



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERIA QUÍMICA
E INDUSTRIAS EXTRACTIVAS**

**CONSTRUCCIÓN DE UN BIORREACTOR CON BACTERIAS
INMOVILIZADAS PARA LA BIODEGRADACIÓN DE
HIDROCARBUROS.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA**

P R E S E N T A

M. EN C. YAIR CRUZ NARVÁEZ

DIRECTORES:

DR. ENRIQUE RICO ARZATE

DR. JOSE JAVIER CASTRO ARELLANO



MÉXICO D.F.,

MARZO 2019



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 17:00 horas del día 06 del mes de febrero del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESIQIE para examinar la tesis titulada:

"Construcción de un biorreactor con bacterias inmovilizadas para la biodegradación de hidrocarburos"

Presentada por el alumno:

CRUZ

NARVÁEZ

YAIR

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

B	1	3	1	0	0	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis



DR. JOSÉ JAVIER CASTRO ARELLANO



DR. ENRIQUE RICO ARZATE



DR. ARTURO MANZO ROBLEDO



DRA. TATIANA TIMOSHINA LUKIANOVA



DR. JIN AN WANG





DR. JAIME GARCÍA MENA

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

ESCUELA SUPERIOR DE
INGENIERÍA QUÍMICA E
INDUSTRIAS EXTRACTIVAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS



DRA. GUADALUPE SILVA OLIVER
INVESTIGACIÓN




INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 07 del mes marzo del año 2019, el (la) que suscribe Yair Cruz Narváez alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Ingeniería Química con número de registro B131001, adscrito a SEPI-ESIQIE, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. José Javier Castro Arellano y Dr. Enrique Rico Arzate y cede los derechos del trabajo intitulado “Construcción de un biorreactor con bacterias inmovilizadas para la biodegradación de hidrocarburos”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección ycruzni@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Yair Cruz Narváez

CONTENIDO

RESUMEN	11
ABSTRACT	12
CAPITULO 1 GENERALIDADES	13
1.1 La crisis del agua	13
1.1.1 El problema de la contaminación del agua	15
1.1.2 Alternativas de tratamiento	16
1.2 El biotratamiento	18
1.2.1 Mecanismos metabólicos involucrados en la degradación de hidrocarburos	21
1.3 Sistemas de biorreacción	24
1.3.1 Requerimientos del producto	25
1.3.2 Identificación del sistema biológico	25
1.3.3 Estequiometría y diseño del medio.....	25
1.3.4 Cinética	26
1.3.5 Selección del tipo de biorreactor	26
1.3.6 Diseño del sistema.....	26
1.3.7 Biorreactor con células inmovilizadas.....	27
1.4 Las sustancias húmicas	27
1.4.1 Definición y caracterización de las sustancias húmicas.....	27
1.5 ESTADO DEL ARTE	28
1.5.1 Antecedentes en la biorremediación de hidrocarburos mediante microorganismos y sustancias húmicas.	28
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS GENERALES	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
CAPITULO 2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	32
2.1 Compuestos	32
2.2 Métodos	33
2.3 Etapa I	34
2.3.1 Diseño del medio de cultivo	34
2.3.2 Producción, extracción y purificación de ácidos húmicos.....	34
2.3.3 Elaboración de muestras sintéticas.....	38
2.4 Etapa II	38
2.4.1 Adaptación de microbioma y generación del inóculo.....	38
2.4.2 Caracterización del microbioma	39
2.5 Etapa III	39
2.5.1 Selección del soporte microbiano.....	39
2.5.2 Formación de biopelícula	39
2.5.3 Escalamiento en biorreactor empacado.....	40
2.6 Etapa IV	41
2.6.1 Evaluación de la degradación en biorreactor empacado.	41
2.6.2 Caracterización del desarrollo del microbioma durante el proceso.	41
2.6.3 Evaluación de la degradación con adición de SH.....	41
CAPITULO 3 RESULTADOS Y ANÁLISIS	42

3.1 Comportamiento del medio de cultivo y efecto de SH.	42
3.2 Caracterización de SH.	44
3.2.1 Análisis por espectroscopia UV-vis, acidez total, grupos COOH y OH fenólicos.....	44
3.2.2 Análisis por espectroscopia IR.....	44
3.2.3 Análisis por RMN.....	46
3.3 Evaluación de la zeolita como soporte microbiano.....	46
3.4 Adaptación del microbioma.	50
3.5 Caracterización del microbioma.	51
3.6 Evaluación del proceso de degradación.....	52
3.6.1 CT, CI y CO.....	53
3.6.2 HTP y degradación de hidrocarburos.....	55
3.6.3 Efecto de las SH.....	67
CONCLUSIONES.....	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Métodos de tratamiento de aguas contaminadas.....	17
Figura 2.- Ventajas y desventajas de los diferentes tipos de métodos de tratamiento de aguas contaminadas.....	18
Figura 3.- Transformación de alcanos en acetil coenzima-A, mediada por el operon alkBFGHJKL y el operon alkST que decodifica la rubedroxina reductasa [16].....	23
Figura 4.- Mecanismo principal en la degradación aerobia de microorganismos y factores que intervienen en el proceso [18].....	24
Figura 5.- Representación esquemática del proceso para el diseño de un sistema de biorreacción.	25
Figura 6 Esquemización de la metodología experimental seguida en este trabajo.	32
Figura 7 Elaboración de composta a partir de heces vacunos y desperdicios orgánicos.	35
Figura 8 Depósito de lombricomposteo y generación de lixiviados.....	35
Figura 9 Metodología de extracción de los ácidos húmicos de los lixiviados de la lombricomposta.....	36
Figura 10 Proceso de purificación de los ácidos húmicos extraídos en medio ácido.....	36
Figura 11 Esquema del equipo utilizado para la determinación de la producción de CO ₂ . a) En un tubo de ensaye se colocan cristales de NaOH; b) agua contaminada con hidrocarburos e inoculada con consorcio bacteriano y zeolita como soporte y c) fluido manométrico, la diferencia en altura permite la cuantificación de producción de CO ₂	40
Figura 12 Diagrama general del sistema de biorreacción empleado.....	40
Figura 13 Comportamiento del pH al agregar cada una de las sales.....	42
Figura 14 Comportamiento del pH del medio mínimo al agregar SH.....	43
Figura 15 FT-IR-ATR de ácidos húmicos extraídos.	45
Figura 16 Microscopias en MEB de zeolita natural clinoptilolita en aumento de a) X200 b) X1 500 c) X20 000 y d) 25 000.....	47
Figura 17 Microscopias en MEB de zeolita comercial ZSM-5 en aumento de a) X200 b) X1 500 c) X25 000 y d) 30 000.....	48
Figura 18 Estudio de la estabilización del soporte zeolita durante el desarrollo de microorganismos en los sistemas con diesel como contaminante [D: sistema contaminado con diesel; DB: sistema contaminado con diesel e inoculación de microbioma y DBSH: sistema contaminado con petróleo, inoculado con microbioma y adición de ácidos húmicos].....	49
Figura 19 Estudio de la estabilización del soporte zeolita durante el desarrollo de microorganismos en los sistemas con petróleo como contaminante [P: sistema contaminado con petróleo; PB: sistema contaminado con petróleo e inoculación de microbioma y PBSH: sistema contaminado con petróleo, inoculado con microbioma y adición de ácidos húmicos].....	49

Figura 20 Proceso de adaptación del microbioma al diesel y petróleo como sustratos.....	50
Figura 21 Desarrollo de las fracciones de a) 465 kb y b) 431 kb [N: negativo, M: marcador].	52
Figura 22. Degradación de diesel presente en agua contaminada: a) muestra de agua con diesel y bacterias, b) muestra de agua con diesel, bacterias y sustancias húmicas.....	52
Figura 23. Degradación de petróleo presente en agua contaminada: a) muestra de agua con petróleo y bacterias, b) muestra de agua con petróleo, bacterias y sustancias húmicas.....	53
Figura 24. Variación de carbono total (CT), carbono orgánico total (CO) y carbono inorgánico (CI) en el sistema de agua contaminada con a) diésel y b) con diesel y ácidos húmicos.	54
Figura 25. Variación de carbono total (CT), carbono orgánico total (OC) y carbono inorgánico (CI) en el sistema de agua contaminada con a) petróleo y b) con petróleo y ácidos húmicos.	54
Figura 26 Disminución de la cantidad de HTP durante el proceso de biodegradación en el sistema contaminado con diesel, evaluado a través de GC-FID.....	56
Figura 27 Cromatograma de GC-FID de sistema contaminado con diesel inicial.	57
Figura 28 Cromatograma de GC-FID de sistema contaminado con diesel en el día 1.....	58
Figura 29 Cromatograma de GC-FID de sistema contaminado con diesel en el día 2.....	59
Figura 30 Cromatograma de GC-FID de sistema contaminado con diesel en el día 3.....	60
Figura 31 Disminución de la cantidad de HTP durante el proceso de biodegradación en el sistema contaminado con petróleo, evaluado a través de GC-FID.....	61
Figura 32 Cromatograma de GC-FID de sistema contaminado con petróleo inicial.....	62
Figura 33 Cromatograma de GC-FID de sistema contaminado con petróleo en el día 1.....	63
Figura 34 Cromatograma de GC-FID de sistema contaminado con petróleo en el día 2.....	64
Figura 35 Cromatograma de GC-FID de sistema contaminado con petróleo en el día 3.....	65
Figura 36 Biodegradación de diferentes fracciones de hidrocarburos en agua contaminada con diesel.....	66
Figura 37 Biodegradación de diferentes fracciones de hidrocarburos en agua contaminada con petróleo.....	66
Figura 38 Disminución de la cantidad de HTP durante el proceso de biodegradación en el sistema contaminado con diesel, evaluado a través de HPLC.....	68

Figura 39 Disminución de la cantidad de HTP durante el proceso de biodegradación en el sistema contaminado con diesel con adición de ácidos húmicos, evaluado a través de HPLC.	69
Figura 40 Disminución de la cantidad de HTP durante el proceso de biodegradación en el sistema contaminado con petróleo, evaluado a través de HPLC.	70
Figura 41 Disminución de la cantidad de HTP durante el proceso de biodegradación en el sistema contaminado con petróleo con , evaluado adición de ácidos húmicos, a través de HPLC.	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos utilizados durante la realización de este trabajo.	33
Tabla 2. Resultados de la caracterización de los AH extraídos por espectroscopía UV-vis.	44
Tabla 3 Pureza del material genético extraído en los 50 consorcios que conforman el microbioma.	51

RESUMEN

El presente trabajo se estudio el proceso de biodegradación aerobio de la fracción de hidrocarburos que satura el agua, mediante un microbioma extraído de un sedimento contaminado del sureste mexicano. Se analizo el efecto de la adición de sustancias húmicas en el proceso.

Con el objetivo de obtener una mayor tasa de degradación de hidrocarburos contaminantes hasta la mineralización bacteriana, se construyo un biorreactor con zeolita natural clinoptilolita como empaque, se promovió el crecimiento de los microorganismos en la superficie del sistema, evaluando su estabilización para descartar los efectos de adsorción del material.

La metodología experimental utilizada en este trabajo se dividió en 4 etapas: a) diseño del medio de cultivo, producción, extracción y caracterización de ácidos húmicos y elaboración de muestras sintéticas; b) adaptación de microbioma, caracterización de microbioma y generación del inóculo; c) selección del soporte microbiano, formación de biopelícula y escalamiento en biorreactor empacado y d) evaluación de la degradación en biorreactor empacado, caracterización del desarrollo del microbioma durante el proceso y evaluación de la degradación con adición de SH.

Las eficiencias de degradación que se obtuvieron fueron de 98.2% para el sistema contaminado con diesel y de 93.2% para el sistema contaminado con petróleo, esto sin la adición de ácidos húmicos. Con la adición de los ácidos húmicos la presencia de los hidrocarburos no fue detectada después del segundo día de tratamiento.

En general, el microbioma utilizado tiene elevada capacidad degradadora sobre la fracción de hidrocarburos contaminante del agua y la adición de ácidos húmicos promueve una degradación completa y una velocidad de degradación mayor.

ABSTRACT

A process of aerobic biodegradation of the saturated hydrocarbon fraction water was studied by a microbiome extracted of contaminated sediment from the Mexican southeast. The effect of adding humic substances in the process was analyzed.

In order to obtain a higher rate of degradation of hydrocarbon pollutants to bacterial mineralization, a bioreactor with natural zeolite clinoptilolite as packaging is built, the growth of microorganisms on the surface of the system was promoted by assessing their stabilization to negate of adsorption material.

The experimental methodology used in this work was divided into 4 stages: a) culture medium design, production, extraction and characterization of humic acids and synthetic preparation of samples; b) adaptation of microbiome, characterizing microbiome and inoculum generation; c) selection of microbial support, biofilm formation and scale bioreactor packed d) Degradation Assessment in bioreactor packed characterization microbiome development and evaluation during the process of degradation with the addition of SH.

Degradation efficiencies obtained were 98.2% for the contaminated with diesel and 93.2% for the system oiled system, this without the addition of humic acids. With the addition of humic acids for the presence of hydrocarbons it was not detected after the second day of treatment.

In general, the microbioma used has high degrading capacity on the fraction of water and hydrocarbon contaminants adding humic complete degradation and promotes a faster degradation.

CAPITULO 1 GENERALIDADES

1.1 La crisis del agua

La población mundial se pronostica será de mas de 9 mil millones de personas para el año 2050. Este hecho involucra toda una serie de complicados problemas debido a la enorme cantidad de recursos naturales necesarios para atender las necesidades básicas de los seres humanos, la principal de ellas: el agua. El consumo per cápita de agua es de 250 L/día, y una vez utilizada el agua se contamina y ya no es útil para su consumo, la solución a esto: el tratamiento del agua. En el futuro se pronostican conflictos armados entre países o incluso entre regiones del planeta motivados por la escasez de agua[1], [2]. La falta de agua genera problemas diversos, falta de higiene, crisis en la producción y generación de alimentos, sequía en los campos agrícolas, imposibilidad de alimentar ganado, lo que acarrea problemas en el desarrollo ganadero. La sequía por su parte permite la erosión, el empobrecimiento de los suelos y posterior infertilidad, disminución en la calidad de vida. La falta de agua genera la ausencia de vida, ya que este líquido es vital para su desarrollo y mantenimiento.

La búsqueda de vida en otros planetas esta enfocada en la búsqueda de agua en condiciones fisicoquímicas adecuadas para el desarrollo y mantenimiento de esta. En nuestro planeta las actividades antropogénicas han provocado una crisis de agua, ya que su consumo irresponsable y su contaminación por diversas sustancias la convierten de una sustancia protectora de la vida en una aniquiladora de esta.

Muy variados han sido los esfuerzos de la comunidad internacional por conseguir la regulación y legislación a favor del cuidado de este vital líquido, sin embargo se han interpuesto intereses económicos, políticos y corporativos que han ido en detrimento de la disponibilidad del recurso de manera igualitaria para todos los países del mundo. El tercer mundo, a pesar de tener recursos hídricos superiores a muchos países desarrollados, es incapaz de poner el agua en condiciones de sanidad adecuada para sus pobladores, es decir, su desarrollo tecnológico, su economía o su política

social no son capaces de potabilizar el agua, en contra del hecho que existen tecnologías actuales para llevar un agua negra a agua de la pureza para quirófano o para inyectar, y para tener eficiencias de tratamiento tan elevadas como la utilizada por Neil Armstrong para hacer su épico viaje a la luna.

La crisis de agua no es un problema tecnológico por tanto, es un problema político-social y va de la mano con los intereses económicos de las grandes potencias, las cuales irónicamente, no se encuentran exentas de padecer la problemática de la escasez en un futuro próximo.

México, por otra parte, posee una riqueza hídrica que le permite desarrollar actividades primarias tales como la agricultura, la ganadería. Posee ríos con caudales del orden de 115,000 hm³ tal como el río Grijalva, sin embargo, aun existe una enorme fracción que no dispone de agua potable, o que tiene que trasladarse enormes distancias para poder hacerse de algunos litros de agua para las necesidades más imperantes. En materia de legislación para la protección de los recursos hídricos, México ha desarrollado normas y programas tales como la Comisión Nacional del Agua, la Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca, los cuales no han cambiado el problema de la disponibilidad del agua potable[3].

En nuestra cultura el agua ha jugado un papel vital para el desarrollo de nuestra identidad como mexicanos. Desde los dioses a los que adoraban en el antiguo México-Tenochtitlán, tal como Tlaloc, hasta el proceso de nixtamalización, el cual se lleva a cabo en medio acuoso. A pesar de esto, aun no existen acciones de parte del gobierno que permitan el acceso al agua de manera equitativa, para probar este hecho no tenemos más que abrir nuestro periódico o encender un noticiero para escuchar que diariamente existe escasez en diferentes partes del país. El gobierno se ha preocupado enormemente por realizar acciones regulatorias respecto al sector energético, al sector industrial, al sector de servicios, etc, sea para beneficio de la población o para implementar su política entreguista de dichos sectores y su privatización, como la administración presente del presidente Peña. Sin embargo, parece no existir la noción del rol tan importante que el agua juega en este y en otros sectores de nuestro país, que la frase que reza: “ el agua es vida” se traduce en el aspecto de un país que el agua no solo es vida, sino también desarrollo, bienestar, salud, estabilidad, productividad, aseguramiento agrícola, ganadero, alimentario,

desarrollo tecnológico y futuro para las generaciones venideras. Es obligación de la generación presente, por tanto, cuidar el agua para garantizar su disponibilidad mañana y asegurar la disponibilidad en condiciones necesarias para cubrir necesidades básicas a todos y cada uno de los habitantes de este planeta.

1.1.1 El problema de la contaminación del agua

Al ser el agua un recurso vital, involucrado en todos y cada uno de los procesos que sostienen la vida, ciclos biogeoquímicos, regulación del clima, traslado de nutrientes, procesos metabólicos extra e intracelulares, reacciones enzimáticas, etc.; tiene un riesgo elevado de contaminación. Diversas son las fuentes de las que puede provenir la contaminación, siendo estas naturales o antropogénicas. En las fuentes de contaminación naturales, tales como las erupciones volcánicas, huracanes, entre otras, el sistema natural está preparado para eliminar la contaminación en algún proceso natural, generalmente en la intemperización. Sin embargo, en las actividades promovidas y realizadas por el hombre, la tasa de contaminación del agua rebasa la capacidad del sistema natural, lo que se traduce en graves alteraciones con consecuencias negativas irreversibles. Muchas son las fuentes de contaminación que el hombre, en sus actividades y en su avance hacia el desarrollo tecnológico desembocan en la contaminación del agua, desde las actividades agrícolas para la producción de alimentos, la ganadería intensiva, los procesos involucrados en la manufactura de materias primas, la explotación de recursos e inclusive la vivienda y las funciones metabólicas se convierten en un problema de contaminación debido a la enorme cantidad de personas existentes en el planeta.

La contaminación por hidrocarburos, no es un problema nuevo en nuestro país, pues ha sido consecuencia directa del desarrollo e industrialización de México. La Comisión Nacional de Hidrocarburos (CNH) se creó el 28 de noviembre de 2008 como un organismo con autonomía técnica para regular y supervisar la exploración y extracción de hidrocarburos en México. La CNH quedó formalmente instalada el 20 de mayo de 2009, a partir del nombramiento de los cinco comisionados integrantes de su órgano de gobierno [4]. Anualmente desde su creación, realiza un reporte anual con estadísticas de accidentes, derrames y fugas de crudo en el territorio nacional. Desde el año 2000 hasta el 2014 se habían derramado 93 700

barriles sobre el territorio nacional, llegando esto a afectar cuerpos de agua utilizados como suministro para el consumo [5].

1.1.2 Alternativas de tratamiento

Los métodos de tratamiento de agua se pueden dividir en físicos, químicos y biológicos. La aplicación de cada tipo de tratamiento o su combinación, dependerá del tipo de contaminante presente en el agua. La normatividad vigente en México referente al tratamiento de agua contaminada esta basada en el tipo de contaminación presente y el uso final del agua tratada; sin embargo, específicamente para el agua contaminada con hidrocarburos, no existe legislación para agua hasta la fecha. Las normas NOM-001-SEMARNAT-1996, NOM-002-SEMARNAT-1996 y NOM-003-SEMARNAT-1997 regulan la calidad del agua residual doméstica posterior a un tratamiento.

En la figura 1 se muestran las diversas alternativas de tratamiento de agua contaminada existentes.

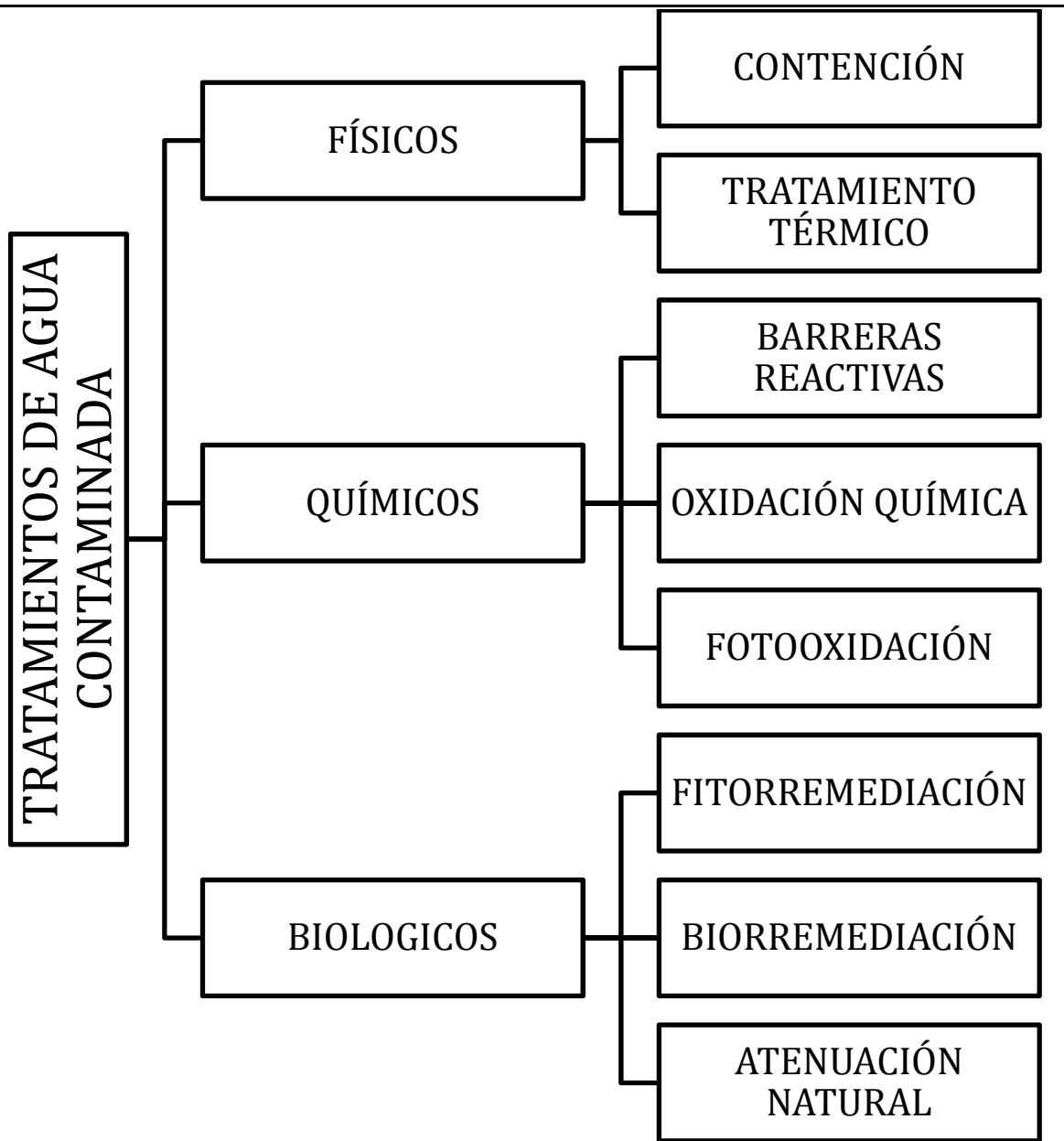


Figura 1.- Métodos de tratamiento de aguas contaminadas.

En la figura 2 se muestran las ventajas y desventajas de cada uno de los métodos de tratamiento.

