



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Biorremediación de lixiviados de biopilas de tratamiento
de suelos contaminados con hidrocarburos.**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

Karina Hernández Sánchez

Director de Tesis: M. en C. Tapia Hernández Refugio Armando

Puebla, Pue.

Noviembre del 2015.



Agradecimientos

A mi tutor de tesis M. en C. Armando Tapia Hernández, por haber creído en mí, por darme su apoyo en la realización de esta tesis y aceptarme en su laboratorio como tesista, pero sobre todo por toda la paciencia y experiencia adquirida en el laboratorio.

A mis padres, por todo el esfuerzo, su apoyo incondicional, paciencia, confianza, dedicación, y amor que me han dado para poder realizar este trabajo, son lo máspreciado que tengo y mi mayor ejemplo los amo.

A mi hermana Lidia por todo su apoyo y cariño.

A la M. en C. Teresita Jiménez, Omar y Ana Line por todas las asesorías brindadas durante todo este trabajo.

A mis revisores Dr. Ernesto Mangas y Q.F.B. Guillermo Rueda por sus atinadas observaciones y consejos para mejorar esta tesis.

A Oswaldo, por alentarme a continuar en esta meta.

A todos mi compañeros del Laboratorio de Suelos, Lety, Oscar, Delia, Alexia, Lupita, Ricardo, Brenda, Veré, gracias por las explicaciones, por toda la ayuda brindada, las horas de risa, frustración y aprendizaje que pasamos juntos.

A mis amigos de la universidad, Diego, Raúl, Marta, Eduardo, Sol y Luis, por los bellos momentos. Personas valiosas y grandiosas.

A la licenciatura en Biología por haberme preparado como profesionista y darme tantas experiencias, amigos, compañeros y felicidad.

A la vida por darme la oportunidad de llegar hasta donde estoy.

Gracias a cada uno de ustedes que me brindaron lo necesario para ser cada día una mejor persona y seguir adelante.

Dedicatoria

A mi familia...

Mis padres Adán y Micaela, con todo mi amor para ustedes, que me han enseñado que las cosas se hacen con determinación y esfuerzo, que hicieron todo para que yo pudiera lograr mis sueños, por ayudarme incondicionalmente.

Mi hermana Lidia por ser inigualable y por todos los momentos vividos.

A todos los quiero mucho, ustedes son todo para mí.

INDICE

1. Introducción	1
2. Planteamiento del problema	2
3. Justificación:	3
4. Hipótesis:	4
5. Objetivos	4
5.1. Objetivo General:	4
5.2. Objetivos particulares:	4
6. Marco teórico	5
6.1. Situación en México de la contaminación por hidrocarburos	5
6.2. Contaminación por hidrocarburos en suelo.	6
6.3. Efectos de contaminación en el agua	7
6.4. Biosurfactantes	8
6.5. Composición química del petróleo	9
6.6. Biodegradación de Hidrocarburos de Petróleo	10
6.7. Técnicas de remediación	13
6.7.1. Clasificación de las técnicas de remediación:	13
6.7.2. Estrategias de remediación	13
6.7.3. Tecnologías de remediación biológica (Biorremediación)	14
6.7.4. Técnicas “in situ”	15
6.7.5. Técnicas “ex situ”	16
7. Materiales y Métodos	19
7.1 Mapa Conceptual Metodología	19
7.2 Diseño experimental	20
7.3 Muestreo	21
7.4 Caracterización físico-química del lixiviado	21
7.5 Determinación de Hidrocarburos totales (HTP).	22
7.6 Material biológico	22
7.6.1. Bacterias degradadoras de hidrocarburos	22
7.6.2. Análisis microbiológico del Degradador y Composta	22

7.6.3. Preparación de inóculo de Bacterias Degradadoras de Hidrocarburos	23
7.7. Diseño experimental	23
7.8. Cuantificación de la población microbiana	25
7.9. Determinación de hidrocarburos totales	25
7.10. Identificación de Bacterias	26
7.11. Análisis de datos	26
8. Resultados	26
8.1. Caracterización físico-química del lixiviado	26
8.2. Determinación de Hidrocarburos totales	27
8.3. Análisis microbiológico del biodegradador y composta	27
8.4. Determinación de la concentración de hidrocarburo en el lixiviado de suelo contaminado	28
8.5. Población de bacterias durante los tratamientos	32
8.6. Identificación de Bacterias	33
9. Discusión de Resultados	34
10. Conclusiones.	41
11. Bibliografía.	42
11.1. Páginas web	48
12. ANEXO	50
12.1 Medios de cultivo	50
12.2 Anexo fotográfico	52

Lista de abreviaturas

EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América
BBD	Bioestimulación de bacterias degradadoras
CNH	Comisión Nacional de Hidrocarburos
COV	Compuestos orgánicos volátiles
C:N:P	Relación Carbono: nitrógeno: fósforo
COS	Compuestos Orgánicos Semivolátiles
SD	Desviación estándar
DES	Diferencias estadísticas significativas
HCP	Hidrocarburos de Petróleo
HPA	Hidrocarburos poliaromáticos
HTP	Hidrocarburos totales de petróleo
MBBD	Mezcla de bioaumentación de bacterias degradadoras
NOM	Norma Oficial Mexicana
NPM	Número más probable
ppm	Partes por millón
PEMEX	Petróleos Mexicanos
UFC/gss	Unidades formadoras de colonias/gramo de suelo seco
UFC/ml	Unidades formadoras de colonias/mililitro

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla	Leyenda	Pág.
1	Caracterización de lixiviados de suelo contaminado con petróleo crudo.	27
2	Cuantificación de poblaciones microbianas del biodegradador y composta.	28
3	Degradación de los hidrocarburos presentes en el lixiviado a una concentración inicial de 4399 ppm en los diferentes tratamientos.	28
4	Degradación de los hidrocarburos presentes en el lixiviado a una concentración inicial de 5716 ppm en los diferentes tratamientos.	29
5	Degradación de los hidrocarburos presentes en el lixiviado a una concentración inicial de 9379 ppm en los diferentes tratamientos.	30
6	Degradación de los hidrocarburos presentes en el lixiviado a una concentración inicial de 9379 ppm en los diferentes tratamientos.	31
7	Porcentaje de degradación de lixiviado de suelo contaminado con hidrocarburo en las diferentes concentraciones.	32
8	Población bacteriana de los diversos experimentos de contaminación de hidrocarburo.	32

Resumen

En la actualidad la sociedad depende en gran medida del petróleo para generar energía y materias primas para la industria. Sin embargo, durante la exploración, explotación, transporte y refinación se genera contaminación a los ecosistemas agua y suelo. El sureste de México es particularmente afectado por los derrames y daños a los ductos. En este trabajo se trataron lixiviados de celdas de tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos de una empresa dedicada a la biorremediación, proveniente del estado de Tabasco, con el objetivo de determinar la eficiencia de las técnicas de bioaumentación y bioestimulación en la degradación de hidrocarburos presentes en los lixiviados de suelos contaminados. Por lo que, los tratamientos consistieron en la aplicación de fertilización química (nitrógeno y fósforo), dos fertilizantes orgánicos comerciales (composta y “biodegradador”), la inoculación con cepas bacterianas degradadoras de hidrocarburos (11BB y 11BR) y la mezcla con bacterias degradadoras, con tres concentraciones iniciales de Hidrocarburo Totales de Petróleo (HTP) 4399, 5716 y 9379 ppm. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente, durante diez días. La adición de fertilizantes químicos u orgánicos favoreció la degradación de los hidrocarburos. En todos los tratamientos se presentó una disminución en el porcentaje de degradación respecto al incremento en la concentración del hidrocarburo. El tratamiento con composta tuvo la mayor degradación en la concentración de 4399 ppm, (86.63%) obteniéndose un aumento significativo ($p \leq 0.05$) en la biodegradación para todos los tratamientos incubados a esa concentración. Mientras que el tratamiento con bioaumentación de mezcla de bacterias degradadoras tuvo el mayor porcentaje de degradación en la concentración de 5716 ppm, (89.72%), no mostrando DS con respecto al tratamiento de composta con un porcentaje de degradación de (84.29%), sin embargo con 9379 ppm la bioaumentación de mezcla con bacterias degradadoras presentó la mejor degradación con el (81.77%) de igual manera no presentó DS con respecto a la composta con un valor de (72.85%). Los resultados obtenidos sugieren que la bioaumentación y bioestimulación son técnicas que pueden ser empleadas para eliminar el contenido de hidrocarburos en agua o lixiviados, como sería en el tratamiento de aguas residuales de estaciones de servicio.

1. Introducción

En México la industria petrolera ocupa uno de los principales lugares de importancia por los beneficios económicos que genera; sin embargo, sus actividades son también una fuente notable de contaminantes que pueden ocasionar daños significativos al ambiente, debido a que los hidrocarburos que son liberados se acumulan en el suelo y posteriormente sus lixiviados llegan al agua, siendo los responsables del deterioro de los ecosistemas. Esta industria, entre su vasta infraestructura, cuenta con una amplia red de ductos para la distribución de productos petroleros a todo el país y que atraviesa importantes zonas urbanas, industriales, agropecuarias y naturales. Las fallas en el mantenimiento y operación de los ductos, el manejo inadecuado de algunos materiales y las actividades ilegales, ocasionan de manera frecuente fugas y derrames de estos compuestos en muchas regiones del país, sobre todo en el sureste de México donde se concentra la mayor actividad petrolera. Estos compuestos contaminantes ocasionan un deterioro en el ambiente y la salud humana por sus efectos cancerígenos, además de considerarse sustancias de difícil biodegradación y se clasifican como residuos peligrosos.

Con el fin de contrarrestar los efectos nocivos causados por la presencia del petróleo en los ecosistemas, se han desarrollado técnicas físicas, químicas y biológicas que buscan remover el mayor porcentaje del contaminante y disminuir el impacto generado tras un derrame o acumulación progresiva. Entre las técnicas más amigables con el ambiente está la biorremediación, la cual es un proceso biológico en donde se emplean microorganismos que trabajando de manera individual o coordinada (mediante sinergias), dentro de un consorcio microbiano, degradan contaminantes hasta compuestos no tóxicos presentes en suelo, agua o aire. Se emplean dos estrategias principales: la bioestimulación y la bioaumentación. La bioestimulación es la adición de nutrientes, principalmente fuente de nitrógeno y fósforo, para favorecer el crecimiento y desarrollo de los microorganismo nativos degradadores (Pardo *et al.*, 2004). En la bioaumentación se inoculan microorganismos endógenos o exógenos en un lugar específico, con

el fin de fomentar la degradación y disminuir el tiempo de reducción del contaminante (Arroyo *et al.*; Vallejo, *et al.*, 2005; Volke y Velasco., 2002).

2. Planteamiento del problema

A nivel mundial la contaminación de agua, aire y suelo es generada por diversas actividades antropogénicas, tales como la industria extractiva que incluye la extracción del petróleo, petroquímica, química y minera; de igual manera las actividades agrícolas, el manejo y disposición final de los residuos sólidos municipales y las relacionadas con el manejo de materiales y residuos peligrosos (transporte, almacenamiento, tratamiento, reciclaje y disposición final), representan un problema importante en cuanto a contaminación del suelo y por consiguiente el lixiviado proveniente del mismo.

El tratamiento de suelo contaminado se realiza en celdas en las cuales se aplican diversas tecnologías para poder recuperar el suelo como son, deshidratación, “landfarming” o incineración. Pero no siempre son las técnicas adecuadas, en las celdas de tratamiento se utiliza un ciclo de recirculación del suelo, esto genera la producción de lixiviados que son recuperados en tanques y se vuelven a ingresar a la celda de tratamiento, pero generalmente no se puede recuperar por completo ese lixiviado por lo cual la disposición final del mismo es quedar impregnado en el suelo en el mejor de los casos o son liberados al ambiente.

Por otro lado, las actividades realizadas en estaciones de servicio automotriz, no solo se centran en la venta de combustibles líquidos, sino también se incluyen servicios de lubricación, lavado general de motor, servicio de diagnóstico, trabajos menores de mantenimiento automotor, venta y cambio de lubricantes. Éstas actividades generan lixiviados que se caracterizan por contener grasas y aceites, hidrocarburos, sólidos suspendidos, detergentes y concentraciones variables de metales, los cuales por medio de lavado y precipitación son conducidos a la red de alcantarillado y fuentes hídricas superficiales o en el mejor de los casos quedan atrapados en las trampas que posteriormente son recuperados para su posterior tratamiento, todo esto implica riesgos para el ambiente.

Ante este problema surge la biorremediación, para el tratamiento de hidrocarburos pesados, por ello resulta de vital importancia encontrar nuevas alternativas, donde puedan ser empleadas bacterias que tengan la capacidad de biodegradar hidrocarburos y sus derivados, sin descartar el empleo de otras técnicas combinadas que permitan posteriormente obtener agua libre de contaminantes para ser reutilizada.

