UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Región Poza-Rica Tuxpan

MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

TRABAJO DE INTERVENCIÓN

BIORREMEDIACIÓN DE SUELO CONTAMINADO POR HIDROCARBUROS MEDIANTE BIOPILAS UTILIZANDO BIOAUMENTACIÓN BACTERIANA Y TEXTURIZANTE DE PLÁTANO

PRESENTA:

Biol. Néstor Daniel Romero García

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera

CO-DIRECTOR:

Dr. Pablo San Martín Del Ángel

Tuxpan, Ver. ENERO 2021

El presente trabajo de intervención titulado **"Biorremediación de suelo contaminado por hidrocarburos mediante biopilas utilizando bioaumentación bacteriana y texturizante de plátano"**, realizado por el C. Biólogo Néstor Daniel Romero García, bajo la dirección de la Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera y asesoría del Dr. Pablo San Martín Del Ángel, ha sido revisado y aprobado como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO ENCIENCIAS DEL AMBIENTE

DRA. ROSA IDALIA HERNÁNDEZ HERRERA

DIRECTORA

DR. PABLO SAN MARTÍN DEL ÁNGEL

ASESOR

Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS DEL AMBIENTE

Revisión del Trabajo de Intervención del alumno: **Néstor Daniel Romero García**

JURADO EXAMINADOR

NOMBRE	FECHA	DICTAMEN	FIRMA
Dra. María Rebeca Rojas Ronquillo	15/01/2021	APROBADO	
Dr. Israel Hernández Romero	15/01/2021	APROBADO	
Dra. Laura Lucero Álvarez Molina	18/01/2021	Aprobado	

En la presente revisión se acordó que el Trabajo de Intervención denominado "**Biorremediación de suelo contaminado por hidrocarburos mediante biopilas utilizando bioaumentación bacteriana y texturizante de plátano**" que presenta el sustentante para obtener el Grado de Maestro, está terminado por lo que puede proceder a su inmediata impresión.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por darme valor, fuerza y sobre todo la esperanza de llevar a cabo este trabajo.

Agradezco a mis directores de tesis Dr. Pablo San Martín del Ángel y a la Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera por su confianza y apoyo para la realización de este trabajo.

A la Universidad Veracruzana, por permitirme llevar a cabo mis estudios de licenciatura y de posgrado.

A Conacyt por haberme otorgado la beca y haber contribuido a la realización de este trabajo.

A los miembros de la comisión revisora integrada por la Dra. Doctora Laura Lucero Álvarez Molina, Dra. María Rebeca Rojas Ronquillo y al Dr. Israel Hernández Romero, gracias por su tiempo, observaciones y sugerencias que han permitido la mejora de este trabajo.

A la Dra. Rocío Rodríguez Cabrera y al Mtro. José Manuel Maruri García, por sus consejos para la realización del muestro en este trabajo y por el apoyo para el análisis fisicoquímico en el laboratorio de suelos.

A la Dra. Diana Laura Díaz Inocencio, por la facilitación del equipo y material para realizar la cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo en el laboratorio de bromatología. Así como, al Mtro. Jordán Gutiérrez Vivanco, Mtro. Sergio Omar Nieto

Rosaliano y Dra. María Rebeca Rojas Ronquillo por facilitarme equipos para el desarrollo de esta investigación.

A mis amigos del laboratorio de biotecnología ambiental, Biol. Yolanda Hernández de la Cruz, Biol. Estefany Reyes Solís, Biol. Zayda Patricia Navarrete Sánchez, Biol. Mar. Marian Alejandra Soto Reazola, Ing. Petrolera Paloma Alejandra Sosa Lara y al Ing. Químico Irvin Vidal Briseño, por sus consejos, amistad y buenos momentos en el laboratorio.

A mis amigos, compañeros y maestros de la Maestría en Ciencias Ambientales.

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

DEDICATORIA

A mis padres por apoyarme en todos los aspectos y en la decisión de seguir estudiando, por ser mi motivación y orgullo para esforzarme y seguir adelante, por estar conmigo siempre que los he necesitado, por aconsejarme en nunca dejar de buscar a Dios sobre todas las cosas… Los amo.

“En mis triunfos tu gloria será”

Philippe

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN 1
II. ANTECEDENTES 4
2.1 Breve historia del pozo Dos Bocas 4
2.2 Factores que condicionan la biorremediación de un suelo 6
2.2.1 Aspectos metabólicos 6
2.2.2 Disponibilidad de nutrientes 7
2.2.3 Oxígeno 8
2.2.4 Salinidad 8
2.2.5 Estructura química del hidrocarburo 9
2.2.6 Biodisponibilidad 10
2.3 Condiciones ambientales 10
2.3.1 Temperatura 10
2.3.2 pH 11
2.3.3 Humedad 11
3.0 Caracterización del suelo en la biorremediación 12
4.0 Bioaumentación en los procesos de biorremediación 17
5.0 Técnica de biopilas 19
5.1 Casos de estudio 21
5.2 Residuo agroindustrial 27
5.2.1 Plátano 27
III. OBJETIVOS 28
3.1 Objetivo general: 28
3.2 Objetivos específicos: 28
IV. HIPÓTESIS 29
V. ÁREA DE ESTUDIO 30
5.1 Localización 30
5.2 Orografía 30
5.3 Hidrografía 30

5.4 Clima 31
5.5 Principales ecosistemas 31
5.6 Recursos Naturales 31
5.7 Características y uso de suelo 31
VI. MATERIAL Y MÉTODOS 33
6.1 Selección del área de muestreo 33
6.2 Muestreo 33
6.3 Toma de la muestra 34
6.4 Manejo de las muestras 34
6.5 Análisis fisicoquímicos del suelo 35
6.6 Aislamiento bacteriano 36
6.7 Cultivo en agar 36
6.8 Purificación de las cepas bacterianas 36
6.9 Tinción de Gram 37
6.10 Selección de cepas bacterianas de acuerdo con su capacidad de degradación 37
6.11 Medición del crecimiento bacteriano 37
6.12 Bioaumentación bacteriana 38
6.13 Cuantificación bacteriana 38
6.14 Esterilización del suelo 39
6.15 Agente texturizante 39
6.16 Aplicación de bacterias al suelo contaminado por hidrocarburos 40
6.17 Experimento de biopilas 40
6.17.1 Conformación de las biopilas 40
6.17.2 Diseño experimental 42
6.18 Determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) 42
16.18.1 Preparación de la muestra de suelo para la extracción 43
16.18.2 Extracción y cuantificación de hidrocarburos 43
6.19 Seguimiento del tratamiento por biopilas 44
6.20 Análisis estadísticos 45

VII. RESULTADOS 46
7.1 Caracterización del suelo contaminado 46
7.1.1 Análisis físico del suelo contaminado..... 46
7.1.2 Análisis químico del suelo contaminado 47
7.2. Purificación de cepas bacterianas hidrocarburolíticas axénicas. 49
7.3 Selección de cepas bacterianas de acuerdo con su capacidad de degradación 50
7.4 Cinética de crecimiento..... 51
7.5 Cuantificación bacteriana..... 52
7.6 Caracterización bromatológica del texturizante de plátano..... 52
7.7 Remoción de HTP..... 53
VIII. DISCUSIÓN..... 57
8.1 Caracterización del suelo en la biorremediación..... 57
8.2 Obtención de bacterias hidrocarburolíticas 60
8.3 Remoción de hidrocarburos 63
IX. CONCLUSIONES Y APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO..... 70
9.1 Conclusiones..... 70
9. 2 Aplicación práctica del trabajo..... 71
9. 3 Recomendaciones 73
X. BIBLIOGRAFÍA..... 74
XI.ANEXO……..99
Anexo A……...99
Anexo B……100
Anexo C……101

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro. 1. Texturizantes utilizados en procesos de biorremediación 22

Cuadro. 2. Distribución de tratamientos 42

Cuadro. 3. Determinaciones fisicoquímicas del suelo semanal y mensual durante el experimento 44

Cuadro. 4. Resultados del análisis físico del suelo 47

Cuadro. 5. Resultado del análisis químico del suelo 48

Cuadro 6. Análisis bromatológico del pseudotallo de plátano 52

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.1. Ubicación del Pozo Dos Bocas 32

Fig. 2. Distribución aleatoria de las biopilas 41

Fig.3. Proporción de arena, arcilla y limo del suelo contaminado 46

Fig.4. Morfología macroscópica 49

Fig. 5. Morfología microscópica 49

Fig.6. Selección de cepas bacterianas con forme a su capacidad de degradación ……..……50

Fig. 7. Cinética de crecimiento en medio nutritivo en horas..... 51

Fig. 8. Valor promedio de remoción de HTP a los 30 días del proceso de biorremediación…….....53

Fig. 9. Porcentajes de remoción de HTP a los 30 días……54

Fig. 10. Valor promedio de remocion de HTP a los 90 días del proceso de biorremediación..... 100

Fig. 11. Porcentajes de remoción de HTP a los 90 días……..56

Fig. 12. Temperatura del suelo y temperatura ambiental registrada durante el experimento……99

Fig. 13. pH registrado por tratamiento en el proceso de biorremediación.....100

Fig. 14. Porcentajes de humedad en los tratamientos durante semanas……..101

RESUMEN

En el presente trabajo, se evaluó un proceso de biorremediación en un suelo contaminado por hidrocarburos empleando la técnica de bioaumentación con el uso de una de cepa bacteriana autóctona y pseudotallo de plátano mediante biopilas expuestas a la intemperie. Para el desarrollo del proceso se dispusieron contenedores para la construcción de las biopilas y posteriormente se aumentó la biomasa bacteriana de la cepa seleccionada. Se empleo un diseño experimental aleatorio utilizando 4 tratamientos y 3 repeticiones. Los tratamientos consistieron en la aplicación de suelo contaminado variando los estímulos como se describe a continuación: suelo contaminado como control T1 C, bioaumentación bacteriana T2 BioBac, otro tratamiento con texturizante de plátano T3 TexPla y la combinación de bioaumentación bacteriana y texturizante de plátano T4 BioBacTexPla. La relación de suelo: residuo utilizado en los tratamientos con texturizante de plátano fue 49:1. El experimento tuvo una duración de 90 días donde se adicionó aire de manera continua y humedad de manera periódica. Al inicio del experimento el suelo presentó una concentración de 36, 843.27 mg/kg de HTP. Como resultado del proceso de biorremediación se obtuvo que el tratamiento T4 BioBacTexPla presentó una remoción máxima y significativa de 58.87 % respecto a la concentración inicial, la remoción del tratamiento T2 BioBac fue de 56.71 %. El tratamiento T3 TexPla obtuvo un 51.80 % de remoción de hidrocarburos. El tratamiento control T1 presentó un mínimo porcentaje de remoción de 41.08 %. Con los resultados obtenidos se sustenta que la adición de microorganismos nativos (bioaumentación) y texturizantes (residuos orgánicos) resultan una buena estrategia para el saneamiento de suelos contaminados por derivados del petróleo.

Palabras clave: Biopilas, Texturizante, bioaumentación, biorremediación.

I. INTRODUCCIÓN

El suelo es un recurso natural que representa la superficie plana de la tierra, está formado por materiales minerales y orgánicos. Como parte de los ecosistemas brinda servicios ambientales, por ejemplo, en él se llevan a cabo los ciclos biogeoquímicos mediante la participación de elementos clave para la vida como el carbono, nitrógeno y fósforo (Montanarella, 2015)**.** Diferentes autores consideran que el suelo ofrece las siguientes funciones: producción de alimento y biomasa, almacenamiento de carbono, almacenamiento y filtración de agua, soporte de las actividades humanas, fuente de materias primas, reserva de la biodiversidad, depósito del patrimonio geológico, entorno físico y cultural para la humanidad (Burbano-Orjuela, 2013; Burbano, 2016; Gardi *et al*., 2014). Por lo que su protección es de vital importancia.

Sin embargo, la contaminación del suelo se encuentra en constante incremento debido al crecimiento de la población a nivel mundial, el cual favorece la producción y liberación de compuestos de hidrocarburos en el ambiente de manera inadvertida o deliberada (Villalba-Villalba, 2013).

De acuerdo con la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA, 2014), reportó que en México del 2010 al 2014 fueron derramados 93.32 de miles de barriles (Mb) de petróleo en el suelo y afluentes de agua en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Chiapas, Tabasco, Puebla y Campeche. Por lo que existen áreas contaminadas por hidrocarburos debido a las actividades de exploración, refinamiento y la substracción ilegal del combustible (Cavazos-Arroyo

et al., 2014). El estado de Veracruz, por sus importantes recursos petroleros, presenta gran cantidad de afectaciones de sitios por derrames de hidrocarburos que dañan suelos y/o cuerpos de agua (Sámano-Tirado y Sámano-Tirado, 2013).

Además, el derrame de hidrocarburos en el suelo inhibe la germinación y el crecimiento de los cultivos (Somtrakoon y Chouychai, 2013; Sangeetha y Thangadurai, 2014). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos consiguen ser acumulados y absorbidos por la rizosfera de las especies vegetales, posteriormente son transportados a su parte aérea (Pretorius *et al*., 2018) y con ello, ingresan así a la cadena trófica (De lima *et al*., 2017).

Después de un evento de contaminación por hidrocarburos, en el suelo se presentan diversas consecuencias ambientales como, por ejemplo, la inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal, modificaciones en la dinámica poblacional de la fauna y la biota microbiana, incluyendo la contaminación de los cuerpos de agua subterráneos por infiltración (Cohen, 2013).

Como respuesta a la creciente contaminación del suelo, se han considerado tecnologías para la remediación de suelos contaminados por derivados del petróleo en particular, tratamientos térmicos, oxidación química usando reactivos fenton y la biorremediación (Luz *et al*., 2011). Esta última ha tenido aceptación por su bajo costo en comparación con otras tecnologías, ya que se basa en el uso de microorganismos (bacterias, hongos y algas) o enzimas para producir una transformación parcial o total de contaminantes orgánicos (Nápoles-Álvarez *et al*.,

2015). Las bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en ecosistemas marinos y terrestres, desempeñando un papel importante en el tratamiento de agentes contaminantes del medio ambiente, siendo esenciales para prevenir, controlar y restaurar ecosistemas afectados por contaminantes como el petróleo (Mendo-Pascual, 2014).

Entre las diferentes tecnologías de remediación, las biopilas son una forma de tratamiento de suelos contaminados de tipo *ex situ* (Kripsalu y Nammari, 2010). Consisten en excavar el suelo y de preferencia mezclarlo con agentes texturizantes (residuos agrícolas) para posteriormente colocarlas en áreas de tratamiento (Zamudio-Pérez, 2010). Los texturizantes orgánicos no solo cumplen la función de mejorar algunas características del suelo, físicas, químicas y biológicas, incrementan la porosidad y permiten una mejor difusión de oxígeno, favoreciendo la actividad microbiana (Roldán-Martín, 2006; Ordaz *et al*., 2011). Las biopilas son técnicamente sencillas y relativamente baratas de construir y se ha demostrado que son efectivas en estudios de zonas templadas (Coulon *et al*., 2010).

Frente a lo expuesto, el propósito de esta investigación fue evaluar el proceso de biorremediación de un suelo contaminado con hidrocarburos por medio de bioaumentación de cepas bacterianas autóctonas y pseudotallo de plátano como texturizante, ya que es un producto lignocelulósico, removable y poroso que podría ser una alternativa para disminuir la descontaminación de suelos en condiciones de campo a través de un sistema de biopilas.

II. ANTECEDENTES

2.1 Breve historia del pozo Dos Bocas

En 1908 arribó en la Hacienda de San Diego de la Mar la compañía el Águila, del grupo “Pearson”. Fue en esa época cuando el Águila entabló un combate comercial con la “Waters Pierce Oil Company”, en disputa del mercado de productos refinados. En medio de esta batalla el pozo Núm. 3 de Dos Bocas brotó y se incendió “con una columna de hidrocarburos fluidos, lanzada con la incontrolable presión de un geyser” y arrojaba “una columna gigantesca de petróleo, cuya combustión hacia subir las llamas a los cielos de 400 a 500 metros de altura” (Ortiz-Ortiz, 2017). Esto hizo que un gran resplandor se elevara por las nubes, que en las noches fuera visto en altamar del Golfo de México a unos 80 o hasta 160 km de distancia y confundido en tierra con la aurora de los mares boreales, haciendo pensar en una erupción volcánica.

Cuando el proceso de perforación llegó a 550 metros de profundidad, el gas y el aceite brotaron con tal fuerza que se dispersaron a más de 200 metros alcanzando a una caldera mal apagada, ubicada a 100 metros, que inmediatamente se incendió; un testigo, el maquinista Godofredo Jeffrey, dijo que “el incendio fue ocasionado por la salida del aceite y fue a dar a la caldera recién apagada. En las calderas aparecieron unas aberturas por las que se transmitió el fuego al aceite que corría sobre la superficie (García-Aguirre y Valdez-Méndez, 1995).

Actualmente el daño ecológico causado en el ambiente es de 200 hectáreas aproximadamente el cual permanece latente. A pesar de que la contaminación data de 1910 en el pozo Dos Bocas (Figura 1). Se siguen presentando derrames de hidrocarburo influenciados por la temporada de lluvias que provocan la dispersión del aceite en el sitio. Dicha contaminación a lo largo de las décadas ha afectado notoriamente el suelo, ha acabado con la vegetación y con algunas especies marinas, por lo que actualmente se le puede considerar un peligro para los seres vivos y para el medio ambiente (Gómez-Maya y Sagahón-Bautista, 2006).

2.2 Factores que condicionan la biorremediación de un suelo

Los microorganismos son muy sensibles a su entorno de crecimiento debido a que responden a los cambios en el ambiente que los rodea (Boopathy, 2000). La aplicación exitosa de la tecnología de biorremediación requiere el conocimiento de las características del sitio y de los parámetros que afectan la biodegradación microbiana de los contaminantes (Chandra *et al*., 2013). La biodegradación de un contaminante está influenciada por diversos factores que se describen a continuación.

2.2.1 Aspectos metabólicos

Algunas bacterias son capaces de utilizar diferentes fuentes de carbono para realizar sus actividades metabólicas (Fuentes *et al*., 2014). Las bacterias hidrocarburolíticas son un grupo de bacterias que tienen la capacidad de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono y energía (Soledad, 2010). Los microorganismos hidrocarburolíticos emplean varias rutas metabólicas para la transformación total de las moléculas orgánicas en CO_2, H_2O, y algunos residuos inorgánicos inertes. Mediante estas rutas de degradación, el contaminante orgánico funciona como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia necesaria para la biosíntesis celular o biomasa microbiana (Fuentes *et al*., 2014). No obstante, estos microorganismos se adaptan o desarrollan su metabolismo en función de los parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura, humedad) así como de los

compuestos químicos que se encuentran en su ambiente inmediato (Nisperuza-Vidal y Montiel-Aroca, 2010). Las bacterias que encuentran condiciones adecuadas para su crecimiento demostrarán un alto nivel de degradación de contaminantes (Fletcher, 2000).

2.2.2 Disponibilidad de nutrientes

Los hidrocarburos son una fuente de carbono para los microorganismos, sin embargo, son muy pobres en nitrógeno y fósforo, que son esenciales para el crecimiento bacteriano. Por lo tanto, para lograr una biorremediación efectiva es esencial agregar los elementos faltantes (Ron y Rosenberg, 2014). La adición de soluciones de nitrato de amonio, fosfato de diamonio y cloruro de potasio, se han utilizado para ajustar las proporciones de carbono, nitrógeno, fósforo (C: N: P) (Beskoski *et al*., 2011). La relación 100:10:1 ha sido aplicada para llevar a cabo la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Acuña *et al*., (2012), observaron un porcentaje de biodegradación de 29 %, indican que la incorporación de nutrientes en altas cantidades puede provocar un efecto adverso al deseado, disminuyendo el número de bacterias degradadoras.

2.2.3 Oxígeno

Los hidrocarburos al ser sustratos altamente reducidos requieren un aceptor de electrones, siendo el oxígeno molecular el más común. Aunque la mayoría de los estudios han demostrado que la biodegradación de hidrocarburos es un proceso aeróbico, también se ha informado sobre la biodegradación anaeróbica de hidrocarburos. En ausencia de oxígeno molecular, se ha demostrado que el nitrato, el hierro, el bicarbonato, el óxido nitroso y el sulfato actúan como aceptores de electrones alternativos durante la degradación de los hidrocarburos. El oxígeno suele ser el factor limitante en la biorremediación aeróbica en muchos sitios. La degradación de los hidrocarburos ocurre mucho más rápido en condiciones aeróbicas en comparación con las condiciones anaeróbicas. Por lo tanto, la adición de oxígeno puede aumentar significativamente la tasa de remediación (Chandra *et al*., 2013**).**

2.2.4 Salinidad

La presencia de sal a altas concentraciones inhibe el crecimiento microbiano y la posterior degradación de los contaminantes del petróleo (Hua *et al*., 2010). Sin embargo, se ha demostrado que cepas de *Pseudomonas aeruginosa* son capaces de degradar el petróleo crudo, incluso en presencia de salinidad (Ebadi *et al*., 2017).

