, para la biodegradación de diésel en un suelo arenoso, en experimentos en columna. *Revista Gestión y Ambiente*. 16 (2): 83-94.

Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. 67 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.

Ñústez, D. C. 2012. Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible. Tesis de Maestría. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia.

Ñústez, D. C., Paredes, D. y Cubillos, J. 2014. Bioremediation for degradation of total hydrocarbons present in the sediments of a fuel service station. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad de Zulia.* 37 (1): 20 – 28.

Ordaz, J. A., Martínez, T. A., Ramos, M. F. R., Sánchez, D. L. F., Martínez, A. J., Tenorio, L. J. A. y Cuevas-Díaz, M. C. 2011. Biorremediación de un suelo

contaminado con petróleo mediante el empleo de bagazo de caña con diferentes tamaños de partícula. *Multiciencias*. 11 (2): 136-145.

Petro, P. E. y Mercado, G. 2014. Biorremediación de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos derivados del petróleo en Colombia. Diplomado en procesos químicos. Universidad de San Buenaventura seccional Cartagena. Cartagena de Indias, Colombia.

Ponce Vélez, G., y A. V. Botello, 2005. Niveles de hidrocarburos en el Golfo de México, p. 269-298. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. *Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología.* 696 p.

Pucci, G. N., Acuña, A., Tonin, N., Tiedemann, M. C. y Pucci, O. H. 2010. Diversity of culturable bacteria capable of degrading hydrocarbons from the beach of Caleta Córdova, Argentina. *Revista Peruana de Biología*. 17(2): 237 – 244.

Quirino, A., Pulcrano, G., Rametti, L., Puccio, R., Marascio, N., Catania, M. R., Matera, G., Liberto, M. C. y Foca, A. 2014. Typing of *Ochrobactrum anthropi* clinical isolates using automated repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction DNA fingerprinting and matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry. *BMC Microbiology*. 14 (74): 1-8.

Reda A. I. Abou-Shanab, Eraky, M., Haddad, A. M., Abdel-Rahman B. Abdel Gaffar., Salem, A. M. 2016. Characterization of Crude Oil Degrading Bacteria Isolated from

Contaminated Soils Surrounding Gas Stations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 97 (5): 684-688.

Reyes, V. E. 2017. Proceso de biorremediación bacteriana en sedimento contaminado de industria petrolera. Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana, Tuxpan, México.

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.

Rodríguez, A. S. 2014. Aislamiento e identificación de bacterias hidracarburoclastas de suelo contaminado del sur del estado de Veracruz. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Químicas. Xalapa, Veracruz. México.

Romano, S., Aujoulat, F., Jumas-Bilak, E., Masnou, A., Jeannot, J., Falsen, E., Marchandin, H. y Teyssier, C. 2009. Multilocus sequence typing supports the hypothesis that *Ochrobactrum anthropi* displays a human-associated subpopulation. *BMC Microbiology.* 9 (267): 1-18.

Ruiz-Marín, A., J. C. Zavala-Loria, Y. Canedo-López y A. V. Cordova-Quiroz. 2013. Aislamiento de bacterias trópicales en suelo de mangle contaminado por hidrocarburos: biorremediación por atenuación natural y bioaumentación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 12(3): 553-560.

Sadeghi haddad zavareh, M., Ebrahimipour, G., Shahriari Moghadam, M., Fakhari, J y Abdoli, T. 2016. Bioremediation of Crude Oil Using Bacterium from the Coastal Sediments of Kish Island, Iran. *Iranian Journal of Public Health*. 45 (5): 670-679.

San Martín, A. P., M. L. Salas S., E. Zarza M. y R. I. Hernández H. 2012. Biorremediación de sedimentos contaminados de la laguna de Tamiahua, Veracruz (una propuesta de remediación ambiental). *Academia Mexicana Multidisciplinaria*. 2(1): 1-5.

Torri, S. I., Cabrera, M. N. y Alberti, C. 2018. Respiración potencial durante la bioestimulación de un suelo contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 34 (1): 127-136.

US EPA 3541. 1994. Automated soxhlet extraction SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical method. 1-4 pp.

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.

Vallejo, Q. E. V., Sandoval, C. J. J., Garagoa, B. S. C. y Bastos, A. J. 2015. Evaluation of the biostimulation over the bioremediation of hydrocarbons in contaminated soils with tar in Soacha, Cundinamarca- Colombia. *Biodiversity and Ecosystem Services*. 65 (4): 354-36.

Vidal, E. 2018. El estudio de impacto ambiental en la mediación para la ocupación superficial surgida de la reforma energética en México. *Perfiles de las Ciencias Sociales*. 5 (10): 1-26 pp.

Viñas, L., Bellas, J., Besada, M. V., Franco, M. A., Fumega, J. y González-Quijano, A. 2012. Demarcación Canaria Evaluación inicial y buen estado ambiental Descriptor 8: Contaminantes y sus efectos. *Instituto Español de Oceanografía, Madrid, España*. 29 pp.