3. Justificación:

La contaminación por hidrocarburos es uno de los principales problemas ambientales, ya que estos se esparcen rápidamente, debido a la existencia de una importante diferencia de densidades entre el agua y el hidrocarburo, llegando a ocupar extensas áreas, y dificultando por lo tanto sus posibilidades de limpieza. Todo esto es generado por la distribución de los ductos que recorre gran parte del territorio nacional, las fugas de tanques de almacenamiento y la toma ilegal, que en la mayoría de los casos quedan fuera de control, provocando la generación de residuos de petróleo y sus derivados los cuales en muchas ocasiones no son tratados adecuadamente o simplemente no son tratados.

En este trabajo se busca generar una alternativa de biorremediación que sea económica, sencilla y rápida para recuperar algunos de los sitios afectados por estos derrames, directamente los ocasionados por los mismos lixiviados de suelos contaminados con hidrocarburos, ya que no se tiene ninguna estrategia de limpieza para este tipo de contaminación. Todo esto con ayuda de diversos organismos, como lo son hongos y bacterias que se encuentran en el suelo y sus lixiviados.

4. Hipótesis:

Las técnicas de bioestimulación y bioaumentación aumentaran el porcentaje de biodegradación de lixiviados de suelos contaminados con hidrocarburos.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General:

Determinar la eficiencia de las técnicas de bioaumentación y bioestimulación en la degradación de hidrocarburos presentes en los lixiviados de suelos contaminados.

5.2. Objetivos particulares:

- Realizar la caracterización físico-química del lixiviado de suelo contaminado con hidrocarburo.
- Cuantificar la población microbiana inicial y final de bacterias degradadoras en el sistema de bioaumentación.
- Determinar el tratamiento óptimo para la biodegradación de lixiviados.
- Determinar el porcentaje de biodegradación de hidrocarburos en el lixiviado.

6. Marco teórico

6.1. Situación en México de la contaminación por hidrocarburos

El petróleo es la energía primaria más importante a nivel mundial. En México, gran parte de las actividades económicas se sustentan en él, de manera que alrededor del 60% de las necesidades energéticas de nuestro país son cubiertas con esta fuente de energía no renovable, a través de la industria petrolera.

En 2014, PEMEX fue el octavo productor de petróleo en el mundo, 13° compañía integrada a nivel mundial y la 14° en reservas de crudo en el mundo. A nivel nacional es la mayor empresa comercializadora de productos petrolíferos en México como: gas natural, crudo y productos refinados (PEMEX, 2014).

De acuerdo a los dictámenes emitidos por la Dirección General de Gestión Integral de Materiales y Actividades Riesgosas de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, los productos del petróleo, como la gasolina, el diésel y otros hidrocarburos, fueron los principales contaminantes librados durante las emergencias ambientales ocurridas en el período de 2003 a 2006. El petróleo crudo ocupó el cuarto lugar de los contaminantes más frecuentemente emitidos, con un reporte de 92 emergencias de un total de 749. En 2003, las fugas en ductos (de petróleo y productos similares) fueron las emergencias ambientales más frecuentes (más de 100 casos), seguidas de las volcaduras de carros tanque (63 casos); sin embargo, para los siguientes tres años este patrón se invirtió y las fugas en ductos se ubicaron en una segunda posición (menos de 60 casos por año). Con relación a la ubicación de las emergencias, el estado de Veracruz fue el más afectado, con 117 incidentes, seguido de los estados de Tamaulipas (75), Oaxaca (69), Hidalgo (54) y Puebla (50). Estas cinco entidades concentraron casi el 50% de las emergencias ocurridas entre 2003 y 2006 (Blanno y Ruiz-Saucedo, 2007).

Para el 2014, en el Estado de Puebla se tiene registro de 6.93 miles de barriles derramados en suelos (CNH, 2014).

6.2. Contaminación por hidrocarburos en suelo.

La contaminación de los suelos por hidrocarburos, tienen un importante efecto sobre las propiedades físicas y químicas de los suelos, pudiendo impedir o retardar el crecimiento de la vegetación sobre el área contaminada. Los hidrocarburos aromáticos son tóxicos para los seres vivos ya que son muta génica y carcinogénicos.

Los suelos contaminados por crudo muestran incrementos en la materia orgánica, carbono total y nitrógeno comparado con suelos libres de hidrocarburo Pliece, (1948) por su parte encontró grandes incrementos en la materia orgánica en suelos que se han contaminado con crudo y también determino que los suelos contaminados con gas natural tienen un pH de 7. Evgin, (1989) encontró efectos de los hidrocarburos en algunas propiedades mecánicas del suelo como la cohesión. Desde el 64 Dobson y Wilson observaron mayor actividad microbiológica en suelos impregnados con hidrocarburos que en suelos libres del mismo.

Por otro lado, en la materia orgánica del suelo pueden existir sustancias que son consideradas contaminantes orgánicos. Gómez, (2004) menciona que la movilidad de los compuestos orgánicos en el suelo está relacionada con su solubilidad en agua, a mayor solubilidad mayor movilidad. Ortiz *et al.*, (2003) mencionaron que el aumento de la retención del agua en la capa superficial, es una de las propiedades físicas del suelo más afectada cuando ocurre un derrame de petróleo.

Un ejemplo muy claro de esta clase de contaminación se ve reflejado en estados del sureste de México, los grandes accidentes que presenta la industria del petróleo, como derrame de tanques, ruptura de tuberías y extracción de pozos petroleros, representan 10% de estas descargas, las cuales son más evidentes por la gran cantidad de hidrocarburos liberados en un sitio y tiempo determinado. Sin embargo, el 90% restante es debido a descargas menores de las actividades industriales, que contaminan el suelo y son arrastradas por las aguas continentales (Fernández *et al.*, 2006).

6.3. Efectos de contaminación en el agua

En la actualidad, los vertidos de petróleo y la consecuente contaminación en cuerpos de agua naturales constituyen uno de los problemas ambientales más preocupantes. Los daños a las fuentes hídricas pueden ser severos. Estos efectos se producen como consecuencia de una combinación de diferentes acciones que se llevan a cabo en la industria, tales como las operaciones de producción, perforación, carga, descarga y almacenamiento del crudo.

La contaminación de aguas por hidrocarburos provenientes de la inyección en los pozos petroleros trae consigo una serie de problemas ambientales, económicos, culturales y sociales. Entre estos destacan la inhibición del paso de la luz solar lo que ocasiona una disminución de la actividad fotosintética de las algas, afectando el desarrollo en las cadenas alimenticias a nivel de los organismos productores.

En las aguas superficiales el vertido de petróleo u otros desechos produce disminución del contenido de oxígeno, aporte de sólidos y de sustancias orgánicas e inorgánicas (Galán, 2013).

Otra forma de contaminar el agua con hidrocarburo es por medio de las estaciones de servicios, ya que los compuestos derivados de estas estaciones no reciben un adecuado tratamiento. Lo que conduce a problemas de contaminación por escurrimiento de aguas que posteriormente, se dirigen al alcantarillado, del mismo modo en los casos de derrame de combustible, generalmente son lavados y el agua producto de esta limpieza llega a las fuentes hídricas (Cubillos, 2011).

Por otro lado, el petróleo que llega al mar se evapora o es degradado lentamente por bacterias. Los hidrocarburos orgánicos volátiles del petróleo matan inmediatamente varios animales, especialmente en sus formas larvales. Otras sustancias químicas permanecen en la superficie y forman burbujas flotantes que cubren las plumas de las aves que se zambullen, lo cual destruye el aislamiento térmico natural y hace que se hundan y mueran. Los componentes pesados del petróleo que se depositan al fondo del mar pueden matar a los animales que habitan en las profundidades o los hacen inadecuados para el consumo humano.

Por otra parte el agua freática o subterránea es una fuente vital de agua para beber y para el riego agrícola. Sin embargo es fácil de agotar porque se renueva muy lentamente. Cuando el agua freática llega a contaminarse no puede depurarse por sí misma, como el agua superficial tiende a hacerlo, debido a que los flujos de agua freática son lentos. También hay pocas bacterias degradadoras, porque no hay mucho oxígeno.

6.4. Biosurfactantes

Los Biosurfactantes son un grupo heterogéneo de compuestos químicos de superficie activa producida por una amplia variedad de microorganismos en especial bacterias y hongos. Los tensoactivos mejoran la solubilización y eliminación de contaminantes. La biodegradación también es mejorada por tensoactivos debido al aumento de la biodisponibilidad de los contaminantes (Nilanjana y Preethy, 2010).

Los Biosurfactantes pueden actuar como agentes emulsionantes por la disminución de la tensión superficial y formar micelas; muchos de ellos abarcan un amplio rango de propiedades funcionales como la separación de fases, actividad superficial y reducción de la viscosidad de aceites crudos, y han sido aplicados en las industrias agrícola, textil y petroquímica (Nilanjana y Preethy, 2010).

Ellos representan un amplio espectro de biomoléculas donde se incluyen, entre otros, ácidos grasos normales e hidroxilos, glicolípidos, lipopéptidos cíclicos, N-acilaminoácidos, lipopéptidos, mono- y diglicéridos, y fosfolípidos (Kosaric, 1993). Desde el punto de vista químico, los biosurfactantes presentan gran diversidad estructural, poseen una efectiva selectividad y son estables a elevadas temperaturas, pH y salinidad.

Los biosurfactantes son más biocompatibles, más fácilmente biodegradables y por lo tanto menos tóxicos, menos perjudiciales al ambiente y más activos a bajas concentraciones (Rosenberg y Ron, 1999; Lang, 2000). Además, proporcionan un mayor contacto con el contaminante, facilitando su degradación. Los contaminantes hidrofóbicos presentes en los hidrocarburos del petróleo requieren su solubilización para poder ser degradados por las células microbianas; por lo

que la presencia de biosurfactantes incrementa la degradación microbiana de los contaminantes.

Poblaciones de bacterias.

La distribución de las poblaciones microbianas no es uniforme en el suelo y refleja la estructura del mismo y la disponibilidad de nutrientes. La actividad de los microorganismos en la superficie del suelo requiere de la presencia de nutrientes, mismos que se encuentran normalmente en cantidad suficiente en los suelos no contaminados (Bajpai *et al.*, 1991), por lo que normalmente se encuentran cuentas microbianas del orden de 10^7 a 10^9 UFC por gramo de suelo. En suelos bien aireados, se encuentran hongos, pero si hay limitación en la transferencia del oxígeno, se encontrará un mayor número de bacterias (Nyer *et al.*, 1996). La diversidad observada en los microorganismos del suelo es sorprendente, pues más de 10000 especies diferentes de bacterias han sido encontradas por gramo de suelo, aunque muchas no se han podido identificar, en suelos contaminados se encuentran de 350 a 1500 poblaciones (Torsvik y Overas, 2002).

6.5. Composición química del petróleo

El petróleo es una mezcla de hidrocarburos que contiene principalmente carbono e hidrogeno respectivamente, los hidrocarburos están presentes en fase sólida, líquida y gaseosa y pueden presentar además en su composición, pequeñas proporciones de heterocompuestos con presencia de nitrógeno, azufre, oxígeno y algunos metales. El petróleo varía mucho en su composición, la cual depende principalmente del tipo de yacimiento de donde provenga Chow, (1987).

Los hidrocarburos que componen al petróleo pueden agruparse en cuatro categorías: alifáticos, aromáticos, polares o resinas y asfáltenos.

Alifáticos: son compuestos de cadenas abiertas, son saturados si la molécula posee un enlace (alcanos) entre los átomos de carbono, e insaturados si tiene cuando menos un doble (alquenos) o triple (alquinos) enlace. Los hidrocarburos alifáticos saturados son químicamente más estables que los insaturados (Freedman, 1989 y Chang, 1999).

Aromáticos: Están presentes en una gran proporción en los hidrocarburos y su base elemental es el anillo bencénico. La fracción de los aromáticos contiene hidrocarburos como el benceno, tolueno, xileno, etc., hidrocarburos poliaromáticos, como los naftenoaromáticos y compuestos aromáticos de sulfuro como el tiofeno y dibenzotiofeno. La fracción de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) contiene compuestos cancerígenos como el benzopireno.

Polares: La fracción de polares, o resinas que contienen compuestos polares con N, S y O, con una gran variedad de componentes como piridinas, quinoleinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas, que pueden ser sólidos amorfos que difícilmente se disuelven en el petróleo.

Asfaltenos: Son compuestos de moléculas grandes que se dispersan en el petróleo como compuestos poliaromáticos, ácidos nafténicos, sulfuros, fenoles polihídricos, ácidos grasos y metaloporfirinas (Sigiura *et al.*, 1996).

6.6. Biodegradación de Hidrocarburos de Petróleo

En la degradación de los hidrocarburos del petróleo, se involucran consorcios de microorganismos, incluyendo procariontes y eucariontes. Las bacterias y levaduras son los organismos que predominan en la degradación de compuestos del petróleo en ecosistemas acuáticos, mientras que bacterias y hongos son los que dominan en muestras de suelo. Los microorganismos más comunes que son responsables de la degradación del petróleo comprenden principalmente géneros bacterianos como: *Acinetobacter*, *Arthobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* y *Bacillus*. (Atlas, 1981; Bossert y Bartha, 1984).