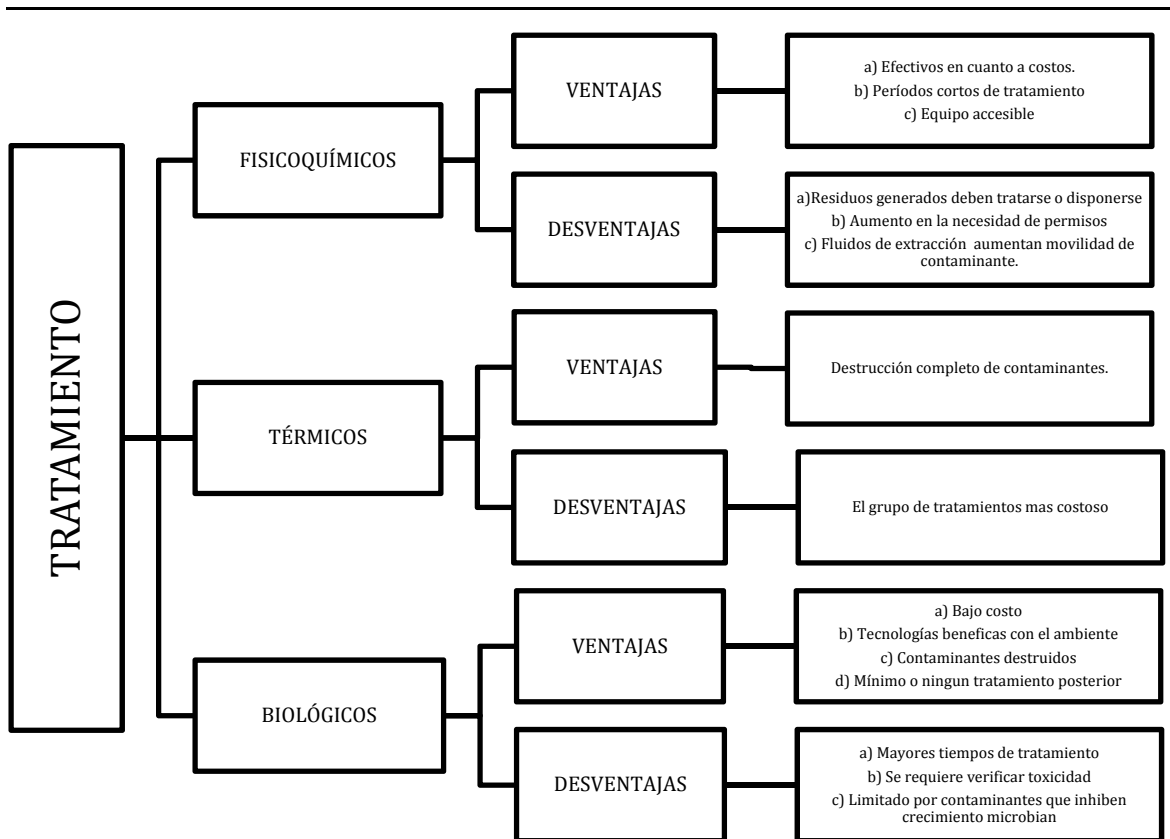


Figura 2.- Ventajas y desventajas de los diferentes tipos de métodos de tratamiento de aguas contaminadas.

El biotratamiento es una opción que ofrece ventajas y que además puede aplicarse a una enorme diversidad de contaminantes de manera específica, ya que los microorganismos pueden degradar de forma específica un grupo o familia química de contaminantes. En el biotratamiento existen, a su vez, el tratamiento aerobio y el tratamiento anaerobio. En general, el tratamiento aerobio tiene mayores ventajas operativas, mayor margen para soportar perturbaciones en las condiciones de operación, menor tiempo para llegar a un régimen estable y mayor tasa de degradación. Sin embargo, en el sistema anaerobio obtenemos además de biomasa, metano el cual tiene un valor energético que puede ser aprovechado. En este trabajo nos enfocaremos en el biotratamiento en condiciones aerobias.

1.2 El biotratamiento

En general, un proceso químico tiene por objeto la generación de productos de mayor valor agregado que las materias primas de las que se parten. Sea porque dichos productos no existen naturalmente, porque son difíciles de extraer si

existen y resulta más rentable fabricarlos o porque no hay suficiente disponibilidad de ellos en la naturaleza. Existen diversas maneras de aumentar la eficiencia de un proceso, modificando variables clave durante la operación, diseñando reactores químicos con características específicas para el proceso de interés. Sin embargo, un problema muy recurrente en la ingeniería química se presenta cuando el producto de interés tiene una estructura muy compleja, la reacción o serie de reacciones involucradas tienen una selectividad muy pobre al producto de interés, requiere una serie de pasos tediosos encareciendo el proceso a tal grado que ya no lo hacen rentable. Esto es especialmente cierto en la obtención de fármacos y sustancias de interés biológico. Afortunadamente, en muchas ocasiones es factible la producción de dichas sustancias utilizando sistemas biológicos. De lo anterior es posible inferir una serie de factores que determinan tanto las diferencias como la conveniencia de seguir una u otra vía sintética.

Aunque es verdad que las limitaciones en la operación de un reactor químico lo determinan factores como la estabilidad del compuesto a determinadas condiciones, el rendimiento de una reacción, la cinética, el equilibrio químico y el costo del proceso, entre otras; existen también otra serie de factores que son igualmente importantes, tales como la utilidad y grado de agresividad con el medio de los subproductos obtenidos, la facilidad para el tratamiento de dichos subproductos y por su puesto el grado de riesgo (laboral, ambiental y legal) del proceso. Un reactor químico puede operarse a condiciones severas, siempre que representen las óptimas para el proceso de interés.

Por otra parte, en un reactor bioquímico, los límites permisibles de operación, son mayormente determinados por las enzimas (si el proceso es enzimático) o por el sistema biológico en que se fundamente. Dichos límites son aquellos en los que los sistemas biológicos sigan siendo viables y funcionales, prefiriéndose las condiciones óptimas para ellos.

En una primera vista, parecería que un reactor bioquímico está en desventaja con un reactor químico, porque, como es de esperarse, el intervalo de los parámetros para el funcionamiento de este es mucho menor que el correspondiente a un reactor químico. Sin embargo los sistemas biológicos aportan una serie de beneficios difíciles de superar por un proceso químico, por ejemplo:

-
- Alta selectividad, por lo que es posible utilizar materia prima con pureza menor a la que correspondería a un proceso químico.
 - Alta especificidad para obtener el producto de interés.
 - Un mayor control ante factores externos, tales como una contaminación de materias primas, un cambio repentino en la concentración, una variación en la temperatura o presión de operación, desde luego siempre que estén dentro del intervalo de funcionamiento del sistema vivo.
 - En general, menores costos ya que “la maquinaria” de síntesis están contenidas en el interior del sistema biológico y el diseño del biorreactor está orientado a facilitar el desarrollo de dicho sistema biológico.

El biotratamiento puede dividirse en tres maneras de aplicarse:

- a) Fitorremediación: el uso de plantas para la descontaminación; esta técnica es muy útil en la extracción y limpieza cuando el contaminante es un metal pesado. Sin embargo, no existen estudios de los efectos en la integridad de las plantas utilizadas y las alteraciones que estas sufren. Otro punto importante es que la presencia de microorganismos en diferentes partes de la planta favorece y condiciona la eficacia de la técnica.
- b) Biorremediación en condiciones anaerobias; existen microorganismos capaces de realizar sus funciones bioquímicas en ausencia de oxígeno diatómico, inclusive para muchas de ellas es una condición necesaria. Los productos que generan estos microorganismos bajo estas condiciones son CH_4 , CO_2 y biomasa. La principal ventaja de la técnica anaerobia consiste en que el 90% de la energía se emplea para la producción del biogás (la mezcla de CH_4 y CO_2) y solo el 10% para el crecimiento microbiano, lo que se traduce en beneficios económicos, ya que el biogás es altamente energético.
- c) Biorremediación en condiciones aerobias; los microorganismos que requieren oxígeno pueden degradar los contaminantes mas rápida y eficientemente. Existe mayor generación de biomasa, y una inversión de hasta el 50% de la energía en el metabolismo aerobio. Los productos son

CO₂, H₂O y biomasa. La alta cantidad de biomasa producida se traduce en la elevada conversión del contaminante que actuó como sustrato.

La biorremediación, es un método de limpieza de agua o ambientes contaminados usando la inherente capacidad de los microorganismos para degradar o convertir sustancias. El tratamiento de aguas residuales domésticas mediante lodos activados es uno de los grandes avances en la biorremediación. El éxito de la biorremediación depende de la existencia y capacidad de degradación de los microorganismos. En este punto, la biostimulación es un paso muchas veces indispensable para acelerar o aumentar la capacidad degradativa de un microorganismo[6]. Entre los bioestimulantes están compuestos inorgánicos como nitrógeno y fósforo, sustratos sencillos como el metano y moléculas de bajo peso molecular y/o oxígeno para garantizar condiciones aerobias [6]–[8].

Cuando los microorganismos presentes no tienen la capacidad para degradar los contaminantes, se puede agregar microorganismos con la capacidad, a esta técnica se le denomina bioaumentación [6], [8], [9]. En la bioaumentación, es indispensable evaluar la patogenicidad de los microorganismos adicionados y los efectos ecológicos [6].

Es posible que los microorganismos nativos tengan la capacidad de degradar de forma natural, en cuyo caso, el monitoreo de la concentración de contaminantes es una medida suficiente, y este mecanismo se denomina atenuación natural [6], [10], [11].

1.2.1 Mecanismos metabólicos involucrados en la degradación de hidrocarburos

Aunque la importancia de la actividad microbiana en pozos petroleros se conoce desde hace mucho tiempo, el estudio sobre la naturaleza y diversidad del desarrollo bacteriano en esos ecosistemas es pobre y su actividad metabólica in situ aun no ha sido totalmente esclarecido [12].

Una amplia variedad de microorganismos han sido aislados o detectados en fracciones de crudo mediante técnicas moleculares: aerobias, anaerobias facultativas y microaerofílicas. Las transformaciones que los microorganismos pueden llevar a cabo han revolucionado la industria petroquímica en los últimos 20 años, y estas incluyen biodesulfuración, bionitrogenación,

biodesmetalización, bioemulsificación y recuperación mejorada de petróleo por microorganismos [12], [13].

Todas las operaciones en la industria del petróleo tales como exploración, producción, transporte y refinamiento son fuentes potenciales de contaminación de agua, suelo y aire [14]. Entre las tecnologías disponibles para la limpieza de zonas contaminadas por hidrocarburos, la biorremediación y la fitorremediación son las más amigables con el ambiente y las más económicas. Las bacterias son capaces de degradar compuestos tóxicos orgánicos tales como xenobióticos que incluyen herbicidas, pesticidas, refrigerantes, solventes, etc. Las bacterias pueden actuar como mejoradores de la fitorremediación, participando activamente en el proceso [13], [15].

La comprensión de los procesos involucrados en la biotransformación, biodegradación y biorremediación del petróleo por parte de los microorganismos, ha ido esclareciéndose gracias al desarrollo de técnicas moleculares, debido a que menos del 1% de microorganismos son cultivables en condiciones de laboratorio. Estas técnicas permiten estudiar material genético de todo un conjunto de microorganismos sin necesidad de aislar y cultivar. Estas mismas técnicas, han permitido la caracterización detallada de la estructura de la membrana bacteriana, lo cual permite establecer mecanismos de ingreso y ascensión de las moléculas de hidrocarburos al interior celular [16]. La comprensión de este mecanismo es vital para la aplicación de correctos principios de ingeniería [13], [16].

Se ha reportado el uso de microorganismos para el monitoreo de diferentes compuestos orgánicos contaminantes como alcanos, benceno y derivados, naftaleno, salicilatos, bifenilos policlorados y clorocatecoles [17], entre los microorganismos reportados con actividad degradadora de estos hidrocarburos se encuentran *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* y *Rhodococcus*[18].

En el metabolismo aerobio de alcanos, *Pseudomona putida*, por ejemplo, la enzima monooxigenasa unida a la membrana permite la conversión de un alcano en un alcohol, el cual puede ser oxidado más tarde en un aldehído y en ácido para proceder a la β -oxidación y al ciclo de los ácidos tricarbónicos [16], [19].

En la figura 3 se muestra la regulación que se lleva a cabo por un par de operones para transformar alcanos en acetil coenzima-A [16].

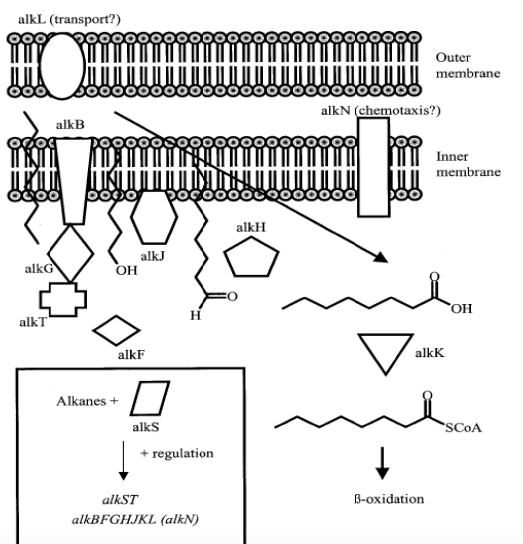


Figura 3.- Transformación de alcanos en acetil coenzima-A, mediada por el operon alkBFGHJKL y el operon alkST que decodifica la rubredoxina reductasa [16].

Se ha reportado que *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia* y *Acinetobacter sp.* poseen operones con capacidad degradadora del tipo alk [12], [16]. En *Acinetobacter sp.* se ha descrito una vía donde una dioxigenasa convierte un alcano a aldehídos a través de n-alquilhidroperoxidasas sin un alcohol intermedio. Esta dioxigenasa requiere oxígeno molecular para catalizar la oxidación de los n-alcanos (C₁₀ a C₃₀) y alquenos (C₁₂ a C₂₀) sin la producción de radicales [16].

Uno de los principales factores que limita la biodegradación de un hidrocarburo es su biodisponibilidad [20]. Los hidrocarburos difieren en su susceptibilidad para ser atacados por un microorganismo en el siguiente orden: alcanos lineales, alcanos ramificados, aromáticos pequeños, cicloalcanos y con mayor dificultad los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en inglés) [18].

Los factores que afectan la efectividad de la biodegradación de hidrocarburos son las propiedades fisicoquímicas del contaminante; la temperatura porque afecta directamente la química de los contaminantes, su solubilidad y la fisiología y diversidad de la microflora; la presencia de nutrientes tales como nitrógeno, fósforo y en algunos casos hierro [16], [18], [21]. En la figura 4 se

muestran los factores que intervienen en el proceso de biodegradación de un hidrocarburo.

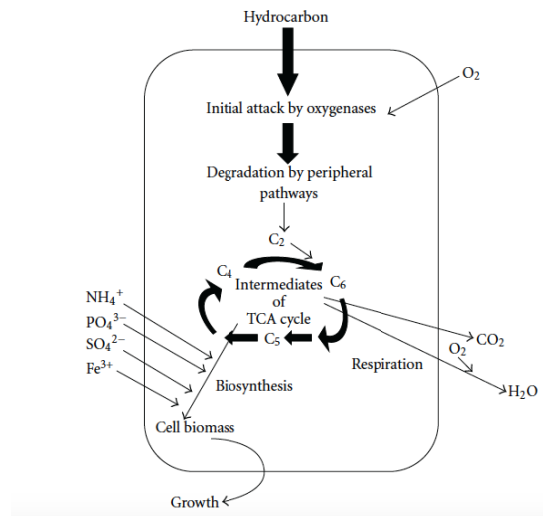


Figura 4.- Mecanismo principal en la degradación aerobia de microorganismos y factores que intervienen en el proceso [18].

La vía aerobia favorece mas rápida y eficientemente la biodegradación de la mayoría de los hidrocarburos contaminantes. Como se ilustra en la figura 2, el ataque inicial al contaminante orgánico es un proceso oxidativo y requiere la activación de enzimas tales como oxidasas y peroxidasas que catalicen el proceso [16], [18], [21]. En el presente trabajo se evalúa la eficiencia degradadora de diferentes microorganismos en el suelo a escala microcosmos .

1.3 Sistemas de biorreacción

La selección y diseño específico de un biorreactor incluye una serie de decisiones en materia de microbiología y bioquímica para procesos bioquímicos. En la figura 5 se muestra un esquema para el diseño de un biorreactor.

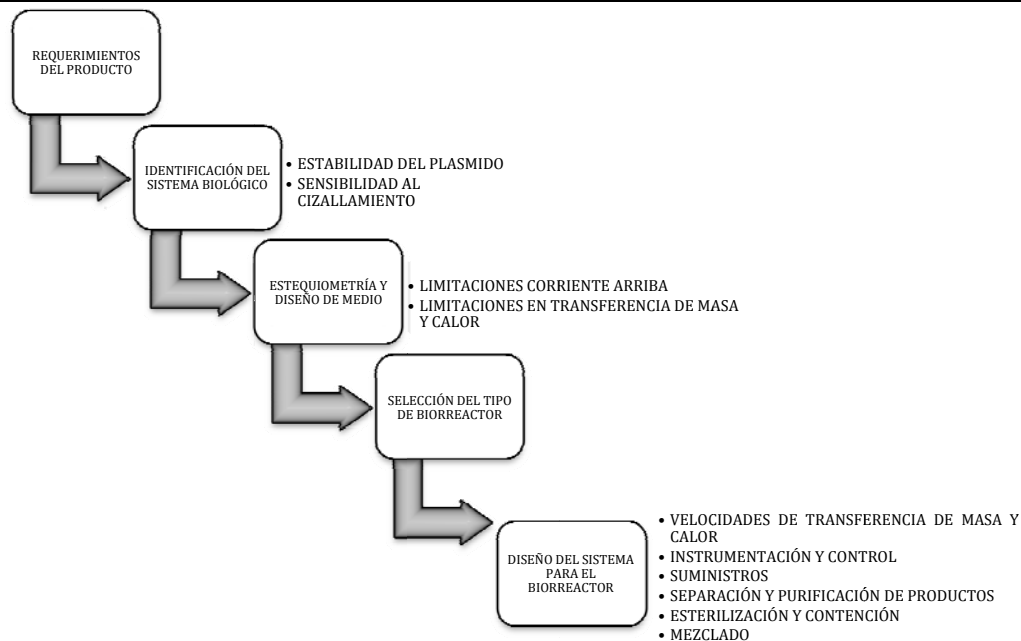


Figura 5.- Representación esquemática del proceso para el diseño de un sistema de biorreacción.

1.3.1 Requerimientos del producto

El diseño final de un sistema para producción industrial o para productos biotecnológicos lo definen los objetivos comerciales. La pureza requerida, las características del producto, la presentación y otras características cruciales en el diseño del proceso los rige el mercadeo de este.

1.3.2 Identificación del sistema biológico

Los sistemas biológicos considerados en el diseño del proceso son: microorganismos, plantas y células animales. Cada uno de estos sistemas hace variar enormemente los costos del proceso a diseñar, ya que puede requerir condiciones muy controladas y especiales para su mantenimiento, debido a la gran sensibilidad de dichos sistemas. La caracterización genética de los sistemas biológicas proporcionan enormes ventajas en el proceso de diseño. Finalmente, el sistema biológico empleado limita el rendimiento del producto de interés.

1.3.3 Estequiometría y diseño del medio

El diseño del medio es vital para un adecuado desarrollo del sistema biológico seleccionado. El medio debe contener los elementos absolutamente necesarios para cubrir las necesidades nutricionales de las células del sistema biológico. El metabolismo de los organismos que conforman el sistema es responsable de la conversión de algunos componentes del medio y de la liberación de calor. La

estequiometría proporciona información básica para la transferencia de masa y calor. Las relaciones cuantitativas entre el consumo de sustrato, formación de productos y evolución calorífica son muy importantes en el diseño del proceso. Debido a la complejidad de las células vivas, los balances de materia y energía están basados en la bioquímica de éstas, y por tanto, pueden aproximarse las variables que determinan las funciones bioquímicas, pero con limitaciones en su validez a un determinado intervalo.

1.3.4 Cinética

La información estequiométrica complementa la cinética del proceso. Estos dos puntos son nucleares en el diseño de un biorreactor. Existen dos formas de desarrollar los cálculos cinéticos, la primera es recurrir a los datos publicados si estos se encuentran disponibles o la segunda forma, es generarlos mediante un estudio específico a escala laboratorio. En este punto, la transferencia de masa y los fenómenos causados por el mezclado se pueden incorporar en el diseño del sistema.

1.3.5 Selección del tipo de biorreactor

El primer paso es la selección del biocatalizador: bacterias, hongos, animales o insectos, células suspendidas versus células inmovilizadas. Las formas de transferencia de masa y calor originan la selección del tipo de biorreactor y el modo de operación. El cambio en las propiedades del sistema de biorreacción durante el proceso de transformación pueden afectar la eficiencia alcanzada en el sistema o la funcionalidad óptima de este, un cambio en la viscosidad debido al incremento en la concentración del producto, la cantidad de gas obtenido o la variación térmica deben ser considerados. Las operaciones de separación y purificación del producto pueden incluirse en el biorreactor, o comenzar estas operaciones en el momento inmediato de la generación de productos.

1.3.6 Diseño del sistema

El diseño real del sistema de biorreacción está basado en la expresión cinética del proceso, las velocidades de transferencia de masa y calor requeridos y las condiciones de mezclado. En este punto se realizan las consideraciones para el escalamiento del biorreactor y los detalles tales como la instrumentación y control, los servicios auxiliares de aire, agua y vapor. Los elementos básicos para el dimensionamiento de un biorreactor son:

- a) La ecuación de velocidad;
- b) Concentración máxima de células y
- c) Características de flujo en el reactor.

Estos elementos determinan la productividad y dimensión del reactor

1.3.7 Biorreactor con células inmovilizadas

Las células inmovilizadas han sido utilizadas para transformaciones, síntesis y degradación. Las ventajas de la inmovilización de células son:

- a) Aplicación a reacciones enzimáticas multietapa;
- b) El rendimiento de la actividad enzimática es alto;
- c) Alta estabilidad operacional;
- d) La operación de extracción y purificación enzimática es innecesaria;
- e) Alta densidad celular;
- f) La densidad celular y actividad enzimática se mantienen por un largo período de tiempo;
- g) Los productos son fácilmente recuperados de las células inmovilizadas y
- h) Las células inmovilizadas son menos susceptibles a la contaminación microbiana.

Las principales desventajas en la inmovilización celular son:

- a) Catálisis enzimática de múltiples reacciones indeseables;
- b) Contaminación por fugas de células y
- c) La permeabilidad del sustrato y producto a través de las membranas celulares puede ser limitada.

La elección de un diseño particular depende de los requerimientos de transferencia de masa, el comportamiento en el crecimiento celular y las propiedades estructurales del agregado.

1.4 Las sustancias húmicas

1.4.1 Definición y caracterización de las sustancias húmicas

Las sustancias húmicas (SH) son operacionalmente definidas como una fracción de la materia orgánica del suelo y representan la mayor reserva de

carbono orgánico recalcitrante en el medio ambiente terrestre[22]. La vasta mayoría de las SH en el suelo es una mezcla muy compleja de microorganismos y biopolímeros de plantas y sus productos de degradación. El carbono orgánico representa aproximadamente el 62% del carbono global del suelo, mientras al menos el 50% de este carbono puede ser clasificado como el componente químico resistente conocido como SH[23].

Las SH extraíbles son ubicuas en la naturaleza y juegan un rol esencial en la agricultura sostenible, calidad del agua e inmovilización y transporte de nutrientes y químicos antropogénicos; al mismo tiempo que ofrecen potenciales oportunidades para el desarrollo de nuevos compuestos para su aplicación en la industria y en la medicina[22].

La fuente principal para la formación de materia orgánica en el suelo es la biomasa vegetal y microbiana, la composición y las propiedades de estos son factores de control importantes para los procesos de humificación. Al considerar los aspectos estructurales de HS, es necesario examinar la contribución de las diferentes clases de compuestos que forman tales tejidos. Estas categorías incluyen materiales intracelulares de almacenamiento (por ejemplo, proteínas) y materiales estructurales (por ejemplo, polisacáridos, ligninas, y componentes alifáticos incluyendo lípidos de la membrana y las cutículas de las plantas) que forman membranas y paredes celulares [24]. La humificación es el proceso químico-microbiológico de la transformación de la materia orgánica proveniente de los organismos vivos en una clase general de compuestos orgánicos refractarios[25].

1.5 ESTADO DEL ARTE

El estado del arte se describe de forma inductiva, es decir, se revisa de forma separada cada uno de los factores considerados para efectuar el proceso de biodegradación de hidrocarburos a través de un microbioma y ácidos húmicos en un biorreactor.

1.5.1 Antecedentes en la biorremediación de hidrocarburos mediante microorganismos y sustancias húmicas.

Desde el derrame del Exxon Valdez, en 1989 en la costa frente a Alaska, el estudio y aplicación de la microbiología para la descontaminación de hidrocarburos ha tenido un gran desarrollo [26]. Los estudios recientes se centran en factores tales como nutrientes, estado físico del hidrocarburo, oxígeno, temperatura, salinidad y presión [16].

La biodegradación por poblaciones de microorganismos autóctonos representa

uno de los mecanismos primarios mediante el cual los hidrocarburos pueden ser removidos del ambiente [18].

El papel de los minerales presentes en un medio para estabilizar y apoyar la degradación de hidrocarburos en condiciones aerobias se ha estudiado poniendo especial interés en la mineralización de los hidrocarburos[8], [27], [28].

Para principios de la década de los 90's ya se tenían enlistados como organismos degradadores de hidrocarburos a 27 géneros de bacterias y 31 géneros de hongos, los cuales podían alcanzar eficiencias de degradación del 8 al 82% en hongos del suelo; del 0.13 al 50% para bacterias del suelo y del 0.003% al 100% para bacterias de aguas marinas[29].

