



**Casa abierta al tiempo**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**

UNIDAD IZTAPALAPA



**“EVALUACION DE CEPAS PRODUCTORAS DE  
BIOSURFACTANTES Y SU APLICACION EN LA  
BIODEGRADACION DE LA FRACCION AROMATICA EN  
UN SUELO INTEMPERIZADO CONTAMINADO CON  
PETROLEO”**

# **T E S I S**

PRESENTADA POR

**I.B.Q. MARCO ALEJANDRO MONTES DE OCA GARCIA**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARIANO GUTIERREZ ROJAS

A S E S O R :

DR. SANTIAGO FLORES Y DE HOYOS

MEXICO, D. F. 2001

---

U. A. M. METROPOLITANA BIOTECNOLÓGICA

El posgrado en biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo consejo con el convenio: **471-0/Maestría en Biotecnología.**

---

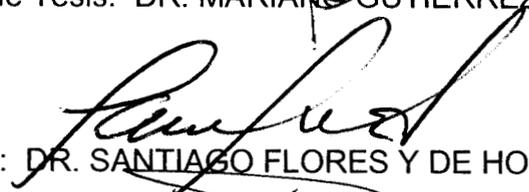
El jurado designado por la División de ciencias Biológicas y de la Salud de la  
Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

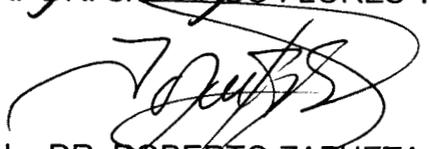
MARCO ALEJANDRO MONTES DE OCA GARCÍA

El día 10 de abril de año de 2001

Comité Tutorial:

  
Director de Tesis: DR. MARIANO GUTIÉRREZ ROJAS

  
ASESOR: DR. SANTIAGO FLORES Y DE HOYOS

  
SINODAL: DR. ROBERTO ZAZUETA SANDOVAL

  
SINODAL: DR. SERGIO HUERTA OCHOA

---

## AGRADECIMIENTOS

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

A dios.

Agradezco el apoyo al Instituto Mexicano del Petróleo por la beca que me otorgó, así como a los proyectos: FIES-95-106-VI y FIES-95-108-VI.

A mis queridos padres con amor y cariño que me ayudaron a mi formación.

A Mariano Gutiérrez, por su conocimiento, dedicación y paciencia.

A los doctores: Sergio Huerta, Santiago Flores y Roberto Zazueta, por sus comentarios y gran ayuda.

A mis hijos: Jazmín y Andrés, por sus ocurrencias y compañía.

A mi esposa, por su apoyo

A mis suegros, por su valioso apoyo.

A mis compañeros de trabajo, que han hecho las jornadas de trabajo más agradables, por su amistad y comprensión.

A mis hermanos: Paco, Myriam y Mónica; mis sobrinos: Mar, Paco, Alan, Daniel, Alejandra, Pau, Monica, Myriam; mis cuñados(as): Naoky, Alejandra, Maribel, Francisco, Daniel, Ricardo, Blanca, Eduardo, Claudia.

20/10/88 = 4

## RESUMEN

Se presentan y analizan los resultados del uso de biosurfactantes como ayuda en la biodegradación de hidrocarburos y sus fracciones, en especial la fracción aromática, que contiene los hidrocarburos aromáticos polinucleares.

Se seleccionó un suelo contaminado cuyo contenido de aromáticos fue del 3%. Se realizaron estudios de síntesis de biosurfactantes con dos bacterias: *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*.

Se seleccionó el biosurfactante producido por *Klebsiella pneumoniae* porque tanto sus características fisicoquímicas como la actividad emulsificante y estabilidad de la emulsión fueron mejores. Para disponer de un marco de referencia se utilizó Tergitol NP-10 y se desarrolló un estudio comparativo. Con la técnica de lavado de suelos, se estudió el potencial del surfactante Tergitol NP-10 y el biosurfactante de *Klebsiella pneumoniae* y se determinó la eficiencia relativa de solubilización de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) y sus fracciones, obteniéndose como resultado que el biosurfactante contribuyó en la desorción de todas las fracciones en diferentes proporciones con respecto al surfactante de referencia Tergitol NP-10 y a diferente número de lavados.

Se realizaron estudios de biodegradación, donde el biosurfactante de *Klebsiella pneumoniae* fue capaz de incrementar la velocidad de la biodegradación de la fracción aromática; así mismo la fracción alifática fue biodegradada con ayuda del biosurfactante. En el caso de la fracción polar se encontró que sólo era necesaria la adición de microorganismos degradadores de hidrocarburos, más que de cualquiera de los surfactantes empleados. Para la fracción de asfaltenos, el fenómeno que predominó fue la desorción hasta las 24 horas de cultivo, tendiendo posteriormente a acumularse. Por último, el uso del Tergitol NP-10 favoreció la degradación de los HTP presentes en el suelo contaminado.

## ABSTRACT

Is presented and analyze the results of the biosurfactant use like help in the hydrocarbons biodegradation and their fractions, especially the fraction that contains the polynuclear hydrocarbon aromatic.

A contaminated soil was selected whose content of aromatic was 3%. They were carried out studies of biosurfactantes synthesis with two bacterias: *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*.

The biosurfactant selected was obtained from *Klebsiella pneumoniae* due its physicochemical characteristics like emulsifier activity and emulsion stability were better. As a reference, surfactant Tergitol NP-10 was used and a comparative study was carried out. Using the surfactants: Tergitol NP-10 and the biosurfactant produced by *Klebsiella pneumoniae* by the soil washing technique, the potential of solubilization of total petroleum hydrocarbons and their fractions was studied and their relative efficiency was determined; as a result, the biosurfactant contributed in the desorption of all the fractions in different rates with regard to the reference surfactant Tergitol NP-10 at different number of washings.

It were carried out biodegradation studies, in that the biosurfactant from *Klebsiella pneumoniae* was able to increase the velocity of the biodegradation of the aromatic fraction; likewise the aliphatic fraction. In the case of the polar fraction it was found that it was only necessary the addition of hydrocarbon degrading microorganisms than anyone used surfactants. For the fraction of asphaltenes the main phenomenona prevailed was the desorption within the first 24 hours of cultivation, later shown a tendency to accumulate. Finally, the use of the Tergitol NP-10 favored the degradation of the present HTP in contaminated selected soil.

# CONTENIDO

RESUMEN .....	i
ABSTRACT .....	ii
CONTENIDO .....	iii
INTRODUCCIÓN .....	1
1.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	4
1.1.- Suelo .....	4
1.2.- Contaminación por hidrocarburos .....	5
1.3.- Hidrocarburos poliaromáticos .....	8
1.4.- Biodisponibilidad de contaminantes .....	18
1.5.- Biosurfactantes .....	20
2.- JUSTIFICACIÓN .....	28
3.- OBJETIVOS .....	29
3.1.- General	
3.2.-Particulares	
HIPÓTESIS .....	29
4.- MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
4.1.- Selección de suelo contaminado .....	30
4.2.- Evaluación y caracterización de cepas productoras de biosurfactantes .....	33
4.2.1.- Origen e Identificación de cepas .....	33
4.2.2.- Perfil cinético de las cepas productoras de biosurfactantes .....	36
4.2.2.1.- Preparación de inóculo .....	36
4.2.2.2.- Producción de biosurfactantes .....	36
4.2.3.- Pruebas de estabilidad de emulsión .....	37
4.2.4.- Biodegradación de surfactantes .....	38
4.2.5.- Prueba de lavado de suelo en lote .....	38
4.3.- Estudios de solubilización de hidrocarburos y sus fracciones por surfactantes seleccionados .....	38
4.4.- Evaluación de la biodegradación de HTP y sus fracciones en suelo contaminado en presencia de los surfactantes .....	38
4.4.1.- Preparación de inóculo degradador de hidrocarburos .....	41
4.4.2.- Técnicas analíticas .....	41

4.4.2.1.- Cuenta de microorganismos degradadores de hidrocarburos	41
4.4.2.2.- Cuantificación de hidrocarburos totales del petróleo y fraccionamiento de hidrocarburos	42
4.4.2.2.1.- Cuantificación en suelo	42
4.4.2.2.2.- Fraccionamiento de hidrocarburos	42
4.4.2.3.- Producción de CO <sub>2</sub> , con suelo en suspensión	44
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
5.1.- Selección de suelo contaminado	47
5.2.- Evaluación y caracterización de cepas productoras de biosurfactantes	49
5.2.1.- Identificación de cepas	49
5.2.2.- Producción de biosurfactantes	51
5.2.3.- Selección de cepas productoras de biosurfactantes	53
5.2.4.- Pruebas de estabilidad de emulsión	55
5.2.5.- Biodegradación de surfactantes	58
5.3.- Solubilización de fracciones de hidrocarburos en suelo contaminado	59
5.3.1.- Hidrocarburos totales del petróleo	60
5.3.2.- Hidrocarburos alifáticos	63
5.3.3.- Hidrocarburos aromáticos	65
5.3.4.- Asfaltenos	67
5.3.5.- Hidrocarburos polares	70
5.4.- Eficiencia relativa de solubilización de HTP y sus fracciones con relación a la cantidad de surfactante empleado	71
5.5.- Biodegradación de HTP y sus fracciones en suelo contaminado	73
5.5.1.- Biodegradación de hidrocarburos totales del petróleo	73
5.5.2.- Biodegradación de hidrocarburos alifáticos	82
5.5.3.- Biodegradación de hidrocarburos aromáticos	85
5.5.4.- Biodegradación de hidrocarburos polares	88
5.5.5.- Biodegradación de asfaltenos	91
6.- CONCLUSIONES	96
7.- RECOMENDACIONES	97
8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
9.- ANEXO	104
Procedimiento para cálculo del balance de carbono	104
Glosario de términos	108

## INTRODUCCIÓN

La contaminación de nuestro entorno es uno de los grandes problemas actuales, se ha incrementado sobre base de la apertura comercial y el desarrollo industrial además de la continua síntesis de sustancias químicas asociadas a la actividad humana. El gran uso de estas, implica diversos riesgos ambientales como: derrames accidentales, roturas de contenedores, descargas residuales en agua, suelo o atmósfera causando la contaminación del entorno.

México se ha caracterizado por ser un país productor y procesador de hidrocarburos, desarrollo que ha jugado un papel importante en nuestra economía; desafortunadamente uno de los precios que ha pagado por dicho desarrollo es la contaminación. En la actualidad existen diversos problemas a los que enfrenta la industria petrolera, uno de ellos es la contaminación de los suelos; en donde actualmente se realizan grandes esfuerzos por prevenirla y mitigarla.

En México existe una creciente demanda de una vinculación más efectiva entre industria, ambiente y población, lo que ha promovido la legislación para el establecimiento de reglamentos que permitan minimizar sus impactos adversos.

Desde sus inicios, el problema de la contaminación ambiental se ha desarrollado principalmente en las zonas de mayor concentración humana, en especial en aquellas donde hay un mayor número de industrias. Muchas veces los impactos adversos por su operación y el no tratar sus descargas, ocasiona que haya acumulación de sustancias residuales.

En este sentido, diversas disciplinas científicas juegan un papel muy importante en la generación de ideas, a fin de aplicar el conocimiento y crear soluciones para mitigar los problemas de la contaminación.

Debido a la complejidad de algunos problemas ambientales, se hace necesaria la interacción de varias disciplinas, como en el caso de la biotecnología,

la cual se define como el uso de microorganismos y sus procesos para proveer beneficios económicos en la protección y restauración ambiental (Joshi, 1996).

Debido a lo anterior, el uso, la implementación y el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan hacer frente de una manera más eficiente los problemas de contaminación, es una necesidad actual. Por ejemplo, en los Estados Unidos de Norteamérica el Programa Nacional Prioritario de Sitios Contaminados ha elaborado un listado de lugares que consta de más de 1,200 sitios contaminados que requieren tratamiento; en algunos de estos lugares se han evaluado diversas tecnologías de remediación, en las que se aplica por lo menos un proceso biológico y su uso tiende a incrementarse (Joshi, 1996).

Muchas sustancias de origen antropogénico al ser vertidas en el suelo interaccionan con los componentes de estos, a través de diversos fenómenos fisicoquímicos (Dragun, 1998). Uno de los más importantes es el fenómeno que impide que las sustancias contaminantes estén disponibles para su degradación, en especial en aquellos sitios donde los contaminantes se encuentran intemperizados, situación en la cual las moléculas de alto peso molecular como los Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares (HAP), tienden a sorberse en el suelo.