2.2.5 Estructura química del hidrocarburo

La susceptibilidad de los hidrocarburos a la biodegradación está determinada por la estructura y el peso molecular de la molécula de hidrocarburo. Los hidrocarburos alifáticos son degradados y asimilados por una amplia gama de microorganismos. Los n-alcanos de longitud de cadena intermedia (C_{10}-C_{24}) se degradan más fácilmente. Los alcanos de cadena corta (menos de 9) son tóxicos para muchos microorganismos, pero al ser volátiles en general se pierden rápidamente en la atmósfera. Los alcanos de cadena larga generalmente son resistentes a la biodegradación. La ramificación en general reduce la tasa de biodegradación. Los compuestos aromáticos pueden estar parcialmente oxidados, pero son metabolizados solo por unas pocas bacterias. Los compuestos aromáticos especialmente los hidrocarburos poliaromáticos (HAP) se degradan lentamente. Los compuestos alicíclicos se pueden degradar a través de un proceso conocido como cometabolismo (Chandra *et al*., 2013). En este sentido, Cerqueira *et al*., (2011) analizaron la capacidad de biodegradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos de lodos oleosos petroquímicos en medio líquido por un consorcio bacteriano compuesto por *Stenotrophomonas. acidaminiphilia*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cibi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* demostrando una excelente capacidad de degradación del lodo aceitoso, reduciendo el 90.7 % de la fracción alifática y el 51.8 % de la fracción aromática.

2.2.6 Biodisponibilidad

Que un contaminante orgánico sea en principio biodegradable no implica que sea biodegradado en cualquier escenario ambiental. La causa es, en muchas situaciones, la falta de biodisponibilidad. (Ortega-Calvo, 2013). La biodegradación de los HAP está limitada en los suelos contaminados por envejecimiento debido a la baja biodisponibilidad (menor o igual a 1 %). Sin embargo, el envejecimiento no es el parámetro principal que influye en el nivel de disponibilidad, si no, que los componentes orgánicos que coexisten con los hidrocarburos en el suelo también impulsan la disponibilidad (Cébron *et al*., 2013).

2.3 Condiciones ambientales

2.3.1 Temperatura

Este parámetro, posee una influencia sobre la biodegradación, ya que es un factor preponderante en la estimulación del metabolismo bacteriano responsable de llevar adelante el proceso. Por otro lado, el petróleo a bajas temperaturas aumenta su viscosidad y disminuye su solubilidad, esto lo convierte en un sustrato poco biodisponible para que los microorganismos lo utilicen como fuente de carbono y energía. Las bajas temperaturas también provocan una disminución en la tasa de metabolización de los microorganismos, lo que resulta en una tasa de eliminación más lenta durante los periodos más fríos del año. El aumento de la temperatura, por lo general, se relaciona con el aumento de la biodegradación de los contaminantes, hasta llegar a temperaturas que no son compatibles con la vida de los

microorganismos (Pucci *et al*., 2011). Tal es el caso de San Martin *et al*., (2011) donde apreciaron que la temperatura ambiental registrada durante el proceso de biorremediación fue inferior a la temperatura registrada en el suelo contaminado, logrando solo una degradación del 7 % de hidrocarburos.

2.3.2 pH

Es un factor ambiental selectivo que afecta la diversidad y la actividad microbiana, influye directamente en la actividad enzimática, en el proceso de transporte y la solubilidad de los nutrientes (Dhote *et al*., 2010). El crecimiento de las bacterias se ve seriamente afectado en presencia de un entorno de pH ambiental inadecuado (Chen *et al*., 2017). Los rangos adecuados para la biorremediación están comprendidos entre 6 y 8 (Hemalatha y Veeramanikandan, 2011).

2.3.3 Humedad

El agua es importante para el desarrollo de los microorganismos, ya que actúa como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula. Es conveniente mantener una humedad del orden del 70 % de la capacidad de campo, la cual se define como la masa de agua que admite el suelo hasta la saturación, que depende de cada tipo de suelo. Un exceso de humedad produce inhibición del proceso por anaerobiosis. Un déficit impide por consiguiente el desarrollo de los microorganismos (Nápoles *et al*., 2015); sin embargo, el rango varía en función de la técnica.

3.0 Caracterización del suelo en la biorremediación

La evaluación o determinación de las propiedades físicas y químicas de un suelo contaminado contribuye al seguimiento del proceso de remediación, además de ser útil para tomar acciones pertinentes en el mejoramiento de dichos procesos (Sachun-Rodrìguez, 2015). Las propiedades fisicoquímicas tales como textura, contenido de humedad, concentración de nutrientes, pH, conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico, contenido de materia orgánica, etc. Han sido ampliamente utilizadas en el proceso de biorremediación (Arrieta-Ramírez, 2012; Brown et al., 2017; Silvana-Avaro, 2017). Estas características indican si es factible que se realice una biorremediación eficiente (Acuña *et al*., 2010).

La **textura** está íntimamente relacionada con la composición mineral, el área superficial específica y el espacio de poros del suelo. Esto afecta prácticamente a todos los factores que influyen en un proceso de biodegradación de hidrocarburos, el cual es aeróbico y requiere de un hábitat con adecuada disponibilidad de agua e hidrocarburo para los microorganismos (Kristensen *et al*., 2010). La correcta combinación de las partículas que componen el suelo es fundamental para establecer un ambiente adecuado que permita el buen desarrollo de los microorganismos que lo habitan. De esta forma, si los microorganismos del suelo se desarrollan eficientemente, la biodegradación de los hidrocarburos contaminantes de este tipo de muestras puede biorremediarse de forma óptima, logrando la adecuada reconstitución del ambiente afectado (Acuña *et al*., 2009). Los suelos arenosos son más porosos que las arcillas. Una mayor porosidad permite

una mejor transferencia de oxígeno en el suelo, que es esencial para la biodegradación de los hidrocarburos. La baja biorremediación en arcilla podría deberse a una transferencia de oxígeno ineficiente en el suelo. La arcilla de grano fino forma una textura pegajosa en presencia de agua, bloqueando la transferencia eficiente de oxígeno a través del suelo (Haghollahi *et al*., 2016). Sin embargo, esta propiedad puede ser mejorada, ya que se ha reportado que la adición de texturizantes, enmiendas orgánicas y agentes de carga cambian la textura del suelo (Kastner y Miltner, 2016).

La **humedad** en el suelo es fundamental para la evolución y desarrollo de los microorganismos presentes en él. La capacidad de campo es una medida del contenido de agua que retiene el suelo; es decir, marca el límite entre el agua capilar y la gravitacional (máxima cantidad de agua que puede retener el suelo después de tres días de aporte de agua). Un déficit de agua puede disminuir el transporte de nutrientes y de contaminantes y la migración bacteriana a través del suelo; y, por el contrario, el exceso desplaza el aire de los poros del suelo, generándose condiciones anaerobias al agotarse el oxígeno disuelto en agua (Nápoles *et al*., 2015). La información en la literatura sobre el valor óptimo del contenido de humedad del suelo para fines de biorremediación es variable, ya que Vallejo *et al.*, (2016) señala que la biodegradación de los hidrocarburos es óptima entre el 14 y 15 % de la capacidad de campo. Por su parte Vázquez *et al*., (2010) mantuvieron un nivel cercano entre el 60 y 70 % de humedad y Ferreira do Nascimento *et al*.,

(2013) durante sus ensayos, la humedad del suelo fue mantenida entre el 70 y 80 % de la capacidad de retención de agua.

Los microorganismos requieren **nutrientes** inorgánicos que pueden estar disponibles en cantidades suficientes en los suelos del sitio, pero frecuentemente se deben de agregar a los suelos del biosistema, Aunque, cantidades excesivas de ciertos nutrientes (fosfato y sulfato) pueden reprimir el metabolismo microbiano. Así pues, Pozzo-Ardizzi *et* al., (2018) sugieren que la proporción de carbono: nitrógeno: fósforo, típica y necesaria para una efectiva biodegradación, guarda las relaciones 100:10:1 a 100:1:0.5 dependiendo de los componentes específicos y de los microorganismos involucrados en el proceso de biodegradación.

La **temperatura** desempeña un papel importante en la biodegradación de los hidrocarburos al afectar directamente la composición química de los contaminantes (Chandra *et al*., 2013). Se ha informado que en el suelo los requisitos de temperatura óptima oscilan entre 30-40°C (Das y Chandran, 2011). Sin embargo, si se superan los 40°C se produce una disminución en la actividad microbiana. Cuando la temperatura está a 0°C se detiene esencialmente la biodegradación (Gómez-Romero *et al*., 2008). También se ha demostrado con éxito la biodegradación de hidrocarburos en condiciones de clima frío con temperaturas entre 1 y 8°C (Gómez y Sartaj, 2014).

Con referencia a lo mencionado Acuña *et al*., (2012) optimizaron los parámetros de humedad, temperatura y relación de nutrientes para estimar la posibilidad de aplicar

la técnica de biorremediación en un suelo contaminado con hidrocarburos. Para optimizar la humedad y la temperatura se trabajó en microcosmos con humedades de 3 %, 10 %, 15 % y 20 % y temperaturas de 5°C, 15°C, 28°C, y 37°C, la relación de nutrientes se diseñó en microcosmos diferentes que fueron monitoreados por consumo de oxígeno y por determinación de hidrocarburos por cromatografía de gases. Las relaciones C:N:P estudiadas fueron 100:20:2, 100:10:1, 100:5:0,5 y 100:1:0,1. Los resultados obtenidos indican que la mineralización de hidrocarburos fue óptima para humedades de 10 % a 20 % y a temperaturas de 25°C a 37°C con valores de producción de CO_2 de 3000 a 4500 $mgCO_2Kg^{-1}$. La relación óptima C:N:P fue de 100:1:0,1 en la que se observó el mayor consumo de oxígeno y la remoción de 83 % de los hidrocarburos totales, con 78 y 89 % de eliminación de los hidrocarburos n-alcanos y poliaromáticos. Por su parte García *et al*., (2012) estudiaron la biodegradación de un crudo en dos suelos de diferentes texturas, con y sin la adición de un agente estructurante (hojarasca). Los suelos ensayados fueron de textura arenosa constituida por cuarzo e ilita, y franco-arcillo-arenoso compuesto por cuarzo y caolinita. Se evaluaron cuatro tratamientos por triplicado en microcosmos con un contenido de crudo inicial de 5 % (m/m) y se añadieron fertilizantes a base de N y P para obtener las relaciones C/N=60 y C/P= 800. Periódicamente se airearon los microcosmos y se ajustó la humedad entre 40 y 60 % de la capacidad de retención. La concentración del petróleo se determinó a los 1, 15, 30, 45 y 90 días mediante la extracción Soxhlet. Encontraron que la textura franco-arcillo-arenosa favoreció el proceso de los hidrocarburos totales en los componentes saturados. Por último, Haghollahi *et al*., (2016) investigaron el efecto

del tipo de suelo en la biorremediación de suelos contaminados con petróleo. Los suelos se categorizaron como suelo arenoso que contiene 100 % de arena, suelo arcilloso con más de 95 % de arcilla, suelo de grano grueso con 68 % de grava y 32 % de arena y grano grueso con alto contenido de arcilla con 40 % de grava, 20 % de arena y 40 % de arcilla. Los suelos inicialmente limpios, se contaminaron con gasóleo a una concentración de 100 g/Kg. Los resultados mostraron que el porcentaje de remoción más alto fue para el suelo arenoso con un 70 % con un contenido inicial de HTP de 69.62 g/Kg y el más bajo fue para el suelo arcilloso con 23.5 % de remoción con un contenido inicial de 69.70 g/Kg.

4.0 Bioaumentación en los procesos de biorremediación

La bioaumentación es la adición de cultivos microbianos precrecidos en laboratorio para mejorar las poblaciones microbianas en un sitio con la finalidad de acelerar la limpieza de contaminantes, reducir el tiempo y el costo de la limpieza (Speight, 2017). Para aumentar la eficiencia de este proceso se han empleado diferentes enfoques de acuerdo con el origen. La bioaumentación autóctona implica que los microorganismos son aislados del lugar a remediar (Álvarez, 2015). Sin embargo, al no detectar la presencia de microorganismos degradadores se recurre a la inoculación con cultivos exógenos (MingMing y Qiu Yu, 2009). Estos microorganismos se reclutan de otro sitio y después se introducen en el sitio contaminado.

Para el uso efectivo de microorganismos en la bioaumentación es importante determinar el potencial microbiano para la degradación de hidrocarburos en condiciones óptimas en medios líquidos. Se ha informado que los géneros de *Lactobacillus*, *Prevotella* (Cruz-Narváez *et al*., 2019), *Bacillus* (Hernández-De la Cruz, 2019**).** Son capaces de degradar hidrocarburos. Algunos estudios han confirmado la aplicación potencial de microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos usando la tecnología de bioaumentación (Guarino *et al*., 2017; Martínez-Rivera, 2018; Pérez-Pozo, 2018; Szulc *et al*., 2014; Windevoxhel *et al*., 2013).

Se ha demostrado que los microorganismos autóctonos pueden degradar los hidrocarburos al usarlos directamente como fuente de carbono y energía. Por ejemplo. San Martín *et al*., (2011) evaluaron la biorremediación a campo abierto de 307 kg de suelo contaminado por hidrocarburos de la laguna de Marlan municipio de Ébano, San Luis Potosí, mediante la aplicación de bacterias autóctonas aisladas del suelo con medio Bushnell-Hass y en agar soya tripticaseina. Los resultados obtenidos mostraron una reducción del 7 % de HTP en un periodo de tres meses, concluyen que sus bajos niveles de reducción posiblemente se atribuyen al efecto de las bajas temperaturas ambientales registradas durante el experimento. Por otra parte, Mendo-Pascual (2014) evaluó un proceso de biorremediación en columnas de acrílico a sedimentos contaminados por hidrocarburos empleando bacterias autóctonas de la laguna de Tamiahua, Veracruz, México. Mediante pruebas cualitativas seleccionó la cepa con capacidad de degradación y fue bioaumentada con técnicas de laboratorio, aplicando las técnicas de bioaumentación y bioventeo obtuvo una remoción del 68.36 % en un periodo de 90 días. De acuerdo con sus resultados el proceso de biorremediación fue considerado exitoso.

5.0 Técnica de biopilas

Las biopilas también conocidas, como bioceldas, bioredes, biomoldeados y pilas de compost, representan un sistema confiable para reducir la concentración de petróleo en los suelos excavados a través de la biodegradación (Baldan *et* al., 2015; Genovese *et al*., 2008). Esta tecnología implica la recolección y transferencia de suelos contaminados a un sitio creado específicamente para estimular la actividad microbiana aeróbica dentro de los suelos mediante la aireación y o la adición de minerales, nutrientes y humedad (Gallego *et al.*, 2011; Gómez y Sartaj, 2014; Thompson *et al*., 2005). Enseguida es depositado en una superficie o en una piscina previamente excavada, se forman montones de suelo y se permite la acción degradadora de microorganismos propios del suelo o externos inoculados. La altura común de las biopilas va de 2 a 4 m (Kripsalu y Nammari, 2010), pueden encontrarse variaciones de humedad y temperatura a las distintas profundidades de la cama. Por lo anterior la altura ideal de la biopila deberá estar en función de la facilidad que se tenga en equipo y mano de obra para mantener un sustrato lo más homogéneo posible a lo largo y ancho de la biopila (Wang *et al*., 2014).

La adición de agua a menudo es importante para una operación de biopila exitosa, particularmente en áreas áridas donde la aireación puede mejorar la evaporación del agua y reducir el contenido de humedad de la pila a niveles que limitan las tasas de degradación. Se construyen sobre una base impermeable para reducir la migración potencial de lixiviados al entorno subsuperficial. Una red de tuberías perforadas, instalada sobre la base, está conectada a un soplador que facilita la

aireación de la pila (Jabbar *et al.*, 2018; Pollard *et al*., 2008). En algunos casos se construye un sistema de recolección de lixiviados, específicamente si se agregan agua y nutrientes a la pila. Las pilas generalmente están cubiertas con una membrana impermeable para evitar la liberación de contaminantes y para proteger el suelo del viento y la precipitación. Las biopilas pueden usarse en climas templados, pero también pueden usarse en climas más fríos si se introduce aire caliente a través del proceso de aireación (Azubuike *et al.*, 2016; Mohn *et al*., 2001)**.** El sistema de biopilas estáticas implica que la aireación se implemente por medio de dispositivos de aireación forzada. Se forman biopilas de suelo contaminado mezclado con materiales orgánicos y con el fondo y los laterales recubiertos de un material impermeable. En la parte superior de la pila se coloca una cubierta para evitar emisión de compuestos volátiles a la atmósfera. Mediante tuberías se hace entrar el aire al interior de la pila y en la parte baja se recolectan los efluentes (Coulon *et al*., 2010). En ocasiones se utilizan agentes texturizantes para proporcionar volumen e incrementar la porosidad del sistema, facilitando así la difusión de oxígeno a través del suelo contaminado que será tratado, también disminuyen los niveles de humedad, facilitando con esto la transferencia de oxígeno, incrementa la superficie de contacto aire-microorganismo y favorece el proceso de degradación. Esta técnica tiene la ventaja de utilizar materiales de bajo costo, además de poder utilizar productos de desecho como texturizantes (Roldán-Martín, 2006; Zhang *et al*., 2021).

5.1 Casos de estudio

Varios estudios han reportado la biorremediación de suelos al agregar desechos agrícolas. En este sentido, Ordaz *et al.*, (2011) hacen referencia que se han empleado residuos, tales como bagazo de caña, rastrojo de maíz, paja de avena, cáscara de naranja, aserrín de madera, etc., como enmiendas y texturizantes. (En el cuadro 1 se muestran algunos texturizantes utilizados en procesos de biorremediación). Los agentes texturizantes, como el bagazo, no solo mejoran la porosidad del suelo, sino que también proporcionan una fuente de carbono, debido al alto contenido de carbohidratos. Por lo que adicionar residuos agrícolas y nutrientes resulta una buena estrategia para mejorar las condiciones del suelo y, en consecuencia, la actividad microbiana responsable de la remoción de los hidrocarburos (Huang *et al.,* 2019).

Cuadro. 1. Texturizantes utilizados en procesos de biorremediación.

Material orgánico	% de remoción	Tiempo	Escala	Referencia
Compost gastado y bagazo de caña.	40 %	15 días	Reactor en columna	Trejo-Hernández *et al*., (2007)
Estiércol, tojo y corteza de pino.	28 % y 68 %	3 meses	Biopila	Rubinos *et al*., (2008)
Cachaza y bagazo de caña.	51.4 % y 60.1 %	15 días	Microcosmos	García-Torres *et al*., (2011)
Bagazo de caña.	30 %	20 días	Microcosmos	Ordaz *et al*., (2011)
Cascara de banano.	93 %	30 días	Microcosmos	Pino-Rodríguez *et al*., (2012)
Bagazo de caña y racimo de frutas.	100 % y 97 %	20 días	Condiciones controladas	Hamzah *et al*., (2014)
Restos de poda.	76 %	51 días	Landfarming	Ariza y Mejía-Carrillo (2017)
Residuos de cachaza y bagazo de caña.	45 % y 61 %	15 días	Microcosmos	Rodríguez-Geldres (2017)
Biomasa de nopal, corteza de piña y alfalfa.	77 %, 89.1 % y 88.45 %	120 días	Pilas de compost	Vaca-Mier *et al*., (2017)

A nivel internacional existen reportes donde se ha aplicado de manera exitosa la adición de texturizantes en biopilas para suelos contaminados con derivados de petróleo. De acuerdo con esto Kripsalu y Nammary (2010) describen una configuración de biorreactor para simular la degradación de hidrocarburos de petróleo en una biopila estática, la biopila se mezcló con enmiendas orgánicas ricas: compost de aceite maduro (40 %) y compost de desecho de jardín (20 %). Encontraron un 68.7 % de remoción después de 370 días de tratamiento.

Por el contrario, Beskoski *et al*., (2011) someten a biorremediación un suelo contaminado con mazut (fuelóleo residual pesado). La biopila estaba compuesta por suelo contaminado mezclado con aserrín de madera blanda y arena de rio cruda, la aireación se mejoró mediante una mezcla sistemática. Los resultados obtenidos mostraron que la bioaumentación combinada con la aireación y la bioestimulación permitieron la remediación exitosa a escala de campo logrando reducir los hidrocarburos de petróleo a un 94 % de 5.2 a 0.3 g/kg de materia seca en un periodo de cinco meses, mientras que la biopila control se redujo solo en un 10 %.

