



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Campus Tuxpan

Maestría en Ciencias del Ambiente

Alternativa de biorremediación con bacterias
autóctonas de sedimento contaminado de la
Laguna de Tamiahua, Veracruz, México

TESIS

**Que para obtener el título de:
Maestra en Ciencias del Ambiente**

PRESENTA

Biol. Wendy Lizbeth Mendo Pascual

Director de Tesis:

Dr. Pablo San Martín del Ángel

Co-director de Tesis:

Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera

Tuxpan, Ver.

Septiembre 2014

AGRADECIMIENTOS

Agradezco inicialmente al Dr. Pablo San Martín del Ángel por su confianza y por todo el apoyo brindado en mí para la realización de este trabajo.

A la Dra. Rosa Idalia Hernández Herrera por su tiempo y disposición en la revisión de este trabajo.

Quiero agradecer a mi máxima casa de estudios 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 cada uno de mi comisión revisora Dra. Marisela López Ortega, Dr. Rodrigo Cuervo González y al Dr. Juan Manuel Pech Canché por su disposición y sus observaciones y recomendaciones para que este trabajo mejorara.

Gracias por el apoyo brindado a todos los del laboratorio de Biotecnología ambiental y haber hecho tan ameno estos dos años.

DEDICATORIAS

A mis Padres y esposo por el apoyo incondicional que me brindaron durante esta etapa de mi vida, sin ellos no podría haber cumplido este sueño.

“El futuro pertenece a aquellos que creen en la belleza de sus sueños”

Eleanor Roosevelt

ÍNDICE

| | | |
|------|---|----|
| I. | INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. | ANTECEDENTES | 3 |
| | 2.1 La industria petroquímica en México | 3 |
| | 2.2 Características y propiedades de los hidrocarburos de petróleo | 4 |
| | 2.2.1 Fuentes de hidrocarburos..... | 5 |
| | 2.2.2 Impacto ambiental de los hidrocarburos | 7 |
| | 2.2.3 Hidrocarburos contenidos en sedimento | 8 |
| | 2.3 Legislación ambiental en materia de hidrocarburos..... | 9 |
| | 2.4 Tecnologías de remediación..... | 11 |
| | 2.5 Tratamiento biológico: biorremediación | 13 |
| | 2.5.1 Tecnologías <i>in situ</i> | 14 |
| | 2.5.2 Tecnologías <i>ex situ</i> | 15 |
| | 2.5.3 Factores que limitan la biorremediación | 16 |
| | 2.6 Microorganismos degradadores de petróleo..... | 19 |
| | 2.7 Las técnicas de bioaumentación, bioestimulación y bioventeo como alternativas de biorremediación | 21 |
| | 2.7.1 Bioaumentación y bioestimulación..... | 21 |
| | 2.7.2 Bioventeo..... | 24 |
| III. | OBJETIVOS | 27 |
| | Objetivo general:..... | 27 |
| | Objetivos particulares: | 27 |
| IV. | MATERIALES Y MÉTODOS | 28 |
| | 4.1 Toma de muestras | 28 |
| | 4.2 Análisis físicos y químicos del sedimento | 28 |
| | 4.3 Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) | 29 |
| | 4.3.1 Preparación del sedimento para la extracción de hidrocarburos | 29 |
| | 4.3.2 Extracción de hidrocarburos y cuantificación..... | 30 |
| | 4.4 Aislamiento de las bacterias | 32 |

| | |
|---|----|
| 4.5 Cultivo en agar..... | 32 |
| 4.6 Purificación de las cepas bacterianas..... | 32 |
| 4.7 Selección de cepas bacterianas hidrocarbonoclastas..... | 33 |
| 4.8 Incremento de la biomasa bacteriana..... | 33 |
| 4.9 Diseño experimental y tratamientos..... | 34 |
| 4.10 Proceso de biorremediación..... | 35 |
| 4.11 Análisis estadísticos..... | 36 |
| 4.12 Identificación taxonómica..... | 36 |
| 4.12.1 Sistema API 20 NE..... | 36 |
| 4.12.2 Análisis de ARNr 16s..... | 37 |
| V. RESULTADOS..... | 40 |
| 5.1 Caracterización física y química del sedimento..... | 40 |
| 5.1.1 Análisis físicos de los sedimentos contaminados..... | 40 |
| 5.1.2 Análisis químicos de los sedimentos contaminados..... | 41 |
| 5.2 Cepas bacterianas hidrocarburoclásticas axénicas..... | 43 |
| 5.2.1 Selección de bacterias degradadoras de hidrocarburos..... | 44 |
| 5.3 Cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo (HTPs)..... | 44 |
| 5.3.1 Potencial de hidrógeno..... | 48 |
| 5.3.2 Temperatura..... | 49 |
| 5.4 Identificación taxonómica..... | 50 |
| 5.4.1 Sistema API 20 NE..... | 50 |
| 5.4.2 Análisis de ARNr 16s..... | 53 |
| VI. DISCUSIÓN..... | 55 |
| VII. CONCLUSIONES Y APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO..... | 65 |
| 7.1 Conclusiones..... | 65 |
| 7.2 Aplicación práctica del trabajo..... | 66 |
| 7.3 Recomendaciones..... | 68 |
| VIII. BIBLIOGRAFÍA..... | 69 |
| IX. ANEXO..... | 86 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Composición de las fracciones químicas de los hidrocarburos de petróleo | 4 |
| Cuadro 2. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo | 9 |
| Cuadro 3. Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo | 10 |
| Cuadro 4. Factores que afectan la biorremediación..... | 17 |
| Cuadro 5. Iniciadores universales UniBact Forward y Reverse | 37 |
| Cuadro 6. Componentes para la amplificación por PCR | 38 |
| Cuadro 7. Resultados del análisis físicos de los sedimentos | 40 |
| Cuadro 8. Resultados del análisis químico del sedimento | 42 |
| Cuadro 9. Contenido de HTP (mg/kg) al inicio 30, 60 y 90 días del proceso de biorremediación sin bacterias..... | 45 |
| Cuadro 10. Contenido de HTP (mg/kg) al inicio 30, 60 y 90 días del proceso de biorremediación con bacterias | 46 |
| Cuadro 11. Resultados de las pruebas estadísticas, t student | 47 |
| Cuadro 12. Resultados de la galería API 20 NE | 51 |
| Cuadro 13. Ventajas y desventajas de realizar el proceso de biorremediación <i>in situ</i> | 67 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Columnas conectadas a la bomba de aire. | 35 |
| Figura 2. Proporción de arena, limo y arcilla del sedimento contaminado. | 41 |
| Figura 3. Morfología macroscópica: colonias mucoides pequeñas y con una coloración beige claro. | 43 |
| Figura 4. Morfología microscópica: formas bacilares Gram negativo..... | 43 |
| Figura 5. Prueba cualitativa donde se muestra la degradación de los hidrocarburos a distintos tiempos postincubación..... | 44 |
| Figura 6. Valores promedio de contenido de TPH mg/kg a los 30, 60 y 90 días del tratamiento. | 48 |
| Figura 7. Valores de Potencial de Hidrógeno durante el proceso de biorremediación..... | 49 |
| Figura 8. Valores de temperatura durante el proceso de biorremediación..... | 50 |
| Figura 9. Amplificación gen ARNr 16s mediante PCR. | 53 |

Resumen

Las bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en ecosistemas marinos y terrestres, desempeñan 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. En el presente trabajo, se evaluó el proceso de biorremediación en columnas de acrílico a sedimentos contaminados por hidrocarburos empleando bacterias autóctonas de la laguna de Tamiahua, Veracruz, México. Se tomaron muestras de sedimento al azar de tipo compuesto, mediante aislamientos bacterianos con medio Bushnell Hass y petróleo como única fuente de carbono y energía se obtuvieron cepas en agar de soya tripticaseína. Mediante pruebas cualitativas se seleccionó la cepa con capacidad de degradación y fue bioaumentada por técnicas de laboratorio. Se realizó el proceso de biorremediación aplicando las técnicas de bioaumentación y bioventeo. El proceso constó de dos tratamientos, el primero sin bacterias y el segundo con bacterias. Al inicio del proceso los sedimentos contaminados tenían un valor inicial de HTP de 104, 000 mg/kg, el experimento tuvo una duración de 90 días al cual se le inyectó aire de manera constante (Bioventeo), durante el experimento el pH se mantuvo en 7.3 y la temperatura osciló entre los 26.9 y 27.7°C. Como resultado del experimento se obtuvo que para el tratamiento sin bacterias se presentó un contenido de 97, 560 mg/kg y un 6.44 % de degradación, para el tratamiento que tenía concentrada la biomasa bacteriana el contenido fue de 35.640 mg/kg y una remoción del 68.36%. La cepa aplicada en la biorremediación fue identificada mediante pruebas bioquímicas por el sistema API 20 NE y complementada por pruebas moleculares de ARNr 16s teniendo como resultado a la especie *Ochrobactrum anthropi*. Por lo anterior descrito, en el presente trabajo de investigación, el proceso de biorremediación fue considerado exitoso.

Palabras clave: aislamiento, purificación, degradación, biomasa, bioaumentación, bioventeo.

I. INTRODUCCIÓN

La industrialización en el mundo ha generado graves problemas de contaminación, en el caso de la industria petrolera debido a la exploración y comercialización del petróleo sigue aumentando los derrames rutinarios y accidentales causando un mayor daño al medio ambiente (Vieira *et al.*, 2009; Araujo *et al.*, 2006).

En México, el desarrollo de la industria petroquímica ha generado graves problemas ambientales, como el deterioro de los ecosistemas en el país (Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2002), esto debido al incremento por el aumento de la explotación y producción de la industria petrolera (Scholz *et al.*, 2008), algunos de los estados del país que presentan mayor afectación por contaminación de hidrocarburos y sus derivados, son Campeche con el primer lugar en las concentraciones de hidrocarburos dispersos en aguas costeras y marinas, seguido por el estado de Veracruz, Tabasco y Quintana Roo (Ponce-Vélez y Vázquez-Botello, 2005).

Debido a la presencia de esta problemática, la biotecnología ambiental surge como una solución a problemas de contaminación, esta disciplina emplea los procesos biológicos modernos en la protección y restauración de la calidad del ambiente (Barrios-San Martín, 2011). Actualmente la principal aplicación de la biotecnología es la biorremediación, que surge como alternativa para descontaminar áreas empleando organismos vivos (Beskoski *et al.*, 2011). La biorremediación o biotratamiento permite la recuperación de ambientes como

suelos, sedimentos y acuíferos contaminados con xenobióticos, mediante la aplicación de la capacidad metabólica de los sistemas biológicos (Rivelli *et al.*, 2013) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos, utilizando el carbono del contaminante como fuente de alimento y energía (Ortiz *et al.*, 2005; Van Elsas *et al.*, 2007).

El uso de tecnologías de biorremediación para el tratamiento de sitios contaminados es una opción que presenta ventajas con respecto a métodos físicos y químicos: son sencillas de implementar, efectivas, ambientalmente seguras, los contaminantes se destruyen o transforman y son relativamente económicas (Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2003).

Los procesos de biorremediación se han usado para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con hidrocarburos, solventes, explosivos, clorofenoles, pesticidas, conservadores de madera e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Van Deuren *et al.*, 1997; Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2003).

Por tal motivo el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal realizar un experimento de biorremediación a nivel de microcosmos empleando las técnicas de bioaumentación y bioventeo en sedimentos contaminados por hidrocarburos de la laguna de Tamiahua utilizando bacterias autóctonas con capacidades hidrocarbonoclásticas.

II. ANTECEDENTES

2.1 La industria petroquímica en México

El desarrollo económico en México ha favorecido la concentración y expansión de la industria petrolera, sin embargo, actualmente este desarrollo ha dado origen a graves problemas en materia ambiental, derivados de emergencias ambientales, con graves repercusiones a la salud humana y al equilibrio ecológico de los ecosistemas (Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2002).

La intensificación y diversificación de la actividad industrial en el país, así como el acelerado crecimiento en la población, ha dado como resultado la demanda de mayores cantidades de combustibles fósiles (hidrocarburos); aunque gran parte de estos compuestos se utilizan para generar energía, un alto porcentaje es liberado al medio ambiente como agente contaminante (Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2003).

Las diferentes actividades industriales son fuentes potenciales de contaminación ambiental, como la emisión de humos, polvos, gases y descargas de aguas residuales generadas durante la perforación de pozos petroleros, en la extracción de líquidos, por la refinación y en la producción de petroquímicos (Ortínez *et al.*, 2003). Esto como consecuencia del inadecuado manejo y disposición final de estos residuos, que se ha visto reflejado en poco tiempo en los altos niveles de contaminación alcanzados en los suelos, agua y aire (Beltrán *et al.*, 2013).

2.2 Características y propiedades de los hidrocarburos de petróleo

El petróleo se caracteriza por ser un líquido negro, viscoso y con una composición química sumamente compleja, los principales componentes del petróleo son los hidrocarburos, formados únicamente por hidrógeno y carbono (Rahman *et al.*, 2007); los hidrocarburos constituyen uno de los grupos de contaminantes ambientales más importantes, tanto por su abundancia, como por su persistencia en distintos ambientes (Viñas-Canals, 2005).

La composición elemental del petróleo está condicionada por la predominancia de los compuestos tipo hidrocarburo: 84-87% de Carbono, 11-14% de Hidrógeno, de 0-8% de Azufre y de 0-4% de Oxígeno y Nitrógeno (Rahman *et al.*, 2007). Los principales componentes se dividen en fracciones (Cuadro 1), los ácidos grasos saturados, los compuestos aromáticos, los asfaltenos y las resinas

Cuadro 1. Composición de las fracciones químicas de los hidrocarburos de petróleo

| Fracción | Composición |
|-----------------|--|
| Saturados | n-alcanos, alcanos de cadena ramificada e isoprenoides y cicloparafinas o cicloalcanos, hopanos. |
| Aromáticos | Hidrocarburos monoaromáticos, diaromáticos, aromáticos policíclicos (HAP) |
| Resinas | Agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas |
| Asfaltenos | Ácidos grasos, metaloporfirinas, fenoles polihidratados |

Autor: Speight, 1991

2.2.1 Fuentes de hidrocarburos

Los hidrocarburos comprenden una amplia variedad de compuestos químicos que tienen distintos orígenes. Una vez liberados al ambiente, estos pueden distribuirse en el agua, suelo y sedimentos. Aunque el origen es muy diverso se pueden diferenciar los siguientes:

- Hidrocarburos antrópicos: son introducidos como resultado de la actividad humana. Los procesos de combustión industrial contribuyen con niveles altos, debido al humo generado por carbón, combustibles fósiles y petróleo refinado, las descargas de aguas municipales, las actividades de transporte y los derrames son algunas de las principales fuentes de estos contaminantes (Bidleman *et al.*, 1990).
- Hidrocarburos biogénicos: son sintetizados casi por todas las plantas, animales terrestres y marinos, incluyendo a la microbiota, bacterias, plancton marino, diatomeas, algas y plantas superiores (Bedair y Al Saad, 1992).
- Hidrocarburos diagenéticos: provenientes de una transformación microbiana o química que ocurre en los sedimentos a partir de moléculas biogénicas precursoras como terpenos, esteroides, carotenos (Benlahcen *et al.*, 1997)

Se reconoce que los hidrocarburos diagenéticos constituyen principalmente a los alifáticos, cicloalcanos, esteroides, triterpenos pentacíclicos y los hidrocarburos

aromáticos policíclicos. En donde los HAPs son los más importantes entre los hidrocarburos diagenéticos, están formados por dos o más anillos de benceno fusionados, los cuales difieren en el número y posición del anillo aromático (Acuña *et al.*, 2010). Los HAPs se forman por la exposición de moléculas orgánicas a elevadas temperaturas (pirólisis), así como también por exposiciones a menor temperatura (100- 150°C) y a elevadas presiones durante millones de años en sedimentos, durante la formación del petróleo (Notar *et al.*, 2001).

