



**INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR
DE ÁLAMO TEMAPACHE**

TITULACIÓN INTEGRAL

TESIS PROFESIONAL

*REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES MEDIANTE
BACTERIAS AISLADAS DE LA LAGUNA
TAMPAMACHOCO EN TUXPAN, VERACRUZ.*

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO AMBIENTAL**

PRESENTA

KARLA MARÍA VÁZQUEZ VIDAL

DIRECTOR DE TESIS

DR. LEANDRO CHAIRES MARTÍNEZ

Agradecimientos

A Dios, por haberme dado la sabiduría y la fortaleza para que fuera posible culminar con mis estudios de licenciatura.

Al Dr. Leandro Chaires Martínez, asesor de tesis, por permitirme realizar mis prácticas profesionales en el Centro de investigación en Alimentos y Ambiental (CIAA) del cual está a cargo, así como por su dedicación, sus enseñanzas y apoyo incondicional en la realización del presente proyecto.

Al M.B. Alejandro Cruz Hernández y M.C.A. Nancy D. Hernández Castellanos ya que por medio de sus observaciones se enriqueció y fortaleció este trabajo de tesis.

A Gil Antonio Gómez Azuara por ser un excelente compañero de vida y de carrera profesional, compartiendo así, gratos momentos en nuestra vida personal y académica.

A mi hija Renata Itzaé Gómez Vázquez por ser mi máxima inspiración para la culminación del presente proyecto y pilar fundamental para mi superación profesional.

A mis padres Edith del Carmen Vidal Espinoza, Saúl Leonardo Torralva Salazar y Faustino Vázquez Cruz, por su apoyo incondicional a lo largo de mi desarrollo académico y personal.

A mis compañeros de proyecto Karla Cristina Mar Cayetano y Gil Antonio Gómez Azuara, por su compromiso y dedicación durante el desarrollo del mismo.

Agradezco finalmente, a todo el cuerpo docente que participo en mi desarrollo profesional, así como al Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache por permitirme llevar a cabo mis estudios de licenciatura.

Dedicatoria

A mi madre

Por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo y ser el pilar fundamental en mi desarrollo personal y académico.

"Mi madre es la mujer más bella que he conocido. Todo lo que soy, se lo debo a mi madre. Atribuyo todos mis éxitos en esta vida a la enseñanza moral, intelectual y física que de ella he recibido". George Washington-

Índice

I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
2.1 Contaminación ambiental	3
2.2 Hidrocarburos y su clasificación.....	4
2.2.1 Hidrocarburos Alifáticos:.....	4
2.2.2 Hidrocarburos aromáticos no halogenados o cíclicos	5
2.2.3 Destilados del petróleo	6
2.3 Fuentes de hidrocarburos	6
2.4 Impactos ambientales de los hidrocarburos	7
2.4.1 Contaminación del suelo con hidrocarburos	7
2.4.2 Contaminación del agua con hidrocarburos	7
2.4.3 Implicaciones a la salud humana.....	8
2.5 Degradación de hidrocarburos por microorganismos	8
2.6 Bacterias hidrocarburolíficas	9
2.6.1 Tipos de bacterias hidrocarburolíficas.....	10
2.7 Métodos de biorremediación.....	13
2.8 Antecedentes sobre estudios realizados con bacterias hidrocarburolíficas.....	15
2.8.1 Estudios realizados para la degradación de hidrocarburos con bacterias hidrocarburolíficas.....	15
2.8.2 Estudios de bacterias hidrocarburolíficas aisladas	17
III. Planteamiento del problema	20
IV. Justificación.....	21
V. Hipótesis	22
VI. Objetivos	22
6.1 Objetivo general:.....	22
6.2 Objetivos específicos:	22
VII. Área de estudio.....	23
VIII. Metodología.....	24
8.4 Métodos Experimentales.....	24

Fase I: Aislamiento bacteriano.....	24
8.4.1 Obtención de la muestra.....	24
8.4.2 Aislamiento de la cepa	24
8.4.3 Purificación de la cepa	25
8.4.4 Producción de la biomasa.....	26
8.4.5 Preparación de medio de cultivo	26
8.4.6.- Inoculación bacteriana	26
8.2.5 Resiembra de la cepa.....	26
Fase II: Creación de biofilm	27
8.4.6 Preparación del medio nutritivo	27
8.4.7 Comprobación de la adhesión bacteriana.....	27
Fase III: Degradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP'S) en reactor de lecho empacado.	28
8.4.8 Preparación de Biofilm y medios de cultivo	28
8.4.9 Ensamble del reactor de lecho empacado	28
8.4.10 Curva Patrón.....	29
8.4.11 Extracción de HTP'S por arrastre con hexano	29
8.4.12 Determinación de HTP'S.....	29
IX. Resultados	30
9.1 Producción de biomasa	30
9.2 Identificación taxonómica.....	31
9.3 Generación del biofilm	32
9.4 Degradación de HTP'S en reactor de lecho empacado.....	33
X. Discusiones	34
XI. Conclusiones	37
XII. Recomendaciones.....	38
Bibliografía.....	39

Índice de figuras

Fig. 1 Clasificación de los hidrocarburos.	4
Fig. 2 Bacteria Rhodococcus visualizada en el microscopio.....	10
Fig. 3 Bacteria Nocardia sp.	11
Fig. 4 Pseudomonas aeruginosa	12
Fig. 5 Bacteria Pseudomonas fluorescens	12
Fig. 6 Esquema del funcionamiento del bioventeó.	14
Fig. 7 Técnica de bioestimulación	14
Fig. 8 Bacillus sphaericus utilizados en la técnica de bioaumentación.	15
Fig. 10 Extracción de la muestra.	24
Fig. 11 Sedimentos inoculados.	25
Fig. 12 Purificación de la cepa.	25
Fig. 13 Cuantificación de biomasa en espectrofotómetro.	26
Fig. 14 Cepas seleccionadas para su identificación.....	27
Fig. 15 Propagación del biofilm.	27
Fig. 16 Inoculación para el biofilm.	28
Fig. 17 Columna vertical empacada con piedras de pecera.....	29
Fig. 18 Selección de muestras por producción de biomasa.....	30
Fig. 19 Cepas enviadas para identificación	31
Fig. 20 Tinción de Gram de bacterias aisladas.	31
Fig. 21 Formación de biofilm en piedras de pecera.	32
Fig. 22 Demostración visual de la degradación de los HTP'S.	33
Fig. 23 Curva patrón de gasolina vs hexano.....	33

Índice de tablas

Tabla 1. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en el suelo 8

Tabla 4 Composición química del medio de cultivo Bushnell-Hass;**Error! Marcador no definido.**

Tabla 5 Identificación taxonómica.**Error! Marcador no definido.**

Resumen

Las bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en ecosistemas marinos y terrestres, desempeñan un papel importante en el tratamiento de agentes contaminantes del medio ambiente, siendo esenciales para prevenir, controlar y restaurar ecosistemas afectados por contaminantes como el petróleo. En el presente proyecto, se realizó la remoción de HTP's empleando bacterias autóctonas de la laguna de Tampamachoco en Tuxpan, Ver.

Para realizar el aislamiento bacteriano se utilizó el medio de cultivo Bushnell Hass y diesel como única fuente de carbono y energía. Para la purificación de las cepas, se utilizó caldo nutritivo y agar, sobre el cual se inocularon las bacterias y se mantuvieron incubadas a una temperatura de 30°C por un periodo de 72 horas, dicho proceso se repitió por tres generaciones, obteniendo un crecimiento constante de biomasa en tres cepas; Restauración_A, Hidrocarburos_B y Restauración_C, las cuales fueron identificadas en el Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional como *Bacillus Cereus* con un 99% de identidad y *Bacillus Sp.* con 100% de identidad.

Con las bacterias previamente aisladas se procedió a la generación de un biofilm, para ello se realizó un cultivo sucesivo en seis matraces con caldo nutritivo y piedras de pecera inoculadas con las bacterias *Bacillus Cereus* y *Bacillus Sp.*, posteriormente, se preparó el medio sólido, utilizando caldo nutritivo y agar, en dicho medio se colocó una piedra inoculada y se incubó por un lapso de 72 horas a 30°C., teniendo como resultado la propagación de la comunidad bacteriana en las piedras de pecera, las cuales simulan el medio rocoso de la zona estuarina. Finalmente, para la evaluación de la capacidad hidrocarburohídrolítica de las bacterias, se introdujeron piedras de pecera inoculadas en un reactor de lecho empacado, las cuales fueron utilizadas como medio de soporte en un sistema de recirculación, en el cual se adicionó 30 mL de diésel, en un periodo de 96 horas, obteniendo una degradación de hidrocarburos del 58%.

Palabras clave: Aislamiento, inoculación, purificación, biomasa, degradación.

I. Introducción

La laguna de Tampamachoco se localiza en la costa de Veracruz a 9 kilómetros al Noreste de la ciudad de Tuxpan, es una de las lagunas del Golfo de México más ricas en especies de peces, moluscos, crustáceos y gran diversidad de flora. Su valor radica en sus características hidrológicas y ecológicas e interrelación con otros ambientes costeros, así como por su uso, manejo y aprovechamiento por el hombre. Esta zona es de forma alargada y paralela a la línea de la costa, la Laguna tiene una longitud de 10.6 kilómetros y una anchura de 2.7 kilómetros, cerrada hacia el Golfo de México por una barrera arenosa, llamada Barra Galindo.

Actualmente la laguna de Tampamachoco es un sitio que se ha visto afectado de manera paulatina por el derrame de hidrocarburos y residuos industriales, provocando que esta zona sea un foco de contaminación latente, afectando directamente al suelo, cuerpos de agua adyacentes, así como la flora y fauna autóctonas. Cabe destacar que los hidrocarburos constituyen uno de los grupos de contaminantes ambientales más importantes, tanto por su abundancia, como por su persistencia en distintos ambientes. Por lo que se ha llevado a crear alternativas para la limpieza de sitios contaminados con hidrocarburos empleando diversos tratamientos fisicoquímicos y de biorremediación.

Las técnicas de biorremediación son rentables, benéficas para el ambiente, y pueden llegar a degradar completamente el contaminante mediante la aplicación metabólica de los sistemas biológicos, para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos. La utilización de bacterias con capacidad hidrocarburofítica es ampliamente usada en este proceso. Estas emplean varias rutas metabólicas para la transformación total de las moléculas orgánicas en dióxido de carbono (CO_2), agua (H_2O), y algunos residuos inorgánicos inertes.

Mediante estas rutas de degradación, el contaminante orgánico funciona como donador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia necesaria para la biomasa microbiana, contribuyendo en la restauración de la zona contaminada, puesto que la degradación microbiana constituye el principal proceso de descontaminación natural.