Así mismo Wang *et al*., (2012) construyen biopilas a escala de campo para la biorremediación de lodos contaminados con petróleo envejecidos con microorganismos indígenas. Tres biopilas fueron tratadas con agente de carga (tallo de algodón) y nutrientes y una cuarta pila como control. La actividad metabólica microbiana y el número de especies de bacterias se mejoraron significativamente mediante la adición de agente de carga, logrando obtener una remoción del 49.62 % de los hidrocarburos después de 220 días de exposición, mientras que la pila control redujo un 20.44 %.

Por otra parte, Gómez y Sartaj (2014) aplicaron con éxito una metodología de diseño factorial y superficie de respuesta para modelar y optimizar la eliminación de HTP en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas en condiciones de clima frio. Observaron tasas de eliminación de HTP en el rango de 74-82 % en las configuraciones de tratamientos en las que se usó compost maduro y consorcios microbianos, en comparación con un promedio de 48 % de remoción en la configuración de control en un periodo de 94 días.

En México se reportan estudios de biorremediación en biopilas a gran escala Roldán-Martín *et al*., (2005) utilizaron un sistema de biopilas adicionado con granos de café para la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos. El trabajo fue dividido en tres etapas: pruebas de tratabilidad en microcosmos, biopilas a nivel de laboratorio, y biopilas en campo. En las tres etapas se evaluó el comportamiento de parámetros, como materia orgánica, nitrógeno, fósforo, pH, humedad e hidrocarburos totales del petróleo (HTP). En la primera etapa evaluaron pruebas de tratabilidad con diferentes materiales orgánicos (granos de café y cáscara de naranja), seleccionando el tratamiento con granos de café. En la segunda etapa se construyó una biopila pequeña con 23 kg de suelo contaminado alcanzando una remoción de contaminantes de 69 % después de 12 semanas. Y finamente en la tercera etapa se evaluó el comportamiento de la biopila en campo con 1 tonelada de suelo con diferentes niveles de contaminación 20,000 mg/kg (bajo) 50,000 mg/kg (medio) y 90,000 mg/kg (alto) los porcentajes de remoción obtenidos fueron 78 %, 54 % y 49 % respectivamente.

De igual manera Cuevas-Díaz (2012) investigó a nivel de campo la degradación de hidrocarburos del petróleo de un suelo contaminado. Estableció seis bioceldas tratadas con bagazo y cachaza de azúcar, como nutrimentos adicionó sulfato de amonio y fosfato diamónico, obteniendo porcentajes del 59 % y 66 % de degradación en una duración de ocho meses.

También se han realizado trabajos de biorremediación mediante biopilas a escala pequeña Rojo-Santiesteban (2013) analizó la biodegradación de hidrocarburos derivados de diésel, contenidos en suelos con alto contenido de materia orgánica derivada de composta madura y construyó tres biopilas, la biopila (B1) fue tratada con sustancias húmicas y un consorcio bacteriano correspondiente al género de *Pseudomonas* sp. La biopila (B2) fue inoculada con el mismo consorcio y la biopila (B3) fue utilizada como control. Los resultados obtenidos mostraron que la B1 logró reducir la concentración inicial de 49, 141.01 mg/kg a 5, 345. 85 de HTP con un 82.22 % de remoción, la (B2) redujo la concentración de 56, 249.18 mg/kg a 11, 688. 11 mg/kg con 79.25 % de remoción y por último la B3 disminuyó 62, 752. 99 mg/kg a 13, 196. 28 mg/kg con 78.97 % de remoción en un periodo de 112 días.

Para la zona norte del estado de Veracruz se han reportado estudios de biorremediación a escala de campo Del Rio *et al*., (2004) evaluó la técnica de biopilas con diferentes niveles de contaminación, utilizando el grano de café crudo como texturizante, para favorecer la biodegradación de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) presentes en el suelo contaminado ubicado en el municipio de Poza-Rica, Veracruz. Emplearon 8 biopilas con diferentes niveles de contaminación de hidrocarburos de la siguiente manera: 1 y 2 con bajos niveles de contaminación (20,

000 ppm), 5 y 6 nivel medio (50, 000 ppm) y 7 y 8 nivel alto (90, 000 ppm). Las biopilas 3 y 4 se utilizaron como controles. Los autores observaron que el porcentaje de remoción de HTP alcanzado con las biopilas correspondientes a la concentración baja fue de 75 %, en el nivel intermedio el porcentaje de remoción alcanzado fue del 60 % y para el nivel alto se tuvo un 50 % de remoción en un periodo de 84 días.

Por otro lado, Roldán-Martín (2006) evaluó un sistema de biopilas en campo con diferentes concentraciones de HTP, baja (20, 000 mg/kg), media (50, 000 mg/kg) y alta (> de 60, 000 mg/kg). Se realizó un control por cada nivel de contaminación evaluado, adicionó como texturizante granos de café y nutrientes en forma sólida (urea y fosfato de amonio). Observó que con el nivel bajo de contaminación se alcanzó un 69% de remoción, descontando la remoción del control abiótico que fue del 10%. Para las biopilas con el nivel medio (50, 000 mg/kg) se obtuvo un 54 % de remoción. Con el nivel alto (90, 0000 mg/kg) se obtuvo 44% de remoción, descontando la remoción abiótica a los 90 días de experimentación.

Así mismo Lastra-Blanco (2010) realizó una biorremediación en campo de 370 kg de suelo contaminado por hidrocarburos por medio de la aplicación de bacterias autóctonas del suelo de la laguna de Marland del municipio de Ébano, San Luis Potosí, encontrando una disminución del 7 % de HTP en un periodo de 3 meses. Concluye que el bajo porcentaje de degradación de HTP puede a atribuirse a las bajas temperaturas ambientales registradas en la experimentación.

5.2 Residuo agroindustrial

5.2.1 Plátano

El plátano es uno de los cultivos más importantes en la agricultura mexicana, ocupa el segundo lugar de la producción en frutas tropicales, la importancia de este cultivo radica en su uso alimentario, su alto valor nutritivo rico en potasio, hierro y vitaminas k, además de su precio bajo, sabor agradable y disponibilidad todo el año. (Mena-Espino y Couoh-Uicab, 2015). En México, los principales estados productores de plátano son Chiapas, Tabasco, Veracruz, Colima y Jalisco. En el 2013 se obtuvo una producción de 2, 127, 772.29 toneladas de fruta, con un ingreso de $ 5, 411, 964, 860 (SIAP,2013). Los sistemas de producción de plátano generan una gran cantidad de desechos orgánicos, provenientes de la cosecha y comercialización del rubro tales como pseudotallos, láminas foliares y restos de frutos o del racimo; los cuales son dejadas en la misma plantación (Mazzeo *et al*., 2010).

Por lo anterior expuesto, se ha tomado interés en aprovechar el residuo pseudotallo, con la obtención de producir texturizante para su aplicación en el proceso de biorremediación.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

- Evaluar el proceso de biorremediación de un suelo contaminado con hidrocarburos utilizando bioaumentación de cepas bacterianas autóctonas y texturizante de plátano en condiciones de campo.

3.2 Objetivos específicos:

- Caracterizar las propiedades físicas y químicas del suelo contaminado.
- Obtener cepas bacterianas hidrocarburolíticas axénicas, aisladas del suelo contaminado del área de estudio.
- Aplicar el pseudotallo de plátano como texturizante al suelo contaminado durante el proceso de biorremediación.
- Determinar el porcentaje de remoción de hidrocarburos presentes en el suelo durante el proceso de biorremediación en biopilas.

IV. HIPÓTESIS

Hipótesis General:

La adición de bioaumentación y/o texturizante de plátano al suelo contaminado con hidrocarburos mediante biopilas, reducen la concentración de hidrocarburos.

Hipótesis Estadísticas

H_0: La concentración de hidrocarburos de petróleo en el suelo es igual para todos los tratamientos.

H_1: La concentración de hidrocarburos de petróleo en el suelo es diferente en algún tratamiento.

V. ÁREA DE ESTUDIO

5.1 Localización

El municipio de Tamalín se encuentra ubicado en la zona norte del estado del estado de Veracruz, en las coordenadas 21° 19 y 21°37´ de latitud norte y 97° 31´ y 97° 50' de longitud oeste, a una altura de 10 y 300 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con el municipio de Tantima, al este con los municipios de Tantima, Chinampa de Gorostiza y Naranjos Amatlán, al sur con los municipios de Tancoco y Tantima. (SIM, 2015).

El municipio de Tamalín tiene una extensión de 399.64 km², cifra que representa un 0.6 % total del estado. Su extensión territorial se divide en 78 localidades entre las que destacan Carmona y Valle, Mamey la Mar, Saladero, San Jerónimo, Calmecate y la Trinidad (SIM, 2015).

5.2 Orografía

El municipio se encuentra ubicado en la zona norte del estado, en las estribaciones de la parte llana de la huasteca.

5.3 Hidrografía

Se encuentra regado por pequeños ríos que son tributarios de la laguna de Tamiahua, cuenta con algunos arroyos o lagunas como estero de Cuchapas y Dos Bocas.

5.4 Clima

Su clima es cálido-extremoso con una temperatura promedio de 24°C; su precipitación pluvial media anual es de 8.050 m.

5.5 Principales ecosistemas

Los ecosistemas que coexisten en el municipio son el de selva y bosque mediano de chicozapote, caoba y pucté, donde se desarrolla una fauna compuesta por poblaciones de conejos, liebres, ardillas y aves como primavera y gorriones.

5.6 Recursos Naturales

Pozos petroleros en producción como es el de Rancho Nuevo, las Baterías, etc. También otro de los recursos naturales con que cuenta es el forestal.

5.7 Características y uso de suelo

Su suelo es de tipo gleysol y regosol, el primero se caracteriza por capaz saturadas y el segundo por capas distintas, es susceptible a la erosión. Se utiliza en un 50% para agricultura y ganadería.

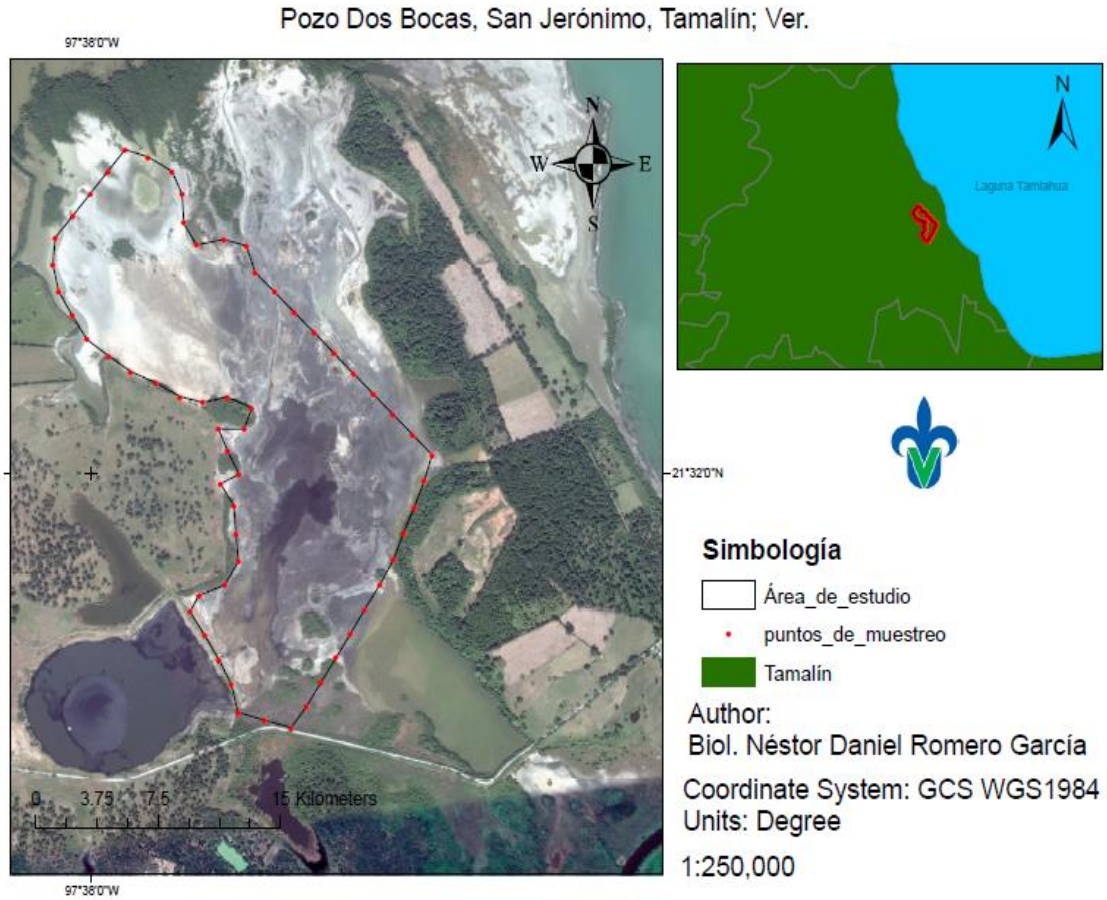

Figura 1. Ubicación del Pozo Dos Bocas. Puntos rojos: Localización de los sitios donde fueron colectadas las muestras de suelo. Línea negra: Presenta la poligonal delimitada con respecto al área de estudio.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Selección del área de muestreo

Para cumplir con los objetivos planteados, se llevó a cabo un recorrido de prospección con la finalidad de obtener la poligonal, identificar las características del lugar y situar los puntos de muestreo en el Pozo Dos Bocas ubicado en las coordenadas 21°31'39.31"N y 97°37'44.83"O (Figura 1). El suelo utilizado ha estado contaminado desde hace décadas y los hidrocarburos han experimentado un proceso de intemperización. Para situar los puntos de muestreo se consultó a un especialista en suelo. La elección se tomó considerando la accesibilidad, textura al tacto, topografía, distancia y profundidad.

6.2 Muestreo

El procedimiento de muestreo se realizó siguiendo las especificaciones de la norma Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece la clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Sin embargo, cabe mencionar que durante el muestreo se optó no realizar puntos en el interior del polígono por cuestiones de seguridad. Para obtener el número mínimo de puntos de muestreo de acuerdo con el área contaminada se consideró la 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.

6.3 Toma de la muestra

Basados en la prospección del sitio, se determinó realizar un muestreo dirigido sobre la línea perimetral de la poligonal de estudio (Figura 1). A partir de ahí se delimitó un área de 100 ha, posteriormente se establecieron los puntos de muestreo conforme a la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 obteniendo un total de 60 puntos de muestreo. Se colectaron 10 muestras de suelo de 1 kg en cada punto. La distancia y el marcaje de los puntos se asignó por medio de un GPS.

Las muestras de suelo se tomaron con una pala de tipo corte. Para esto se removió la capa superficial presente y se excavó en forma de “v” a una profundidad de 20 cm. Posteriormente, las muestras fueron mezcladas para homogeneizar el nivel de contaminación, después fueron colocadas en bolsas de polietileno previamente etiquetadas para su traslado.

6.4 Manejo de las muestras

Una vez colectado el suelo, fue llevado al área de bioensayos perteneciente a la Universidad Veracruzana, donde las muestras se secaron a temperatura ambiente. Las muestras se trituraron con un mazo de madera para luego, tamizarlas con una malla de 2-3 mm y así eliminar cualquier tipo de basura u otro material no deseado para el experimento. A partir de la muestra compuesta se utilizó 1.5 Kg del suelo para el análisis fisicoquímico y de 100 a 200 g para el aislamiento bacteriano.

6.5 Análisis fisicoquímicos del suelo

El análisis se realizó en el “laboratorio de suelos” de la Universidad Veracruzana. La muestra de 1.5 kg suelo se dejó secar a temperatura ambiente en una charola de plástico, después fue cribada con un tamiz del No. 10. Posteriormente se llevaron a cabo los siguientes análisis fisicoquímicos: clase textural (hidrómetro de bouyoucos), pH, temperatura, salinidad y conductividad eléctrica (multiparámetro), densidad aparente (método de la probeta), determinación de materia orgánica (técnica de Walkley-Back), nitrógeno total, fósforo, potasio, hierro, aluminio, sulfatos, manganeso, cloruros y carbonatos (kit LAMOTE), calcio, magnesio, caliza activa y capacidad de intercambio catiónico mediante la suma de cationes. Los resultados obtenidos fueron interpretados según la clasificación agronómica correspondiente.

6.6 Aislamiento bacteriano

El medio de cultivo que se utilizó para el aislamiento de las bacterias presentes en las muestras de suelo fue el medio Bushnell-Hass (Fletcher, 2000).

Para este procedimiento el medio Bushnell-Hass se esterilizó en autoclave a 15 psi por 15 min. Posteriormente se agregó 50 mL de medio en frascos estériles, 5 g de suelo contaminado y 0.5 mL de petróleo como fuente de carbono, dichos frascos se incubaron en la estufa a 30°C en un lapso de 72 h. Una vez que se observó degradación de hidrocarburo durante el tiempo de incubación se procedió a realizar el cultivo en agar por medio de un asa bacteriológica utilizando la técnica de siembra en estría.

6.7 Cultivo en agar

Después del proceso de aislamiento, se efectuó el cultivo bacteriano en cajas Petri que contenían 20 mL de medio nutritivo estéril. A partir del cultivo bacteriano obtenido en el medio Bushnell-Hass, estas cepas se incubaron a una temperatura de 35°C en un periodo de 24 h de acuerdo con Fletcher (2000).

6.8 Purificación de las cepas bacterianas

La purificación de cepas bacterianas consistió en realizar resiembras sucesivas a partir del primer cultivo hasta alcanzar un grado de pureza, se estableció como límite la morfología de las colonias bacterianas. Una vez identificadas las colonias fueron

almacenadas en agar nutritivo bajo condiciones de refrigeración (4°C) con el fin de preservar su viabilidad.

6.9 Tinción de Gram

Durante el proceso de purificación se realizó la tinción de Gram tomando una asada de bacterias colocándolas en un portaobjeto sobre el microscopio a 100x para determinar su morfología e identificación de las bacterias positivas y negativas.

6.10 Selección de cepas bacterianas de acuerdo con su capacidad de degradación

Las cepas bacterianas se clasificaron de acuerdo con su eficiencia en la biodegradación de hidrocarburos con respecto al tiempo (Fletcher, 2000).

6.11 Medición del crecimiento bacteriano

Para la realización del crecimiento bacteriano se empleó un método indirecto (turbidimetría) por medio de un espectrofotómetro ajustando la longitud de onda a 625 nm. Para ello se utilizó un matraz con 120 mL de medio nutritivo estéril que se inoculó con una suspensión bacteriana. Posteriormente, el matraz fue incubado a una temperatura de 35°C. Seguidamente, se analizó la evolución del crecimiento bacteriano tomando muestras de 3 mL de medio nutritivo a cada hora y midiendo su densidad óptica con un Espectrofotómetro VELAB VE-5000.

6.12 Bioaumentación bacteriana

Para este proceso se utilizaron bacterias autóctonas del suelo contaminado de San Jerónimo, Veracruz. La bioaumentación se desarrolló en condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar, con la ayuda de mecheros, asa bacteriológica, guantes y cubre boca, dicha bacteria fue inoculada en tubos de ensaye que contenían medio nutritivo. Posteriormente se vertieron en matraces de 500 mL, y se obtuvo un volumen de 2, 500 mL de caldo inoculado con bacterias. Una vez obtenida la biomasa las bacterias se vertieron a un garrafón de plástico con 20 litros de agua purificada para obtener una mezcla homogénea.

6.13 Cuantificación bacteriana

Este proceso se determinó mediante el recuento bacteriano en placa para ello se tomó una alícuota del cultivo bacteriano. Posteriormente se prepararon diluciones partiendo del tubo inoculado, se tomó 1 mL de este y se agregó a otro tubo con 9 mL de solución salina, se agitó por 15 s, se tomó 1 mL del segundo y se agregó a otro tubo, se repitió el mismo procedimiento hasta obtener la dilución 10^{-4}. Se cuantificó el número de microorganismos presente en todas las diluciones, sembrando 1 mL de cada una de estas en cajas petri, se agregó 20 mL de medio nutritivo, se homogenizó y se dejó solidificar, se incubó a 35°C por 48 h. Pasado el tiempo de incubación, se realizó el conteo de las colonias utilizando un contador de colonias marca Scientific modelo CVP-CM3, se seleccionó aquellas diluciones que presentaron un número entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC).

Posteriormente, se calculó el número de UFC/mL presente en la alícuota obtenida, de acuerdo con la siguiente formula:

$$\frac{Número\ de\ colonias}{Volumen\ sembrado} * \frac{1}{Factor\ de\ dilución}$$

De esta manera; el número de UFC/mL se calculó dividiendo el número de colonias resultantes entre el volumen sembrado 1 mL por 1 entre el factor de dilución que fue de 10000, ya que se utilizó la dilución 10^{-4}.

6.14 Esterilización del suelo

Para este procedimiento el suelo se colocó en bolsas de polipapel envueltas en papel estraza con capacidad de aproximadamente 3 kg. Se esterilizó en autoclave a 1.03 k/gcm^3 a (15 psi) por 15 minutos.