Durante la biodegradación, los microorganismos están equipados con la maquinaria metabólica para utilizar al contaminante como fuente de carbono y energía para su crecimiento, produciendo biomasa, subproductos, dióxido de carbono y agua (Eweis, 1998). El grado de eficiencia de los procesos de degradación se encuentra íntimamente relacionado con factores ambientales que rodean al sistema microorganismo-contaminante (Fernández, 1995). Entre los más

importantes se encuentra el pH, la concentración de nutrientes, la temperatura, el tamaño y características de las partículas de suelo, la biodisponibilidad y concentración del contaminante, la toxicidad, la presencia de otros nutrientes, etc. La persistencia de un contaminante en el ambiente depende de las características físicas y químicas del compuesto químico, como la baja solubilidad y la toxicidad que presenta hacia los microorganismos degradadores (Alexander, 1994).

Los microorganismos que oxidan hidrocarburos realizan este procedimiento por vía aerobia en las reacciones de óxido-reducción, teniendo como último aceptor de electrones al oxígeno, también existen microorganismos que requieren condiciones anaerobias para la oxidación de estos compuestos. Pero la mayoría de los compuestos, la degradación es más rápida y completa en condiciones aerobias (Cookson, 1995).

Los mecanismos de degradación del petróleo y sus fracciones dependen de la fracción química dominante y de los microorganismos involucrados. En la biodegradación microbiana de hidrocarburos se conocen genes involucrados en la metabolización de las diferentes fracciones del petróleo en donde múltiples vías metabólicas interaccionan para oxidarlos, dichos genes codifican para la síntesis de enzimas como monoxigenasas, dioxigenasas, deshidrogenasas, etc. También se presentan procesos de co-metabolismo en donde el co-metabolito, en este caso el compuesto contaminante, puede ser transformado sólo en presencia de un sustrato utilizado por el microorganismo para su crecimiento o en presencia de otro compuesto transformable (Dalton y Stirling, 1982).

La oxidación de hidrocarburos alifáticos, tanto por bacterias como por hongos, consiste en convertir la cadena hidrocarbonada del alcano en el ácido graso correspondiente mediante la oxidación del grupo metilo terminal. En presencia de oxígeno la cadena del alcano puede ser atacada por monoxigenasas o dioxigenasas (Bouwer y Zehnder, 1993), las cuales introducen uno o dos átomos de oxígeno en la molécula, formándose así un alcohol.

Posteriormente, el alcohol es oxidado a un aldehído y después al ácido graso correspondiente. Una vez que el hidrocarburo se encuentra en forma de ácido

graso, es utilizado en la ruta catabólica de la β -oxidación, donde se remueven unidades de dos carbonos para la formación de acetil-CoA, éste es llevado hasta CO_2 y H_2O por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la oxidación de $\text{NADH} + \text{H}^+$ y FADH_2 generados por la oxidación de nutrientes se lleva a cabo en cadena respiratoria y como subproducto se produce ATP (Wackett *et al.*, 1989).

Los compuestos aromáticos que poseen como estructura primaria la molécula de benceno, denominados BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos), se encuentran como contaminantes frecuentes y constituyen un porcentaje elevado de la composición del petróleo. Su degradación se lleva a cabo mediante dos vías oxidativas: la activación del anillo y su ruptura. La activación involucra la incorporación de oxígeno en el anillo, esto es, una dihidroxilación del núcleo aromático. Esta activación se lleva a cabo también por la acción de las enzimas mono o dioxigenasas (Cerniglia, 1992). En la segunda fase, los dihidrodioles sufren una oxidación para formar derivados dihidroxilados, como el catecol, los cuales son precursores de la ruptura del anillo por oxidación vía *meta* u *orto*, produciendo el semialdehído 2-hidroximucónico y el ácido mucónico, respectivamente.

Posteriormente, estos compuestos son oxidados para formar ácidos grasos que pueden ser utilizados por los microorganismos para la síntesis celular y la producción de energía (Eweis *et al.*, 1998).

Para los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) su degradación es por medio de un anillo a la vez, por mecanismos similares a los de la degradación de los hidrocarburos aromáticos. Sin embargo, la biodegradabilidad de los (HAP) tiende a disminuir conforme se incrementa el número de anillos que los constituyen y conforme se incrementa el número de radicales alquilo que poseen (Park *et al.*, 1990). La solubilidad que presentan en compuestos polares influye mucho en la biodegradación de estos compuestos. El sinergismo entre bacterias, hongos y levaduras provoca un incremento en la velocidad de oxidación de los hidrocarburos (Riser-Roberts, 1998).

6.7. Técnicas de remediación

6.7.1. Clasificación de las técnicas de remediación:

Las tecnologías de remediación pueden clasificarse de diferentes maneras con base en:

- a) Estrategias de remediación.
- b) Lugar en que se realiza el proceso de remediación.
- c) Tipo de tratamiento.

6.7.2. Estrategias de remediación

- Destrucción o modificación de los contaminantes. Se encarga de alterar la estructura química del contaminante.
- Extracción o separación. Los contaminantes son extraídos o separados aprovechando sus propiedades físicas o químicas.
- Aislamiento o inmovilización del contaminante. Contaminantes estabilizados, solidificados o contenidos con el uso de métodos físicos o químicos.

Lugar en que se realiza el proceso de remediación.

- In situ. Se realiza en el mismo sitio contaminado, sin extraer el suelo, mediante técnicas que están en desarrollo.
- Ex situ. En esta técnica se requiere excavar o alguna otra técnica para remover el suelo contaminado, puede realizarse en el mismo sitio (on site) o fuera de él (off site).

Tipo de tratamiento.

- Tratamiento biológico (Biorremediación). Actividad metabólica de los organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar, transformar o remover los contaminantes.
- Tratamientos fisicoquímicos. Se utilizan las propiedades físicas o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir o contener la contaminación.

- Tratamientos térmicos. Utilizan calor para aumentar la volatilización, quemar, descomponer o fundir los contaminantes del suelo.

6.7.3. Tecnologías de remediación biológica (Biorremediación)

Las tecnologías de remediación empleadas para la recuperación de suelos contaminados son hidrocarburos son varias, para fines de esta tesis únicamente nos enfocaremos a las tecnologías de remediación biológicas (biorremediación).

El concepto de biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos y bacterias), para remover (extraer), degradar (biodegradar) o transformar (biotransformar) compuestos orgánicos tóxicos en productos metabólicos menos tóxicos o inóculos (Velasco y Volke, 2003).

La técnica de biorremediación surge como consecuencia de que científicos académicos e industriales determinaron que algunos microorganismos, sobre todo algunas bacterias, podían utilizar los hidrocarburos del petróleo como alimento y fuente de energía. Durante la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo las bacterias oxidan el petróleo a dióxido de carbono, agua y energía, y aproximadamente 50% del carbono en el petróleo es usado para biomasa bacteriana (Randy *et al.*, 1999).

Subsecuentemente, se hicieron investigaciones para determinar las condiciones óptimas de biodegradación para reproducir estas condiciones en el campo. Se descubrió la necesidad de mantener el suelo muy húmedo para mantener el contenido de humedad en las células bacterianas. También se descubrió que es muy importante mantener el suelo en condiciones aeróbicas, porque la transformación de los hidrocarburos del petróleo en condiciones anaeróbicas es muy lenta o algunas veces inexistente. De igual modo, la adición de nutrientes inorgánicos, especialmente nitrógeno y fósforo establecen en gran medida un estímulo para la biorremediación. Esto se debe a que los hidrocarburos de petróleo son casi exclusivamente hidrógeno y carbón, por lo que contienen muy pocas cantidades de otros elementos esenciales para las células bacterianas, como son nitrógeno, fósforo, potasio y algunos minerales traza (Rand *et al.*, 1999).

La biorremediación es una tecnología limpia, ya que los contaminantes pueden ser transformados en compuestos inocuos, como el bióxido de carbono. Además cuando los nutrientes se agotan, incluyendo los contaminantes empleados como fuente de carbono, los microorganismos mueren.

6.7.4. Técnicas “in situ”

La técnica de biorremediación in situ es el tratamiento en el propio lugar, sin excavación de los suelos, y solo implica la adición de la humedad y de los nutrientes necesarios para conseguir el crecimiento microbiano y favorecer el metabolismo de los contaminantes. Se pueden tratar grandes extensiones de suelo con un mínimo de transporte, normalmente utilizando una retroexcavadora; la aireación se realiza empleando la misma retroexcavadora. Solo es posible un control ambiental mínimo de los parámetros físicos (pH, temperatura etc.)

- ❖ **Bioventeo.**

El bioventeo es una tecnología cuyo objetivo es estimular la biodegradación natural de cualquier compuesto biodegradable en condiciones aerobias. El suelo será estimulado mediante la adición de aire y nutrientes en la zona contaminada, y el caudal de aire es limitado para que ocurra de biodegradación.

Se utiliza para tratar compuestos orgánicos biodegradables semivolátiles (COS) o no volátiles. Además de favorecer la degradación de contaminantes adsorbidos, pueden degradarse compuestos orgánicos volátiles (COV) por medio de su movimiento a través del suelo biológicamente activo. Es estimulado con éxito para remediar suelos contaminados con Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP), solventes no clorados, pesticidas y conservadores de la madera, entre algunos otros químicos (Beltrami, 2001).

- ❖ **La bioaumentación se define como la adición o introducción de microorganismos endógenos o exógenos en un sitio determinado, para promover y acelerar una actividad biológica específica, como puede ser la degradación de un contaminante. El uso de la bioaumentación**

generalmente se considera conveniente cuando el número de microorganismos degradadores de hidrocarburos en el sitio contaminado es muy bajo (menor a 10⁵ UFC por gramo en peso seco) o cuando éstos no tienen la capacidad de degradación suficiente (Vogel, 1996).

- ❖ La bioestimulación consiste en la adición de nutrientes y/o la introducción de oxígeno y aceptores de electrones al sitio contaminado, favoreciendo o intensificando la actividad biológica de los microorganismos. Su uso se recomienda cuando el sitio contaminado carece de los nutrientes necesarios para soportar el crecimiento microbiano. Básicamente, los nutrientes que se introducen al medio son aquellos que pueden ser limitantes para la actividad bacteriana, principalmente los denominados macronutrientes, como nitrógeno y fósforo. La naturaleza de la fuente de nutrientes y sus características fisicoquímicas deberán estar en función del tipo de contaminante que se desea biodegradar, del tipo de tratamiento que se elija y de las características propias del suelo (Bajpai *et al.*, 1991). La presencia de macronutrientes es necesaria para el crecimiento bacteriano: el nitrógeno es necesario para la síntesis de proteínas, componentes de la pared celular y ácidos nucleicos. Por otro lado el fósforo se requiere para la síntesis de ácidos nucleicos, componentes de las membranas celulares y ATP (Baker y Herson, 1994).

Esta técnica se ha empleado con éxito para remediar suelos contaminados con gasolinas, COV, COS y pesticidas, no es recomendable para suelos arcillosos, altamente estratificados demasiado heterogéneos, ya que pueden provocar limitaciones en la transferencia de O₂ (Velasco y Volke, 2002).

6.7.5. Técnicas “ex situ”

Los procesos de biorremediación ex situ, incluyen procesos de biodegradación en fase de lodos. El suelo se mezcla con agua (para formar lodo), microorganismos y nutrientes, los suelos se colocan en una celda de tratamiento (composteo) o sobre membranas impermeables (biolabranza), en donde se agrega agua y nutrientes.

- ❖ Biorremediación en fase de lodos (biorreactores).

Los reactores más utilizados para biorremediar suelos es el biorreactor de lodos, en el cual el suelo contaminado se mezcla constantemente con un líquido, y la degradación se lleva a cabo en la fase acuosa por microorganismos en suspensión o inmovilizados en la fase sólida; estos se utilizan principalmente para tratar HTP, COS no halogenados y COV.

- ❖ Biorremediación en fase solida (composteo).

El composteo es un proceso biológico controlado, por el cual pueden tratarse suelos y sedimentos contaminados con compuestos orgánicos biodegradables, para obtener subproductos inocuos estables. El material contaminado se mezcla con agentes de volumen (paja, aserrín, estiércol, desechos agrícolas), que son sustancias orgánicas sólidas biodegradables, adicionadas para mejorar el balance de nutrientes, así como para asegurar una mejor aireación y la generación del calor durante el proceso (Velasco y Volke, 2002).

En el compostaje se deben ajustar y controlar algunos parámetros ambientales como son el contenido de humedad, pH y el contenido de nitrógeno.

- ❖ Biopilas alargadas.

Es el proceso de composteo más económico y sencillo, el material se apila sobre una plataforma en montes alargados. En este tipo de biopila, la aireación se realiza mediante el mezclado manual o mecánico de la composta, proceso que a su vez permite homogeneizar la temperatura. El mezclado de la composta proporciona una mayor distribución y facilita la biodegradación de los contaminantes, ya que facilite la homogeneización de los nutrientes, agua, aire, contaminantes y microorganismos. La frecuencia del mezclado de la pila depende de la actividad microbiana, que generalmente puede determinarse por el perfil de la temperatura en la composta, que puede realizarse una vez al día o bien una vez al mes (Velasco y Volke, 2003).