Los derrames de hidrocarburos en el suelo ocasionan interacciones entre el suelo, aire y agua (superficial y freática). En el suelo ocurre una serie de fenómenos fisicoquímicos promovidos por el ambiente (intemperismo), de los cuales la sorción del contaminante en las partículas del suelo es uno de los retos a vencer por los procesos de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

El problema al que se enfrentan los microorganismos para degradar hidrocarburos es la baja disponibilidad de estos substratos dada su baja solubilidad en agua y su sorción en suelo, una estrategia es favorecer su solubilidad mediante diversos métodos, entre los que destaca el uso de

surfactantes. Recientemente se ha puesto atención al uso de biosurfactantes como alternativa “ecológica” para favorecer la disponibilidad de estos contaminantes (Deschens y col. 1996; Mriganka y col., 1995).

La finalidad de este trabajo fue estudiar las posibilidades de utilización de biosurfactantes como ayuda en la desorción y por ende en la biodegradación de hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAP), presentes en un sitio contaminado con hidrocarburos. Los microorganismos productores de biosurfactantes fueron aislados y seleccionados en el Instituto Mexicano del Petróleo.

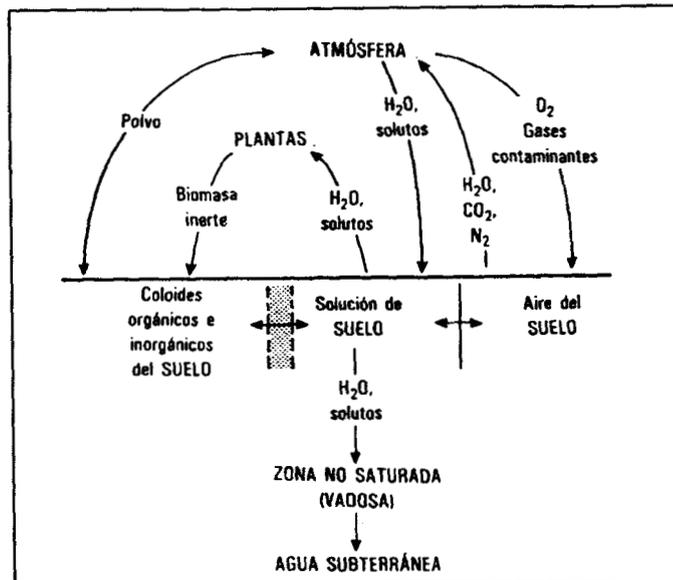
Se seleccionó y evaluó un biosurfactante, el cual fue utilizado en pruebas de solubilización de hidrocarburos y sus fracciones, se determinó su contribución en la remoción y biodegradación de los diferentes grupos de hidrocarburos, de manera especial la de los HAP, comparándolo con un surfactante sintético comercial de referencia.

## 1.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1.- Suelo

El suelo se define como una mezcla de materia mineral, orgánica, agua y aire. El volumen ocupado por cada uno de éstos, en un suelo superficial para condición ideal de desarrollo de plantas es aproximadamente: materia mineral (45%), materia orgánica (5%), agua (25%), aire (25%). Las proporciones de los componentes varían con el tiempo y de un lugar a otro. El volumen de agua y aire guardan una relación inversamente proporcional entre sí y aunque la entrada de agua elimina el aire, cabe señalar también que ese espacio puede ser ocupado por algún contaminante (Foth y Turk, 1979).

Todas las fases influyen entre sí, las reacciones de los sólidos afectan la calidad del agua y el aire, estos desgastan los sólidos y los microorganismos catalizan muchas de estas reacciones (Foth y Turk, 1979). Las interacciones químicas de los suelos con la atmósfera y el agua percolada, aunque difíciles de percibir, determinan en gran medida la composición de la atmósfera, del suelo y de las aguas subterráneas. Estas reacciones son importantes para limpiar el aire y el agua después de la contaminación natural y la percolada por el hombre (Bohn y col., 1993). La interacción entre los sólidos del suelo y su solución (solución acuosa que rodea a las partículas del suelo), es tan fuerte que parte del agua y de los iones presentes en la solución del suelo no pueden asignarse de manera definitiva a la solución o al sólido. La solución del suelo es la parte central ya que en esta tiene como función participar como intermediario en la mayoría de las reacciones del suelo a sus relaciones con organismos vivos y el medio (Bohn y col., 1993). Esto se ilustra en la figura 1.1, en donde se muestra que existe una relación íntima entre el suelo, agua y aire. Debido a las condiciones ambientales, ocurren una serie de reacciones que dan lugar al fenómeno de intemperización que afectan de manera adversa tanto la actividad fisicoquímica y biológica del suelo alterando con esto el ciclo natural de transferencia de masa.



**Figura 1.1.-** Ciclo de masa que se transfiere entre la atmósfera, biósfera, las 3 fases del suelo, la zona no saturada (vadosa) y el agua subterránea.

### 1.2.- Contaminación por hidrocarburos

Debido a la necesidad de encontrar soluciones idóneas a los diferentes problemas de contaminación de suelos por hidrocarburos y sus derivados, es necesaria la búsqueda de técnicas alternativas que favorezcan tanto los fenómenos naturales de degradación como las que faciliten la remoción de los contaminantes sorbidos en el suelo.

Al vertirse hidrocarburos en el suelo ocurren diversos fenómenos, en los cuales los compuestos solubles son lixiviados hacia el suelo contaminando el agua subterránea, las sustancias que no lixivian y se acumulan e interactúan con el suelo (Dragun, 1998), los principales fenómenos que se llevan a cabo son los siguientes:

- **Volatilización.-** Al ocurrir este fenómeno las sustancias químicas de menor punto de ebullición son liberados relativamente rápido, mientras que los compuestos de mayor punto de ebullición permanecen en el suelo contaminado.

- *Acumulación.*- Este fenómeno se presenta por la confinación de los hidrocarburos derramados y está relacionado con características del suelo como la textura, topografía del sitio, incluyendo principalmente las barreras físicas que impiden su dispersión radial y axial.
- *Degradación química y fotoquímica.*- La modificación molecular de algunos hidrocarburos vertidos al ambiente es provocada principalmente por reacciones de oxidación, mediante la incorporación de oxígeno ambiental. En el suelo existen diferentes tipos de sustancias con las que pueden reaccionar y formar y/o modificar la estructura original de algunos hidrocarburos. Adicionalmente se pueden dar modificaciones en la estructura química de algunas moléculas de hidrocarburos por la acción de la luz.
- *Biodegradación.*- Naturalmente en el suelo existen diversos tipos de microorganismos con diferentes capacidades metabólicas, algunos tipos de microorganismos presentes en el suelo tienen la capacidad de adaptar sus sistemas enzimáticos para poder utilizar hidrocarburos como fuente de carbono.

En síntesis, existen diversos fenómenos fisicoquímicos y biológicos que acompañan la presencia de hidrocarburos en suelos, las cuales están influenciados de manera directa por las características propias del suelo y la naturaleza de los hidrocarburos presentes (Atlas, 1984). Los hidrocarburos del petróleo contienen una variedad de sustancias químicas orgánicas; los químicos han agrupado los componentes de los hidrocarburos en tres grupos principales: alcanos o parafinas, alquenos e hidrocarburos aromáticos. En el petróleo crudo los alcanos son el mayor grupo químico, los productos que los contienen incluyen: gasolinas, diesel, turbosina y combustóleo, estos productos a su vez contienen tres clases principales de alcanos: de cadena lineal, ramificados y naftenos; los alcanos lineales tienen una conformación atómica de enlaces carbono-carbono de manera lineal en cadenas largas, a diferencia de los alcanos ramificados, cuya conformación molecular forma ramificaciones como las de un árbol. En los

naftenos, los átomos de carbono se agrupan formando estructuras cíclicas , las cuales pueden conformar moléculas desde dos hasta cinco o seis anillos (Dragun, 1998).

Los alquenos u olefinas son constituyentes no naturales del petróleo crudo; estos son formados por el proceso de refinación utilizados para la manufactura de productos comerciales. Los alquenos contienen al menos un enlace doble carbono-carbono. Los hidrocarburos aromáticos contienen al menos un anillo aromático con o sin algún sustituyente en el anillo bencénico, por ejemplo el benceno, tolueno, etil benceno y xileno (BTEX). Las fracciones pesadas del petróleo están formadas de moléculas de mayor complejidad por ejemplo polímeros de aromáticos, u otro tipo de moléculas de alto peso molecular como los hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAP), éstas moléculas son de interés ambiental. La presencia de hidrocarburos en el ambiente ocasiona diversos tipos de problemas, como los siguientes:

- Formación de una capa superficial a veces impermeable, que ocasiona una reducción importante en el intercambio natural de materiales entre el suelo y el entorno, pudiendo existir en las capas inferiores hidrocarburos menos intemperizados.
- Se sorbe con el suelo disminuyendo su disponibilidad para su recuperación y/o tratamiento.
- Las moléculas que forman parte de la fracción pesada son predominantemente de peso molecular elevado y de estructura compleja, por lo que su degradación es difícil.

Intemperismo es un término que se usa frecuentemente para describir los cambios en un petróleo derramado por efecto del ambiente. Esos cambios se refieren a cambios biológicos y no biológicos, que pueden ocurrir al mismo tiempo

(Atlas, 1984), estos procesos reducen las concentraciones de los constituyentes individuales de los hidrocarburos, este proceso puede producir cambios significativos, en la composición de los hidrocarburos (Steilljes y Watkin, 1993). Uno de los factores más importantes en el intemperismo es el fenómeno de la volatilización, cuya proporción depende de las condiciones ambientales y del tipo de hidrocarburo, ya que la velocidad de pérdida de hidrocarburos disminuye exponencialmente con el tiempo, y el material remanente es rico en ceras, asfaltenos y moléculas de mayor punto de ebullición que las sustancias volátiles; las pérdidas en peso por este fenómeno se encuentran entre 20 al 40%, (Atlas, 1984). Debido a las características fisicoquímicas de los HAP, estos prevalecen como parte de los residuales de hidrocarburos intemperizados, su presencia crea un riesgo a la salud pública y al ambiente, por lo que es necesario llevar a cabo acciones de remediación que reduzcan los niveles de concentración de los tóxicos, dentro de valores normativamente aceptables o, que minimicen su exposición al ambiente (Smith y col., 1994).

En suelos contaminados con hidrocarburos intemperizados, los HAP de alto peso molecular son fuertemente sorbidos en el suelo y son difíciles de degradar en un tratamiento de remediación en fase sólida, por lo que es necesario mejorar la velocidad de degradación y la eficiencia de remoción de estas sustancias (Deschenes y col., 1995).

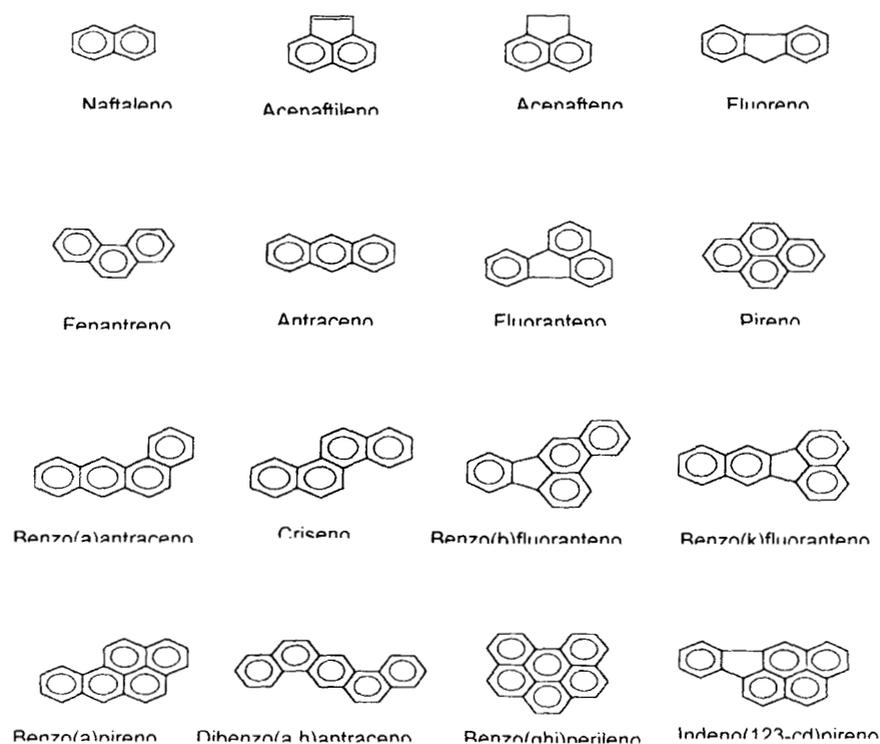
### *1.3.- Hidrocarburos poliaromáticos*

Los HAP, son sustancias que contienen carbono e hidrógeno, con los átomos de carbono arreglados en una serie de anillos bencénicos fusionados, algunos otros están constituidos con sustituyentes alquilo o como moléculas heterocíclicas que contienen oxígeno, nitrógeno o azufre. Los HAP, son compuestos formados por la unión de dos o más anillos aromáticos fusionados. Las actividades industriales asociadas a la generación de los HAP, incluyen las de la manufactura de gas, tratamiento de madera, manufactura de coke, refinación del petróleo, entre otros.