Las características fisicoquímicas de los HAPs son las que condicionan su comportamiento, en el medio ambiente, siendo las más importantes la hidrofobicidad y la recalcitrancia. Debido a sus propiedades hidrofóbicas, los HAPs suelen acumularse en la superficie, lo que dificulta su degradación (Lladó - Fernández, 2012; Atagana, 2006). Además de su elevada persistencia ambiental, los HAPs suponen un riesgo para la salud pública, como son el naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenentreno, antraceno, fluoranteno y pireno, son considerados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US Environmental Protection Agency, USEPA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comunidad Europea (CE) debido a sus efectos carcinogénicos (Menzie *et al.*, 1992; Ortínez *et al.*, 2003).

Estos compuestos se encuentran distribuidos en el suelo, mar, sistemas pluviales y sedimentos y su presencia se ha atribuido principalmente a los derrames de petróleo y descargas de plantas petroquímicas (Labana *et al.*, 2007).

2.2.2 Impacto ambiental de los hidrocarburos

En la actualidad uno de los problemas ambientales más importantes es la contaminación de ecosistemas terrestres y acuáticos por hidrocarburos y sus derivados (Pardo *et al.*, 2004). Esta contaminación surge debido a los accidentes que ocurren en la industria petrolera, como derrames de tanques, ruptura de tuberías y extracción de pozos, que representan 10% de estas descargas; sin embargo el 90% es debido a descargas de las actividades industriales (Fernández *et al.*, 2006).

Las principales consecuencias ambientales que se presentan después de un evento de contaminación por hidrocarburos son: la reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal, cambios en la dinámica poblacional de la fauna y la biota microbiana, contaminación por infiltración de cuerpos de agua subterránea (Cohen, 2013). Además del impacto negativo al ambiente, los hidrocarburos juegan un papel importante en el desarrollo económico y social, ya que inciden directamente en la producción de alimentos a través de la pesca y la acuicultura, el transporte, la construcción y la administración de puertos e industrias y en los últimos años se han presentado afectaciones en la expansión de las zonas urbanas y recreativas, cabe destacar que una de las principales consecuencias es la afectación a la salud humana, esto por medio de la cadena alimenticia debido a su potencial tóxico (Ponce-Vélez y Vázquez-Botello, 2005).

2.2.3 Hidrocarburos contenidos en sedimento

El ecosistema marino cerca de la costa se distingue por ser un ambiente muy dinámico con una gran variedad de sedimentos según sus distintos hábitats biológicos, los procesos de erosión y los mecanismos de transporte de cada región (Salazar *et al.*, 2004).

Los sedimentos forman parte importante de los ecosistemas acuáticos, se caracterizan por ser áreas productivas y reservorio de especies bentónicas; sin embargo, en ellos pueden acumularse sustancias tóxicas mediante mecanismos complejos de adsorción físicos y químicos, que depende la naturaleza de la matriz sedimentaria y las propiedades de los contaminantes (De Bartolomeo *et al.*, 2004).

El destino de los contaminantes en los sedimentos están predispuestos a factores como las características de los sedimentos, las propiedades de los compuestos y factores ambientales tales como la temperatura y la precipitación. Los destinos posibles de los contaminantes que entran incluyen la biodegradación, volatilización y la transferencia a los organismos (Chapman *et al.*, 2002).

Históricamente los sedimentos son considerados reservorios para diversos tipos de contaminantes antropogénicos, los contaminantes que entran a estos ecosistemas pueden acumularse en la biota residente y ser incorporados en las cadenas alimenticias marinas o costeras; también pueden considerarse como una fuente de contaminantes persistentes en el ambiente (Pruell *et al.*, 2000).

2.3 Legislación ambiental en materia de hidrocarburos

En México existe un gran número de sitios contaminados, principalmente por hidrocarburos derivados del petróleo. Esta situación ha generado que en los últimos años se genere legislación, que controle y regule dicha situación.

Los límites de limpieza para hidrocarburos en suelos y aguas dependerán de los criterios o normas vigentes en México. En 2005 se publicó la Norma Oficial Mexicana con el título de NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 y que en el año 2012 se actualizaría a 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. En esta norma se establecen los límites en función de las fracciones ligera, media y pesada, así como el uso del suelo (Cuadros 2 y 3).

Cuadro 2. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo

| Fracción de hidrocarburos | Uso de suelo predominante (mg/kg base seca) | | |
|---------------------------|--|--------------------------|------------------------|
| | Agrícola, forestal, pecuario y de conservación | Residencial y recreativo | Industrial y comercial |
| Ligera | 200 | 200 | 500 |
| Media | 1 200 | 1 200 | 5 000 |
| Pesada | 3 000 | 3 000 | 6 000 |

Cuadro 3. Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo

| Hidrocarburos específicos | Uso de suelo predominante (mg/kg base seca) | | |
|--------------------------------------|---|-------------------------------------|-----------------------------------|
| | Agrícola, forestal, pecuario y de conservación | Residencial y recreativo | Industrial y comercial |
| Benceno | 6 | 6 | 15 |
| Tolueno | 40 | 40 | 100 |
| Etilbenceno | 10 | 10 | 25 |
| Xilenos | 40 | 40 | 100 |
| Benzo(a) pireno | 2 | 2 | 10 |
| Dibenzo(a,h) antraceno | 2 | 2 | 10 |
| Benzo(a) antraceno | 2 | 2 | 10 |
| Benzo(b) fluoranteno | 2 | 2 | 10 |
| Benzo(k) fluoranteno | 8 | 8 | 80 |
| Indeno(1,2,3 cd) pireno | 2 | 2 | 10 |

2.4 Tecnologías de remediación

La tecnología de remediación implica la remoción, degradación o transformación de contaminantes a sustancias menos tóxicas, a través de acciones químicas, físicas o biológicas, que reducen la movilidad y migración de contaminantes (Jain *et al.*, 2011).

De acuerdo con Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2002, las tecnologías de remediación pueden clasificarse de distintas maneras, con base en los siguientes principios: a) estrategias de remediación; b) lugar en que se realiza el proceso de remediación y c) tipo de tratamiento.

a) Estrategias de remediación: son estrategias básicas que pueden ser utilizadas por separado o en conjunto.

1. Destrucción o modificación: altera la estructura química del contaminante.
2. Extracción o separación: se extraen los contaminantes o separan del medio contaminado.
3. Aislamiento o inmovilización: los contaminantes son estabilizados, solidificados.

b) Lugar del proceso de remediación: se pueden clasificar en *in situ* y *ex situ*.

1. *In situ*: son las aplicaciones en las que el suelo contaminado es tratado, o bien, los contaminantes son removidos del suelo contaminado sin

necesidad de excavar el sitio, es decir, se realizan en el mismo sitio en donde se encuentra la contaminación.

2. *Ex situ*: se requiere de excavación, dragado o cualquier otro proceso para remover el suelo contaminado antes de su tratamiento que puede realizarse en el mismo sitio (*on site*) o fuera del sitio (*off site*).

c) Tipo de tratamiento: se divide en tres tipos de tratamientos.

1. Tratamientos biológicos (biorremediación): utiliza las actividades metabólicas de organismos vivos (plantas, hongos, bacterias) para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos.
2. Tratamientos fisicoquímicos: este tipo de tratamientos, utiliza las propiedades físicas o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación.
3. Tratamientos térmicos: utilizan calor para incrementar la volatilización, quemar, descomponer o fundir los contaminantes en un suelo.

2.5 Tratamiento biológico: biorremediación

Los microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en una gran variedad de hábitats, que van desde ambientes marinos a los ambientes terrestres; sin embargo gran parte de estos ambientes han sido contaminados por compuestos tóxicos provenientes de las actividades antropogénicas (Hawumba *et al.*, 2010). El poblamiento de ambientes contaminados por microorganismos significa que son capaces de sobrevivir en esas condiciones ambientales, por tener una mayor capacidad de adaptación a los medios contaminados (Abalos *et al.*, 2004; Benavides *et al.*, 2006).

El término biorremediación se aplica principalmente a la utilización de microorganismos (bacterias y hongos) para degradar, transformar y desintoxicar contaminantes orgánicos e inorgánicos y residuos peligrosos a compuestos inocuos tales como dióxido de carbono, agua o a formas menos tóxicas (US EPA, 2005; Paul *et al.*, 2005; Vidali, 2001). Las transformaciones de los contaminantes se logran a través de las capacidades catabólicas de los microorganismos (Domde *et al.*, 2007).

Durante la biorremediación se puede emplear organismos autóctonos (organismos propios del sitio contaminado) o exógenos (de otros sitios), puede realizarse *in situ* o *ex situ* (Ang *et al.*, 2005). Los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con hidrocarburos de petróleo (HTP), solventes (benceno y tolueno) explosivos (TNT), clorofenoles

(PCP), pesticidas, conservadores de madera (creosota), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y metales pesados (Semple *et al.*, 2001; Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2002).

2.5.1 Tecnologías *in situ*

La técnica *in situ* consiste en estimular y crear un ambiente favorable para el crecimiento microbiano a partir de los contaminantes. Las tecnologías de biorremediación *in situ*, incluyen el bioventeo, la bioaumentación, la bioestimulación, la biolabranza, la atenuación natural y fitorremediación (Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2003).

- Bioventeo: es una técnica innovadora *in situ* donde los microorganismos autóctonos son estimulados mediante la inyección de aire, con el objetivo de proporcionar oxígeno para estimular el crecimiento microbiano y la actividad de los microorganismos para promover la degradación de los hidrocarburos del petróleo (Eyvazi y Zitner, 2009; Sardrood *et al.*, 2013).
- Bioaumentación: consiste en la adición de microorganismos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante (Mahanty *et al.*, 2013).
- Bioestimulación: esta técnica implica la estimulación de los microorganismos autóctonos, mediante la adición de nutrientes o receptores de electrones, para mejorar así la biodegradación de los contaminantes orgánicos (Singh *et al.*, 2011).

- Biolabranza: consiste en que el suelo contaminado es tratado *in situ* por medio del arado. El suelo contaminado se mezcla con agentes de volumen y nutrientes, y se remueve periódicamente para favorecer su aireación, optimizando la velocidad de degradación (Riser-Roberts, 1998).
- Atenuación natural: proceso natural por el cual los microorganismos descomponen o degradan sustancias peligrosas, transformándolas en sustancias menos tóxicas o inocuas (US EPA, 1996; Margesin y Schinner, 2001).
- Fitorremediación: utiliza las plantas para remover, reducir, transformar, mineralizar, degradar, volatizar o estabilizar contaminantes (Harvey *et al.*, 2002).

2.5.2 Tecnologías *ex situ*

Este proceso se lleva a cabo fuera del sitio de contaminación, estas técnicas implican la excavación o remoción de suelo contaminado de la tierra (Sardrood *et al.*, 2013).

- Landfarming: es una técnica en la que el suelo se excava y extiende, es labrada periódicamente, el objetivo es estimular los microorganismos nativos para facilitar la degradación de los contaminantes (Vidali, 2001).
- Composteo: el composteo es un proceso biológico, es una técnica que consiste en la combinación de tierra contaminada con material orgánico biodegradable como el estiércol o desechos agrícolas, la presencia de

estos materiales orgánicos estimula el desarrollo de la población microbiana. El compostaje se puede realizar usando pilas estáticas aireadas (Antizar *et al.*, 2008).

- Biopilas: es una combinación entre landfarming y compostaje. Consiste en formar pilas con el suelo contaminado. El sistema puede ser abierto o cerrado, se adiciona con nutrientes y agua y se coloca en áreas de tratamiento que incluyen sistemas para coleccionar lixiviados y alguna forma de aireación. Las biopilas proporciona un entorno favorable para las comunidades indígenas (Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2003).
- Biorreactores: este método se utiliza para tratar material sólido contaminado (suelos, lodos y sedimentos) o agua a través de un biorreactor. Un biorreactor puede ser definido como un recipiente de contención (sólido, líquido y gas) que mezcla el contenido para aumentar la tasa de degradación por medio de los microorganismos (Vidali, 2001).

2.5.3 Factores que limitan la biorremediación

El éxito de la biorremediación depende de los diversos factores, así como de las características propias del contaminante así como del suelo (Bamforth y Singleton, 2005). La velocidad y el grado de biodegradación de los compuestos tóxicos en los suelos y sedimentos se encuentran condicionados por múltiples factores (Labana *et al.*, 2007). En general dentro de los factores se encuentran los físicos/químicos, biológicos y ambientales (Cuadro 4).

Cuadro 4. Factores que afectan la biorremediación

| Factores físicos y químicos | Factores biológicos | Factores ambientales |
|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Propiedades de los contaminantes• El contenido orgánico en el suelo• Estructura y tipo de suelo• Presencia del contaminante | <ul style="list-style-type: none">• Características de población microbiana (diversidad genética/ potencial catabólico) | <ul style="list-style-type: none">• Temperatura• Oxígeno• Humedad• pH• Sorción• Grado de contaminación |

Autor: Labana *et al.*, 2007

El factor determinante en el proceso de degradación de hidrocarburos es la población microbiana, que debe estar adaptada al compuesto contaminante y poseer las enzimas necesarias para catalizar las reacciones de degradación (Viñas *et al.*, 2005). En muchos casos el éxito de la biorremediación se condiciona a varios factores como la naturaleza química y la concentración de contaminantes, su disponibilidad para los microorganismos y características físico químicas del medio ambiente (Fantroussi y Agathos, 2005; Hamamura *et al.*, 2006). Por otro lado, la temperatura, el pH y la humedad deben ser considerados siempre, ya que afectan directamente a las características químicas de los contaminantes, así como a la fisiología y diversidad bacteriana autóctona del sitio (Das y Chandran, 2011; Cárdenas *et al.*, 2010). Para el caso de la temperatura se considera que esta debe oscilar entre los 18 a 30 °C (Fantroussi y Agathos, 2005). Cabe

destacar que el pH es un factor importante que interviene en la biodegradación de los hidrocarburos, se considera que el rango recomendado para que se lleve a cabo la degradación se encuentra entre 5 y 9 (Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2003), sin embargo un pH próximo a la neutralidad de 6 a 9 es un rango favorable para el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos (Boopathy *et al.*, 2012; Nikolopoulou *et al.*, 2007).

Se debe considerar la presencia de nutrientes inorgánicos (nitrógeno, fósforo y potasio) para que las tecnologías tengan resultados favorables. En suelos contaminados donde la presencia de carbono orgánico suele ser alta, debido a la naturaleza del contaminante, los nutrientes disponibles pueden agotarse muy rápido (Barrios-San Martín, 2011). La textura del suelo se encuentra relacionada con la eficiencia del proceso de biorremediación, es importante considerar esta propiedad, ya que la relación área/volumen de los diferentes tipos de partícula, tienen un impacto directo sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, y por consiguiente en las tecnologías de remediación (Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2002). Un alto contenido húmico se relaciona con los derrames de hidrocarburos, ya que estos influyen en el aumento de materia orgánica (Barrios-San Martín, 2011).