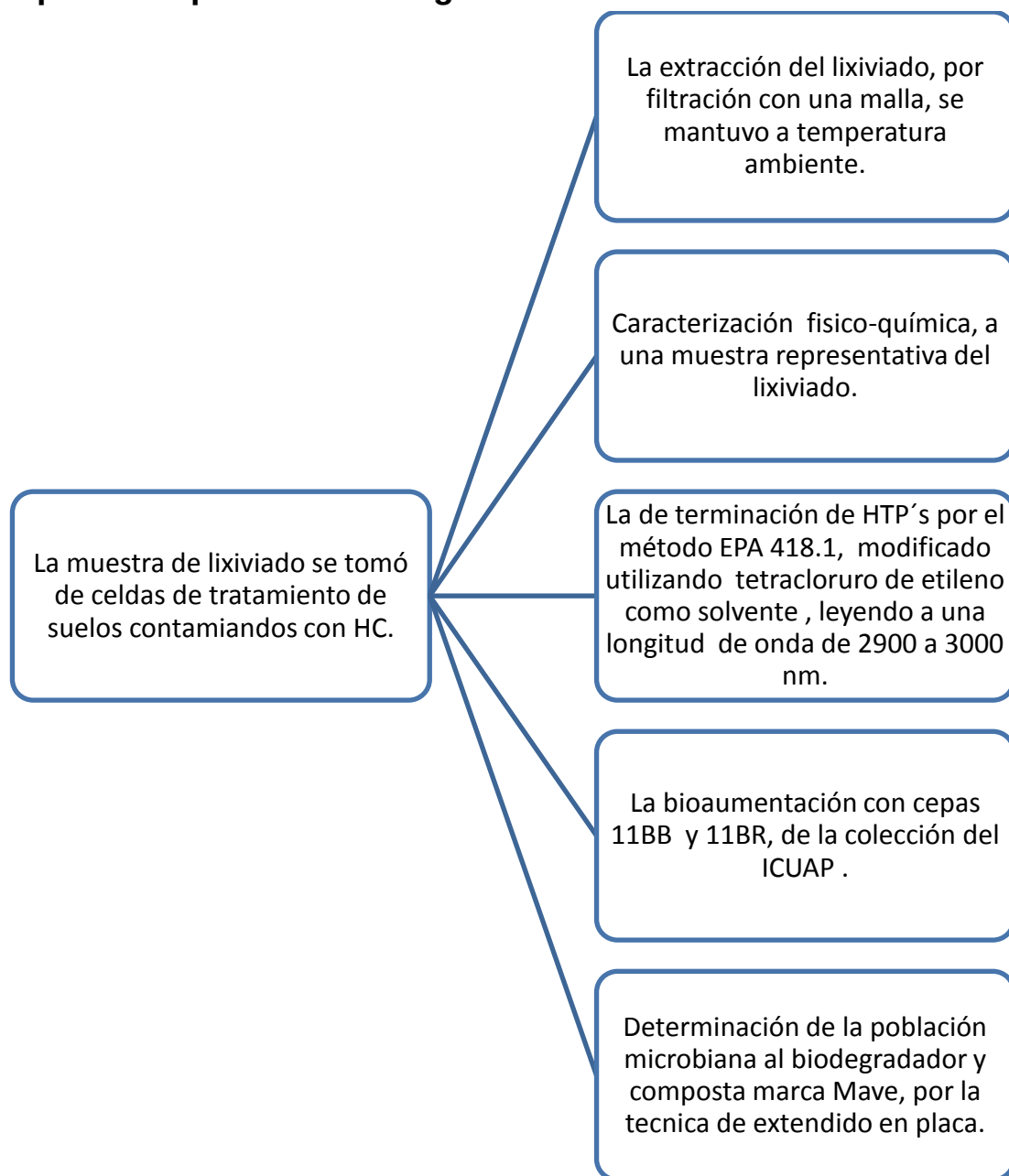
Cuadro 1. Características de las diferentes tecnologías de biorremediación (Riser-Roberts,1998).

Tecnología	Aplicación	Características	Beneficios
Bioventeo <i>In situ</i>	Tratamiento de HTP, COV.	Introducción de oxígeno a través del suelo, por bombeo, para estimular el crecimiento microbiano y su actividad.	-Necesita poco equipo. -Sirve para el tratamiento de suelo y agua.
Bioestimulación <i>In situ</i>	Suelos contaminados con HTP, COV y pesticidas.	Aplicación de soluciones con nutrientes y oxígeno, a través del suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos.	-Bajo costo -Favorece la actividad microbiana.
Biolabranza <i>In situ</i>	Suelos contaminados con hidrocarburo.	Durante el proceso la superficie del suelo contaminado es tratada en el mismo sitio por medio del arado.	-Bajo costo.
Biopilas <i>Ex situ</i>	Tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos.	El material contaminado se coloca sobre la superficie del terreno en formas de pilas. Estas pilas se mezclan periódicamente para favorecer la aireación.	-Sirve para el tratamiento de suelo y agua -Bajo costo.
Composteo <i>Ex situ</i>	Suelo contaminado con clorofenoles.	Proceso biooxidativo controlado, que involucra lodos activados sustratos orgánicos heterogéneos en estado sólido, el cual evoluciona incluyendo una fase termófila, produciendo CO ₂ , agua, minerales y un material orgánico (composta).	-Bajo costo.
Biorreactores <i>Ex situ</i>	Producción microbiana de antibióticos, solventes, aminoácidos. -Tratamiento de líquidos, sólidos, gases y lodos.	Uso de reactores para el cultivo microbiano en fase líquida o semisólida.	-Rápida degradación cinética.
Fitorremediación <i>Ex situ</i>	-Compuestos orgánicos - Metales pesados.	Utilización de plantas para la remoción de contaminantes.	-Es la que presenta menor costo de las técnicas biológicas. -También es una técnica <i>ex sit</i> .
Landfarming <i>Ex situ</i>	-Residuos de la industria del aceite, alimentos, papel y cuero. -Suelos contaminados con hidrocarburo.	Uso de poblaciones microbianas nativas y suplementos con nutrientes minerales.	-Bajo costo (equipo, construcción y operación).

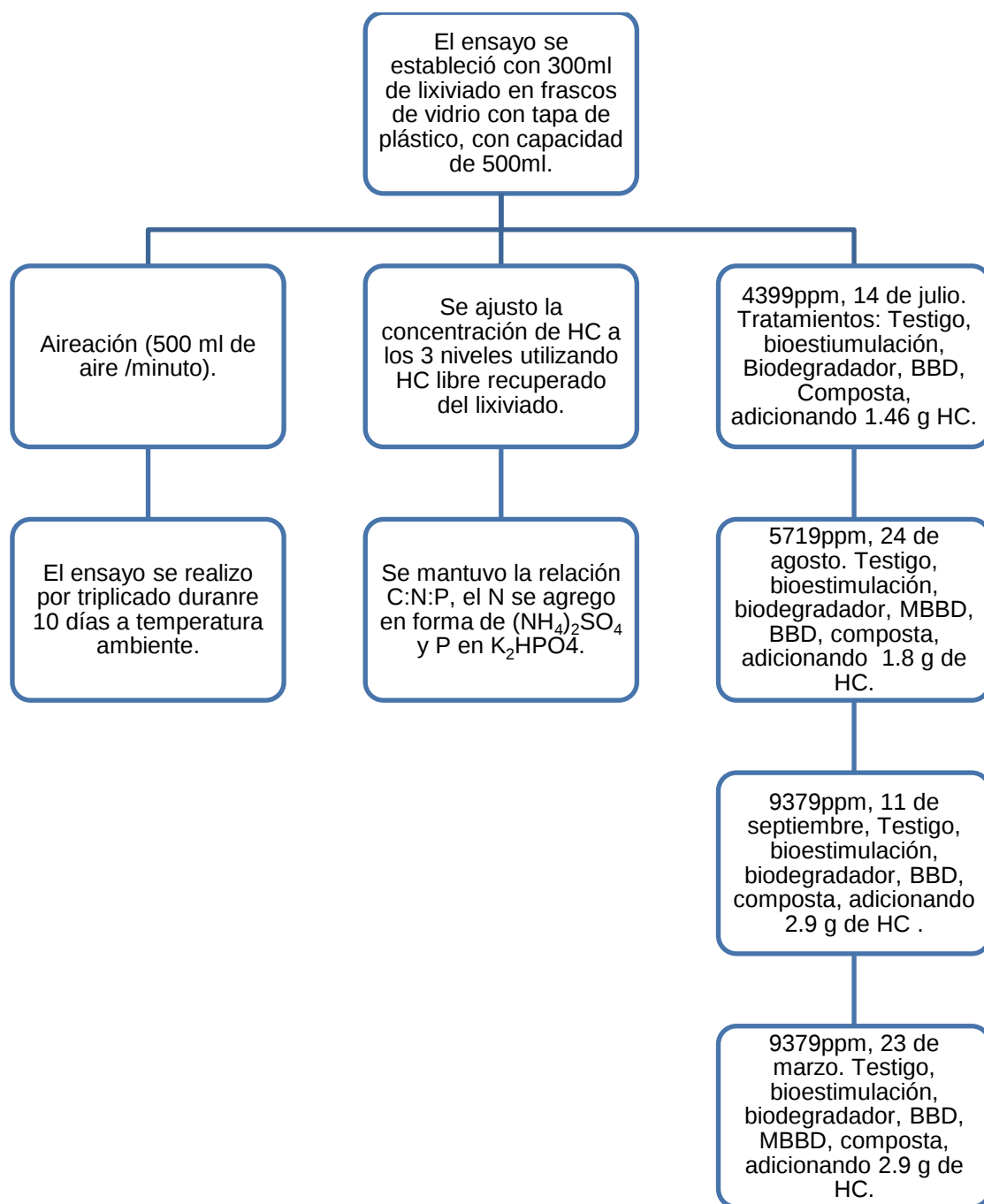
BPC: Bifenilos policlorados; COV: Compuestos orgánicos volátiles; HPA: Hidrocarburos poliaromáticos; HTP: Hidrocarburos totales de petróleo. (Velasco y Volke, 2003, Alexander, 1999)

7. Materiales y Métodos

7.1 Mapa Conceptual Metodología



7.2 Diseño experimental



7.3 Muestreo

La muestra fue tomada de celdas de tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos del estado de Tabasco, de una empresa dedicada a la biorremediación.

Las muestras de suelo fueron enviadas al laboratorio en contenedores de plástico, las cuales presentaban la separación de agua con hidrocarburos en la superficie. Para extraer el lixiviado, se procedió a separar la fase líquida de los suelos con una malla. El lixiviado se mantuvo en un recipiente cerrado a temperatura ambiente.

7.4 Caracterización físico-química del lixiviado

Se tomó una muestra representativa del lixiviado extraído de los suelos para su caracterización parcial.

- Determinación de pH.

El pH se determinó por el método electrométrico, utilizando un potenciómetro.

- Conductividad.

La medida la conductividad eléctrica se realizó mediante un conductímetro provisto de una celda, marca conductronic PC45.

- Demanda bioquímica de oxígeno (DBO5).

La demanda bioquímica de oxígeno se determinó con base al método de la botella claro oscura a través de un equipo de evaluación continua.

- Demanda química de oxígeno (DQO).

La demanda química de oxígeno se determinó con base al método tradicional de digestión.

- Amonio.

El amonio se determinó en base al Método de Azul indofenol.

- Nitrógeno.

El nitrógeno total se determinó en base al método de digestión con persulfato.

- Fósforo.

El fósforo se determinó en base al método PhosVer3 con digestión ácida.

7.5 Determinación de Hidrocarburos totales (HTP).

El lixiviado fue analizado a fin de evaluar la cantidad de hidrocarburos totales de petróleo presentes en las muestras. Con base al método EPA 418.1, Determinación de Hidrocarburos totales recuperables por espectrofotometría de infrarrojo (IR).

Se tomó una muestra representativa del lixiviado con un volumen total de 1 litro, posteriormente se procedió a tomar las características de la muestra (color, olor, apariencia) y se colocó en un embudo de separación, se acidificó a pH 2, se adicionaron 5 ml de tetracloruro de etileno (C_2Cl_4) y se agitó vigorosamente, para la filtración de la fase orgánica se preparó un embudo con sulfato de sodio (Na_2SO_4) y sílica gel, el procedimiento se repitió 3 veces hasta conseguir un volumen de aforo de 10 ml. Finalmente los extractos fueron analizados por medio de un espectrofotómetro de infrarrojo marca Bruker modelo Tensor 27 a una longitud de onda de 2900 a 3000 nm.

7.6 Material biológico

7.6.1. Bacterias degradadoras de hidrocarburos

Los microorganismos que se emplearon en el presente estudio son parte de la Colección del Laboratorio de Microbiología del Suelo de la BUAP.

Se tomaron dos cepas bacterianas 11BB Y 11BR, cada una de ellas fue transferida con un asa a un medio fresco de agar nutritivo, por estría cruzada, y se incubó a 30°C durante 48 horas, para verificar su pureza.

7.6.2. Análisis microbiológico del Degradador y Composta

La utilización del degradador comercial marca Mave y composta, ayudaron a la bioestimulación y bioaumentación de los residuos sólidos.