6.15 Agente texturizante

El agente texturizante utilizado se seleccionó en función de su abundancia y disponibilidad. Los pseudotallos se obtuvieron de una parcela dedicada al cultivo de plátano en el municipio de Tihuatlán, Veracruz. Donde se cortaron y posteriormente se sometieron a los siguientes tratamientos: secado a temperatura ambiente, disminución de tamaño, trituración en molino y tamizado en malla. Posteriormente el texturizante de plátano fue sometido a un análisis bromatológico y fisicoquímico. Para el análisis bromatológico fue necesario colocar 150 g de pseudotallo de plátano fresco en una tara de aluminio previamente etiquetada. Se ejecutó la caracterización

física del texturizante en el laboratorio de bromatología perteneciente a la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Campus Tuxpan, mediante la técnica de análisis químico proximal. La caracterización contempló la determinación de materia seca y humedad, la proteína cruda, extracto etéreo, fibra cruda, elementos libres de nitrógeno, porcentaje total de nutrientes digestibles, energía digestible y energía metabolizable, en base humedad, base seca 90 % y base seca al 100 %.

6.16 Aplicación de bacterias al suelo contaminado por hidrocarburos

El volumen de solución bacteriana se vertió a una bomba de aspersión (marca Berthoud) nueva y perfectamente limpia para suministrar la biomasa bacteriana al suelo contaminado. El suelo contaminado se extendió con pala en contenedores, y la solución bacteriana se asperjó al suelo de manera uniforme.

6.17 Experimento de biopilas

6.17.1 Conformación de las biopilas

Las biopilas se construyeron sobre contenedores de plástico con dimensiones de 0.44 m de ancho, 0.63 m de largo y 0.35 m de alto (Figura 2). El sistema de aireación en las biopilas se realizó de manera continua por medio de una red de tubería conectada a un aireador (blower), los tubos se perforaron y se colocaron a cada 10 cm de alto. Para garantizar la humedad se adicionó agua purificada. Las biopilas se cubrieron con una membrana impermeable para la protección de rayos solares. A los tratamientos se les adicionó suelo contaminado por hidrocarburo, variando los estímulos para cada tratamiento respectivamente como se describe a continuación:

suelo contaminado como control T1 (C), otro tratamiento con suelo contaminado más la bioaumentación bacteriana T2 (BioBac), suelo contaminado más texturizante de plátano T3 (TexPla) y por último suelo contaminado, bioaumentación bacteriana más texturizante de plátano T4 (BioBacTexPla). Basándose en una revisión bibliográfica se determinó que la cantidad de suelo contaminado que se mezcló con el texturizante de plátano fue en una relación 49:1.

El lugar para los tratamientos se ubicó en el área de bioensayos dentro de las instalaciones de la Universidad Veracruzana Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. El experimento de biorremediación tuvo una duración de tres meses.

Figura 2. Distribución aleatoria de los tratamientos.

6.17.2 Diseño experimental

Se consideró un diseño experimental aleatorio y se utilizaron cuatro tratamientos y tres repeticiones. Cada tratamiento presentó tres unidades experimentales. (Cuadro 2).

Cuadro 2. Distribución de tratamientos.

Tratamientos	Composición	Repeticiones		
T_1	Suelo contaminado control (C)	T_2 BioBac	T_4 BioBacTexPla	T_2 BioBac
T_2	Suelo contaminado más bioaumentación bacteriana (BioBac)	T_4 BioBacTexPla	T_3 TexPla	T_3 TexPla
T_3	Suelo contaminado más texturizante de plátano (TexPla)	T_1 C	T_1 C	T_2 BioBac
T_4	Suelo contaminado más bioaumentación bacteriana y texturizante de plátano (BioBacTexPla)	T_1 C	T_4 BioBacTexPla	T_3 TexPla

6.18 Determinación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP)

Los análisis se realizaron en el laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, por medio del método de reflujo utilizando el equipo Soxhlet, tomando como referencia los métodos D5369-93 de la ASTM (2003), 3540C y 3541 de la USEPA (1996,1994) en (Fernández *et al*., 2006).

16.18.1 Preparación de la muestra de suelo para la extracción

La pila se homogenizó y aéreo antes de tomar las muestras para la extracción, después se siguió el procedimiento para determinar la humedad que consistió en poner a secar la muestra a 30°C de 8-15 g de suelo extendida en un papel aluminio, durante 48 horas, en un cuarto de temperatura controlada o a la sombra. Se molió la muestra en un mortero hasta obtener partículas finas. Se colocó la muestra seca en un frasco seco y limpio (Lastra-Blanco, 2010 y Santiago-Reyes, 2013). Se determinó la humedad final de estás, como se indica a continuación: pesar la cantidad de muestra, necesaria a ocupar para la extracción, sobre un papel o charola de aluminio a peso constante. La muestra se colocó dentro de la estufa a 80°C de 12 a 24 horas. Después se depositó dentro de un desecador para su enfriamiento. Por último, se pesó la muestra con todo y papel. El porcentaje de humedad se determinó por la diferencia de pesos de acuerdo con (Fernández *et al*., 2006) utilizando la siguiente fórmula:

$$\%\ \text{humedad} = \frac{(\text{peso inicial} - \text{peso final})}{(\text{peso inicial})\qquad(100)}$$

16.18.2 Extracción y cuantificación de hidrocarburos

Para extraer los hidrocarburos del suelo contaminado se utilizó el método de reflujo con equipo Soxhlet según (Fernández *et al*., 2006).

La extracción y cuantificación de los hidrocarburos se realizó al inicio del experimento y posteriormente a los 30 y 90 días.

6.19 Seguimiento del tratamiento por biopilas

Se realizó una caracterización fisicoquímica del suelo contaminado por hidrocarburos, mediante la determinación de los siguientes parámetros temperatura (Anexo A), pH (Anexo B) y humedad (Anexo C) semanalmente y %HTP mensualmente durante el procedimiento (En el cuadro 3 se muestran los parámetros a monitorear).

Cuadro 3. Determinaciones fisicoquímicas del suelo semanal y mensual durante el experimento.

Parámetro	Método o técnica	Índices adecuados	Periodicidad
Temperatura	Termómetro	20°C-40°C	Semanalmente
PH	Potenciómetro	6-9	Semanalmente
Humedad	Eliminación térmica del agua.	20-80 %	Semanalmente
%HTP	Método Soxhlet	**(**NOM-138-SEMARNAT/SS-2003	Mensualmente (al inicio, 30 y 90 días)

6.20 Análisis estadísticos

Los valores de porcentaje de remoción de hidrocarburos fueron transformados por arcseno $\boldsymbol{\theta} = \mathbf{arcseno}\sqrt{\mathbf{p}}$ para la normalización de los porcentajes. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza con un α de 0.5 y por último un análisis de comparación de medias con el software estadístico STATISTICA 7, los gráficos fueron procesados por el software GraphPad.

VII. RESULTADOS

7.1 Caracterización del suelo contaminado

7.1.1 Análisis físico del suelo contaminado

De acuerdo con el análisis físico realizado a la muestra de suelo sus principales componentes fueron arena con el 21.16 %, arcilla 26.12 % y limo 52.72 %, por lo que se obtuvo un suelo con clase textural franco limoso conforme a la clasificación agronómica del triángulo de texturas (Figura 3).

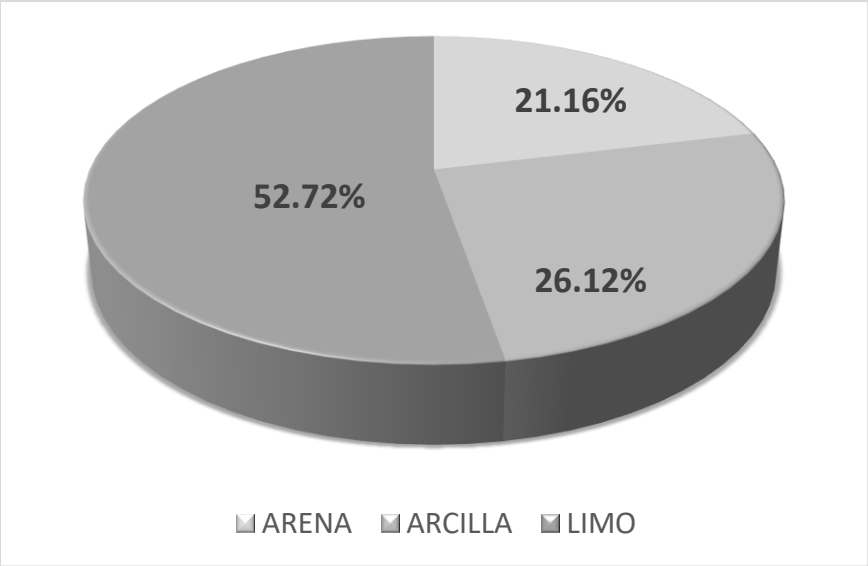

Figura 3. Proporción de arena, arcilla y limo del suelo contaminado.

En cuanto a la densidad aparente que se presentó, fue de 1.43 g/cm^3 considerándose como media. Con respecto a la conductividad eléctrica, el suelo se clasificó como ligeramente salino con 7243.43 dS/m, con una temperatura de 25.7°C y una salinidad media de 1.451 % en la clasificación agronómica (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resultados del análisis físico del suelo

Parámetro	Resultados	Criterio de la clasificación agronómica	Interpretación
Densidad aparente	1.43 g/cm^3	1.2 a 1.59	Media
Conductividad eléctrica	7243.43	----------	Ligeramente salino dS/m
Temperatura	25.7°C	----------	----------
Salinidad	1.451 %	1.3 a 2	Mediana salinidad

7.1.2 Análisis químico del suelo contaminado

Los resultados del análisis químico del suelo revelaron que el pH fue de 7.56. Por otra parte, los carbonatos presentan 49.5 %, la caliza activa obtuvo un valor de 24.98 %. Por otro lado, materia orgánica registró un valor de 7.25 %.

En la determinación de minerales el nitrógeno total presentó un valor de 36.3 ppm, el fósforo 37 ppm y el potasio 200 ppm. Para el calcio se obtuvo un valor de 14,448 ppm, para magnesio 10,154.88 ppm, el manganeso con 5 ppm, el hierro con 2.5 ppm, el aluminio presentó 125 ppm, cloruro 25 ppm, sulfatos 100 ppm, para la capacidad de intercambio catiónico se registró 172.48 eq/100g (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados del análisis químico del suelo.

Parámetros del suelo contaminado	Resultados obtenidos	Criterio de la clasificación agronómica	Interpretación
pH	7.56	7.4-7.7	Ligeramente alcalino
Carbonatos	49.95 %	>40	Muy alto
Caliza activa	24.98 %	>20	Muy alto
Materia orgánica	7.25 %	>4.21	Extremadamente rica
Nitrógeno total	36.3 ppm	25-62.5	Medio alto
Fósforo	37 ppm	37	Medio
Potasio	200 ppm	200	Alto
Calcio	14,448 ppm	>2800	Muy rico
Magnesio	10,154.88	150	Muy alto
Manganeso	5 ppm	5	Bajo
Hierro	2.5 ppm	2.5	Marginal
Aluminio	125 ppm	125	Muy alto
Cloruros	25 ppm	0-25	Muy bajo
Sulfatos	100 ppm	100	Bajo
Capacidad de intercambio catiónico	172.48 eq/100g	>40	Muy alto

7.2. Purificación de cepas bacterianas hidrocarburolíticas axénicas

Después de las resiembras sucesivas se obtuvieron colonias bacterianas de aspecto plano con coloración beige, que se muestran en la (Figura 4). Por otra parte, se identificaron bacterias bacilares Gram negativo (Figura 5).

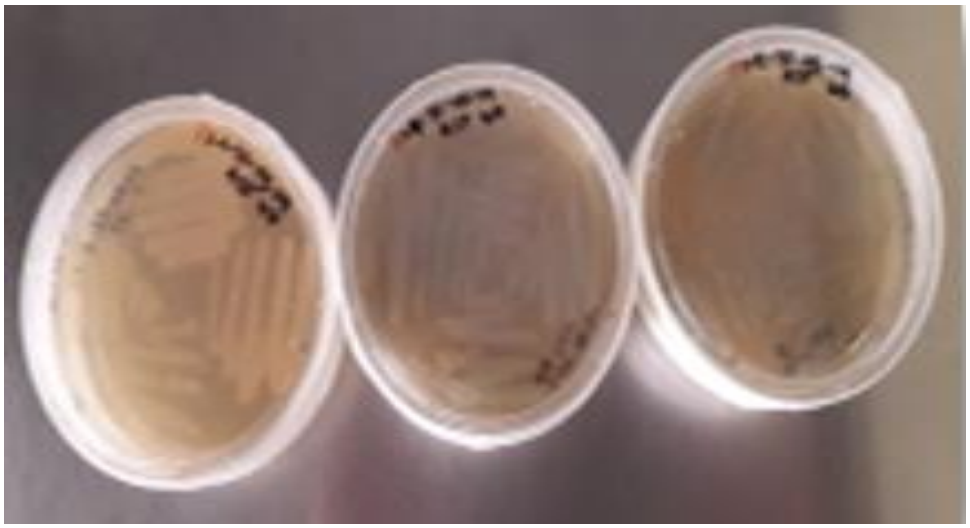

Figura 4. Morfología macroscópica: colonias de aspecto plano con coloración beige.

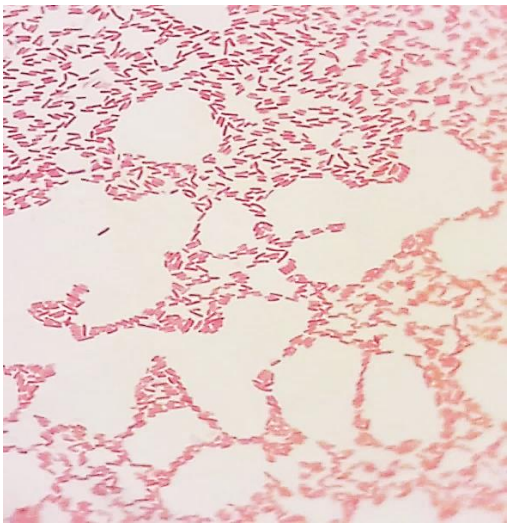

Figura 5. Morfología microscópica: formas bacilares Gram negativo.

7.3 Selección de cepas bacterianas de acuerdo con su capacidad de degradación

Al término de la prueba cualitativa solo la cepa 6 fue elegida como la más eficiente. En la figura 6 se muestra como la cepa 6 (C6) a las 144 horas de inoculación logró una degradación de petróleo del 19 %, mientras que el resto de las cepas presentaron degradaciones del 0 a 8 %.

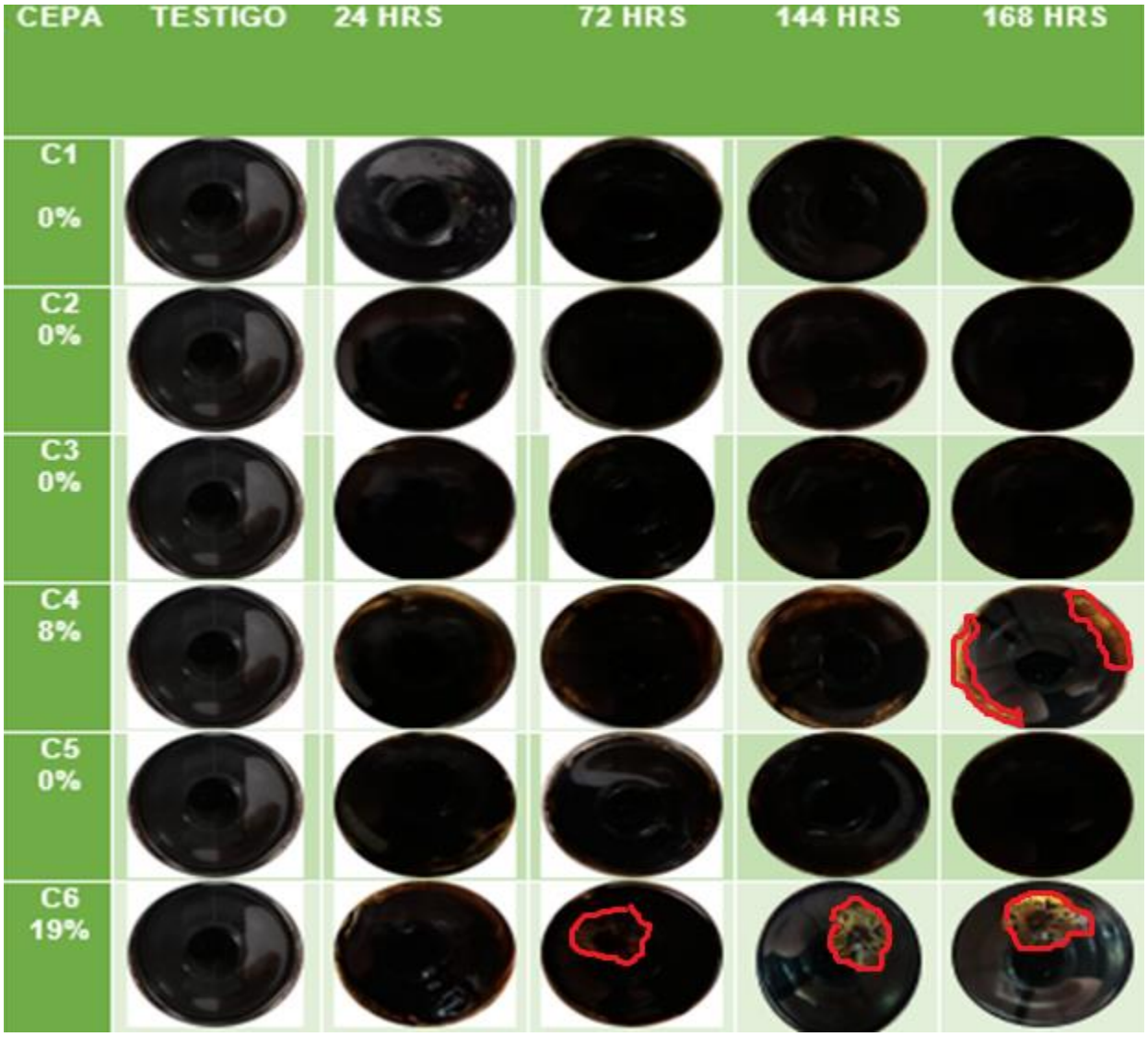

Figura 6. Selección de cepas bacterianas con forme a su capacidad de degradación.

7.4 Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento mostró que la fase de Lag culmina al cabo de las 13 h con un valor de 0.199 de absorbancia. Posteriormente el crecimiento se mantuvo con un incremento hasta las 17 h a partir del cual se observó la fase Log (exponencial) hasta las 27 h que finalizó el monitoreo en donde se puede observar que aún no alcanzaba la fase estacionaria (Figura 7). La bacteria fue bioaumentada y cosechada a partir de la fase exponencial en la hora 27 con un valor de 1.109 de absorbancia para después ser adicionada a los tratamientos.

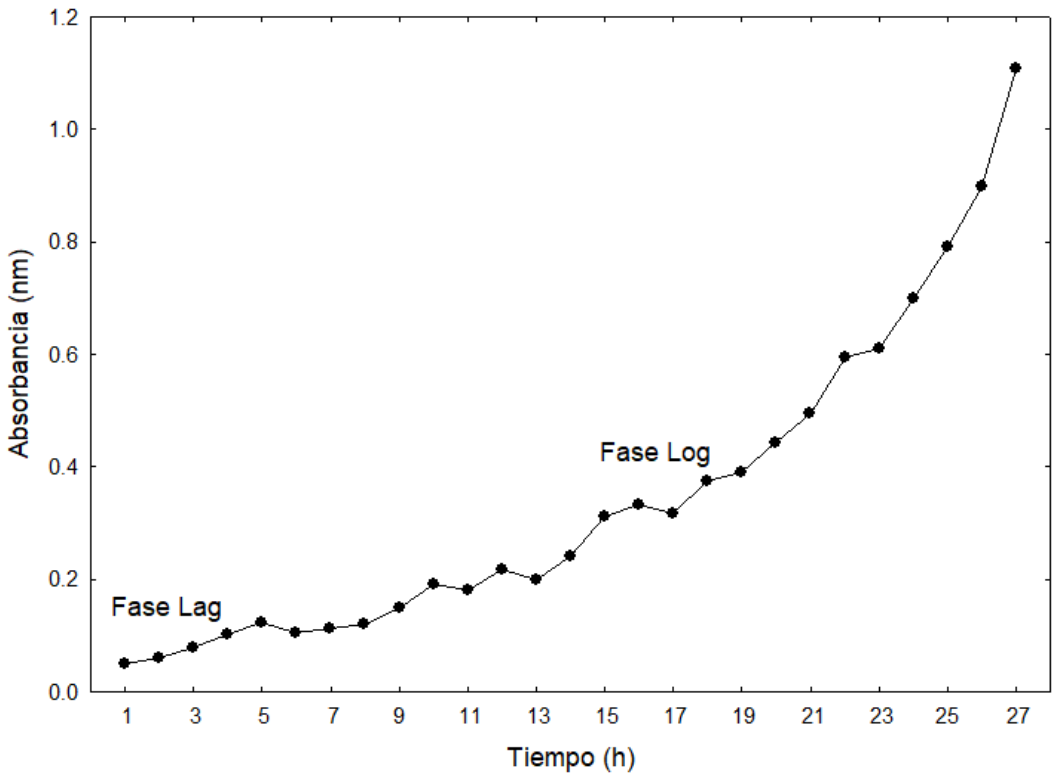

Figura 7. Cinética de crecimiento en medio nutritivo en horas.