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se llevó a cabo un aislamiento de bacterias hidrocarburohílicas de la Laguna de Tampamachoco para la biorremediación de sedimentos estuarinos, lo cual sería un parteaguas para la recuperación del ecosistema y aplicación en otras zonas que presenten la misma problemática.

II. Antecedentes

2.1 Contaminación ambiental

En México, la cobertura de los ecosistemas naturales del país se redujo 62% con las mayores pérdidas en las zonas tropicales. De acuerdo con el Inventario Nacional de Emisiones (INEM), en el país se emiten más de 40.5 millones de toneladas de contaminantes a la atmósfera. Los indicadores de calidad del agua muestran que 73% de los cuerpos de agua del país están contaminados; el 80% de las descargas de centros urbanos y 85% de las descargas industriales se vierten directamente en ellos sin tratamiento previo (Margesin, 2001).

Actualmente uno de los principales problemas ambientales se presenta en las áreas marinas y costeras del Golfo de México debido a contaminantes proveniente de los asentamientos humanos, las actividades agrícolas, turísticas o industriales; así como de la extracción, procesamiento y transporte de petróleo y gas (Rivera, 2006). El océano constituye un ecosistema muy dinámico y complejo, que el hombre está destruyendo con contaminantes químicos, llegando a comprometer la trama alimentaria del medio marino (Margesin, 2001).

2.1.1 Contaminación en zonas estuarinas

Los estuarios son ecosistemas abiertos, en donde los ríos se encuentran con el mar. Su característica fundamental es la variación en la salinidad, que cambia con las mareas y la distancia a la costa (Day, 2012).

La utilización inadecuada de estos sitios ha ocasionado efectos adversos debido a contaminación por pesticidas, desechos domésticos y variados contaminantes industriales como metales pesados e hidrocarburos, provocando una perturbación en su balance natural, amenazando su integridad (Farombi, 2007).

La destrucción de las áreas productoras de materia orgánica en el ambiente estuario (pastos marinos, o bosques de manglar), disminuye la productividad del sistema y limita directamente su potencial productivo de especies de importancia comercial como peces, crustáceos y moluscos. Así como la construcción de carreteras, diques, drenajes y estructuras para diversificación de aguas, ya que generan disminución de la escorrentía de

agua dulce que llega a los manglares, incrementan la salinidad y reducen el aporte de nutrientes y sedimentos (Kakabadse, 2000).

La deforestación extensiva, escorrentía de pesticidas, sobrecarga de contaminantes y sedimentación excesiva, originada por dragado o uso de tierras cuenca arriba, contribuyen a la pérdida de la biodiversidad de la zona (GESAMP, 2007).

2.2 Hidrocarburos y su clasificación

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos formados únicamente por átomos de carbono e hidrógeno. La estructura molecular consiste en un armazón de átomos de carbono a los que se unen los átomos de hidrógeno dependiendo del tipo de hidrocarburo. (Chappin, 1998).

En su mayor parte, los hidrocarburos provienen del petróleo. Esto se debe a que el petróleo es el resultado de la descomposición de materia orgánica y por lo tanto ofrece gran cantidad y concentración de carbono e hidrógeno. Y se clasifican (Fig. 1) en 4 grupos (Setti, 1993):

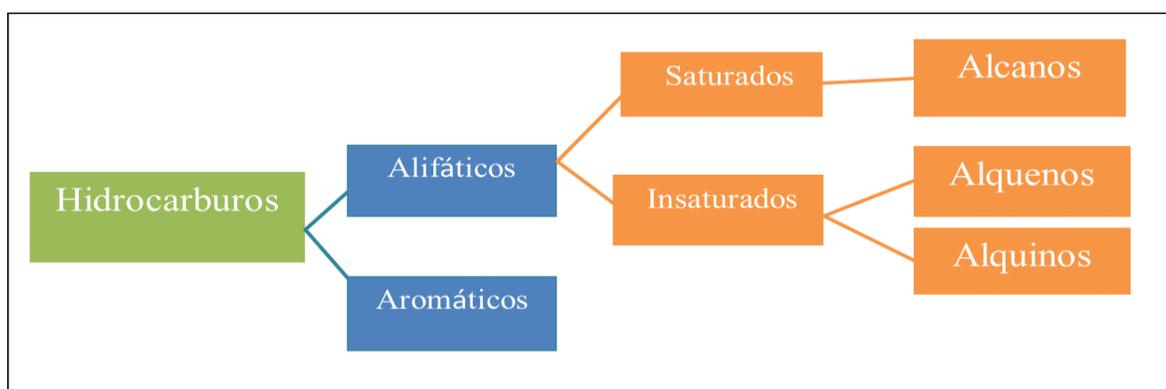


Fig. 1 Clasificación de los hidrocarburos.

2.2.1 Hidrocarburos Alifáticos: Llamados también de cadena lineal están formados por cadenas de carbonos saturados parcial o totalmente con hidrogeno con o sin ramificaciones. Los más conocidos son el metano, propano y butano formados por cadenas de 1, 3 y 4 carbonos conocidos como de cadena corta. Los hidrocarburos de cadena larga: constan de 5 o más átomos de carbono reciben su nombre según el número de ellos, pentano, hexano, octano (Wade, 2004).

Dentro de esta clasificación se encuentran:

- **Hidrocarburos saturados:** Es la forma más simple de hidrocarburos y están formados únicamente por enlaces sencillos que se hallan saturados con átomos de hidrógeno (McMurry, 2001).

Se subdividen en:

- ✓ **Alcanos:** Son compuestos formados por carbono e hidrógeno que sólo contienen enlaces simples carbono – carbono. Cumplen la fórmula general C_nH_{2n+2} , donde n es el número de carbonos de la molécula (Hayama, 2004).
- **Hidrocarburos insaturados:** Pueden presentar uno o más, dobles o triples enlaces entre carbono y carbono. Aquellos que presentan doble enlace se les conocen como alquenos. Si presentan un triple enlace se les conocen como alquinos (McMurry, 2001).

Se subdividen en:

- ✓ **Alquenos:** Son hidrocarburos que contienen enlaces dobles carbono-carbono. Se emplea frecuentemente la palabra olefina como sinónimo, abundan en la naturaleza y tienen la fórmula empírica general C_nH_{2n} (Sánchez, 2003).
- ✓ **Alquinos:** Son hidrocarburos que contienen enlaces triples carbono-carbono. La fórmula molecular general para alquinos acíclicos es C_nH_{2n-2} y su grado de insaturación es dos. El acetileno o etino es el alquino más simple, fue descubierto por Berthelot en 1862 (Sánchez, 2003).

2.2.2 Hidrocarburos aromáticos no halogenados o cíclicos

Contienen en su estructura un anillo la mayoría de las veces de tipo bencénico, los principales representantes son: el benceno y el tolueno, que se utilizan en la fabricación de detergentes y explosivos. Ambos son líquidos volátiles liposolubles de fácil absorción por las mucosas. Su contacto agudo ocasiona irritación de la piel y mucosas (Harayama, 1999).

2.2.3 Destilados del petróleo

Dentro de este grupo de hidrocarburos se incluye una amplia gama de productos obtenidos de la destilación o fraccionamiento del petróleo crudo. Incluye principalmente gasolina, aceites lubricantes, queroseno y combustibles líquidos. La importancia epidemiológica de estos productos radica en la gran disponibilidad doméstica de ellos (Berger & Anderson, 1999)

2.3 Fuentes de hidrocarburos

Los hidrocarburos comprenden una amplia variedad de compuestos químicos que tienen distintos orígenes. Una vez liberados al ambiente, estos pueden distribuirse en el agua, suelo y sedimentos. Aunque el origen es muy diverso se pueden diferenciar los siguientes (Bedair & Saad, 1992):

- **Hidrocarburos antrópicos:** Son introducidos como resultado de la actividad humana. Los procesos de combustión industrial contribuyen con niveles altos, debido al humo generado por carbón, combustibles fósiles y petróleo refinado, las descargas de aguas municipales, las actividades de transporte y los derrames son algunas de las principales fuentes de estos contaminantes (Bidleman & Castleberry, 1990).

- **Hidrocarburos biogénicos:** Son sintetizados casi por todas las plantas, animales terrestres y marinos, incluyendo a la microbiota, bacterias, plancton marino, diatomeas, algas y plantas superiores (Bedair & Saad, 1992).

- **Hidrocarburos diagenéticos:** Provenientes de una transformación microbiana o química que ocurre en los sedimentos a partir de moléculas biogénicas precursoras como terpenos, esteroides, carotenos (Benlahcen & Chaoui, 1997).

Se reconoce que los hidrocarburos diagenéticos constituyen principalmente a los alifáticos, cicloalcanos, esteroides, triterpenos pentacíclicos y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), siendo estos los más importantes (Acuña & Pucci, 2010).

Los HAPs, se encuentran distribuidos en el suelo, mar, sistemas pluviales y sedimentos y su presencia se ha atribuido principalmente a los derrames de petróleo y descargas de plantas petroquímicas (Labana & Kapur, 2007).

2.4 Impactos ambientales de los hidrocarburos

En la actualidad uno de los problemas ambientales más importantes es la contaminación de ecosistemas terrestres y acuáticos por hidrocarburos y sus derivados (Pardo & Benavides, 2004). Esta contaminación surge debido a los accidentes que ocurren en la industria petrolera, como derrames de tanques, ruptura de tuberías y extracción de pozos (Fernández & Hernández, 2006).

2.4.1 Contaminación del suelo con hidrocarburos

Cuando ocurre un derrame de petróleo, se produce un efecto negativo de los hidrocarburos sobre la vegetación de manera directa ocasionando la muerte y de manera indirecta afectando las condiciones físicas del suelo alterando principalmente su fertilidad (Pettenello & Feldman, 2012).

La afectación cuando ocurre un derrame está asociada al impedimento que se genera en el suelo para que pueda realizar adecuadamente el intercambio gaseoso con la atmósfera, dando lugar a que ocurran procesos físico-químicos simultáneos como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida provocaría mayor toxicidad. En igual sentido se afecta la población de microorganismos, dado que se modifica la salinidad, por lo cual se entorpece el proceso biorremediador, debido a que gradientes altos de salinidad destruyen la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizan las enzimas y deshidratan las células, lo cual es letal para la fauna microbiana (Kumaran & Robinson, 2000).

2.4.2 Contaminación del agua con hidrocarburos

Cuando se impacta el agua, se forma sobre la superficie una mancha o película generada por el hidrocarburo, flotando sin mezclarse por diferencia de densidades, impidiendo la entrada de luz y el intercambio gaseoso, dando inicio a la solubilización de compuestos hidrosolubles, afectado el plancton en primera instancia, posteriormente los macroinvertebrados y finalmente afecta los bentos o población que habita el fondo de ríos y quebradas (Bento & Camargo, 2003).