2.6 Microorganismos degradadores de petróleo

Las bacterias para su crecimiento requieren de fuentes de carbono derivados de los hidrocarburos del petróleo, estos microorganismos se han caracterizado por ser tolerantes a los derivados del petróleo, además de desarrollar y utilizar diferentes respuestas especializadas (enzimáticas y fisiológicas) para crecer en presencia de este contaminante y de manera natural realizar la degradación química del petróleo (Acosta *et al.*, 2011; Atlas *et al.*, 1991); las bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos de petróleo, se les conoce como bacterias hidrocarbonoclásticas (Harayama *et al.*, 2004).

Actualmente, numerosos géneros bacterianos han sido descritos como degradadores de hidrocarburos, a partir de procesos de biorremediación se han identificado microorganismos tolerantes y con capacidad de degradación, a partir de sitios contaminados, como es el caso de *Ochrobactrum intermedium* (Colla *et al.*, 2014), *Mycobacterium* spp., *Salmonella* spp. (Chikere *et al.*, 2012), *Burkholderia* spp., *Achromobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Cupriavidus* spp., *Rhodanobacter* spp. (Pactao *et al.*, 2012), *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* (Acosta *et al.*, 2011), *Bacillus* sp. (Lebkowska *et al.*, 2011), *Ochrobactrum anthropi*, *Vibrio*, *Aeromonas* sp. (Pucci *et al.*, 2010), *Monilinia* sp. (Wu *et al.*, 2008), *Acinetobacter calcoaceticus* (Gallego *et al.*, 2007), *Stenotrophomonas* sp. y *Ochromonas* sp. (Ueno *et al.*, 2007).

Por otra parte se han identificado especies con capacidad para degradar petróleo a partir de pruebas de degradación, algunas de las bacterias reportadas son

Enterobacter cloacae, *Acinetobacter* y *Bacillus pumillus* (González – Hernández, 2014); *Listeria fleischmanni*, *Bacillus coagulans*, *Ochrobactrum intermedium* (Lira – Rodríguez, 2014) y *Pseudomonas aeruginosa* (Pérez *et al.*, 2008), estas especies fueron identificadas a partir de pruebas bioquímicas y moleculares.

Uno de los géneros bacterianos más explotados en los bioprocesos es *Rhodococcus*, presentan una gran diversidad metabólica, capaz de transformar, biodegradar hidrocarburos alifáticos halogenados y aromáticos (Chikere *et al.*, 2009; Rivelli *et al.*, 2013).

Las *Pseudomonas* forman parte del grupo de las bacterias más utilizadas en la biorremediación, en diversos estudios han demostrado la capacidad de utilizar una amplia variedad de substratos, incluyendo los creados a partir de petróleo (Zanaroli *et al.*, 2010; Vázquez *et al.*, 2009; Labana *et al.*, 2007; Benavides *et al.*, 2006; Mohamad *et al.*, 2004); dentro de este género destacan las *Pseudomonas aeruginosa*, son muy empleadas en los procesos de biorremediación, debido a las capacidades para degradar compuestos aromáticos (Khodijah *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2003), en otros estudios ha demostrado un mayor crecimiento sobre petróleo como única fuente de carbono (Pérez *et al.*, 2008), además de tener un potencial como bacteria exógena en la biorremediación (Ueno *et al.*, 2007).

2.7 Las técnicas de bioaumentación, bioestimulación y bioventeo como alternativas de biorremediación

2.7.1 Bioaumentación y bioestimulación

En los últimos años se han realizado diversos estudios de biorremediación de suelos y sedimentos contaminados por hidrocarburos y sus derivados, combinando las técnicas de bioaumentación y bioestimulación, como Colla *et al.*, (2014) que estudiaron la eficacia de la bioaumentación y bioestimulación en un suelo contaminado por diesel, el experimento se llevó durante 32 días a una temperatura de 28 °C, utilizaron bacterias autóctonas que fueron identificadas en base a la secuencia 16S rRNA gen (*Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Ochrobactrum intermedium*) lograron una degradación del 35.7%.

En otro caso Qiao *et al.*, (2014) realizaron una investigación que se basó en la aplicación de la técnica de bioestimulación evaluando la eficacia de fertilizantes (NPK), sustancia húmica y residuos orgánicos, así como la aplicación de consorcios bacterianos, después de 90 días de incubación los resultados mostraron que la mayor degradación de TPH fue mediante la bioestimulación con NPK con un porcentaje de 64%.

Autores como Bayer *et al.*, (2013) realizaron un proceso de biorremediación en columnas de vidrio de sedimentos limo-arenoso, que fueron contaminados por diesel, durante 111 días aplicaron las técnicas de atenuación natural y bioestimulación, durante el experimento la temperatura se registró de 25.1 a 28.7

°C, un pH de 6.7 a 8.4, la eficiencia en la eliminación total del contaminante fue de 82 y 78% respectivamente.

De acuerdo con Nikolopoulou *et al.*, (2013a) examinaron la eficacia de la bioaumentación por medio de bacterias autóctonas, para recuperar sedimento de un ambiente marino contaminado por petróleo, durante 30 días del experimento aplicaron nutrientes para estimular la degradación, con este proceso llegaron a un 73% de degradación del contaminante.

En otro estudio Nikolopoulou *et al.*, (2013b) combinaron las técnicas de bioaumentación y bioestimulación durante 90 días, emplearon bacterias autóctonas para la remediación de ambientes marinos contaminados, comprobaron que la combinación de estas dos técnicas se mejora la degradación de hidrocarburos, de acuerdo a lo anterior obtuvieron una degradación de HAPs del 88%.

Investigaciones como la realizada por Chagas *et al.*, (2012) en donde evaluaron un suelo de arcilla contaminado con diesel, aislaron bacterias a partir de medio Bushnell Hass, utilizaron tres tratamientos de biorremediación: landfarming, bioestimulación y bioestimulación con bioaumentación; al finalizar los 129 días del período experimental, obtuvieron los valores de 87%, 89% y 87% para cada tratamiento respectivamente.

Cabe destacar trabajos como el de Lladó *et al.*, (2012) donde se enfocaron en la aplicación de microorganismos y nutrientes a un suelo franco-arenoso contaminado por hidrocarburos, el experimento se llevó en microcosmos durante

280 días, con un pH de 7.5 y un contenido inicial de hidrocarburos de 1,727 mg/kg, lograron biorremediar entre un 30 y 50%.

Se han aplicado procesos de biorremediación a nivel de laboratorio como el realizado por San Martín *et al.*, (2012) aplicaron la biorremediación a sedimentos contaminados, aislando bacterias a partir de medio Bushnell Hass y cultivos en agar de soya tripticaseína, este proceso consistió en la bioaumentación de bacterias hidrocarbonoclastas nativas, el experimento tuvo una duración de 3 meses, obtuvieron al final del experimento un porcentaje total de degradación del 72%.

Otros autores como Beolchini *et al.*, (2010) realizaron un proceso de biorremediación en sedimento limo arcilloso, con alto contenido húmico y altas concentraciones de hidrocarburos alifáticos y HAP, investigaron los efectos del suministro de nutrientes inorgánicos y la cinética de crecimiento microbiano. La adición de nutrientes inorgánicos en este estudio influyeron en el 70% de la degradación de los hidrocarburos alifáticos y 40% para los HAP después de 35 días de tratamiento.

Algunos autores han comparado las técnicas como la realizada por Couto *et al.*, (2010) quienes compararon la técnica de atenuación natural y bioaumentación-bioestimulación para un bioensayo a nivel de mesocosmo de manera *in situ* durante nueve meses, con el fin de descontaminar el suelo de una refinería petrolera, los valores de degradación fueron de 30% para la atenuación natural y para la bioaumentación-bioestimulación una degradación de 50%; el hecho de que

la atenuación natural fuera tan eficiente, refieren que probablemente es un resultado de la presencia de microorganismos nativos fisiológicamente adaptados. Finalmente trabajos como el de Bento *et al.*, (2005) evaluaron las técnicas de atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación para dos suelos contaminados por petróleo que los obtuvieron de Long Beach, California (EE.UU.) y Hong Kong (China). Utilizaron bacterias nativas, previamente aisladas por la secuencia del gen 16S rRNA como *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilus*, *Acinetobacter junii* y *Pseudomonas sp.*, después de 12 semanas de experimento, los resultados fueron una degradación 84% para Long Beach por bioaumentación y por bioestimulación fue de 72%. En el suelo de Hong Kong la atenuación natural fue la más alta con 47% de degradación.

2.7.2 Bioventeo

La técnica de bioventeo es una valiosa alternativa para tratar sitios contaminados mediante la inyección de aire y la aplicación de bacterias hidrocarbonoclásticas potencializando la biodegradación.

Investigaciones recientes han demostrado la eficacia de la técnica, como Muskus *et al.*, (2013) quienes evaluaron las técnicas de bioventing, atenuación natural, bioaumentación y bioventing con bioaumentación en un suelo contaminado artificialmente con diesel contenido en columnas; para la bioaumentación se inoculó el suelo con un consorcio bacteriano, cada tratamiento lo realizaron por triplicado, con una duración de cuatro meses. Los resultados fueron que con la

aplicación de la técnica de bioventing obtuvieron porcentajes de remoción hasta del 97%, mientras que con la técnica de bioventing-bioaumentación fue una remoción hasta del 75% y con la atenuación natural y bioaumentación, los porcentajes de remoción no superaron el 48%.

Se han realizado trabajos como el de García *et al.*, (2010) aplicaron esta técnica a nivel de laboratorio, para tratar suelo contaminado por fenantreno (HAPs), la bioventilación fue realizada en columnas de vidrio con un contenido de 5.5 kg de suelo contaminado y no contaminado, durante un período de 7 meses, en condiciones óptimas de C, N y P, lograron una tasa de reducción de fenantreno del 93%.

Trabajos como el realizado por Eyvazi y Zytner (2009) donde expusieron siete tipos de suelos a diferentes concentraciones de gasolina, proporcionaron los nutrientes necesarios a los microorganismos degradadores, se incubaron a 25 °C durante 30 días, los resultados de este estudio mostraron que la biodegradación para los diferentes tipos de suelo puede ser predecible de acuerdo a las propiedades del suelo, de acuerdo a esto la correlación que desarrollaron predijo la velocidad de degradación con una estimación de error de menos de 5% con un nivel de confianza de 95%.

Investigaciones recientes han evaluado la técnica, entre los que destaca Vieira *et al.*, (2009) que examinaron los efectos de la aireación y la velocidad de agitación, como un método para optimizar la biodegradación en los sedimentos contaminados por diesel y gasolina, emplearon cultivos de bacterias exógenas y

obtuvieron resultados favorables con una degradación de 75,9 % después de 3 días.

De acuerdo con Byun *et al.*, (2005) quienes aplicaron la técnica de bioventeo en un suelo contaminado por hidrocarburos totales de petróleo (HTP), el suelo fue tratado por 180 días, durante el proceso estimularon los microorganismos con nutrientes (nitrógeno y fósforo), la disminución de HTP sucedió alrededor del día 45 del experimento.

Por último, autores como Osterreicher *et al.*, (2004) evaluaron un tratamiento de bioventeo en un suelo contaminado por gasolina-etanol, utilizaron bacterias nativas con capacidad de degradar el contaminante, fueron aisladas en medio mineral, en esta investigación se aplicó aire mediante un compresor a un flujo constante, durante los 141 días que duró el tratamiento, obtuvieron una disminución del contaminante en un 98.8%.

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el proceso de biorremediación, utilizando bacterias autóctonas degradadoras de hidrocarburos para descontaminar sedimentos de la Laguna de Tamiahua.

Objetivos particulares:

- Caracterizar física y químicamente el sedimento del área de estudio.
- Obtener cepas bacterianas hidrocarburohíticas axénicas, aisladas de los sedimentos contaminados del área de estudio.
- Aplicar la técnica de bioventeo y bioaumentación a los sedimentos contaminados durante el proceso de biorremediación.
- Establecer el contenido de hidrocarburos totales de petróleo a los 30, 60 y 90 días de los sedimentos del área de estudio.
- Determinar taxonómicamente a nivel bioquímico y molecular las cepas bacterianas hidrocarburohíticas del área de estudio.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Toma de muestras

El sedimento usado para el estudio fue extraído de la laguna de Tamiahua, Veracruz, México ubicada en las coordenadas 21° 20' 08'' latitud norte y 97° 49' longitud oeste, que presenta antecedentes de contaminación por derrame de hidrocarburos.

El muestreo consistió en coleccionar 12 muestras de sedimento al azar de tipo compuesto de la laguna de Tamiahua, las muestras fueron puestas en bolsas oscuras para evitar la fotodegradación y trasladadas al laboratorio de Biotecnología Ambiental, en la Universidad Veracruzana. El proceso se inició con la homogenización de las muestras de sedimento, posteriormente fue tamizado para eliminar cualquier tipo de basura u otro material no deseado.

Para el análisis físico-químico se tomó un kilogramo de sedimento contaminado finamente tamizado.

Para el aislamiento bacteriano se utilizaron 500 gr de sedimento contaminado.

4.2 Análisis físicos y químicos del sedimento

Los análisis físicos y químicos se realizaron conforme a la: NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudios, muestreos y análisis.

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

Clase textural, pH, densidad real, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, carbonatos totales, nitrógeno inorgánico, fósforo asimilable, potasio intercambiable, calcio intercambiable, magnesio, manganeso, conductividad eléctrica y adsorción de sodio.

Los resultados obtenidos fueron interpretados según la clasificación agronómica correspondiente.

4.3 Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP)

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

4.3.1 Preparación del sedimento para la extracción de hidrocarburos

Para llevar a cabo la extracción de hidrocarburos primero se determinó la humedad de la muestra, la cual consistió en colocar 40 gr de sedimento contaminado en un recipiente a peso constante en la estufa marca Felisa a 30 °C durante 72 horas, hasta que la muestra perdió toda la humedad posible. Posteriormente, la muestra se sacó de la estufa y se colocó en el desecador para

que tomara la temperatura ambiente, después la muestra fue pesada nuevamente, registrando el peso final.

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

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

4.3.2 Extracción de hidrocarburos y cuantificación

Este proceso se realizó con el método de reflujo con equipo Soxhlet, tomando como referencia los métodos, D5369-93 de la ASTM (2003) y 3540 C de la US EPA (1996, 1994) el proceso consistió en colocar 5 gr de suelo seco, finalmente molido, los 5 gr de suelo se depositaron en un cartucho de celulosa y después el cartucho fue puesto en la columna extractora del equipo Soxhlet.

Como siguiente paso en un matraz bola (marca Pyrex) con capacidad de 500 ml se colocó en la estufa para obtener el material a peso constante, después de un lapso de 72 horas se retiró de la estufa, se dispuso en un desecador para que tomara la temperatura ambiente y se registró el peso inicial, posterior a esto se adicionó 400 ml de hexano A.C.S. (marca CTR SCIENTIFIC), se ensambló el matraz con la columna extractora, se inició el calentamiento hasta alcanzar el punto de ebullición, se mantuvo el reflujo en estas condiciones durante 8 horas de tal manera que se efectuaron de 6 a 8 reflujos por hora. Al término del proceso el

matraz fue colocado en la estufa 24 horas y después fue introducido en el desecador hasta llegar a temperatura ambiente, finalmente se registró el peso final del matraz que contenía el extracto orgánico.