Volke, T. y Velasco, J. A. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. México. 62 pp.

Wu, B., Lan, T., Lu, D. y Liu, Z. 2014. Ecological and enzymatic responses to petroleum contamination. *Environmental Science: Processes & Impacts*. 16 (6): 1501 – 9.

Zuo, Y., Defeng, X., Regan, J. M., Bruce, E., L. 2008. Isolation of the Exoelectrogenic Bacterium *Ochrobactrum anthropi* YZ-1 by Using a U-Tube Microbial Fuel Cell. *Applied and Enviromental Microbiology*. 74 (10): 3130 p.

X. ANEXOS

10.1.- Textura por medio del hidrómetro de Bouyoucos

Materiales: Suelo seco, balanza granataria, batidora de fuente de sodas, pipetas de 10 ml, hexametafosfato de sodio, oxalato de sodio, agua destilada, cronometro, probeta de 1 lt, un densímetro de bouyoucos, pizeta de 250 ml, varilla ex profeso, alcohol amílico y termómetro.

Procedimiento:

1. Después de que el suelo se ha secado, pese y coloque 50 g en el vaso de la batidora.
2. Agregue con una pipeta los dispersantes: 10 ml de metasilicato de sodio y 10 ml de oxalato de sodio.
3. Adicione 250 ml de agua destilada.
4. Agite durante 10 minutos como mínimo para muestras de textura gruesa (arenosos) y hasta 30 minutos para las de textura fina (arcillosos).
5. Vacié el contenido del vaso de la batidora en una probeta con capacidad de un litro, procurando que no quede nada de suelo en el vaso.
6. Aforar inicialmente a 800 ml y después, con el densímetro adentro, aforar a los 1,000 ml con la ayuda de una pizeta con agua destilada.
7. Saque el densímetro y agite con una varilla ex profeso, moviéndola de arriba hacia abajo, para que las partículas de la muestra de suelo queden homogéneamente distribuidas en todo el volumen de la probeta. Para lograr lo anterior, es necesario

tirar con fuerza de la varilla de agitación para que de esta manera el suelo que permanece en el fondo se ponga en suspensión. Durante esta operación, la probeta se debe sostener fuertemente con la mano. Cuando la suspensión se haya mezclado totalmente, se retirara la varilla.

8. Con el cronometro en mano, después de haber retirado la varilla, empiece a contar 40 segundos, mientras tanto introduzca cuidadosamente el hidrómetro. Si en la superficie de la suspensión de la probeta se presenta abundante espuma, agregue unas gotas de alcohol amílico.
9. A los 40 segundos, mida el primer valor de densidad con el hidrómetro en la parte superior del menisco (anótelo en el cuadro de resultados). Enseguida realiza la lectura de temperatura.
10. Retire con cuidado el hidrómetro y termómetro y téngalos limpios para repetir la operación 2 horas después.

NOTA: Cada vez que se tenga que medir la densidad de la suspensión, el hidrómetro se debe introducir 20 segundos antes del tiempo indicado. Si por alguna razón se pasa del tiempo establecido, agite otra vez la suspensión como se indica en la instrucción correspondiente y proceda de nuevo. Esto es válido únicamente para la primera lectura.

10.2.- Densidad aparente por el método de la probeta

Materiales: Franela, tapón de hule, probeta de plástico de 50 ml, suelo seco y tamizado.

Procedimiento:

1. Pese 40 g de suelo seco y tamizado.
2. Coloque el suelo en una probeta de plástico de 50 ml.
3. Tápelo con un tapón de hule.
4. Sobre una base, golpee la probeta 30 veces, con frecuencia de un golpe por segundo y con una trayectoria vertical de 30 cm.
5. La intensidad de cada golpe debe permitir el asentamiento del suelo y no la emisión del mismo hacia la boca de la probeta.
6. Concluida la serie de golpes, lea el volumen final que ocupa el suelo y anote el dato.

Formula: DA= 50/ vol. de la muestra.

10.3.- Determinación del pH y conductividad eléctrica por la técnica del multiparámetro.

Materiales: Muestra de suelo, vaso de precipitado de 100 ml, agua destilada, cápsula magnética, vidrio de reloj, agitador magnético, papel filtro, multiparámetro oakton PCSTestre35 waterproof.

Procedimiento:

1. Pesar 20 g de suelo seco y colocarlos en un vaso de precipitado de 100 ml.
2. Agregar 40 ml de agua destilada, la capsula magnética y cubrir con un vidrio de reloj.
3. Colocar el agitador magnético y darle 5 minutos de tiempo. Filtre en un tubo de ensaye.
4. Pasado el tiempo de agitación y filtración, mida el pH de la muestra introduciendo el multiparámetro en la suspensión del suelo, espere 20 segundos, enciéndalo y tome la lectura directamente del multiparámetro hasta que no haya variación en la caratula numérica.
5. Apague el multiparámetro, y con ayuda de una pizeta lávelo cada vez que este sea introducido en una solución o suspensión, y con papel filtro o papel higiénico quite el exceso de agua con precaución para no dañar su sensible membrana.