Las cianobacterias, algas verdes, rojas y cafés tienen la capacidad de degradar naftaleno [18].

Wang y col. presentaron en 2014 un trabajo en el que propusieron la producción de un di ramnolípido, el cual se ha evidenciado a través de la reducción de la tensión superficial de la solución por efecto del surfactante producido[30]. Dentro de este mecanismo, el surfactante producido tiene la función de aumentar la biodisponibilidad del contaminante[16], [20], [31]. La degradación alcanzada de la fracción de n-alcenos en un medio mineral con 0.4% de petróleo fue del 95% en un período de 4 días [20].

La degradación de hidrocarburos en sistemas de biorreactores presentan una diferencia. La velocidad de degradación aumenta en un sistema en lecho empacado respecto a un sistema en fase libre [32].

Uno de los primeros estudios sobre las sustancias húmicas y la contaminación por hidrocarburos fue hecho en Alemania en 1999 por Thomas y col., en este trabajo se analizó la transformación de TNT durante el proceso de humificación, en una zona contaminada en suelo y agua[33].

Alexandrova y col., en 2011 estudiaron las sustancias húmicas estructuralmente para relacionar sus interacciones en procesos biológicos, tanto en sistemas vivos como en sistemas ambientales, entre ellos mostraron la aplicación potencial en los procesos de remediación [34].

Can-Turgay y col. evaluaron en 2009 el efecto de agregar sustancias húmicas provenientes de leonardita en suelo contaminado con hidrocarburos, siguiendo las fracciones C13-C31 con el objetivo de comparar el proceso con la bioaumentación. En el trabajo se reporta el uso de enzimas ureasa, ácido alcalin fosfatasa y la deshidrogenasa como agentes degradadores. El trabajo concluye que no existe un efecto considerable entre la bioaumentación y la

adición de sustancias húmicas en periodos de tiempo cortos. Sin embargo en periodos de tiempo largos, la tasa de degradación es alta y además es de mejor calidad, es decir, la mineralización es mayor y la fracción de hidrocarburos degradados contiene mayor número de carbonos. A pesar de esto, la concentración inicial del contaminante fue de apenas 2.4% [35].

Las sustancias húmicas son responsables de diferentes efectos en los organismos vivos tales como a) interferir en la producción fotosintética de oxígeno; b) interferir en la información química y hormonal; c) mostrar efectos similares a hormonas y d) regulación de una variedad de genes de nematodos en el compost [36].

Park y col. han encontrado en muestras subárticas de suelo, que existen clases de bacterias tales como *Bacilli* y γ -*Proteobacter* con capacidad de utilizar las sustancias húmicas como fuentes de carbono para su desarrollo. Ellos aislaron 122 especies de bacterias que mostraban esta capacidad. El cambio en la estructura de las SH, posterior al crecimiento bacteriano, por comparación de los espectros de IR evidenciaron no solo su utilización como sustrato, sino la transformación en moléculas de mayor complejidad [37].

Lippold y col. han encontrado que en la degradación de PAH, la adición de sustancias húmicas no aumenta significativamente la degradación natural en medio acuoso [38], lo cual puede deberse a la presencia de estructuras poliaromáticas en las sustancias húmicas. Fava y col. estudiaron los efectos de las SH en una zona contaminada con PAH. Los resultados de este trabajo muestran un incremento de la biodisponibilidad de los contaminantes, lo que aumenta la velocidad y el porcentaje de degradación. Este resultado se atribuye a las características particulares de los microorganismos nativos encontrados en la zona contaminada.

Lipczynska-Kochany y col. reportaron el uso de SH en la biorremediación de un efluente de agua contaminada con fenol y formaldehído de procedencia industrial. El aumento en la dosis de SH agregados, hasta 2000 mg/L, disminuyó el efecto inhibitorio e incremento la remoción hasta llegar a un 44% [39].

El panorama anterior, muestra que las interacciones tanto de los contaminantes, los microorganismos y las sustancias húmicas en un sistema de biorreacción pueden proporcionar una metodología eficiente de degradación de hidrocarburos. Por lo tanto, en el presente trabajo se plantea la siguiente:

HIPÓTESIS

- La inmovilización de un consorcio bacteriano donde predomina el género *Pseudomonas* para formar una biopelícula permitirá obtener eficiencias de degradación de hidrocarburos mayores al 95%, utilizando como medio de soporte un material poroso.
- La adición de surfactantes naturales (ácidos húmicos) al medio de cultivo permitirá facilitar la degradación de hidrocarburos, reduciendo el tiempo de tratamiento menor a 3 días.

OBJETIVOS GENERALES

- Diseñar y construir un biorreactor aerobio en régimen continuo para la biodegradación de la fracción media de HTP utilizando un microbioma formado por bacterias y hongos;
- Inmovilizar una biopelícula de bacterias y hongos sobre un material poroso en el interior del biorreactor.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el tipo de material poroso para realizar la inmovilización y formación de una biopelícula bacteriana;
- Utilizar diesel y petróleo crudo como modelos contaminantes de agua en el tratamiento para comparar la aplicación del biorreactor con diferentes hidrocarburos y establecer la concentración limitante del desarrollo microbiano;
- Evaluar la contribución de los ácidos húmicos en el proceso de biodegradación.
- Estudiar las variaciones en la expresión de los diferentes microorganismos que se expresan a lo largo del proceso de biodegradación en el sistema

CAPITULO 2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El trabajo experimental se ha dividido en 4 etapas, bajo la premisa de la caracterización, el acondicionamiento y finalmente la evaluación de la degradación. En la figura 6 se muestra esquemáticamente el trabajo desarrollado durante este trabajo.

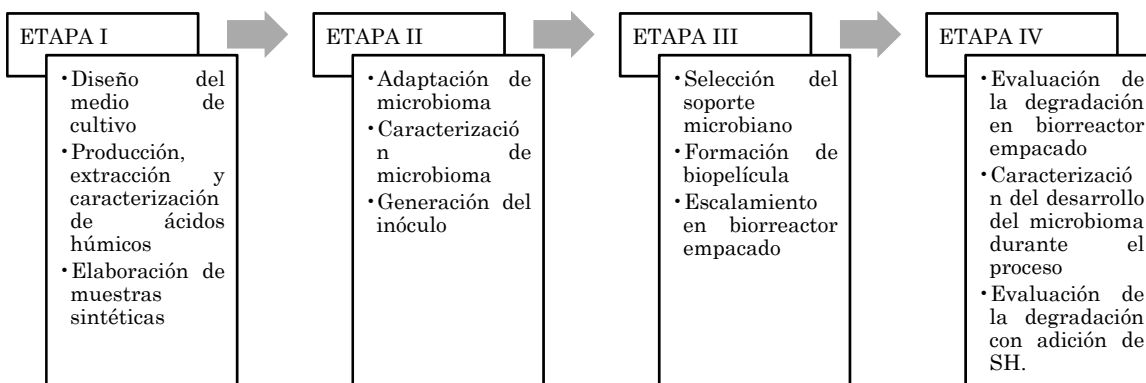


Figura 6 Esquematación de la metodología experimental seguida en este trabajo.

2.1 Compuestos

En este trabajo se utilizaron un total de 30 compuestos, listados a continuación. Cloruro férrico (FeCl_2), fosfato ácido de potasio(KH_2PO_4), cloruro de magnesio (MgCl_2), cloruro de sodio(NaCl), cloruro de amonio (NH_4Cl), cloruro de calcio (CaCl_2), sulfato de zinc (ZnSO_4), cloruro de manganeso (MnCl_2), ácido bórico (H_3BO_4), cloruro de cobalto (CoCl_2), cloruro de cobre(CuCl_2), cloruro de níquel(NiCl_2), molibdato de sodio (Na_2MoO_4), hidróxido de sodio (NaOH), persulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$); con pureza 99.9%, ácido clorhídrico (HCl) grado analítico con 36% de pureza; todos estos reactivos fueron proporcionados por Fermont. Medio tripticasa de soya (TSA), proporcionado por BIOXON grado bacteriológico. Metanol, agua y acetonitrilo grado HPLC, con pureza 99.99%, proporcionados por J.T. Baker. Tetracloruro de carbono (CCl_4), cloruro de metileno (CH_2Cl_2), grado analítico, con pureza 99.9%, proporcionados por J.T. Baker. Agua deuterada proporcionada por Merck Pureza. Hidrógeno, nitrógeno

y helio grado cromatográfico, con pureza 99.98%, proporcionados por Infra.Diesel comercial. Petróleo, mezcla maya de 30.5°API, proporcionado por el Instituto Mexicano del Petróleo.

2.2 Métodos

En la tabla se enlistan los métodos utilizados durante el trabajo.

Tabla 1. Métodos utilizados durante la realización de este trabajo.

Parámetro	Norma	Método	Equipo
pH	NMX-AA-008-SCFI-2001	Potenciométrico	Potenciómetro (marca: Corning)
Conductividad	NMX-AA-093-SCFI-2000	Conductimétrico	Potenciómetro (marca: Corning)
Demanda química de oxígeno	NMX-AA-30-SCFI-2001	Espectrofotométrico	Termo-reactor (marca: Hach); Espectrofotómetro (marca: Hach, modelo: DR 2700)
Sólidos suspendidos totales	NMX-AA-034-SCFI-2001	Peso seco	Balanza analítica (marca: Sartorius, modelo: TE1245); estufa eléctrica (marca: Termolyne, modelo:)
Carbono orgánico total	-	Oxidación térmica	Analizador TOC (marca: General Electric, serie Innovox:)
Determinación de HTP	EPA Method 8015 modificado	GC-FID	Cromatografo de gases Clarus 580 con detector FID (Marca Perkin Elmer).Columna Elite MS
Determinación de HTP	-	HPLC-PDA	Cromatografo de Líquidos de Alta Resolución Flexar (Marca Perkin Elmer).Columna C18
Densidad óptica	-	UV-VIS	Espectrofotometro de uv-vis (Marca Ocean Optics).modelo
Análisis de ^1H y ^{13}C	-	RMN	RMN 450 Mz (Marca Bruker Mod. Avance III HD
Análisis de Infrarrojo	-	IR-ATR	Espectrofotometro IR-ATR (Marca Perkin Elmer Frontier)

2.3 Etapa I

2.3.1 Diseño del medio de cultivo

El medio mineral o mínimo debe cumplir con una alta proporción de fosfatos, para favorecer la actividad metabólica microbológica y permitir la adaptación al contaminante como fuente de carbono. El medio mínimo utilizado es el siguiente: 1.2 mL/L FeCl_2 0.1%, KH_2PO_4 0.5 g/L, MgCl_2 0.4g/L, NaCl 0.4 g/L, NH_4Cl 0.4 g/L, CaCl_2 0.05 g/L, 1mL/L solución elementos traza: ZnSO_4 10 mg/L, MnCl_2 3.0 mg/L, H_3BO_4 30 mg/L, CoCl_2 20 mg/L, CuCl_2 1.0 mg/L, NiCl_2 2.0 mg/L, Na_2MoO_4 3.0 mg/L; preparado y ajustado a pH de 7.1 con solución 0.1 N de NaOH .

2.3.2 Producción, extracción y purificación de ácidos húmicos.

Las sustancias húmicas, a partir de las cuales se realizó la extracción de los ácidos húmicos, fueron producidos utilizando heces de ganado vacuno alimentado de manera orgánica y con desperdicios vegetales cultivados con ausencia de pesticidas. Este proceso se llevó a cabo en la planta de lombricomposteo de la Universidad Autónoma Chapingo. En la figura 7 se muestra una imagen de las pilas de lombricomposteo.



Figura 7 Elaboración de composta a partir de heces vacunos y desperdicios orgánicos.

La materia orgánica es transformada en composta, durante un período de 2 meses, con volteos cada 15 días, manteniendo una humedad de 60%. Al término de la transformación, la composta es trasladada a un depósito como el mostrado en la figura 8, en el cual se inoculan lombrices del género *Eisenia fetida*, comúnmente conocida como lombriz roja californiana. En este depósito, los lixiviados son recuperados durante el proceso de transformación de la composta en lombricomposta.



Figura 8 Depósito de lombricomposteo y generación de lixiviados.

Las sustancias húmicas se han generado durante todo este proceso, y se encuentran presentes en el lixiviado producido. Una muestra es sometida al proceso de extracción en el laboratorio mostrado en la figura 9.

El proceso de extracción está basado en la metodología utilizada por Torres y col. [40] y por lo reportado por Stevenson [41]. En estos trabajos la extracción alcalina reporta hasta un 80% de eficacia.

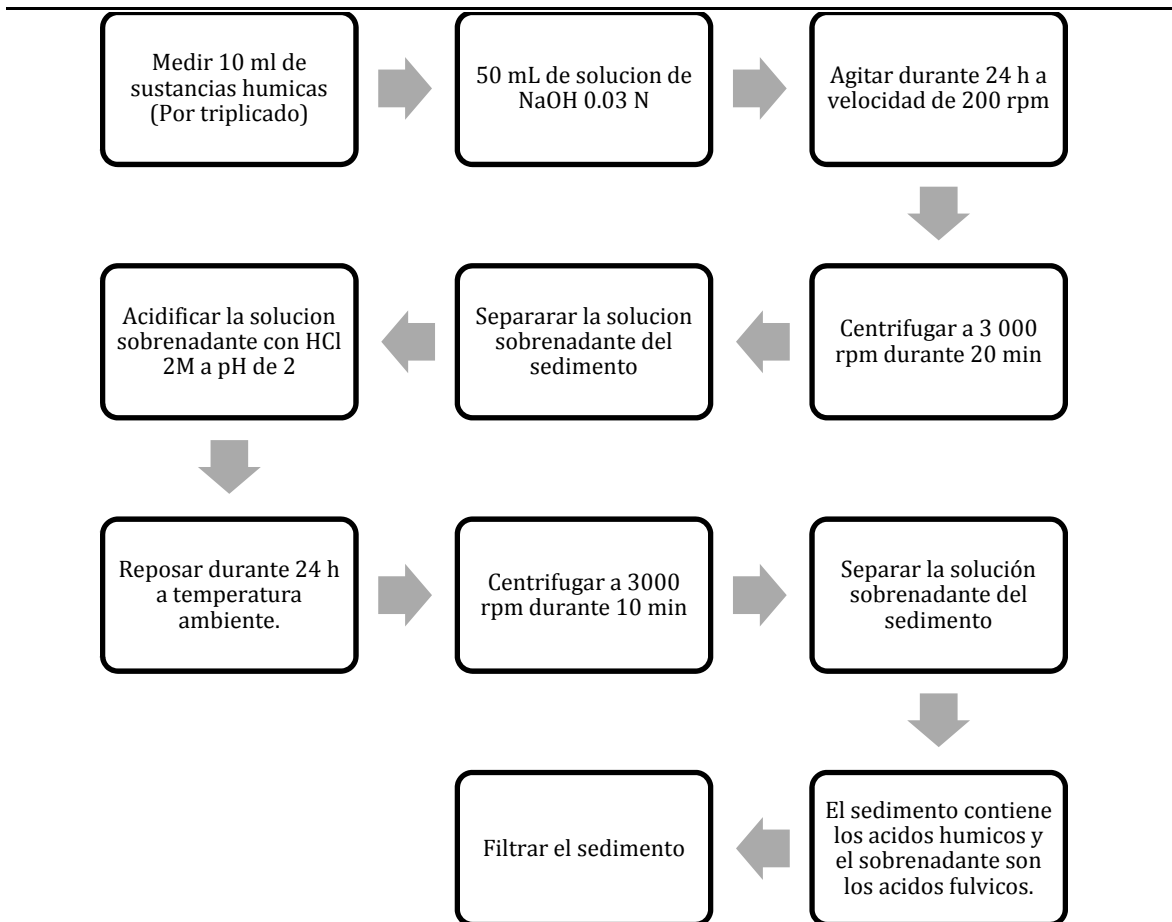


Figura 9 Metodología de extracción de los ácidos húmicos de los lixiviados de la lombricomposta.

El proceso de purificación de los ácidos húmicos extraídos, se muestra en la figura 10.

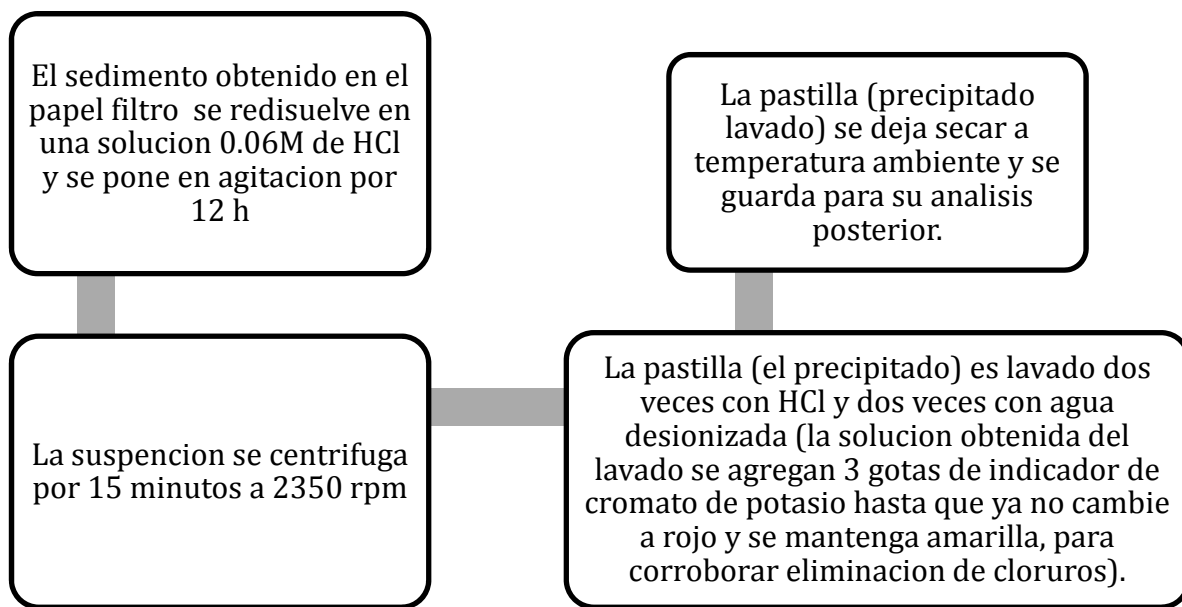


Figura 10 Proceso de purificación de los ácidos húmicos extraídos en medio ácido.

La caracterización de los ácidos húmicos obtenidos se llevó a cabo mediante tres técnicas: espectrofotometría de UV-vis, espectroscopia de Infrarrojo mediante ATR y análisis de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y de ^{13}C .

Para llevar a cabo la evaluación por UV-vis, se realizó la determinación de la relación de densidades ópticas E_4/E_6 [42]. Se disolvieron 3 mg de ácidos húmicos en 10 mL de NaHCO_3 0.05 N pH = 8. Como referencia se utilizó la solución de NaHCO_3 . Se midió la absorbancia a 465 y 665 nm.

Para la determinación de la acidez total, se pesó 50 mg de ácidos húmicos en un matraz Erlenmeyer con tapón esmerilado. Posteriormente se agregaron 20 mL de solución $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0.2 N. En forma simultánea se corrió un blanco con 20 mL de solución de $\text{Ba}(\text{OH})_2$. Se tapó el matraz cuidadosamente y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La suspensión se filtró y se lavó el residuo con agua destilada libre de CO_2 . El filtrado más el agua se tituló con una solución estándar de HCl 0.5 N hasta pH = 8.4. La cantidad de acidez total se efectuó con los cálculos siguientes:

$$\frac{(V_b - V_m)N_{\text{HCl}}100}{\text{mg de muestra}} = \text{Acidez total} \frac{\text{meq}}{\text{g material húmico}}$$

donde:

V_b = volumen de blanco

V_m = volumen de muestra

N_{HCl} = normalidad del ácido

La cuantificación de los grupos carboxílicos (COOH) se realizó pesando 50 mg de ácidos húmicos en un matraz Erlenmeyer con tapón esmerilado. A la muestra se le agregaron 10 mL de solución de acetato de calcio 1N y 40 mL de agua destilada libre de CO_2 . Simultáneamente se corrió un blanco con 10 mL de solución de calcio 1 N y 40 mL de agua destilada libre de CO_2 . Se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. La solución fue filtrada y lavada con agua libre de CO_2 y finalmente se tituló el filtrado y el lavado con solución de NaOH 0.1 N hasta pH = 9.8. Se efectuaron los cálculos siguientes:

$$\frac{(V_m - V_b)N_{\text{NaOH}}100}{\text{mg de muestra}} = \text{Grupos COOH} \frac{\text{meq}}{\text{g material húmico}}$$

donde:

V_b = volumen de blanco

V_m = volumen de muestra

N_{NaOH} = normalidad de la base

Los grupos fenólicos se determinaron mediante el siguiente cálculo:

$$\begin{aligned} \text{Acidez total} \left(\frac{\text{meq}}{\text{g material húmico}} \right) - \text{Grupos COOH} \left(\frac{\text{meq}}{\text{g material húmico}} \right) \\ = \text{Grupos OH fenólicos} \left(\frac{\text{meq}}{\text{g material húmico}} \right) \end{aligned}$$

En el análisis por espectroscopía de infrarrojo con ATR la muestra no requiere preparación previa.

Para el análisis de RMN[43], la muestra fue disuelta con agua deuterada de la siguiente forma: 100 mg de ácidos húmicos fueron disueltos en 2.5 mL de una solución al 0.5 M de NaOH en agua deuterada, Después de 24 h de intensa agitación, 0.5 mL de esta solución se puso en una celda de 5 mm para RMN y se llevó al equipo de RMN.

2.3.3 Elaboración de muestras sintéticas.

El agua contaminada para la experimentación, se elaboró usando como base el medio mínimo o medio mineral mencionado en el punto 2.3.1. Para esto, nueve volúmenes de medio mineral fueron puestos en contacto con 1 volumen del contaminante hidrocarburo, ya sea diesel o petróleo. El contacto se mantuvo por 3 meses, con agitación constante a 300 rpm y una temperatura de 30°C. Con este procedimiento se emuló el proceso de envejecimiento de un derrame accidental en un acuífero real. Posterior a este procedimiento, se separó únicamente la fase acuosa, la cual se considera a partir de este momento la muestra contaminada con hidrocarburos.

2.4 Etapa II

2.4.1 Adaptación de microbioma y generación del inóculo.

La adaptación del microbioma al contaminante se realizó aumentando la concentración del contaminante de manera sucesiva. El microbioma inicialmente se encuentra liofilizado en cascará de trigo. Para iniciar el proceso, 1 g de cáscara de trigo con el microbioma se puso en contacto con 50 mL de medio mineral, agitando el sistema a 200 rpm a 30°C durante 30 minutos. Al término de este tiempo, la cáscara es retirada de la solución. En este punto se preparan soluciones con 10, 30, 50 y 100% de la muestra contaminada, usando como solución diluyente el medio mineral sin contaminar.

Se inocula 10% de volumen de la solución con el microbioma activo a la primera solución preparada que contiene 10% de muestra contaminada. Se agita por 3 días a 30°C a 200 rpm. Al término del período, se agrega 10% de volumen de esta solución a la que contiene 30% de muestra contaminada y se repite el procedimiento hasta llegar a la solución con 100% de la muestra contaminada. Al finalizar este último proceso se considera que el microbioma está adaptado y que esta solución obtenida es el inóculo.

2.4.2 Caracterización del microbioma

El microbioma está constituido por 51 consorcios microbianos distintos, los cuales fueron liofilizados simultáneamente sobre la cáscara de trigo. La caracterización del microbioma se realizó en 3 etapas. La primera etapa consistió en la extracción del material genético, la segunda amplificación del material genético extraído y la tercera y última en la secuenciación masiva con el fin de generar las fenotecas correspondientes. La extracción del material genético se realizó de acuerdo al protocolo recomendado por el kit de extracción utilizado PowerSoil® DNA isolation kit. El material genético extraído es analizado para determinar su pureza en un espectrofotómetro con ATR.

Para la amplificación del material genético extraído se realizó una PCR del fragmento 16S.

La secuenciación se llevó a cabo cargando el material genético amplificado a un chip.

2.5 Etapa III

2.5.1 Selección del soporte microbiano

La zeolita natural clinoptilolita se sometió a un proceso de fragmentación mecánica hasta la reducción del tamaño a fragmentos de 1 a 2 cm.

2.5.2 Formación de biopelícula

Para la evaluación de la formación de la biopelícula, en un matraz se colocaron 10 g de esferas de zeolita, las cuales fueron saturadas con muestra de agua contaminada por contacto durante 3 horas, a 200 rpm a 30°C. Posteriormente, 100 mL de muestra contaminada fue colocada en el matraz conteniendo el soporte y se agregaron 10 mL de la solución inóculo preparada en el punto 2.4.1. Este sistema se mantuvo en agitación a 30°C, a 200 rpm por 5 días. Se

evalúo la producción de CO₂ a través de un sistema como el mostrado en la figura 11.