La extracción y cuantificación de los hidrocarburos se efectuó al inicio del experimento y posteriormente a los 30, 60 y 90 días.

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

$$\text{HTPs} = \frac{(RB-RA)(FC)}{(P)(FH)}$$

Donde:

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

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

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

P= Cantidad de suelo extraído (g).

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

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

4.4 Aislamiento de las bacterias

El proceso de aislamiento de bacterias se realizó en sedimento contaminado, obtenido del área de estudio con la finalidad de determinar el tipo de bacterias presentes.

Para llevar a cabo el aislamiento de bacterias se utilizó el medio de cultivo Bushnell Hass (Anexo B), el cual fue previamente esterilizado en autoclave a 15 libras de presión por 15 minutos.

El aislamiento consistió en agregar 500 gr de sedimento en frascos estériles, después adicionar 100 ml de medio Bushnell Hass y 1 ml de petróleo, los frascos fueron colocados en la estufa a 30 °C por un lapso de 72 horas. Posteriormente se procedió a realizar el cultivo en agar.

4.5 Cultivo en agar

Después del proceso de aislamiento, se efectuó el cultivo bacteriano en cajas petri medianas (marca Pyrex) que contenían 20 ml de agar de soya tripticaseína estéril. A partir del cultivo bacteriano obtenido en el medio Bushnell-Hass, estas cepas se incubaron a una temperatura de 35°C en un período de 24, 48 y 72 horas (Fletcher, 2000).

4.6 Purificación de las cepas bacterianas

La purificación de las cepas bacterianas consistió en realizar cultivos sucesivos hasta alcanzar el grado de pureza; se estableció como límite la morfología de las

colonias bacterianas para verificar el proceso se efectuaron tinciones de Gram (Anexo C). Una vez reconocidas las colonias fueron almacenadas en cajas petri medianas con 20 ml de agar de soya tripticaseína bajo condiciones de refrigeración (4°C) con el fin de preservar su viabilidad.

4.7 Selección de cepas bacterianas hidrocarbonoclastas

Las cepas bacterianas obtenidas se seleccionaron de acuerdo a su eficiencia en la biodegradación de hidrocarburos con respecto al tiempo. Se realizó una prueba cualitativa que consistió en hacer crecer en forma individual las bacterias en frascos que contenían 50 ml de caldo de Bushnell-Hass y 1 ml hidrocarburo, las muestras se incubaron a 35°C por lapsos de 24, 48 y 72 horas, registrando la degradación que presentaban.

4.8 Incremento de la biomasa bacteriana

La bioaumentación se desarrolló en condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar, con ayuda del mechero, asa bacteriológica, guantes y cubre boca, las bacterias fueron inoculadas en tubos de ensaye que contenían 10 ml de caldo de soya tripticaseína que es un medio enriquecedor de bacterias. Obteniendo 40 ml de caldo de soya tripticaseína y se evaluó mediante el grado de turbidez. Cuando las bacterias proliferaron en los tubos de ensaye, se vaciaron a un matraz con capacidad de 100 ml que contenía caldo de soya tripticaseína respectivamente y se repitió el proceso de incubación. Al término de la incubación

el contenido se vertió a un matraz de 500 ml de caldo de soya tripticaseína respectivamente y se incubaron a 35°C por 72 hrs.

Una vez obtenido el aumento bacteriano deseado las bacterias se vertieron en tubos falcon con capacidad de 15 ml y fueron separadas del medio de cultivo por centrifugación, se utilizó una centrifuga PLC series a 2000 revoluciones por minuto (RPM) por 10 minutos (Fletcher, 2000).

Las células bacterianas centrifugadas se aplicaron al sedimento contaminado para comenzar el proceso de biorremediación.

4.9 Diseño experimental y tratamientos

Para el proceso de biorremediación se elaboró el siguiente diseño: constó de 8 columnas de acrílico con medidas de 45 cm de altura y un diámetro de 5.5 cm.

Las columnas fueron divididas en dos tratamientos: el tratamiento “Sin bacterias” es una mezcla de sedimento contaminado con hidrocarburos previamente esterilizado enriquecido con caldo de soya tripticaseína y el tratamiento “Con bacterias” es sedimento contaminado por hidrocarburos previamente esterilizado con caldo de soya tripticaseína más la bioaugmentación de bacterias, cada columna fue conectada con mangueras a un tubo de material de pvc, por donde se suministró el aire a las bacterias (bioventeo) contenidas en las columnas (Figura 1).

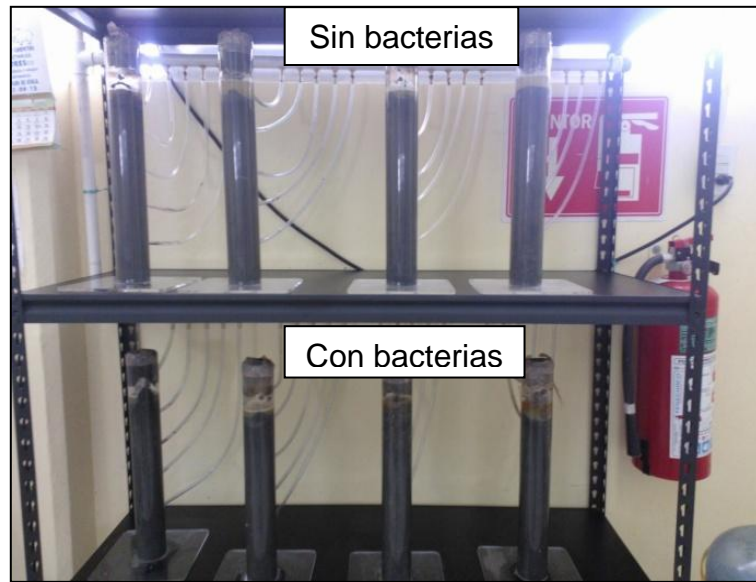


Figura 1. Columnas conectadas a la bomba de aire.

4.10 Proceso de biorremediación

En este se evaluó la capacidad de las bacterias para degradar los hidrocarburos presentes en el sedimento. En primera instancia se prepararon las columnas, llenándolas de 1. 200 kg de sedimento contaminado previamente esterilizado, posteriormente al tratamiento “sin bacterias” no se le hizo ninguna aplicación y al tratamiento “con bacterias” se le añadió la biomasa bacteriana obtenida a partir del aislamiento del sedimento contaminado por hidrocarburos de la laguna de Tamiahua.

Durante el proceso de biorremediación las muestras se mantuvieron en constante aireación (bioventeo) y se le agregó caldo nutritivo (agar de soya tripticaseína), se monitoreo la temperatura de la muestra y pH de forma quincenal durante todo el experimento de biorremediación.

Se tomaron muestras al inicio, a los 30, 60 y 90 días del experimento, para la realización de la cuantificación de hidrocarburos.

4.11 Análisis estadísticos

Se realizaron los análisis estadísticos con el programa Estadistic, utilizando la prueba T student para la cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo.

4.12 Identificación taxonómica

4.12.1 Sistema API 20 NE

Para el desarrollo de la prueba, se preparó una suspensión bacteriana en 5 ml de agua fisiológica la cual se adicionó a cada galería, siguiendo las indicaciones de la técnica. Posteriormente al llenado de las galerías, se incubaron a una temperatura de 36°C por un período de 18-24 horas. Posteriormente se procedió a la lectura e interpretación de las galerías. Las galerías que requirieron la adición de reactivos se realizó en último lugar, ya que algunas pueden liberar algunos gases que pudieran alterar los resultados.

El resultado de la prueba bioquímica fue interpretado por el software APIWEB (BioMerieux).

4.12.2 Análisis de ARNr 16s

Extracción de DNA

Se realizó un cultivo de la cepa en medio de agar Luria Beltrani, se tomó una colonia y se resuspendió en 50 µl de agua miliQ, se le añadieron 50 µl de cloroformo, se efectuó una agitación mediante un mezclador de vórtice durante medio segundo. Posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad. A partir de la obtención del DNA se tomaron 5 µl de la muestra sin tocar la fase orgánica (cloroformo) y se colocó en un tubo eppendorf limpio, para su conservación se utilizó hielo.

Amplificación

Para la amplificación del fragmento ARNr 16s se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando los siguientes iniciadores (Cuadro 5):

Cuadro 5. Iniciadores universales UniBact Forward y Reverse

| Primer | Secuencia |
|----------------------|-----------------------------------|
| Primer forward 63F | 59-CAC GCC TAA CAC ATG CAA GTC-39 |
| Primer reverse 1387R | 59-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-39 |

Las muestras fueron introducidas en tubos eppendorf de 0.2 y se le añadió una mezcla con los siguientes componentes (Cuadro 6):

Cuadro 6. Componentes para la amplificación por PCR

| Componentes | Volumen |
|--------------------|----------------|
| DNA molde | 2 μ l |
| Buffer 10x | 5 μ l |
| Buffer 5x GC | 10 μ l |
| dNTP'S | 4 μ l |
| Oligo 63 F | 4 μ l |
| Oligo 1387R | 4 μ l |
| H ₂ O | 20 μ l |
| HF | 1 μ l |
| Total | 50 μ l |

Posteriormente se dispusieron en el termociclador y las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

- Desnaturalización del DNA a copiar (molde): con una duración de 4 minutos a una temperatura de 94 °C.
- Alineamiento del DNA molde: 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto con 30 segundos a 72 °C.
- Elongación: 7 minutos con una temperatura de 72 °C.

La muestra procesada por la PCR se comprobó su amplificación en un soporte sólido de agarosa en una cámara de electroforesis.

Purificación y cuantificación

Se purificó el fragmento de PCR mediante el método de purificación de DNA de fragmentos de PCR de GE Healthcare. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro. Una vez purificado el DNA la secuenciación se procesó a través de Secugen.

Análisis de secuenciación

El análisis se desarrolló a partir de la secuencia obtenida, se utilizó el software SnapGene Viewer 2.3.2 para obtener los ácidos nucleicos de la cadena forward y reverse. Después se efectuó el alineamiento con el programa Clustalw2, donde se obtuvo la secuencia completa de nucleótidos. Posteriormente se comparó la secuencia obtenida con el programa Blast.

V. RESULTADOS

5.1 Caracterización física y química del sedimento

5.1.1 Análisis físicos de los sedimentos contaminados

De acuerdo a los análisis físicos realizados a los sedimentos sus tres principales componentes fueron arena con el 10%, limo 45.8% y arcilla 44.1% (Figura 2), como resultado se obtuvo una fracción arcillo limosa de acuerdo a la clasificación agronómica del triángulo de texturas. La densidad real que presentó fue de 2.48 t/m³ que es normal y con una conductividad eléctrica clasificada como fuertemente salino (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados del análisis físicos de los sedimentos

| Parámetro | Valores de referencia (NOM-021-RECNAT-2000) | Resultado |
|-------------------------|--|-----------------------|
| Conductividad eléctrica | >16.0 muy fuertemente salino | 27.10 dS/m |
| Densidad real | 2.4–2.7 densidad normal | 2.48 t/m ³ |
| Arena | 10% | |
| Limo | 45.8% | |
| Arcilla | 44.2% | |

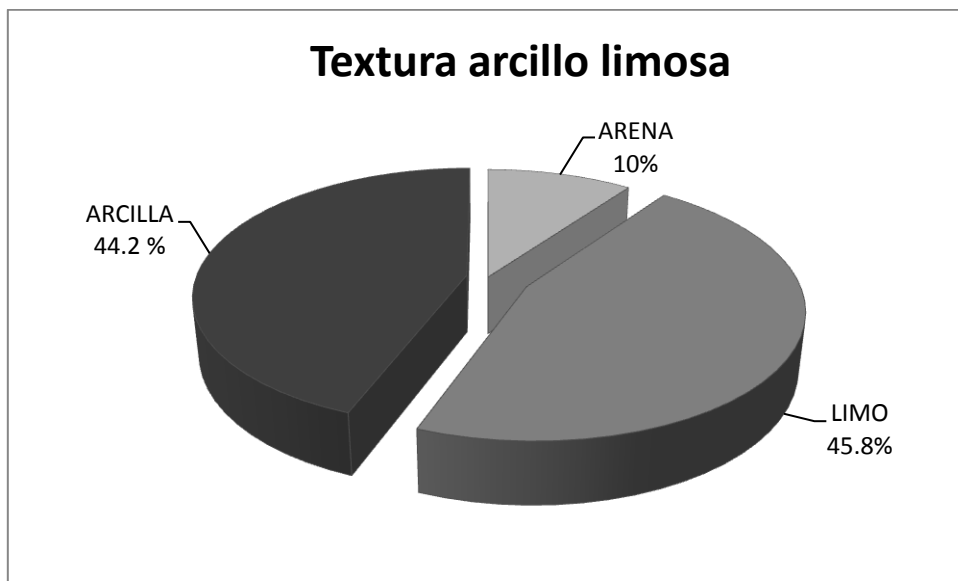


Figura 2. Proporción de arena, limo y arcilla del sedimento contaminado.

5.1.2 Análisis químicos de los sedimentos contaminados

Los resultados de los análisis químicos del sedimento, mostraron que el pH fue de 8.4 lo que indica que es medianamente alcalino según Moreno (1978). Por otro lado, la materia orgánica registró un valor de 5.78 % lo que indica que el sedimento es muy rico en materia orgánica, en cuanto a los carbonatos totales el resultado fue de 9.06 % que indica que el valor es medio. En la determinación de minerales el nitrógeno inorgánico fue bajo con un 3.4 mg/kg, mientras fósforo, potasio y manganeso se presentaron con valores altos, sin embargo para calcio y magnesio estos se caracterizaron por presentar valores medios, para la capacidad de intercambio catiónico se registró un 44.0 kg lo que indicó un valor muy alto (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resultados del análisis químico del sedimento

| Parámetro | Valores de referencia (NOM-021-RECNAT-2000) | Resultados |
|---------------------------------------|--|-------------------|
| pH | 7.4-8.5 medianamente alcalino | 8.4 |
| Materia orgánica | >3.6-6.0 alto | 5.78% |
| Nitrógeno inorgánico | 0-10 muy bajo | 3.4 mg/kg |
| Potasio | >0.6 alta | 1.720 mg/kg |
| Fósforo | >11 alto | 13.22 mg/kg |
| Calcio | 5–10 media | 9.453 mg/kg |
| Magnesio | 1.3–3.0 media | 1.345 mg/kg |
| Manganeso | >10 alto | 16.59 mg/kg |
| Carbonatos totales | 2.1–15 mediano | 9.06% |
| Capacidad de intercambio catiónico | >40 muy alta | 44.0 kg |

5.2 Cepas bacterianas hidrocarburoclíticas axénicas

Derivado del proceso de aislamiento y purificación se obtuvieron las cepas bacterianas axénicas, que se muestran en las figuras 3 y 4.