7.5 Cuantificación bacteriana

El contador de bacterias indicó que la cantidad de células bioaumentadas fue de 1, 440, 000 UFC/mL.

7.6 Caracterización bromatológica del texturizante de plátano

Del análisis bromatológico se determinó que los elementos libres de nitrógeno, fibra cruda y extracto etéreo en base seca al 100 % fueron los componentes que presentaron una mayor concentración. (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis bromatológico del pseudotallo de plátano.

Determinaciones	**Base seca 100 %**
Proteína cruda	2.49
Extracto etéreo	14.63
Cenizas totales	6.91
Fibra cruda	26.01
Elementos libres de nitrógeno	50

.

7.7 Remoción de HTP

Al iniciar el proceso de biorremediación los tratamientos presentaron una concentración de 36, 843.27 mg/kg de HTP. En la figura 8, se observan los resultados de la remoción de HTP durante el proceso de biorremediación aplicado a los tratamientos. A los 30 días se encontró que el tratamiento T1 C presentó una concentración de 22,135.66 mg/kg, lo que corresponde a un 39.92 % de remoción, que fue el valor más bajo al compararlo con los demás tratamientos. Posteriormente el tratamiento T2 BioBac registró una concentración de 17,435.89 mg/kg, que representa un 52.68 % de remoción. Dicho valor fue el más alto con respecto a los demás tratamientos. En el tratamiento T3 TexPla se obtuvo una concentración de 18,468.78 mg/kg con un 49.87 % de remoción. Relativo al tratamiento T4 BioBacTexPla la concentración fue de 19,183.49 mg/kg, lo que corresponde a un 47.93 % de remoción de hidrocarburos totales de petróleo.

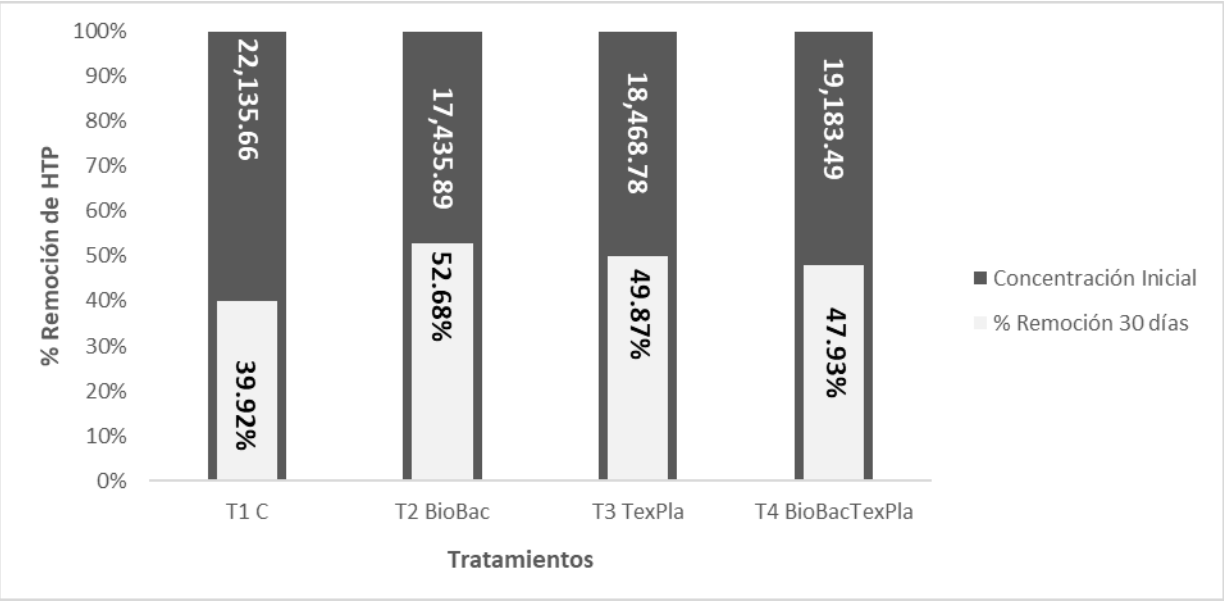

Figura 8. Valor promedio de remoción de HTP a los 30 días de biorremediación.

En la figura 9, se observa el resultado del análisis estadístico, de acuerdo con el mismo, se obtuvo que a los 30 días el tratamiento T2 BioBac presentó un valor de 0.81 % que fue el valor máximo y significativamente mayor con respecto a los demás tratamientos. El tratamiento T3 TexPla registró un valor promedio de 0.78 %. Por otro lado, el tratamiento T1 C evidenció un valor mínimo y significativamente menor de 0.68 % mostrando diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos T2 y T3. Por último, el tratamiento T4 BioBacTexPla obtuvo un valor de 0.75 %. Por otra parte, los tratamientos T2, T3 y T4 no fueron estadísticamente significativos.

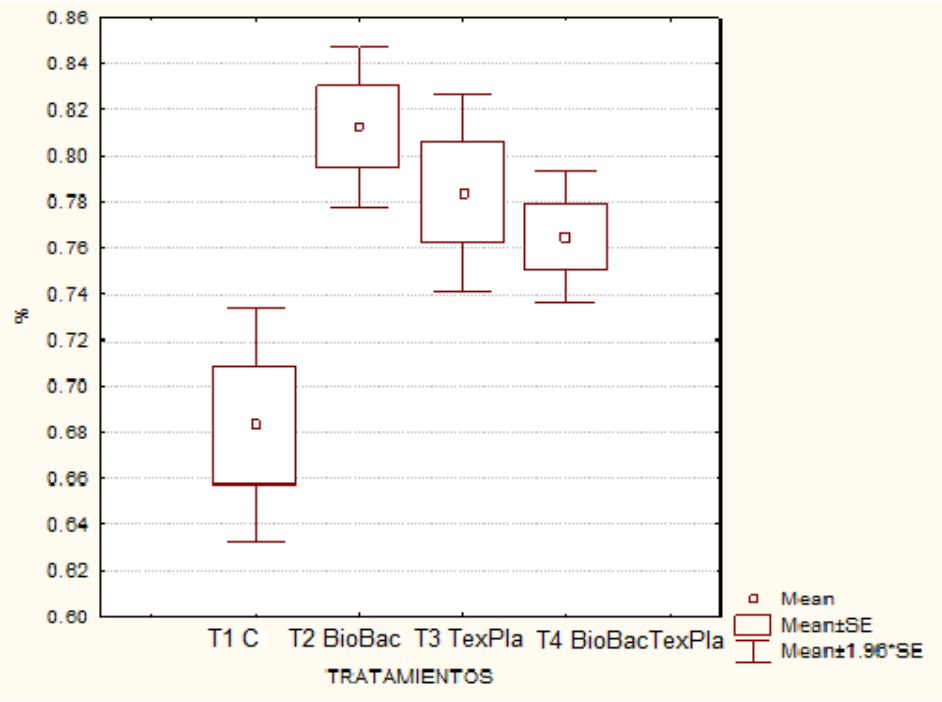

Figura 9. Porcentajes de remoción de HTP a los 30 días.

Finalmente, en la figura 10 se observa que, en el lapso de los 30 a 90 días del proceso de biorremediación el tratamiento T4 BioBacTexPla obtuvo una concentración 15,152.85 mg/kg, con un 58.87 % de remoción. Dicho valor mostró una degradación máxima con respecto a los demás tratamientos. Por otra parte, el tratamiento T2 BioBac registró una concentración de 15,950.98 mg/kg, que representa un 56.71 % de remoción. Para el tratamiento T3 TexPla se determinó una concentración de 17,758.57 mg/kg, que corresponde a un 51.80 % de remoción. El tratamiento T1 C presentó el valor mínimo con un 41.08 % de remoción de hidrocarburos y una concentración de 21,706.40 mg/kg.

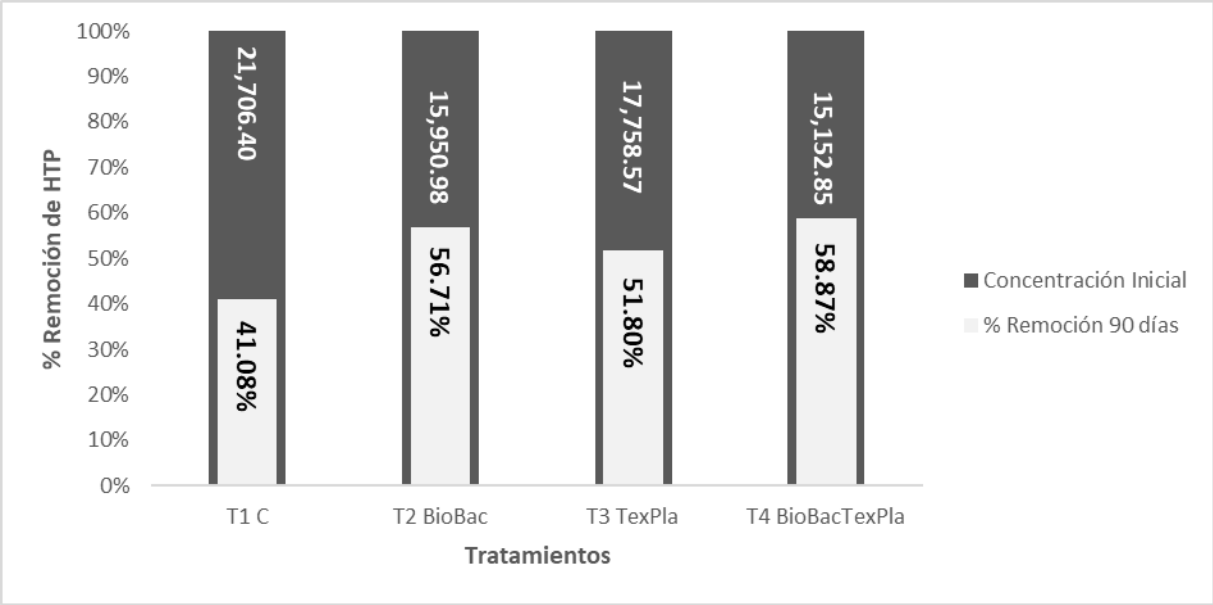

Figura 10. Valor promedio de remoción de HTP a los 90 días de biorremediación.

En la figura 11, se observa que el tratamiento T4 BioBacTexPla presentó un valor de 0.87 % que fue el valor máximo y significativamente mayor con respecto a los demás tratamientos. El tratamiento T2 BioBac registró un valor promedio de 0.85 %. Por otro lado, el tratamiento T3 TexPla evidenció un valor de 0.80 %. Por último, el tratamiento T1 C mostró un valor mínimo y significativamente menor mostrando diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en los tratamientos T2, T3 y T4. Por otra parte, los tratamientos T2, T3 y T4 continuaron sin diferencias estadísticas significativas entre sí.

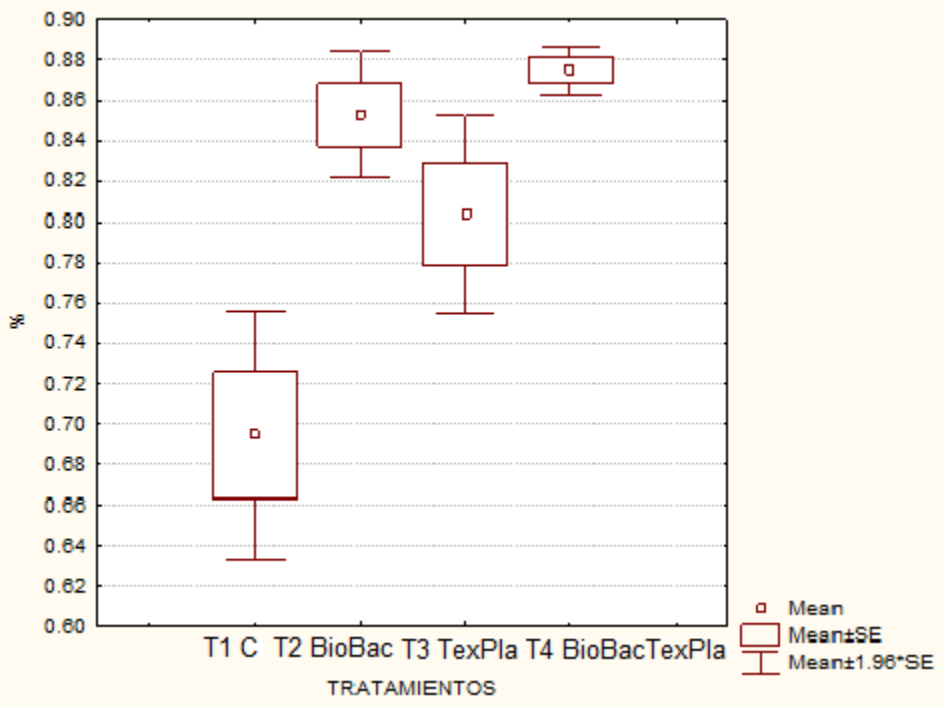

Figura 11. Porcentajes de remoción de HTP a los 90 días.

VIII. DISCUSIÓN

8.1 Caracterización del suelo en la biorremediación

Uno de los aspectos a considerar durante los procesos de biorremediación son las características fisicoquímicas del sustrato, ya que estas determinan las condiciones necesarias para el desarrollo y crecimiento de los microorganismos.

La textura del suelo afecta el metabolismo de los microorganismos con capacidad de remover los hidrocarburos (Gielnik *et al.*, 2016). La arcilla tiene baja transferencia de oxígeno lo que amenaza el crecimiento de los microorganismos aeróbicos (Abbasian *et al*., 2015). Encontraste en el presente estudio el suelo presentó una textura franco-limosa, este tipo de sustrato tiene una porosidad equilibrada, lo que puede incrementar el contenido de oxígeno y mejorar la mineralización de los hidrocarburos. Por otra parte, la combinación de partículas representa un factor clave en la biorremediación pues establecen un ambiente adecuado para el desarrollo de los microorganismos (García *et al.,* 2012). Lo cual está relacionado con los resultados obtenidos en la presente investigación, ya que la muestra presentó una variación con dos tipos de partícula franco y limo, probablemente el tipo de textura permitió el desarrollo de la cepa bacteriana al presentarse condiciones adecuadas como la retención de humedad y nutrientes que favorecieron la biodegradación de los hidrocarburos.

Generalmente los suelos contaminados con hidrocarburos tienden hacer ácidos lo cual limita el crecimiento y la actividad de los microorganismos (Doria-Argumedo, 2018). No obstante, en este estudio la muestra de suelo contaminado presentó un pH ligeramente

alcalino con un valor de 7.56, esto probablemente se atribuye a que el pH varía en función de las características del suelo. Un pH extremadamente alcalino o ácido propician que la biodegradación de los hidrocarburos disminuya (Bruton-Pinazo, 2020). Sin embargo, el pH ligeramente alcalino registrado en este estudio influyó en la remoción de los hidrocarburos logrando una degradación del contaminante de más del 40 %. Esto se atribuye a que el pH se encontró dentro de lo establecido garantizando el crecimiento de la cepa autóctona, la solubilidad de nutrientes y de los hidrocarburos lo que ayuda al proceso de biorremediación.

La materia orgánica registrada en este estudio presentó un valor de 7.25 %, considerado como extremadamente rico. Estos valores probablemente se ven influenciados por los contaminantes orgánicos dado a que cuando ocurre un derrame aumenta la carga de materia orgánica (Barrios-San Martín, 2011). Con respecto a lo anterior, en la presente investigación se reportó un alto porcentaje de materia orgánica, situación que podría deberse a que el suelo muestreado fue tomado de un sitio contaminado con derrames de petróleo, por ello el suelo presentó un alto grado de contaminación influyendo directamente en la concentración de la materia orgánica. Probablemente los porcentajes de M. O obtenidos en esta investigación son aptos para establecer la biodisponibilidad del contaminante hacia los microorganismos favoreciendo los procesos de biorremediación.

Cuando ocurre un derrame petróleo en el suelo hay una masa de carbono disponible en el suelo para el crecimiento de los microrganismos y los nutrientes nitrógeno y fósforo son escasos en el suelo (Naseri *et al*., 2014). Por el contrario, el suelo muestreado en este estudio presentó concentraciones medias de N y P. Esta razón podría atribuirse al

contenido de materia orgánica mediada por la descomposición de cobertura vegetal y humus, ya que altas concentraciones indican la capacidad de proporcionar nutrientes esenciales (Herrera-Navarrete, 2011). Tal es el caso como en la presente investigación donde se registra una materia orgánica rica. Por el contrario, se ha reportado que estos nutrientes pueden ser ajustados mediante la adición de fertilizantes inorgánicos como urea y fosfatos para acelerar la biodegración de los hidrocarburos (Vallejo *et al*., 2016). A diferencia en este estudio más que adicionar fertilizantes se optó por incrementar la biomasa bacteriana de la cepa aislada con capacidad de eliminar los hidrocarburos. La concentración de nutrientes en este suelo probablemente estimuló la actividad metabólica de la cepa propiciando la remoción del contaminante.

8.2 Obtención de cepas bacterianas hidrocarburolíticas

En un estudio realizado por Nasser *et al*., (2020) aíslan 16 cepas bacterianas de un sitio contaminado, mediante pruebas de biodegradación determinó que todos los aislamientos presentaron potencial de remover hidrocarburos. Encontraste en la presente investigación se aislaron 6 cepas bacterianas de un sitio contaminado, sin embargo, se determinó que solo 2 cepas fueron capaces de crecer en presencia de hidrocarburos como única fuente de carbono. La razón de esto podría deberse a que no todas las bacterias están adaptadas al contaminante, dado a que en un sitio contaminado las comunidades microbianas son dominadas por aquellos microorganismos capaces de utilizar o sobrevivir a compuestos tóxicos, como en los sitios contaminados con hidrocarburos, tal es el caso de las 2 cepas aisladas (C4 y C6).

Por otra parte, se ha informado que existen bacterias capaces de utilizar petróleo para su crecimiento y mantenimiento, mejor conocidas como bacterias hidrocarburolíticas (Martínez *et al.*, 2015). En concordancia con esto se especula que la cepa 4 y 6 presentaron rasgos de ser hidrocarburolíticas, ya que al estar en contacto con los hidrocarburos en su ambiente natural desarrollaron respuestas de adaptación que contribuyeron en la degradación del hidrocarburo. Sin embargo, la cepa 6 presentó mayor porcentaje de remoción en comparación con la cepa 4 dado a que la capacidad de degradar hidrocarburos depende de la actividad metabólica de cada microorganismo. Por lo tanto, la cepa 6 se seleccionó como inoculo para mejorar la biodegración de los hidrocarburos mediante el incremento de su biomasa por bioaumentación.

Se ha reportado que los procesos de biorremediación pueden estar favorecidos al introducir microrganismos mediante bioaumentación exógena (Li *et al*., 2016). Sin embargo, los efectos en la biodegradación son específicos de cada caso y los resultados varían en función de los inóculos introducidos. Para garantizar el éxito en este estudio se empleó una cepa bacteriana autóctona extraída de un suelo contaminado con capacidad de metabolizar hidrocarburos, de acuerdo con estudios previos se considera que las especies autóctonas se han adaptado al estrés ambiental en el entorno circundante y por lo tanto son más adecuadas para la biodegradación de hidrocarburos (Liu *et al*., 2019). De manera que la cepa obtenida en el sitio se adaptó a la concentración de hidrocarburo presente en su entorno lo cual resultó favorable en la prueba de biodegradación demostrando su eficiencia en el proceso de biorremediación al asimilar los hidrocarburos.

La cepa bacteriana aislada y bioaumentada durante el proceso de biorremediación presentó una morfología bacilar de forma negativa en la tinción Gram, pues un semblante rosado fue evidenciado en la observación al microscopio como consecuencia de la decoloración de la capa de peptidoglicano que rodea la célula. Rabelo-Flórez y De La Rosa-Martínez (2020), sugieren que en suelos afectados por hidrocarburos predominan bacterias Gram negativas. Lo cual es comprobado en este estudio debido a que se confirmó la presencia de bacterias Gram negativas aisladas de un sitio contaminado por hidrocarburos al igual que (Anza-Cruz *et al.*, 2016).