Se realizó la determinación de la población microbiológica del degradador, aplicando el método de diluciones decimales seriadas (10^{-2} , 10^{-7}) en solución buffer de fosfatos. El conteo de bacterias se realizó mediante la técnica de extendido en placa empleando medio Agar Nutritivo, Agar Soya Trypticaseina, medio mineral BH (Bushnell-haas) (Bushnell y Haas, 1941), para el conteo de hongos, Agar Papa-Dextrosa, Agar Extracto de Malta y Rojo Congo para Actinomicetos; también se utilizó Caldo de Lactosa, Caldo Tetrationato, Caldo EC, Caldo selenito, para el conteo de Coliformes Fecales y Salmonella.

La incubación fue a 30 °C, y se realizó en los siguientes tiempos: Bacterias (48 horas), Hongos (5-7 días), Actinomicetos (4-7 días), Coliformes fecales (48 horas). Después del tiempo de incubación se contaron aquellas cajas que contenían de 30 a 300 colonias, el resto se consideró como incontable. Se determinaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de acuerdo a la siguiente Ecuación:

UFC/ml = No. De colonias por placa *Factor de dilución *ml de la muestra sembrada.

7.6.3. Preparación de inóculo de Bacterias Degradadoras de Hidrocarburos

Las bacterias utilizadas para este trabajo fueron encontradas en recortes de perforación de hidrocarburos del estado de Veracruz, razón por la cual fueron probadas y analizadas por su capacidad degradadora y productora de surfactantes.

De los cultivos puros de la cepas degradadoras se tomó un inóculo para agregarlo a caldo BH que es un medio mineral adicionado con melaza, sulfato de zinc, cloruro de cobalto, sulfato de cobre y levadura, se incubó a 30°C por 48 horas y se determinó la población por número más probable en placa.

7.7. Diseño experimental

En el ensayo experimental se utilizaron 300 ml de lixiviado, se colocaron en frascos de vidrio con tapa de plásticos con capacidad de 500 ml, se aplicó aireación mediante bombas de aire, con flujo constante de 500 ml de aire/minuto, determinado con un flujómetro, el ensayo se llevó a cabo durante 10 días a temperatura ambiente la cual fue registrada diariamente, los frascos de los

diferentes tratamientos se colocaron de forma aleatoria y cada tratamiento se llevó a cabo por triplicado.

Para ajustar la concentración de hidrocarburos a los 3 niveles de contaminación se agregó hidrocarburo libre recuperado del lixiviado hasta la concentración teórica de hidrocarburo requerida tomando en cuenta el hidrocarburo residual de la muestra. La concentración real en cada nivel se determinó por el método gravimétrico descrito más adelante. En todos los ensayos la relación de C:N:P se ajustó a 100:10:1, el nitrógeno se agregó en forma de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y el fósforo en forma de difosfato de potasio K_2PO_4 . En los ensayos de bioaumentación se utilizó el 3.5% de los productos comerciales que equivalen a 10.5ml para bacterias y degradador y 10.5g para composta.

El primer nivel de contaminación que fue de 4399ppm se inició el 14 de julio del 2014, se utilizaron los siguientes tratamientos testigo, bioestimulación, degradador, bioaumentación de bacterias degradadoras y composta, adicionando 1.46g de hidrocarburo en cada uno de los tratamientos, además de nitrógeno y fósforo junto con su respectivo producto comercial, todo esto como se mencionó anteriormente.

El segundo nivel de contaminación fue de 5716 ppm inicio el 24 de agosto del 2014, utilizando los tratamientos testigo, bioestimulación, degradador, bioaumentación de bacterias degradadoras, composta y mezcla de bioaumentación de bacterias degradadoras, adicionando 1.8 g de hidrocarburo, nitrógeno y fosforo en cada uno de los tratamientos, junto con su respectivo producto comercial, como se mencionó anteriormente.

El tercer nivel de contaminación fue de 9379 ppm inicio el 11 de septiembre del 2014, utilizando los tratamientos testigo, bioestimulación, degradador, bioaumentación de bacterias degradadoras, composta, adicionando 2.9 g de hidrocarburo en cada uno de los tratamientos, nitrógeno y fosforo, junto con su respectivo producto comercial, como se mencionó anteriormente.

Para el cuarto nivel de contaminación se inició el 23 de marzo de 2015 a una concentración de 9379 ppm, utilizando los tratamientos testigo, bioestimulación,

degradador, bioaumentación de bacterias degradadoras, composta y mezcla de bioaumentación de bacterias degradadoras, agregando 2.9 g de hidrocarburo, nitrógeno y fósforo en cada uno de los tratamientos, como se mencionó anteriormente.

7.8. Cuantificación de la población microbiana

Se determinó la población bacteriana inicial y final por la técnica de número más probable de cada uno de los tratamientos por triplicado, por medio de diluciones seriadas decimales (10^{-2} , 10^{-8}) en soluciones buffer fosfatos, para evaluar su contribución en la degradación de hidrocarburos, utilizando los medios de Agar Nutritivo y Agar soya tripticaseína.

Posteriormente se ingresaron los frascos a refrigeración para su análisis posterior de hidrocarburos totales.

7.9. Determinación de hidrocarburos totales

La determinación de hidrocarburos totales (HTP) se realizó con base en la norma NMX-AA-005-SCFI-2000, Análisis de agua – Determinación de grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas, por gravimetría. Esta norma fue modificada con fines necesarios para el análisis.

Trascurridos los 10 días de tratamiento se procedió a tomar las características de la muestra, se colocó el volumen total del lixiviado al embudo de separación, se acidificó a pH 2, se le adicionaron 10 ml de hexano y se extrajo por agitación vigorosa, para la filtración de la fase orgánica se preparó un embudo con sulfato de sodio, el procedimiento se repitió 3 veces hasta conseguir un volumen de aforo de 100 ml. Para la destilación se coló el matraz volumétrico (previamente llevado a peso constante) en el rota vapor a una temperatura de 69°C. Posteriormente se ingresó el matraz volumétrico al horno a una temperatura de 70°C, durante 12 horas para descartar cualquier residuo de hexano. Para la lectura de la muestra se utilizó una balanza analítica en la cual se pesó el matraz de bola.

7.10. Identificación de Bacterias

Se realizó Tinción de Gram a las cepas bacterianas, esta prueba fue utilizada para identificar la morfología de las bacterias.

API 20NE

Para la identificación de las cepas se utilizó el Kitt API 20NE de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Esta prueba permite identificar los bacilos gram negativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias.

7.11. Análisis de datos

Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos de la determinación de hidrocarburos totales, utilizando el programa statistica versión 7.

Para la interpretación de los resultados se realizó un ANOVA y prueba de tukey.

8. Resultados

8.1. Caracterización físico-química del lixiviado

La interpretación de los resultados de los análisis físicos químicos del lixiviado fue con base en la NOM-001-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles del contaminante en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, ya que no se cuenta con una norma para los lixiviados obtenidos del suelo. Los resultados de la caracterización físico-química del lixiviado se muestran en la tabla 1.

El lixiviado presentó un valor de 690 mg/L^{-1} en la demanda bioquímica de oxígeno (DBO5), en tanto que el total de solidos suspendidos fue de 1232 mg/L , de igual manera, las concentraciones de grasas y aceites, nitrógeno, fosforo, metales pesados como plomo, mercurio, cadmio y cromo, rebasan por mucho los máximos permisibles en la NOM-001-ECOL-1996.

También se determinó un pH de 7.3, conductividad de $1529 \text{ } \mu\text{s/cm}$, total de solidos disueltos, amonio, Coliformes fecales y demanda química de oxígeno, estas variables no pudieron ser comparadas con la norma ya que no es una norma para lixiviados.

8.2. Determinación de Hidrocarburos totales

El lixiviado proveniente de las celdas de tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos, presentó un contenido de hidrocarburos totales de 3697.686mg/L, determinado por el método EPA 418.1 por espectrofotometría de (IR), el cual fue modificado por el uso del solvente.

8.3. Análisis microbiológico del biodegradador y composta

Las bacterias mesófilicas aerobias presentaron la población más alta tanto en el degradador (6.1×10^5) como en la composta (5.0×10^8), en tanto que los Coliformes fecales presentaron poblaciones menores. Otros grupos microbianos determinados fueron los actinomicetos y levaduras los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Caracterización de lixiviados de suelo contaminado con petróleo crudo.

Parámetro.	Valores	Máximos permisibles NOM 001 ECOL1996
Total de Sólidos disueltos (mg /L)	1524	NA
Total de Sólidos Suspendidos (TSS) (mg/L)	1232	40-60
Conductividad $\mu\text{S}/\text{cm}$	1519	NA
pH (Potenciómetro)	7.3	NA
NH ₄ (Azul indofenol)	62.8	NA
N-total, (Digestión con persulfato) (mg/L)	18.1	40
P-total, (PhosVer3 con digestión ácida) (mg/L)	15.1	20
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5) (mg/L)	690	50
Demanda Química de Oxígeno (DQO) (mg/L)	780	NA
Coliformes fecales UFC/ml	11,500,000	_____
Grasas y Aceites (mg/L)	670	15-25
Hg (mg/L)	0.09	0.005-0.01
Pb (mg/L)	29.4	0.2-0.4
Cd (mg/L)	1.04	0.1-0.2
Cr (mg/L)	10	0.5-1

N.A.: No es aplicable

Tabla2. Cuantificación de poblaciones microbianas del biodegradador y composta.

Muestras	Bacterias mesofilicas aerobias	Actinomicetos	Levaduras	Coliformes fecales	Coliformes totales
Biodegradador	6.1×10^5 Ufc/ml	300 Ufc/ml	2.0×10^4 Ufc/ml	3.0 NMP/ml	15×10^4 NMP/ml
Composta	5.0×10^8 Ufc/ml	5.8×10^5 Ufc/ml	1.3×10^5 Ufc/ml	14.7 NMP/g bs	4.6×10^3 NPM/g bs

*UFC/ml: Unidades formadoras de colonias por mililitro.

*NMP/gbs: Numero más probable por gramos en base seca.

*NMP/ml: Numero más probable en ml.

8.4. Determinación de la concentración de hidrocarburo en el lixiviado de suelo contaminado

Los resultados de degradación de hidrocarburos al final del experimento 1 en base al método por gravimetría de la NMX-AA-005-SCFI-2000, Análisis de agua – Determinación de grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas se muestran en la tabla 3. Este método tiene un porcentaje de recuperación del 75% de acuerdo a las condiciones de extracción establecidas en el laboratorio.

Tabla 3. Degradación de los hidrocarburos presentes en el lixiviado a una concentración inicial de 4399 ppm en los diferentes tratamientos.

Tratamientos	HC Recuperado (g) ¹	HC recuperado en ppm	Porcentaje de degradación de HC ¹
Testigo	1.04 ± 0.01	3482	28.57 ± 0.43^e
Bioestimulación	0.81 ± 0.02	2695	44.9 ± 1.70^d
Biodegradador	0.49 ± 0.01	1628	66.70 ± 0.69^c
BBD	0.32 ± 0.02	1070	78.10 ± 1.78^b
Composta	0.20 ± 0.01	653	86.63 ± 1.03^a

BBD: Bioaumentación de bacterias degradadoras.

¹Cada valor representa el promedio de triplicados.

²Letras deferentes en la columna indican diferencia estadística significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$)

El ensayo de degradación se realizó durante 10 días, como se muestra en materiales y métodos, esto fue a temperatura ambiente con una temperatura más alta registrada de 28°C y la más baja de 22°C. La mayor degradación se presentó en el tratamiento con composta (86.63%), seguido de la bioaumentación con bacterias degradadoras (78.10%) y la menor degradación fue en el tratamiento testigo con (28.57%) de degradación. Todos los tratamientos muestran diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre ellos.

Los resultados de degradación de hidrocarburos del experimento 2 se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Degradación de los hidrocarburos presentes en el lixiviado a una concentración inicial de 5716 ppm en los diferentes tratamientos.

Tratamientos	HC degradado (g) ¹	HC recuperado en ppm	Porcentaje de degradación de HC ¹
Testigo	1.64 ± 0.05	5477	9.90 ± 3.16 ^e
Bioestimulación	1.25 ± 0.05	4155	31.65 ± 3.11 ^d
Biodegradador	0.79 ± 0.06	2633	56.69 ± 3.59 ^c
BBD	0.45 ± 0.04	1514	75.09 ± 2.67 ^b
MBBD	0.19 ± 0.04	624	89.72 ± 2.31 ^a
Composta	0.29 ± 0.04	955	84.29 ± 2.34 ^a

BBD: Bioaumentación de bacterias degradadoras.

MBBD: Mezcla de bioaumentación de bacterias degradadoras.

¹Cada valor representa el promedio de triplicados.

²Letras diferentes en la columna indican diferencia estadística significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

El ensayo de degradación se realizó durante 10 días, esto fue a temperatura ambiente con una temperatura más alta registrada de 24°C y la más baja de 18°C, se observó una diferencia de 4°C con respecto a la temperatura más alta y baja registrada en el nivel 1 de contaminación. La mayor degradación se presentó en el tratamiento con la mezcla de bioaumentación con bacterias degradadoras (89.72%), seguido de la composta (84.29%) y la menor degradación fue en el tratamiento testigo con (9.90%) de degradación. Los tratamientos testigo,

bioestimulación y bioaumentación de bacterias degradadoras muestran diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre estos tratamientos, mientras que los tratamientos composta y mezcla de bioaumentación de bacterias degradadoras no muestran diferencias estadísticas significativas entre estos dos tratamientos, pero si en comparación con los demás tratamientos.