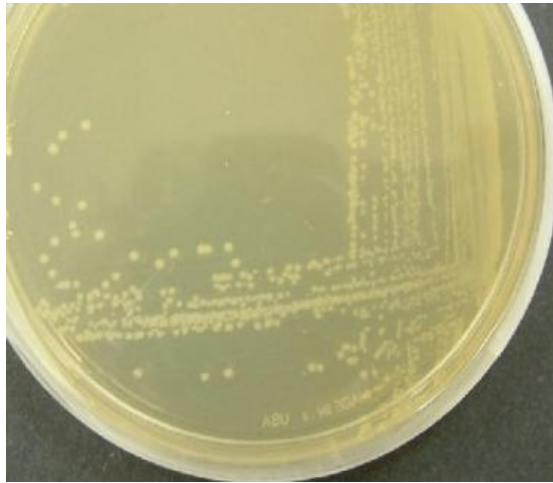


Figura 3. Morfología macroscópica: colonias mucoides pequeñas y con una coloración beige claro.



Figura 4. Morfología microscópica: formas bacilares Gram negativo.

5.2.1 Selección de bacterias degradadoras de hidrocarburos

Al término de la prueba cualitativa de degradación durante un periodo de 24 a 72 horas de 10 cepas solo la cepa 8 fue elegida como la más eficiente. En la figura 5 se muestra como la cepa 8 a las 24 horas de incubación tenía un porcentaje de degradación del 25%, a las 48 horas presentaba una degradación de petróleo del 40% y para las 72 horas logró una degradación del 70%, mientras que el resto de las cepas presentaron degradaciones de 0 a 20% durante las 72 horas.

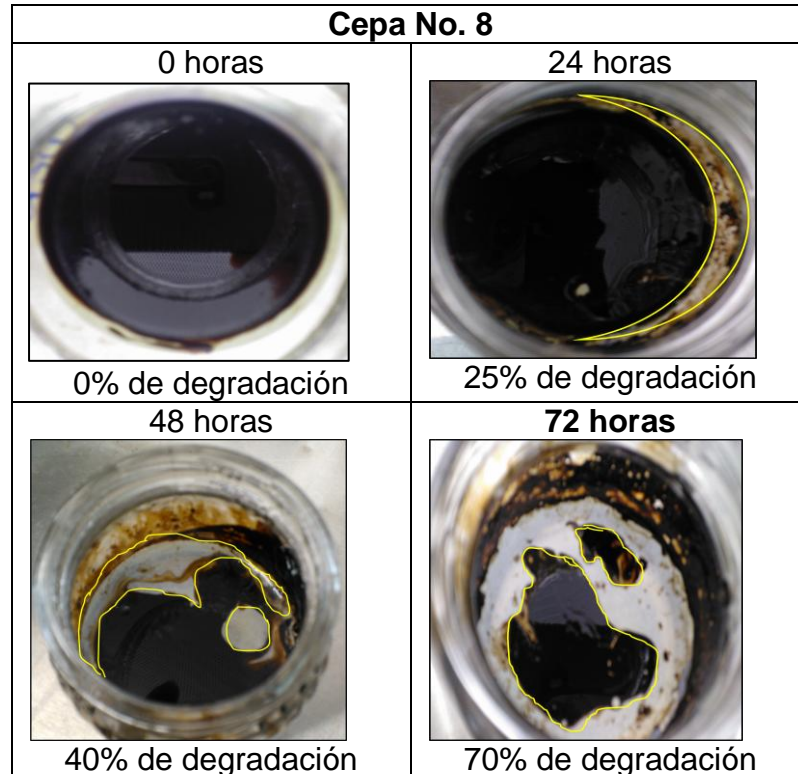


figura 5. Prueba cualitativa donde se muestra la degradación de los hidrocarburos a distintos tiempos postincubación.

5.3 Cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo (HTPs)

Para el tratamiento de biorremediación sin bacterias, el contenido total de HTP al inicio del proceso fue de 104,000 mg/kg. Posteriormente en el día 30 se presentó un contenido de 101,220 mg/kg lo que es igual a un 2.78% de degradación. A continuación para el día 60 el contenido llegó a 99,120 mg/kg con lo cual alcanzó un 4.88%. Al finalizar el experimento de biorremediación, es decir a los 90 días se obtuvo un contenido final de 97,560 mg/kg que corresponde a un 6.44% menos del contenido de HTP en el sedimento (Cuadro 9).

Cuadro 9. Contenido de HTP (mg/kg) al inicio 30, 60 y 90 días del proceso de biorremediación sin bacterias

| TRATAMIENTO SIN BACTERIAS | | |
|--|--------------------|----------------------------------|
| Días del proceso de biorremediación | HTP (mg/kg) | Porcentaje de degradación |
| Día 0 | 104,000 | 0% |
| Día 30 | 101,220 | 2.78% |
| Día 60 | 99,120 | 4.88% |
| Día 90 | 97,560 | 6.44% |

Para el tratamiento de biorremediación con bacterias, el proceso comenzó con un valor de 104,000 mg/kg de HTP. A los 30 días se obtuvo una reducción a 96,730 mg/kg lo que representa un 7% de degradación. Posteriormente a los 60 se tenía un contenido de hidrocarburos de 73,690 mg/kg, lo que representa un porcentaje de degradación del 30.31%. Al término de este proceso de biorremediación, es decir a los 90 días, se mostró un contenido final de 35,640 mg/kg logrando así un

porcentaje final de degradación del 68.36% para el tratamiento con bacterias (Cuadro 10).

Cuadro 10. Contenido de HTP (mg/kg) al inicio 30, 60 y 90 días del proceso de biorremediación con bacterias

| TRATAMIENTO CON BACTERIAS | | |
|--|--------------------|----------------------------------|
| Días del proceso de biorremediación | HTP (mg/kg) | Porcentaje de degradación |
| Día 0 | 104,000 | 0% |
| Día 30 | 96,730 | 7.27% |
| Día 60 | 73,690 | 30.31% |
| Día 90 | 35,640 | 68.36% |

En el cuadro 11, puede observarse los resultados de los análisis estadístico, de acuerdo con el mismo, se obtuvo que a los 30 días se registró un valor promedio de 101222.5 mg/kg para el tratamiento sin bacterias y para el tratamiento con bacterias fue un valor promedio de 96732.5 mg/kg, en cuanto al resultado del valor de $t=26.1806$ y el valor de significancia fue $p=2.04873 \times 10^{-7}$, lo que expresa que se encontraron diferencias estadísticamente significativas para este período. De acuerdo al estadístico realizado para el día 60 se presentó un valor promedio para el tratamiento sin bacterias de 99122.5 mg/kg y para el tratamiento con bacterias se registró un valor de 73690 mg/kg, de acuerdo con estos resultados se generó un valor promedio de $t=463.8488$ y un valor de significancia $p=6.77662 \times 10^{-15}$, es decir, encontrándose diferencias estadísticamente significativas. Para los

estadísticos del día 90 se registró un valor promedio de 97565 mg/kg para el tratamiento sin bacterias, en cambio para el tratamiento con bacterias se encontró un valor promedio de 35645 mg/kg, de la prueba t realizada se obtuvo un valor de $t=1626.0988$ y encontrando un valor de $p=3.65106 \times 10^{-18}$, lo que nos indica que se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En la figura 6 se observan las diferencias significativas que se presentaron entre los tratamientos.

Cuadro 11. Resultados de las pruebas estadísticas, t student

| Días | Valor promedio | | Valor de t | Valor de P (<0.05) |
|------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------|---------------------------|
| | Tratamiento sin Bacterias (mg/kg) | Tratamiento con bacterias (mg/kg) | | |
| 30 | 101222.5 | 96732.5 | 26.1806 | 2.04873×10^{-7} |
| 60 | 99122.5 | 73690 | 463.8488 | 6.77662×10^{-15} |
| 90 | 97565 | 35645 | 1626.0988 | 3.65106×10^{-18} |

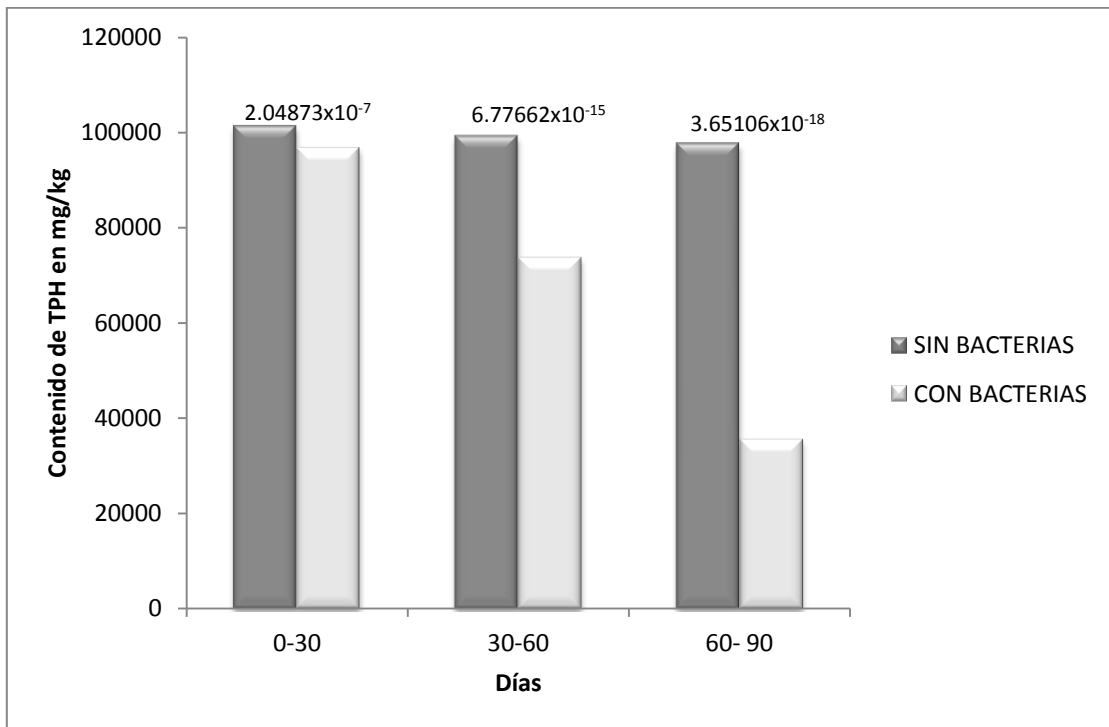


Figura 6. Valores promedio de contenido de TPH mg/kg a los 30, 60 y 90 días del tratamiento.

5.3.1 Potencial de hidrógeno

Por otra parte, los datos obtenidos del potencial de hidrógeno monitoreado durante el experimento variaron entre los dos tratamientos, para el tratamiento sin bacterias se inició con un pH neutro de 7.1, mientras que para el tratamiento con bacterias fue medianamente alcalino, con un valor de 7.5; a los 45 días del experimento para el tratamiento sin bacterias se registró un pH neutro de 6.8 y para el tratamiento con bacterias fue medianamente alcalino con un 7.8; al final del periodo experimental a los 90 días en el tratamiento sin bacterias mostro un pH moderadamente ácido con un valor de 6.5 y para el tratamiento con bacterias fue

medianamente alcalino, con un 7.4 para el potencial de hidrógeno. De acuerdo a los datos registrados, el valor promedio para el tratamiento sin bacterias fue neutro con un valor de 7.1; mientras que para el tratamiento con bacterias fue medianamente alcalino con un pH de 7.5 (Figura 7).

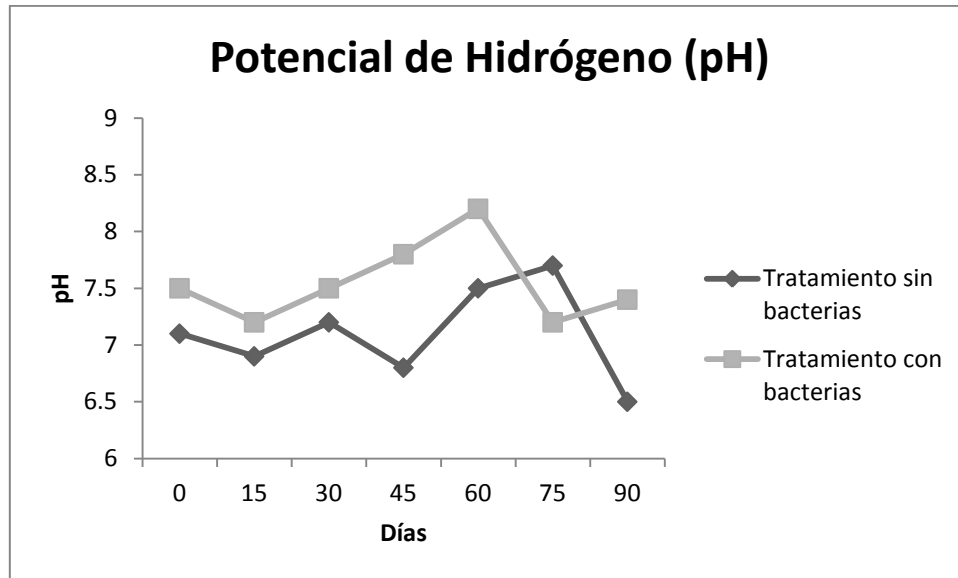


Figura 7. Valores de Potencial de Hidrógeno durante el proceso de biorremediación.

5.3.2 Temperatura

Para los resultados obtenidos de la medición de temperatura durante el proceso de biorremediación, la temperatura que se registró al inicio para el tratamiento sin bacterias fue de 26.5 °C y para el tratamiento con bacterias fue de 28 °C, alrededor de los 45 días la temperatura para el tratamiento sin bacterias osciló entre los 27.5 °C y el tratamiento con bacterias obtuvo un valor de 27.2 °C, para el final del experimento el valor de la temperatura en el tratamiento sin bacterias fue

de 27 °C y para el tratamiento con bacterias la temperatura presentó un aumento registrándose 27.5 °C, estos rangos en la temperatura siempre se mantuvieron durante el experimento, se obtuvo un valor promedio de 26.9 °C para el tratamiento sin bacterias y para el tratamiento con bacterias el valor promedio fue de 27.7 °C (Figura 8).

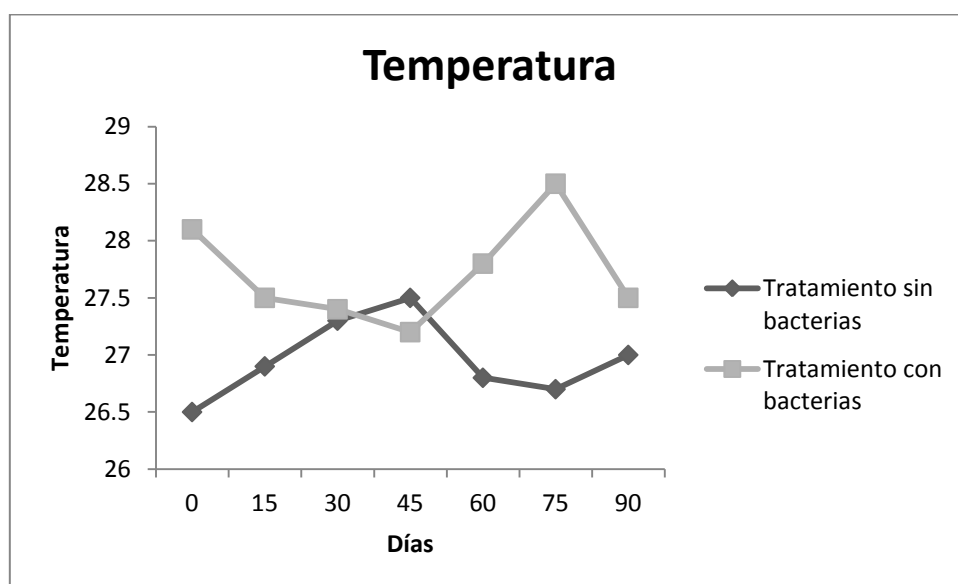


Figura 8. Valores de temperatura durante el proceso de biorremediación.