Por otra parte, Tanti *et al*., (2012) demostraron que bacilos Gram negativos, tienen la habilidad de oxidar los hidrocarburos mediante complejos enzimáticos. Este tipo de bacterias, degradan los compuestos del petróleo en estructuras más biodisponibles mediante mineralización. Se puede especular que las bacterias aisladas tienen la

capacidad de producir enzimas catabólicas para utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono, ya que en esta investigación se logró remover los hidrocarburos presentes en una muestra de suelo por medio de bacilos Gram negativos, por lo cual se considera que estos morfotipos son importantes en procesos de biorremediación, dado a que son capaces de metabolizar hidrocarburos. Este hecho podría deberse a que probablemente la presencia de lipopolisacáridos en sus membranas beneficia la estabilización de hidrocarburos en sistemas acuosos, facilitando el contacto de los contaminantes hacia los microorganismos para su posterior biodisponibilidad y biodegradación.

8.3 Remoción de hidrocarburos

En la presente investigación se evidenció la remoción de hidrocarburos en la muestra de suelo contaminado como control en el tratamiento T1 C con un valor de 39.91 % en los primeros 30 días. La baja remoción del hidrocarburo en este tratamiento probablemente se debió a la ausencia de estimulación bacteriana y de texturizante. Sin embargo, presentó diferencias estadísticas en relación con los tratamientos T2 y T3. Experiencias en procesos de biorremediación han presentado remoción de hidrocarburos en muestras de suelo contaminado catalogadas como control (Wang *et al*., 2012). Gómez y Sartaj, (2014) obtuvieron degradación en una muestra de suelo tratada como control de 48 %, ya que evidenció la presencia de microorganismos heterótrofos. En contraste, en el presente estudio la remoción del hidrocarburo presentada en el tratamiento T1 C probablemente se debió a la influencia de la adición de aireación (bioventeo) y humedad, así como también a factores como la luz solar que pueden contribuir con la evaporación, volatización, fotooxidación y biodegradación de los hidrocarburos. Dado a que se han reportado estudios donde confirman que estas condiciones son un factor crítico que afectan significativamente la remoción de los hidrocarburos en el tratamiento de suelos (Ramírez-Segura *et al*, 2016; Zhang *et al*., 2021).

En cambio, el tratamiento que demostró el mayor porcentaje de remoción al compararlo con los tratamientos T3, T4 y T1 fue el T2 BioBac con un 52.58 %, esto se atribuye a la actividad metabólica de la bacteria a causa de que este tratamiento contenía el estímulo de la bioaumentación bacteriana al igual que el T4 que contenía la bioaumentación bacteriana más el texturizante de plátano, sin embargo, el porcentaje de remoción en el T4 fue menor al compararlo con el T2. Estos resultados son similares a los obtenidos por

Nasser *et al*., (2020); Muskus *et al.*, (2013) quienes obtienen mayores porcentajes de remoción mediante el incremento de una cepa bacteriana. Estos resultados confirman que el incremento de la biomasa bacteriana se correlaciona positivamente con la disminución del contaminante.

Con respecto a los tratamientos T3 y T4 que contenían la adición del texturizante de plátano presentaron porcentajes de remoción similares de 49.87 % y 47. 93 %. Probablemente por la acción del texturizante, cabe destacar que el tratamiento T3 solo tenía la adición del pseudotallo de plátano donde se logró la eliminación del hidrocarburo probablemente por la incorporación de microorganismos, ya que se ha demostrado que los agentes texturizantes promueven el crecimiento de los microrganismos mostrando efectos positivos en la eliminación de los hidrocarburos (Hamzah *et al*., 2012). Lo cual es congruente a lo reportado en este trabajo al obtener la remoción del contaminante en presencia del texturizante sin la adición del inoculo bacteriano.

Por otra parte, en el proceso de biorremediación se empleó la técnica de bioaumentación autóctona en los tratamientos T2 BioBac y T4 BioBacTexPla, estudios previos sugieren que la población microbiana constituye un factor clave en el proceso de biorremediación, ya que estas deben estar adaptadas al compuesto contaminante y tener el potencial para metabolizar los hidrocarburos (Viñas *et*., 2005). En el presente estudio los tratamientos T2 y T4 fueron expuestos a la estimulación con bioaumentación autóctona mediante inóculos crecidos en laboratorio lograron porcentajes de 56.71 % y 58.87 % al término del proceso de biorremediación. Al comparar los porcentajes de remoción presentes en los tratamientos T3 TexPla con 51.80 % y T1 C con 41. 08 % se puede inferir que la inoculación autóctona presentó un aumento significativo en la remoción de hidrocarburos,

esto sugiere que la adición del inoculo bioaumentado en el suelo se adaptó para remover los compuestos orgánicos debido a que esta cepa fue aislada a partir de una muestra contaminada con hidrocarburos. Alkaabi *et al*., (2020) sugieren que las bacterias autóctonas están altamente adaptas y cuando se reintroducen contribuyen a la rehabilitación de sitios contaminados. Por otra parte, los resultados en la presente investigación demuestran la eficiencia de la bioaumentación con microorganismos autóctonos en la remoción de hidrocarburos al igual que Rojo-Santiesteban, (2013) quien obtiene en un proceso de biorremediación en biopilas un porcentaje de remoción del 79.25 % durante 112 días demostrando que el uso de cepas bacterianas autóctonas en procesos de biorremediación es esencial, ya que estas están aclimatadas a las condiciones del sitio, presentando una mejor facilidad para degradar a los hidrocarburos a pesar de su toxicidad.

Durante los procesos de biorremediación se ha evidenciado la influencia de los desechos orgánicos (texturizantes) sobre la biodegradación de hidrocarburos (Rodríguez-Geldres, 2017; Vaca-Mier *et al*., 2017). En este sentido, en la presente investigación los tratamientos T3 TexPla y T4 BioBacTexPla lograron una remoción final de 51. 80 % y 58.87 % respectivamente. Estos resultados probablemente son atribuidos a que la adición de desechos genera el crecimiento de otro tipo de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) tal y como lo señala Gómez y Sartaj, (2014). Por otra parte, se ha reportado que la biodegradación de los hidrocarburos en el suelo puede promoverse modificando las propiedades fisicoquímicas del suelo (Akbari y Ghoshal, 2015). Por lo tanto, se especula que la disipación de los hidrocarburos en estos tratamientos puede atribuirse al tamaño de partícula del texturizante empleado que puede aumentar la

aireación del suelo. Esta estructura podría hacer que el suelo modifique su porosidad constituyendo un hábitat más adecuado para los microorganismos factor que es determinante en la biorremediación. Por el contrario, Llado *et al*., (2013) reportaron que lograron una disminución de hidrocarburos mediante la adición de materiales ricos en lignina porque las enzimas lignolíticas presentan capacidades para la transformación de hidrocarburos. En el presente estudio se evidencio la disminución de los hidrocarburos presentes en el suelo, probablemente las condiciones químicas del texturizante de plátano (elementos libres de nitrógeno que constituyen sustancias como celulosa, lignina, etc.). Hayan estimulado a los microorganismos aumentando la remoción de los hidrocarburos. Aunque los estudios de biodegradación de la lignina se han reportado en hongos, algunas bacterias también pueden degradar este componente (Bugg *et al*., 2011). Ali *et* al., (2011) reportaron que el aserrín fue colonizado de manera natural por microorganismos que degradaron este desecho orgánico y que presentaron potencial de metabolizar los compuestos de hidrocarburo. Por lo tanto, es posible que los residuos utilizados como enmiendas y texturizantes no solo incrementen la porosidad, al mismo tiempo permiten un aumento en la difusión de oxígeno en la matriz del suelo, sino que también contribuyen con nutrientes y microrganismos al suelo para la reactivación de la flora nativa con capacidad metabólica para degradar tóxicos (Ordaz *et al*., 2011).

Por otra parte, se ha reportado que la combinación de microorganismos indígenas y la adición de residuos orgánicos (agentes de carga, texturizantes y enmiendas) presentan influencias sobre la biodegración de los contaminantes (Wang *et al*., 2012). En el presente estudio se probó la inoculación de microorganismos autóctonos y pseudotallo de plátano en un suelo contaminado con hidrocarburos empleando la tecnología de biopilas. Los

efectos obtenidos mostraron que el tratamiento T4 BioBacTexPla a los 90 días del proceso logró un incremento significativo del 58.87 % en comparación con el tratamiento T3 TexPla. Nuestros resultados están de acuerdo con las observaciones informadas por Ma *et al*., (2016) quienes investigaron el efecto de la estrategia de bioaumentación y la adición aserrín en un proceso de biorremediación, obtienen una eliminación del 55.7 % en 90 días similar a lo encontrando en esta investigación. Probablemente las partículas orgánicas del texturizante, la adición de humedad y aireación en esta investigación permitieron recolonizar los microorganismos presentes en el pseudotallo de plátano los cuales se adaptaron junto con los microrganismos inoculados al suelo para estimar su efectividad en la eliminación de hidrocarburos totales del petróleo. Se especula que la adición del texturizante propició un aumento en las concentraciones de nutrientes que aumentaron la biomasa y la actividad metabólica de los microorganismos y como consecuencia la biodegración del hidrocarburo.

Las biopilas tratadas con bioaumentación autóctona resultaron en una rápida degradación de HTP en la etapa inicial (durante los 30 días), en comparación con el control, el texturizante de plátano y la combinación de bioaumentación y texturizante de plátano. Encontrando diferencias significativas en el suelo control respecto a la bioaumentación y el texturizante de plátano durante el periodo de remoción de hidrocarburos. Los resultados indicaron que la degradación de los hidrocarburos fue un 52.68 % en esta biopila en comparación con los demás tratamientos. Por lo tanto, se demostró la eficacia de emplear microorganismos nativos del área afectada para disminuir la contaminación generada por hidrocarburos, siempre y cuando se incite su desarrollo. Por otra parte, a los 90 días la degradación del hidrocarburo fue mayor en la

biopilas tratadas con bioaumentación y texturizante de plátano con un 58.87 % en la remoción del hidrocarburo. En el análisis estadístico en este lapso la biopila suplementada con bioaumentación y texturizante mostró una diferencia significativa en ($p < 0.05$) entre el suelo control, lo que demuestra la contribucion positiva del texturizante y la bioaumentacion en la remocion del hidrocarburo en el suelo. Observaciones similares fueron reportadas por Abioye *et al*., (2009) quienes informaron diferencias significativas entre el suelo enmendado con cascara de melon y el suelo contaminado con hidrocarburos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la remoción de hidrocarburos, se puede observar que durante los primeros 30 días se evidenciaron tasas de degradación rápida en el petróleo presente en el suelo en cada una de las biopilas, ya que se obtuvieron los siguientes valores de remoción 39.92 %, 52.68 %, 49. 87 % y 47. 93 %. Posteriormente, se nota una baja reacción en el proceso pues se evidenciaron pequeños incrementos de degradación en cada uno de los tratamientos. Tal y como se ha descrito en otros estudios donde se reporta que la cinética de remoción de contaminantes orgánicos en suelos habitualmente presenta una fase de remoción rápida seguido de un periodo de disminución con pequeños o inexistentes cambios en las concentraciones iniciales de los hidrocarburos. Lo que coincide con lo reportado a Hernández-Cervantes, (2016) donde obtiene una mayor degradación de hidrocarburos durante los primeros días de tratamiento. Esta cinética es conocida como el fenómeno del “palo de hockey (Alexander, 2005), que puede estar causada por una disminución de los nutrientes, de la población microbiana, la baja biodisponibilidad de compuestos orgánicos por su carácter recalcitrante y condiciones fisicoquímicas desfavorables.

En el presente trabajo se determinó un contenido inicial de hidrocarburos de 36, 843.27mg/kg de HTP /kg de suelo, en base a la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 que establece los límites máximos permisibles de contaminación en suelos afectados por derivados del petróleo, caracterización del sitio y procedimiento para su restauración en suelos de uso agrícola, forestal, recreativo y de conservación indica que el valor máximo es de 3,000 mg/kg. Durante el proceso de biorremediación en biopilas no se alcanzó a estar dentro de los límites máximos permisibles, sin embargo, se logró la remoción del contenido de Hidrocarburos Totales del Petróleo hasta un 58.87 % mediante la técnica de bioaumentación y texturizante de plátano en biopilas.

IX. CONCLUSIONES Y APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO

9.1 Conclusiones

- Se llevo a cabo la caracterización fisicoquímica del suelo contaminado indicando que es un suelo ligeramente alcalino, con predominancia de textura franco-limosa, materia orgánica extremadamente rica y concentraciones de nutrientes medios. Estos parámetros fueron adecuados para el proceso de biorremediación permitiendo el desarrollo de los microorganismos estimulando la biodegración de los hidrocarburos.
- Se aisló una cepa axénica con capacidad hidrocarburolítica con un morfotipo bacilar Gram negativo.
- La bioaumentación con un inóculo autóctono fue favorable durante el proceso de remoción de hidrocarburos en el suelo, dado a que se obtuvo porcentajes de eliminación superiores al 45 % en los tratamientos T2 BioBac y T4 BioBacTexPla en un tiempo de 90 días. Demostrando que la remoción de los hidrocarburos se mejora al aumentar la cantidad de los microorganismos aislados.
- La aplicación del pseudotallo de plátano al suelo contaminado en una relación suelo: residuo de 49:1 en los tratamientos T3 y T4 presentó un efecto positivo en la remoción del contaminante al obtener porcentajes del 51.80 % y 58.87 %, lo cual indica que la incorporación de texturizantes al suelo contaminado reducen significativamente la concentración de hidrocarburos.
- Se obtuvo el mayor porcentaje de remoción en el tratamiento donde se empleó la bioaumentación autóctona y el texturizante de plátano (T4 BioBacTexPla).

9. 2 Aplicación práctica del trabajo

El proceso de biorremediación del suelo contaminado mediante biopilas a nivel de campo utilizando bioaumentación bacteriana autóctona y texturizante de plátano fue considerado satisfactorio al encontrar niveles de remoción de 56 y 58 % en la concentración de hidrocarburos, demostrando que la biorremediación *ex – situ* a través de biopilas resulta eficaz para emplear el saneamiento de suelos , se considera como una técnica factible, económica y menos destructiva para suelos contaminados por derivados del petróleo.

Por lo anterior, se propone llevar a cabo esta estrategia al sitio contaminado, de manera que se deberá realizar una evaluación de impacto ambiental o un estudio riesgo dependiendo de la situación.

La investigación tendrá diferentes fases:

En primera fase se realizará un recorrido de prospección con la finalidad de situar y reconocer el sitio a remediar, posteriormente se tomarán muestras del suelo contaminado para determinar las características fisicoquímicas del suelo, concentración y tipo de hidrocarburos presentes en el sitio.

En una segunda fase se implementará la metodología para aislar bacterias, se determinará el potencial de biodegradación de cada una de las cepas y posteriormente se prepararán inóculos para producir biomasa bacteriana, se probará la eficiencia de la bioaumentación mediante consorcios. Así mismo se implementarán texturizantes locales para probar su eficiencia en la biodegradación de hidrocarburos.

En una tercera fase se deberá seleccionar un área específica para la construcción de biopilas, ya que esta técnica requiere grandes espacios debido a las dimensiones y cantidades de suelo a remediar, asegurando que el sitio donde se construirán sea impermeabilizado con geomembranas para evitar daños por lixiviación.

Una vez acondicionado el lugar, se procederá a colocar el suelo contaminado sobre la geomembrana para la formación de las biopilas, se roseará la bioaumentación mediante dispersores a lo largo de las biopilas. Posteriormente se colocarán tubos PVC a los costados de las biopilas para suministrar la aireación de manera inyectada mediante aireadores, se adicionará agua periódicamente para mantener condiciones de humedad y por último se cubrirán las biopilas para su protección.

Se ejecutará un monitoreo en tiempo 0 en intervalos de 15 días para evaluar las condiciones de humedad, temperatura, pH, presencia de nutrientes, crecimiento de microorganismos, por otra parte, se monitorerá la concentración de hidrocarburos y su porcentaje de remoción por medio de un equipo soxhlet.

El muestreo y los ensayos físicos, químicos y microbiológicos necesarios serán realizados por las entidades participantes en el proyecto y otras subcontratadas, en apego a los procedimientos y protocolos establecidos en cada caso.

9. 3 Recomendaciones

- Establecer el proceso de biorremediación en temporadas de temperaturas altas preferentemente en los meses de marzo a junio.
- Realizar un análisis fisicoquímico del suelo contaminado antes y durante el proceso de biorremediación.
- Aplicar consorcios bacterianos autóctonos y exógenos al suelo contaminado.
- Combinar la estimulación bacteriana empleando texturizantes y fertilizantes inorgánicos para aumentar la eficiencia en la biodegradación del hidrocarburo presentes en las biopilas.
- Identificar mediante pruebas moleculares la cepa aislada y bioaumentada durante el proceso de biorremediación.
- Cuantificar la adición del oxígeno suministrado en las biopilas.
- Emplear biosurfactantes para desorber los hidrocarburos presentes en el suelo con la finalidad de aumentar su biodisponibilidad y, por ende, que aumente la biodegradación de los contaminantes.

X. BIBLIOGRAFÍA

Abioye, P. O., Alonge O, A. y Ijah, U. J.J. 2009. Biodegradation of crude oil in soil amended with melon shell. AUJ Technol 13(1):35–38.

Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M., Naidu, R., 2015. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. Appl. Biochem. Biotechnol. 176, 670–699.

Acuña, A. J., Pucci, G. N., Herrera, G. y Pucci, O. H. 2009. Efecto de la textura de los suelos de la Patagonia sobre el proceso de biodegradación de hidrocarburos. Ingeniería Sanitaria y Ambiental. 104:73-77.

Acuña, A., Pucci, G., Morales, M. J. y Pucci, O. 2010. Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 30:29-36.

Acuña, A. J., Tonin, L. N., Díaz, V., Pucci, G. N. y Pucci, O. H. 2012. Optimización de un sistema de biorremediación de hidrocarburos a escala de laboratorio. Ingeniería. Investigación y Tecnología. 13:105-112.

Ali, N., Eliyas, M., Al-sawari, H. y Radwan, S.S. 2011. Hydrocarbon – utilizing microorganisms naturally associated with sawdust. Chemosphere. 83:1268-1272.

Álvarez, H. M. 2015. Biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos: un proceso complejo que involucra múltiples variables. Revista Química Viva. 18-25.

Anza-Cruz., H. G., Orantes-Calleja., P. D., Gonzáles-Herrera, R., Ruíz-Marín, A., Espinoza-Medinilla, E., Martínez-Salinas, R. I., García-Lara, C. M. y Vera-Toledo. P. 2016. Biorremediación de suelos contaminados con aceite automotriz usados mediante sistema de biopilas. ESPACIO I+D, Innovación más Desarrollo. 12:50-77.

Ariza, C. P. y Mejía-Carrillo, S. A. 2017. Optimización del proceso de Landfarming para mejorar la funcionalidad del tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante la adición de materia orgánica. Scientific International Journal. 14(3):84-94.

Arrieta- Ramírez, O. M., Rivera- Rivera, A. P., Arias-Marín, L., Rojano, B, A., Ruiz, O. y Cardona-Gallo, S. A. 2012. Biorremediación de un suelo con diésel mediante el uso de microorganismos autóctonos. Gestión y ambiente. 15:27-39.

Akabary, A. y Ghoshal, S. 2015. Bioaccesible porosity in soil aggregates and implications for biodegradation of high molecular molecular weight petroleum compounds. Environ. Sci. Technol. 49:14368-14375.

Azubuike, C. C., Chikere, C. B. y Okpokwasili, G. C. 2016. Bioremediation techniques–classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. World J Microbiol Biotechnol. 1-18

Baldan, E., Basaglia, M., Fontana, F., Shapleigh, F. P. y Casella, S. 2015. Development, assessment and evaluation of a biopile for hydrocarbons soil remediation. International Biodeterioration & Biodegration. 98:66-72.

Barrios-San Martín, Y. 2011. Biorremediación: una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo. Biotecnología Aplicada. 28:60-68.

Barman, U. y Choudhury, R. D. 2019. Soil texture classification using multi class support vector machine. Information Processing In Agriculture. 1-15.

Bermúdez-Acosta, J. 2012. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a partir del uso de un consorcio bacteriano alóctono, en la zona costera de Punta Majagua. Cienfuegos, Cuba. Tesis de Maestría. Facultad de Química-Farmacia. Universidad Central “Marta Abreu” De las Villas. Santa Clara, Cuba.

Beskoski, V.P., Goigić-Cvijović, G., Milić, J., Llić, M., Miletić, S., Solević, T. y Vrvić, M. M .2011. Ex situ bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil)-A field experiment. Chemosphere.83:34-40.

Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. Bioresource Technology. 74:63-67.

Boopathy, R., Shields, S. y Nunna S. 2012. Biodegradation of crude oil the BP oil spill in the marsh sediments of Southeast Louisiana, USA, Applied biochemistry and biotechnology, 167, 1560-1568.