2.4.3 Implicaciones a la salud humana

Se generan cuando el hidrocarburo que tiene características corrosivas, explosivas, inflamables y tóxicas contamina el suelo y cuerpos de agua, ingresando finalmente al organismo a través de los sistemas de acueducto, razón por lo cual la Agencia de Protección Ambiental (USEPA) de EEUU clasifica los hidrocarburos y sus derivados como contaminantes primarios y sus límites máximos permisibles se describen en la Tabla 1 (Miranda & Restrepo, 1999).

Tabla 1. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en el suelo

Fracción de hidrocarburos	Usos del suelo predominante (mg kg base seca)		
	Agrícola	Residencial	Industrial
Ligera	200	200	500
Media	1.200	1.200	5.000
Pesada	3.000	3.000	6.000

2.5 Degradación de hidrocarburos por microorganismos

La degradación de los hidrocarburos por microorganismos se basa en su capacidad de aceptar como sustrato sustancias orgánicas para transformarlas en compuestos menos tóxicos, o inocuos y/o eliminarlos de forma total produciendo CO₂, agua y biomasa microbiana. El resultado del proceso de biorremediación depende de las características de la población microbiana (biomasa, actividad enzimática, diversidad de la población, tipo de metabolismo), características del sitio (nutrientes, donadores y receptores de electrones, condiciones ambientales inhibitoras, pH, temperatura, etc.) y características del sustrato (estructura química del contaminante, toxicidad, solubilidad y concentración del contaminante). Estos factores determinan si es necesario un periodo de aclimatación del microorganismo y son indicadores del mecanismo de degradación del contaminante y si éste servirá como sustrato primario, secundario o co-metabólico (Boopathy, 2000)

Dependiendo de la complejidad de cada fracción del petróleo crudo, es la facilidad de degradación que poseen los microorganismos. Al derramarse en el suelo los hidrocarburos inician procesos fisicoquímicos que al ser lentos, aumentan su toxicidad. Debido a su alta salinidad su tratamiento es complicado, pues los microorganismos utilizados mueren por deshidratación al no metabolizarlas (De Mesa & Cáceres, 2006).

Es importante mencionar que los microorganismos pueden degradar los hidrocarburos, utilizándolos como fuente única de alimento, o bien mediante el co-metabolismo: pueden alimentarse de otras moléculas como azúcares y proteínas y al mismo tiempo, de los hidrocarburos presentes en el medio (Solanas, 2009). Los hidrocarburos en el ambiente son degradados principalmente por bacterias y hongos que poseen la capacidad peroxidasa y oxigenasa que facilitan la degradación de los mismos mediante ataques secundarios (Rich & Myrold, 2003).

2.6 Bacterias hidrocarburohíticas

Ambientalmente, las bacterias son muy importantes, pues tienen la capacidad de transformar una gran variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos a sustancias inocuas, que pueden ser reciclados al medio ambiente. Aquellas bacterias disponen de la capacidad de oxidar una gran cantidad de compuestos orgánicos producidos y utilizados industrialmente. Se estima, que de todos los microorganismos presentes en el suelo, las bacterias son aquellas que se presentan en un mayor número y también las más importantes en la degradación de hidrocarburos (Hayama, 2004).

El fundamento de la degradación bacteriana de hidrocarburos, se basa en la utilización de estos por los microorganismos como fuente de carbono y energía. Los hidrocarburos en efecto, proveen de alimento a ciertas bacterias y microorganismos. El aislamiento y selección de bacterias a través de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivos puros ricos en petróleo crudo, es una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y sobrevivencia de cepas tolerantes a concentraciones altas de petróleo (Ríos, 2005).

2.6.1 Tipos de bacterias hidrocarburohíticas

2.6.1.1 Rhodococcus

Son bacterias aerobias, Gram positivas (Fig. 2), inmóviles, cuyas características bioquímicas son la acumulación de metales pesados y una gran variedad de vías metabólicas para la degradación y modificación de compuestos aromáticos. Es una de las bacterias más explotadas en bioprocesos no convencionales, consistente en microorganismos que presentan una gran diversidad metabólica, capaz de transformar, biodegradar y utilizar como única fuente de carbono compuestos hidrófobos (Correa & Záchia, 1999).

Cabe destacar, su capacidad de crecimiento en medios con escasos nutrientes, así como la carencia de un sistema de represión catabólica y su persistencia ambiental, las hacen excelentes candidatas para los tratamientos de biorremediación (Finnerty, 1992).

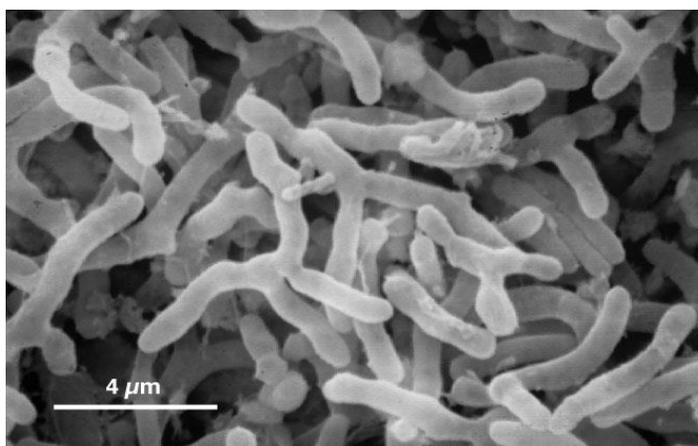


Fig. 2 Bacteria Rhodococcus visualizada en el microscopio.

2.6.1.2 Gordona y Nocardia sp

Son otros microorganismos (Fig.3) reportados como capaces de utilizar el dibenzotiofeno (DBT) como fuente de azufre. Dentro de las aplicaciones industriales y ambientales, se incluye la producción de ácido acrílico, conversión de esteroides, biorremediación de hidrocarburos clorados y fenoles, a lo que se añade su gran capacidad de degradar hidrocarburos alifáticos halogenados y numerosos compuestos aromáticos, como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PHA's) (Eriksson & Mohn, 2003).

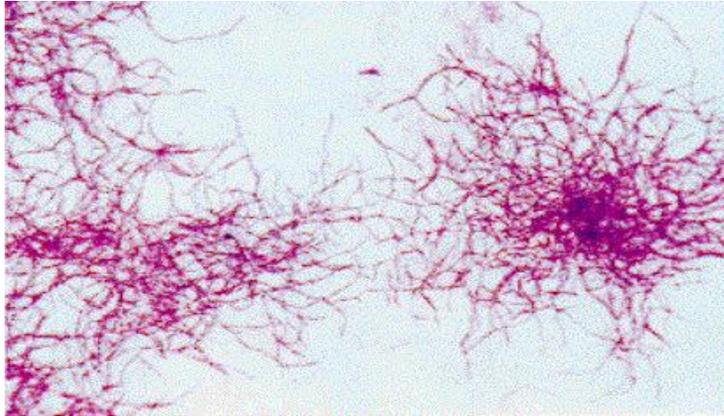


Fig. 3 Bacteria Nocardia sp.

2.6.1.3 Pseudomonas

Son bacterias productoras de biosurfactantes como los ramnolipidos involucrados en procesos de remoción de aceites y productos relacionados, Bushnell y Hass fueron de los primeros en describir bacterias productoras de biosurfactantes, como el *Corynebacterium simplex* y cepas de *Pseudomonas*. Y poseen la habilidad de utilizar diversos substratos, incluyendo aquellos creados por el petróleo (Nelson & Gill, 2002).

2.6.1.4 Pseudomonas aeruginosa

Es otro de los microorganismos más usado y estudiado en biorremediación y presenta una serie de actividades naturales sobre xenobioticos. Lamentablemente, también es conocida por ser un patógeno oportunista en humanos y causante de complicaciones graves en personas inmunosuprimidas, con quemaduras severas o con fibrosis quística (Rockne & James, 2002).

Sin embargo los estudios con relación al desempeño metabólico de la *Pseudomona saeruginosa* (Fig. 4) ha permitido identificarla como degradadora de gran cantidad de sustratos como el n-hexadecano, mineralización de compuestos alifáticos en condiciones anaerobias y degradadora de hidrocarburos aromáticos y poli-aromáticos, así como del pireno en estudios *in vitro* (Fan & Kwang, 2003).

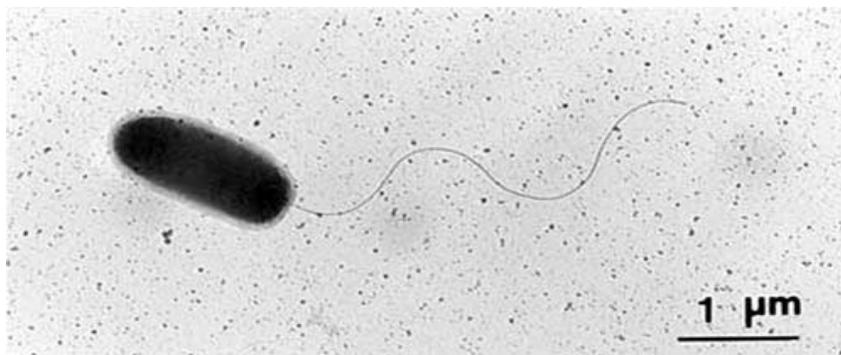


Fig. 4 *Pseudomonas aeruginosa*

2.6.1.5 *Pseudomonas fluorescens*

Son bacterias (Fig. 5) degradadoras de naftaleno y fenantreno, ventaja que tiene frente a las otras *Pseudomonas*, que solo metabolizan naftaleno y asfaltenos (Rockne & James, 2002). Estudios realizados demuestran que *Flavobacterium* y *Pseudomonas* son los microorganismos más aislados en la fase de degradación de los Hidrocarburos Totales (TPH) (Kastner & Mahro, 1998).

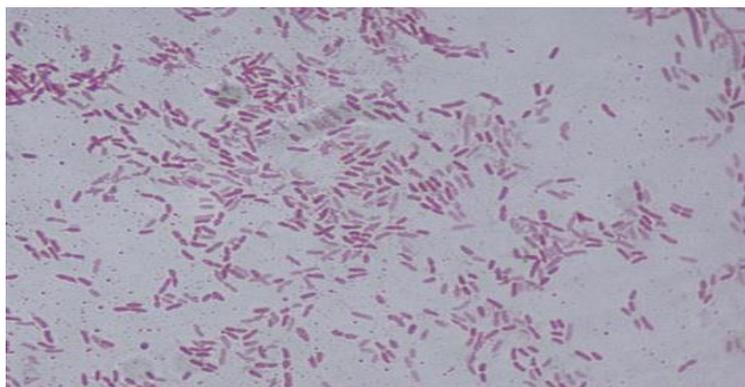


Fig. 5 Bacteria *Pseudomonas fluorescens*

2.6.1.6 Otras bacterias

Bacillus cereus, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilis*, *Acinetobacter junii*, y *Pseudomonas sp.* Bacterias del género *Pseudomonas* poseen la habilidad para utilizar diversos sustratos, incluyendo los derivados del petróleo; estas son bacterias productoras de biosurfactantes extracelulares que solubilizan y facilitan la penetración de los hidrocarburos a través de la pared celular hidrofílica (Valderrama, 2000).