5.4 Identificación taxonómica

5.4.1 Sistema API 20 NE

Las pruebas bioquímicas se aplicaron a la cepa aislada y purificada del sedimento de la laguna de Tamiahua y que fue utilizada en el proceso de biorremediación. Los resultados de las galerías del API 20 NE fueron que Nitrato potásico, D-glucosa, L-arabinosa, D-manosa, N-acetil-glucosamina, D-maltosa, Gluconato

potásico, Ácido cáprico, Ácido málico y Citocromo oxidasa presentaron una reacción positiva, mientras que los substratos L-triptófano, D-glucosa, L-arginina, Urea, Esculina citrato férrico, Gelatina, 4-nitrofenil-D-galactopiranosida, D-manitol, Ácido adípico, Citrato trisódico y Ácido fenilacético los cuales dieron un resultado negativo al test (Cuadro 12).

Cuadro 12. Resultados de la galería API 20 NE

| TEST | SUBSTRATOS | RESULTADOS |
|-----------------|-----------------------------------|-------------------|
| NO ₃ | Nitrato potásico | Positivo |
| TRP | L- triptófano | Negativo |
| GLU | D- glucosa | Negativo |
| ADH | L-arginina | Negativo |
| URE | Urea | Negativo |
| ESC | Esculina citrato férrico | Negativo |
| GEL | Gelatina (origen bovino) | Negativo |
| PNG | 4-nitrofenil- D-galactopiranosida | Negativo |
| GLU | D- glucosa | Positivo |
| ARA | L-arabinosa | Positivo |
| MNE | D-manosa | Positivo |
| MAN | D- manitol | Negativo |
| NAG | N-acetil-glucosamina | Positivo |
| MAL | D-maltosa | Positivo |
| GNT | Gluconato potásico | Positivo |
| CAP | Ácido cáprico | Positivo |
| ADI | Ácido adípico | Negativo |
| MLT | Ácido málico | Positivo |
| CIT | Citrato trisódico | Negativo |
| PAC | Ácido fenilacético | Negativo |
| OX | Citocromo oxidasa | Positivo |

Se realizaron las pruebas de oxidasa y catalasa, las cuales ambas resultaron positivas.

De los datos obtenidos de las pruebas bioquímicas se realizó el análisis en APIWEB, como resultado se obtuvo que el microorganismo pertenece a:

Reino: Bacteria

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rhizobiales

Familia: Brucellaceae

Género: *Ochrobactrum*

Especie: *anthropi*

Con una coincidencia de un 99.8%.

5.4.2 Análisis de ARNr 16s

Como resultado de la amplificación de la secuencia de ARNr 16s mediante PCR utilizando iniciadores universales, se obtuvo una banda de aproximadamente de 500 pb correspondiente a una región del RNA 16s (Figura 9).

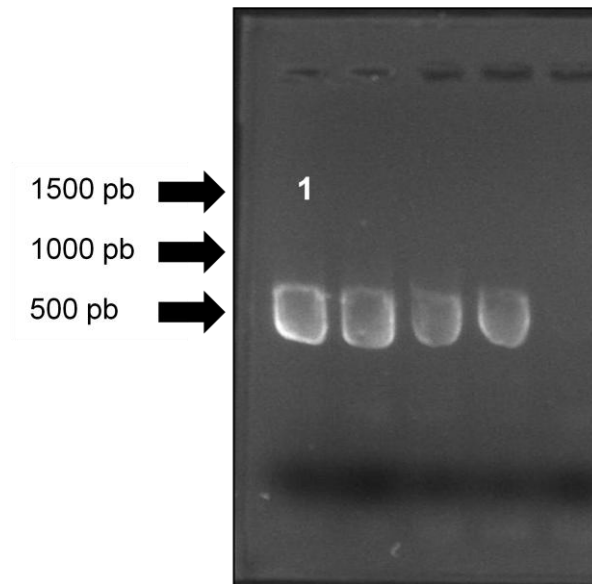


Figura 9. Amplificación gen ARNr 16s mediante PCR.

Como resultado de la secuenciación se obtuvo un electroferograma correspondiente a la secuencia parcial reverse del gen ARNr 16s, se obtuvieron 546 pares de bases, de acuerdo con el recuento estas bases pertenecieron a: 112 adenina (A), 141 citosina (C), 144 guaninas (G) y 149 timina (T) (Figura 9).

Los resultados obtenidos tras los alineamientos de BLAST con las secuencias del gen 16s ARNr albergadas en la base de datos del Genbank con código de acceso AB778289, indica que la cepa corresponde a:

Reino: Bacteria

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rhizobiales

Familia: Brucellaceae

Género: *Ochrobactrum*

Especie: *anthropi*

De acuerdo con esto se obtuvieron 547 nucleótidos de la cepa y un porcentaje de identificación del 97.1 %.

VI. DISCUSIÓN

En el presente estudio se utilizaron bacterias autóctonas como alternativa de biorremediación, el análisis físico de los sedimentos del área de estudio, mostró como resultado una clase textural arcillo limosa. De acuerdo a trabajos previos se considera que la clase textural es una propiedad muy importante, ya que la relación área/volumen de los diferentes tipos de partícula, tienen un impacto directo sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo e inclusive sobre las tecnologías de remediación (Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2002). Al igual que Beolchini *et al.*, (2010) en su trabajo de biorremediación en microcosmos señalan que el sedimento tuvo una clase textural arcillo limosa, lo cual se asemeja al reportado en el presente trabajo y que obtuvo resultados óptimos en el proceso de biorremediación. Por otra parte San Martín *et al.*, (2012) obtienen un clase textural franco limoso en su estudio en la laguna de Tamiahua, obteniendo resultados favorables de degradación. De acuerdo con lo antes citado se ha demostrado que los sedimentos que muestran texturas de arcilla y limo, presentan resultados favorables en la degradación, esto podría deberse a que estas fracciones tienen capacidades de retención de agua por largos períodos, lo que proporciona a las bacterias una humedad adecuada para el desarrollo de su metabolismo.

En este trabajo durante el proceso de biorremediación el sedimento presentó un pH ligeramente alcalino con valores de 7.1 a 7.5, de acuerdo a la bibliografía, el pH es un factor importante que interviene en la biodegradación de los

hidrocarburos, un pH próximo a la neutralidad de 6 a 9 es un rango favorable para el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos (Boopathy *et al.*, 2012). Trabajos como el de Bayer *et al.*, (2013) que durante su experimento de biorremediación en sedimentos registraron un pH que osciló entre 6.9 a 8.4, el cual se acerca al obtenido en la presente investigación, se considera que este valor de pH influyó en la eliminación del contaminante. Autores como Lladó *et al.*, (2012) obtuvieron en un proceso de biorremediación de un suelo un pH de 7.5, el cual se encuentra dentro del rango recomendado, al igual que en el presente trabajo se registraron valores de 7.1 a 7.5 logrando una degradación de hidrocarburos de más del 50%, esto podría corresponder a que el pH se mantuvo dentro de los valores indicados, lo que benefició el crecimiento y desarrollo de las bacterias.

Con respecto a la temperatura en los sedimentos para la presente investigación se registró una temperatura entre los 26 y 28 °C. Algunos autores señalan que la temperatura es un factor importante en la actividad degradativa, considerando que la temperatura debe permanecer entre los 18 y 30 °C para garantizar así la actividad metabólica de las bacterias (Fantroussi y Agathos, 2005). Tal es el caso de Colla *et al.*, (2014) quienes evaluaron las técnicas de biorremediación manteniendo una temperatura controlada en 28 °C, esto es similar a la presentada en este trabajo de biorremediación, teniendo resultados positivos en el proceso. El estudio realizado por Bayer *et al.*, (2013) registró una temperatura de 25.1 a 28.7 °C, de acuerdo a lo antes citado estos valores se encuentran dentro del rango

sugerido. En la presente investigación se controló la temperatura manteniéndola dentro de los niveles recomendados, obteniendo un proceso de biorremediación exitoso, por lo que se considera que la temperatura es un factor importante en la actividad degradativa, ya que cada microorganismo tiene un rango de temperatura que garantiza su actividad metabólica y por consiguiente las tecnologías de biorremediación.

La materia orgánica registrada para este estudio fue un valor de 5.78% lo que se considera muy rica en humus, estos valores se relacionan con la presencia del contaminante (petróleo) influyendo en el aumento del contenido de materia orgánica (Barrios-San Martín, 2011). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Beolchini *et al.*, (2010) que reportan un alto contenido húmico y altas concentraciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, con respecto a lo citado en el actual trabajo de investigación se reportó un porcentaje alto de materia orgánica, condición que podría deberse a que corresponde a sedimentos de laguna costera que presentan un grado de contaminación alto influyendo directamente en la concentración de materia orgánica.

Para este trabajo los sedimentos presentaron una concentración de nitrógeno baja y de potasio-fósforo alta, se considera que un alto contenido de nutrientes inorgánicos como es NPK incrementan las poblaciones microbianas y la tasa de biodegradación del contaminante (Barrios-San Martín, 2011). De acuerdo con los resultados obtenidos por Qiao *et al.*, (2014) que mediante la adición de sustancias nutritivas registraron un alto contenido de nutrientes inorgánicos y por lo tanto

porcentajes de degradación positivos, de acuerdo a lo anterior en el presente trabajo se adicionaron nutrientes para estimular a las bacterias, consiguiendo porcentajes altos de remoción, demostrando que la presencia de nitrógeno, potasio y fósforo en sedimentos pueden mejorar el proceso de degradación del contaminante.

En este trabajo, el aislamiento bacteriano se efectuó a partir de sedimento contaminado, la técnica se realizó en medio Bushnell Hass, debido a la efectividad que presenta en el aislamiento de bacterias hidrocarbonoclastas (Fletcher, 2000). Trabajos como el de Osterreicher *et al.*, (2004), utilizaron medio mineral para el aislamiento bacteriano, obteniendo resultados favorables; sin embargo otros autores como Chagas *et al.*, (2012) y San Martín *et al.*, (2012) aislaron bacterias de un sitio contaminado por petróleo mediante el medio Bushnell Hass, demostrando que este medio es muy eficiente durante la etapa de aislamiento, por lo que en el presente trabajo se utilizó el medio Bushnell Hass para el proceso de aislamiento, el empleo de este medio garantizó el uso únicamente de bacterias con capacidad de degradación de petróleo durante el proceso de biorremediación.

Para el presente estudio el cultivo, purificación y aumentación bacteriana se hicieron en los medios nutritivos de caldo y agar de soya tripticaseína, Fletcher (2000) menciona que mediante la utilización de estos medios nutritivos se obtiene un mayor crecimiento de bacterias tanto aerobias como anaerobias. En el caso de San Martín *et al.*, (2012) utilizó los mismos medios nutritivos, generando cultivos puros. En el presente trabajo de investigación se emplearon los medios nutritivos

de caldo y agar de soya tripticaseína, obteniendo cultivos puros y biomasa bacteriana, la eficiencia presentada en estos procesos se atribuye a que estos medios son reconocidos y han demostrado en trabajos previos tener la capacidad de incrementar el crecimiento bacteriano y ser los adecuados en los procesos de bioaumentación, debido a que es un medio enriquecedor.

En el proceso de biorremediación desarrollado se emplearon bacterias autóctonas extraídas del sedimento contaminado, de acuerdo a estudios previos se considera que la población microbiana son un factor determinante en el proceso de degradación, ya que estas deben estar adaptadas al compuesto contaminante y poseer la capacidad para degradar petróleo (Viñas *et al.*, 2005). De acuerdo con Nikolopoulou *et al.*, (2013a), San Martín *et al.*, (2012) y Osterreicher *et al.*, (2004) quienes durante el proceso de biorremediación que efectuaron utilizaron bacterias autóctonas o nativas de los sitios contaminados respectivamente, estos resultados coinciden con los logrados en el presente trabajo, donde se aislaron bacterias autóctonas a partir de un sitio contaminado, obteniendo resultados favorables de degradación, con respecto a lo citado anteriormente esto podría deberse por la adaptación que tienen los microorganismos a su hábitat presentando una mejor facilidad para degradar los compuestos tóxicos.

Las bacterias bioaumentadas e inoculadas durante el proceso de biorremediación presentan un solo morfotipo, bacilos Gram negativos, los cuales coinciden con los reportados por San Martín *et al.*, (2012) quienes para el trabajo de biorremediación utilizaron bacterias Gram negativas obtenidas de la Laguna de Tamiahua,

mostrando porcentajes de degradación altos. En el presente trabajo se lograron remover los hidrocarburos utilizando bacilos Gram negativos, por lo que se considera que los morfotipos encontrados en la laguna se encuentran mejor adaptados al contaminante y por lo tanto presentan capacidades altas para biodegradar los agentes contaminantes.

Para la identificación bacteriana la cepa fue identificada mediante la prueba bioquímica API 20 NE, además de pruebas moleculares secuenciando el gen ARNr 16s, de acuerdo a esto se obtuvo la especie *Ochrobactrum anthropi*, algunos autores señalan que dado que las bacterias presentan una amplia diversidad fenotípica y genotípica, es necesario realizar la identificación no solo bioquímica y fisiológica sino que también molecular basada en el análisis del ARNr 16s (Colla *et al.*, 2014). Con respecto, Lira – Rodríguez, (2014) identificó bacterias hidrocarburoclíticas a partir de pruebas bioquímicas y moleculares, señalando que permite una identificación más precisa y acertada. Por lo antes mencionado en el presente trabajo se aplicaron pruebas bioquímicas y moleculares, determinando a nivel de género y especie la bacteria, el empleo de estas técnicas permitieron una identificación más completa, considerándolas importantes y complementarias para realizar una adecuada identificación.

Es importante señalar que la especie *Ochrobactrum anthropi* fue identificada como especie hidrocarburoclítica para el presente trabajo de investigación, de acuerdo con la bibliografía este grupo de microorganismos se han caracterizado por ser tolerantes al petróleo, desarrollar y utilizar diferentes respuestas enzimáticas para

crecer en presencia del contaminante y realizar la degradación (Acosta *et al.*, 2011; Atlas *et al.*, 1991). En contraste con el presente trabajo González – Hernández, (2014) menciona que las especies *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter* y *Bacillus pumillus*, presentaron capacidades de degradar petróleo, por otra parte Lira – Rodríguez, (2014) señala que *Listeria fleischmanni*, *Bacillus coagulans* y *Ochrobactrum intermedium*, también tienen capacidades de biodegradar compuestos contaminantes. A diferencia de lo antes mencionado Pucci *et al.*, (2010) coinciden con el presente trabajo, al identificar la especie *Ochrobactrum anthropi* y demuestran la capacidad de esta especie para degradar distintos compuestos como gasolina, petróleo, kerosene y aceite diesel, con respecto a lo antes citado, en el presente estudio la especie *Ochrobactrum anthropi* presentó capacidad para degradar hidrocarburos, además de realizarle pruebas degradativas fue utilizada en el proceso de biorremediación, debido a estos atributos, esta especie puede ser considerada como una bacteria con capacidades de degradar compuestos derivados del petróleo, debido a que en el presente estudio esta especie logró remover los hidrocarburos en más de un 50%.