Brown, D. M., Okoro, S., Van-Gils, J., Van-Spanning, R., Bonte, M., Hutchings, T., Linden, O., Egbuche, U., Bruun, K. B. y Smith, J. W. N. 2017. Comparison of landfarming amendments to improve Bioremediation of petroleum hydrocarbons in Niger Delta Soils. Science of the total Environment. 596-597:284-292.

Bruton-Pinazo, S. B. 2020. Capacidad de biodegradación de *Pseudomons aeruginosa* frente al polietileno de baja densidad. Tesis de doctorado. Universidad Del Altiplano. Puno, Perú.

Bugh, TDH., Ahmad, M., Hardiman, E. M. y Singh, R. 2011. The emergency role for bacterial in lignin Degradation and bio producto formation. Curr. Opin. Biotechnol. 22:394-400.

Burbano-Orjuela. H.2013. La sociedad depende del todo y las partes: naturaleza y suelo. Tendencias.14(2):9-22.

BURBANO, H. 2016. El suelo y su relación con los servicios ecosistémicos y la seguridad alimentaria. Rev. Cienc. Agr. 33(2):117-124.

Cavazos-Arrollo. J., Pérez-Armendáris, B. y Mauricio- Gutiérrez, A .2014. Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. Agricultura, sociedad y desarrollo. 11(4):539-550.

Cébron, A., Pierre, F., Catherine, L., Stéphanie, O. y Corinne, L. 2013. Experimental increase in availability of a PAH complex organic contamination from an aged contaminated soil: Consequences on biodegradation. Environmental Pollution. 177:98-105.

Cerqueira, V. S., HollenbacH, E. B., Maboni, F., Vainstein, M. H., Camargo, F. A., Do-Carmo, R. P. M. y Bento, F. M. 2011. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. Bioresource Technology. 102:110003-11010.

Chandra, S., Richa, S., Kriti, S. y Sharma, A. 2013. Application of Bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. Annals of Microbiology. 63:417-431.

Chen, Q., Jingjing, L., Mei, L., Huiling, S. y Mutai, B. 2017. Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment. Plos, One. 12(3) 1-23.

Chen, Y. A., Pao-Wen, G. L., Liang-Ming, W. y Yi-Ju, W. Sheng-Shugn.2020. Effect of soil organic matter on petroleum hydrocarbon degradation in diesel/fuel oil-contaminated soil. 129 (5):603-612.

Cohen, M. 2013. Water pollution from oil spills, Environment. 3:121-126.

Coulon, F., Al-Awadi, M., Cowie, W., Mardlin, D., Pollard, S., Cunningham, C., Risdon, G., Arthur, P., Semple, K. T. y Paton, G. I. 2010. When is a soil remediated? Comparison of biopiled and windrowed soils contaminated with bunker-fuel in a full-scale trial. Environmental Pollution. 158(10):3032-3040.

Cruz-Narváez, Y., Rico-Arzate, E., Castro-Arellano, J.J., Noriega-Altamirano, G., Piña-Escobedo, A., Murugesan, S. y García-Mena, J. 2019. Obtaining microorganisms in cloud forest soils for the degradation of aromatic hydrocarbons. Revista Chapingo Serte Ciencias Forestales y del Ambiente. 25:95-106.

Cuevas-Díaz, M. C. (2012): “Aplicación de residuos agroindustriales en la recuperación por cultivo sólido de un suelo contaminado con hidrocarburos y evaluación ecotoxicológica”. Reporte técnico. Proyectos fondos FOMIX Clave VER-2006-C037127.

Das, N. y Chandran, P. 2011. Microbial Degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. Biotechnology Research International. 2011:1-13.

Del Río G.C.P., Paredes, F. M. G., Roldán-Martín, A. y Rodríguez-Vázquez, R. 2004. Biopilas adicionadas con grano de café para el saneamiento de suelos contaminados con diferentes niveles de contaminación. IX Congreso Nacional y II Congreso Internacional de Ciencias Ambientales. UMAR Campus Huatulco, 12-14 de mayo.

De lima, R.F., Dionello, R. G., Peralba-Mdo, C., Barrionuevo, S., Radunz, L.L. y Reichert-Junior, F. W. 2017. PAHs in corn grains submitted to drying with firewood. Food Chem. 215, 165-170.

Dhote, M., Asha, J., Anil, K., Kanade, G. S. y Chakrabarti, T. 2010. Biodegradation of chrysene by the bacterial strains isolated from oily sludge. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 26(2):329-335.

Doria-Argumedo. C. J. 2018. Degradación de residuos aceitosos provenientes de actividades mineras en la Guajira, Colombia. Revista Polítecnica. 14 (26):42-51.

Echeverri-Jaramillo, G. E., Manjarrez-Paba, G. y Cabrera-Ospino, M. 2010. Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en habitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. Publicación Científica En Ciencias Biomédicas. 8(13):76-86.

Ebadi, A., Nayer-Azam, K.S., Mohsen, O., Maryam. H. y Reza, G. N .2017. Effective bioremediation of a petroleum- polluted saline soil by a surfactant- producing *Pseudomonas aeruginosa* consortium. Journal of advanced Research. 8(6):627-633.

Fantroussi, S. y Agathos, S. 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?, Ecology and industrial microbiology, 8, 268-275.

.

Fernández- Linares, L. C., Rojas-Avelizapa, N. G., Roldan-Carrillo, T. G., Ramírez-Islas, M-E., Zegarra-Martínez, H. G., Hernández, R. U., Reyes-Ávila, R. J., Flores-Hernández, D. y Arce-Ortega, J. M. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. p. 89-101.

Ferreira Do Nascimento, T. C., Santos-Oliveira, F. J. y De-Franca, F. P. 2013. Biorremediación de un suelo tropical contaminado con residuos aceitosos intemperizados. Revista. internacional de contaminación ambiental. 29:21-28.

Fletcher, R. 2000. Practical considerations during bioremediation, 39-55. En: Remediation of hazardous waste contaminated soil. University of Pittsburg. Pittsburg Pennsylvania.

Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P. y Seeger, M. 2014. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 98: 4781- 4794.

Fu, P.P., Xia, Q., Sun, X. y Yu, H. 2012. Phototoxicity and environmental transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-light-induced reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage. Journal of Environmental Science and Health Part C. 30:1-41.

Gallego, R. J. R., Sierra, C., Permanyer, A., Peláez, A. I., Menéndez-Vega, D. y Sánchez, J. 2011. Full-Scale Remediation of a Jet Fuel-Contaminated Soil:Assessment of Biodegration, Volatization, and Bioavailability. Water Air Soil Pollut. 217:197-211.

García Aguirre, F. J. y Valdez Méndez, E. 1995. Dos Bocas: una contribución a la historia de los desastres en Veracruz, en Anuario X del Instituto de Investigaciones Histórico-Sociales de la UV. Xalapa, Universidad Veracruzana. 105-121.

García, M. G., Infante, C. y López, L. 2012. Biodegradación de un crudo mediano en suelos de diferente textura con y sin agente estructurante. Bioagro. 24 (2):93-102.

García-Torres, R., Ríos-Leal, E., Martínez-Toledo, A., Ramos-Morales, F. R., Cruz-Sánchez, J. S. y Cuevas- Díaz, M. Del C. 2011. Uso de cachaza y bagazo de caña de azúcar en la remoción de hidrocarburos en suelo contaminado. Revista Internacional De Contaminación Ambiental. 27:31-39.

Gardi, C., Angelini, M., Barceló, S., Comerma, J., Cruz Gaistardo, C., Encina Rojas, A., Jones, A., Krasilnikov, P., Mendonca Santos Brefin, M.L., Montanarella, L., Muñiz-Ugarte, O., Schad, P., Vara Rodríguez, M.I. y Vargas, R. (eds), 2014. Atlas de suelos de América Latina y el Caribe, Comisión Europea - Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, L-2995 Luxembourg, 176 pp.

Genovese, M., Denaro, R., Cappello, S., Di- Marco, G., La-Spada, G., Giuliano, L., Genovese, L. y Yakimov, M. M. 2008. Bioremediation of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes-contaminated soil: a biopile pilot experiment. J. Appl. Microbiol.105(5):1694-1702.

Gielnik, A., Pechaud, Y., Huguenot, D., Cébron, A., Riom, J.-M., Guibaud, G., Esposito, G., van Hullebusch, E.D., 2019. Effect of digestate application on microbial respiration and bacterial communities' diversity during bioremediation of weathered petroleum hydrocarbons contaminated soils. Sci. Total Environ. 670, 271–281.

Gómez. F. y Sartaj, M. 2014. Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM). International Biodeterioration & Biodegradation 89:103-109.

Gómez-Maya, A y Sagahón-Bautista, J. 2006. “Bacterias hidrocarbonoclastas de un área contaminada de San Jerónimo Municipio de Tamalín, Veracruz. Durante el period Agosto 2004-Enero 2005”. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana. Tuxpan, Veracruz.

Gómez-Romero, S. E., Gutiérrez- Bustos, D. C., Hernández- Marín, A. M., Hernández-Rodríguez, C. Z., Losada- Casallas, M. y Mantilla-Vargas, P. C. 2008. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. NOVA. Publicación Científica En Ciencias Biomédicas. 6(9):76-84.

Guarino, C., Spada, V. y Sciarrillo, R. 2017. Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioagumentation-Assistited Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. Chemosphere.170:10-161.

Haghollahi, A., Fazaelipoor, M. H. y Schaffie, M. 2016. The effect of soil type on the bioremediation of petroleum contaminated soils. Journal of Environmental Management. 180:197-201.

Hamzah A, Salleh SNMd, Lee SL, Sarmani S (2012) Bioaugmentation of microbial consortia and supplementation of bulking agents in removal of crude oil from soil. In: Mendez-Vilas A (ed) Microbes in applied research. Current advances and challenges. World Scientific Publishing Co, London, pp 39–43

Hamzah, A., Phan, C. W., Yong, P. H. y Mohd-Ridzuan, N. H. 2014. Oil Palm Empty Fruit Bunch and Sugarcane Bagasse Enhance the Bioremediation of Soil Artificially Polluted by Crude Oil. Soil and Sediment Contamination: An International Journal. 23:751-762.

Hemalatha, S., and Veeramanikandan, P. 2011. Characterization of aromatic hydrocarbon degrading bacteria from petroleum contaminated sites. Journal of Environmental Protection. 2:243–254.

Hernández-Martínez, N. 2008. Bacterias hidrocarbonoclastas de un área contaminada de Álamo Veracruz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana. Tuxpan, Veracruz.

Hernández-Cervantes, G. 2016. Aplicación de biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales en sedimentos. Tesis de especialización. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Tuxpan, Veracruz

Hernández-Castellanos, N. D. 2016. Establecimiento de un proceso de biorremediación usando *Stenotrophomonas maltophilia*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Veracruzana. Tuxpan, Veracruz, México.

Hernández-De la Cruz, Y. 2019. Uso de *Bacillus coagulans* para la biorremediación de sedimento contaminado por hidrocarburos en el ejido el sacrificio Tuxpan, Veracruz. Tesis de especialización. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Tuxpan, Veracruz.

Herrera-Navarrete, J., Ruíz-Marín, A., Canedo-López, Y., Zavala-Loria, J. Del C., Campos-García, S., Sabido-Pérez, M. Y., Antonio, N. E., Pérez-Reda, L. J. y Reyes-García, Z. 2011. Estudio de materia orgánica y nutrientes de suelos contaminados con hidrocarburos a tratamientos diferentes. Unacar Tecnociencia. 5:48-55.

Higuera-Sandoval, C. H., Gómez-Christancho, J. C. y Pardo-Naranjo, O. E. 2012. Caracterización de un suelo arcilloso tratado con hidróxido de calcio. Facultad de Ingeniería. 21(32):21-40.

Hua, X., Wang, J., Wu, Z., Zhang, H., Li, H., Xing, X. y Liu, Z. 2010. A salt tolerant *Enterobacter cloacae* mutant for bioaugmentation of petroleum- and salt- contaminated soil. Biochemical Engineering Journal. 49:201-206.

Huang, Y., Huan, P., Qingling, w., Yanian, G. y Wuxin, L. 2019. Enrichment of the soil microbial community in the bioremediation of a petroleum-contaminated soil amended with rice straw or sawdust. Chemosphere. 224:265-271.

Iturbide-Arguelles, R., Flores-Torres, C., Chávez- López, C. y Roldan-Martín, A. 2002. Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas. Ingeniería Investigación y Tecnología. 3:25-35.

Jorgensen, K.S. 2007. *In Situ* Bioremediation. Advances in Applied Microbiology. 61:285-305.

Jabbar, N. M., Kadhim, E. H. y Mohammed, A. K. 2018. Bioremediation of Soil Contaminated with Diesel using Biopile system. Al-Khwarizmi Engineering Journal. 14 (3):48-56

Kastner, M y Miltner, A. 2016. Aplication of compost for effective bioremediation of organic contaminants an pollutants in soil. Appl Microbiol Biotechnol. 100:3433-3439.

Kripsalu, M. y Nammari, D.2010. Monitoring of biopile composting of oily sludge. Waste Management and Research 28(5): 395-403.

Kristensen, A. H., Henriksen, K., Mortensen, L., Scow, K. M. y Moldrup, P. 2010. Soil physical constraints on intrinsic biodegradation of petroleum vapors in a layered subsurface. NIH Public Acces. 9:137-147.

Lastra-Blanco, M.L. 2010. Biorremediación *ex situ* de un suelo de la laguna de Marland en Ébano, San Luis Potosí. Por la tecnología de biolabranza mecánica. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Veracruzana. Tuxpan, Veracruz, México.

Loroña-Calderón, F., Gómez-Lora, W., Jaco-Rivera, E., Reynaga-Loayza, C., Guiño-Sinarahua, M., Gamarra-Torres, J., Díaz-Huamán, F., Huamán-Buitrón, N., Rafael-Gutiérrez, P., Mayte-Quispe, J., Moran-Carhuapoma, M. y Carhuancho-Alzamora, L. C. 2018. Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con Diesel B5 mediante Microorganismos Eficaces (EM). Catedra Villareal. 6(2):189-209.

Liu, X., Liu, M., Chen, X., Yang, Y., Hou, L., Wu, S., Zhu, P., 2019. Indigenous PAH degraders along the gradient of the Yangtze Estuary of China: relationships with pollutants and their bioremediation implications. Mar. Pollut. Bull. 142, 419–427.

Luz, C.C., Santos, E. A., Santos, M. O. S., Mussi, M., Y., Yamashita, M., Bastos, W. R., Brucha, G., Reis, M. M. y Reis, M. G. 2011. Estudos de biodegradação de óleo diésel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho – Ro, Amazônia. Quim. Nova. 34(5):775-779.

Lladó, S., Solanas, A., de Lapuente, J., Borrás, M. y Viñas, M. 2012. A diversified approach to evaluate bioestimulation and bioaugmentation strategies for heavy oil contaminated soil, Science of the total environment, 435-436: 262- 269.

Llado, S., Covino, S., Solanas, A.M., Vinas, M., Petruccioli, M. D´Annibale, A. 2013. Comparative assessment of bioremediation aproaches to highly recalcitrant PAH degradation in a real industrial polluted soil. Journal of Hazardous Materials. 248:407-414.

Ma, J., Yongqi, Y., Xiaoli, D., Yetong, C., Hanmei, D., Huijun, Z., Shaohui, G. y Guangxu, Y. 2016.Effects of adding bulking agent, inorganic nutrient and microbial inocula on biopile treatment for oil-field drilling waste. Chemosphere. 150:17-23.

Mahanty, B., Kim, S. y Kim, C. G. 2013. Assessment of a biostimulated or bioaugmentation calcification system with *Bacillus pasteurii* in a simulated soil environment. Microbial Ecology. 65: 679-688.

Martínez, J., Jímenez, M., Soto, D., Lomas, M. y Sánchez, S. 2015. Aislamiento y caracterización de bacterias hidrocarburolíticas degradadoras de gasolina y diésel. Revista De Ciencias Naturales y Agropecuarias. 2:155-161.

Martínez-Rivera, A.2018. Biorremediación bacteriana de suelo contaminado con fluidos y residuos de perforación mediante diferentes métodos. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, Universidad nacional de Colombia. Medellín, Colombia.

Mazzeo-Meneses, M., León-Agatón, L., Mejía-Gutiérrez, L. F, Guerrero-Mendieta, L. E. y Botero-López, J. D. 2010. Aprovechamiento industrial de residuos de cosecha y poscosecha del plátano en el Departamento de Caldas. Revista Educación e Ingeniería (9):128-139.

Medina, J., García, F. y Paricaguán, B. 2014. Biodegradación de petróleo por microorganismos autóctonos en suelos contaminados provenientes de la bahía de Amuay del estado Falcón. Revista Ingeniería UC. 21:62-69.

Mena-Espino, X y Couoh-Uicab, Y. 2015. Efectos de los plaguicidas utilizados para el control de la Sigatoka negra en plantaciones bananeras en México, así como su efecto en el ambiente y la salud pública. Medio ambiente y desarrollo sustentable. 9(2):115-122.

Mendo-Pascual, W. L. 2014. Alternativa de biorremediación con bacterias autóctonas de sedimento contaminado de la Laguna de Tamiahua, Veracruz, México. Tesis de maestría.

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

Mendoza-Vera, J. M. 2004. Estado actual del conocimiento de la biorremediación en México. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigaciones Económicas Administrativas y Sociales.

Meyer, D.D., Anderson-Beker, S., Bucker, F., Ruaro-Peralba, M. D. C., Guedes-Frazzon, A. P., Osti, J. F., Andreazza, R., De Oliveira-Camargo, F. A. y Menezes-Bento. F. 2014. Bioremediation strategies for diesel and biodiesel in oxisol from southern Brazil. International Biodeterioration & Biodegradation. 95:356-363.

MingMing, T. y QuiYu, W. 2009. Biostimulation and bioaugmentation repair of oil contaminated soil. China. Biotechnology. 29(8):129-134.

Mohn, W.W., Radziminski, C. Z., Fortin, M. C. y Reimer, K. J. 2001. On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:242–247.

Montanarella, L. 2015. Agricultural policy govern our soils. Nature.528:32 - 33.

Muskus, M. A. M., Santoyo, M. C. y Plata, Q. L. S. 2013. 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.

Nápoles-Álvarez, J., Rodríguez -Pérez, S., Santiago-Blásquez, L. y Ábalos-Rodríguez, A. 2015. Disminución del extracto orgánico total en suelos contaminados con hidrocarburos. Tecnología Química. 35(3):322-333.

Nápoles, J., Pérez-Portuondo, I Yamila, O., Aguilera, I. y Ábalos. A. 2016. Aislamiento de bacterias de suelos contaminados con capacidad de crecer en hidrocarburos y 2,4 -diclorofenol. Conference: VIII Jornadas Científico-Técnicas XX Aniversario. 8 p.

Naseri, M., Abbas, B, y Javad, B. Bioremediation treatment of hydrocarbon-contaminated Arctic soils: influencing parameters. 2020. Environ Sci Pollut. 21:11250–11265.

Nasser, A., Mohammad, A., Al-Ghouti, Samir, J. y Nabil. 2020. Potential for native hydrocarbon-degrading bacteria to remediate highly weathered oil-polluted soils in Qatar through self-purification and bioaugmentation in biopiles. Biotechnology Reports. 28:1-10.

Nisperuza-Vidal y Montiel-Aroca, 2010. Caracterización y evaluación de cepas bacterianas nativas con capacidad hidrocarburolítica del pozo petrolero de San Sebastián, Lorica, departamento de Córdoba. Tesis de maestría. Universidad de Córdoba. Facultad de ciencias de la salud programa de bacteriología. Montería

Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreo y análisis. Diario Oficial de La Federación.67 p.

Ñustes-Cuartas, D. C. 2012. Biorremediación para la biodegradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible. Tesis

de maestría. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira.

Ordaz, J. A., Martínez-Toledo, A., Ramos-Morales, F. R., Sánchez-Díaz, L. F., Martínez, A. J., Tenorio-López. J. A. y Cuevas-Díaz, M. Del. C.2011. Biorremediación de un suelo contaminado con petróleo mediante el empleo de bagazo de caña con diferentes tamaños de partícula. Multicienciencias. 11(2):136-145.

Ortega-Calvo, J.J. 2013. ¿Por qué un contaminante biodegradable persiste en el ambiente? Siceno.14-17.

Ortiz-Ortiz, M.2017. Incendio del pozo petrolero Dos Bocas de San Diego de la Mar, en 1908. Revista Iberoamericana de Ciencias. 4(6):60-72.

Pérez-Casimiro, G., Iturbide-Arguelles, R. Flores-Serrano, R. M. 2006. Cambio en las propiedades físicas de un suelo contaminado con hidrocarburos debido a la aplicación de una tecnología de remediación. Revista ADIS de ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica. 1:10.

Pérez-Pozo, M. R. 2018. Evaluación de la biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando *Pseudomonas fluorescens*. Tesis de ingeniería. Universidad Politécnica Salesiana. Quito.