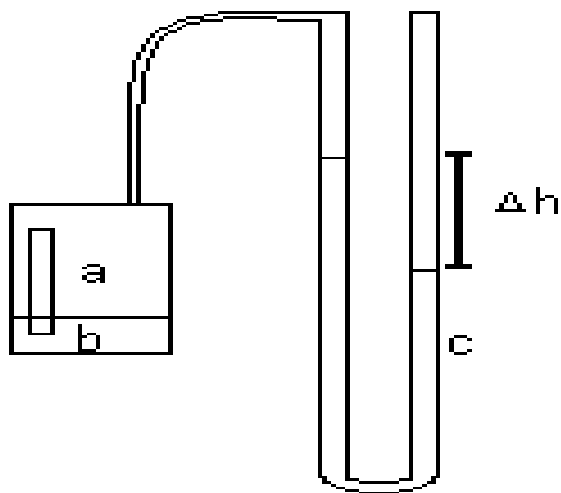


Figura 11 Esquema del equipo utilizado para la determinación de la producción de CO₂. a) En un tubo de ensayo se colocan cristales de NaOH; b) agua contaminada con hidrocarburose inoculada con consorcio bacteriano y zeolita como soporte y c) fluido manométrico, la diferencia en altura permite la cuantificación de producción de CO₂.

2.5.3 Escalamiento en biorreactor empacado

El sistema de biorreacción formado por un biorreactor empacado con zeolita se esquematiza en la figura 12.

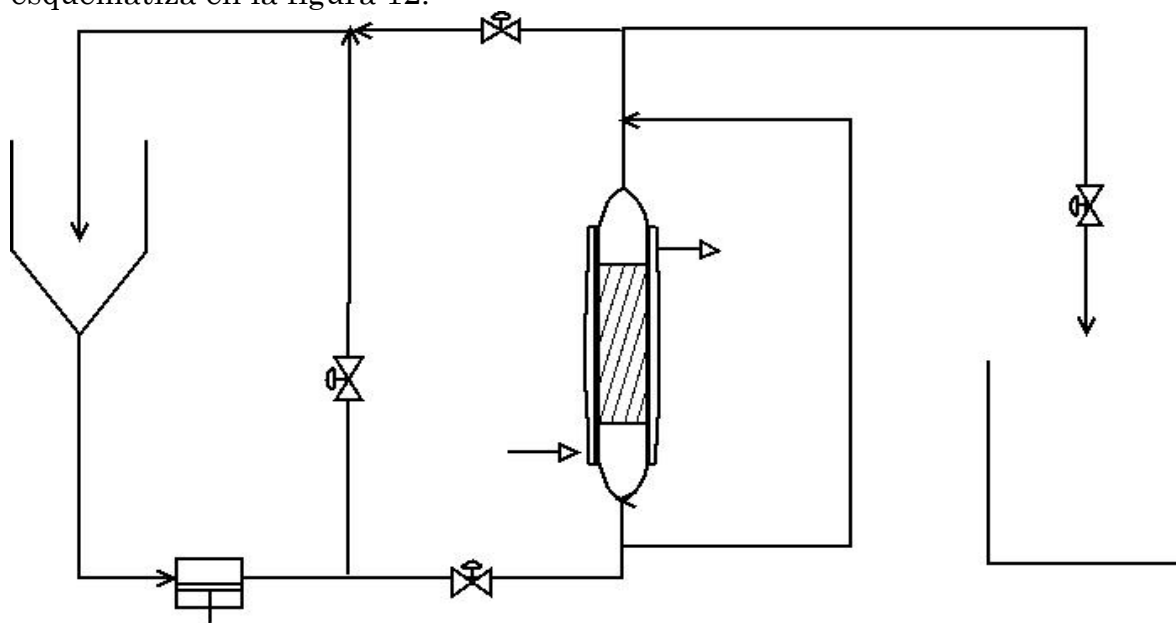


Figura 12 Diagrama general del sistema de biorreacción empleado.

El biorreactor fue fabricado en vidrio de borosilicato, con un sistema de enchaquetamiento, provisto de dos sistemas de retención de sólidos mediante filtros de vidrio poroso.

2.6 Etapa IV

2.6.1 Evaluación de la degradación en biorreactor empacado.

Después de la estabilización del biorreactor, se tomaron muestras las cuales se sometieron a análisis de GC-FID, GC-MS, COT, CT y CI diariamente por un periodo de dos semanas.

2.6.2 Caracterización del desarrollo del microbioma durante el proceso.

Las muestras fueron sometidas al proceso de secuenciación masiva y se compararon los microorganismos presentes con las fenotecas producidas en el punto 2.4.2.

2.6.3 Evaluación de la degradación con adición de SH.

Para la evaluación del efecto de las SH en el sistema de biorreacción, se adiciona al medio AH purificados en una concentración de 1000 mg/L. Después del proceso de estabilización del sistema de biorreacción, se tomaron muestras que fueron analizados como en el punto 2.6.1 y 2.6.2.

CAPITULO 3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Comportamiento del medio de cultivo y efecto de SH.

El medio mínimo, al ser preparado debe ser ajustado a pH de 7 -7.2. En la figura 13 se muestra el comportamiento del pH del medio con la adición consecutiva de las sales.

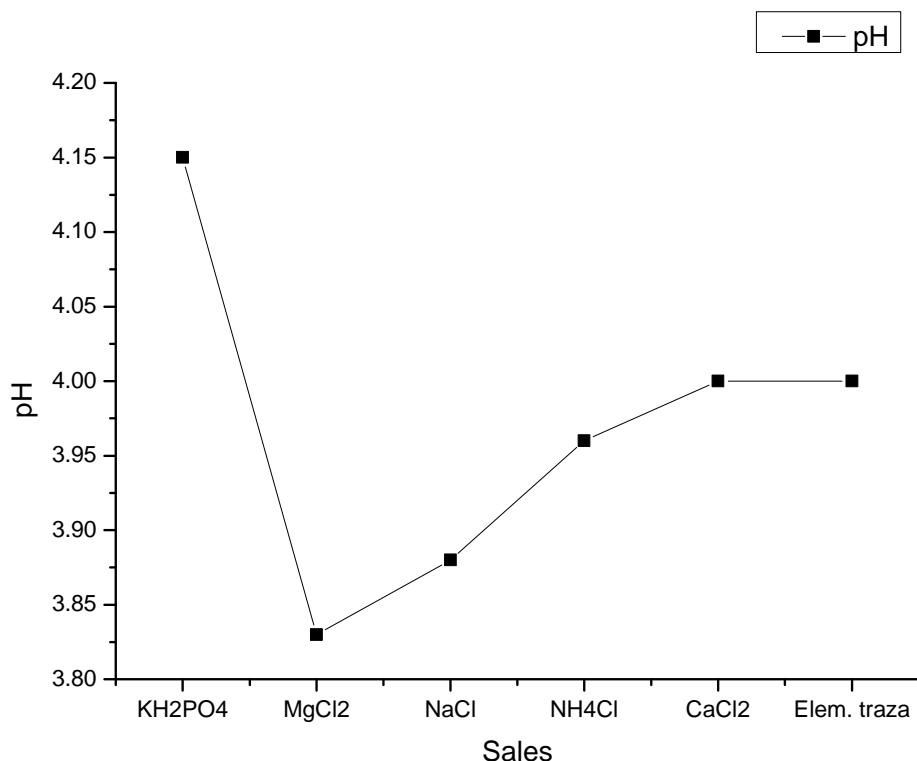


Figura 13 Comportamiento del pH al agregar cada una de las sales.

Las sustancias húmicas tienen propiedades de actuar como una solución amortiguadora. Cuando se agregan SH en el proceso de preparación de la solución, el pH no llega a valores de pH muy bajos. En la figura 14 se muestra este comportamiento.

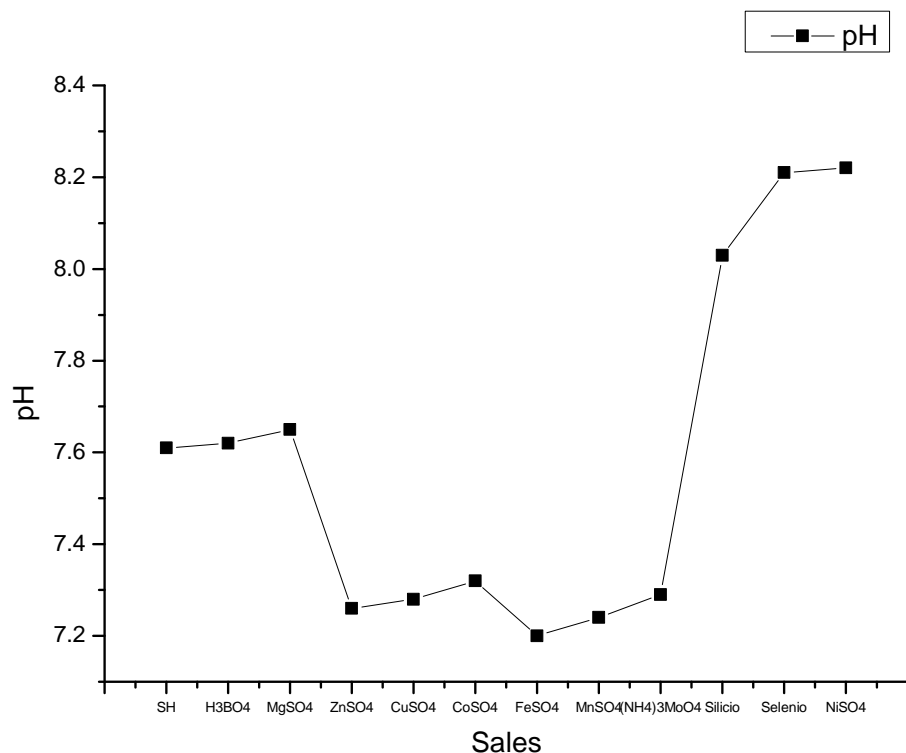


Figura 14 Comportamiento del pH del medio mínimo al agregar SH.

El comportamiento como solución amortiguadora de las SH es bien conocido y esta ampliamente reportado en la literatura [24], [25], [33], [36], [38], [39], [39], [41], [42]. Esta formulación de medio mínimo permite el desarrollo óptimo del microbioma y contribuye con el proceso metabólico implicado en la degradación de hidrocarburos.

El medio mínimo aporta los microelementos necesarios para el desarrollo y funcionalidad microbiológico. La presencia de fosforo en el medio estimula las reacciones bioquímicas involucradas en el metabolismo aerobio, ya que conforma la molécula de ATP, la molécula energética involucrada en los bioprocesos.

Un medio mínimo estándar, contiene una fuente de carbono de fácil metabolismo para los microorganismos; sin embargo, en este trabajo no se agrego dicha fuente, ya que está compite con los hidrocarburos contaminantes para ser metabolizados.

El pH final del medio mínimo está entre 7.0 y 7.2, para asegurar el desarrollo óptimo del microbioma.

3.2 Caracterización de SH.

La caracterización de la fracción de las sustancias húmicas se realizó a través de espectroscopía UV-vis, IR y RMN. El objetivo de la selección de esta caracterización es poder relacionar las características estructurales con las funcionalidades químicas y el potencial como mejorador de la biodegradación.

3.2.1 Análisis por espectroscopia UV-vis, acidez total, grupos COOH y OH fenólicos.

Los resultados de los análisis por UV-vis se observan en la tabla 2. La relación de

Tabla 2. Resultados de la caracterización de los AH extraídos por espectroscopia UV-vis.

E_4/E_6	Acidez total (meq/g)	COOH (meq/g)	OH (meq/g)
6.40	10.25	2.43	10.40

La relación E_4/E_6 es un indicador del grado de condensación de carbonos aromáticos entrelazados en los ácidos húmicos, una alta relación E_4/E_6 refleja un bajo grado de condensación aromática y amplia proporción de estructuras alifáticas; mientras una baja relación E_4/E_6 refleja un alto grado de condensación aromático[40]. El valor encontrado muestra un alto grado de condensación aromática.

3.2.2 Análisis por espectroscopia IR

La elevada acidez total, grupos COOH y OH fenólico esta en concordancia con lo encontrado en el espectro de IR mostrado en la figura 15.

La banda típica intensa a 3400 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones OH de alcoholes, fenoles y ácidos carboxílicos. La presencia de grupos carboxilos se puede confirmar debido a la banda intensa a 3400 cm^{-1} , la banda pequeña en 2620 cm^{-1} (debido a las vibraciones OH del hidrogeno enlazado al COOH), la banda a 1720 cm^{-1} (debido a las vibraciones C=O) y la banda en 1410 (atribuida al ángulo O-H en el grupo COOH). Los grupos oxigenados se caracterizan por las bandas en $1220\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$ (ácidos carboxílicos, fenoles y aromáticos o éteres insaturados) y en $1030\text{-}1095\text{ cm}^{-1}$ (alcoholes y éteres alifáticos). La alta acidez de los ácidos húmicos se confirma con la amplia banda de las vibraciones O-H asociada a $3600\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$.

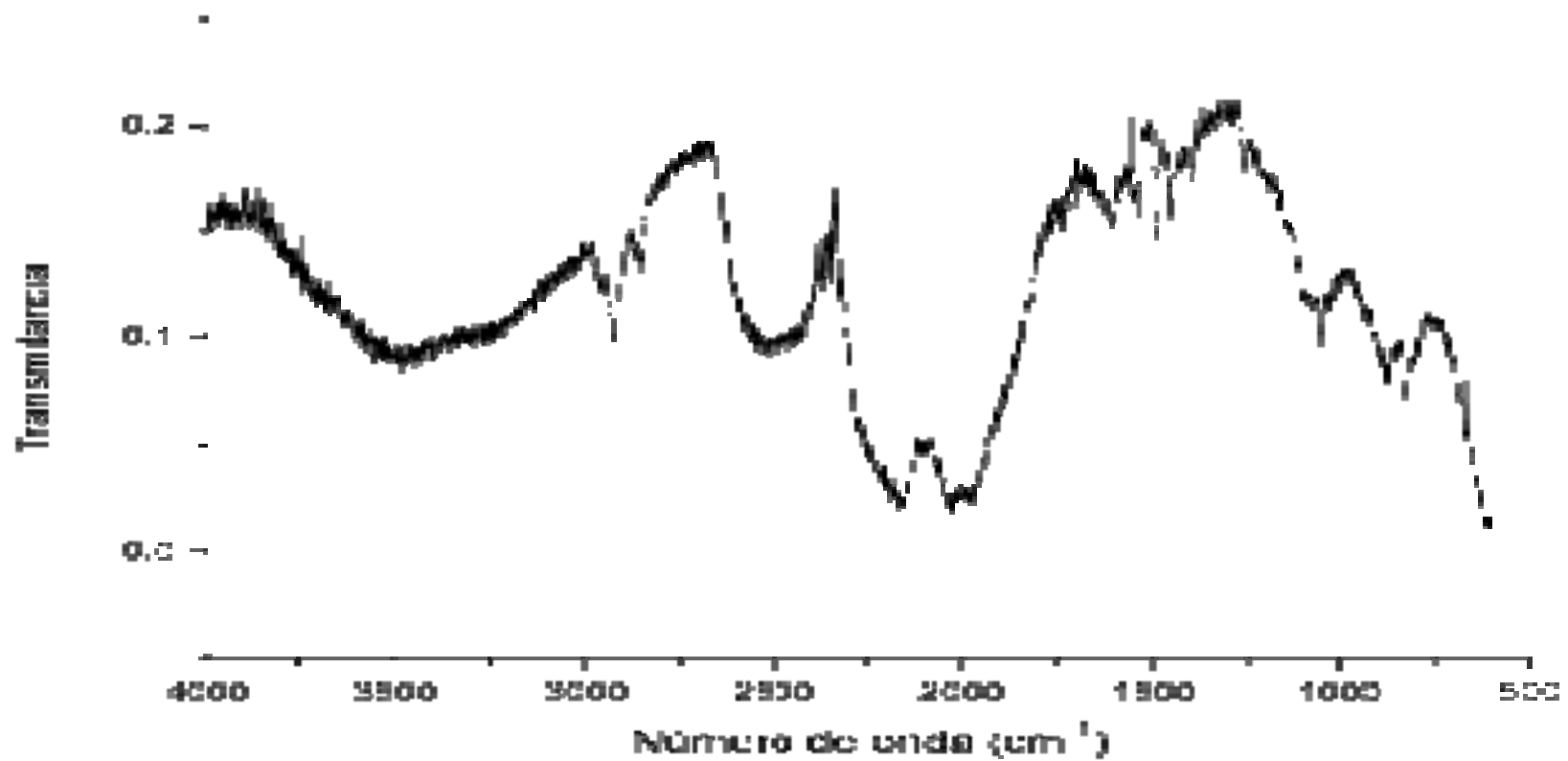


Figura 15 FT-IR-ATR de ácidos húmicos extraídos.

Los grupos saturados, CH₃ y CH₂ se caracterizan por las bandas en 2850-2960 cm⁻¹ (debido al estiramiento C-H). Las bandas en 1455 y 1375 cm⁻¹ debido a las vibraciones de deformación de los grupos CH₃ y CH₂.

Referente a las estructuras tipo aromáticas, la ausencia de bandas características entre 3000-3100 cm⁻¹ debido a los grupos =C-H indica un alto grado de sustitución de los anillos aromáticos; la presencia de las bandas de deformación fuera del plano CH apoya esta conclusión. Las bandas a 805 cm⁻¹ es atribuible a tri- o tetrasustitución de anillos aromáticos. La banda en 1620 cm⁻¹ es característica del enlace C=C de anillos aromáticos. La banda en 1540 cm⁻¹ se atribuye a las estructuras N-H.

Tikhova y col. realizaron un estudio para predecir el estudio de fragmentos que componen diferentes tipos de ácidos húmicos, los resultados de estos análisis son concordantes con las estructuras que se proponen en dicho trabajo [24].

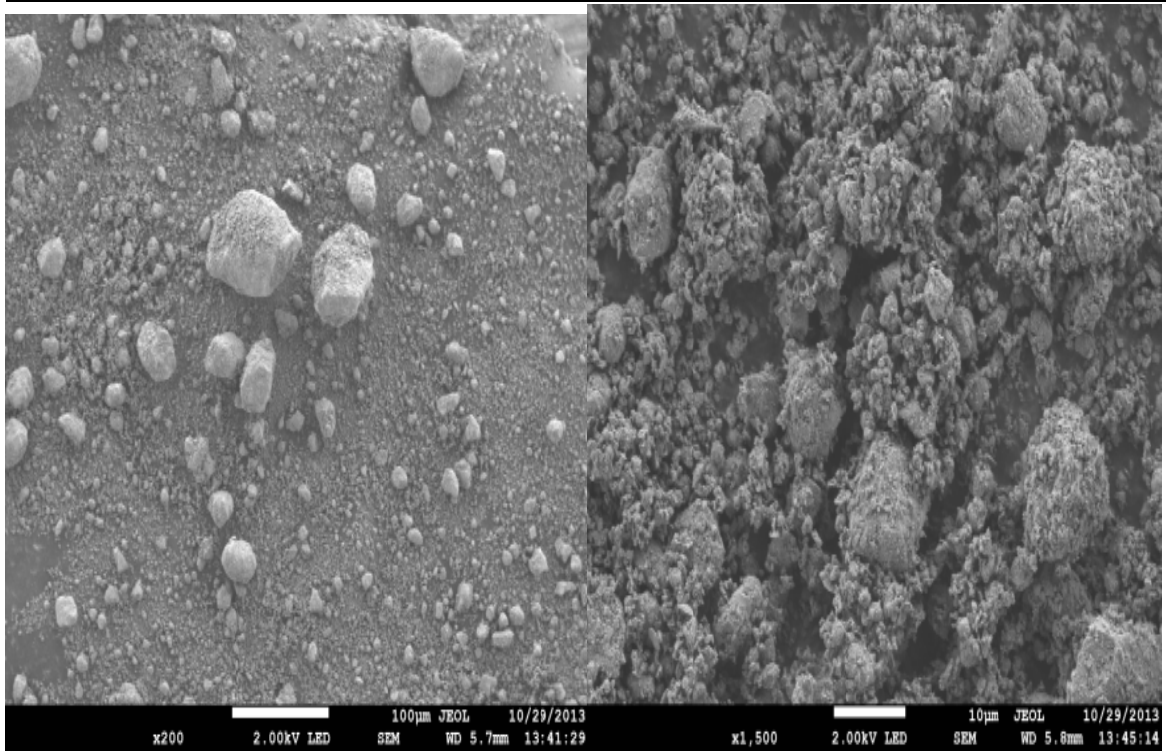
3.2.3 Análisis por RMN

Análisis en proceso.

3.3 Evaluación de la zeolita como soporte microbiano.

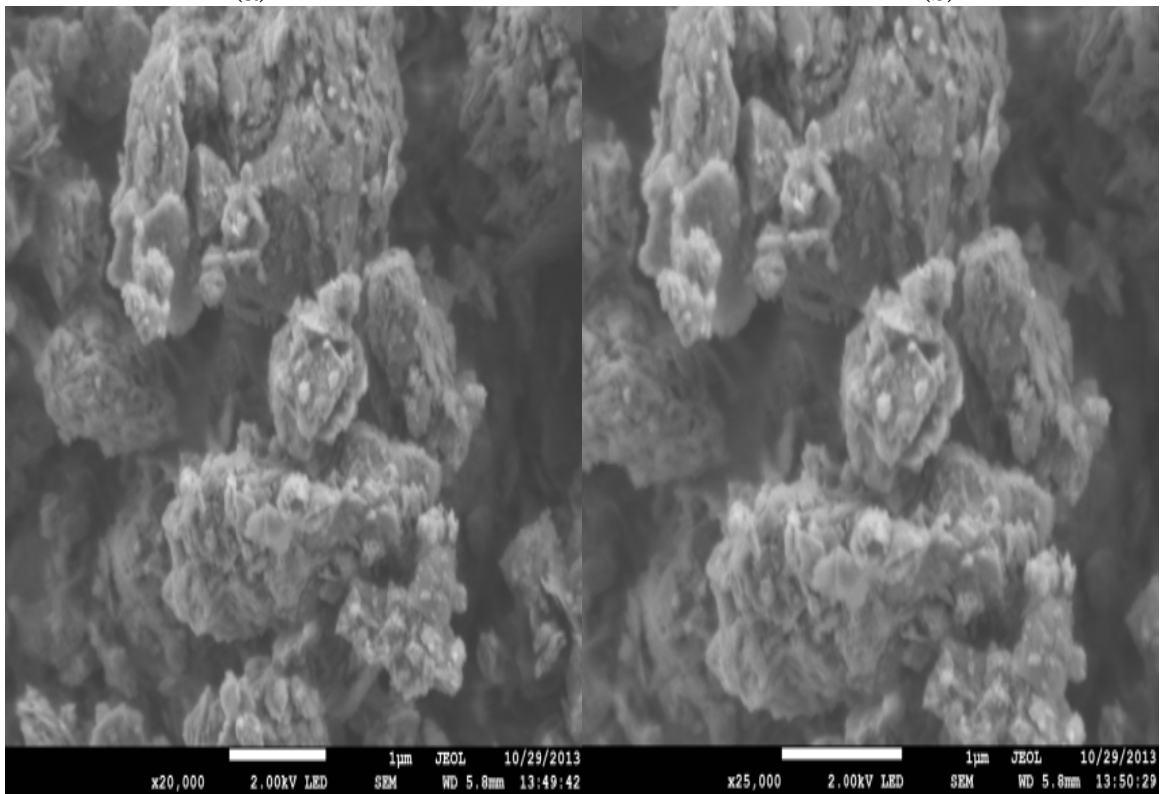
La selección del material de soporte se baso en la disponibilidad y precio. La zeolita ha sido utilizada como soporte de microorganismos en diversos procesos [44]–[46].

En la figura 16 y 17 se muestran las micrografías obtenidas en el microscopio electrónico del barrido de la zeolita natural utilizada y de la zeolita comercial ZSM-5.