Durante el proceso de biorremediación llevado a cabo se aplicó la técnica de bioventeo a los sedimentos contaminados durante 90 días logrando una degradación del 68.36%, autores señalan que la técnica de bioventeo provee el oxígeno necesario para sostener la actividad de los microorganismos degradadores (Sardrood *et al.*, 2013). De acuerdo a García *et al.*, (2010) utilizando la técnica de bioventeo alcanzaron una tasa de reducción del contaminante del

93%, mientras Vieira *et al.*, (2009) que mediante esta técnica obtuvieron una degradación del 75.9%. Con relación a lo antes citado se considera que el bioventeo es una técnica innovadora donde los microorganismos son estimulados mediante la inyección de aire, propiciando una mejor degradación de contaminantes, esto se podría relacionar a la estimulación que se le da a las bacterias, induciendo al crecimiento microbiano y acelerando la actividad metabólica, mejorando el proceso de degradación.

Se destaca que en este proceso de biorremediación además de la técnica de bioventeo se adicionaron las técnicas de bioaumentación y bioestimulación, mejorando los resultados de degradación, de acuerdo a la bibliografía, la técnica de bioaumentación proporciona microorganismos y la bioestimulación los estimula para mejorar el proceso de biodegradación (Mahanty *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2011). Autores como Colla *et al.*, (2014) emplearon la bioaumentación y bioestimulación obteniendo una degradación del 35.7%, que representa niveles bajos de remoción, por otra parte Muskus *et al.*, (2013) combino las técnicas de bioventeo y bioestimulación teniendo porcentaje de hasta el 97% de degradación. En la presente investigación se combinaron las tres técnicas, bioaumentación, bioestimulación y bioventeo, alcanzando un alto porcentaje de degradación, se considera que mediante estas técnicas se aportan los microorganismos y nutrientes adecuados, además del oxígeno necesario para llevar un buen proceso de biorremediación.

En este estudio se registró un contenido inicial de hidrocarburos de 104,000 mg/kg, sobrepasando los límites permitidos en la Norma Oficial Mexicana, sin embargo los resultados generados en el proceso de biorremediación fueron de un contenido final de 35,640 mg/kg, con respecto a la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos de acuerdo con los lineamientos el límite máximo permisible es de 3,000 mg/kg. En el presente estudio no se logró degradar todos los hidrocarburos, sin embargo se consiguió disminuir el contenido de hidrocarburos en un 68.36% mediante la aplicación de la tecnología de remediación, la efectividad de este proceso se atribuye a la utilización de bacterias en el proceso de biorremediación como técnica para descontaminar los sedimentos de estudio.

En el presente trabajo se emplearon bacterias autóctonas de la Laguna de Tamiahua, teniendo grandes resultados en el proceso de biorremediación; estudios previos señalan que utilización de sistemas biológicos, como son las bacterias, han generado resultados favorables en procesos de remediación (Volke–Sepúlveda y Velasco–Trejo, 2003). Estudios realizados por San Martín *et al.*, (2012), Chagas *et al.*, (2012) y Osterreicher *et al.*, (2004), obtuvieron excelentes resultados al utilizar bacterias en sus proceso de biorremediación, demostrando resultados de más del 50% de degradación. Para el proceso de biorremediación aplicado en este trabajo se consiguió un porcentaje de degradación del 68.36% mediante la aplicación de bacterias, debido a esto, el

resultado es considerado exitoso mediante la técnica de biorremediación, de acuerdo a lo citado por los autores antes mencionados.

VII. CONCLUSIONES Y APLICACIÓN PRÁCTICA DEL TRABAJO

7.1 Conclusiones

- Los parámetros físicos obtenidos mostraron una clase textura arcillo limosa y una densidad real de 2.48 t/m^3 . Los resultados de los análisis químicos se obtuvo un pH medianamente alcalino con 8.4, materia orgánica de 5.78% y una concentración de nitrógeno del 3.4 mg/kg estos parámetros influyeron en la efectividad del proceso de biorremediación.
- Se obtuvieron cepas hidrocarburofíticas axénicas a partir del sedimento contaminado.
- El tratamiento con bacterias al finalizar el proceso de biorremediación, mostró una degradación de 68.36%.
- Se determinó taxonómicamente la bacteria *Ochrobactrum anthropi* mediante pruebas bioquímicas.
- La identificación bioquímica se complementó mediante la secuenciación y análisis de ARNr 16s permitiendo la identificación de la cepa bacteriana coincidiendo con la especie *Ochrobactrum anthropi*.
- Finalmente en el presente trabajo de investigación el proceso de biorremediación fue considerado exitoso, siendo una alternativa eficiente, fácil de aplicar y con un costo menor con respecto a otras tecnologías para la recuperación de sitios contaminados por hidrocarburos.

7.2 Aplicación práctica del trabajo

En este proyecto se efectuó una biorremediación a nivel de laboratorio a sedimentos provenientes de un sistema lagunar que fueron afectados por hidrocarburos, de acuerdo al éxito en los resultados obtenidos se considera que las técnicas aplicadas podrían ser utilizadas como acción remediadora para reducir la presencia de contaminantes en la laguna.

De acuerdo con lo anterior se aplicaría:

- Biorremediación *in situ* de los sedimentos contaminados.

La biorremediación a aplicar se llevaría en dos fases, como a continuación se describe:

Fase de laboratorio:

Consistiría en toda la metodología aplicada en el presente trabajo y el empleo de la bacteria obtenida e identificada como *Ochrobactrum anthropi*.

Fase de campo:

Esta etapa comprendería la instalación del sistema de bioventilación mediante el cual se estimulará la actividad metabólica por medio de la inyección de aire a través de pozos de ventilación. Estos pozos se instalarán en varios puntos del área contaminada y a través de ellos se inyectará la cepa bacteriana bioaumentada para acelerar el proceso de biorremediación, estas bacterias serán bioestimuladas mediante una solución de nutrientes que favorecerá el crecimiento

y desarrollo de estas bacterias, la bioestimulación se llevará de forma permanente durante todo el proceso de biorremediación.

Se realizarán análisis constantes (quincenales) de agua y sedimento para evaluar el contenido de nutrientes presentes, por otra parte se monitoreará la concentración de hidrocarburos en sedimentos y su porcentaje de degradación por medio de cromatografía de gases.

En el cuadro 13 se establecen algunas de las ventajas y desventajas que se podrían presentar al llevar a cabo este proceso al sitio.

Cuadro 13. Ventajas y desventajas de realizar el proceso de biorremediación *in situ*

| Ventajas | Desventajas |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Utilizar bacterias autóctonas del sitio, mejora la degradación.• La aplicación de estas técnicas estimula el metabolismo microbiano.• Son técnicas de bajo costo con respecto a otras técnicas. | <ul style="list-style-type: none">• La baja disponibilidad de nutrientes.• Limitación en la transferencia de oxígeno.• Bajas temperaturas provocando aletargamiento en las bacterias.• Un pH inadecuado.• Es un proceso de mediano a largo plazo. |

7.3 Recomendaciones

- Es necesario desarrollar un aislamiento únicamente de bacterias hidrocarbonoclastas, para asegurar la degradación de los contaminantes derivados del petróleo.
- Es fundamental realizar la identificación mediante pruebas bioquímicas y complementarlas con pruebas moleculares, para obtener mayor exactitud en los resultados.
- Es esencial hacer un análisis físico y químico del sedimento o suelo previo al proceso de biorremediación y durante el proceso para determinar la presencia o ausencia de los nutrientes.
- Se sugiere que durante un proceso óptimo de biorremediación se debe tener en cuenta los siguientes factores: temperatura, pH, la disponibilidad de nutrientes y oxígeno, ya que la presencia o ausencia de algunos de estos parámetros influirá directamente en la eficiencia del proceso.
- Se señala la importancia de realizar análisis periódicos que determinen la degradación de los contaminantes.
- Se recomienda la aplicación de las técnicas de bioestimulación, bioaumentación y bioventeo como alternativas en los procesos de biorremediación.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abalos, A., Viñas, M., Sabaté, J., Manresa, M. A. y Solanas, A. M. 2004. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10, *Biodegradation*, 15, 249-260.
- Acosta, I., Moctezuma, M., Tovar, J. y Cárdenas, J. 2011. Aislamiento e identificación de bacterias y levaduras resistentes a petróleo, *información tecnológica*, 22 (6): 103-110.
- Acuña, A., Pucci, G., Morales, M. y Pucci, O. 2010. Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina, *Revista de la sociedad Venezolana de microbiología*, 30, 29-36.
- Ang, L. Zhao, H. y Obbard, P. 2005. Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering, *Enzyme and microbial technology*, 37, 487-496.
- Antizar, B., Spanova, K., Beck, A. y Russell, N. 2008. Microbial community structure changes during bioremediation of PAHs in an aged coal-tar contaminated soil by in- vessel composting, *International biodeterioration and biodegradation*, 61, 357-364.

- ASTM D5369-93. 2003. Standard practice for extraction of solid waste samples for chemical analysis using Soxhlet extraction, Environmental assessment, Book of Standards, 11 (4).
- Araujo, I., Montilla, M., Cárdenas, C., Herrera, L., Angulo, N. y Morillo, G. 2006. Lodos estabilizados y cepas bacterianas en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, *Interciencia*, 31 (4): 268-275.
- Atagana, H. I. 2006. Biodegradation of polyacyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil by biostimulation and bioaugmentation in the presence of copper (II) ions, *World journal of microbiology and biotechnology*, 22, 1145-1153.
- Atlas, R., Horowitz, A., Krichevsky y Bej, A. 1991. Response of microbial populations to environmental disturbance, 22, 249-256.
- Bamforth, S. y Singleton, I. 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions, *Journal of chemical technology and biotechnology*, 80, 723-736.
- Barrios - San Martín. 2011. Biorremediación: una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo, *Biología aplicada*, 28, 60-68.
- Bayer, D., Chagas, A., Gavazza, S., Florencio, L. y Kato, M. 2013. Natural attenuation and biosurfactant stimulated bioremediation of estuarine

sediments contaminated with diesel oil, *Applied biochemistry and biotechnology*, 171, 173-188.

Bedair, H. y H. T. Al-Saad 1992. Dissolved and particulate adsorbed hydrocarbons in water of shatt al Arab river, Iraq, *Water, air, soil pollution*, 61, 397-408.

Beltrán, O., Berrío, L., Agudelo, E. y Cardona, S. 2013. Tecnologías de tratamiento para la tierra fuller contaminada con aceite dieléctrico, *Revista EIA (Escuela de ingeniería de Antioquia)*, 10 (19): 33-48.

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

Benlahcen, K., Chaoui, A., Budzinski, H., Bellocq, J. y Garrigues, P. 1997. Distribution and source of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Mediterranean coastal sediment, *Marine pollution bulletin*, 34 (5): 298-305.

Bento, F., Camargo, F., Okeke, B. y Frankenberger, W. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, bioestimulation and bioaugmentation, *Bioresource technology*, 96, 1049-1055.

Beolchini, F., Rocchetti, L., Regoli, F. y Dell' Anno. 2010. Bioremediation of marine sediments contaminated by hydrocarbons: Experimental analysis and kinetic modeling, *Journal of hazardous materials*, 182, 403-407.

- Beskoski, V., Gojgic, G., Milic, J., Milic, M., Miletic, S., Solevic, T. y Vrvic, M. 2011. *Ex situ* bioremediation of a soil contaminated by mazut (heavy residual fuel oil) a field experiment, *Chemosphere*, 83, 34-40.
- Bidleman, T. F., A. A. Castleberry, W. T. Foreman, M. T. Zaransk y D. W. Wall 1990. Petroleum hydrocarbons in the surface water of two studies in the southeastern United States, *Coast shelf science* 30, 91-109.
- 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.
- Byun, I., Nam, H., Koo, S., Hwang, S., Lee, T. y Park T. 2005. Monitoring of bioventing process for diesel contaminated soil by dehydrogenase activity, microbial counts and the ratio of n- Alkane/ Isoprenoid, *Korean Journal Chemical engineering*, 22 (6): 917-921.
- Cárdenas, C., Araujo, I., Gómez, K., Bohórquez, Gómez, A., Angulo, N., Saules, L. y Morillo, G. 2010. Compostaje y fertilización en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, *Boletín del centro de investigaciones biológicas*, 44, 129-142.
- Chagas, A., Kato, M., De lima, E. y Gabazza, S. 2012. Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil, *Journal of environmental management*, 113, 510-516.

- Chapman, M., Ho, T., Munns, R., Solomon, K. y Weinstein, P. 2002. Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment, *Marine pollution bulletin*, 44, 271-278.
- Chikere, C., Okpokwasili, G. y Chikere, B. 2009. Bacterial diversity in a tropical crude oil-polluted soil undergoing bioremediation, *African journal of biotechnology*, 8 (11): 2535-2540.
- Chikere, C., Surridge, k., Okpokwasili, G. y Cloete, T. 2012. Dynamics of indigenous bacterial communities associated with crude oil degradation in soil microcosms during nutrient-enhanced bioremediation, *Waste management and research*, 30 (3): 225-236.
- Cohen, M. 2013. Water pollution from oil spills, *Environment*, 3, 121-126.
- Colla, T., Andrezza, R., Bucker, F., Moreira, M., Tramontini, L., Prado, G., Guedes, A., Oliveira, F. y Menezes, F. 2014. Bioremediation assessment of diesel-biodiesel contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy, *Environmental science and pollution research*, 21, 2592-2602.
- Couto, M., Monteiro, E., y Vasconcelos, M. 2010. Mesocosm trials of bioremediation of contaminated soil of a petroleum refinery: comparison of natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation, *Environmental science and pollution research*, 17, 1339-1346.

- Das, N. y Chandran, P. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An Overview, *Biotechnology research international*, 2011, 1-13.
- De Bartolomeo, A., Poletti, L., Sebastiani, B. y Morozzi, G. 2004. Relationship among parameters of lake polluted sediments evaluated by multivariate statistical analysis, *Chemosphere*, 55, 1323-1329.
- Domde, P., Kapley, A. y Purohit, H. 2007. Impact of bioaugmentation with a consortium of bacteria on the remediation of wastewater containing hydrocarbons, *Environmental science and pollution research*, 14 (1): 7-11.
- Eyvazi, M. y Zitner, R. 2009. A correlation to estimate the bioventing degradation rate constant, *Bioremediation journal*, 13 (3): 141-153.
- Fan, C., Qing, X. y Kwang, J. 2003. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD (P) H fluorescence, *Applied and environmental microbiology*, 69 (11): 6715-6722.
- 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, L., Rojas, N., Roldán, T., Ramírez, M., Zegarra, H., Hernández, R., Reyes, R., Flores, D. y Arce, J. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados, 89-101.