Los HAP se han encontrado en diversos sitios, los cuales se han distribuido en términos de concentración, en las siguientes áreas: urbanas mayor que en la agricultura y esta a su vez es mayor al área rural (Smith y col., 1994).

Los HAP se encuentran presentes en el petróleo crudo entre un 1 a un 2 % en peso, sus concentraciones dependen de su fuente geológica, también se encuentran en productos refinados tales como: gasolina, queroseno, diesel y aceite de motor (Research Triangle Institute, 1995).

En la figura 1.2 se muestran 16 hidrocarburos aromáticos polinucleares, los cuales debido a su potencial tóxico agudo y crónico son asociados primeramente con HAP de bajo peso molecular, mientras que el potencial carcinogénico se asocia con HAP de alto peso molecular. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (EPA) ha designado los 16 HAP como los más importantes en términos ambientales y como representativos de este grupo de sustancias.



**Figura 1.2.-** Estructura molecular de los principales hidrocarburos aromáticos polinucleares de interés ambiental

En general los HAP muestran baja volatilidad y baja solubilidad en agua comparados con los aromáticos como benceno, tolueno y xileno, ambas propiedades disminuyen cuando se incrementa el número de anillos (peso molecular); estas son las características que tienen una gran influencia en la remoción de HAP en suelos y sedimentos via biorremediación. Los HAP mostrados en el listado de la tabla 1.1, corresponden al grupo de mayor atención por agencias de regulación federales y estatales en los EUA y Canada (Smith y col., 1994).

Tabla 1.1.- Propiedades de los 16 HAP de interés ambiental.

HAP	Solubilidad máxima (mg/l)	Constante de Henry (atm·m <sup>3</sup> /mol)	Log del coeficiente de partición octanol-agua: (LOG K <sub>ow</sub> )	Categorización de los mecanismos de destino <sup>a</sup>		
				V	SOR	B
<i>2 anillos</i> Naftaleno	3 X 10 <sup>-1</sup>	4.83 X 10 <sup>-4</sup>	3.37	T	S	P
<i>3 anillos</i> Acenafteno	3.42	2.41 X 10 <sup>-4</sup>	3.92	T	S	P
Acenaftileno	3.93	1.14 X 10 <sup>-4</sup>	4.07	T	S	P
Antraceno	1.29	8.60 X 10 <sup>-5</sup>	4.45	T	S	P
Fluoreno	1.90	1.17 X 10 <sup>-4</sup>	4.18	T	S	P
Fenantreno a 21°C	8.16 X 10 <sup>-1</sup>	3.93 X 10 <sup>-5</sup>	4.46	T	S	P
<i>4 anillos</i> Benzo(a)antraceno 24 °C	1 X 10 <sup>-2</sup>	1.16 X 10 <sup>-6c</sup>	5.61	NE	S	P
Criseno	6 X 10 <sup>-3</sup>	1.05 X 10 <sup>-6</sup>	5.61	NE	S	P
Fluoranteno	2.65 X 10 <sup>-1</sup>	6.50 X 10 <sup>-6</sup>	5.33	NE	S	P
Pireno a 26 °C	1.60 X 10 <sup>-1</sup>	5.10 X 10 <sup>-6</sup>	5.18	NE	S	P
<i>5 Anillos</i> Benzo(a)pireno	3.8 X 10 <sup>-3</sup>	4.90 X 10 <sup>-7</sup>	5.98	NE	P	S
Benzo(b)fluoranteno	1.4 X 10 <sup>-2c</sup>	1.19 X 10 <sup>-5c</sup>	6.57	NE	P	S
Benzo(k)fluoranteno	4.3 X 10 <sup>-3c</sup>	3.94 X 10 <sup>-5c</sup>	6.84	NE	P	S
Dibenzo(a,h,)antraceno	5 X 10 <sup>-4</sup>	7.30 X 10 <sup>-8</sup>	5.97	NE	P	S
<i>6 anillos</i> Benzo(g,h,i)pireleno	2.60 X 10 <sup>-4</sup>	5.34 X 10 <sup>-8c</sup>	7.33	NE	P	S
Indeno(1,2,3-cd)pireno	5.30 X 10 <sup>-4c</sup>	6.95 X 10 <sup>-8</sup>	7.66	NE	P	S

Notas:

- a.- Datos tomados de la U.S. EPA (1992). Todos los datos son a 25 °C, a excepción de los que se especifican
- b.- En términos del comportamiento esperado: V = volatilización, SOR = proceso de sorción, B = biodegradación. En términos de categoría competitiva: P = primario, S = secundario, T = terciario; NE = comportamiento no esperado
- c.- Datos tomados de la U.S. EPA (1986)

Las características fisicoquímicas de los HAP tienen influencia directa en su sorción, en cambio cuando se encuentran solubles tienden a volatilizarse y/o a ser biodegradados. Con base a lo anterior en la tabla 1.2 los HAP se clasifican con base a los tres mecanismos ambientales fundamentales: volatilización, sorción, biodegradación, los cuales a su vez se encuentran categorizados como: mecanismos primarios, secundarios y terciarios responsables de la reducción de los HAP, que pueden ocurrir durante el tratamiento de un suelo o sedimento contaminado (Smith y col., 1994).

Existe una tendencia de los HAP a permanecer sorbidos en la matriz suelo/sedimento al aumentar su peso molecular (aumento en el número de anillos), esta tendencia los hace menos biodisponibles, dificultando su degradación; en solución, los HAP de 2 y 3 anillos pueden volatilizarse, pero este mecanismo se da en menor proporción comparado con la sorción y biodegradación, por lo que los datos mostrados en las últimas 3 columnas de la tabla 1.2, están basados en las tendencias generales observadas en campo donde los procesos de sorción son más dominantes que la biodegradación de los HAP; esto ha sido particularmente observado en materiales intemperizados y en materiales constituidos por 10 al 20% de arenas finas: arcillas y limos (Smith y col., 1994).

Actualmente los métodos principales para el tratamiento de suelos contaminados con HAP es mediante la combustión térmica y la extracción de suelos. En el primer caso, los HAP se volatilizan del suelo elevando su temperatura hasta 500 °C, para después ser completamente oxidados en otro incinerador. En el segundo caso, los contaminantes son removidos del suelo por agentes extractantes (solventes miscibles en agua), el suelo es separado en partículas limpias (arenas) del agente extractor contaminado (lodo). Ambos son procesos costosos, por lo tanto los métodos microbiológicos son una posible alternativa para tratar los contaminantes del suelo, ya que son procesos

generalmente mas económicos y relativamente sencillos de llevar a cabo respecto a los no biológicos (Kotterman, 1998).

### Biodegradación de HAP

Los HAP de bajo peso molecular son fácilmente degradados por varios tipos de microorganismos, sin embargo la velocidad de degradación se reduce al aumentar su peso molecular. Las diferencias de biodegradación de los HAP pueden explicarse por su solubilidad en agua, existiendo una correlación inversa entre la solubilidad y la biodegradación. Muchos estudios han demostrado que las bajas velocidades de disolución de los HAP limita la asimilación y degradación por bacterias (Volkering y col., 1992).

Los procedimientos de remediación biológica se han desarrollado para degradar diferentes tipos de sustancias contaminantes en el suelo, procesos que han mostrado factibilidad tanto técnica como económica; este tipo de tratamientos estan basados en la habilidad de los microorganismos del suelo para degradar diversos tipos de sustancias, bajo condiciones controladas de humedad, aireación y nutrientes (labranza); sin embargo se ha observado que los HAP no son suficientemente degradados aún en las condiciones más favorables en un sistema de labranza (Landfarming) (Volkering y col., 1992).

En otro trabajo realizado en reactores de lodos, se utilizó suelo contaminado con HAP (30% p/v), con la adición de nutrientes y microorganismos degradadores, logrando una biodegradación promedio del 93.4% de los HAP 2 a 6 anillos presentes de, predominando la degradación de los HAP de bajo peso molecular, por lo que fue necesaria una optimización en su eficiencia y costo (Research Triangle Institute, 1995).

Se han llevado a cabo investigaciones respecto a la degradación de los HAP individuales bajo condiciones de crecimiento por cometabolismo o cooxidación (adición de una fuente de carbono suplementaria para energia,

síntesis y crecimiento celular), mineralización parcial a CO<sub>2</sub> utilizando HAP (de 3, 4 y 5 anillos), radiotrazados. En otros estudios los HAP individuales (pireno y fluoranteno), fueron utilizados por los microorganismos como fuente de carbono y energía (Smith y col., 1994).

En la degradación de los HAP en ecosistemas acuáticos y terrestres, tanto los microorganismos eucariontes y procariontes tienen la capacidad enzimática para oxidar sustratos aromáticos desde el benceno al benzo(a)pireno. Las bacterias oxidan inicialmente los hidrocarburos aromáticos por la incorporación de dos átomos de oxígeno para formar un dihidrodiol con una configuración *cis*, esta reacción es catalizada por una dioxigenasa la cual es un sistema enzimático multicomponente, que consiste en una flavoproteína, una proteína que contiene hierro y azufre y una ferredoxina. La posterior oxidación de los *cis*-dihidrodiolos tienden a la formación de catecoles que son sustratos para otras dioxigenasas que realizan una fisión enzimática del anillo aromático. En contraste, se sabe que algunos hongos como la *Yarrowia lipolytica* oxidan los hidrocarburos aromáticos via citocromo P-450 catalizando reacciones donde intervienen monooxigenasas, las monooxigenasas catalizan la primera reacción del catabolismo de hidrocarburos alifáticos (Scheller y col., 1998); las dioxigenasas dependientes de NAD, catalizan la primera reacción del catabolismo de hidrocarburos aromáticos, formando los *cis*-dihidrodiolos; los cuales son transformados a dioles por las alcohol deshidrogenasas y el diol es escindido por la acción de otra dioxigenasa no dependiente de NAD, (que rompe el anillo), para continuar por la ruta de los catecoles (Gibson y Parales, 2000), esto se muestra en la figura 1.3; estas reacciones son similares a aquellas reportadas en sistemas enzimáticos en mamíferos, (Cerniglia, 1981).

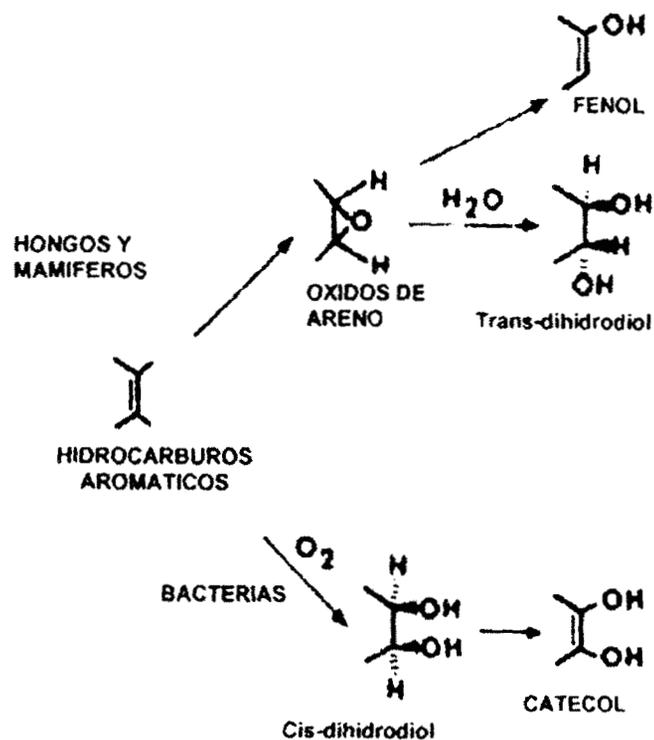


Figura 1.3.- Vías metabólicas de oxidación de hidrocarburos aromáticos por microorganismos procariontes y eucariontes.