(a)

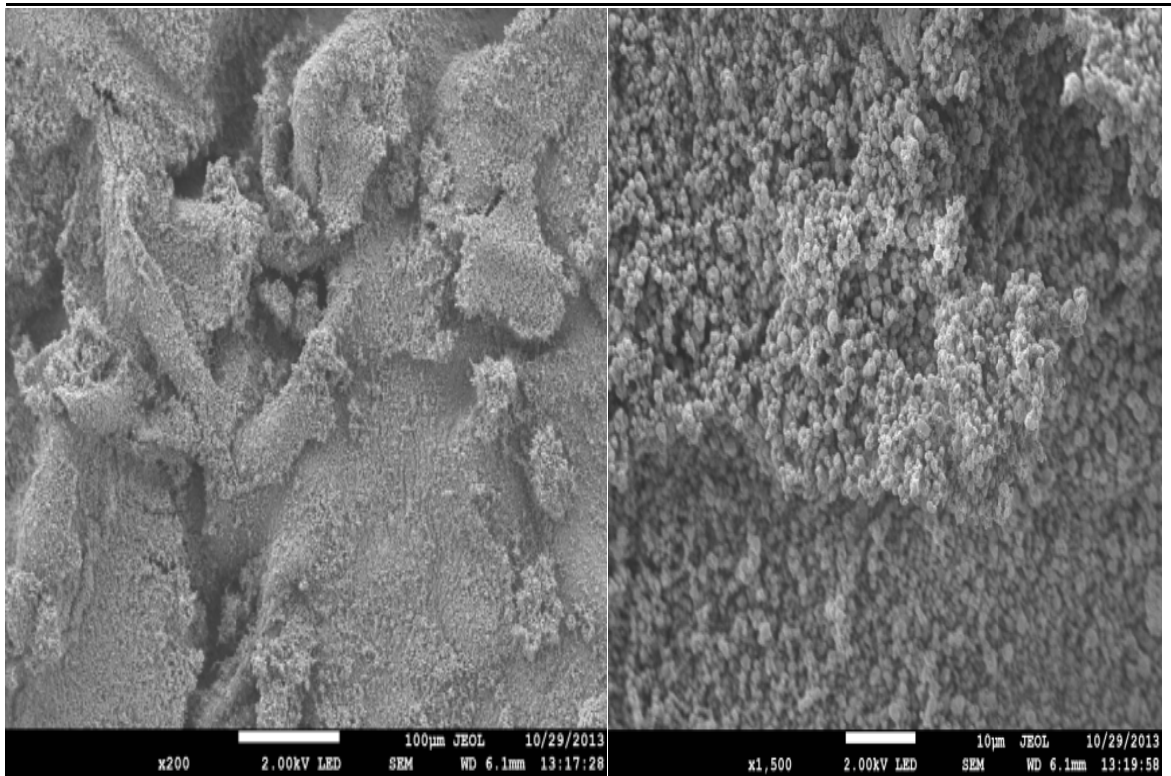
(b)



(c)

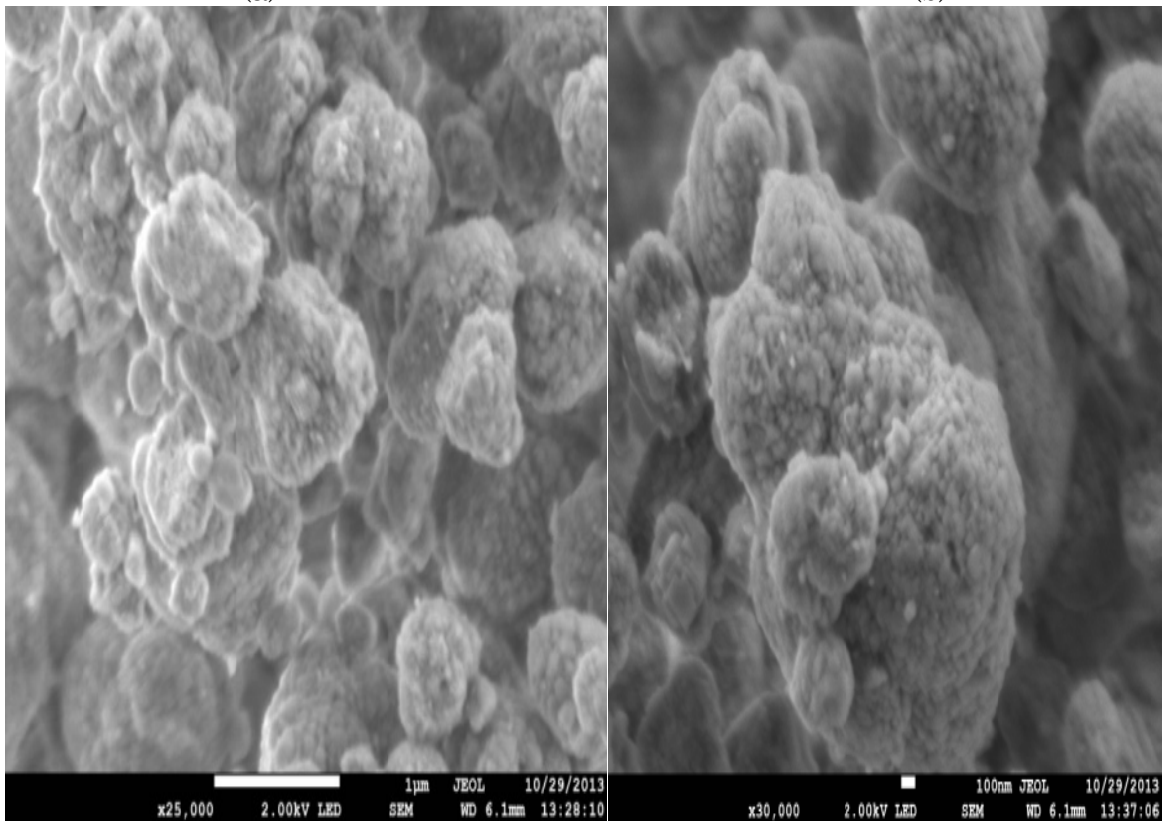
(d)

Figura 16 Microscopias en MEB de zeolita natural clinoptilolita en aumento de a) X200 b) X1 500 c) X20 000 y d) 25 000.



(a)

(b)



(c)

(d)

Figura 17 Microscopias en MEB de zeolita comercial ZSM-5 en aumento de a) X200 b) X1 500 c) X25 000 y d) 30 000.

El resultado del estudio sobre la estabilización del soporte con el microbioma se muestra en la figura 18 y 19.

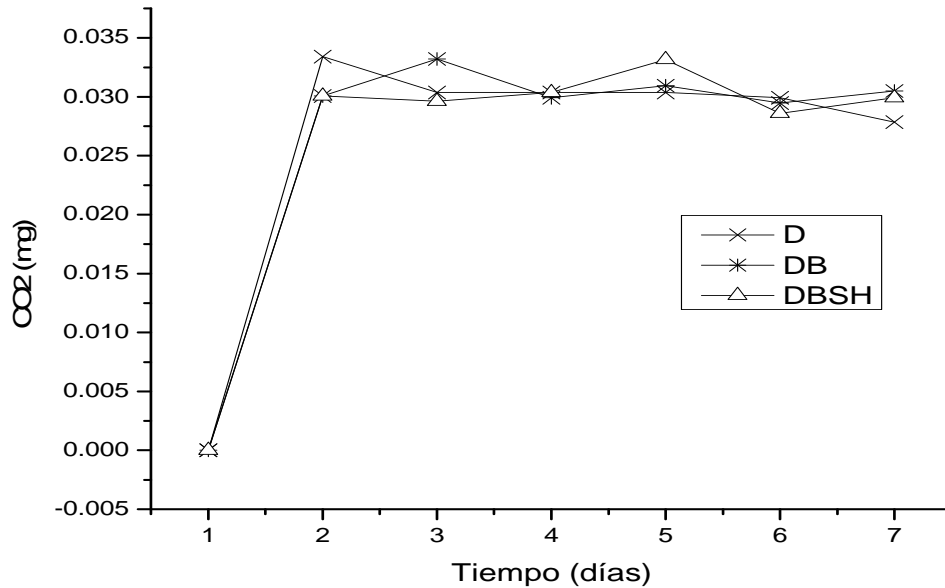


Figura 18 Estudio de la estabilización del soporte zeolita durante el desarrollo de microorganismos en los sistemas con diesel como contaminante [D: sistema contaminado con diesel; DB: sistema contaminado con diesel e inoculación de microbioma y DBSH: sistema contaminado con petróleo, inoculado con microbioma y adición de ácidos húmicos].

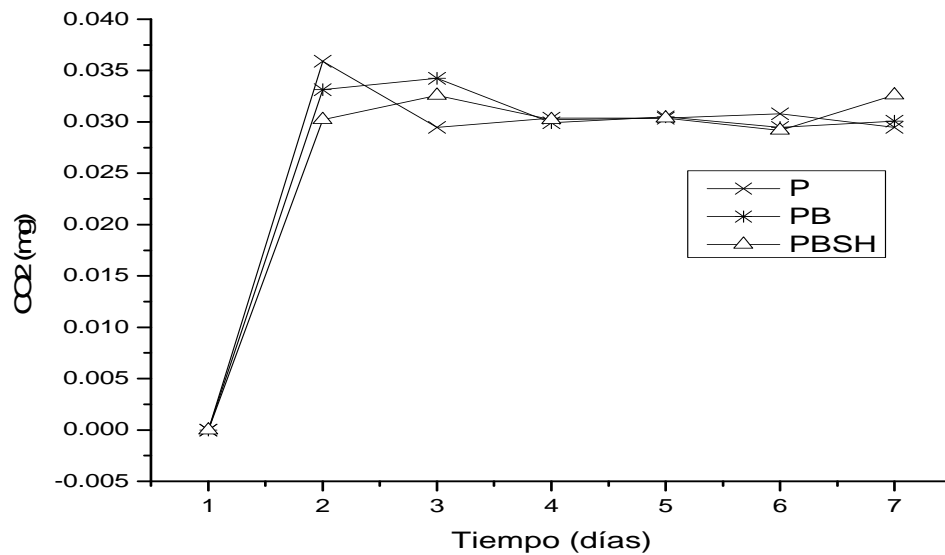


Figura 19 Estudio de la estabilización del soporte zeolita durante el desarrollo de microorganismos en los sistemas con petróleo como contaminante [P: sistema contaminado con petróleo; PB: sistema contaminado con petróleo e inoculación de microbioma y PBSH: sistema contaminado con petróleo, inoculado con microbioma y adición de ácidos húmicos].

Es necesario una semana para lograr la estabilización en el proceso. Este punto es importante para descartar los fenómenos de adsorción del contaminante por la zeolita y permitir el desarrollo de la biopelícula bacteriana. Es importante observar que en este punto el sistema mantiene concentraciones sin cambio, por lo que se garantiza que el soporte esta totalmente saturado con el contaminante.

3.4 Adaptación del microbioma.

En la figura 20 se muestra el desarrollo hasta la adaptación del microbioma.

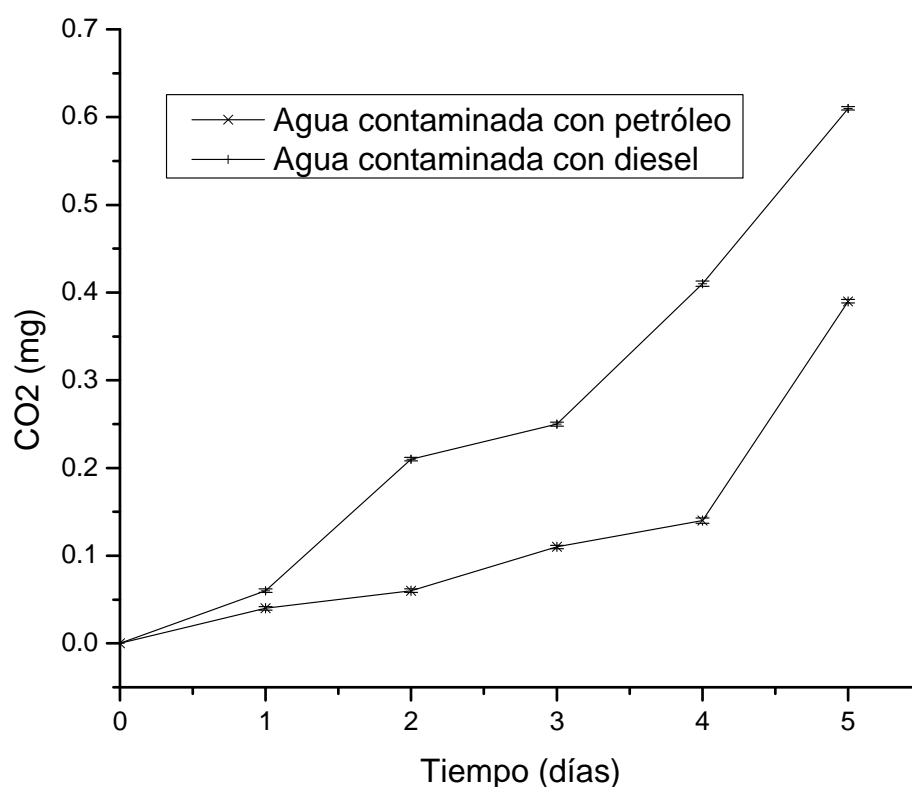


Figura 20 Proceso de adaptación del microbioma al diesel y petróleo como sustratos.

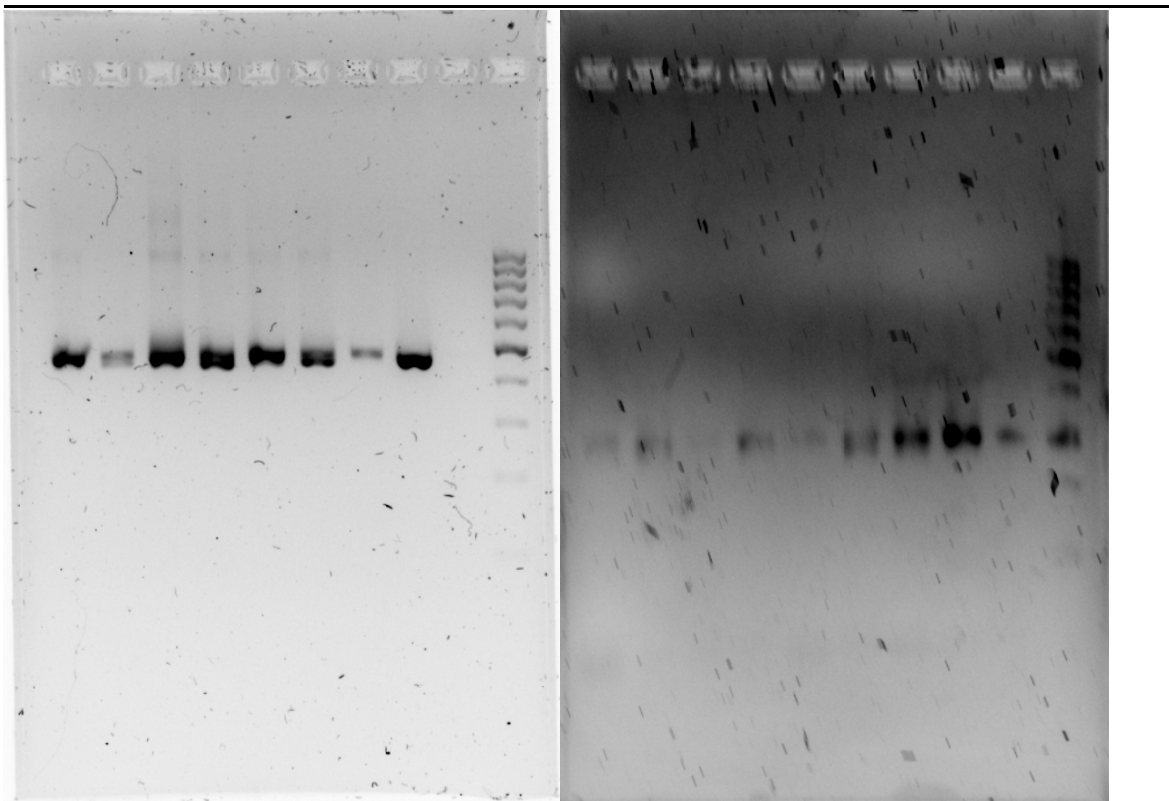
La adaptación del microbioma se logra cuando se entra en la etapa exponencial de la curva de crecimiento microbiano. Esto sucede para el microbioma en el día 3 en el caso del diesel como sustrato y en el día 4 cuando se trata de petróleo, como se observa en la figura 20. Durante la adaptación suceden cambios a nivel metabólico, la actividad de la ureasa y el número de microorganismos viables disminuyen al aumentar la concentración de HTP, mientras que el calor desprendido por el metabolismo del contaminante y la temperatura máxima de desarrollo se incrementan[47].

3.5 Caracterización del microbioma.

En la tabla 3 se muestra la pureza del material genético extraído de los consorcios que conforman el microbioma. En la figura 21 se muestran las fracciones de 465 y 431 kb para algunos de los consorcios que componen el microbioma utilizado.

Tabla 3 Pureza del material genético extraído en los 50 consorcios que conforman el microbioma.

Consortio	C (ng/ μ L)	Consortio	C (ng/ μ L)	Consortio	C (ng/ μ L)	Consortio	C (ng/ μ L)	Consortio	C (ng/ μ L)
1	4.9	11	2.3	21	5.0	31	12.3	41	5.1
2	4.3	12	14.4	22	4.2	32	3.4	42	16.9
3	1.7	13	9.1	23	4.7	33	4.7	43	11.4
4	9.1	14	4.0	24	5.9	34	2.5	44	4.1
5	7.2	15	5.8	25	7.4	35	2.9	55	5.9
6	4.7	16	7.1	26	3.7	36	2.2	46	6.9
7	6.2	17	8.1	27	7.1	37	4.9	47	5.2
8	2.5	18	3.7	28	5.7	38	8.6	48	5.8
9	2.7	19	4.7	29	3.9	39	6.4	49	7.9
10	2.5	20	-4.6	30	8.9	40	-6.0	50	-7.1



01 09 12 22 30 33 49 Ecoli N M 01 02 03 04 05 06 07 Ecoli14 Ecoli34 M
 (a) (b)

Figura 21 Desarrollo de las fracciones de a) 465 kb y b) 431 kb [N:negativo, M: marcador].

3.6 Evaluación del proceso de degradación

La Demanda Química de Oxígeno (DQO) marca una pauta de la capacidad del microbioma para metabolizar el sustrato hidrocarbonado. En la figura 22 y 23 se muestra la evolución de la degradación de los hidrocarburos por el microbioma en términos de DQO.

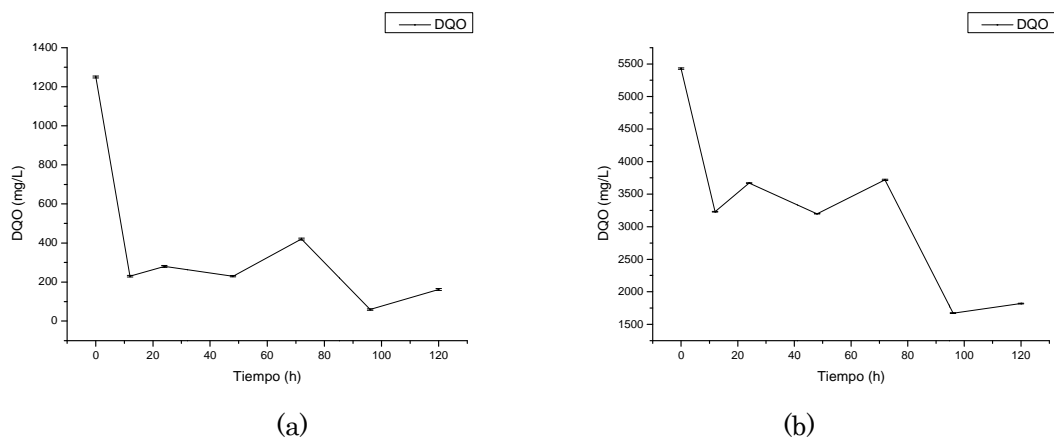


Figura 22. Degradación de diesel presente en agua contaminada: a) muestra de agua con diesel y bacterias, b) muestra de agua con diesel, bacterias y sustancias húmicas.

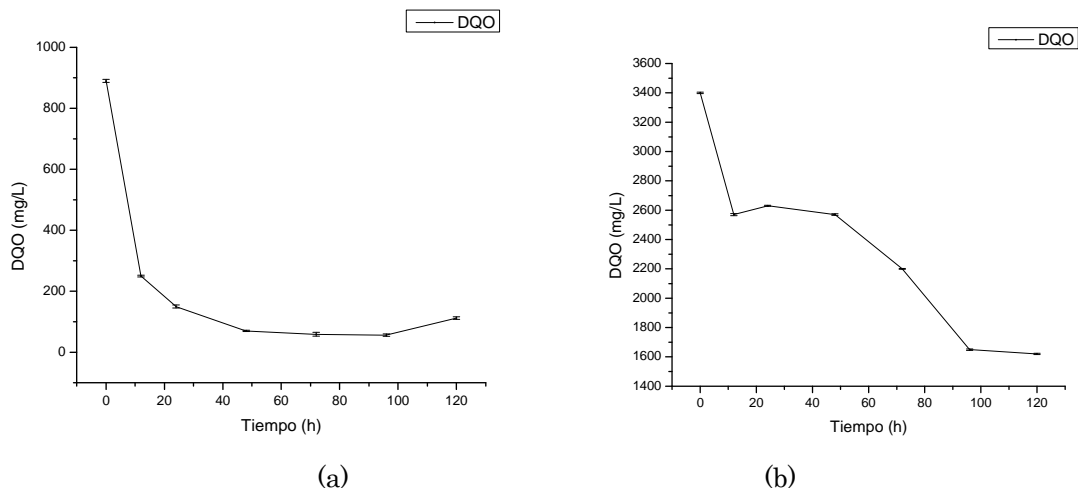
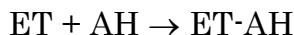


Figura 23. Degradación de petróleo presente en agua contaminada: a) muestra de agua con petróleo y bacterias, b) muestra de agua con petróleo, bacterias y sustancias húmicas.

La disminución de la materia contaminante susceptible de oxidación química puede monitorearse sin problema cuando el sistema solo tiene diesel o petróleo. En la figura 22a y 23a, para diesel y petróleo como contaminante la degradación llega a valores de 98.2% y 93.2%, respectivamente.

Al agregar ácidos húmicos a los sistemas, los porcentajes de degradación que se miden como DQO disminuyen, esto se observa en las figuras 22b y 23b, donde los porcentajes de degradación aparentes son de 69.1% y 64.7%, respectivamente. Esto parece indicar que la adición de ácidos húmicos disminuye la tasa de degradación; sin embargo, cuando los AH son agregados a los sistemas, el valor inicial de DQO se incrementa de un 300% a un 500%. Con la medición de DQO en estos sistemas no podemos evaluar de forma diferencial la degradación de los hidrocarburos contaminantes presentes, ya que los AH son oxidados químicamente. Perminova y col. señalan que al agregar AH a un sistema contaminado, la toxicidad del contaminante disminuye debido a la formación de un complejo contaminante-ácidos húmicos [33].



Donde ET = ecotóxicos contaminantes.

3.6.1 CT, CI y CO

La transformación de carbono orgánico a carbono inorgánico es un indicador del grado de mineralización del contaminante. La tendencia general observada es una reducción de la concentración de carbono orgánico y el incremento del carbono inorgánico. En las figuras 24 y 25 se presentan los resultados del comportamiento de carbono orgánico e inorgánico durante el proceso de tratamiento, con y sin la adición de ácidos húmicos.

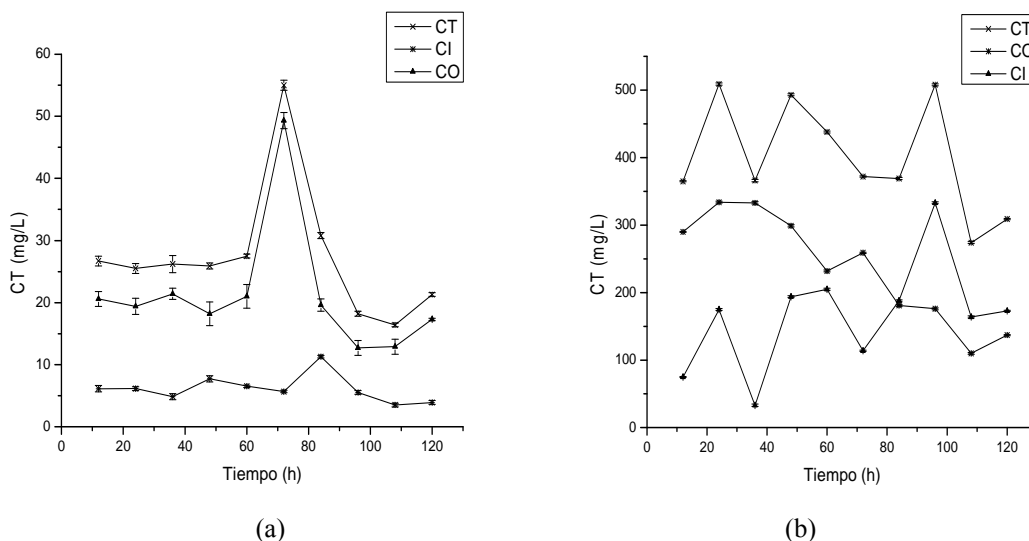


Figura 24. Variación de carbono total (CT), carbono orgánico total (CO) y carbono inorgánico (CI) en el sistema de agua contaminada con a) diésel y b) con diésel y ácidos húmicos.