Mycobacterium austroafricanum se ha observado que es eficaz en la degradación de gasolina y diesel (Floriane & Vandecasteele, 2000).

Otro género estudiado dentro de las técnicas de biorremediación es *Sphingomonas*, bacilos no fermentadores y dentro de estos la *Sphingomona wittichi* es un microorganismo capaz de degradar en condiciones anaerobias el diclorobenceno y cepas como *Sphingomonas yanoikuyae*, y *Sphingomonas paucimobilis* como degradadoras de PAH's utilizándolos como única fuente de energía. (Kaplan & Kitts, 2004).

Alcalgenes, *Micobacterium* y *Bacteroides* han sido reportados como degradadores de hidrocarburos de petróleo, y estos filotipos son candidatos para el tratamiento de terrenos contaminados con TPH. Sin embargo su poca abundancia se convierte en una desventaja para su aplicación (Nannipieri & Renella, 2001).

La degradación del bifenil policlorinado PCBs y otros hidrocarburos por microorganismos como *Comamonas acidovorans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Achromobacter sp.* *Pseudomonas sp.* *Flavobacterium devorans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus mascerans* y *Bacillus thuringensis* ha sido aplicada con buenos resultados para el tratamiento de los mismos (Boer & Veen, 2003). Se ha referenciado que las *Comamonas* son degradadoras de fenaltreno, *Gordona sp.* degrada el Pireno, de 5 a 35 días luego de ser inoculada. Mientras que el *Azoarcus spp.* puede degradar benceno y tolueno (Nicholsony & Fathepure, 2004).

2.7 Métodos de biorremediación

El bioventeo (Fig. 6), consiste en la ventilación forzada del suelo mediante la inyección de oxígeno (O₂) en la zona saturada mediante pozos de inyección; debido a la aireación se va a favorecer la degradación de hidrocarburos por volatilización y migración de la fase más volátil del contaminante, y por biodegradación, ya que al incrementar la oxigenación del suelo se estimula la actividad microbiana (Benavides & Quintero, 2005).

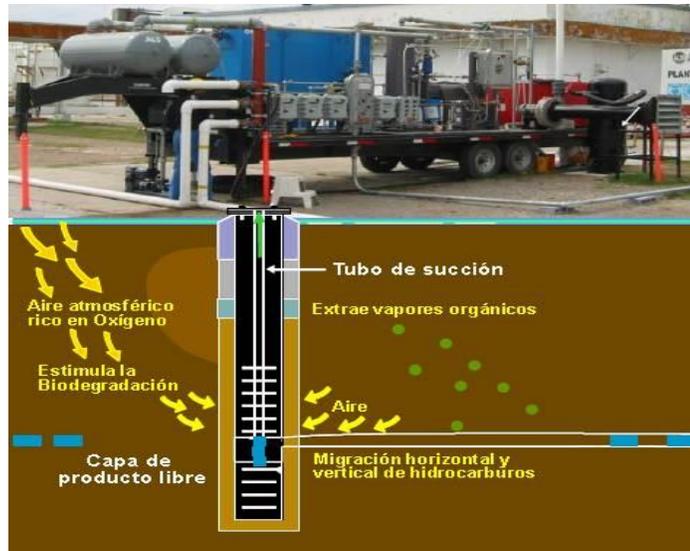


Fig. 6 Esquema del funcionamiento del bioventeo.

La bioestimulación (Fig. 7) consiste en la adición de nutrientes, sustratos o aditivos que estimulen el crecimiento y actividad metabólica de los microorganismos degradadores presentes en la zona impactada. Esta alternativa se aplica cuando existen poblaciones autóctonas con capacidad degradativa en la zona contaminada (Núñez, 2003).

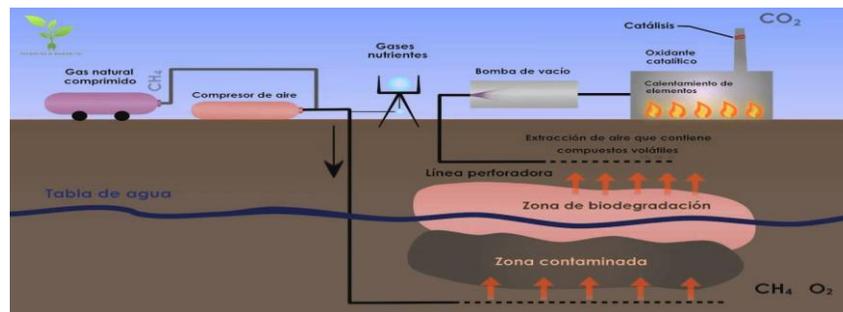


Fig. 7 Técnica de bioestimulación

La bioaumentación comprende el uso de enzimas o cultivos de microorganismos (Fig. 8) con alta capacidad de oxidación con el propósito de eliminar sustancias indeseables, donde se asegura que estén presentes los microorganismos específicos capaces de degradar al compuesto contaminante no deseado hasta sus moléculas básicas (Mahanty & Gyun, 2013).

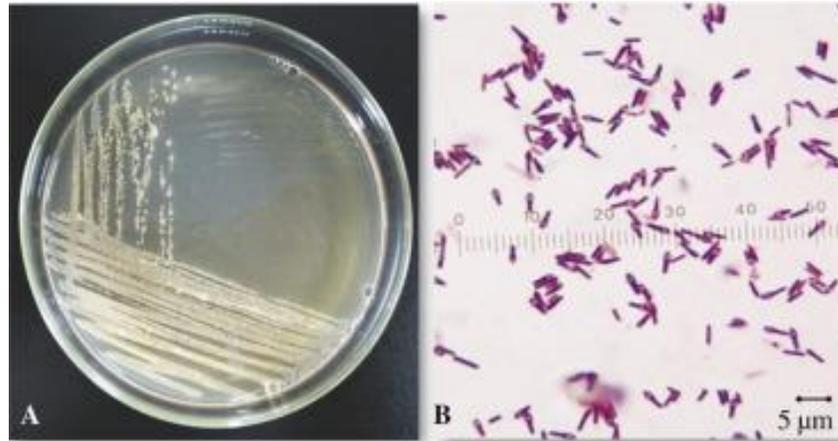


Fig. 8 *Bacillus sphaericus* utilizados en la técnica de bioaumentación.

2.8 Antecedentes sobre estudios realizados con bacterias hidrocarburoclíticas

2.8.1 Estudios realizados para la degradación de hidrocarburos con bacterias hidrocarburoclíticas.

1. Colla y Prado (2014) estudiaron la eficacia de la bioaumentación y bioestimulación en un suelo contaminado por diesel, el experimento se llevó durante 32 días a una temperatura de 28 °C, utilizaron bacterias autóctonas que fueron identificadas en base a la secuencia 16S rRNA gen (*Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter xylooxidans* y *Ochrobactrum intermedium*) lograron una degradación del 35.7%.
2. Bayer y Kato (2013) realizaron un proceso de biorremediación en columnas de vidrio de sedimentos limo-arenoso, que fueron contaminados por diesel, durante 111 días aplicaron las técnicas de atenuación natural y bioestimulación, durante el experimento la temperatura se registró de 25.1 a 28.7 °C, un pH de 6.7 a 8.4, la eficiencia en la eliminación total del contaminante fue de 82 y 78% respectivamente.
3. Chagas y Gabazza (2012) realizaron un estudio en donde evaluaron un suelo de arcilla contaminado con diesel, aislaron bacterias a partir de medio Bushnell Hass, utilizaron tres tratamientos de biorremediación: landfarming, bioestimulación y

bioestimulación con bioaumentación; al finalizar los 129 días del período experimental, obtuvieron los valores de 87%, 89% y 87% para cada tratamiento respectivamente.

4. San Martín y Hernández (2012) aplicaron procesos de biorremediación a nivel de laboratorio con sedimentos contaminados, aislando bacterias a partir de medio Bushnell Hass y cultivos en agar de soya tripticaseína, este proceso consistió en la bioaumentación de bacterias hidrocarbonoclastas nativas Gram negativas, el experimento tuvo una duración de 3 meses, obteniendo al final del experimento un porcentaje total de degradación del 72%.
5. Bento y Camargo (2003) evaluaron las técnicas de atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación para dos suelos contaminados por petróleo que los obtuvieron de Long Beach, California (EE.UU.) y Hong Kong (China). Utilizaron bacterias nativas, previamente aisladas por la secuencia del gen 16S rRNA como *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilus*, *Acinetobacter junii* y *Pseudomonas sp.*, después de 12 semanas de experimento, los resultados fueron una degradación 84% para Long Beach por bioaumentación y por bioestimulación fue de 72%. En el suelo de Hong Kong la atenuación natural fue la más alta con 47% de degradación.
6. García (2013) empleó un sistema de biorremediación por bioaumentación en microcosmos, para evaluar la remoción de hidrocarburos totales de petróleo presentes en sedimentos obtenidos de un estero de la localidad de Emiliano Zapata, Tuxpan, Ver. Lo cual consistió en aislar bacterias hidrocarburoclásticas exógenas en medio Bushnell-Hass, las cuales se cultivaron y purificaron en agar de soya tripticaseína (AST). Al concluir el experimento se logró una remoción de HTP de 80.54 %, logrando un mayor porcentaje de remoción en los primeros 30 días al obtener un valor de 57.52 %.
7. Santiago (2013) llevó a cabo un proceso de biorremediación ex-situ en lodos de perforación, lo cual consistió en aislar bacterias de las muestras, posteriormente se

realizaron resiembras sucesivas hasta purificar las bacterias. Se procedió a la aumentación de masa bacteriana en CST. El experimento duró 90 días, en el cual se logró una degradación del 30 %.

8. Mendo (2014) evaluó el proceso de biorremediación en columnas de acrílico a sedimentos contaminados por hidrocarburos empleando bacterias autóctonas de la laguna de Tamiahua, Veracruz. El proceso constó de dos tratamientos, el primero sin bacterias y el segundo con bacterias identificadas como *Ochrobactrum anthropi* c. El experimento tuvo una duración de 90 días al cual se le inyectó aire de manera constante (bioventeo). Como resultado de dicho experimento se obtuvo que para el tratamiento sin bacterias se logró un 6.44 % de degradación y para el tratamiento con biomasa bacteriana una remoción del 68.36 %.