En el caso de los hidrocarburos poliaromáticos se conocen rutas metabólicas similares sobre todo en los primeros pasos, por ejemplo para la degradación del naftaleno las bacterias inicialmente oxidan el naftaleno por la incorporación de ambos átomos de oxígeno molecular en la molécula aromática para formar el cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno, el segundo paso es la conversión del cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno en el 1,2-dihidroxinaftaleno, en la figura 1.4 se muestra la degradación de la molécula del naftaleno a catecol por parte de bacterias.

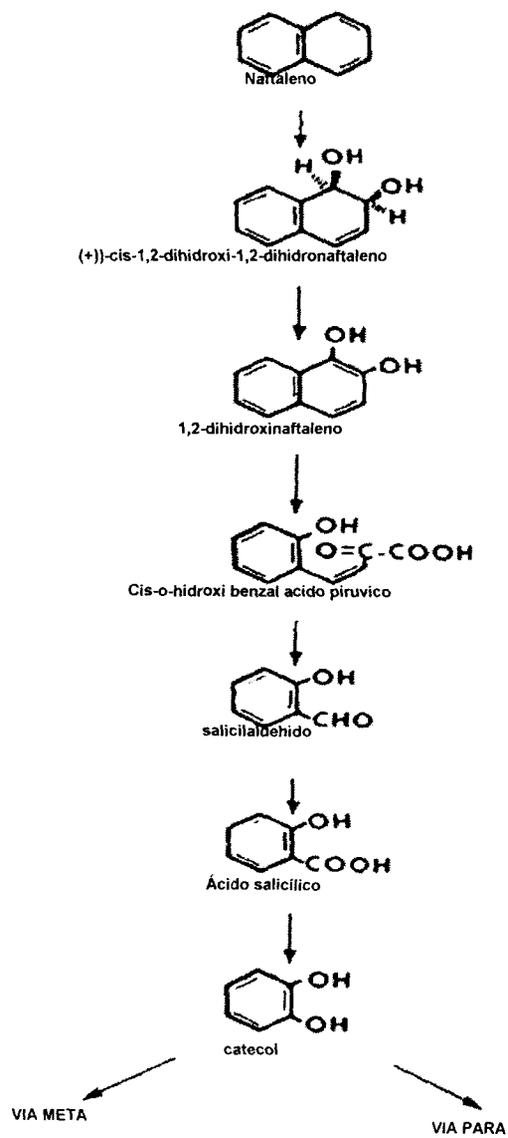


Figura 1.4.- Via metabólica bacteriana para la oxidación de naftaleno a catecol.

En el caso de la oxidación del fenatreno se han realizado diversos trabajos con bacterias y muy pocos con hongos (Cerniglia, 1981), las diferentes vías metabólicas descritas en bacterias para la degradación de fenetreno, se muestran en la figura 1.5.

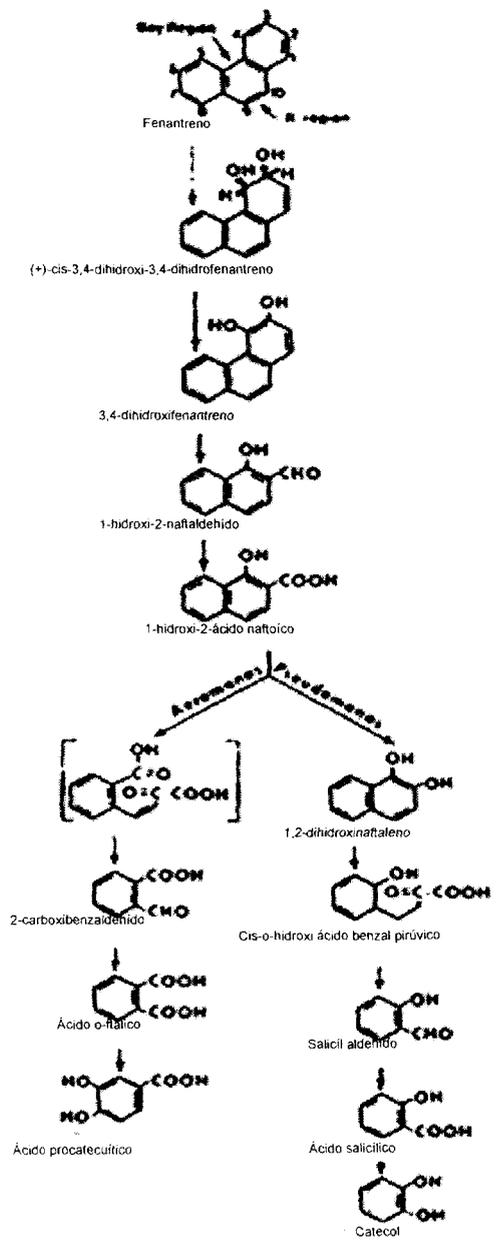


Figura 1.5.- Vías metabólicas para la biodegradación de fenantreno por bacterias

Para el caso de poliaromáticos de más de tres anillos una de las moléculas más estudiadas es el benzo(a)pireno, ya que se ha encontrado en diversos sitios contaminados con HAP, activado metabólicamente es potencialmente citotóxico mutagénico y carcinogénico.

No se ha reportado que cultivos puros o consorcios bacterianos tengan la capacidad de utilizar anillos aromáticos como fuentes de carbono y energía. Esto es debido a su gran tamaño y a la extrema insolubilidad de HAP como el benzo(a)pireno ó benzo(a)antraceno en medio acuoso. Sin embargo, las bacterias pueden oxidar HAP cuando se desarrollan con un sustrato alterno (Cerniglia, 1981). Cuando *Beijerinckia sp.* B-386 crece con succinato en presencia de bifenilo, puede convertir el benzo(a)pireno a una mezcla de *cis*-9,10-dihidroxi-9,10-dihidrobenzo(a)pireno y *cis*-7,8-dihidroxi-7,8-dihidrobenzo(a)pireno (Gibson y col., 1975). Un ejemplo de esto es mostrado en la figura. 1.6, en la cual se ilustra la transformación del benzo(a)pireno por *Bijerinckia sp* B-136.

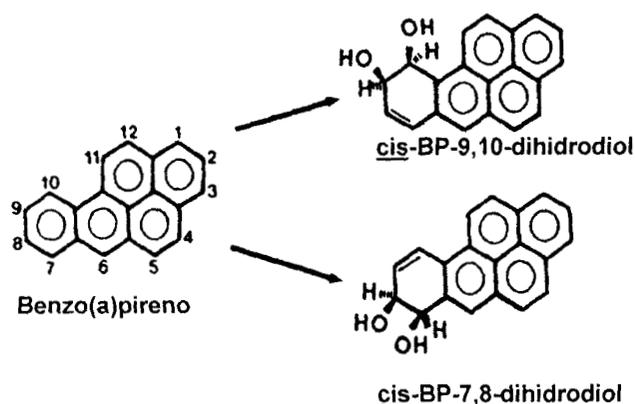


Figura 1.6.- Transformación del benzo(a)pireno por *Bijerinckia sp* B-136

Uno de los principales inconvenientes de la contaminación por HAP en suelo es su sorción con partículas del suelo principalmente con el humus, por lo que su disponibilidad (referida a los mecanismos que afectan la presencia de una sustancia en el medio), se ve disminuida y por lo tanto se requiere diseñar mecanismos que permitan aumentar su disponibilidad.

#### 1.4.- Biodisponibilidad de contaminantes

La biodisponibilidad es definida como el potencial de los microorganismos para degradar un químico, también como la accesibilidad de un compuesto químico a la degradación microbiana (Gutiérrez-Rojas, 2000).

La sorción de los HAP en la materia orgánica, tanto la materia original (humus) y la orgánica introducida por el hombre (carbón, hollín), también reduce la biodisponibilidad y la biodegradación. La sorción de los HAP en la materia orgánica depende de la hidrofobicidad, así como de su concentración, estructura química y distribución de la materia orgánica en la matriz de suelo (Kotterman, 1998).

La observación de que los HAP intemperizados son degradados mas lentamente y en menor grado que los contaminantes frescos, es generalmente atribuido al secuestro de los HAP en la materia orgánica, seguido de una lenta desorción. Adicionalmente pueden ser atrapados en los agregados de partículas del suelo y entre los poros, lo que ocasiona una difusión lenta de estos contaminantes (Kotterman, 1998).

Para incrementar la velocidad de degradación bacteriana de los HAP de alto peso molecular se debe incrementar la biodisponibilidad. Entre los métodos para lograrlo se encuentra la adición de solventes miscibles en agua o incrementando la temperatura, sin embargo a gran escala existen serias limitaciones. Las investigaciones se han enfocado al uso de surfactantes para aumentar la biodisponibilidad, estas sustancias forman micelas a valores mayores o iguales de la concentración micelar crítica (CMC). La CMC es la concentración de surfactante mínima necesaria para la formación de micelas, en un sistema compuesto de solvente, surfactante, en algunos casos otros solutos en un ambiente físico definido. Las micelas son un arreglo espacial de moléculas de surfactante en solución. Una ilustración del modo de acción de los surfactantes se muestra en la figura 1.7.

En soluciones diluidas cercanas a la CMC las micelas son esféricas. En otras condiciones, los materiales micelares pueden tomar otras formas como: vesículas (doble capa), esferoides, etc., dependiendo del surfactante, la concentración de sales y las condiciones ambientales como la temperatura, por lo que un solo surfactante puede tomar diferentes estructuras micelares

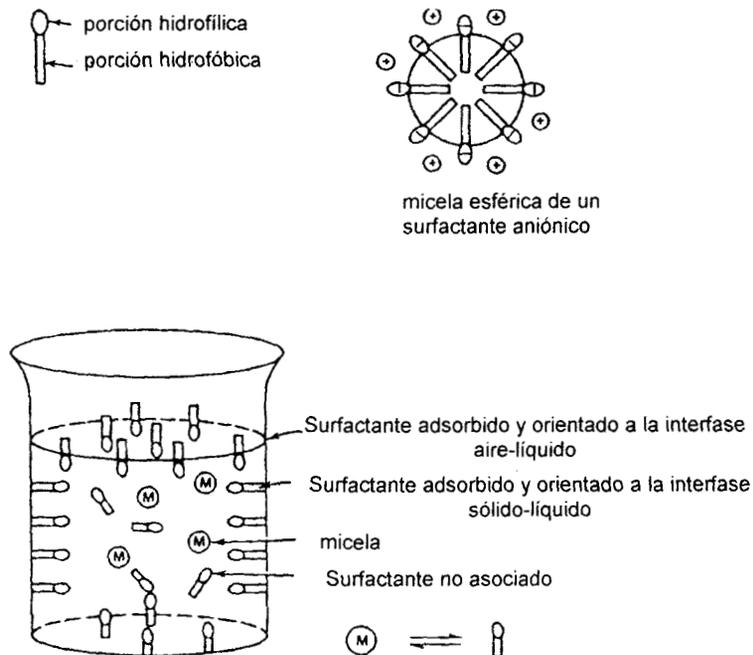


Figura 1.7.- Representación de una solución de surfactante aniónico en equilibrio a concentración arriba de la CMC

Por lo tanto, en las micelas, los HAP se pueden atrapar aumentando la concentración aparente y en algunos casos la biodegradación se favorece; sin embargo, los HAP en las micelas no siempre están biodisponibles para el ataque microbiano (Volkering y col., 1995), mas aún a concentraciones arriba de la CMC, los surfactantes pueden ser tóxicos a las bacterias degradadoras (Tumeo y col, 1994), ocurriendo que en ocasiones, los surfactantes no tóxicos son antes que los contaminantes. Además, los surfactantes también tienden a sorberse en el

suelo, incrementando con esto la cantidad de surfactante exógeno necesario (Liu y col., 1992).

El efecto de los surfactantes sobre la disponibilidad de compuestos orgánicos puede ser explicada por tres mecanismos principales:

1. Aumentando la dispersión de los hidrocarburos en la fase líquida debido a un aumento del área de contacto: microorganismos degradadores-contaminantes, este fenómeno es provocado por la reducción en la tensión interfacial entre la fase no acuosa y la acuosa.
2. Incremento en la solubilidad aparente del contaminante provocada por la presencia de micelas, que pueden contener los compuestos orgánicos hidrofóbicos.
3. Facilita el transporte del contaminante de la fase sólida a la fase acuosa, a través de diferentes fenómenos tales como la disminución en la tensión superficial del agua intersticial en las partículas del suelo, interacción del surfactante con la interfase sólida y la interacción del contaminante con moléculas de surfactante (Volkering y col., 1995).