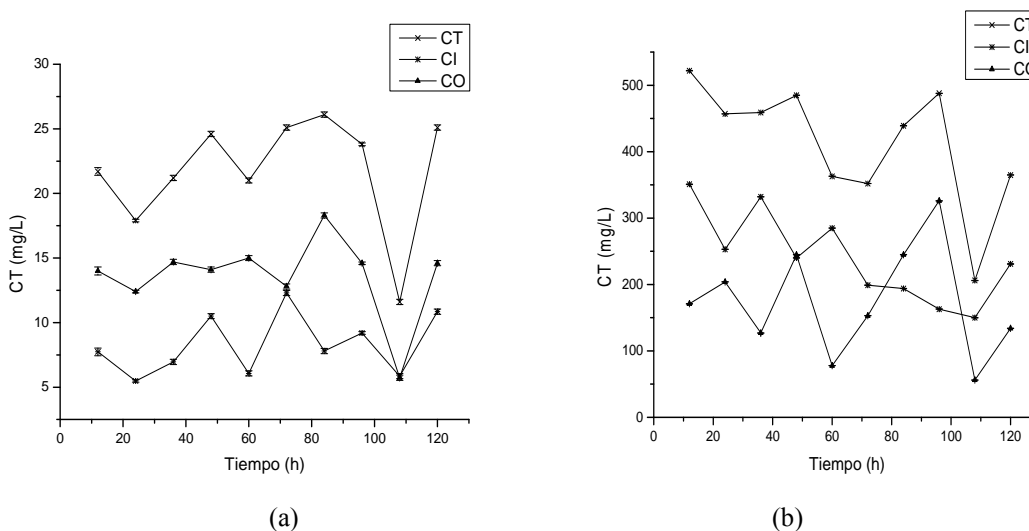


Figura 25. Variación de carbono total (CT), carbono orgánico total (OC) y carbono inorgánico (CI) en el sistema de agua contaminada con a) petróleo y b) con petróleo y ácidos húmicos.

Nuevamente, como en el análisis de DQO, la cantidad de carbono se incremental al agregar ácidos húmicos. En el proceso de degradación el CO_2 producido se libera en forma gaseosa, solo una fracción permanece en la solución como sales inorgánicas de HCO_3^{2-} y CO_3^{3-} . El comportamiento en el que el CO se transforma en CI es evidente al observar las figuras 24b y 25b. Los productos metabólicos del microbioma utilizando los hidrocarburos como sustrato son biomasa y moléculas de biosurfactante que se utilizan para la degradación

subsecuente de mas hidrocarburos. Estos productos contribuyen que el valor de CO comience a incrementarse durante en tratamiento. Este comportamiento se puede verificar observando las figura 24a y 25a.

3.6.2 HTP y degradación de hidrocarburos

Los Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP), disminuyeron en los sistemas contaminados de acuerdo a lo mostrado en las figuras 26-30 para el sistema con diesel y en las figuras 31-35 para el sistema con petróleo. En estos sistemas la evaluación se llevo a cabo sin la adición de ácidos húmicos. En la figura 36 y 37 se muestra la evolución de las fracciones que componen los HTP analizados durante el proceso.

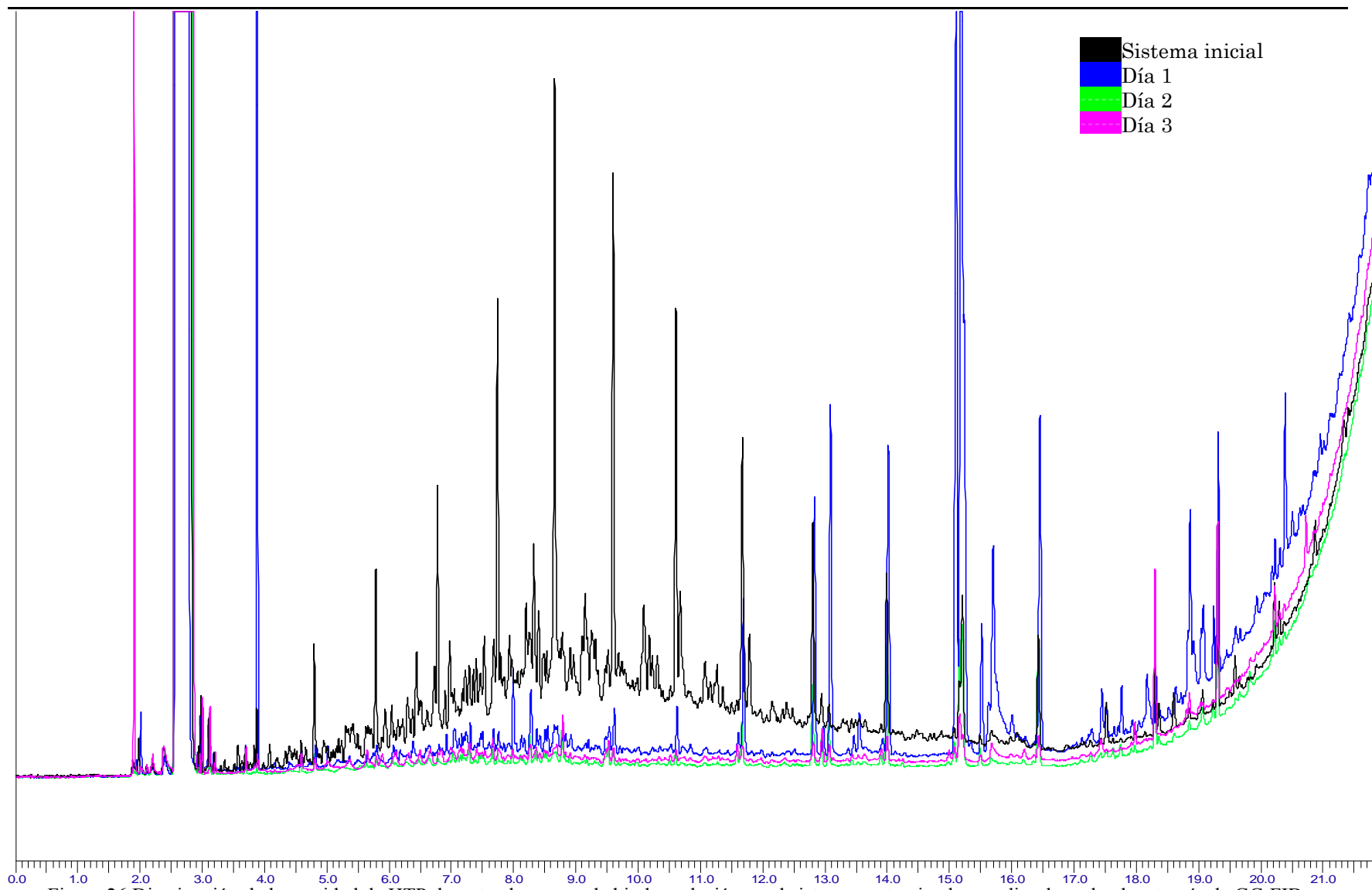


Figura 26 Disminución de la cantidad de HTP durante el proceso de biodegradación en el sistema contaminado con diesel, evaluado a través de GC-FID.

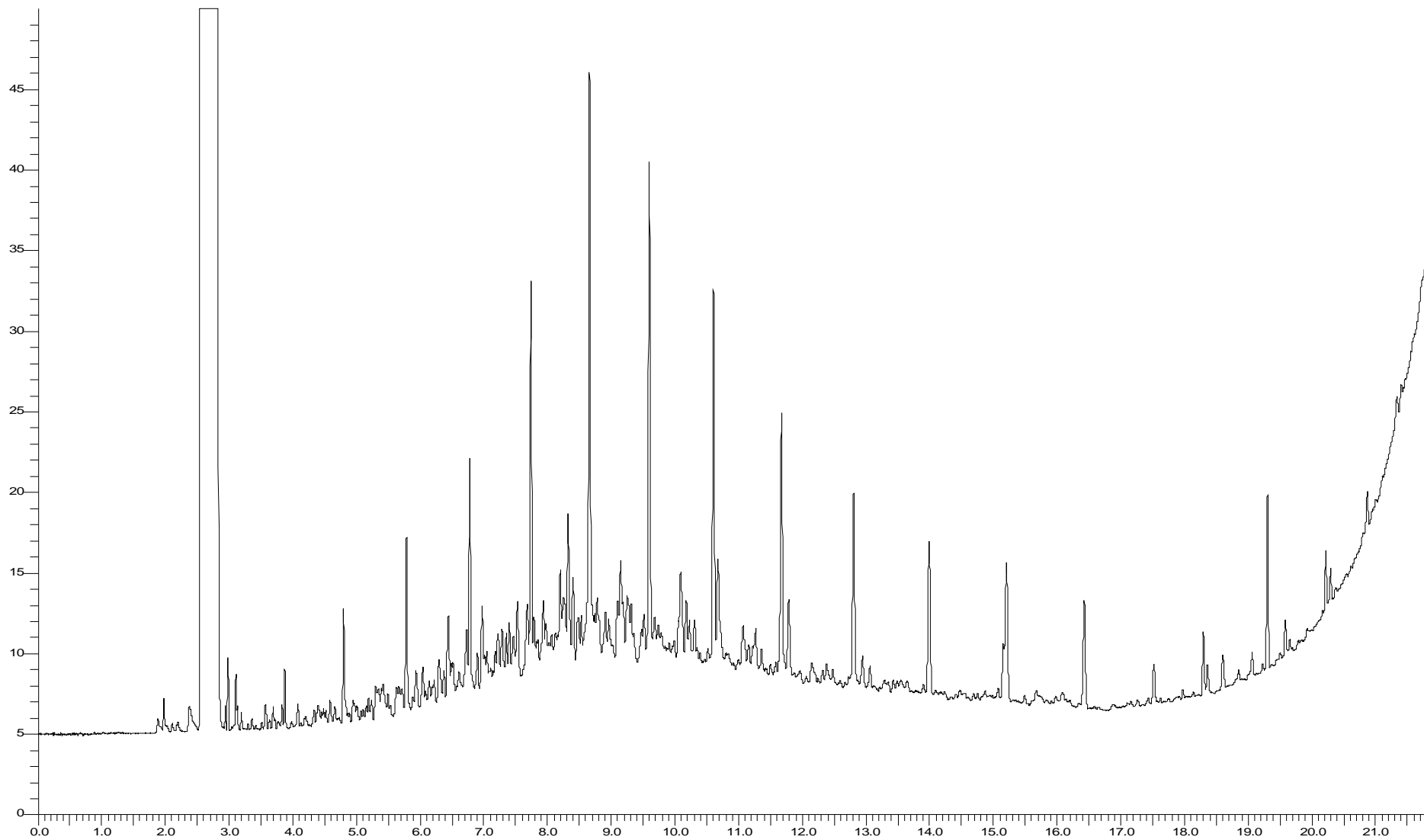


Figura 27 Cromatograma de GC-FID de sistema contaminado con diesel inicial.

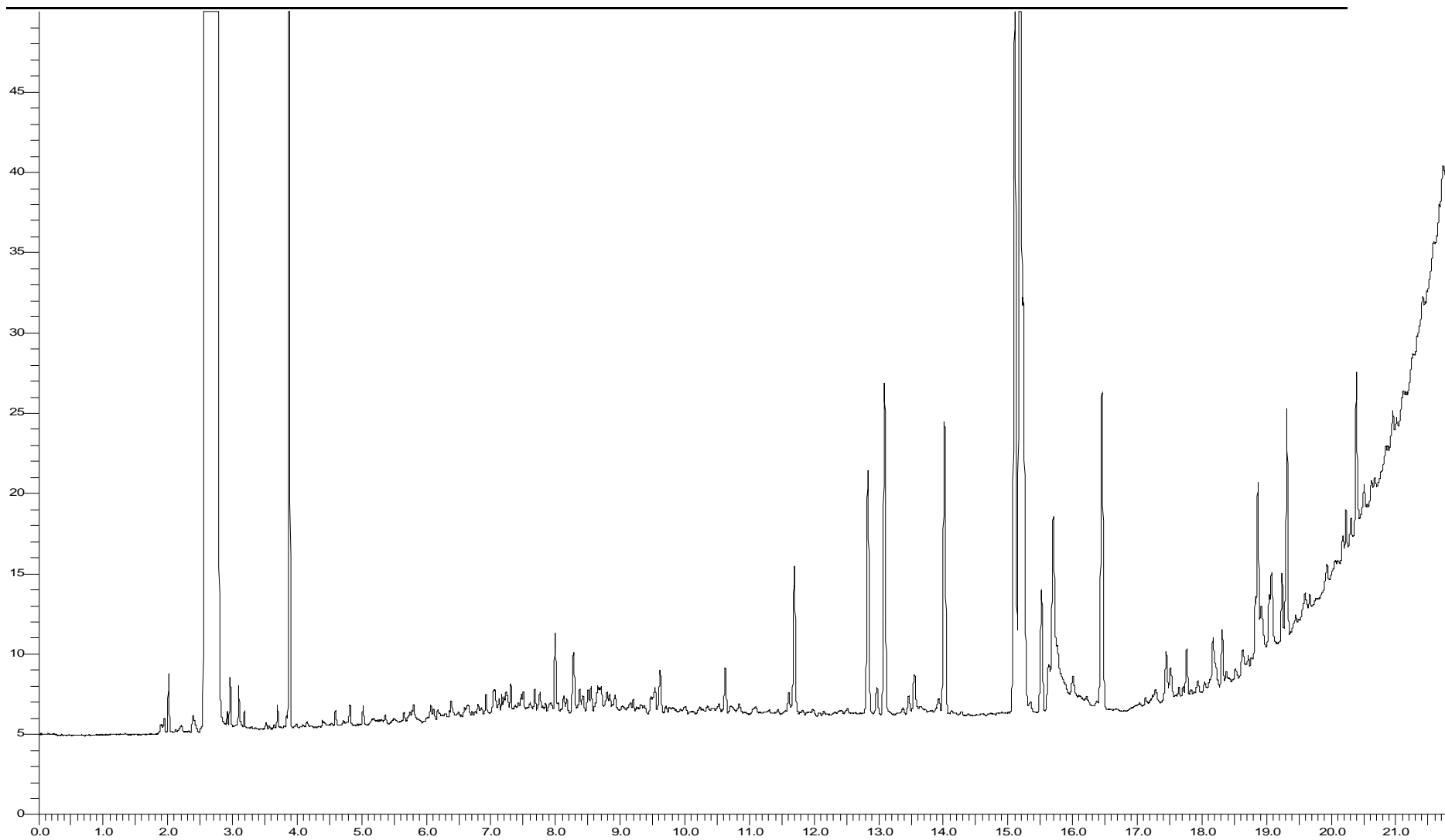


Figura 28 Cromatograma de GC-FID de sistema contaminado con diesel en el día 1.

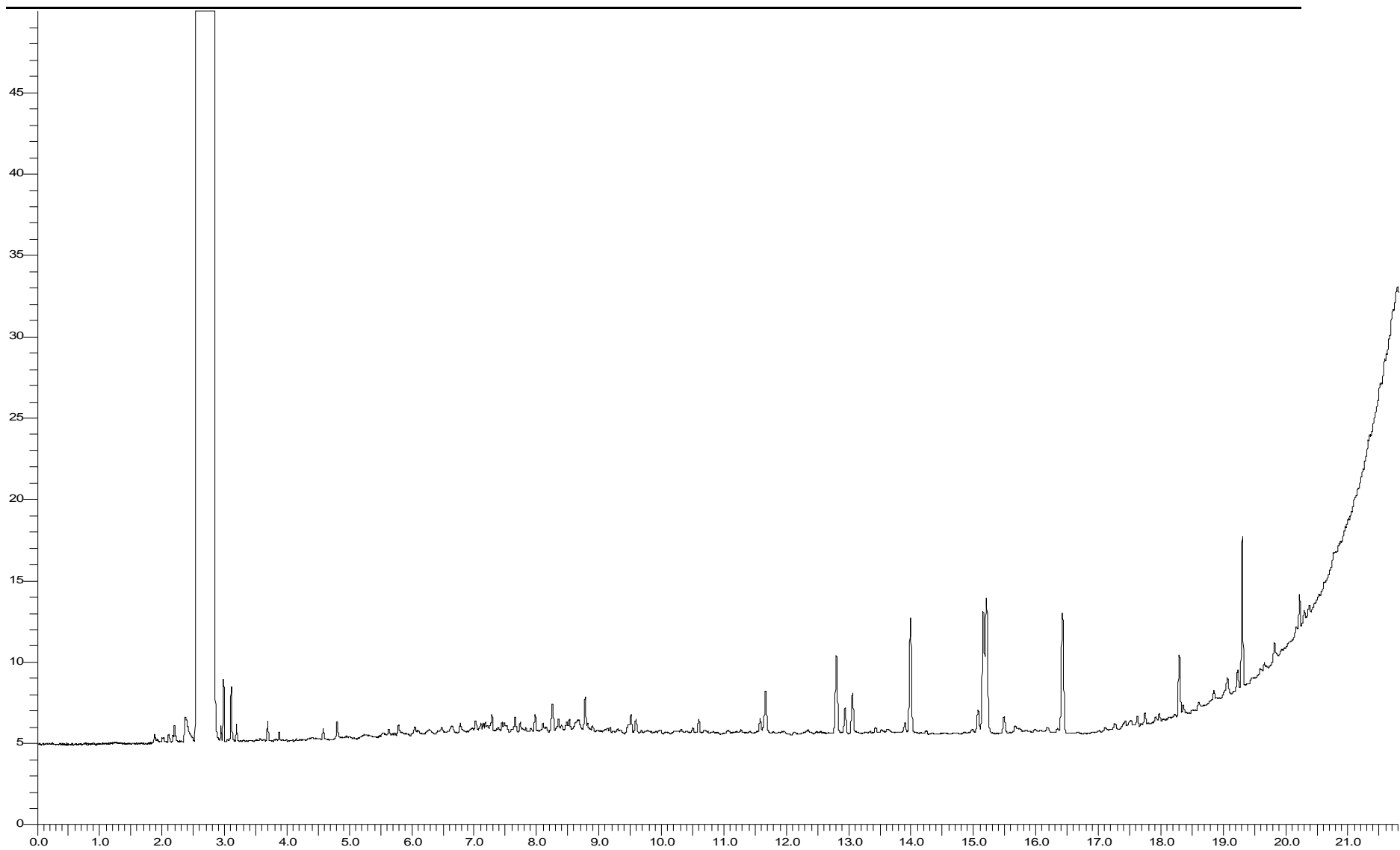


Figura 29 Cromatograma de GC-FID de sistema contaminado con diesel en el día 2.

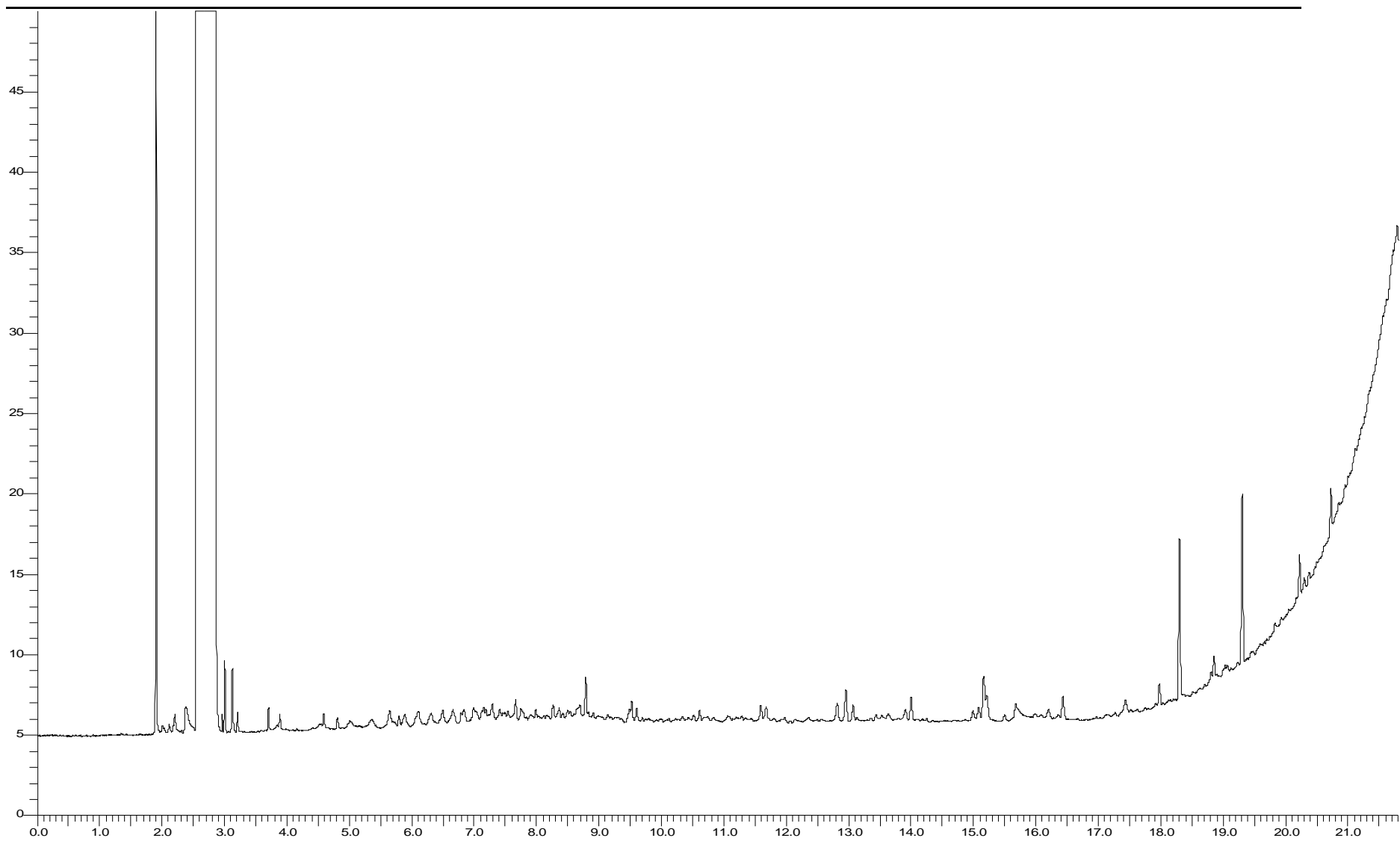


Figura 30 Cromatograma de GC-FID de sistema contaminado con diesel en el día 3.

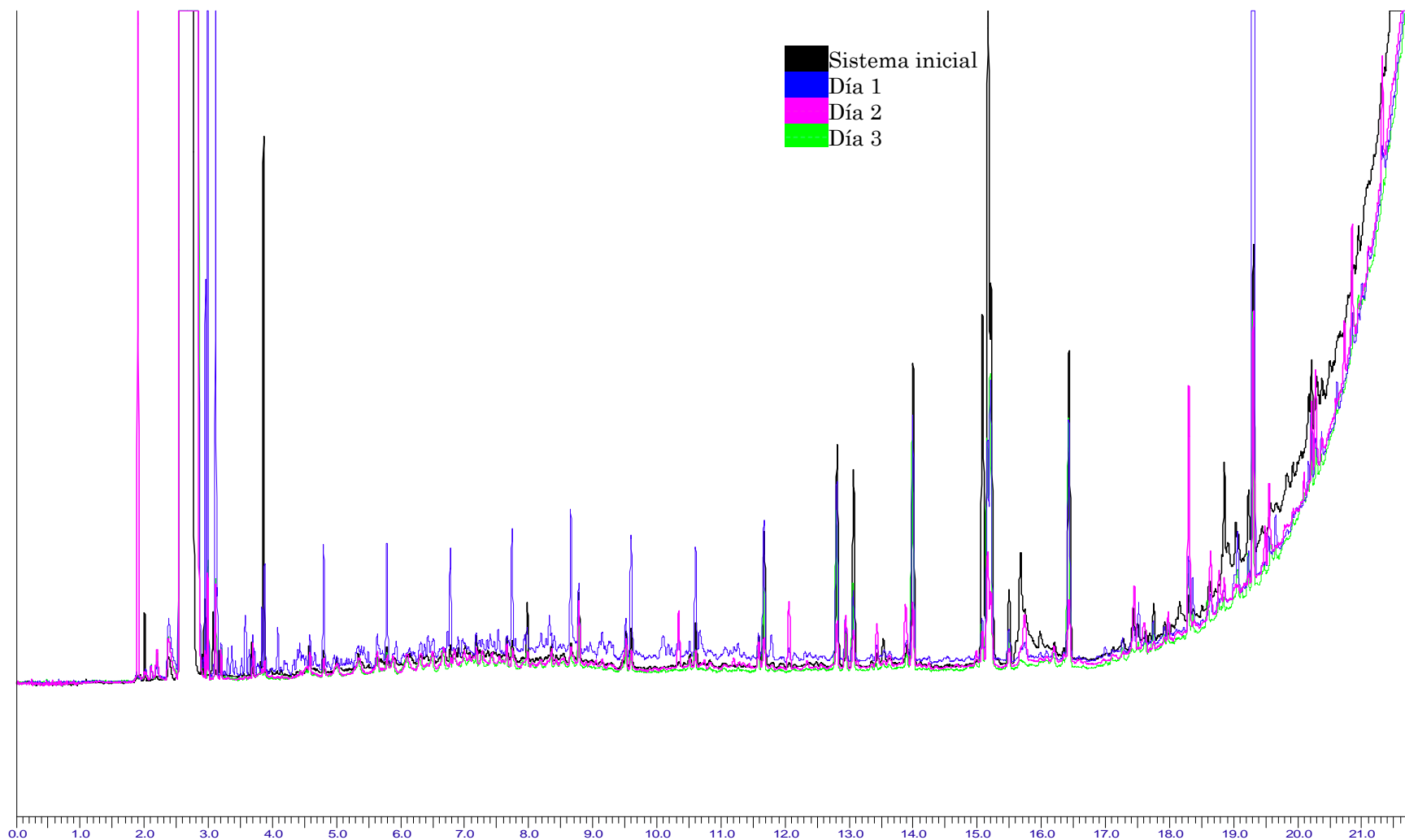


Figura 31 Disminución de la cantidad de HTP durante el proceso de biodegradación en el sistema contaminado con petróleo, evaluado a través de GC-FID.