10.4.- Determinación de la materia orgánica por la técnica de Walkley y Black

Materiales: suelo seco, dos matraces Erlenmeyer, bureta 25 ml. dicromato de potasio 1N, campana de extracción de gases, ácido sulfúrico concentrado, agua destilada, ácido fosfórico, indicador de difenilamina y sulfato ferroso 0.5N.

Procedimiento:

1. Pese 0-5 g y 0.2 de suelo seco previamente tamizado.
2. Coloque cada muestra de suelo en un matraz Erlenmeyer. Es recomendable trabajar y correr uno blanco (agregue a un matraz los mismos reactivos, MENOS suelo. El blanco nos permite calcular la normalidad real del sulfato ferroso, obtener el porcentaje de MO al momento de hacer los cálculos correspondientes y conocer el viraje durante la titulación.
3. Agregue una pipeta 10 ml de dicromato de potasio 1N y agite suavemente.
4. Bajo la campana de extracción de gases, agregue con mucho cuidado, 20 ml de ácido sulfúrico concentrado, dejando resbalar el ácido por las paredes del matraz. Mezcle con precaución ya que se desprenden gases.
5. Agite por un minuto y deje 30 minutos en reposo.
6. Agregue 200 ml de agua destilada a cada matraz.
7. Adiciones 10 ml de ácido fosfórico.
8. Añada tres gotas del indicador difenilamina, poco antes de iniciar la titulación.
9. Llene una de las buretas con la solución sulfato ferroso 0.5N, cuidando que no queden burbujas en su interior.

10. Inicie la titulación, de preferencia con el blanco, mantenga un goteo constantes de la solución de sulfato ferroso y al mismo tiempo, agite el contenido del matraz para poder apreciar el cambio de color de cada solución.
11. Al principio de la titulación, el color de la solución puede ser verde botella o pardo, e irá cambiando a un color azul, el cual se oscurece un poco antes de que se realice el viraje a un color verde esmeralda brillante. Al obtenerse este cambio, suspenda la titulación y anote el volumen del sulfato ferroso gastado en cada una de las diferentes muestras.
12. Realizar los cálculos.

Formula:

%**M.O=** 10(1-S/B) (K´)

10.5.- Determinación de carbonatos por el método valorimétrico

Material: muestras de suelo, ácido clorhídrico, fenolftaleína, hidróxido de sodio 0.25N, vidrio de reloj, balanza granataria, matraces Erlenmeyer de 150, 250 y 500 ml, probeta de 100 ml, bureta de 25 ml, vaso de precipitado de 150 ml y jeringa de 10 ml.

Procedimiento:

1. Pesar 20 g de suelo seco y tamizado.
2. Colocar los 20 g de suelos en un vaso de precipitado de 150 ml.
3. Agregue exactamente 40 ml de HCl, cubrir con un vidrio de reloj y hervir suavemente durante 5 minutos.
4. Enfriar, filtrar y lavar todo el ácido que haya en la muestra con agua destilada.
5. Agregue 3 gotas de fenolftaleína y titular con hidróxido de sodio 0.25 N. Anotar la cantidad de ml gastados
6. Realizar los cálculos.

Formula:

$CaCO_{3=}$ 50 X N de HCl-ml de NaOH X N de NaOH/gr de muestra

Formulario de autorización de publicación en el Repositorio Institucional

Universidad Veracruzana
Dirección General de Bibliotecas

Fecha de entrega: 20 de marzo de 2020

1. Identificación del documento y autor

Nombre del autor:	Vicky Estefany Reyes Solís
Correo electrónico:	biol.estefany_solis@hotmail.com

Facultad: Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Programa académico: Maestría en Ciencias del Ambiente

Título del documento: Biorremediación de sedimentos contaminados por hidrocarburos empleando la bacteria *Ochrobactrum anthropi* a diferentes técnicas de estimulación

Tipo de documento			
Tesis de licenciatura:	( )	Tesis doctoral:	( )
Tesis de maestría:	(X)	Otro:	( )
Parte de un libro	( )	Objeto de aprendizaje:	( )
Disertación	( )	Otro	( )

Temas del trabajo recepcional: (palabras clave de 5 términos):

Bioaumentación, Bioestimulación, Bioventeo, Degradación.

2. Autorización de la publicación de la versión electrónica del documento

En consonancia con lo dispuesto por El Abogado General de nuestra Universidad, en el Oficio AG/884/2106, en mi carácter de licenciante, doy mi autorización a la Dirección General de Bibliotecas para que este trabajo recepcional sea publicado en el repositorio institucional de la Universidad.

Vicky Estefany Reyes Solís

Nombre y firma

3. Tipo formato del documento:

PDF:	(X)	Otro, especifique:	