#### *1.5.- Biosurfactantes.*

Los biosurfactantes son moléculas con propiedades superficiales producidos por microorganismos, plantas y animales y tienen la capacidad de reducir la tensión superficial del medio líquido, son exopolímeros principalmente producidos por bacterias bajo condiciones de crecimiento limitadas, por ejemplo altas relaciones C:N; limitación en la concentración de hierro (Gutiérrez-Rojas, 2000).

Los biosurfactantes son producidos por una gran variedad de microorganismos: bacterias, levaduras, hongos, actinomicetos y a partir de diferentes fuentes de carbono tanto solubles e insolubles en agua, ejemplos de estos se muestran en la tabla 1.2

Tabla 1.2.- Estructura, propiedades físicas y niveles de producción de biosurfactantes de origen microbiano.

BIOSURFACTANTE	MICROORGANISMO	FUENTE DE CARBONO	TS * (mN/m)	TI ** (mN/m)	CMC***	CONC. EN EL MEDIO
GLICOLIPIDOS	<i>Rhodococcus auranticus</i>	n-alcanos	26	0.35	NA	400 X CMC
GLICOLIPIDOS	<i>Rhodococcus sp.</i>	Hexadecano	NA	0.02	1.5 mg/l	660 mg/l
GLICOLIPIDOS	<i>Tourolopsis apicola</i>	Alcanos/ carbohidratos	30	< 0.9	NA	4.1XCMC
RAMNOLIPIDOS	<i>Pseudomonas aurogenosa</i>	Glucosa	29	25	NA	38-77 g/l
RUBIWETTINA	<i>Serratia rubidea</i>	Glicerol	25.5-25.8	NA	10 mg/l	NA
SOFOROLIPIDOS	<i>Tourulopsis bombicola</i>	Glucosa/ac. oleico	33	1.8	NA	38-77 g/l
LIPOPEPTIDOS	<i>Bacillus licheniformis JF2</i>	Glucosa	27	0.016	0.02 mg/l	0.1-0.7 g/l
LIPOPEPTIDOS	<i>Bacillus licheniformis 86</i>	Glucosa	27	0.36	10 mg/l	20 mg/l
VISCOSINA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Glicerol	26.5	NA	150 mg/l	NA
SERRWETTINA	<i>Serratia marcescens</i>	Glicerol	28.8-33.9	NA	NA	NA
SURFACTINA	<i>Bacillus subtilis</i>	Glucosa	27 - 32	1	23-160 mg/l	20-240XCMC
ACIDOS GRASOS	<i>Corynebacterium lepus</i>	Queroseno/ alcanos	< 30	2	150 mg/l	150 mg/l
AC. GRASOS + LIPIDOS NEUTROS	<i>Nocardia erytropolis</i>	Hexadecano	32	< 3	NA	160XCMC
COMPLEJOS: PROTEINA-CARBOHIDRATO	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sacarosa	27	NA	< 10 mg/l	210XCMC
FOSFATIDILETANOL-AMINA	<i>Rhodococcus erytropolis</i>	n-alcanos	30	< 1	30 mg/l	NA
FOSFATIDILETANOL-AMINA	<i>Corinebacterium insidiosum</i>	Hexadecano	28.5	0.55	NA	25XCMC

\* TS = Tensión superficial

\*\* TI = Tensión interfacial

\*\*\* CMC = Concentración micelar crítica.

### 1.5.1.- Estructura química

Estructuralmente estas moléculas están formadas de una porción hidrofóbica, que consta de uno o más ácidos grasos de cadena larga, combinado con un extremo hidrofílico; como por ejemplo una molécula de proteína, azúcar, derivados de ésteres, grupos funcionales de alcohol de lípidos neutros, grupos carboxilo de ácidos grasos o aminoácidos, así también las porciones que contienen fosfatos de los fosfolípidos y los carbohidratos en los glicolípidos. Las propiedades físico-químicas más importantes de los biosurfactantes son las que permiten tomarse como criterio para su búsqueda y selección (Finnerty, 1994); a continuación se detallan las más útiles:

- Sorción en partículas de suelo.- Los surfactantes tienden a interactuar con las partículas del suelo en donde pueden ser sorbidos y por lo tanto su concentración disminuye en el medio circundante.
- Precipitación por iones.- Debido a sus características moleculares los biosurfactantes pueden ser precipitados por la acción de iones, por ejemplo: surfactantes de origen proteínico pueden precipitarse con sales de amonio.
- Estabilidad del surfactante en la matriz de suelo.- Esta propiedad es importante en los surfactantes, ya que al interactuar con los componentes del suelo y el medio circundante, (por ejemplo a diferentes valores pH, temperatura) la estabilidad del surfactante debe permanecer inalterada para una mejor actividad superficial.
- Toxicidad y persistencia en el ambiente.- Los biosurfactantes en muchos casos son menos tóxicos que los surfactantes de origen sintético además de ser biodegradables.

### 1.5.2.- Tipos de biosurfactantes

De acuerdo a los constituyentes y el tamaño de la molécula que conforman los surfactantes existen diferentes tipos de biosurfactantes: polisacáridos, lípidos o complejos que contienen dos o más tipos de moléculas, de acuerdo a dicha clasificación se tienen los siguientes tipos de biosurfactantes (Kosaric y col., 1987).

**1.- Glicolípidos.-** Son carbohidratos combinados con ácidos grasos alifáticos o ácidos hidroxi-alifáticos, son los más comunes, pueden ser aniónicos, no iónicos y extracelulares; En la figura 1.8 se muestran dos ejemplos de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas*.

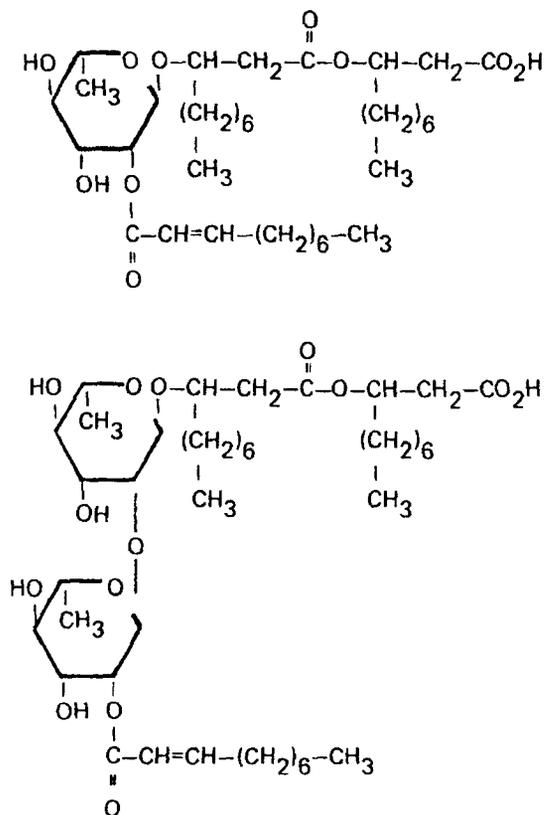


Figura 1.8.- Dos glicolípidos con 1 o 2 unidades de ramnosa de *Pseudomonas*

**2.- Ácidos Grasos.-** Estos son los principales constituyentes de los lípidos, se encuentran en todos los microorganismos y se dividen en 4 grupos principales: cadena lineal, ramificados, insaturados y derivados del ciclopropano, figura 1.9.

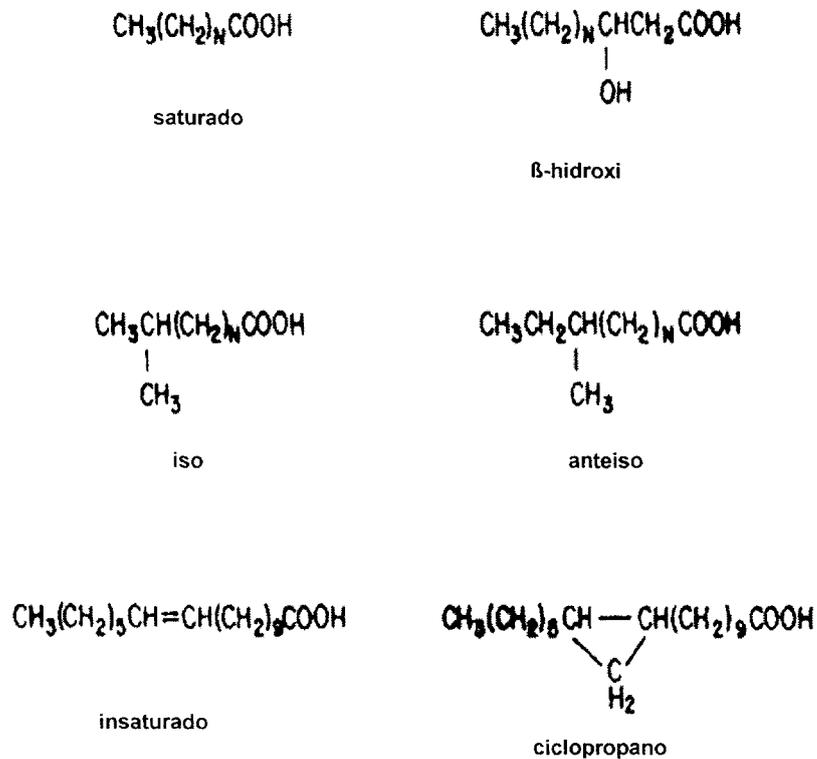


Figura 1.9.- Tipos de ácidos grasos en microorganismos

**3.- Fosfolípidos.-** Son los principales componentes de las membranas microbianas; aunque estos se encuentran en todos los microorganismos, solo algunos de ellos los producen en cantidades significativas; están formados por glicerol que unido a 2 ácidos grasos y un grupo fosfato (Figura 1.9).

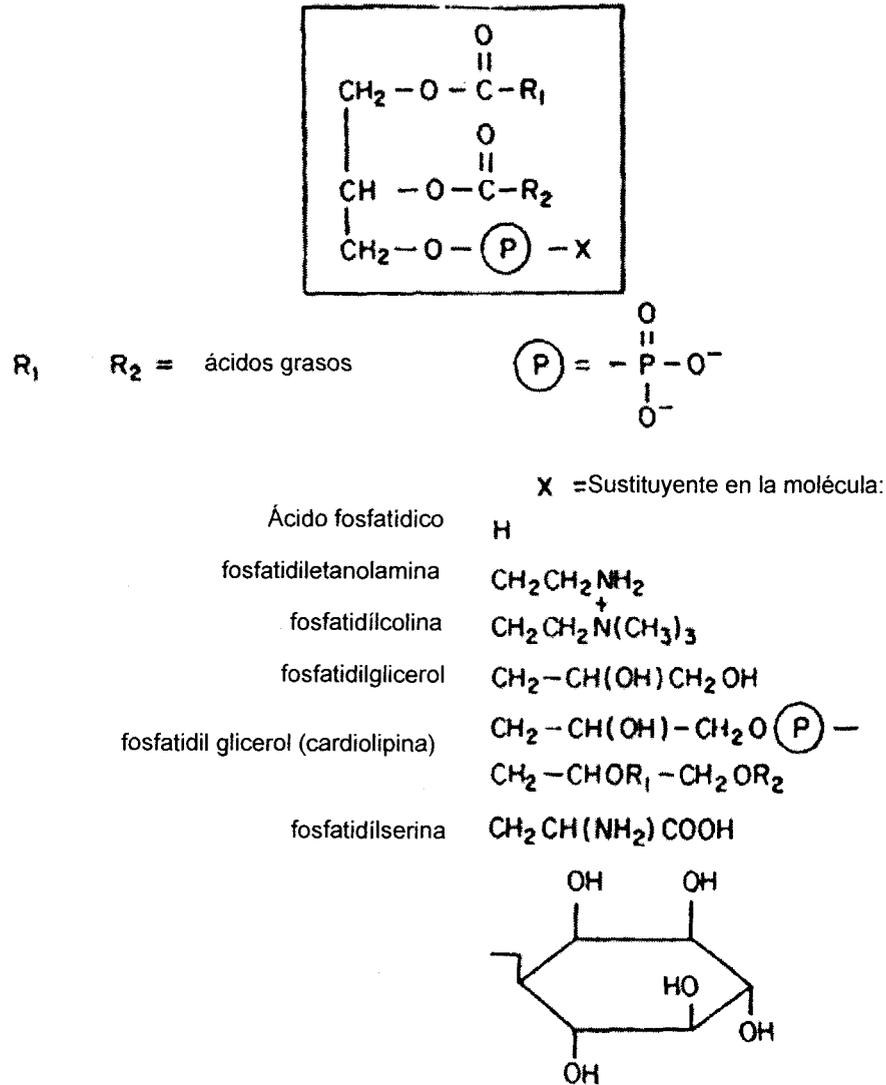


Figura 1.9.- Representación de diferentes fosfolípidos comunes en bacterias de acuerdo con el sustituyente.