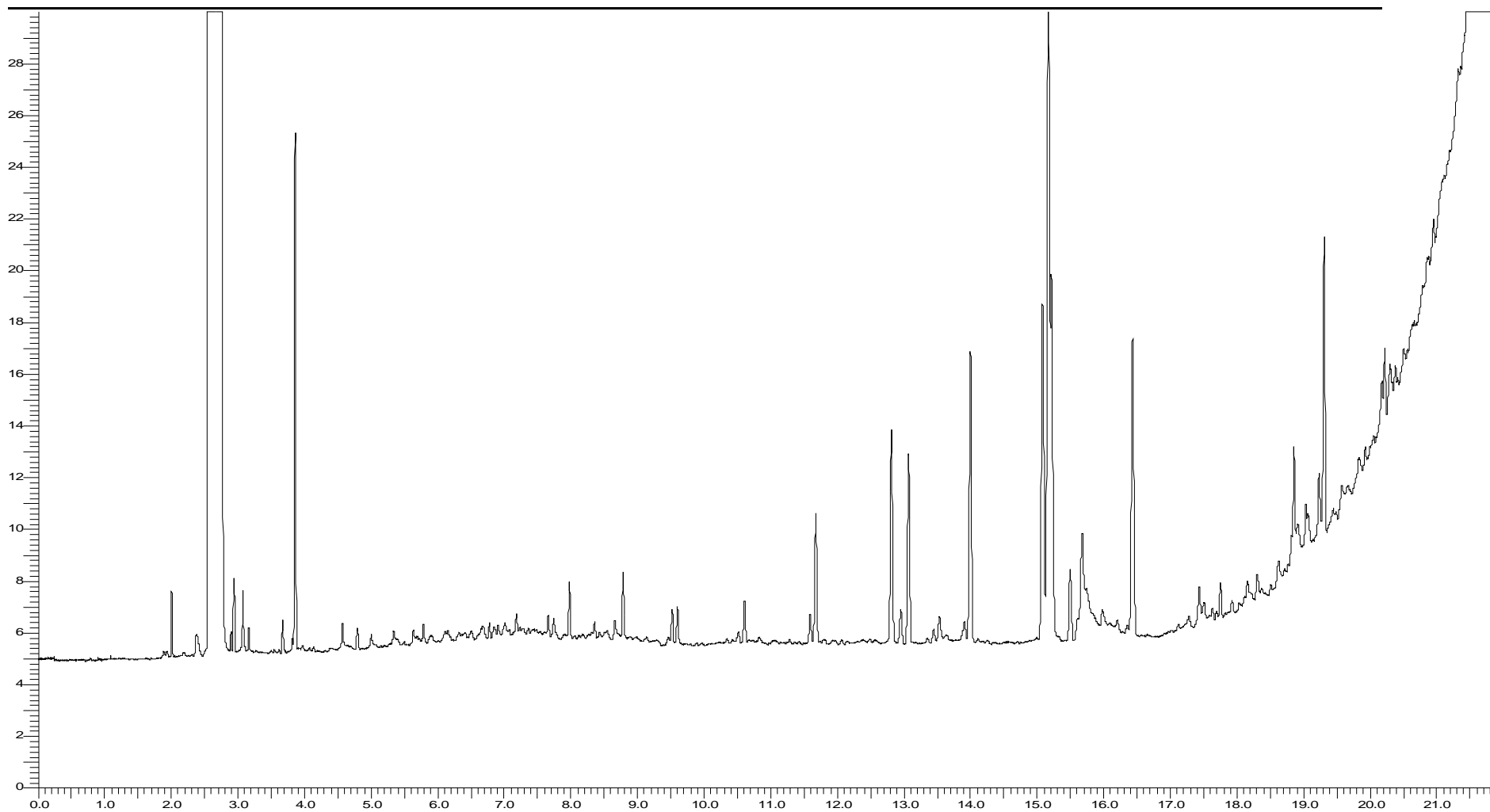


Figura 32 Cromatograma de GC-FID de sistema contaminado con petróleo inicial.

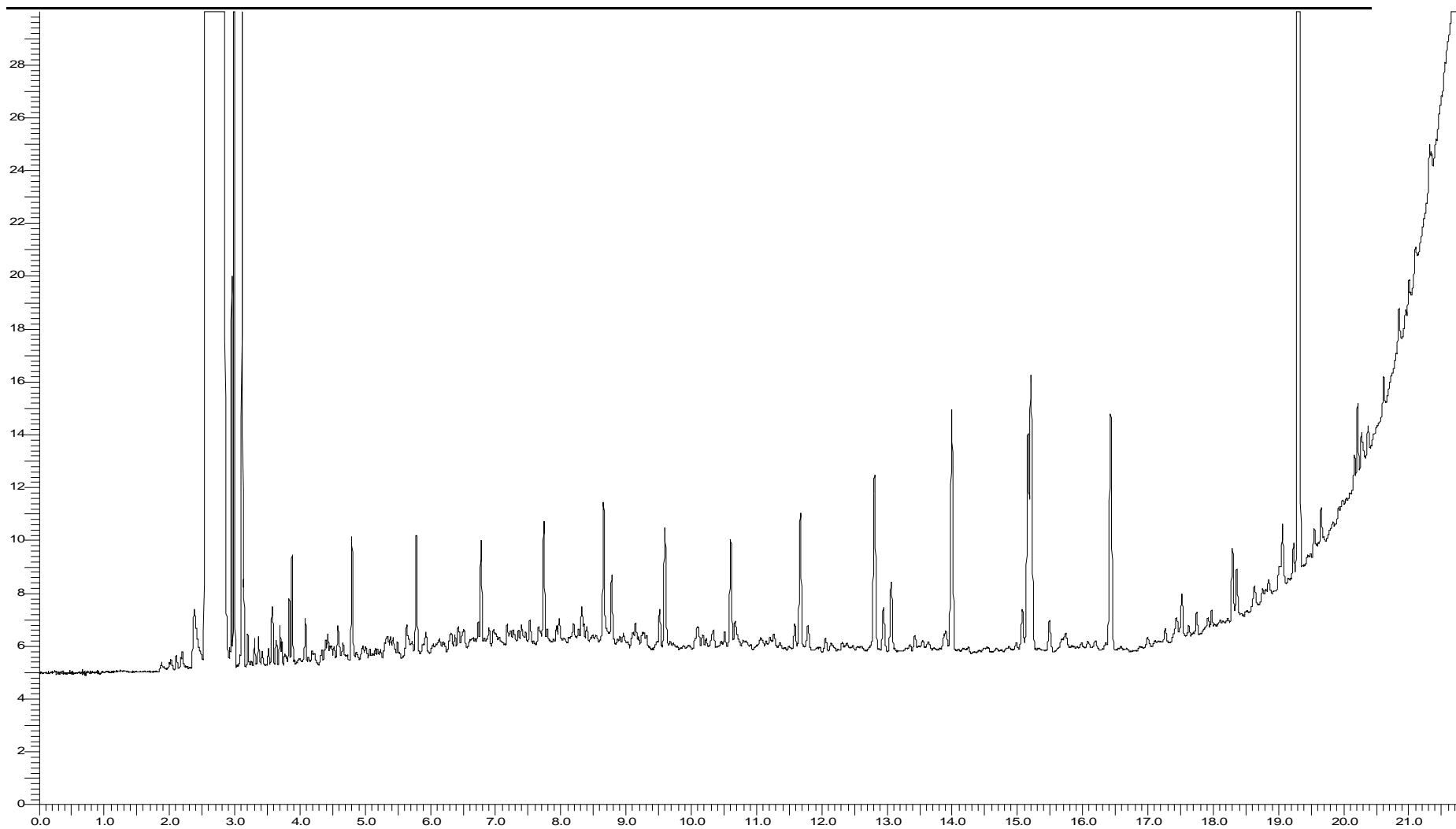


Figura 33 Cromatograma de GC-FID de sistema contaminado con petróleo en el día 1.

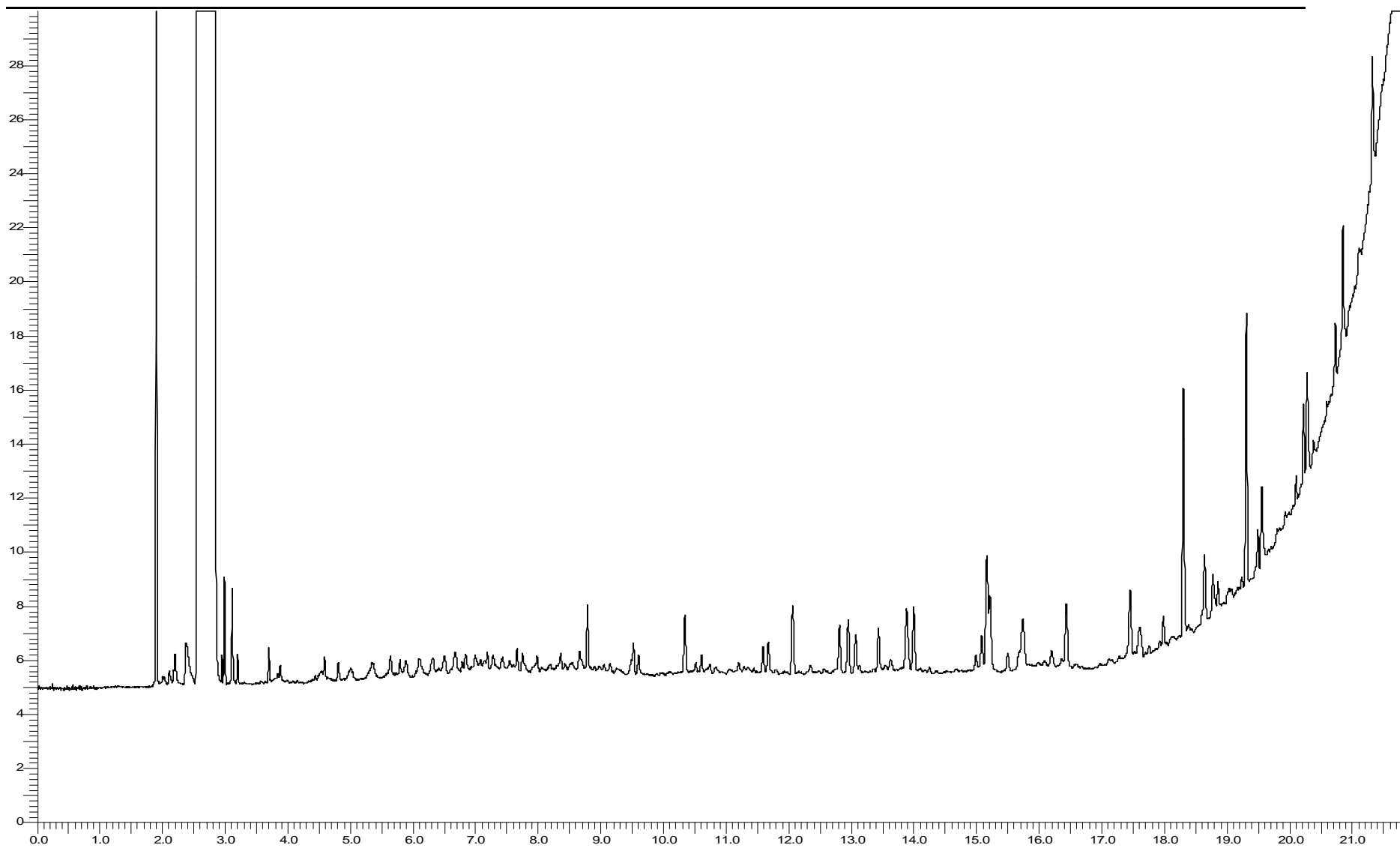


Figura 34 Cromatograma de GC-FID de sistema contaminado con petróleo en el día 2.

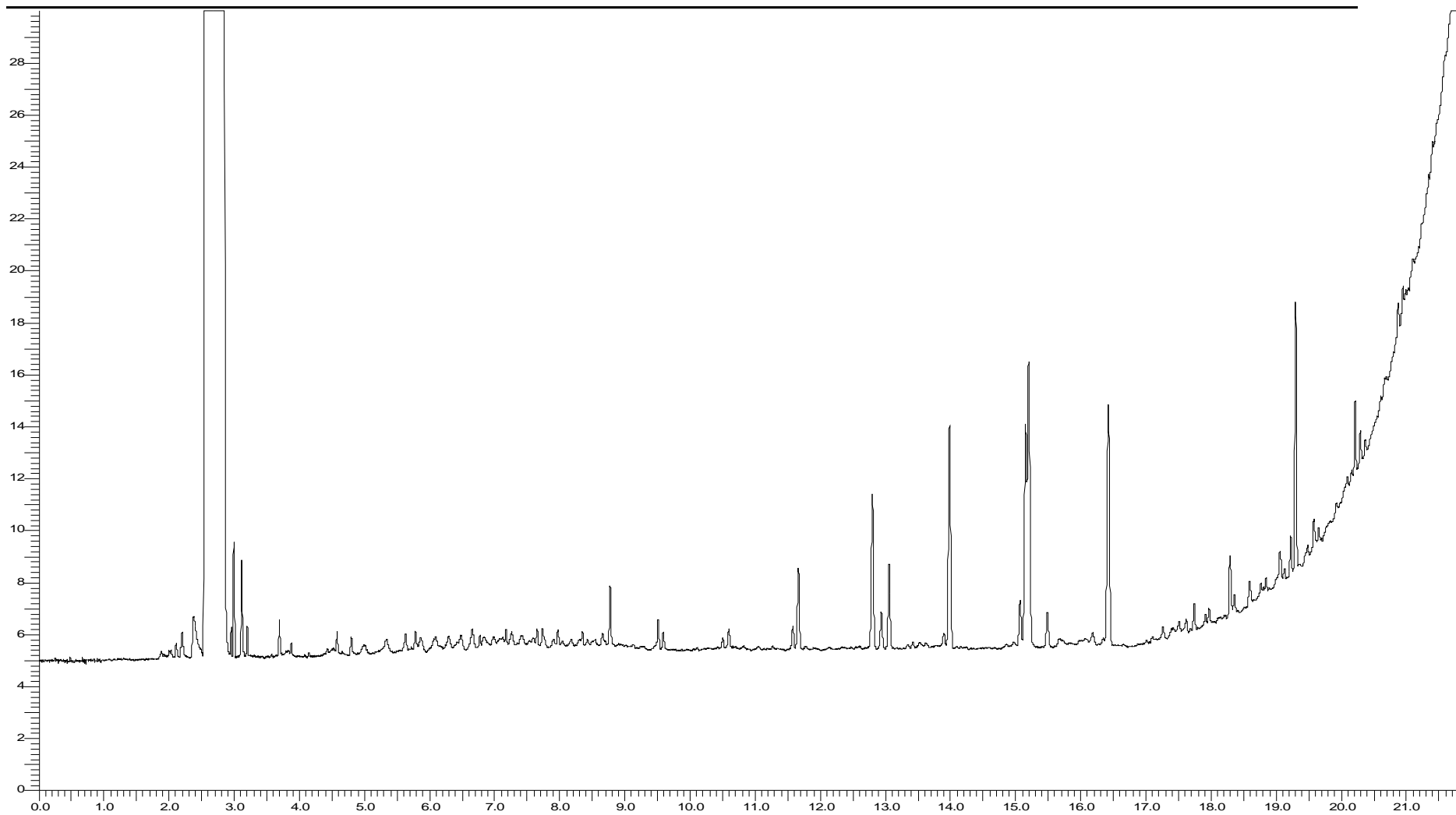


Figura 35 Cromatograma de GC-FID de sistema contaminado con petróleo en el día 3.

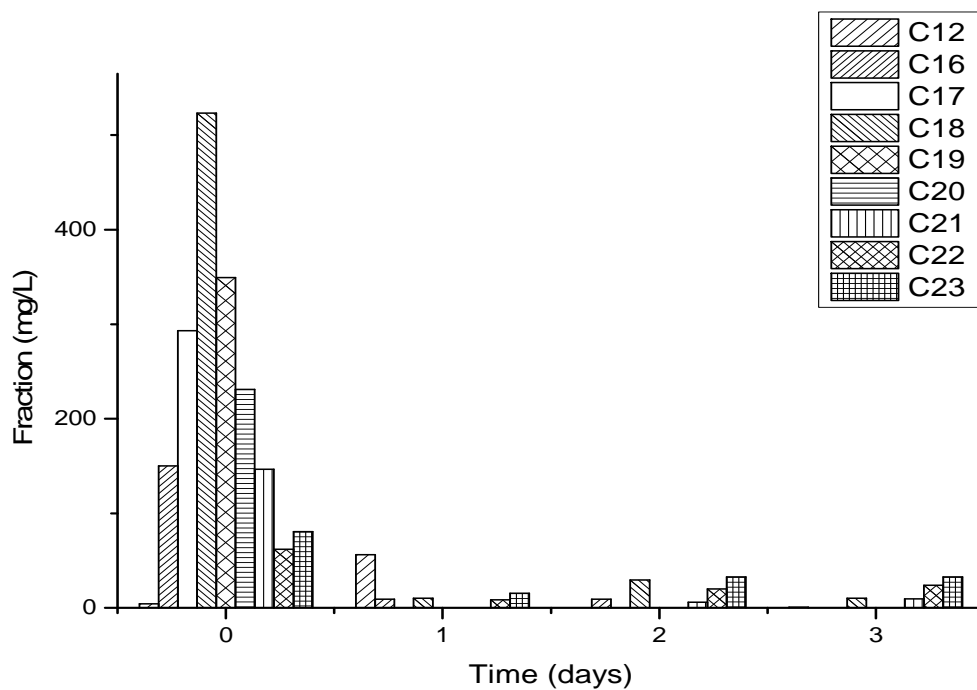


Figura 36 Biodegradación de diferentes fracciones de hidrocarburos en agua contaminada con diesel.

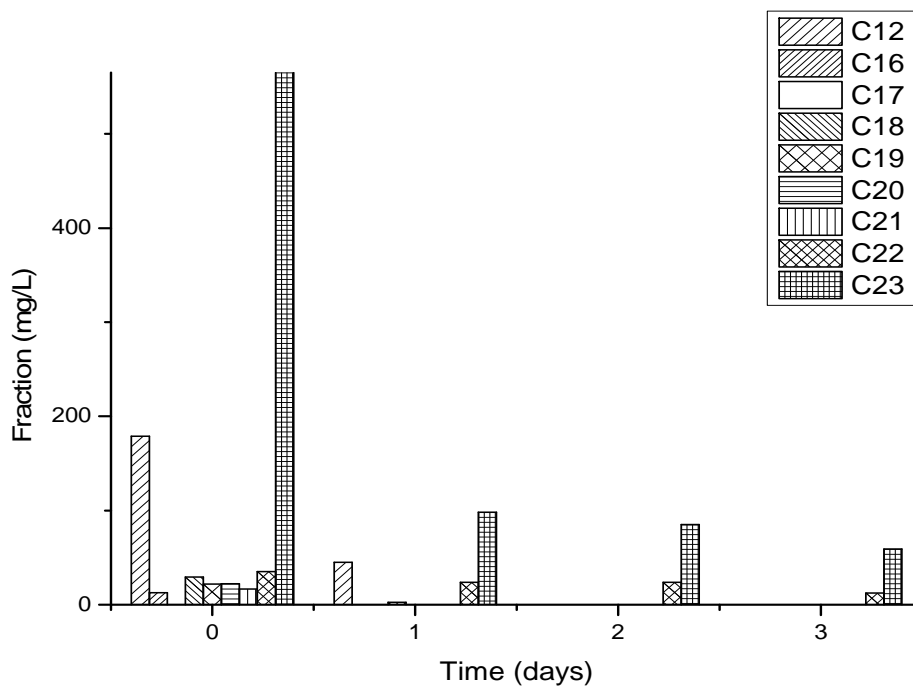


Figura 37 Biodegradación de diferentes fracciones de hidrocarburos en agua contaminada con petróleo.

En ambos sistemas, como se aprecia en las figuras 36 y 37, las fracciones que son degradadas mas rápidamente son las que contienen menor número de carbonos (C12-C20), mientras que las fracciones con mayor número de carbonos requieren mas tiempo para tener una disminución superior al 80%. En ambos sistemas, en el primer día del tratamiento, existe un incremento en la fracción C12, la cuál decrece hasta desaparecer. Este incremento puede deberse a que el microbioma transforma las fracciones con mayor número de carbonos en fracciones mas cortas para poder metabolizarlas.

3.6.3 Efecto de las SH

La adición de los ácidos húmicos a los sistemas desencadenaron una mayor biodisponibilidad de los contaminantes. Los resultados del análisis de los sistemas por HPLC se muestra en las figuras 38 y 39 para el sistema que tiene como contaminante diesel y en las figuras 40 y 41 para los sistemas con petróleo. Debido al sistema de detección utilizado, el comportamiento de compuestos aromáticos, insaturados y con conjugaciones fue el evaluado en este análisis. Sólo en el sistema contaminado con petróleo, figura 40, la degradación llega a un nivel en que ya no se detectan contaminantes en el día 3. En el sistema con diesel, figura 38, el microbioma no consigue éste efecto durante los 6 días de tratamiento.

La adición de ácidos húmicos da como resultado en el sistema con diesel la degradación hasta niveles indetectables en el segundo día de tratamiento, figura 39. El sistema con petróleo muestra este mismo efecto pero en el segundo día de tratamiento, figura 41, lo que indica una mayor velocidad en la degradación de los contaminantes por el microbioma. El sistema contaminado con petróleo, con y sin la adición de ácidos húmicos, exhibe la aparición de un pico en el primer día de tratamiento y la desaparición de todos los picos con tiempos de retención superiores a este. Esto podría indicar la formación de un metabolito intermediario que es excretado por algunas cepas que conforman el microbioma, y el cuál es metabolizado inmediatamente por otras cepas. Este proceso es coincidente con el observado al evaluar los HTP por GC-FID.

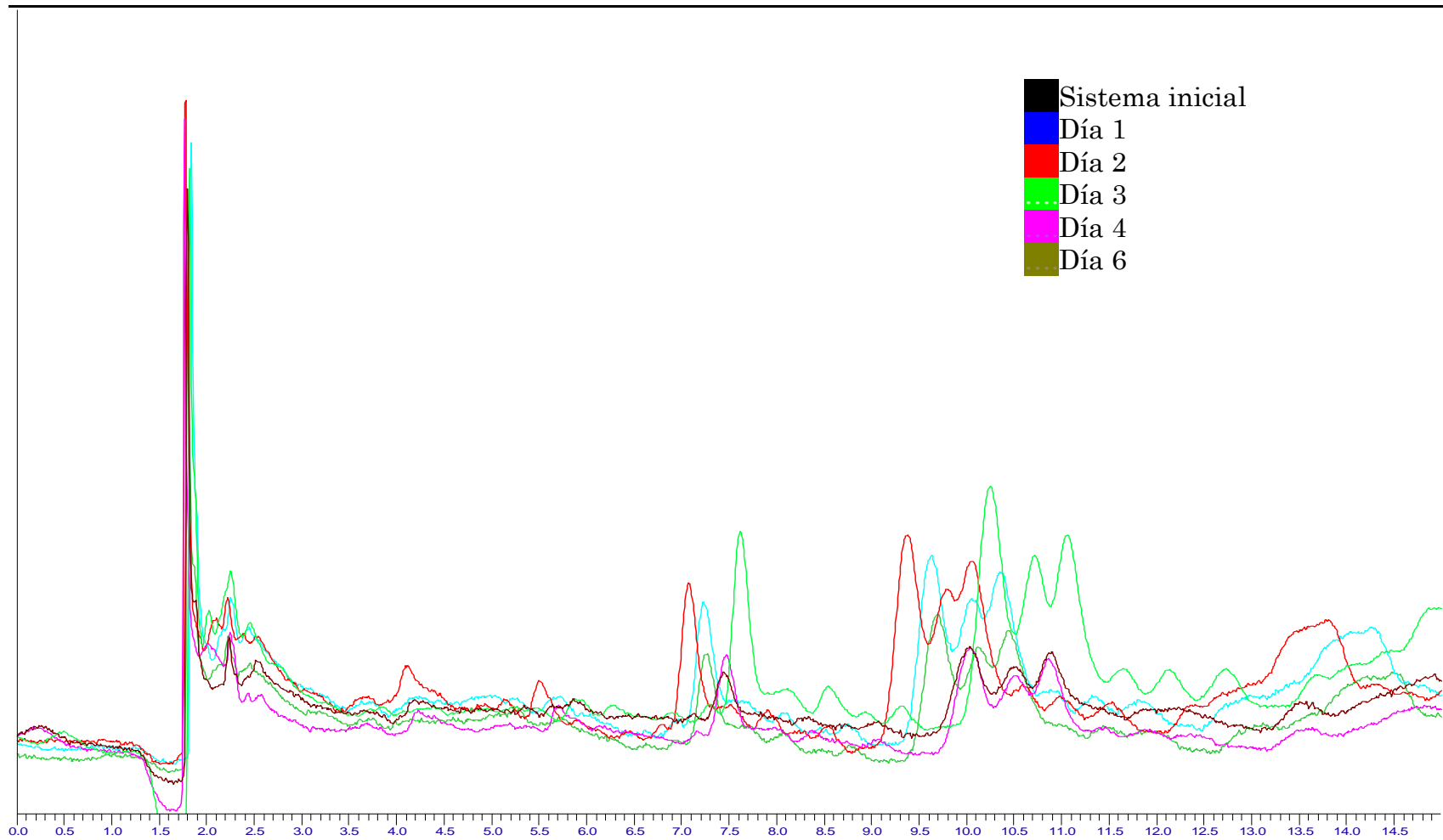


Figura 38 Disminución de la cantidad de HTP durante el proceso de biodegradación en el sistema contaminado con diesel, evaluado a través de HPLC.