2.8.2 Estudios de bacterias hidrocarburohíticas aisladas

1. Lira (2014) efectuó una caracterización bioquímica y molecular de bacterias hidrocarburohíticas procedentes del estero aledaños al ejido Emiliano Zapata, Tuxpan, Veracruz. De los cuales se obtuvieron cuatro sepas bacterianas, todas en forma bacilar, tres Gram negativas y una Gram positiva con capacidad de degradación de hidrocarburo. En base a las pruebas bioquímicas empleadas se determinaron taxonómicamente dos géneros *Bacillus* y *Enterobacter*, correspondientes a *Listeria fleischmannii*, *Bacillus coagulans* y *Ochrobactrum intermedium*.
2. Franco (2005) en muestras de suelos contaminados identificó bacterias degradadoras de hidrocarburos por medio de pruebas bioquímicas convencionales, con el fin de determinar las características de las bacterias aisladas, teniendo como resultados los géneros *Aeromonas* sp, *Bacillus* sp. y *Enterobacter* sp.
3. Barrios y Acosta (2012) realizaron un estudio y aislamiento de bacterias aerobias que degradan los hidrocarburos de las costas cubanas por medio de un proceso de selección primaria, en donde se emplearon dos protocolos de discriminación; el

primero utilizando el medio de cultivo Bushnell-Haas con 1% de petróleo Mesa 30 y el segundo embotellando 100 ml de cada muestra en una botella estéril con tapa de rosca de 250 ml, a la que luego se agregaron 6 ml de Mesa 30 en bruto y 0,1 g de extracto de levadura. Las bacterias aisladas fueron identificadas como *Bacillus sp* y *Alcaligenes sp*, las cuales, después de 45 días de cultivo estático degradaron el 69,26% del crudo.

4. Pérez y Camacho (2007) aislaron una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelo contaminados con petróleo, utilizando el método de enriquecimiento secuencial, empleando como fuente de carbono y energía crudo de petróleo Mesa 30/Puerto Escondido. El aislamiento de las cepas se realizó por siembra en estrías sobre placas de agar triptona soja a partir de un banco de diluciones seriadas y fueron identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando pruebas bioquímicas clásicas.
5. Hernández (2013) realizó un aislamiento de bacterias y hongos hidrocarbonoclastas de rizósfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo, en el cual se colectaron muestras de suelos rizosféricos de la leguminosa *Chamaecrista nictitans* y del pasto *Panicum sp.*, las cuales crecen en presencia de petróleo crudo en suelos de Minatitlán, Veracruz. El aislamiento y purificación consistió en realizar siembras continuas de colonias separadas hasta obtener, en cajas de petri, la presencia de una sola colonia multiplicada; es decir, un solo tipo de microorganismo. Fueron identificadas como bacterias como *Pseudomonas sp.* y dos como *Agrobacterium sp.*
6. Arrieta y Rivera (2010) realizaron un estudio en donde se aisló y caracterizó bioquímica y molecularmente un consorcio bacteriano capaz de degradar los diferentes hidrocarburos presentes en un combustible diésel, conformado por los siguientes géneros: *Enterobacter sp*, *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Sanguibacter soli*, *Arthrobacter sp* y *Flavobacterium sp*, a partir de un suelo contaminado con diésel a escala de laboratorio, y tratado mediante 2 tecnologías de biorremediación: atenuación natural y bioestimulación.

Se definió como parámetro de control la concentración de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) y para el cual, se obtuvo una reducción en la concentración en un periodo de 4 meses de 36,86% para atenuación natural y 50,99% para bioestimulación. La medición de la eficiencia de remoción de Hidrocarburos se cuantificó por cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS).

III. Planteamiento del problema

La contaminación ambiental en zonas estuarinas continúa incrementándose por la descarga permanente de contaminantes que, debido a su toxicidad y persistencia afectan directamente la flora y fauna existente en el medio, misma que alberga buena parte de la biodiversidad del planeta; desde un punto de vista socioeconómico, estos ecosistemas son importantes proveedores de bienes y servicios, tales como alimentos, materias primas, patrimonio cultural, regulación del clima, indicadores de cambio global, recreación y turismo, teniendo una notable influencia en los niveles de bienestar de la sociedad.

Cabe destacar que los ecosistemas marinos contaminados por hidrocarburos, en especial en los estuarios, requieren de 10 años o más para su recuperación. En la laguna de Tampamachoco localizada en Tuxpan Ver. se ve reflejada esta situación, puesto que los agentes contaminantes han modificado el hábitat de los ecosistemas nativos; siendo la contaminación por hidrocarburos el principal factor en dicha problemática.

Por lo cual, existen diferentes tecnologías y métodos para la recuperación de estas zonas contaminadas con derivados de petróleo, sin embargo la biorremediación es una alternativa económica y ambientalmente sostenible. En consiguiente el presente proyecto tiene la finalidad de aislar bacterias hidrocarburofíticas autóctonas de la zona, para la remediación del sitio.

IV. Justificación

En México la contaminación por hidrocarburos es uno de los problemas ambientales más graves y provoca severos desequilibrios ecológicos. En la actualidad esta situación es mundial y se extiende con rapidez, por lo cual el planeta está sufriendo un deterioro principalmente en las áreas de suelo, aire y agua.

Por todo lo anterior, es urgente la toma de acciones encaminadas a la prevención y control de esta problemática, para tratar de minimizar su impacto, ya que amenaza la vida en el planeta. Cabe destacar que existen diversas alternativas para mejorar estas condiciones, una de las más viables según los investigadores, es la biorremediación; tecnología fundamentada en el uso de seres vivos para restaurar ambientes contaminados, gracias al potencial metabólico de dichos microorganismos y lo amigable que resulta con el medio ambiente.

Los más utilizados son las bacterias, hongos, algas y levaduras; destacando gradualmente de este listado a las bacterias, puesto que degradan prácticamente cualquier sustancia orgánica, además pueden eliminar los contaminantes en ambientes donde hay oxígeno llamados aeróbicos, pero también en ambientes sin oxígeno llamados anaeróbicos. Los géneros que han presentado mayor éxito son las *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia* y *Mycobacterium*, que han sido aislados de ecosistemas contaminados y que han logrado eliminar hidrocarburos aromáticos, pesticidas, metales pesados y aditivos de la gasolina.

Es importante destacar que también existen fuentes que aún no han sido explotadas como los sedimentos de los ecosistemas estuarinos; estas zonas son uno de los ambientes más productivos de la Tierra, creando mayor material orgánico y que desafortunadamente han sido los más afectados por esta problemática, puesto que son muy sensibles a la contaminación. Ya que cuando ocurre un derrame de hidrocarburos en el agua, el precipitado generado por el impacto, se mezcla con los sedimentos del sitio generando una masa que presenta una fuente de contaminación latente, que compromete aún el nicho del derrame, afectando flora y fauna sobreviviente.

Esta afectación se ve reflejada en los estuarios localizados en el norte del estado de Veracruz tales como la laguna de Pueblo Viejo, Laguna de Tamiahua, Laguna de Tampamachoco y el estuario de Tecolutla.

Por lo anterior, tenemos una fuente viable que representa una alternativa para la extracción y aislamiento de microorganismos hidrocarburolíticos que puedan ser explotados como una de las mejores alternativas de biorremediación de hidrocarburos.

V. Hipótesis

Debido a que la laguna de Tampamachoco en Tuxpan, Veracruz ha sido expuesta a vertidos de hidrocarburos por décadas, es posible encontrar bacterias adaptadas capaces de degradar hidrocarburos.

VI. Objetivos

6.1 Objetivo general:

Aislar bacterias a partir de sedimentos estuarinos de la Laguna Tampamachoco y evaluar su capacidad hidrocarburolítica a nivel de laboratorio.

6.2 Objetivos específicos:

- Obtener muestras de sedimento de la Laguna de Tampamachoco.
- Aislar e Identificar bacterias hidrocarburolíticas.
- Generar un biofilm para uso en biorremediación de HTP'S.
- Degradar HTP'S en un reactor de lecho empacado para la biorremediación de sedimentos estuarinos.

VII. Área de estudio

Las muestras de sedimento fueron obtenidas de la Laguna de Tampamachoco. En el cual se seleccionaron cuatro puntos específicos, llamándolos de la siguiente manera; zona de restauración, zona de hidrocarburos, zona histórica (Boquitas y Villa) (Fig. 9) y los análisis se desarrollaron en el Centro de Investigación de Alimentos y Ambiental del Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache Ver.



VIII. Metodología

8.4 Métodos Experimentales

El presente proyecto se dividió en tres fases, siendo las siguientes:

Fase I: Aislamiento bacteriano

8.4.1 Obtención de la muestra

Las muestras fueron colectadas en la laguna de Tampamachoco, (Fig. 10) por medio de nucleadores, que se introdujeron a 15 cm en el fondo del agua, logrando extraer una columna de sedimento, del cual se tomaron 2 cm.

De los cuatro lugares a muestrear, se hicieron dos repeticiones de cada una, obteniendo ocho muestras de 20 g de sedimento, las cuales se trasladaron en bolsas Ziploc dentro de una hielera a una temperatura de 4°C al Instituto Tecnológico Superior de Álamo Temapache, y se mantuvieron refrigeradas a la misma temperatura para su posterior estudio.



Fig. 9 Extracción de la muestra.

8.4.2 Aislamiento de la cepa

Se aislaron las bacterias utilizaron seis matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, a cada uno se le adicionaron 50 mL de medio de cultivo Bushnell-Hass (Tabla 4) y 5 ml de Diesel, previamente esterilizado en autoclave a una temperatura de 125°C a 15 libras de presión por 15 minutos. A cada matraz se le adicionaron 5 g de sedimento en una campana de flujo laminar, y se incubaron a 30 °C durante 72 horas (Fig. 11).

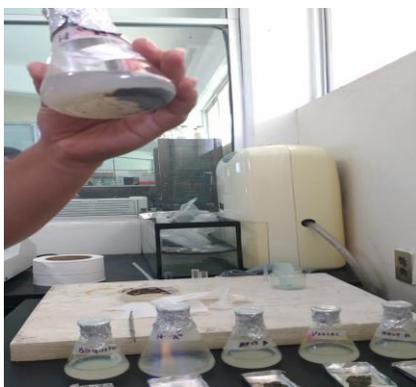


Fig. 10 Sedimentos inoculados.