**4.- Antibióticos con actividad superficial.-** Los antibióticos son metabolitos naturales extracelulares (metabolitos secundarios), producidos por una variedad de microorganismos, muchos tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial, algunos ejemplos son mostrados en la tabla 1.3.

Tabla 1.3.- Antibióticos que poseen actividad superficial

ANTIBIÓTICO	PRODUCIDO POR	ACTIVIDAD
A-3302	<i>Bacillus subtilis</i>	Antibacteriana
Actinobolina	<i>Sterptococcus grisovirides</i>	Antibacteriana
Bacilisina	<i>Bacillus subtilis</i>	Antibacteriana
Bacitracina	<i>Bacillus licheniformis</i>	Antibacteriana
Edeines	<i>Bacillus brevis</i>	Antibacteriana
Esperina	<i>Bacillus mesentericus</i>	Antibacteriana
Gramicidina A, B	<i>Bacillus brevis</i>	Bactericida
Gramicidina S	<i>Bacillus brevis</i>	Antibacteriana
Micobacilina	<i>Bacillus subtilis</i>	Antifúngico
Octapeptins	<i>Bacillus circulans</i>	Antibaceteriana
Fosforamidon	<i>Staphilococcus tanashiensis</i>	Inhibidor de proteinasa
Polimixina	<i>Bacillus polimixa, Bacillus colistinus, Bacillus circulans</i>	Antibacteriana
Polipeptina	<i>Bacillus circulans</i>	Antibacteriana
Subtilina	<i>Bacillus subtilis</i>	Antibacteriana
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Inhibidor de la coagulación en la reacción trombina-fibrinógeno

**5.- Biosurfactantes Poliméricos.**- Son derivados de polisacáridos de proteínas o lípidos, son mezclas complejas que contienen proteína, lípidos y carbohidratos. Se ha encontrado un complejo lípido polisacárido aislado de la pared celular de *Candida tropicalis* que sirve de enlace con los substratos de hidrocarburos en su metabolismo.

**6.- Lipoproteínas y lipopéptidos.**- Contienen aminoácidos, glucosa y ácidos grasos (Figura 1.10), no reducen la tensión superficial de manera apreciable (Kosaric, 1987), pero actúan mediante una unión fuerte a la interfase agua-

hidrocarburos, tienen muchos puntos de contacto con las gotas de hidrocarburos, evitando la coalescencia (Francy, 1991)

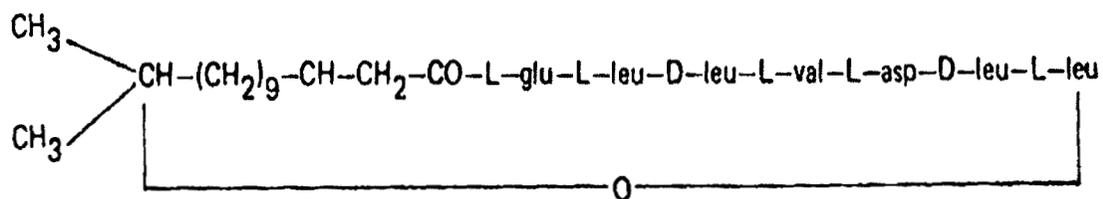


Figura 1.10.- Lipopéptido, surfactina de *Bacillus subtilis*

También se ha encontrado actividad superficial en suspensiones de algunos microorganismos, principalmente en productores de biosurfactantes, ya que contienen en su superficie grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. Las suspensiones celulares tienen la propiedad de reducir la tensión superficial e interfacial (Francy, 1991).

## 2.- JUSTIFICACION

Los suelos contaminados con hidrocarburos intemperizados generalmente son ricos en moléculas capaces de persistir en el ambiente o en su caso transformarse a otras, un ejemplo de estos son los hidrocarburos poliaromáticos (HAP), cuya persistencia en el ambiente, su elevada toxicidad, su potencial mutagénico y carcinogénico, ha realizado la necesidad de llevar a cabo estudios que permitan mejorar su tratamiento.

Los HAP están presentes en suelos en sitios de disposición de desechos, tales como: la conservación de madera, procesamiento del petróleo, desechos aceitosos, sitios de proceso gasificación de carbón (Harayama, 1997).

Debido a las propiedades fisicoquímicas de los HAP, como son una baja solubilidad en agua, toxicidad microbiana y una alta sorción sobre la materia orgánica del suelo, los procesos de biorremediación como el composteo, digestión anaerobia, entre otros, han resultado con una baja eficiencia de remoción por lo que es necesaria la búsqueda de técnicas alternativas que favorezcan la biodisponibilidad y la degradación de estas sustancias (Martens y Frankenberger, 1995).

Existe especial interés por el tratamiento adecuado de los HAP presentes en sitios contaminados con petróleo, ya que su persistencia ambiental es nociva por sus efectos adversos hacia los seres vivos. Una alternativa es la búsqueda y evaluación de aditivos que incrementen la biodisponibilidad de dichos contaminantes, con la finalidad de que sean utilizados como base de un bioproceso que permita degradar los HAP de manera más eficiente; como excelentes candidatos, están los biosurfactantes, los cuales poseen características fisicoquímicas y biológicas similares o superiores a los fabricados sintéticamente.

### **3.- OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Demostrar la efectividad relativa a surfactantes sintéticos, del biosurfactante producido por una cepa bacteriana, en la biodegradación de la fracción aromática en un suelo contaminado por hidrocarburos.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Seleccionar un suelo con base a sus características de contaminación.
- Seleccionar un biosurfactante y un surfactante de referencia con base en sus propiedades de: actividad emulsificante, lavado de suelo, estabilidad de emulsión.
- Evaluar el efecto de los surfactantes en la solubilización selectiva de cada fracción de los contaminantes presentes en suelo contaminado, en especial la fracción aromática.
- Evaluar la toxicidad de biosurfactantes sobre un consorcio microbiano degradador de hidrocarburos.
- Evaluar la biodegradación de la fracción aromática en suelo contaminado, en presencia de un biosurfactante.

#### **HIPÓTESIS**

Es posible favorecer la biodisponibilidad de la fracción aromática, por medio de biosurfactantes en un suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos.

## **4.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Reactivos**

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron grado reactivo y los disolventes fueron grado HPLC. El Tritón X100 y el Tergitol NP-10, provienen de Sigma Chemical Co.

### **4.1.- Selección del suelo contaminado**

#### **4.1.1.-Localización de suelos y caracterización**

La zona de muestreo de suelos contaminados se definió en el estado de Tabasco, esto se debió a que en ésta se desarrollan diferentes actividades petroleras como lo son: la extracción, transporte, almacenamiento y procesamiento de hidrocarburos. Se ubicaron 4 locaciones que tuvieran como problemática común estar contaminadas con derrames de hidrocarburos por lo menos con más de dos años de haber ocurrido.

La localización de 3 de las zonas en el estado de Tabasco en donde se colectaron las muestras se ilustran en la figura 4.1, la muestra restante se localizó en la zona metropolitana de la Ciudad de México. Se colectaron muestras con un peso de 1 Kg de muestra compuesta.

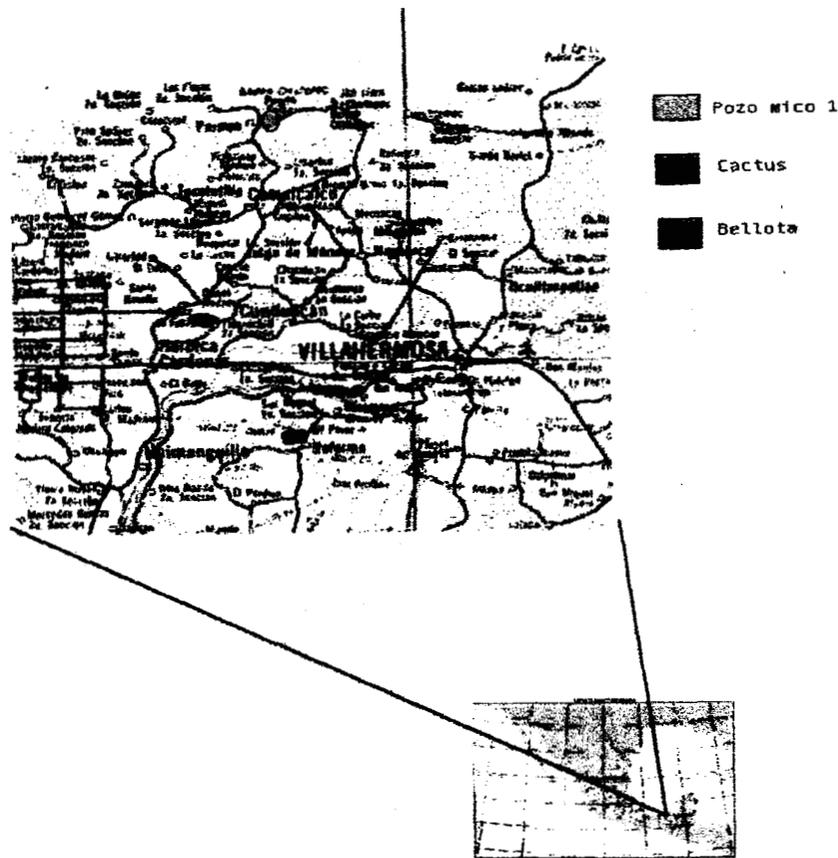


Figura 4.1. Localización de zonas de muestreo.

El análisis fisicoquímico de las muestras colectadas, relacionados con la contaminación por hidrocarburos, se presentan en la tabla 4.1.

Tabla 4.1.- Análisis realizado a muestras de suelo.

PARÁMETRO	MÉTODO/INFORMACIÓN
Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPH'S)	EPA 3540 Extracción sólido-líquido de compuestos orgánicos semivolátiles y no volátiles en suelo y sedimentos (gravimétrico).
Concentración de Hidrocarburos Poliaromáticos (HAP)	Fraccionamiento por cromatografía en columna y análisis gravimétrico (Douglas y col. 1981).
Textura de Suelos	Método de Bouyucos (Kunze y Dixon, 1986)
Materia Orgánica	Método de Walkey-Black (Jackson, 1976)

#### 4.1.2.- Selección de suelo

Los criterios utilizados para la selección del suelo contaminado se muestran en la tabla 4.2.

Tabla 4.2.- Criterios de selección de suelos contaminados

<b>CRITERIO</b>	<b>VALORES/CRITERIO</b>
Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP)	Mayor a 100 000 mg/kg.
Concentración de Hidrocarburos Aromáticos (HAP)	Mayor a 10 000 mg/kg
Grado de Intemperismo (años)	Mayor a 5 años
Materia Orgánica	Menor del 10 %

Los valores/criterio fueron fijados sobre la base de: i) concentraciones encontradas con más frecuencia en derrames y depósitos de hidrocarburos (HTP), ii) existe un número importante de suelos con hidrocarburos intemperizados, por lo que su contenido de HAP es importante y representa un riesgo a la salud iii) la materia orgánica es importante por que interactua con los hidrocarburos en especial los HAP ya que los tiende a sorber, los valores típicos de materia orgánica son muy variables y dependen de su procedencia e interacción con el ambiente alcanzando valores entre el 10% y el 60%, en suelos tropicales (Bohn y col., 1993). Para cada criterio se asignó una calificación arbitraria en la escala de 1 al 10, determinada por el valor del criterio, por ejemplo: para suelos con valores de (HAP) mayores o iguales a 10 000 mg/Kg se asignó una calificación de 10 puntos, y si fue menor se les asignó una calificación proporcional relativa.

#### 4.1.3.- Muestreo

El muestreo en campo se realizó a través de un muestreo sistemático en el cual los puntos se localizaban equidistantes uno de otro a lo largo y ancho del terreno (Patterson, 1993). Las muestras fueron colectadas con un muestreador manual para suelos de acero inoxidable. Se colectaron en los primeros 50 cm de profundidad; las muestras se reunieron y mezclaron para formar una mezcla compuesta representativa, esta mezcla se seco a temperatura ambiente en

laboratorio, se molió y se tamizó a través de un tamiz malla 12, posteriormente fue almacenado en frascos de vidrio con tapa de teflón y conservadas en refrigeración a 6 °C, para su posterior análisis; la descripción de las muestras se detalla en la tabla 4.3.