Pérez-Vargas, J., Vigueras-Carmona, S. E., Gómez-Guzmán, O. y Calva-Calva, G.2015. Degradación microbiana con BFNA de hidrocarburos aromáticos por bioaumentación en Biopilas. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 46:416-423.

Pino-Rodríguez, N. J., Carvajal, S., Gallo, A. y Peñuela, G. 2012. Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diésel. Producción+ Limpia. 7:101-108.

Pollard, S.J., Hough, R. L., Kim, K. H., Bellarby, J., Paton, G., Semple, K. T. y Coulon, F. 2008. Fugacity modelling to predict the distribution of organic contaminants in the soil: oil matrix of constructed biopiles. Chemosphere 71:1432–1439.

Pozzo-Ardizzi, M. G. 2018. La biorremediación aplicada a la rehabilitación de suelos contaminados con hidrocarburos. In: Biorremediación de los recursos naturales. Brutti, L., M. Beltrán y I. García De Salamone (eds). INTA. Buenos Aires. Argentina. Pp137-170.

PROFEPA.2014. Reporte de derrames de petróleo crudo al primer semestre de 2014. México. www. Cofemersimir.gob.mx (Consultado el 10 de octubre del 2018).

Pretorius, T.R., Charest, C., Kimpe, L. E y Blais, J. M. 2018. The accumulation of metals, PAHs and alkyl PAHs in the roots of *Echinacca purpurea*. PLOS ONE. 13(2): 1-18.

Pucci, G. N., Acuña, A. J. y Pucci, O. H. 2011. Biodegradación de hidrocarburos en la meseta patagónica, un resumen de la optimización de los parámetros a tener en cuenta. Ingeniería sanitaria y ambiental. 115:36-41.

Quilachim-Sislema, I. A. 2016. Biorremediación de sedimentos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas suplementados con agentes esponjantes. Facultad de Ciencias de la Ingeniería. Universidad Tecnológica Equinoccial. Tesis de licenciatura. Quito.

Ramírez-Segura, B. E., Hidalgo-Mogollon, A., Ordinola-Zapata, A., Vieyra-Peña, E. G., Palacios-Moran, P. y Ordinola-Madrid, J. 2016. Eficiencia de cepas bacterianas aisladas del manglar para biorremediar suelos contaminados con petróleo. Química Viva. 15:20-30.

Rabelo-Flórez, R. A y De La Rosa Martínez, D. 2020. Bacterias degradadoras de hidrocarburos. Artículo de revisión. 12 p.

Rivera-Ortiz, O., Rivera-Làrraga, J. E., Andrade-Limas, E. del C., Heyer-Rodríguez, L., De La Garza-Requena, F. R. y Castro-Meza, B. I. 2018. Bioestimulación y biorremediación de recortes de perforación contaminados con hidrocarburos. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 34(2):249-262.

Rodríguez-Geldres, M. E. 2017. Remoción de hidrocarburos totales en suelos contaminados con petróleo mediante residuos de Cachaza y Bagazo de caña de azúcar. Scientia. 9. 59-66.

Rojo-Santiesteban, S. 2013. Biorrecuperación de suelos contaminados con diésel, mediante biopilas utilizando estrategias de bioaumentación y bioestimulación. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Superior De Ingeniería Química E Industrias Extractivas. México, D.F.

Roldán-Martín, G. A., Rodríguez- Vásquez, R. y Del Rio-Galván, P. 2005. Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos adicionando grano de café en un sistema de biopilas. VI Congreso de la sociedad cubana de bioingeniería. ISBN 959-212-158-3.

Roldán-Martín, G. A. 2006. Remoción de hidrocarburos en un sistema de biopilas con adición de texturizantes. Tesis doctoral. Centro De Investigación Y De Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional. Unidad Zacatenco. México, D.F

Ron, E. Z. y Rosenberg, E. 2014. Enhanced bioremediation of oil in the sea. Current Opinion in Biotechnology.27:191-194.

Rubinos, D., Villasuso, R., Barral, M. T. y Díaz-Fierros, F. 2008. Biocorrección de suelos contaminados con isómeros de hexaclorociclohexano mediante técnicas de landfarming y biopilas. Edafología. 15(3):53-72.

Sabate, J., Viñas, M. y Solanas, A. M. 2004. Laboratory-scale Bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. International Biodeterioration &Biodegration.54:19-25.

Sancartier, D., B. Zeeb., I. Koch. y K. Reimer. 2009. Bioremediation of diesel contaminated soil by heated and humidified biopile system in cold climates. Cold Regions Science and Technology. 55:167:173.

Sachun-Rodríguez, V. R. 2015. Tratamiento ex situ de suelo contaminado por hidrocarburo a través del método volatización natural. Tesis de ingeniería. Universidad Nacional De Trujillo. Facultad De Ingeniería Química. Trujillo-Perú.

Salas-Salazar, M. L. 2011.Biorremediación de sedimento contaminado por hidrocarburos en la laguna de San Jerónimo municipio de Tamalín. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana. Tuxpan, Veracruz.

Sámano-Tirado, A.E y Sámano-Tirado, E.2013. Remediación de suelos contaminados en el estado de Veracruz, México. X Congreso Cubano de Geología (Geociencias).1-6.

Sangeetha, J. y Thangadurai, D. 2014. Effect of Biologically Treated Petroleum Sludge on Seed Germination and Seedling Growth of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Fabaceae). Brazilian Archives Of Biology And Technology. 57(3): 427-433.

San Martin del Ángel, P., Lastro-Blanco, M., López-Jiménez, A. y Hernández-Herrera, I. 2011. Descontaminación de un suelo de la laguna de Marlan, Ebano, San Luis Potosí por biorremediación. Academia Multidiciplinaria.123-128.

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: 1-5.

Santiago-Reyes, J. A. 2013. Proceso de Biorremediación *ex situ* en lodo de perforación obtenidos de Potrero del Llano, Ver. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas Agropecuarias. Universidad Veracruzana. Tuxpan, Veracruz, México.

Sellers, K., T.A. Pedersen y C. Fan 1993.Review of soil mound technologies for the bioremediation of hydrocarbon contaminate soil. En: E. Calabrese y C. Bell (eds.). *Hydrocarbon contaminated soil,* vol. III. Lewis Publishers.

SIAP (SERVICIO DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA). 2013. [Actualizado al 31 de marzo de 2017]. Página electrónica: (http://www.siap.sagarpa.gob.mx/).

Silvana-Álvaro, C. E., Arocena, L. A., Martínez, M. A. y Nudelman, N. E. S.2017. Biodegradación aerobia de fracciones de hidrocarburos provenientes de la actividad petrolera en un suelo de la región Patagonia Norte, Argentina. Rev. Int. Contam. Ambie. 33(2):247-257.

SIM. (SISTEMA DE INFORMACIÓN MUNICIPAL). 2015. Cuadernillos municipales, Tamalín. 10 p.

Singh D.K. y Gupta, G. 2016. Effect through inhalation on human health of PM1 bound polycyclic aromatic hydrocarbons collected from foggy days in northern part of India. J. Hazard. Mater. 306, 257-268.

Soledad. 2010. Caracterización microbiológica en suelos contaminado por hidrocarburos, de tipo pseudomonas en el sector rio Bonaza, provincia de Pastaza. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Escuela superior Politécnica del Litoral.

Somtrakoon, K y Chouychai, W.2013. Phytotoxicity of Single and Combined Polycyclic Aromatic Hydrocarbons toward Economic Crops.Russian Journal of Plant Physiology. 60: 139–148.

Suja, F., Rahim, F., Raihan-Taha, M., Hambali, N., Rizal-Razali, M., Khalid, A. y Hamzah. A. 2014. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. International Biodeterioration &Biodegradation. 90:115-122.

Speight, J. G. 2017. Removal of compounds organic from the environment. Environmental Organic Chemistry for Engineers. 387-432.

Szulc, A., Ambrozewics, D., Sydow, M., Lawniczak, L., Piotrowska-Cyplik, A., Mareceik, R. y Chzanowski, L.2014. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. Journal of Environmental Management. 132:121-128.

Tanti, B., Ray, S. K., and Buragohain, A. K. (2012). Differentiation of petroleum hydrocarbon-degrading Pseudomonas spp. based on PCR-RFLP of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region. Folia microbiologica, 57: 47-52.

Thompson, I. P., Van Der Gast, C. J., Ciric, L. y Singer, A. C. 2005. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. Environ. Microbiol.7: 909-915.

Trejo-Hernández, M. R., Ortiz, A., Okoh, A. I., Morales, D. y Quintero, R. Biodegradation of heavy crude oil *Maya* using spent compost and sugar cane bagasse wastes. Chemosphere. 68(5): 844-855.

Vaca-Mier, M., López-Callejas, R., Terres-Peña, H. y Lizardi-Ramos, A. 2017. Aplicación de Biomasa de nopal, corteza de piña y alfafa en la degradación de diesel en un suelo contaminado. Revista De Ciencias Ambientales y Recursos Naturales. 3(9):1-8.

Vásquez, M. C., Thibisay- Guerrero, J. y Del Pilar- Quintero, A .2010. Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricados usados. Revista Colombiana De Biotecnología. 12:141-157.

Vallejo-Quintero, V. E., Sandoval-Cobo, J. J., Garagoa-Barahona, S. C. y Bastos-Arenas. 2016. Evaluación del efecto de la bioestimulación sobre la biorremediación de hidrocarburos en suelos contaminados con alquitrán en Soacha, Cundinamarca – Colombia. Biodiversidad y Servicios Ecosistémicos. 65(4):354-361.

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

Villalba-Villalba, N. M .2013. Remediación de suelos contaminados con fenantreno por oxidación química. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.

Wang. X., Li, F., Guo, G., Wang, S., Boronin, A. y Wang, Q. 2014. Temporal changes in microbial metabolic characteristics in field scale biopiles composed of aged oil sludge. Environmental Engineering Sciences 31(9): 507-513.

Wang. X., Wang, Q., Wang, S., Li, F. y Guo, G.2012.Effect of biostimulation on community level physiological profiles of microorganisms in field-scale biopiles composed of aged oil sludge. Bioresource Technology .111:308–315.

Wang, L., Wang, L., Tao, W., Smardon, R. C., Shi, X. y Lu, X. 2016. Characteristics, sources, and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban surfacedust: a case

study of the city of Xi'an in Northwest China. Environ. Sci. Pollut. Res. 23 (13):13389-13402.

Windevoxhel, R., Bastardo, H., Sánchez, N. y Pérez, J .2013. Evaluación de la bioaumentación para la aplicación de un biotratamiento a suelos contaminados con aceites lubricantes. Ingeniería y Sociedad. 8(2):144-152.

Wu, M., Warren., A. D., Wie, L., Xiaochang W., Qian, Y., Tinting, W., Limei, X., Minghui, Z. y Liming, C. 2016. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. International Biodeterioration & Biodegradation. 107:158-164.

Ying, T., Luo, Y., Sun, M., Liu, Z., Li, Z. y Christie, P. 2010. Effect of bioaugmentation by Paracoccus sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. Bioresource Technology.101:3437-3443.

Zamudio-Pérez, E. 2010. Tratamiento biológico de las aguas residuales generadas en lavado de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F

Zhang, K., Sa, W., Penghong, G. y Shuhai, G. 2021. Characteristics of organic carbon metabolism and bioremediation of petroleum-contaminated soil by a mesophilic aerobic biopile system. Chemosphere. 264:1:11.

XI. ANEXO

Anexo A

Monitoreo de temperatura durante el proceso de biorremediación

La temperatura interna de los 4 tratamientos registró un promedio de 24°C. En la semana 2, se registró la temperatura máxima en los tratamientos T2 BioBac y T4 BioBacTexPla con un valor de 31°C y se alcanzó la mínima temperatura de 16°C en la semana 10 para todos los tratamientos. Con respecto a la temperatura ambiental, se registró un promedio de 25°C. En las primeras semanas de 1 a la 4 se presentaron temperaturas máximas similares con un valor de 29°C y se alcanzó la mínima temperatura de 20°C en la semana 10. (Figura 12).

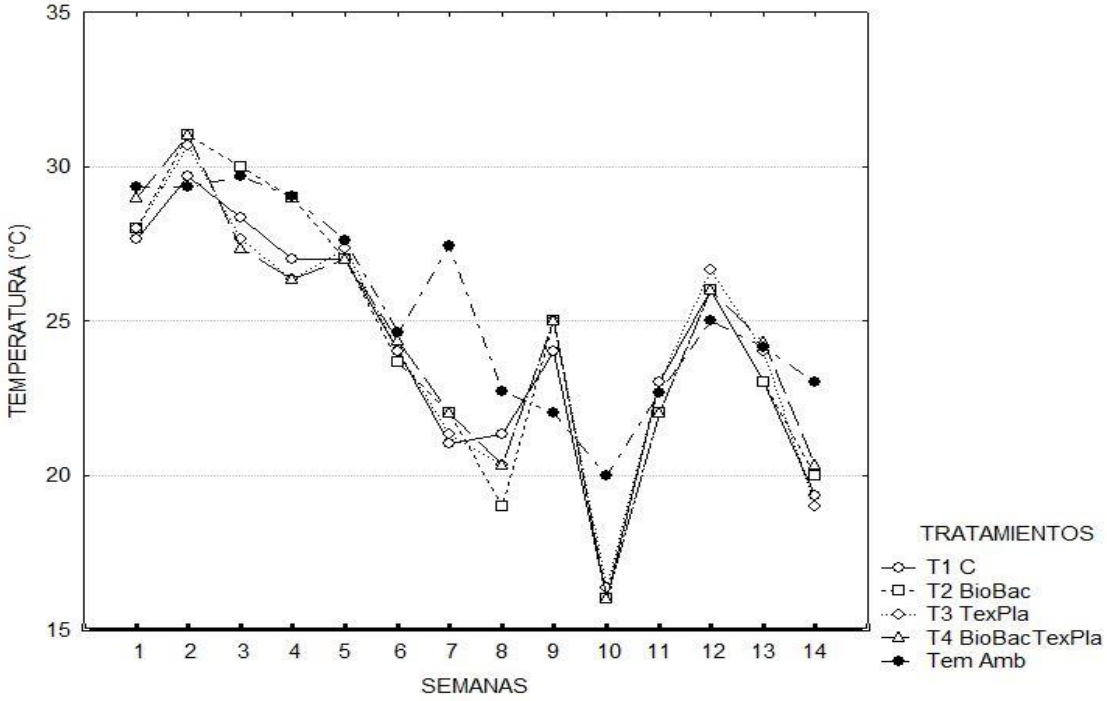

Figura 12. Temperatura del suelo y temperatura ambiental registrada por tratamiento durante el experimento.

Anexo B

Valores de pH obtenidos durante el proceso de biorremediación

Para los tratamientos T3 TexPla y T4 BioBacTexPla los datos obtenidos del pH fueron similares con un valor promedio de 7.8, mientras que para el tratamiento T1 C el valor promedio obtenido fue de 7.6 y para el T2 BioBac el valor promedio fue de 7.7. El valor máximo de pH se registró en el tratamiento T3 TexPla con un valor de 8.14 en la semana 12, mientras que el valor mínimo se registró en los tratamientos T1 C y T2 BioBac con un valor de 7.4 en las semanas 13 y 5. (Figura 13)

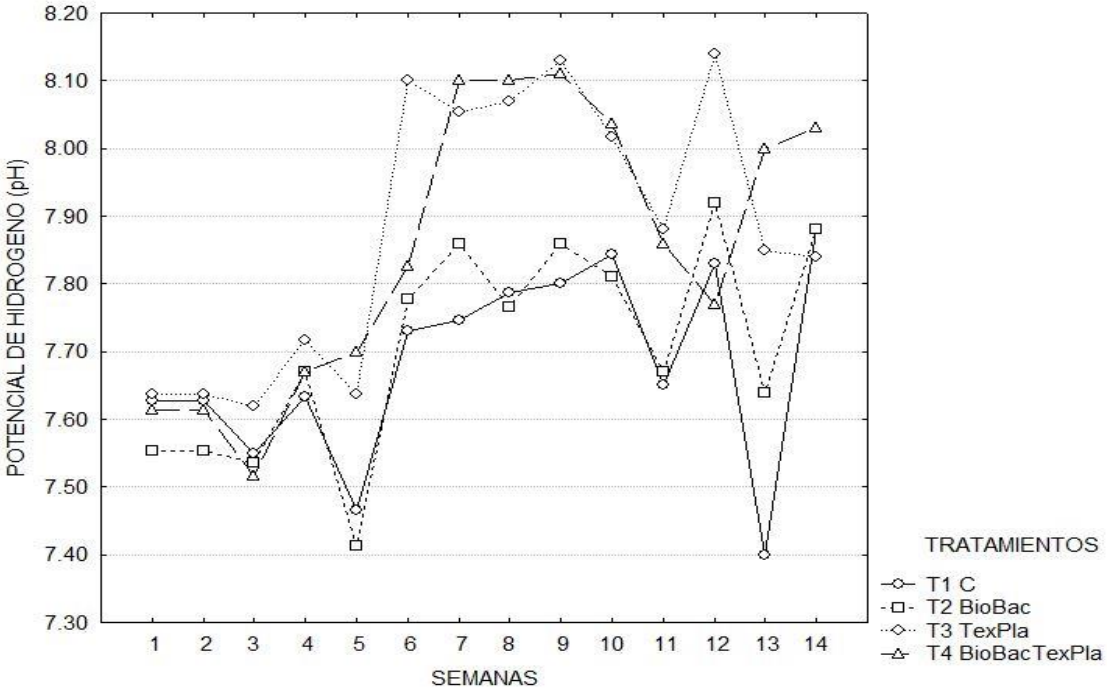

Figura 13. pH registrado por tratamientos en el proceso de biorremediación durante semanas.

Anexo C

Porcentajes de humedad durante el proceso de biorremediación

Durante el monitoreo de biopilas los porcentajes de humedad que se presentaron fueron diferentes T1 C con un promedio de 27.44 %, T2 BioBac con 26.29 %, T3 TexPla con 31.04 %, mientras que para el T4 BioBacTexPla fue de 31.62 %. El porcentaje máximo de humedad se registró en el tratamiento T4 BioBacTexPla, mientras que el valor mínimo se registró en el tratamiento T2 BioBac. (Figura 14).

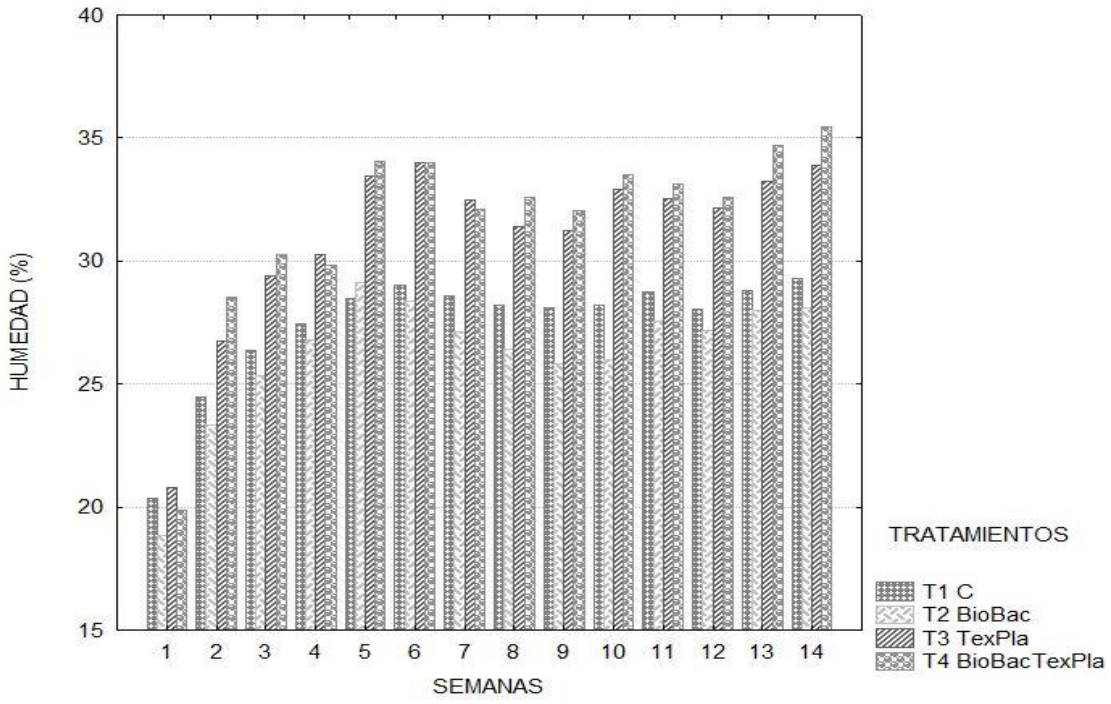

Figura 14. Porcentajes de humedad en los tratamientos durante semanas.