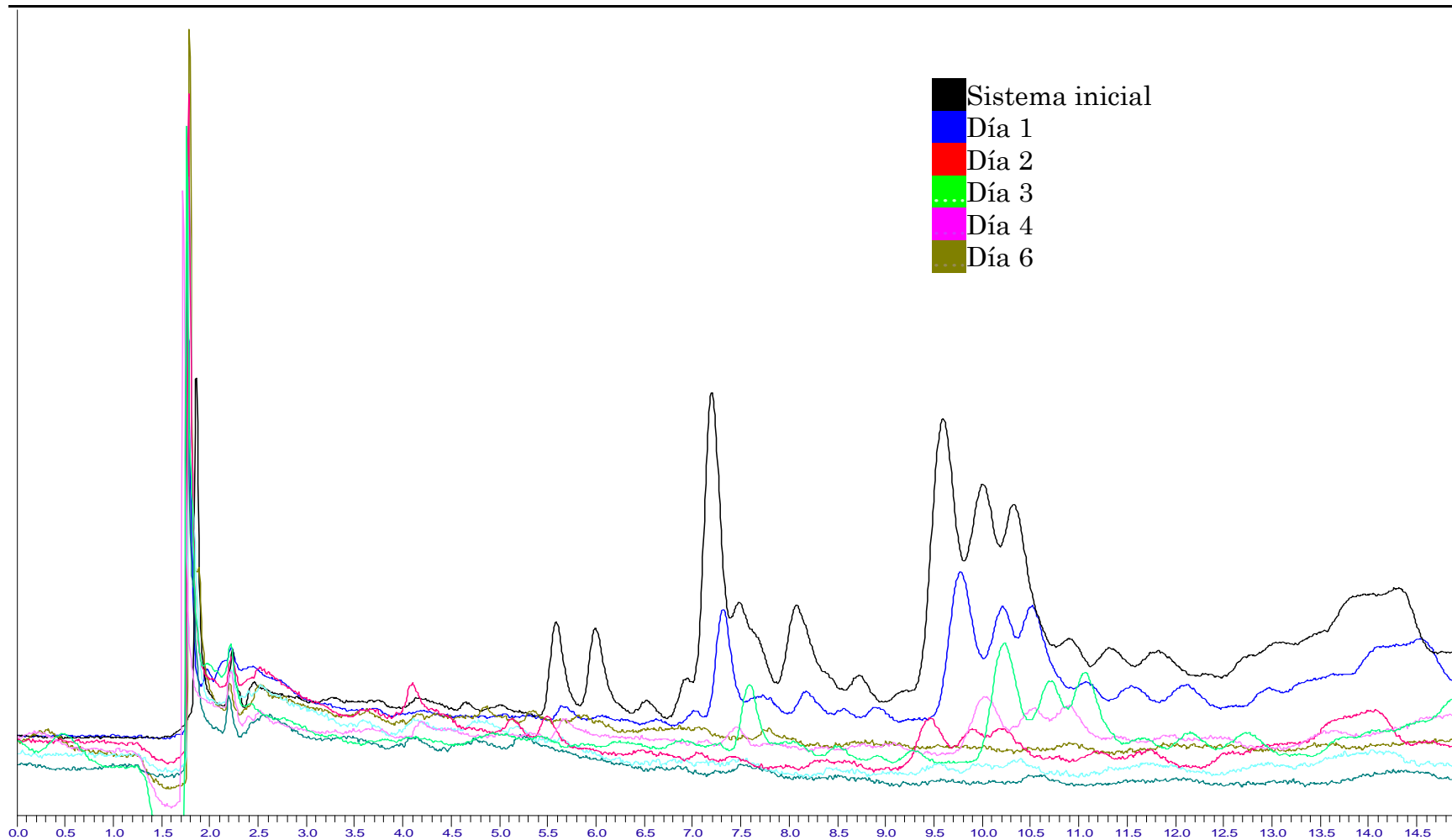


Figura 39 Disminución de la cantidad de HTP durante el proceso de biodegradación en el sistema contaminado con diesel con adición de ácidos húmicos, evaluado a través de HPLC.

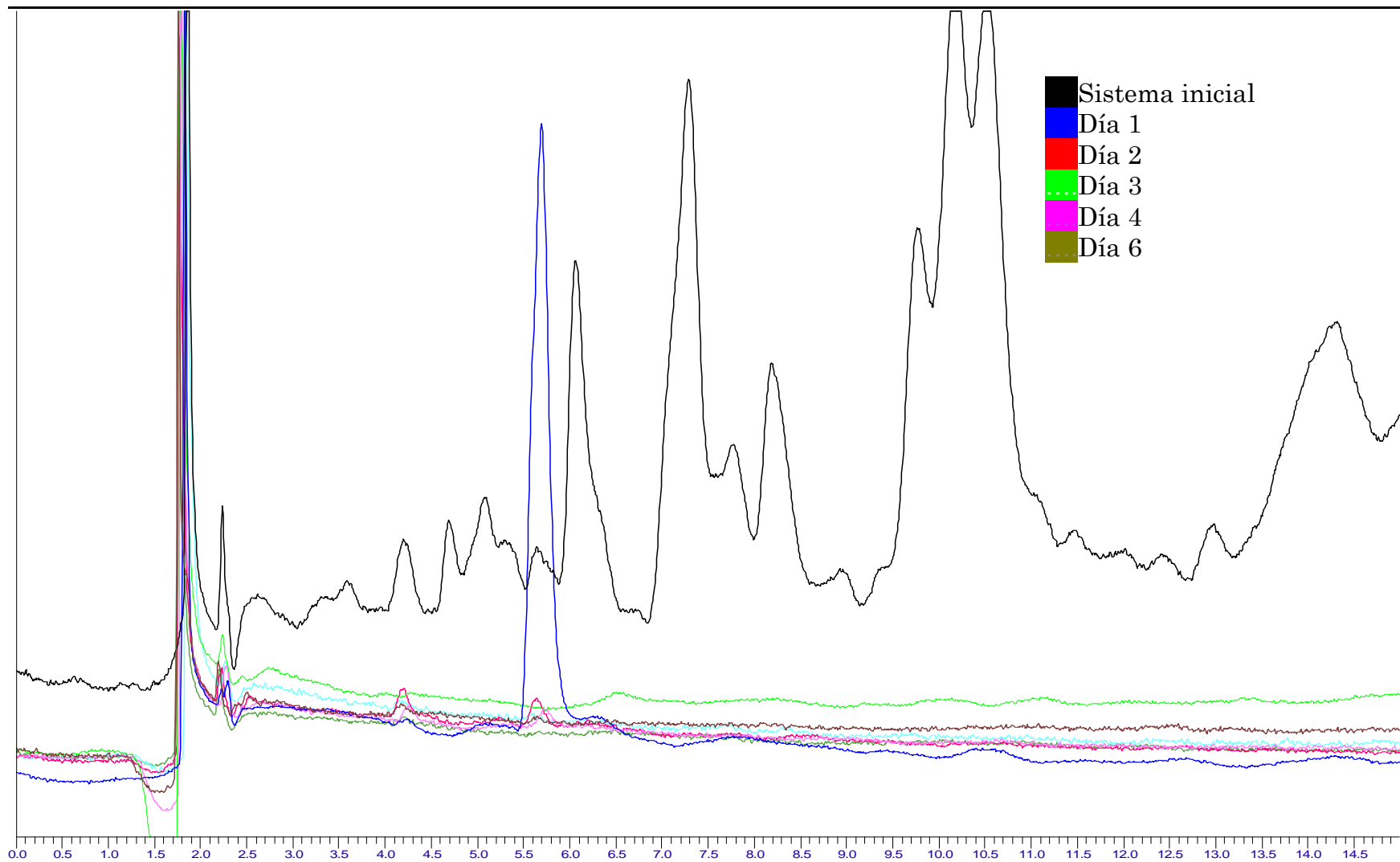


Figura 40 Disminución de la cantidad de HTP durante el proceso de biodegradación en el sistema contaminado con petróleo, evaluado a través de HPLC.

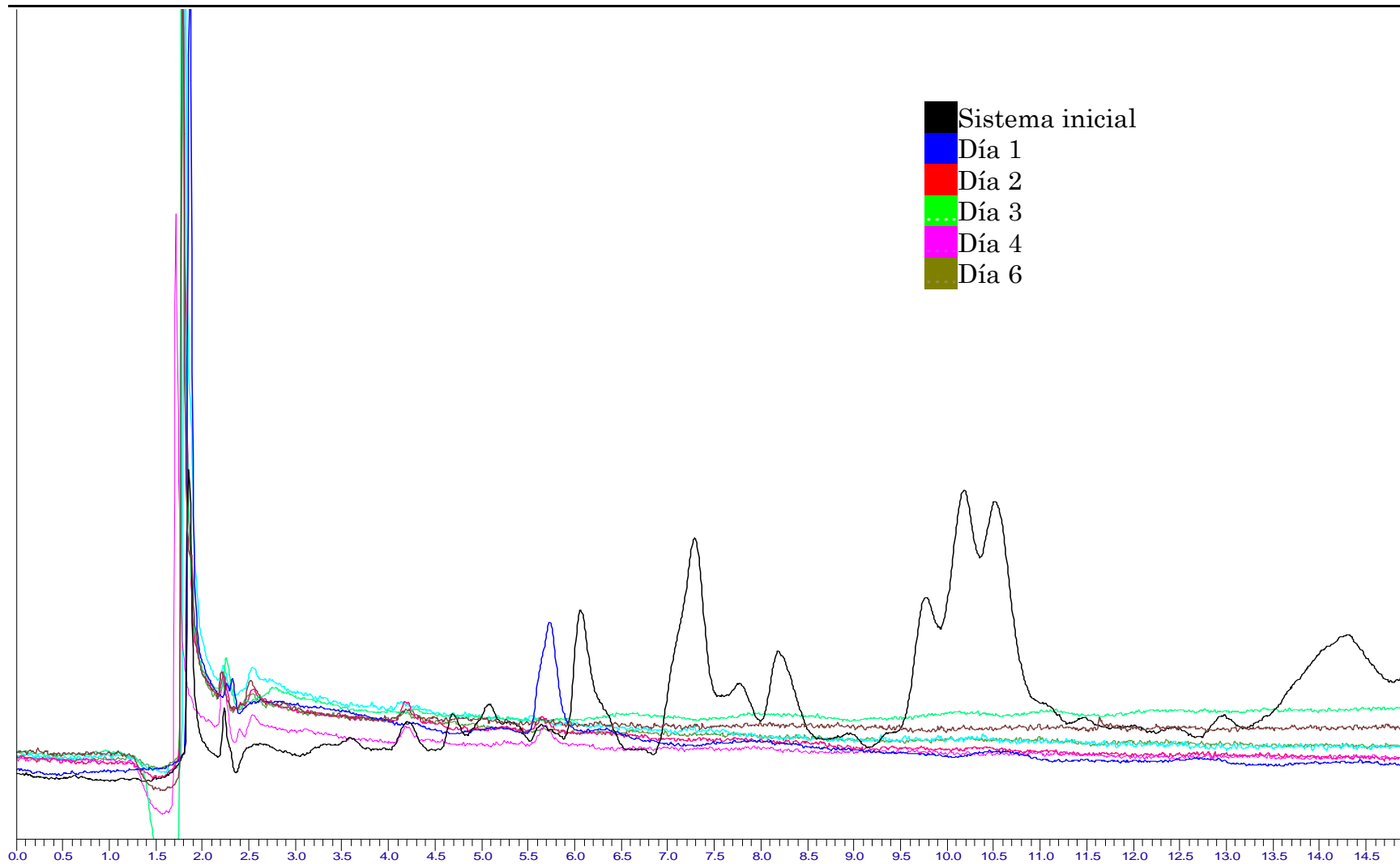


Figura 41 Disminución de la cantidad de HTP durante el proceso de biodegradación en el sistema contaminado con petróleo con , evaluado adición de ácidos húmicos, a través de HPLC.

CONCLUSIONES

La degradación de los contaminantes se vio fuertemente favorecida al agregar sustancias húmicas, ya que esto hace mayormente biodisponible una mayor cantidad de hidrocarburos. Los porcentajes de remoción como DQO fueron de 80% en las primeras 24 horas de tratamiento y alcanzaron hasta 96% por arriba de las 90 horas de tratamiento. Se puede estimular una remoción mayor con la adición de las sustancias húmicas.

El incremento de la concentración de DQO y la variación en las cantidades de carbono total, tanto orgánico como inorgánico del agua al agregar las ácidos húmicos es significativo, sin embargo, la remoción también lo es.

La adición de ácidos húmicos permite la eliminación hasta niveles en los que no hay detección por HPLC de la fracción con aromaticidad y una reducción en el tiempo de degradación de los contaminantes.

El efecto favorecedor de los ácidos húmicos sobre el proceso de biodegradación se debe a las características funcionales y estructurales de estos.

La degradación efectuada parece seguir un mecanismo en el cual los hidrocarburos con un mayor número de carbono son fragmentados a moléculas mas pequeñas las cuales pueden ser metabolizadas más fácilmente por los integrantes del microbioma.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] “Cambio climático complica acceso al agua de gran parte del planeta.” [Online]. Available: <http://agricultureros.com/cambio-climatico-complica-acceso-al-agua-de-gran-parte-del-planeta/>. [Accessed: 20-Apr-2015].
- [2] M. J. Pinkus-Rendón and A. Contreras-Sánchez, “Impacto socioambiental de la industria petrolera en Tabasco: el caso de la Chontalpa,” *LiminaR*, vol. 10, no. 2, pp. 122–144, 2012.
- [3] CNA, “Comisión Nacional del Agua,” *CNA*.
- [4] CNH, “Comisión Nacional de Hidrocarburos.”
- [5] “Reporte_de_volumen_de_petroleo_crudo_derramado_y_fugas_de_gas_natural.pdf.”
- [6] F. Kurisu, “11. Bioremediation of Groundwater and Soil in Urban Areas,” *Groundw. Manag. Asian Cities Technol. Policy Sustain.*, vol. 2, p. 207, 2008.
- [7] M. Bouchez-Naïtali and J.-P. Vandecasteele, “Biosurfactants, an help in the biodegradation of hexadecane? The case of *Rhodococcus* and *Pseudomonas* strains,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 24, no. 9, pp. 1901–1907, Sep. 2008.
- [8] O. Muter, K. Potapova, B. Limane, K. Sproge, I. Jakobsone, G. Cepurnieks, and V. Bartkevics, “The role of nutrients in the biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene in liquid and soil,” *J. Environ. Manage.*, vol. 98, pp. 51–55, May 2012.
- [9] G. C. Arias-Camisón, “Tratamientos de suelos y aguas subterráneas contaminadas con COVs,” *Ing. QUIMICA-Madr.*, vol. 34, no. 391, pp. 159–164, 2002.
- [10] R. Boopathy, S. Shields, and S. Nunna, “Biodegradation of Crude Oil from the BP Oil Spill in the Marsh Sediments of Southeast Louisiana, USA,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 167, no. 6, pp. 1560–1568, Jul. 2012.
- [11] O. V. Stepanyan and G. M. Voskoboinikov, “Effect of oil and oil products on morphofunctional parameters of marine macrophytes,” *Russ. J. Mar. Biol.*, vol. 32, no. S1, pp. S32–S39, Dec. 2006.
- [12] M. Magot, B. Ollivier, and B. K. Patel, “Microbiology of petroleum reservoirs,” *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 77, no. 2, pp. 103–116, 2000.
- [13] A. Singh, B. Singh, and O. Ward, “Potential applications of bioprocess technology in petroleum industry,” *Biodegradation*, vol. 23, no. 6, pp. 865–880, Nov. 2012.

-
- [14] F. A. Caliman, B. M. Robu, C. Smaranda, V. L. Pavel, and M. Gavrilescu, "Soil and groundwater cleanup: benefits and limits of emerging technologies," *Clean Technol. Environ. Policy*, vol. 13, no. 2, pp. 241–268, Apr. 2011.
- [15] B. R. Glick, "Using soil bacteria to facilitate phytoremediation," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 367–374, May 2010.
- [16] J. D. Van Hamme, A. Singh, and O. P. Ward, "Recent Advances in Petroleum Microbiology," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 67, no. 4, pp. 503–549, Dec. 2003.
- [17] S. Daunert, G. Barrett, J. S. Feliciano, R. S. Shetty, S. Shrestha, and W. Smith-Spencer, "Genetically Engineered Whole-Cell Sensing Systems: Coupling Biological Recognition with Reporter Genes," *Chem. Rev.*, vol. 100, no. 7, pp. 2705–2738, Jul. 2000.
- [18] N. Das and P. Chandran, "Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview," *Biotechnol. Res. Int.*, vol. 2011, pp. 1–13, 2011.
- [19] V. Patel, S. Cheturvedula, and D. Madamwar, "Phenanthrene degradation by *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India," *J. Hazard. Mater.*, vol. 201–202, pp. 43–51, Jan. 2012.
- [20] S. Barathi and N. Vasudevan, "Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil," *Environ. Int.*, vol. 26, no. 1, pp. 413–416, 2001.
- [21] Atlas M. Ronald, "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective," *Microbiol. Rev.*, vol. 45, no. 1, pp. 180–209, Mar. 1981.
- [22] B. P. Kelleher and A. J. Simpson, "Humic Substances in Soils: Are They Really Chemically Distinct?," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, no. 15, pp. 4605–4611, Aug. 2006.
- [23] R. Lal, "Carbon sequestration," *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 363, no. 1492, pp. 815–830, Feb. 2008.
- [24] V. D. Tikhova, T. F. Bogdanova, V. P. Fadeeva, and V. N. Piottukh-Peletsky, "Study of the fragment composition of humic acids of different origin using IR-EXPERT software," *J. Anal. Chem.*, vol. 68, no. 1, pp. 86–94, Jan. 2013.
- [25] F. J. Rodríguez and L. A. Núñez, "Characterization of aquatic humic substances: Aquatic humic substances," *Water Environ. J.*, vol. 25, no. 2, pp. 163–170, Jun. 2011.
- [26] A. K. Fukuyama, G. Shigenaka, and D. A. Coats, "Status of intertidal infaunal communities following the Exxon Valdez oil spill in Prince William Sound, Alaska," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 84, no. 1–2, pp. 56–69, Jul. 2014.
- [27] C. A. Nicholson and B. Z. Fathepure, "Biodegradation of Benzene by Halophilic and Halotolerant Bacteria under Aerobic Conditions," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 2, pp. 1222–1225, Feb. 2004.
- [28] H. P. Bacosa, K. Suto, and C. Inoue, "Preferential utilization of petroleum oil hydrocarbon components by microbial consortia reflects

-
- degradation pattern in aliphatic–aromatic hydrocarbon binary mixtures,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 27, no. 5, pp. 1109–1117, May 2011.
- [29] J. G. Leahy and R. R. Colwell, “Microbial degradation of hydrocarbons in the environment.,” *Microbiol. Rev.*, vol. 54, no. 3, pp. 305–315, 1990.
- [30] W. Wang, B. Cai, and Z. Shao, “Oil degradation and biosurfactant production by the deep sea bacterium *Dietzia maris* As-13-3,” *Front. Microbiol.*, vol. 5, Dec. 2014.
- [31] M. Zacarias-Salinas, M. Vaca, M. A. Flores, E. R. Bandala, L. G. Torres, and others, “Surfactant-enhanced washing of soils contaminated with wasted-automotive oils and the quality of the produced wastewater,” *J. Environ. Prot.*, vol. 4, no. 12, p. 1495, 2013.
- [32] J. Huang, M. Nemati, G. Hill, and J. Headley, “Batch and continuous biodegradation of three model naphthenic acids in a circulating packed-bed bioreactor,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 201–202, pp. 132–140, Jan. 2012.
- [33] NATO Advanced Research Workshop on Use of Humates to Remediate Polluted Environments: from Theory to Practice, I. V. Perminova, K. Hatfield, N. Hertkorn, North Atlantic Treaty Organization, and Public Diplomacy Division, *Use of humic substances to remediate polluted environments from theory to practice*. Dordrecht, the Netherlands: Springer, 2005.
- [34] O. N. Aleksandrova, M. Schulz, and M. Matthies, “A Quantum Statistical Approach to Remediation Effect of Humic Substances,” *Water. Air. Soil Pollut.*, vol. 221, no. 1–4, pp. 203–214, Oct. 2011.
- [35] O. C. Turgay, E. E. Erdogan, and A. Karaca, “Effect of humic deposit (leonardite) on degradation of semi-volatile and heavy hydrocarbons and soil quality in crude-oil-contaminated soil,” *Environ. Monit. Assess.*, vol. 170, no. 1–4, pp. 45–58, Nov. 2010.
- [36] C. E. W. Steinberg, T. Meinelt, M. A. Timofeyev, M. Bittner, and R. Menzel, “Humic substances: Part 2: Interactions with organisms,” *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 15, no. 2, pp. 128–135, Mar. 2008.
- [37] H. J. Park and D. Kim, “Isolation and characterization of humic substances-degrading bacteria from the subarctic Alaska grasslands: Humic substances-degrading bacteria from subarctic grasslands,” *J. Basic Microbiol.*, vol. 55, no. 1, pp. 54–61, Jan. 2015.
- [38] H. Lippold, U. Gottschalch, and H. Kupsch, “Joint influence of surfactants and humic matter on PAH solubility. Are mixed micelles formed?,” *Chemosphere*, vol. 70, no. 11, pp. 1979–1986, Feb. 2008.
- [39] E. Lipczynska-Kochany and J. Kochany, “Humic substances in bioremediation of industrial wastewater—Mitigation of inhibition of activated sludge caused by phenol and formaldehyde,” *J. Environ. Sci. Health Part A*, vol. 43, no. 6, pp. 619–626, Apr. 2008.
- [40] V. A. R. Coutiño, L. G. T. Bustillos, L. A. G. M. Tovar, R. J. G. Sánchez, and F. J. R. Valadez, “EFECTO DEL PH SOBRE LAS PROPIEDADES SURFACTANTES Y LA ESTRUCTURA SUPRAMOLECULAR DE SUSTANCIAS HÚMICAS PROVENIENTES DE COMPOST DE LODOS RESIDUALES,” *Rev. Int. Contam. Ambient.*, vol. 29, no. 3, pp. 191–199.

-
- [41] F. J. Stevenson, *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. John Wiley & Sons, 1994.
- [42] Y. Chen, N. Senesi, and M. Schnitzer, "Information provided on humic substances by E4/E6 ratios," *Soil Sci. Soc. Am. J.*, vol. 41, no. 2, pp. 352–358, 1977.
- [43] J. Hladký, L. Pospíšilová, and T. Liptaj, "Spectroscopic characterization of natural humic substances," *J. Appl. Spectrosc.*, vol. 80, no. 1, pp. 8–14, 2013.
- [44] S. Weiß, M. Tauber, W. Somitsch, R. Meincke, H. Müller, G. Berg, and G. M. Guebitz, "Enhancement of biogas production by addition of hemicellulolytic bacteria immobilised on activated zeolite," *Water Res.*, vol. 44, no. 6, pp. 1970–1980, Mar. 2010.
- [45] S. Stelting, R. G. Burns, A. Sunna, G. Visnovsky, and C. R. Bunt, "Immobilization of *Pseudomonas* sp. strain ADP: A stable inoculant for the bioremediation of atrazine," *Appl. Clay Sci.*, vol. 64, pp. 90–93, Aug. 2012.
- [46] Y. Bai, Q. Sun, R. Xing, D. Wen, and X. Tang, "Removal of pyridine and quinoline by bio-zeolite composed of mixed degrading bacteria and modified zeolite," *J. Hazard. Mater.*, vol. 181, no. 1–3, pp. 916–922, Sep. 2010.
- [47] H. Guo, J. Yao, M. Cai, Y. Qian, Y. Guo, H. H. Richnow, R. E. Blake, S. Doni, and B. Ceccanti, "Effects of petroleum contamination on soil microbial numbers, metabolic activity and urease activity," *Chemosphere*, vol. 87, no. 11, pp. 1273–1280, Jun. 2012.