Tabla 4.3.- Descripción de las muestras utilizadas para la selección de suelos

SUELO	IDENTIFICACIÓN DE MUESTRA	USO DE SUELO	PROCEDENCIA
1	CACTUS	Pozo de extracción de petróleo	TABASCO
2	POZO MICO (MATERIAL INTEMPERIZADO)	Material contaminado de pozo y derrame de hidrocarburos	TABASCO
3	POZO BELLOTA	Lodos de perforación	TABASCO
4	ATZCAPOTZALCO	Materiales diversos	DISTRITO FEDERAL

Se elaboró un cuadro de calificaciones, el cual resultó de multiplicar el valor de calificación por el valor de ponderación asignado a cada parámetro, por ejemplo: el valor de ponderación para los hidrocarburos poliaromáticos (HAP) le fue asignado el valor mayor.

#### **4.2.- Evaluación y caracterización de cepas productoras de biosurfactantes**

##### **4.2.1.- Origen e identificación de cepas**

Las cepas fueron aisladas a partir de muestras de suelo contaminado con hidrocarburos; se seleccionaron aquellos microorganismos capaces de producir valores de actividad emulsificante mayores o iguales al 80% de emulsificación de queroseno (Cooper y Goldenberg, 1987), el medio de cultivo utilizado fue el medio "A" (Etienne y col., 1983), en la tabla 4.4 se muestra su formulación.

**Tabla 4.4.- Formulación del medio de cultivo "A",**

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (g/l)</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.7
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2.0
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.005
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.0025
Extracto de levadura	0.1
Glucosa	20
pH	6.5

Se realizó el método de diluciones decimales seriadas, para cada muestra de suelo. Se tomó 1 gramo y se colocó en 9 ml de solución isotónica de NaCl al 0.85%, se agitó por 1 minuto y se dejó sedimentar 1 minuto, del sobrenadante se tomó 1 ml y se pasó a otro tubo que contiene 9 ml de solución isotónica, este procedimiento se realizó hasta un dilución  $10^{-9}$ ; de cada una de las diluciones se tomó 1 ml y se sembró en placas de agar soya tripticaseína y de agar rosa de bengala para el aislamiento de bacterias a partir de las diferentes morfologías coloniales desarrolladas en placas; de similar manera para los hongos. Las cajas se incubaron de 24 a 48 h para bacterias (TSA) y para hongos 72 h de acuerdo al crecimiento.

De acuerdo a su morfología colonial y microscópica se seleccionaron los microorganismos, posteriormente se cultivaron en el medio líquido "A" con glucosa, la actividad emulsificante se determinó al final del cultivo (72 h).

La capacidad emulsificante se determinó colocando 2 ml de sobrenadante de medio del cultivo con surfactante y 4 ml de queroseno, se agitó por 2 minutos y se tomó lectura tanto de altura como de la fase emulsificada con de la total; su relación porcentual representa la actividad emulsificante, esto se representa en la figura 4.2.

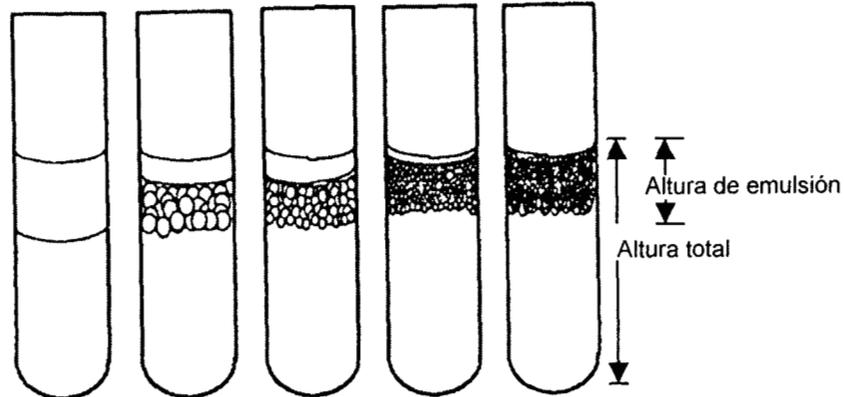


Figura 4.2.- determinación de la actividad emulsificante

A las cepas seleccionadas se les aplicó el sistema de identificación para *Enterobacteriaceae* y otros bacilos gram-negativos, condiciones que establece el uso del sistema API 20 para identificación de microorganismos, que combina las pruebas bioquímicas y un sistema de identificación que interpreta los perfiles obtenidos con una probabilidad de éxito sobre una identificación específica (Apilab Plus Instruction Manual, 1998). Este procedimiento consiste en 23 pruebas bioquímicas estandarizadas y miniaturizadas, de acuerdo a las pruebas propuestas, cada cúpula se llenó con 0.25 ml de la suspensión bacteriana; para las pruebas de anaerobiosis se sellaron con aceite de parafina. Se cerró la cámara y se incubó a 37 °C, por un tiempo de 18-24 h.

Después de la incubación se realizó la lectura para cada prueba de acuerdo a la tabla de lectura del sistema. En función de estos resultados se efectuaron otras pruebas, por ejemplo, cuando la prueba de glucosa fue positiva se realizaron las pruebas del indol, el reactivo de James, prueba de TDA, la de Voges-Proskauer y de NO<sub>2</sub>, (Apilab Plus Instruction Manual, 1998).

Con base a la lectura de las pruebas bioquímicas anteriores se elaboró una hoja de resultados con un perfil numérico, el cual se alimenta a un software con el

que se puede establecer la calidad de la identificación, y propone el género del que se trate y la probabilidad de éxito en la identificación.

Las cepas aisladas fueron conservadas en tubos inclinados con agar TSA en refrigeración a 5 °C, con resiembras cada 2 semanas.

#### 4.2.2.- Perfil cinético de las cepas productoras de biosurfactantes

##### 4.2.2.1.- Preparación de inóculo

Se seleccionaron dos de los microorganismos aislados, de acuerdo a la sección 4.2.1, cada cepa se mantuvo viable en tubos con Agar inclinado Soya Trypticaseína (TSA), se desarrolló por 24 h, posteriormente se realizó una suspensión con 2 ml de medio descrito en la tabla 4.4, sin adición de glucosa y se agitó en vórtex, 1 ml de esta suspensión se tomó como inóculo para un matraz de propagación de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo "A" completo, a 120 rpm y 28 °C, durante 48 h.

A partir de los matraces inoculados y desarrollados se verificó la pureza mediante el análisis microscópico de la tinción de Gram, se tomaron 50 y 75 ml para inocular los reactores de producción de biosurfactante, que se describen posteriormente.

##### 4.2.2.2.- Producción del biosurfactante

Se utilizaron dos reactores de vidrio de 2 y 3 litros de capacidad nominal, con un volumen de operación de 1.5 y 2.5 litros, respectivamente. Cada reactor contaba con: un electrodo de pH, agitación mecánica controlada, termómetro, control de temperatura, adición de aire comprimido previamente filtrado a través de un filtro de fibra de vidrio; debido a las características del proceso de producción de biosurfactantes, se adaptó a la salida de aire del reactor, un recipiente para recibir la espuma generada durante el proceso y evitar así su contaminación. Al final del proceso, se reunió de nuevo la espuma y el medio de

cultivo para realizar las determinaciones del peso seco, actividad emulsificante, pH y azúcares residuales, las condiciones de operación de los reactores fueron las siguientes:

- Temperatura 30 °C.
- Aireación de 1 V.V.M.
- Agitación 200 rpm

El cultivo (células y sobrenadante) resultante del proceso de producción se utilizó en los ensayos posteriores.

#### 4.2.3.- Pruebas de estabilidad de la emulsión

Se utilizaron como referencia los surfactantes químicos comerciales de calidad estándar, Tergitol NP-10 y Tritón X-100 en soluciones al 1%. Como biosurfactantes se utilizaron los cultivos resultantes del desarrollo de los microorganismos: *Klebsiella pneumoniae* Y *Serratia marcescens*.

A partir de las soluciones de surfactantes químicos y biológicos, se elaboraron las siguientes diluciones:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y a cada una se le cuantificó la actividad emulsificante a diferentes tiempos (0 A 96 h), estos valores fueron graficados y se compararon cada uno de los perfiles de estabilidad por cada dilución para cada surfactante en estudio.

#### 4.2.4.- Biodegradación de surfactantes

Con la finalidad de observar la respuesta del desarrollo de un cultivo mixto degradador de hidrocarburos, en presencia de los surfactantes químicos y biológicos, se realizó una cinética de crecimiento determinando indirectamente la presencia de biomasa en términos de absorbancia a 650 nm (Ito y Shigeo, 1982), utilizando el medio de cultivo mineral "A" sin glucosa. El experimento se llevó a

cabo por duplicado en matraces Erlenmeyer con manparas de 500 ml, conteniendo 80 ml de medio y 5 ml de solución de biosurfactante o surfactante químico de referencia como única fuente de carbono. Se incubaron a 30°C, con agitación de 120 rpm, por diferentes tiempos.

Para cada tiempo se midió el crecimiento por absorbancia y los datos se graficaron para cada uno de los surfactantes evaluados. El análisis comparativo se realizó entre cada cultivo usando los valores de absorbancia máximo, así como el tiempo en el que se alcanzó dicho valor.

#### *4.2.5.- Prueba de lavado de suelo en lote*

Esta es una prueba semicuantitativa para determinar la cantidad de hidrocarburos que es capaz de desorber una solución de surfactante sobre un suelo contaminado (Carolina y Abdul, 1991).

Se pesó la cantidad de suelo necesario para obtener una relación 1:30 (sólido:solución de surfactante o biosurfactante), se agitó con barra magnética por 30 minutos, se dejó sedimentar 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el suelo se enjuagó con dos porciones de 50 ml de agua destilada, se secó el suelo a 42 °C y se pesó el residual. La cantidad de material desorbido se expresó como porcentaje.

#### **4.3.- Estudios de solubilización de HTP y sus fracciones por surfactantes seleccionados**

Estos estudios se llevaron a cabo en matraces de 250 ml con 2 g de suelo contaminado y 20 ml de solución de surfactante químico o biológico adicionando azida de sodio al 0.01% como inhibidor de crecimiento microbiano. Cada matraz se incubó con agitación de 120 rpm, por periodos de 7.5 h a  $29 \pm 2$  °C; después se filtró con papel filtro Wathman 41, el líquido se descartó y el sólido se conservó para análisis de HTP y sus fracciones. Las determinaciones se realizaron por

duplicado sacrificándose pares de unidades experimentales para cada tiempo, las lecturas de hidrocarburos residuales se corrigieron de testigos sin surfactante.

Los resultados de HTP y sus fracciones residuales fueron graficados para cada lavado y evaluados comparativamente con respecto al surfactante de referencia. La comparación se realizó mediante el cálculo de la eficiencia relativa de remoción de HTP y sus fracciones, cuyo cálculo se realizó de la manera siguiente:

$$EFICIENCIA RELATIVA = \frac{\text{gramos de HTP removidos / g de biosurf. utilizado}}{\text{gramos de HTP removidos / g de surf. de referencia}}$$

Esta fórmula se aplicó para cada lavado; los criterios de análisis fueron los siguientes:

- *Si el cociente resultaba mayor a 1, el biosurfactante solubiliza mas cantidad de hidrocarburos con respecto al de referencia.*
- *Si el cociente resultaba menor a 1, el surfactante de referencia era mejor.*

#### **4.4.- Evaluación de la biodegradación HTP y sus fracciones en suelo contaminado en presencia de los surfactantes**

Para la evaluación del efecto de los surfactante y biosurfactantes en la biodegradación de hidrocarburos, se utilizó un sistema de lodos en donde se ensayaron los 7 tratamientos que se detallan en la tabla 4.6. En todos los casos las concentraciones utilizadas del surfactante de referencia fue igualada a la obtenida por el cultivo completo de la producción del biosurfactante en términos de la CMC.

Este experimento se llevó a cabo en matraces Erlenmayer de 250 ml con mamparas, los cuales contenían 2 g de suelo contaminado, 20 ml del medio mineral (detallado en la tabla 4.5) (Thibault y col., 1996), y el surfactante de prueba.