Tabla 2 Composición química del medio de cultivo Bushnell-Hass

REACTIVO	FORMULA	1000ML
Cloruro de sodio	(NaCl ₂)	25 gr.
Sulfato de magnesio	(MgSO ₄)	0.20 gr.
Cloruro férrico	(FeCl ₃)	0.50 gr.
Nitrato de amonio	(NH ₄ NO ₃)	1.00 gr.
Monofosfato de potasio	(K ₃ PO ₄)	1.00 gr.
Cloruro de calcio	(CaCl ₂)	0.029 gr.

8.4.3 Purificación de la cepa

Una vez obtenido el crecimiento bacteriano, se inoculo con 1 mL a un nuevo medio de cultivo, y esto se repitió por 3 generaciones (Fig. 12). Simultáneamente se realizó una tinción Gram para ubicar el tipo de bacteria presente.



Fig. 11 Purificación de la cepa.

8.4.4 Producción de la biomasa

Al transcurrir 24 horas de la primera purificación de las cepas, se tomó 2 mL de cada matraz para determinar la absorbancia en el espectrofotómetro a 400 nm (Fig. 13), así mismo se repitió a las 48 y 72 horas. Con ello se identificaron las muestras con mayor biomasa, las cuales se utilizaron para seguir con el proceso de purificación y la obtención de un cultivo puro. En este caso, fueron tres muestras con mayor crecimiento microbiano: Restauración A, Hidrocarburos B y Restauración B.



Fig. 12 Cuantificación de biomasa en espectrofotómetro.

8.4.5 Preparación de medio de cultivo

Ya identificadas las muestras a utilizar, fueron preparados lotes de cajas petri con medio de caldo nutritivo y agar para inocular cultivos sucesivos. Esto consistió en agregar 8 g/L de caldo nutritivo y 20 g/L de agar. Finalmente se esterilizó a 125° C a 15 libras por 15 minutos.

8.4.6.- Inoculación bacteriana

Se añadieron 5 mL de la solución en cajas petri para hacer 3 repeticiones de cada muestra en matraces. A partir del cultivo bacteriano obtenido de la primera purificación, se añadió 1 mL a cada caja y se incubó a 30°C durante 24 horas.

8.2.5 Resiembra de la cepa

Al haber crecimiento en las cajas petri, se hizo una resiembra en matraces con 50 mL de medio de cultivo nutritivo, por medio de un aza de siembra, solo de las cajas con mayor crecimiento dejando incubar por 24 horas a 30° C. Con el fin de una mejor purificación, se tomó 1 mL de cada matraz y se inoculo de nuevo en cajas petri dejando incubar por 24 horas a 30°C.

Finalmente, con el aza de siembra, se resembró en cajas, esto con el fin de ser enviadas para su identificación (Fig.14) al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, siendo Restauración_A, Hidrocarburos_B y Restauración_B.



Fig. 13 Cepas seleccionadas para su identificación.

Fase II: Creación de biofilm

8.4.6 Preparación del medio nutritivo

Con las bacterias previamente aisladas, se procedió a la generación de la biopelícula, la cual se presenta como una fina capa que se adhiere a una superficie inerte formando una comunidad microbiana. Para ello, se prepararon 300 mL de caldo nutritivo; colocando en seis matraces de 250 mL, 20 g de piedras de pecera y 50 mL de caldo nutritivo. Se esterilizó a 125°C a 15 lbs por 15 minutos.

8.4.7 Comprobación de la adhesión bacteriana

Se preparó 100 ml de solución, con 2 g de agar y 0.8 g de medio nutritivo, que fueron vertidos en 12 cajas petri, con una relación de 2 repeticiones de caja por matraz con piedras inoculadas. Con unas pinzas esterilizadas, se colocó una piedra de pecera inoculada en la caja petri y se incubaron a 30°C por 72 horas. Con esto, el crecimiento en el cultivo demuestra la propagación de la cepa proveniente de las piedras (Fig.15).



Fig. 14 Propagación del biofilm.

Fase III: Degradación de Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP'S) en reactor de lecho empacado.

8.4.8 Preparación de Biofilm y medios de cultivo

Se prepararon 600 mL de caldo nutritivo, los cuales se repartieron en 3 matraces con 200 mL cada uno y se colocaron en ellos 250 g de piedras de pecera. Se preparó 1 L de medio de cultivo Bushnell-Hass (Tabla 4), el cual tendrá la función de alimentar a la comunidad microbiana. Se esterilizaron a 125  C a 15 Lbs por 15 min.

Posteriormente se inocularon los matraces con piedras, a nadiendo 2 ml de inóculo en relación de 1 matraz por muestra (Fig. 16). Se dejaron incubar por 72 horas a 30   C.



Fig. 15 Inoculación para el biofilm.

8.4.9 Ensamble del reactor de lecho empacado

El reactor de lecho empacado, se compone por una columna de vidrio vertical de 50 cm de largo, dos empaques con 10cm de diámetro, una manguera de 1/8 in que va conectada de la boquilla del reactor a la bomba peristáltica. Así mismo, se a nadi n los 750 grs. de piedras de pecera inoculadas dentro de la columna de vidrio (Fig. 17). Después de sellado el reactor, se bombearon 250 mL de medio Bushnell-Hass, para cubrir completamente las piedras. Al final, se bombearon 30 ml de Diesel. La recirculación terminaba en un matraz con 50 mL de medio de cultivo, para volver a ser enviado a través del reactor a una velocidad de 3 rpm. El periodo de recirculación duró 7 días.



Fig. 16 Columna vertical empacada con piedras de pecera.

8.4.10 Curva Patrón

Se hicieron disoluciones con analitos conocidos, compuesto por diésel+agua mediante un arrastre con hexano. Se midió la absorbancia a 400nm en el espectrofotómetro, y los resultados fueron vaciados a Excel, donde se graficó y obtuvo la ecuación de la curva.

8.4.11 Extracción de HTP'S por arrastre con hexano

Se purgaron 257 mL de suspensión final del reactor, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante mezclado con Diesel y vertió en un vaso de precipitado de 500 mL. En un embudo de separación se hizo una disolución de 1-3.3 mL, siendo sobrenadante y hexano respectivamente. Se hizo el arrastré con 5-16.6 mL.

8.4.12 Determinación de HTP'S

Se midió la absorbancia a 400 nm. Primeramente se introdujo un blanco con hexano puro, se taró y volvió a medir el blanco. La disolución final se pasó al vortex para una mezcla homogénea y ser medida en el espectrofotómetro. Se sustituyó el resultado en la ecuación de la curva, para obtener la cantidad de Diesel final en el sobrenadante.

IX. Resultados

9.1 Producción de biomasa

Después de un periodo de crecimiento bacteriano de 72 horas en el cual se hicieron tres repeticiones por cada cepa, se obtuvo que las cepas que presentaban mayor crecimiento y de manera constante, fueron R_{A2} , R_{B1} y H_{B1} (Fig. 18), las cuales se adaptaron a condiciones de salinidad altas y a una temperatura de crecimiento de 30°C.

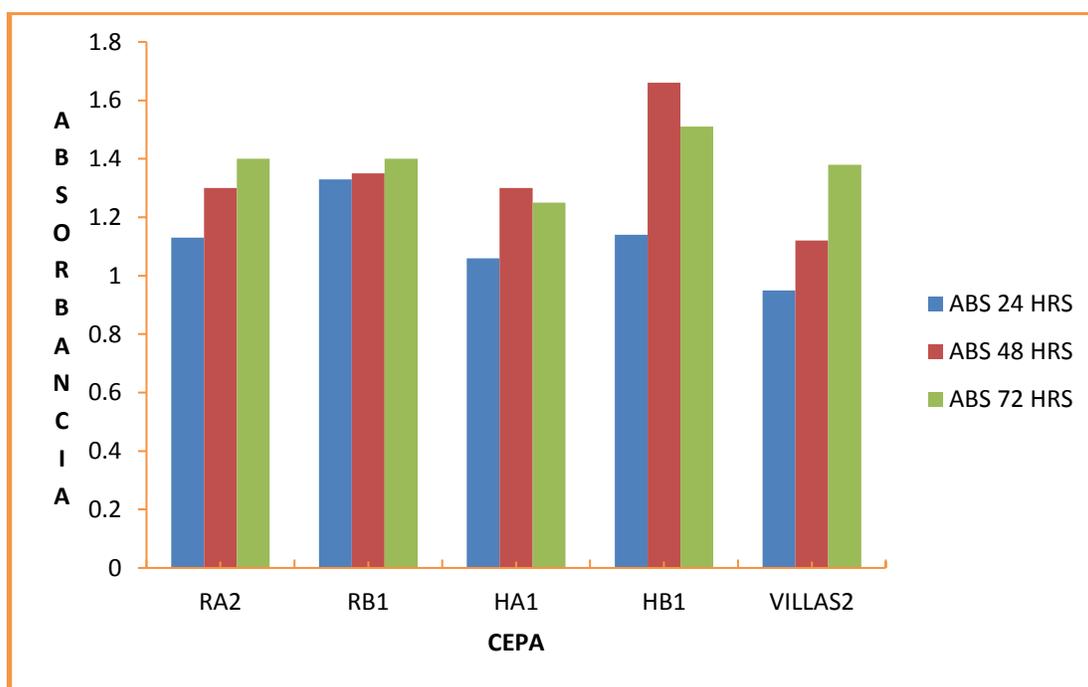


Fig. 17 Selección de muestras por producción de biomasa.

9.2 Identificación taxonómica

Al final del proceso de aislamiento fueron purificadas tres cepas diferentes (Fig. 19), que al ser observadas por el microscopio identificamos que son bacilos Gram negativos (Fig. 20), esto se dio a conocer por medio de una tinción. Al final, estas cepas fueron enviadas al Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional, para su identificación.



Fig. 18 Cepas enviadas para identificación



Fig. 19 Tinción de Gram de bacterias aisladas.

Su identificación se realizó en base a las secuencias genéticas ADN-16S, de acuerdo a sus similitudes y los múltiples alineamientos se encontró que las tres cepas aisladas pertenecen a la especie de *Bacillus cereus* con un 99% de identidad y *Bacillus sp.* con 100% de identidad (Tabla 5).

Tabla 3 Identificación taxonómica.

ESPECIES CERCANAS EN BASE A SECUENCIAS GENÉTICAS ADN_R- 16S			
RÉPLICA	HIT MÁS CERCANO	NÚMERO DE ACCESO	ID%
H_B	BACILUS CEREUS STRAIN MER_27 16S RIBOSOMAL RNA GENE, PARTIAL SEQUENCE	KT719607.1	99
R_A	BACILUS SP. STRAIN YP-1 16S RIBOSOMAL RNA GENE , PARTIAL SEQUENCE	MG266322.1	100
R_B	BACILUS CEREUS STRAIN FJAT-46994 16S RIBOSOMAL RNA GENE , PARTIAL SEQUENCE	MG651600.1	99

9.3 Generación del biofilm

En la figura 21 se observa la propagación de la comunidad bacteriana a través del medio sólido, indicando la presencia del biofilm de cada muestra seleccionada.