Los resultados de degradación de hidrocarburos al final del experimento 3 se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Degradación de los hidrocarburos presentes en el lixiviado a una concentración inicial de 9379 ppm en los diferentes tratamientos.

Tratamientos	HC degradado (g) ¹	HC recuperado en ppm	Porcentaje de degradación de HC ¹
Testigo	2.74 ± 0.042	9143	7.40 ± 1.43 ^d
Bioestimulación	2.08 ± 0.06	6933	29.78 ± 2.35 ^c
Biodegradador	0.74 ± 0.07	2450	75.18 ± 2.61 ^a
BBD	0.61 ± 0.01	2025	79.48 ± 0.47 ^a
Composta	1.01 ± 0.08	3377	65.79 ± 2.72 ^b

BBD: Bioaumentación de bacterias degradadoras.

¹Cada valor representa el promedio de triplicados.

²Letras diferentes en la columna indican diferencia estadística significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

El ensayo de degradación se realizó durante 10 días, esto fue a temperatura ambiente con una temperatura más alta registrada de 28°C y la más baja de 24°C. La mayor degradación se presentó en el tratamiento con bioaumentación de bacterias degradadoras (79.48%), seguido del biodegradador (75.18%) y la menor degradación fue en el tratamiento testigo con (7.40%) de degradación. Los tratamientos testigo, bioestimulación y composta muestran diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre estos tratamientos, mientras que los tratamientos de bioaumentación de bacterias degradadoras y biodegradador no muestran diferencias estadísticas significativas entre ambos tratamientos, pero si en comparación con los demás tratamientos.

Los resultados de degradación de hidrocarburos al final del experimento 4, se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Degradación de los hidrocarburos presentes en el lixiviado a una concentración inicial de 9379 ppm en los diferentes tratamientos.

Tratamientos	HC degradado(g) ¹	HC recuperado en ppm	Porcentaje de degradación de HC ¹
Testigo	2.78 ± 0.02	9277	6.04 ± 0.70 ^e
Bioestimulación	2.25 ± 0.05	7498	24.05 ± 1.70 ^d
Biodegradador	1.36 ± 0.11	4522	54.20 ± 3.91 ^c
BBD	1.00 ± 0.02	3333	66.24 ± 0.68 ^b
MBBD	0.54 ± 0.07	1799	81.77 ± 2.44 ^a
Composta	0.80 ± 0.11	2680	72.85 ± 4.00 ^a

BBD: Bioaumentación de bacterias degradadoras

MBBD: Mezcla de bioaumentación de bacterias degradadoras.

¹Cada valor representa el promedio de triplicados.

²Letras diferentes en la columna indican diferencia estadística significativa de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

El ensayo de degradación se realizó durante 10 días, esto fue a temperatura ambiente con una temperatura más alta registrada de 25°C y la más baja de 17°C. La mayor degradación se presentó en el tratamiento con la mezcla de bioaumentación con bacterias degradadoras (81.77%), seguido de la composta (72.85%) y la menor degradación fue en el tratamiento testigo con (6.04%) de degradación. Los tratamientos testigo, bioestimulación y bioaumentación de bacterias degradadoras muestran diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre estos tratamientos, mientras que los tratamientos composta y mezcla de bioaumentación de bacterias degradadoras no muestran diferencias estadísticas significativas entre estos dos tratamientos, pero si en comparación con los demás tratamientos.

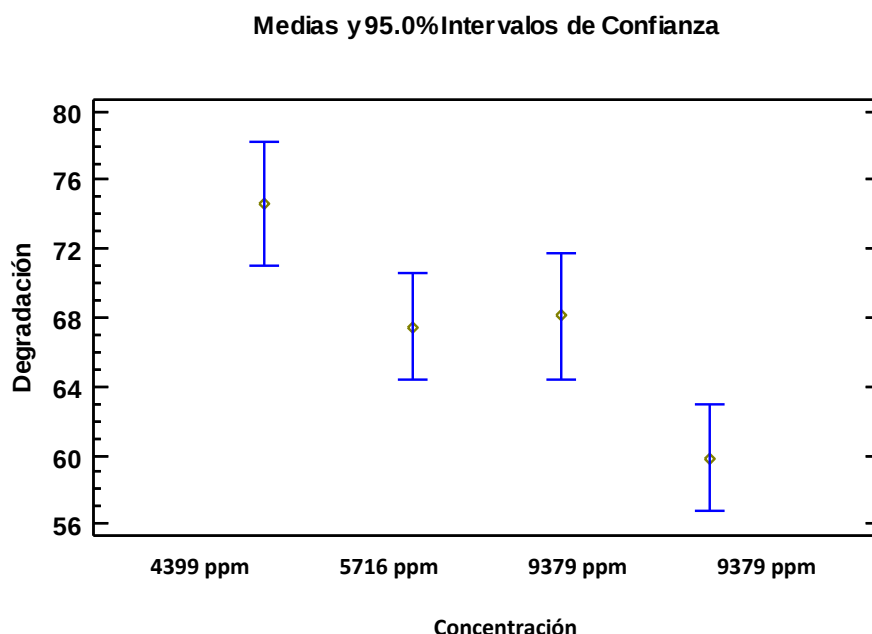


Fig. 1. Porcentaje de degradación de lixiviado de suelo contaminado con hidrocarburo en las diferentes concentraciones.

8.5. Población de bacterias durante los tratamientos

La población inicial de los inóculos para los tratamientos, biodegradador fue de 6.1 log10, bacterias 11BB presentaron una población de 8.61 log10 mientras que las bacterias 11BR el valor fue de 8.09 log10, composta se obtuvo un valor de 8.69 log10 y finalmente para la mezcla de bacterias su población inicial fue de 8.40 log10.

Tabla 7. Población bacteriana de los diversos experimentos de contaminación de hidrocarburo.

Tratamientos	Nivel 1 log10	Nivel 2 log10	Nivel 3 log10	Nivel 4 log10
Testigo	7.64	8.65	7.3	7.14
Bioestimulación	7.65	9.46	7.3	7.26
Biodegradador	8.55	9.25	8.02	8.18
Bacterias 11BB	7.92	9.78	8.25	7.73
Bacterias 11BR	7.55	9.49	8.16	8.07
Composta	9.98	8.91	7.57	8.04
Mezcla bacterias	n/d	9.30	n/d	8.4

N.D. No determinado

Al final del experimento los tratamientos testigos, bioestimulación, biodegradador y mezcla de bacterias degradadoras se observó un incremento poblacional con respecto a la población inicial en los 4 niveles de contaminación respectivamente, mientras que en los tratamientos de bacterias 11BR hubo una disminución de la población con respecto a la población inicial en los niveles 1 y 2, las bacterias 11BB presentaron una disminución de la población con respecto a la población inicial en los niveles 1, 3 y 4, la composta presentó un aumento en la población solo en los dos primeros niveles de contaminación mientras que para los últimos dos niveles se observó una disminución de la población .

8.6. Identificación de Bacterias

Las bacterias utilizadas para este trabajo fueron encontradas en recortes de perforación de hidrocarburos del estado de Veracruz, razón por la cual fueron probadas y analizadas por su capacidad degradadora y productora de surfactantes.

En cuanto a su identificación se observó que presentan una morfología microscópica en forma de bacilos determinadas como Gram negativas.

La prueba de galerías API 20NE marca Biomérieux arrojó que la cepa 11BB es la bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* con un 99.9% de confiabilidad, mientras que la cepa 11BR es la bacteria *Aeromonas hydrophila* con un 99.1% de confiabilidad.

9. Discusión de Resultados

Bento *et al.*, (2005) establecieron que para unas óptimas condiciones de biodegradación, es importante saber las características del sitio o zona de estudio antes de iniciar cualquier tratamiento de biorremediación. Por lo cual se realizó la caracterización físico-química del lixiviado y conteo poblacional de microorganismos degradadores de hidrocarburo (tablas 4 y 5).

El pH registrado al inicio del ensayo fue de 7.3, el cual se consideró óptimo para la actividad de biodegradación. El pH es un factor importante para el desarrollo de los microorganismos, siendo el intervalo entre seis y ocho los más adecuados para muchos de los microorganismos, ya que condiciones altamente ácidas o alcalinas, generalmente inhiben la actividad microbiana (Ercoly *et al.*, 2002; Eweis *et al.*, 1999). Al final del ensayo los valores de pH oscilaron entre 7.9 y 8.2 considerados como ligeramente alcalinos y no representaría un factor de inhibición de la actividad de bio-degradación.

Con respecto a los elevados valores de metales pesados Hg, Pb, Cd y Cr con valores de 0.09, 29.4, 1.04 y 10.0 mg/L respectivamente alrededor de 10 veces mayor que lo estipulado en la norma. La presencia de estos metales probablemente se debe a la alta concentración de petróleo que presentaba el suelo, (Groudeva, *et al.*, 2001; Osuji y Onojake, 2004).

En cuanto a la concentración de nutrientes los valores obtenidos se encuentran dentro de los máximos permitidos en la NOM-001-ECOL-1996 para nitrógeno y fósforo. Nilanjana y Preethy (2010), mencionan que el éxito en la biodegradación de hidrocarburos depende de la concentración de nutrientes que se tengan disponibles, ya que estos ayudaran a incrementar la población microbiana.

La temperatura es uno de los factores más importantes que controlan la actividad microbiológica y las tasas de biodegradación de compuestos (Atlas, 1981). La temperatura afecta la naturaleza física y la composición de los contaminantes aumentando o disminuyendo su viscosidad, solubilidad y volatilización (Roberts, 2000; Rittman y McCarty, 2001). La tasa de degradación más alta se produce en

un intervalo de 30° - 40°C en ambientes de suelo, 20° - 30°C en algunos ambientes de agua dulce y de 15° a 20°C en ambientes marinos (Nilanjana y Preethy, 2010). A temperaturas superiores a 40° C la biodegradación se reduce porque se da la desnaturalización de enzimas y proteínas y muchas poblaciones microbianas mueren. Por el contrario a temperaturas aproximadas de 0°C los hidrocarburos son degradados de forma más lenta y los microorganismos se encapsulan hasta que se dé un cambio de temperatura (Eweis *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos para este parámetro muestran que la temperatura ambiente más alta registrada fue en los experimentos 1 y 3 de 28°C y la más baja para estos dos experimentos fue de 22 y 24°C, por lo cual se considera que entran en el rango de temperatura óptimo para la biodegradación de hidrocarburos, para los experimentos 2 y 4 se registró una temperatura ambiente máxima de 24 y 25°C y más baja de 18 y 17°C, estos valores salen del intervalo antes mencionado además de alcanzar solo la mitad de temperatura máxima por lo cual se ve afectado directamente la población microbiana y al mismo tiempo la degradación de hidrocarburos.

La temperatura influye sobre la actividad de los microorganismos porque la totalidad de las reacciones de degradación microbiológica se producen a través de la actividad de las enzimas, a un mayor incremento de la temperatura, se eleva la actividad metabólica debido a la presencia de más energía en el sistema (Margesin y Schinner, 1999b; Hejazi y Husain, 2004).

La concentración inicial de los HTPs en el lixiviado de suelo fue de 4399 ppm para el experimento 1 de contaminación, mientras que para el experimento 2 fue de 5716ppm y los experimentos 3 y 4 fue de 9379 ppm. Al finalizar el ensayo se observó una degradación baja en los tratamientos que solo presentaron bioestimulación (testigo, fertilización química) en las diversas concentraciones de contaminación, mientras que los tratamientos en los que se aplicó bioaumentación junto con bioestimulación (biodegradador, composta, BBD y MBBD) presentaron una degradación mayor con respecto a los demás tratamientos.

Los tratamientos testigos presentaron disminución en la concentración de HC en todos los experimentos, la mayor biodegradación de los hidrocarburos se presentó en la concentración menor (4399 con un porcentaje de degradación de 28.57%). Esto se le puede atribuir a la presencia de microorganismos nativos de los suelos contaminados y a procesos abióticos.

La bioestimulación con fertilización química mostró un incremento en la degradación de hidrocarburos respecto a los tratamientos testigos. En este estudio se observó que las pérdidas abióticas fueron bajas debido a que se obtuvo baja degradación en los tratamientos testigos de los experimentos 2,3 y 4 con respecto a los tratamientos de bioestimulación química en todas las concentraciones (tabla 7). En algunos casos se reporta que las pérdidas abióticas son debidas a procesos físicos y químicos son pocas o nulas en ambientes con previas contaminaciones, mientras en zonas recientemente contaminadas las pérdidas abióticas presentan una mayor contribución a la descontaminación (Atlas, 1988; Margensi y Schinner 1999). Las pérdidas abióticas pudieron estar relacionadas por el efecto de la volatilización durante el proceso de aireación, sin embargo este efecto fue mínimo puesto que la gran mayoría de volátiles se perdieron durante las labores de contaminación. Atagana (2004), encontró que el incremento de la aireación estimulo la actividad aeróbica a través del arado del suelo produciendo un aumento de la población bacteriana en un 40%.