- Fletcher, R. 2000. Practical considerations during bioremediation, 39-55. *En: Remediation of hazardous waste contaminated soil*. University of Pittsburg. Pittsburg Pennsylvania.
- Gallego, J., García, M., Llamas, J., Belloch, C. y Sánchez, J. 2007. Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortia, *Biodegradation*, 18, 269-281.
- García, F., Escolano, O., García, S., Babín, M. y Fernández, M. 2010. Bioventing remediation and ecotoxicity evaluation of phenanthrene contaminated soil, *Journal of hazardous materials*, 183, 806-813.
- González – Hernández, 2014. Identificación de bacterias hidrocarburohólicas aisladas de lodos de perforación de industrias petroleras, Tesis de licenciatura, Universidad Veracruzana, Tuxpan, Veracruz, México.
- Hammamura, N., Olson, S., Ward, D. y Inskeep, W. 2006. Microbial population dynamics associated with crude oil biodegradation in diverse soils, *Applied and environmental microbiology*, 72, (9): 6316-6324.
- Harayama, S., Kasai, Y. y Hara, A. 2004. Microbial communities in oil contaminated seawater, *Environmental biotechnology*, 15, 205-214.
- Harvey, P., Campanella, B., Castro, P., Harms, H., Lichtfouse, E., Schaffner, A., Smrcek, S. y Werck, D. 2002. Phytoremediation of polyaromatic

hydrocarbons, anilines and phenols, *Environmental science pollution research*, 9, 29-47.

Hawumba, J., Sseruwagi, P., Hung, Y. y Wang, L. 2010. *Bioremediation*, 277-316.

En: Handbook of environmental engineering: Environmental bioengineering.

Wang, L., Tay, J., Tay, S. y Hung, Y. (Ed.). *A product of human press*, New York, USA.

Jain, P., Gupta, V., Gaur, R. Lowry, M., Jaroli, D. y Chauhan, U. 2011.

Bioremediation of petroleum oil contaminated soil and water, *Research journal of environmental toxicology*, 5(1): 1-26.

Khodijah, S., Tazaki, K., Asada, R. y Kogure, K. 2004. *Bioremediation of coastal*

areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacteria, *Environmental international*, 30, 911-922.

Labana, S., Kapur, M., Malik, D., Prakash, D. y Jain, R. 2007. *Diversity*

biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environmental bioremediation technologies*, 409-443.

Lebkowska, M., Zborowska, E., Karwowska, E., Miaskiewicz, E., Muszynski, A.,

Tabernacka, A., Naumczyk, J. y Jeczalik, M. 2011. *Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: field scale processes in Poland*, *Ecological engineering*, 37, 1895-1900.

- Lira – Rodríguez, 2014. Caracterización bioquímica y molecular de las bacterias hidrocarburofílicas procedentes del estero aledaño al ejido Emiliano Zapata, Tuxpan, Ver, Tesis de licenciatura, Universidad Veracruzana, Tuxpan, Veracruz, México.
- Lladó- Fernández. 2012. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas, Tesis de doctorado, Universitat de Barcelona, Barcelona, España.
- 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.
- Mahanty, B., Kim, S. y Gyun, C. 2013. Assessment of a biostimulated or bioaugmentation calcification system with *Bacillus pasteurii* in a simulated soil environment, *Microbial ecology*, 65, 679-688.
- Margesin, R. y Schinner, F. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel oil contaminated soil in an Alpine Glacier skiing area, *Applied and environmental microbiology*, 67 (7): 3127-3133.
- Menzie, C., Potocki, B. y Santodonato, J. 1992. Exposure to carcinogenic PHAs in the environment, *Environment science technology*, 26, 1278-1284

- Mohamad, G., Abdul, R., Bakar, A. y Basri, M. 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium, *International biodeterioration and biodegradation* 54, 61-67.
- Muskus, A., Santoyo, C. y Plata, L. 2013. Evaluación de las técnicas de atenuación natural, bioventing, bioaumentación y bioaumentación-bioventing, para la biodegradación de diesel en un suelo arenoso, en experimentos en columna, *Gestión y ambiente*, 16 (2) 83-94.
- Nikolopoulou, M., Pasadakis, N. y Kalogeraskis, N. 2007. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizer, *Desalination*, 211, 286-295.
- Nikolopoulou, M., Eickenbusch, P., Pasadakis, N., Venieri, D. y Kalogeraskis, N. 2013 a. Microcosm evaluation of autochthonous bioaugmentation to combat marine oil spills, *New biotechnology*, 30 (6) 734-742.
- Nikolopoulou, M., Pasadakis, N. y Kalogeraskis, N. 2013 b. Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm simulated oil spills, *Marine pollution bulletin*, 72, 165-173.
- NOM-021-RECNAT-2000 (Norma Oficial Mexicana). 2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis, Secretaría de Medio ambiente y Recursos Naturales, *Diario oficial de la federación*, 73.

- NOM-138-SEMARNAT-2012 (Norma Oficial Mexicana). 2013. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación, Secretaria de Medio ambiente y Recursos Naturales, Diario oficial de la federación, 14.
- Notar, M., Leskovsek, H. y Faganeli, J. 2001. Composition, distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea, *Marine pollution bulletin*, 42(1): 36-44.
- Ortíz, O., Ize, I. y Gavilán, A. 2003. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México, *Gaceta ecológica*, (69): 83-92.
- Ortiz, E., Núñez, R., Fonseca, E., Oramas, J., Almazán, V., Cabranes, Y., Miranda, A., Barbán, O., Martínez, C., Díaz, Y. y Borges, G. 2005. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, *Revista Contribución a la Educación y la Protección del Medio Ambiente*, (6): 51-60.
- Osterreicher, P., Amaral, E., Davée, J., Pereira, T., Ferreira, C., Costa, A., dos Santos, F., Pais, M. y Mano, D. 2004. Evaluation of bioventing on a gasoline ethanol contaminated undisturbed residual soil, *Journal of hazardous materials*, 110, 63-76.
- Pactao, H., Suto, K. y Inoue, C. 2012. Bacterial community dynamics during the preferential degradation of aromatic hydrocarbons by a microbial consortium, *International biodeterioration and biodegradation*, 74, 109-115.

- Pardo, J., Perdomo, M. y Benavides, J. 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo, NOVA, 2, 40-49.
- Paul, D., Pandey, G., Pandey, J., Jain, K. 2005. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration, Trends in biotechnology, 23 (3):114-135.
- Pérez, R., Camacho, C., Gómez, J., Ábalos, A. Viñas, M. y Cantero, D. 2008. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo, Revista CENIC ciencias biológicas, 39 (1): 44-51.
- Ponce - Vélez y Vázquez - Botello, 2005. Niveles de hidrocarburos en el golfo de México. 269-284. *En*: Golfo de México contaminación e impacto ambiental, diagnostico y tendencias. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología.
- Pruell, R., Taplin, B., McGovern, D., McKinney, R. y Norton, S. 2000. Organic contaminant distributions in sediments, polychaetes (*Nereis virens*) and American lobster (*Homarus americanus*) from a laboratory food chain experiment, Marine environmental research, 49, 19-36.
- Pucci, G., Acuña, A., Tonin, N., Tiedemann, M. y Pucci, O. 2010. Diversidad de bacterias cultivables con capacidad de degradar hidrocarburos de la playa

- de Caleta Córdova, Argentina, *Revista Peruana de Biología*, 17 (2): 237-244.
- Qiao, J., Zhang, C., Luo, S., Chen, W. 2014. Bioremediation of highly contaminated oilfield soil: Bioaugmentation for enhancing aromatic compounds removal, *Frontiers of environmental science and engineering*, 8 (2): 293-304.
- Rahman, K., Street, G., Lord, R., Kane, G., Rahman, T., Marchant, R. y Banat, I. 2007. Bioremediation of petroleum sludge using bacterial consortium with Biosurfactant, *Environmental bioremediation technologies*, 391-408.
- Riser- Roberts. 1998. Biological processes. 30-85. *En: Remediation of petroleum contaminated soils*. Lewis Publishers.
- Rivelli, V., Franzetti, A., Gandolfi, I., Cordoni, S. y Bestetti, G. 2013. Persistence and degrading activity of free and immobilised allochthonous bacteria during bioremediation of hydrocarbon contaminated soils, *Biodegradation*, 24:1-13.
- Salazar, A., Lizano, O. y Alfaro, E. 2004. Composición de sedimentos en las zonas costeras de Costa Rica utilizando fluorescencia de rayos X, *Revista biología tropical*, 52, 61-75.
- San Martín, P., Salas, M., Zarza, E. y Hernández, R. 2012. Biorremediación de sedimentos contaminados de la laguna de Tamiahua, Veracruz (una

propuesta de remediación ambiental), Academia Mexicana Multidisciplinaria, 2, (1): 1-5.

Sardrood, B., Goltapeh, E. y Varma, A. 2013. An introduction to bioremediation. pp. 3-28. *En: Fungi as bioremediation, soil biology*. E.M. Goltapeh *et al.*, (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.

Scholz, B., Ahlf, S., Vazquez, F. y Rullkötter, J. 2008. Sources of hydrocarbon pollution in surface sediments of the Campeche Sound, Gulf of Mexico, revealed by biomarker analysis, *Organic geochemistry*, 39, 1104-1108.

Semple, K., Reid, B. y Fermor, T. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants, *Environment pollution*, 112, 296-283.

Singh, A., Parmar, N., Ramesh, C., Kudah, R. y Ward, O. 2011. Bioaugmentation, biostimulation and biocontrol in soil *Biology*, 1-26. *En: Bioaugmentation, biostimulation and biocontrol*. Ed. Ajit Varma, Amity Institute of Microbial Technology, Amity University Uttar Pradesh, Noida, UP, India. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.

Speight, J. 1991. Composition and properties. 215-241. *En: The chemistry and technology of petroleum*, (Ed.) John Wiley and Sons, New York.

Ueno, A., Ito, Y., Yumoto, I. y Okuyama, H. 2007. Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these

in autochthonous bioaugmentation, World journal of microbiology and biotechnology, 23, 1739-1745.

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

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

US EPA (U. S. Environmental Protection Agency). 1996. Guía del ciudadano: Atenuación natural, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC 1-4.

US EPA (U. S. Environmental Protection Agency). 2005. Guideline: Soil bioremediation, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1-9.

Van Deuren, J., Z. Wang y J. Ledbetter. 1997. Remediation technologies. Screening Matrix and reference guide. 3 Ed. Technology innovation office, EPA.

Van Elsas, J., Jansson, J., Trevors, J. 2007. Modern soil microbiology. 2. Ed. New York: crc press, 387-429.

Vázquez, S., Nogales, B., Ruberto, L., Hernández, E., Oleza, J., Balbo, A., Bosch, R., Lalucat, J. y Cormack, W. 2009. Bacterial community dynamics during bioremediation of diesel oil contaminated Antarctic soil, Microbiology and ecology, 57:598-610.

- Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview, Pure and Applied Chemistry, 73 (7):1172-2001.
- Vieira, P., Vieira, R., Faria, S., Ribeiro, E. y Cardoso, V. 2009. Biodegradation of diesel oil and gasoline contaminated effluent employing intermittent aeration, Journal of hazardous materials, 168, 1366-1372.
- Viñas- Canals. 2005. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica, Tesis de doctorado, Universitat de Barcelona, Barcelona, España.
- Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M. y Solanas, A. 2005. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote contaminated soil, Applied and environmental microbiology, 71: 7008, 1-8.
- Volke- Sepúlveda, T. y Velasco- Trejo, J. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados, INE- SEMARNAT, México, 64.
- Volke- Sepúlveda, T. y Velasco- Trejo, J. 2003. Biodegradación de hidrocarburos del petróleo en suelos intemperizados mediante composteo, SEMARNAT, INE y CENICA, México, 1-34.
- Wu, Y., Luo, Y., Zou, D., Ni, J., Liu, W., Teng, Y. y Li, Z. 2008. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with *Monilinia* sp.:

degradation and microbial community analysis, *Biodegradation*, 19, 247-257.

Zanaroli, G., Di Toro, S., Todaro, D., Varese, G., Bertolotto, A. y Fava, F. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms, *Microbial cell factories*, 9 (10):2-13.

IX. ANEXO

Anexo A

Extracción por reflujo (Soxhlet)

Para extraer los hidrocarburos de suelos contaminados se utiliza el método de reflujo con equipo Soxhlet, tomando como referencia los métodos D5369-93 de la ASTM (2003) y 3540C y 3541 de la US EPA (1996, 1994).

Reactivos

- Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).
- Diclorometano (cloruro de metileno, CH_2Cl_2) grado HPLC.

Material y equipo

- Equipo de reflujo Soxhlet de 250 ml
- Perlas de ebullición
- Cartuchos de celulosa o fibra de vidrio
- Balanza analítica
- Vaso de precipitados 250 ml
- Matraz de bola de 500 ml
- Viales
- Espátula

Procedimiento:

1. Colocar de 5 a 10 g de suelo seco y finamente molido en un cartucho de celulosa o fibra de vidrio.
2. Adicionar sulfato de sodio anhidro en una relación suelos: sulfato 1:1 y mezclar.
3. Colocar cada cartucho conteniendo las muestras dentro de la camisa o columna extractora del equipo Soxhlet.
4. Adicionar 125 ± 5 ml de Diclorometano en el matraz de bola y colocar suficientes perlas de ebullición para evitar la proyección del solvente al calentarse.
5. Ensamblar el quipo Soxhlet e iniciar calentamiento hasta alcanzar una temperatura de $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
6. Mantener en reflujo en estas condiciones durante 8 horas, de tal manera que se efectúen entre 6 y 8 reflujos por hora, lo que permitirá la liberación de los analitos.
7. Después de 8 horas, el extracto orgánico contendrá todos los hidrocarburos solubles en Diclorometano. Pasar el matraz bola a un rotoevaporador y concentrar el extracto orgánico a sequedad.
8. Recuperar el concentrado en un vial de 40 ml con un tapón de teflón para su cuantificación.

Anexo B

Composición química del medio Bushnell Hass

| Reactivo | Fórmula | c. b. p. 1000 ml |
|------------------------|------------|------------------|
| Sulfato de magnesio | $MgSO_4$ | 0.2 g/l |
| Cloruro de calcio | $CaCl_2$ | 0.029 g/l |
| Monofosfato de potasio | K_2HPO_4 | 1 g/l |
| Nitrato de amonio | NH_4NO_3 | 1 g/l |
| Cloruro férrico | $FeCl_3$ | 1 g/l |

Anexo C

Tinción de Gram

Material:

- Cristal violeta
- Lugol
- Yodo
- Alcohol
- Safranina
- Aceite de inmersión
- Cultivo de bacterias
- Portaobjetos
- Asa bacteriológica
- Mechero

Procedimiento:

1. Prepara frotis delgados e individuales, secarlos al aire libre y fijarlos con calor.
2. Cubrir los frotis con reactivo de cristal violeta, durante 1 minuto.
3. Lavar los portaobjetos en una corriente suave de la llave, durante 5 minutos.

4. A continuación lavar los frotis con reactivo de yodo y luego aplicar el mismo reactivo durante un minuto.
5. Lavar como se indico en el paso 3.
6. Aplicar lentamente el reactivo de alcohol y seguir agregando el decolorante, hasta que la tintura ya no fluya del frotis.
7. Lavar inmediatamente como se hizo en el paso 3.
8. Cubrir el frotis con reactivo de safranina durante 30 segundos.
9. Lavar como se indico antes y secar presionando lentamente con una toalla de papel haciendo descansar el portaobjetos sobre la mesa. Oprimir suavemente sin tallar.
10. Observar el frotis utilizando el aceite de inmersión en el lente del microscopio.