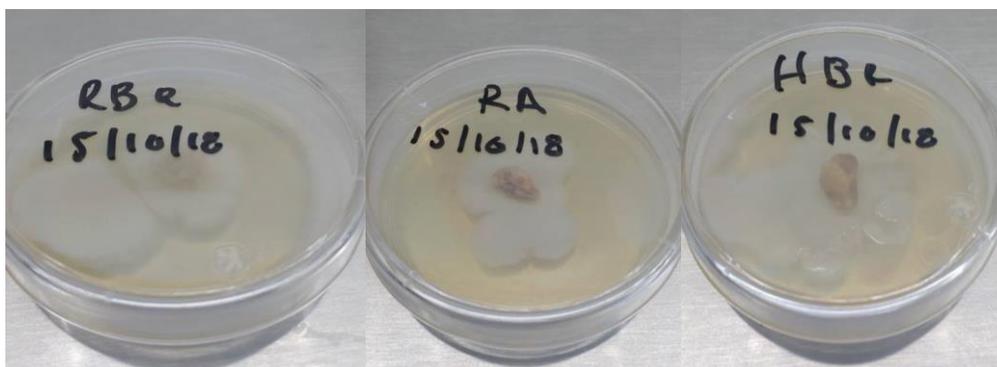


Fig. 20 Formación de biofilm en piedras de pecera.

9.4 Degradación de HTP's en reactor de lecho empacado

En la figura 22 del lado izquierdo se aprecia la separación, por medio de las densidades, del medio como del diésel antes de empezar la recirculación a través del reactor. En el lado derecho, después de 96 horas en tratamiento, se aprecia la ruptura de los enlaces fuertes de carbono, lo cual permite una homogeneización con el medio, demostrando a simple vista una degradación.

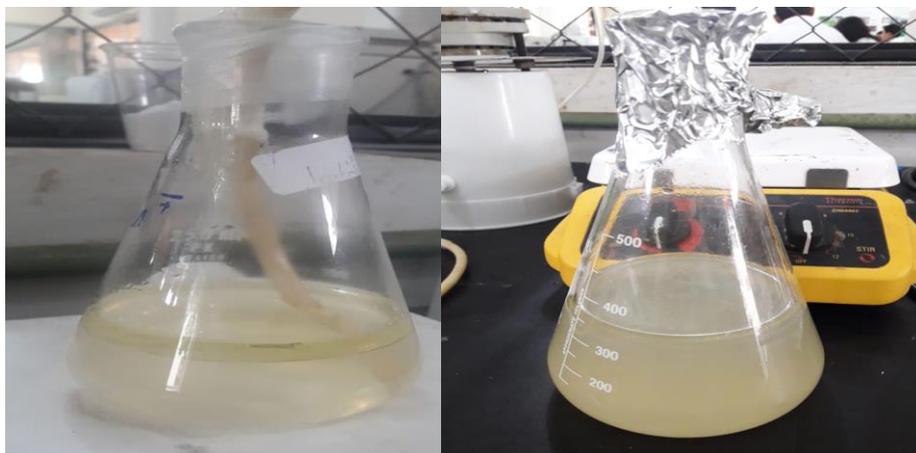


Fig. 21 Demostración visual de la degradación de los HTP'S.

En la figura 23 se observa la curva de calibración usando como estándar diésel, en un intervalo de 0-0.8 g/L. Los datos obtenidos se trabajaron con el software Excel 2018 y la ecuación de la curva fue $y = 0.4685x + 0.0024$ con una R^2 del 0.9994. Para la determinar la concentración de HTP's, se despejo X de la ecuación, y la absorbancia se sustituyó en la variable (y). La degradación fue del 58% en 96 h en un sistema de recirculación.

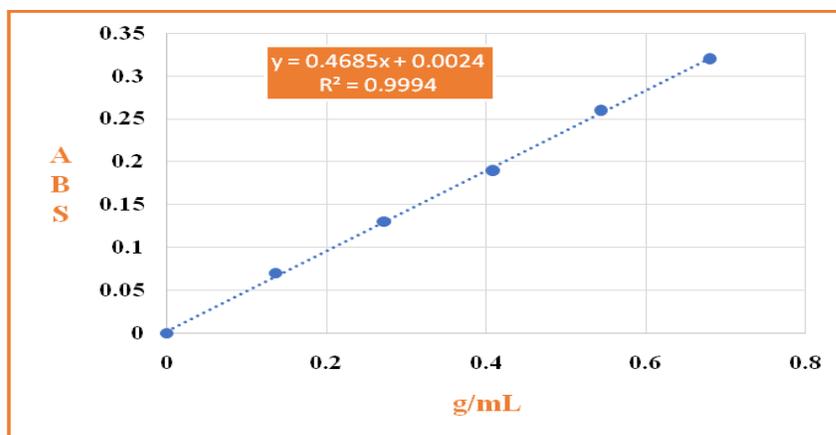


Fig. 22 Curva patrón de gasolina vs hexano

X. Discusiones

En el presente trabajo se aislaron bacterias autóctonas de la laguna de Tampamachoco como una alternativa de biorremediación. El aislamiento bacteriano se efectuó a partir de sedimento contaminado proveniente de dicho sitio, la técnica utilizada se realizó en medio Bushnell Hass, debido a la efectividad que presenta en el aislamiento de bacterias hidrocarburohílicas (Fletcher, 2000). Autores como (Chagas & Gabazza, 2012), (García, 2013) y (Barrios & Acosta, 2012) aislaron bacterias de un sitio contaminado por petróleo, utilizando el mismo el medio; por lo tanto, se demostró que es muy eficiente durante la etapa de aislamiento, ya que garantizó el uso exclusivo de bacterias con capacidad degradadora de HTP'S, lo cual permitió mantener un cultivo puro.

El cultivo bacteriano aislado, se mantuvo a una temperatura constante de 30°C, para obtener un crecimiento uniforme y una remoción de HTP'S efectiva. Autores como (Pardo & Benavides, 2004) mencionan que los rangos de temperatura más apropiados para la degradación de hidrocarburos son de 18 a 30 °C, en la cual se intensifica la actividad enzimática de los microorganismos ayudando a los procesos de degradación, lo cual resulto beneficio en el presente trabajo, pues la degradación de HTP'S que se obtuvo en el reactor de lecho empacado fue favorable.

Es de importancia destacar, que las bacterias hidrocarburohílicas aisladas, presentaron un solo morfotipo, siendo bacilos Gram negativos, coincidiendo con el estudio realizado por (San Martín & Hernández, 2012), quienes utilizaron durante su proceso de biorremediación bacilos Gram negativos para la degradación de los contaminantes.

En la identificación taxonómica del presente trabajo se obtuvieron dos clases de *Bacillus*; *cereus* y *sp*, coincidiendo con (Barrios & Acosta, 2012) quienes aislaron *Bacillus sp* y *Alcaligenes sp* y (Bento & Camargo, 2003) aislando *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter junii* y *Bacillus pumilus*. Cabe mencionar, que en cada estudio se presento una variabilidad en el tiempo de degradación de los hidrocarburos.

Algunos autores como (Barrios & Acosta, 2012), (Franco, 2005), (Lira K. , 2014) y (Hernández, 2013) señalan que la mejor alternativa de biorremediación de suelos contaminados con petróleo, es la utilización de bacterias hidrocarbonoclastas como *Bacillus sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Enterobacter sp.*, *Bacillus coagulans*, *Ochrobactrum intermedium*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas sp.*, mismas que presentan un porcentaje de remoción de HTP's del 57 al 72 %. Así mismo, autores como (Balba & Awadh, 1998) señalan que los consorcios más empleados contienen las especies *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* y en menos ocasiones *Mycobacterium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula* y *Candida*. Las bacterias son más empleadas que los hongos y las levaduras.

Además, la generación de la biopelícula se realizó por medio del consorcio bacteriano aislado, utilizando piedras de pecera, simulando las rocas del medio estuarino, obteniendo una adhesión uniforme en toda la superficie de la piedra, además de su distribución en el medio sólido, coincidiendo con (Nazar, 2007), quien señala que las características de la superficie juega un papel importante en la adherencia de microorganismos; de esta forma, la adhesión de los microorganismos ocurrirá más fácilmente en aquellas superficies más ásperas.

Para la comprobación de la capacidad hidrocarburoclítica del cultivo bacteriano se utilizó el reactor de lecho empacado, llevando a cabo la degradación de HTP's por medio de las piedras de pecera inoculadas, a las cuales se les adicionó diésel como fuente de carbono para las bacterias, manteniéndolo en un periodo de recirculación de 96 horas. Obteniendo 58% de remoción de HTP's, resultado similar al estudio realizado por el autor (García, 2013) al obtener un valor de remoción de 57.52 % con bacterias y 19 % sin bacterias, ambos procesos en un periodo de 30 días mediante la bioestimulación y bioventeo. Recordando que los autores utilizando un método diferente al propuesto en esta investigación. En otro estudio (Braibant, 2004) menciona degradación mediante la medición de la densidad óptica, utilizando un reactor de 2 L con bacterias (*Pseudomonas*).

Por lo cual, dicho proceso es considerado exitoso, ya que se consiguió un porcentaje de degradación competitivo en un menor tiempo, además de ser amigable con el medio ambiente. De manera que resulta una alternativa viable para disminuir la contaminación generada por hidrocarburos mediante el uso de biofilm generado con las bacterias *Bacillus cerus* y *Bacillus sp.*

XI. Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente proyecto, se determinó que el proceso de aislamiento fue favorable, puesto que las condiciones de crecimiento a las cuales fueron expuestas las bacterias procedentes del sedimento contaminado de la Laguna de Tampamachoco permitieron obtener un cultivo bacteriano más eficiente, ya que los microorganismos se adaptaron a concentraciones altas de salinidad y a una temperatura constante de 30°C. Por ende, de un total de seis cepas, tres presentaron un gran crecimiento de biomasa de manera constante en comparación a las cepas restantes, dichas cepas fueron identificadas como *Bacillus cereus* con un 99% de identidad y *Bacillus sp.* con 100% de identidad.

La biopelícula generada con las bacterias antes mencionadas, se esparció satisfactoriamente, manteniendo una adhesión y un crecimiento bacteriano uniforme en toda la superficie de la piedra de pecera, lo cual contribuye en la degradación de los HTP's y por consiguiente en el proceso de remediación del afluente.

La degradación de HTP's dependió en gran medida de la adaptación y selectividad que tuvieron las bacterias desde el proceso de aislamiento, por lo cual, la remoción del hidrocarburo fue de un 58%. Por consiguiente, el proceso de la degradación fue considerado exitoso, siendo una alternativa eficiente.