Por otro lado los tratamientos con fertilización orgánica, biodegradador y composta, presentaron un incremento significativo respecto a los tratamientos testigos de cada experimento, alcanzando un porcentaje de degradación máxima de 75.18% en el experimento 3 para el biodegradador y de 86.63% en el experimento 1 para la composta (tabla 7).

Diversos estudios han reportado el uso de fertilizantes orgánicos en tratamientos de bioaumentación, obteniendo con ellos hasta un (53%) de degradación (Margesin y Schinner, 1997; Armendariz *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Pardo *et al.*, 2004). Otros autores Sarkar *et al.*, (2004) obtuvieron porcentajes de degradación de 95.5% y 96.6% para sus tratamientos de fertilización orgánica

atribuyéndolo a que los compuestos más pesados en el combustible diésel se agotaron a tasas más lentas que los compuestos más ligeros.

Sin embargo los tratamientos de bioaumentación BBD obtuvieron un porcentaje de degradación bajo en comparación con los tratamientos de fertilización orgánica (composta), siendo el experimento 3 el único que obtuvo un valor de degradación mayor de (79.48%) en el tratamiento BBD, sobrepasando a la composta con un valor de (65.79%). Mientras que los tratamientos de MBBD obtuvieron un porcentaje de degradación alto en comparación con los tratamientos de composta en los experimentos 2 y 4. Por lo cual se puede observar que el mejor tratamiento para la biorremediación en este trabajo fue MBBD con un porcentaje de degradación de (89.72%). Esto se debe a las variaciones de temperatura que presentaron los diversos experimentos, ya que las bacterias aunque son especialistas en la degradación de hidrocarburo son muy sensibles a los cambios de temperatura. Margesin y Schineer (1999) determinaron, que los tratamientos de bioestimulación con la adición de nutrientes inorgánicos resulto en un aumento en la degradación de hidrocarburo por los microorganismos nativos, mientras la bioaumentación con microorganismos adaptados para degradar hidrocarburo en clima frío fueron encontrados algunas veces como poco exitosos. Adicionalmente establecieron diferencias en el grado de descontaminación que se puede obtener en ambientes contaminados con hidrocarburos basados en las pérdidas bióticas y abióticas.

Resultados similares obtuvieron Straube, *et al.* (2003) en su estudio sobre remediación de HTP a través de biolabranza implementando técnicas de bioestimulación y bioaumentación. Después de once meses encontraron que el control mostro un 23% de remoción en los HTP, el bioestimulado un 34%, mientras el bioestimulado y bioaumentado mostro un 87% de disminución. Ellos también hallaron un aumento en los HTP en el suelo debido a la aireación; la cual mezcla y rompe las asociaciones suelo arcilla y distribuye el contaminante en toda la superficie.

Bento, *et al.* (2005) Realizaron una investigación en la cual compraban tres técnicas de biorremediación para suelo contaminado con hidrocarburo: atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación, durante 12 semanas, al suelo se le agregaron nutrientes y las cepas bacterianas a cada tratamiento correspondiente y suelo esterilizado al control, la atenuación natural resulto el mejor tratamiento seguido de la bioaumentación con un (75%) de eficiencia y al último la bioestimulación.

Gentili *et al.* (2006) analizaron el potencial de la quitina y quitosano de copos obtenidos a partir de desechos de camarón como material de soporte para la degradación de hidrocarburos a partir de una cepa, esta cepa fue probada en microcosmos de agua de mar. En términos de porcentaje de remoción de petróleo crudo después de 15 días, los microcosmos tratados con los inoculantes inmovilizadas demostraron ser los más exitosos con un porcentaje de degradación del 60% en comparación con sus controles.

Algunos microorganismos, según Sharabí y Bartha (1993), pueden utilizar hidrocarburos del petróleo como alimento y fuente de energía; durante la biodegradación las bacterias oxidan el petróleo a dióxido de carbono, agua, energía y el 50% del carbono de petróleo es usado para biomasa bacteriana. En este estudio la degradación por BBD y MBBD es por la adición de bacterias degradadoras de hidrocarburos *Stenotrophomonas maltophilia* y *Aeromonas hydrophila*. El género *Stenotrophomonas*, ha sido reportado como un microorganismo que metaboliza hidrocarburos, perteneciente al grupo de proteobacterium (Mill *et al.*, 2003).

Juhasz *et al.* (2000) realizaron un estudio sobre la degradación microbiana y la detoxificación de TPH de bajo y alto peso molecular utilizando *Stenotrophomonas maltophilia*. Después de 42 días encontraron mayores porcentajes de degradación en los compuestos de bajo peso molecular como fluoreno 90%, fenantreno 91%, mientras fluoranteno y pireno entre 72-74%. Los PAHs de alto peso molecular como benzo antraceno, benzopireno, dibenzoantraceno y coroneno presentaron menores porcentajes de degradación entre 34-37% en 42 días de tratamiento.

Maldonado (2003), evaluó la atenuación natural de hidrocarburos de petróleo como supresores de polvo en carreteras sin pavimentar. En la evaluación encontraron que esta especie fue capaz de degradar los lodos aceitosos de alto peso molecular, los cuales son adicionados a las carreteras. Vallejo (2004), en su estudio sobre evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelo contaminado con petróleo encontraron que la especie predominante de sus seis cepas durante el estudio fue *Stenotrophomonas maltophilia* (34%), que mostro su amplia diversidad y capacidad metabólica para degradar una variedad de HC.

La densidad de microorganismos en el suelo es un factor primordial en el proceso de biorremediación. Se requiere una concentración mayor de 1×10^3 UFC/g para que se alcance una aceptable actividad biodegradativa por los microorganismos (Leahy y Colwell, 1990; EPA, 2000). En ecosistemas no contaminados las comunidades degradadoras de hidrocarburos constituyen menos del 0.1% y en ecosistemas contaminados forman el 85% de microorganismos viables, estas diferencias se dan por el grado de exposición y por la adaptabilidad de los microorganismos a los hidrocarburos del ambiente (Levin y Gealt, 1997; Roberts, 2000).

La densidad de microorganismos al inicio de los experimentos fue de 5.1×10^8 para la bacteria *Stenotrophomona maltophilia*, 2.0×10^8 para *Arenomona hydrophila*, 6.1×10^5 para el biodegradador y de 5.0×10^8 para la composta. Estas poblaciones superan lo recomendado por Leahy y Colwell.

El aumento de la población microbiana correspondía a la disminución en la concentración de HTP en los tratamientos testigos, bioestimulación, biodegradador y mezcla de bioaumentación de bacterias degradadoras en los 4 experimentos de las diferentes concentraciones de contaminación respectivamente, lo que indica que los microorganismos utilizan una porción del C suministrado por el combustible como una fuente de nutrientes potenciales. Mientras que en los tratamientos de bacterias *Aeromonas Hydrophila* hubo una disminución de la población con respecto a la población inicial en los experimentos 1 y 2, las

bacterias *Stenotrophomonas maltophilia* presentaron una disminución de la población con respecto a la población inicial en los experimentos 1, 3 y 4, la composta presento un aumento en la población solo en los dos primeros experimentos de contaminación mientras que para los últimos dos experimentos se observó una disminución de la población (tabla 8). Estos cambios podrían ser debido a las interacciones entre diversas poblaciones microbianas y los cambios resultantes en el medio ambiente.

Mac Naughton (1999), menciona que para suelos contaminados con hidrocarburos la cuenta de bacterias hidrocarbonoclastas es del orden de 10^6 UFC/g de suelo. En este trabajo se supera este valor ya que las poblaciones bacterias alcanzaron un valor de 9.78 y 9.49 log10. Stephen *et al.*, (1999), encontraron un incremento en el número de bacterias de 5.2×10^5 a 3.9×10^7 bacterias de suelo seco en un suelo contaminado por hidrocarburos. Muñoz *et al.* (2003) reportan que hay un aumento de bacterias hidrocarnoclastas en los primeros días de tratamiento de una biopila, lo cual sucedió en este trabajo ya que al finalizar los experimentos algunas poblaciones presentaron una disminución. Esto también podemos atribuirlo a la notable disminución de la temperatura al igual que pudo originarse por una menor tolerancia de las bacterias a los compuestos tóxicos del hidrocarburo.

10. Conclusiones.

- Las técnicas de Bioestimulación, Bioaumentación y la combinación de estas, favoreció la degradación de los hidrocarburos fracción pesada en los lixiviados.
- Los metales pesados presentes en el lixiviado no inhibieron la biodegradación del hidrocarburo.
- La temperatura ambiental del estado de Puebla afectó la degradación del contaminante.
- El tratamiento óptimo para la biodegradación de hidrocarburo en el lixiviado fue la bioaumentación con mezcla de bacterias degradadoras con un porcentaje de degradación de 89.72%

11. Bibliografía.

- Alexander, M. . (1994). Biodegradation and Bioremediation. San Diego, California. U.S.A.: Academic Press.
- Armendariz, B. Corral, O., Linares, L., García, F. y Vasquez, R.. (2004). Biostimulation of Microorganisms from sugarcane Bagasse Pith for the Removal of wethered Hydrocarbon from Soil. Letter in applied Microbiology. 38,373-377.
- Arroyo, M., Quesada, Y., Quesada R., Geocisa, Y. “Aplicación de Sistemas de Biorremediación de Suelos y Aguas Contaminadas por Hidrocarburos”. Div. Protección Ambiental de Suelos, España.
- Atagana, H.. (2004). Bioremediation of Creosote Contaminated Soil in South Africa by Landfarming. Journal of Applied Microbiology. 96, 510-520
- Atlas, R.. (1988). Biodegradation of Hydrocarbon in the Environment. Environmental Biotechnology. 45, 211-218.
- Atlas, R.M.. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: and environmental perspective. Microbial. Rev. 45, 180-209.
- Bajpai, R.; Zappi, M.E.; Gunnison.. (1991). Additives for establishment of biologically active zones during *in situ* bioremediation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 450-465.
- Baker, J.F. G.C. Patrick, y D. Major.. (1987). Natural Attenuation of aromatic hydrocarbons in a shallow sand aquifer. Ground water monitoring review 7, no. 1: 64-71. Citado por Bianchi-Mosquera, et al., (1994).
- Beltrami. Carolina.. (2001). La contaminación: El equilibrio en peligro, editoriales Longseller, Argentina.
- Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., y Frankenberger, W.T.. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96, 1049-1055.
- Blanno M. y U. Ruiz Saucedo.. (2007). Anexo 1: Análisis estadístico de las emergencias ambientales en suelos mexicanos durante el periodo 2003-

2006. Proyecto Gtz–SEMARNat: Residuos peligrosos y sitios contaminados. Informe final. México. (No publicado).
- Bossert, Y.; Bartha R. (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. En: Petroleum Microbiology, Atlas, R. M. Ed. Macmillan, New York, U.S.A. pp. 435 – 474.
 - Bouwer, E. J.; Zehnder, A. J. B.. (1993). Bioremediation of organic compounds-putting microbial metabolism to work. Trends in Biotechnology. 11, 360-367.
 - Cerniglia, C. E.. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3, 351 – 368.
 - Chang, R.. (1999). Química. 6ta. Ed. Mc Graw Hill, México, D.F. 995.
 - Chow, P.S.. (1987). Petroquímica y sociedad. La ciencia desde México. Secretaría de Educación Pública. México, D.F. 15 – 22.
 - Cookson, J. T. Jr.. (1995). Bioremediation Engineering. Design and application. McGraw Hill, Inc. U.S.A.
 - Cubillos Vargas J.A., Evaluación de la Fitorremediación como alternativa de tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburo, Universidad Tecnológica de Pereira, Octubre 2011.
 - Dalton, H.; Stirling, D. I.. (1982). Co-metabolism. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 297, 481-496.
 - Dobson, L. Wilson, H.A.. (1964). Respiration studies on soil treated with some hydrocarbons. Soil Science Society of America. Proc. 21, 536-539.
 - Ercoly, E., Galves, J., y Cantero, J.. (2002). Análisis y Evaluación de Parámetros Críticos en la biodegradación de hidrocarburos en el suelo. Laboratorio de bioprocesos. Facultad de Ingeniería. Universidad de Cuyo, Mendoza.
 - Eweis, J., Ergas, S., Chang, MD., y Schroeder, E.. (1999). Principios de Biorrecuperación. 1era Edición en español. Mac Graw Hill. España.
 - Eweis, J.B.; Ergas, S.J.; Chang, D. P. Y.; Schroeder, E.D.. (1998). Bioremediation principles. McGraw Hill Inc., Series in Water Resources and

Environmental Engineering, U.S.A. McGraw Hill Inc., Series in Water Resources and Environmental Engineering, U.S.A.

- Fernández, L.. (1995). Mecanismos d'halotolerance associes a la biodegradation d'un hydrocarbure (eicosane) chez une bactérie marine hydrocarbonoclaste. Tesis doctoral. Universite dáix Marseille II. Francia.
- Fernández, L., L. C., N. G. Rojas A., T. G. Roldán C., M. E. Ramírez I., H. G. Zegarra M., R. Hernández U., R. J. Reyes A., D. Hernández F., y J. M. Arce O.. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo. México. D.
- Freedman, B.. (1989). Environmental ecology: The impacts of pollution and other stresses on ecosystem structure and function. Academic Press, Inc. San Diego California. USA. 424.
- Gómez, O. D.. (2004). Recuperación de espacios degradados. 1°. Ed. Universidad Nacional de Colombia.
- Gentili, A., Cubitto, M.A., Ferrero, M., Rodriguez. M.S.. (2006). Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. International Biodeterioration y Biodegradation 57(2006) 222-228.
- Groudeva V.I., Grodev S.N. and Doycheva A.S.. (2001). Bioremediation of water contaminated with crude oil and toxic heavy metals. Int. J. Miner. Process. 62, 293–299.
- Hejazi, R. y Husain, T.. (2004). Landfarm Performance under Arid Conditions. 1. Conceptual Framework. Environmental Science and Technology. 38, 2449-2456.
- Juhasz, A. Stanley, G. y Britz, M.. (2000). Microbial Degradation and Detoxification of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Stenotrophomonas malthophilia* strain VAUN 10, 003. Letter in Applied Microbiology. 30, 396-401
- Kosaric, N.. (1993). Biosurfactants in industry. *Pure Appl. Chern.* 64, 1731-1737.

- Lang S.. (2000). Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr. Opin. Coll. Interface Sci.* 7, 12-20.
- Leahy, J. y Colwell, R.. (1990). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological reviews.* 54, 305-315.
- Levin, M. y Gealt M.. (1997). Biotratamiento de Residuos Tóxicos y peligrosos. 2º edición. Mc Graw Hill. España. Pag: 170-185.
- Maldonado, C.. (2003). Evaluación de la Atenuación Natural de Hidrocarburos del Petróleo como Supresores de Polvo en Carreteras sin Pavimentar. Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Ciencias Biológicas.
- Margensi, R. y Schinner, F.. (1999). Review Biological Decontamination of Oil in Cold Environments. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 74, 381-389.
- Margesin, R. y Schinner, F.. (1997). Efficiency of indigenous and inoculated Cold-Adapted Soil Microorganisms for Biodegradation of Diesel Oil in Alpine Soil. *Appl. and Environmental. Microbiology.* 63, 2660-2664
- Mill, D. K., Fitzgerald, K., Litchfield, C. D., Gillevet, P. M.. (2003). A comparison of DNA profiling techniques for monitoring nutrient impact on microbial community composition during bioremediation of petroleum contaminated soils. *J. Microbiol. Meth.* 54, 57-75.
- Muñoz A., Rojas, N., Roldán, T., Zaragoza D., Fernández, L.. (2003). Adición y residuos agrícolas una alternativa para la limpieza de un suelo contaminado con lodos de perforación Memorias de X Congreso de Biotecnología e Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco.
- Navarro, A.. (1995). Environmentally Safe Drilling Practices.
- Nilanjana Das and Preethy Chandran.. (2010). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview.
- NMX-AA-005-SCFI-2000, Análisis de agua - determinación de grasas y aceites recuperables en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - método de prueba

- NOM-001-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles del contaminante en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, ya que no se cuenta con una norma para los lixiviados obtenidos del suelo.
- Nyer, E. K.; Fam, S.; Kidd, D. F.; Johnsi, F. J.; Palmer, P. L.; Boettcher, G.; Crossman, T. L.; Suthersan, S. S.. (1996). *In situ* treatment technology. CRC Lewis Publishers, Inc. Boca Ratón, Florida, U.S.A. 63 -64.
- Ortiz, J. E., y M. J. García M.. (2003). Técnicas analíticas: identificación de familias de compuestos. *Industria y minería*. 351, 31-40.
- Osuji L.C. and Onojake C.M.. (2004). Trace Heavy Metals Associated with Crude Oil: A Case Study of Ebocha-8 Oil-Spill-Polluted Site in Niger Delta, Nigeria. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY*.1:1708-1715.
- Pardo, J., Perdomo, M., Benavides, J. "Efecto de la Adición de Fertilizantes Inorgánicos Compuestos en la Degradación de Hidrocarburos en Suelos Contaminados con Petróleo". NOVA publicación científica ISSN: 1794-2370. Vol. 2, N° 2 (2004) 1-108.
- Park, K. S.; Sims, R.C.; Dupont, R. R.. (1990). Transformation of PAHs in soils systems. *J. Environ. Eng.* 116(3): 632-640.
- Pliege, M. J.. (1948). Some effects of crude petroleum on soil fertility. *Sociedad Americana de Ciencias del Suelo. Prpc.* 14, 413- 416.
- Randy. H., Dominguez. V., Garcia. L.. (1999). Potencial de Biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano, *Terra* Vol. 17, Num 2, Mexico, D.F.
- Riser-Roberts, E.. (1998). Remediation of petroleum contaminated soils. Biological, Physical and Chemical processes. Lewis Publishers, 542pp. Boca Raton, Florida, U.S.A.
- Rittman, E. y Mccarty L.. (2001). *Biotecnología del medio ambiente, principios y aplicaciones*. 6a Edición. Graw Hill. Madrid, España.
- Roberts, E.. (2000). Remediation of Petroleum Contaminated Soils. Biological, Physical and Chemical Processes. 1a Edition. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida. Pp: 263-300.

- Rosenberg E, Ron E.. (1999). High- and low-molecular- mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 154-162.
- Sarkar D., Ferguson M., Datta R., Birnbaum S.. (2004). Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution* 136(2005) 187-195.
- Sigiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T., y Harayama, S.. (1996). Physicochemical and biodegradability of crude oil. *Environmental science y technology*, 31(1), 45-51.
- Silva, E., Fialho, A., Correia, I., Burns, R. y Shaw, L.. (2004). Combined Bioaugmentation and Biostimulation to Cleanup Soil Contaminated with High Concentrations of Atrazine. *Environmental Science Technology*. 38:632-637.
- Sharabi, N.E.-D. y R. Bartha.. (1993). Testing some assumptions about biodegradability in soil as measured by carbon dioxide evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1201-1205.
- Stephen, J. R., Chang, Y- J., Gan, Peacock, A., Ptiffner, S., Barcelona M. J., White D., Macnaughton, S.J.. (1999). Microbial Characterization of a JP-4 fuel contaminated site using a combination lipid biomarker-polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)- based approach. *Environ. Microbiol.* 1: (3) 231-241.
- Straube, L. Nestler, C., Hansen, L., Ringelberg, D., Pritchard, P. y Jones-Meehan, J.. (2003). Remediation of Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) through Landfarming with Bioestimulation and Bioaugmentation. *Acta Biotechnology*. 23:179-196.
- Torsvik, V.; Overas, L.. 82002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Science* 5, 240-245.
- Vallejo, V.. (2004). Evaluación de la Bioestimulación (Adición de nutrientes) en la Biodegradación de TPH en un Suelo Contaminado con Petróleo. Tesis de Maestría, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Facultad de Ciencias.

- Vallejo, V., Salgado, L., y Roldán, F.. (2005). “Evaluación de la Bioestimulación en la Biodegradación de TPHs en Suelos Contaminados con Petróleo”. Rev. Col. Biotec. Vol. VII, N° 2 67-78.
- Velasco, J., Volke. T.. (2003). El composteo: Alternativa Tecnológica para la Biorremediación de suelos en México, Gaceta Ecológica, enero-marzo, num 066, Instituto Nacional de Ecología, México, D.F.
- Volgel, T. M.. (1996). Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. Curr. Opin. Biotechnol. 7:311-316.
- Volke. T., Velasco. J.. (2002). Tecnologías de Remediación para suelos contaminados, INE-SEMARNAT, México.
- Wacket, L. P.; Brusseau, G.A.; Hueseholder, S.R.; Hansen, R. S.. (1989). Survey of microbial oxygenases: Trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria, Appl. Environ. Microbiol. 55: 2960-2964.

11.1. Páginas web

- CNH. (2014). Reporte de Derrames de Petróleo Crudo 2000-2014. 2014, Mayo 30, de CNH Sitio web: [http://www.cnh.gob.mx/docs/Reporte de volumen de petroleo crudo de ramado y fugas de gas natural I 2014.pdf](http://www.cnh.gob.mx/docs/Reporte_de_volumen_de_petroleo_crudo_de_ramado_y_fugas_de_gas_natural_I_2014.pdf)
- EPA. (2000). Landfarming. 2015, Febrero 20, de EPA Sitio web: <http://www.epa.gov/swerust1/cat/lanfarming.htm>
- Galán C. Patricia. (2013). Contaminación Petrolera. 20 septiembre de 2015, de Ambiente Ecológico Sitio web: www.ambiente-ecologico.com/revist30/contpe30.htm
- PEMEX. www. [En línea]. Boletines de Prensa. 2002. [Fecha de consulta: 10 de mayo de 2015]. Disponible en <http://www.pemex.com/index.cfm?action=news§ionID=8&catID=40&contentID=269>.
- PEMEX. www. [En línea]. 2014. [Fecha de consulta: 30 abril de 2015]. Disponible en <http://www.ri.pemex.com/files/content/Glosario%2020101221.pdf>

- PEMEX. [En línea]. Recuperado el 24 de Abril de 2012. 2014. [Fecha de consulta: 15 de mayo de 2015]. Disponible en <http://www.ri.pemex.com/index.cfm>

12. ANEXO

12.1 Medios de cultivo

Conteo Microbiológico	Medio	Composición para 1 L.
Bacterias	Agar nutritivo	• Caldo nutritivo 8 g • Agar bacteriológico 16 g
Hongos	Papa Agar Dextrosa	• Papa picada en cubos 200g • Dextrosa 20 g • Agar bacteriológico 16 g • pH. 5.5
Actinomicetos	Rojo Congo	• Ácido málico 5 g • K_2HPO_4 (10%) 5 ml • $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (10%) 2 ml • NaCl 0.1% 1ml • Extracto de levadura 0.5 g • $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 1 ml • KOH 4.8 g • Agar bacteriológico 16 g • Rojo congo (1:400) 18 ml • pH 7
Microorganismos hidrocarbonoclastos	HB	• $MgSO_4$ 1M 1.66 ml • $CaCl_2$ 1M 0.18 ml • K_2HPO_4 1 g • KH_2PO_4 1 g • NH_4NO_3 1 g • $FeCl_3$ 1% 5 ml • Ácido gluconico 1 g • Melasa 5 ml • Sulfato de zinc 10 mg/L • Cloruro de cobalto 10 mg/L • Sulfato de cobre 10 mg/L • Levadura 0.3 g • pH 7
Levaduras	Extracto de malta	• Extracto de malta 20 g • Peptona de soya 3 g • Agar bacteriológico 16 g
Bacterias	Agar soya tripticaseina (TSA)	• Agar soya tripticaseina 40 g • Agar bacteriológico 16 g

Solución Buffer de Fosfatos.

Reactivos Químicos	1L de H ₂ O
K ₂ HPO ₄	2.1772 g
KH ₂ PO ₄	1.7008 g
pH	7.0

Demanda Bioquímica de Oxígeno

El método se basa en medir la cantidad de oxígeno que requieren los microorganismos para efectuar la oxidación de la materia orgánica presente en aguas naturales y residuales y se determina por la diferencia entre el oxígeno disuelto inicial y el oxígeno disuelto al cabo de cinco días de incubación a 20°C. Revisar NMX-AA-028-SCFI-200.

Demanda química de oxígeno.

Una gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos son oxidados con una mezcla de ácido crómico y sulfúrico a ebullición. La muestra se coloca a reflujo en una disolución de ácido fuerte con un exceso conocido de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇). Después de la digestión, el dicromato no reducido se mide por titulación o espectrofotométricamente para determinar la cantidad de dicromato consumido y calcular la materia oxidable en términos de oxígeno equivalente. Revisar NMX-AA-030-SCFI-2001.

12.2 Anexo fotográfico



Fig. 1. *Aeromonas hydrophila*

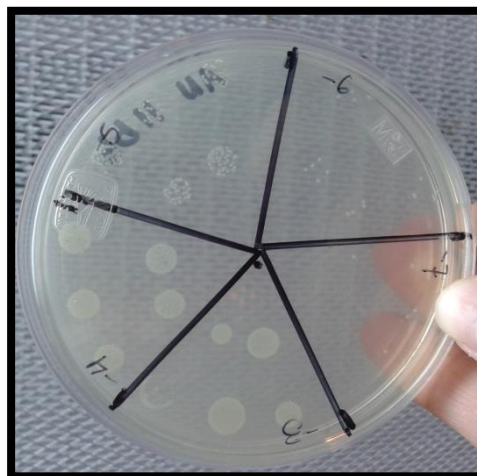


Fig.2. *Stenotrophomonas maltophilia*



Fig.3. Cepas bacterianas encontradas en el biodegradador.



Fig. 4 *Aeromonas hydrophila* y *Stenotrophomonas maltophilia*.



Fig.5. Extracción de HC por el método soxhlet.



Fig.6. Extracción de HC por el método soxhlet.