XII. Recomendaciones

- ✓ Introducir en la columna del reactor sustratos de menor diámetro de partícula, tal como arenas con un diámetro externo de 0.5mm a 0.8mm, ya que presentan una estructura más fina, lo cual, sería ideal para la adhesión de las bacterias y aumentaría el tiempo de retención del contaminante, lo que mejoraría su degradación.
- ✓ Utilizar el cromatógrafo de gases en la determinación de hidrocarburos puesto que es uno de los métodos físicos de separación más eficaz y proporciona un tiempo de análisis muy corto.

Bibliografía

- Acuña, A. M., & Pucci, O. (2010). Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia, Argentina. *Sociedad Venezolana de microbiología* , 29-36.
- Arrieta, C., & Rivera, A. (2010). Biorremediación de un suelo con diésel mediante el uso de microorganismos autóctonos. Medellín, Colombia: Grupo de Investigación en Ciencia de los Alimentos, Universidad Nacional de Colombi.
- Barrios, Y., & Acosta, S. (2012). Estudio y aislamiento de bacterias aerobias que degradan los hidrocarburos de las costas cubanas. *Biotecnol* , 32-53.
- Bayer, D. C., & Kato, M. (2013). Atenuación natural y biosurfactante estimulada por biorremediación de estuarios contaminados con gasóleo. *Bioquímica Aplicada* , 173-188.
- Bedair, H., & Saad, T. (1992). Hidrocarburos disueltos y partículas adsorbidas en aguas del río shatt, Irak. *ResearchGate* , 397-408.
- Benavides, J., & Quintero, G. (2005). Biorremediación de suelos contaminados con . *NOVA* , 82-90.
- Benlahcen, K., & Chaoui, A. (1997). Distribución y fuentes de hidrocarburos aromáticos policíclicos en algunos sedimentos costeros mediterráneos. *Marine Pollution Bolletin* , 298-305.
- Bento, F., & Camargo, A. (2003). Biorremediación de suelos contaminados por gasóleo. *Microbiol* , 60-68.
- Berger, B., & Anderson, E. (1999). Petróleo moderno; una cartilla básica de la industria. *PennWell* , 565-578.
- Bidleman, T., & Castleberry, W. (1990). Hidrocarburos de petróleo en las aguas superficiales de dos estuarios en el sureste de Estados Unidos. *Coast shelf science* , 91-109.
- Boer, W. V., & Veen, J. (2003). La composición de la comunidad microbiana afecta a la Fungistasis del suelo. *Microbiología Aplicada y Ambiental* , 835-844.
- Boopathy, R. (2000). Factores que limitan las tecnologías de biorremediación. *Bioresource* , 63-67.
- Chagas, A. K., & Gabazza, S. (2012). Biorremediación de un suelo arcilloso tropical contaminado con aceite diesel. *Diario del Medio Ambiente* , 510-516.
- Chappin, R. F. (1998). Características de los hidrocarburos . *Mundo científico* , 91-109.

- Colla, T. A., & Prado, G. (2014). Evaluación de la estrategia óptima para la biorremediación ex situ de suelos contaminados con gasóleo. *Ciencia Ambiental* , 2592-2602.
- Correa, F. C., & Záchia, M. (1999). Producción de biosurfactante por la degradación de hidrocarburos Rhodococcus ruber y Rhodococcus erythropolis. *Revista de Microbiología* , 30 (3).
- Day, J. W. (2012). Ecología estuarina. *Introducción a la ecología estuarina* , 576.
- De Mesa, J. B., & Cáceres, D. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA* , 82-90.
- Eriksson, M. S., & Mohn, W. (2003). Degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos a baja temperatura en condiciones aeróbicas y reductoras de nitrato en cultivos de enriquecimiento de suelos del norte. *Appl Environ Microbiol* , 275-284.
- Fan, C. Q., & Kwang, J. (2003). Denitrificación aeróbica de Pseudomonas aeruginosa controlada por la fluorescencia en línea NAD (P) H. *Microbiología Aplicada y Ambiental* , 6715-6722.
- Farombi, E. O. (2007). Biomarcadores de estrés oxidativo y niveles de metales pesados como indicadores de la contaminación ambiental en peces felinos africanos del río Ogun de Nigeria. *Investigacion ambiental y salud pública internacional* , 158-165.
- Fernández, L. R., & Hernández, R. (2006). Técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. *EcoMundo* , 89-101.
- Finnerty, W. (1992). La biología y genética del género Rhodococcus. *Revista de Microbiología* , 193-218.
- Fletcher, R. (2000). Remediación de residuos peligrosos de suelos contaminados. En *Consideraciones prácticas durante la biorremediación de sitios contaminados* (págs. 39-55). Pittsburg, Pennsylvania: Universidad de Pittsburg.
- Floriane, S. M., & Vandecasteele, J. (2000). Cepa de Mycobacterium con capacidades extendidas para la degradación de los hidrocarburos de la gasolina. *Microbiología Aplicada Y Ambiental* , 2392-2399.
- García, I. (2013). Biorremediación en microcosmos de sedimentos contaminados por hidrocarburos mediante la técnica de bioaumentación. Tuxpan, Veracruz: Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana.
- GESAMP, (. M. (2007). Aspectos científicos de la protección del medio ambiente marino. *Informe del trigésimo cuarto período de sesiones; Protegiendo los océanos* , 77-83.

- Harayama, S. K. (1999). Microbiología. En *Biodegradación del petróleo en ambientes marinos*. (págs. 63-70). Tokio, Japón: Biotecnol.
- Hayama, S. K. (2004). Comunidades microbianas en agua de mar contaminada con aceite. Tokio, Japón: Biotecnol.
- Hernández, E. (2013). Bacterias y hongos hidrocarbonoclastas de rizósfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo. *Revista de Microbiología* , 28-39.
- Kakabadse, Y. (2000). Estrategia mundial para la conservación y la gestión sostenible de recursos hídricos en el siglo XXI. *Visión para el agua y la naturaleza* , 17-43.
- Kaplan, C., & Kitts, C. (2004). Sucesión bacteriana en una unidad de tratamiento de tierras petroleras. *Microbiología Aplicada Y Ambiental* , 1777-1786.
- Kastner, M. B., & Mahro, B. (1998). Impacto de los protocolos de inoculación, salinidad y pH en la degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y la supervivencia de las bacterias degradantes de la HAP introducidas en el suelo. *Microbiología Aplicada y Ambiental* , 359-362.
- Kumaran, S., & Robinson, B. (2000). Biorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos. *BioCop* , 38-45.
- Labana, S., & Kapur, M. (2007). Diversidad, biodegradación y biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. *Environmental Bioremediation Technologies* , 409-443.
- Lira, K. (2014). *Caracterización bioquímica y molecular de bacterias hidrocarburoclásticas procedentes del estero aledaño al ejido Emiliano Zapata, Tuxpan, Ver.* Tuxpan, Veracruz: Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana.
- Mahanty, B. K., & Gyun, C. (2013). Evaluación de un sistema de calcificación bioestimulado o bioaumentado con *Bacillus pasteurii* en un entorno de suelo simulado. *Ecología Microbiana* , 679-688.
- Margesin, R. y. (2001). Biorremediación (atenuación natural y bioestimulación) de suelo contaminado con diesel-aceite en un área de esquí alpino glaciar. *Microbiología Aplicada y Ambiental* , 3127-3133.
- McMurry, J. (2001). *Química Orgánica*. México: Thomson International.
- Mendo, W. (2014). Alternativa de biorremediación con bacterias autóctonas de sedimento contaminado de la Laguna de Tamiahua, Veracruz, México. Tuxpan, Veracruz: Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana.

- Miranda, D., & Restrepo, R. (1999). Guía de manejo ambiental para estaciones de servicio de combustible. *Ministerio del Medio Ambiente* , 32-49.
- Nannipieri, P. A., & Renella, G. (2001). Diversidad microbiana y funciones del suelo. *Revista Europea de Ciencia del Suelo.* , 655-670.
- Nelson, K. W., & Gill, S. (2002). Secuenciación completa del genoma y análisis comparativo de la *Pseudomonas putida* KT2440 metabólicamente versátil. *Microbiología Ambiental* , 799-813.
- Nicholsony, C., & Fathepure, B. (2004). Biodegradación de benceno por bacterias halófilas y halotolerantes en condiciones aeróbicas. *Microbiología Aplicada y Ambiental* , 1222-1225.
- Núñez, R. (2003). Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la bioremediación de derrames de hidrocarburos. Cuba: Tesis doctoral, Universidad de La Habana.
- Pardo, J., & Benavides, J. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados por petróleo. Bogotá, Colombia: Ingeniería Ambiental y Sanitaria, Universidad De la Salle.
- Pérez, R. G., & Camacho, M. (2007). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *CENIC* , 44-51.
- Petenello, M., & Feldman, S. (2012). Evaluación de la tolerancia a suelos contaminados con aceite diesel en especies vegetales con potencial biorremediador. *Acta Biológica Colombiana* , 589-598.
- Rich, J. H., & Myrold, D. (2003). Composición y funcionamiento de la comunidad de bacterias desnitrificantes de prados adyacentes y suelos forestales. *Microbiología Aplicada y Ambiental* , 5974-5982.
- Ríos, R. (2005). Estudio de la estimulación biológica para el tratamiento de residuos de perforación petrolera empleando lisímetros. México: Tesis de maestría de la Universidad Autónoma Metropolitana.
- Rivera, A. E. (2006). El gran ecosistema marino del Golfo de México: Perspectiva para su manejo. *Jaina Boletín Informativo* , 30-48.
- Rockne, K. C.-S., & James, T. (2002). Degradación anaerobia de naftalina por cultivos microbianos puros en condiciones reductoras de nitrato. *Microbiología Aplicada y Ambiental* , 799-813.

San Martín, P. S., & Hernández, R. (2012). Biorremediación de sedimentos contaminados de la laguna de Tamiahua, Veracruz . *Academia Mexicana Multidisciplinaria* , 1-5.

Sánchez, J. C. (2003). Isomería y nomenclatura de hidrocarburos. México: E-uaem.

Santiago, J. (2013). Proceso de biorremediación ex situ en lodo de perforación obtenidos de Potrero del Llano, Ver. Tuxpan, Veracruz: Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana.

Setti, L. L. (1993). Degradación de los n-alcanos en un aceite pesado por un cultivo puro de *Pseudomonas* SP. *Chemosphere* , 1151-1157.

Solanas, A. (2009). *La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos*. Barcelona, España: Universidad de Barcelona. Departamento de Microbiología.

Valderrama, B. (2000). *Microbiología del petróleo y sus derivados*. México: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Wade, L. G. (2004). *Química Orgánica*. México: Pearson-Prentice Hall.