Tabla 4.5.- Composición del medio mineral para los experimentos de degradación de hidrocarburos en sistema de lodos

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (mM)	COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (mM)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10	<i>Sol. de minerales traza:</i>	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.001
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.1	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	
sol. de min. Traza	1 (ml/l)	NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	

Se prepararon controles tanto abióticos como sin esterilizar. Los primeros se prepararon mediante la esterilización por calor húmedo a 121 °C por 10 minutos, tanto el suelo contaminado, la solución de surfactantes y la de las sales minerales. Los matraces fueron sometidos a agitación (Ramírez, 1998). La concentración del Tergitol NP-10 utilizada en este experimento se ajustó con relación a la CMC del cultivo de biosurfactante producido por *Klebsiella pneumoniae*, con base en los resultados obtenidos en el lavado de suelos. Los matraces con microorganismos degradadores de hidrocarburos se inocularon con 1 ml de una suspensión de microorganismos a una concentración final de 10<sup>7</sup> células/ml (sección 4.4.1), el experimento tuvo una duración de 47 días.

Tabla 4.6.- Contenido de unidades experimentales para experimento de degradación de hidrocarburos.

TRATAMIENTO	TRATAMIENTO	CONTENIDO
1	Control de Tergitol NP-10	Tergitol estéril
2	Control de biosurfactante	Biosurfactante estéril
3	Testigo Tergitol	Tergitol
4	Testigo biosurfactante	Biosurfactante
5	Testigo microorg. degradadores	Microorganismos degradadores de hidrocarburos.
6	Tratamiento con Tergitol NP-10	Tergitol + microorganismos degradadores de hidrocarburos.
7	Tratamiento biosurfactante	Biosurfactante + microorganismos degradadores de hidrocarburos .

En todos los tratamientos se evaluaron las siguientes variables de respuesta: Hidrocarburos totales del petróleo y sus fracciones (Wang y col., 1994; Later y col. 1981), cuenta total de microorganismos degradadores de hidrocarburos (Kastner y col. 1994).

#### 4.4.1.- Preparación de inóculo degradador de hidrocarburos

Los microorganismos degradadores de hidrocarburos se obtuvieron a partir de muestras de suelos contaminados con hidrocarburos en matraces de 250 ml con 50 ml de medio "A", adicionado de 0.5 g de extracto de hidrocarburos de suelo contaminado y 1 g de suelo. Se incubó con una velocidad de agitación de 150 rpm y 30 °C, por 48 h. Enseguida se realizó una transferencia de 1 ml del sobrenadante del matraz a 50 ml de medio mineral nuevo y la misma cantidad de extracto de hidrocarburos, se realizaron en total 5 transferencias, los microorganismos fueron contados mediante vaciado en placa en agar TSA (cuenta total) y mediante la técnica del número mas probable (NMP), para degradadores de hidrocarburos; la concentración microbiana se ajustó siempre entre  $10^5$  a  $10^7$  células degradadoras de hidrocarburos/ml.

#### 4.4.2.- Técnicas analíticas

##### 4.4.2.1.- Cuenta de microorganismos degradadores de hidrocarburos

Se llevó a cabo por la técnica del número más probable; la cual consiste en inocular 1 ml de solución de cada una de las diluciones mencionadas en la sección anterior en tubos que contenían 9 ml de medio de cultivo "A", adicionado con queroseno al 1% como única fuente de carbono; por triplicado. Incubándose por tres días; los tubos que presentaron crecimiento detectado como turbiedad del medio líquido, se consideraron como positivos y, negativos los no turbios.

Se compararon los tubos inoculados, contra sus respectivos controles (3). Con el control sin inóculo se obtiene el número característico de tres dígitos empezando con la dilución donde más tubos positivos se detectaron, por ejemplo

si en la dilución  $10^{-2}$  hubo tres tubos positivos, en la dilución  $10^{-3}$  dos tubos positivos y en la dilución  $10^{-4}$  ningún tubo positivo el número característico es 320 en la dilución  $10^{-3}$ . Posteriormente en la tabla de Tukey utilizando el número característico, se obtiene el número más probable de microorganismos encontrados que para el caso de ejemplo es 9.5 y como en la dilución  $10^{-2}$  se tiene que 950 es el número más probable de microorganismos en la cantidad de muestra expresado en base seca.

#### 4.4.2.2.- Cuantificación de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) y fraccionamiento de hidrocarburos

##### 4.4.2.2.1.- Cuantificación en suelo

Para la cuantificación de HTP en el suelo contaminado, se utilizó el método gravimétrico 3540 de la Environmental Protection Agency (EPA), usando tetracloruro de carbono como disolvente, como se describe a continuación:

Se pesó 1 g de suelo seco contaminado y 1.0 g de sulfato de sodio anhidro, se colocó la mezcla en un dedal de vidrio se empacó con fibra de vidrio, se sometió a extracción en equipo Soxhlet durante 6 h a una temperatura de  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , utilizando matraces balón de 250 ml a peso constante, se utilizaron 120 ml de tetracloruro de carbono. El matraz balón con el residuo se sometió a evaporación a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se mantuvo en desecador por 12 horas y se determinó el peso. La cantidad de HTP se obtuvo de la siguiente manera:

$$\text{mg de HTP/Kg de suelo seco} = \frac{\text{Masa de extracto Soxhlet en mg}}{\text{Masa de muestra en Kg en base seca}}$$

##### 4.4.2.2.2.- Fraccionamiento de hidrocarburos

Activación de la columna.- 200 g de sílica gel malla 110-200 (tamaño de poro 150 Angstroms), se empacaron en una columna de vidrio de 90 x 4 cm, la cual se enjuagó con 3 porciones de 250 ml cada una de los siguientes disolventes:

acetona, n-hexano y diclorometano. Una vez que se eluyó todo el disolvente la columna con todo y sílica se repartió en una campana de extracción durante toda la noche; posteriormente la sílica se repartió en cajas petri de vidrio y se terminaron de secar a 40 °C, posteriormente la sílica se activó a 180 °C.

Preparación de columna.- Se prepara una columna cromatográfica de vidrio con tapón de teflón de 20 x 1 cm, con fibra de vidrio en el fondo, la cual fue lavada con metanol, hexano y diclorometano, la columna se empacó en seco con 3 g de la sílica activada y en la parte superior se colocaron 0.5 g de sulfato de sodio anhidro, se acondicionó la columna con 20 ml de hexano y el eluyente se descartó.

Eliminación de la fracción de asfaltenos.- Se tomaron 0.25 a 0.5 gramos de hidrocarburos obtenido del extracto Soxhlet (sección 4.4.2.2.1), se adicionaron 20 ml de n-pentano para la separación de asfaltenos mediante su precipitación; esta fue realizada a través de un papel Wathman de No. 41, realizándose 4 lavados con 10 ml de n-pentano; los lavados se colectaron en un vaso de vidrio a peso constante, el residuo sin asfaltenos se calculó gravimétricamente mediante la siguiente relación:

$$\text{Fracción de asfaltenos} = \frac{(\text{peso residuo Soxhlet} - \text{peso residuo sin asfaltenos}) \text{ en mg}}{\text{peso de residuo Soxhlet en mg}}$$

Esta fracción se multiplica por el total de HTP (expresado en base seca) en la muestra y se obtiene la fracción de asfaltenos contenidos en la muestra original.

El extracto sin asfaltenos se eluyó con 20 ml de hexano obteniéndose la fracción de hidrocarburos correspondiente a los alifáticos, después con 20 ml de benceno (fracción aromática) y una mezcla de acetona-metanol (1:1) para separar la fracción polar. El contenido de cada fracción se calculó como sigue:

$$\text{Fracción de hidrocarburos} = \frac{\text{peso residual de cada fracción en mg}}{\text{peso de muestra de extracto Soxhlet en mg}}$$

Para obtener el valor en mg/Kg de cada fracción se realizó el siguiente cálculo:

$$(\text{Fracción de hidrocarburos}) \times (\text{peso de HTP en muestra en mg/Kg})$$

#### 4.4.2.3.- Producción de CO<sub>2</sub> con suelo en suspensión

Con la finalidad de monitorear la degradación, se llevó a cabo el monitoreo de la producción del bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), mediante un método volumétrico; esta cuantificación es una medida de la actividad metabólica microbiana en cada unidad experimental (Bartha y Premer, 1965). El sistema consiste de un matraz (que contiene la mezcla de suelo, microorganismos degradadores de hidrocarburos, y la solución de surfactante en evaluación), y un recipiente adaptado que contiene el KOH para captar el CO<sub>2</sub> producido por el cultivo, este sistema se conoce como respirómetro, el cual se muestra en la figura 4.2.

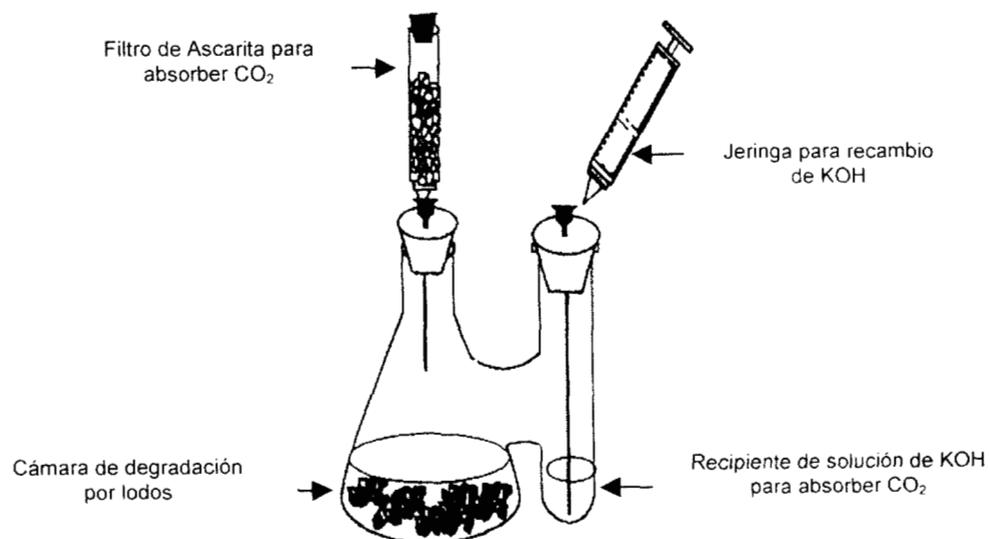


Figura 4.2.- Esquema de respirómetro para determinar la producción de CO<sub>2</sub> durante el experimento de biodegradación.

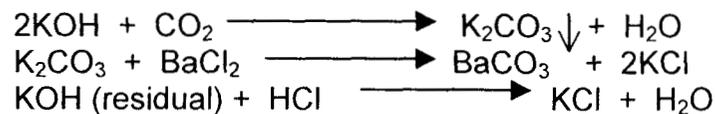
Se colocaron 4 gramos de suelo contaminado en la cámara de degradación, se agregó una solución acuosa (relación 1:8) la cual contiene el surfactante, microorganismos y medio mineral (tabla 4.6)

Los respirómetros se incubaron a 30 °C con agitación a 120 rpm por días; cada 3 días se tomaron 8 ml de KOH, titulándose por duplicado (en porciones de 4 ml cada una), con HCl 1 N en presencia de una solución de BaCl<sub>2</sub>, 2N (para precipitar el CO<sub>3</sub>) utilizando fenoftaleína como indicador. La producción neta de CO<sub>2</sub> se calculó por medio de la diferencia de producción de CO<sub>2</sub> de cada tratamiento (CO<sub>2trat</sub>) menos la de su testigo (CO<sub>2t</sub>).

$$\text{CO}_2 \text{ producido} = \text{CO}_{2\text{trat}} - \text{CO}_{2\text{t}}$$

Determinación de CO<sub>2</sub>.

Las reacciones que se llevan a cabo durante la determinación de CO<sub>2</sub> son las siguientes:



De acuerdo a las reacciones anteriores se calculó la producción de CO<sub>2</sub> mediante la siguiente ecuación:

$$\text{mol de CO}_2 \text{ prod.} = \left[ \frac{(\text{N}_{\text{KOH}} \times \text{V}_{\text{KOH}}) - (\text{N}_{\text{HCl}} \times \text{V}_{\text{HCl}})}{2} \right] \times 2.5$$

Donde:

- N<sub>KOH</sub> = Normalidad de la solución valorada de KOH
- V<sub>KOH</sub> = Volumen de solución de KOH titulado (4 ml)
- N<sub>HCl</sub> = Normalidad de la solución valorada de HCl
- V<sub>HCl</sub> = Volumen de solución de HCl utilizado para titular

## 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1.- Selección de suelo contaminado

Los resultados de la caracterización de los suelos se muestran en la tabla 5.1, como se observa, las muestras exhiben diferentes valores de cada parámetro, destacando el suelo 2 por su contenido de hidrocarburos totales del petróleo (HTP), aromáticos, así como el contenido de materia orgánica, presentando los valores más altos respecto a los demás, cabe hacer mención que dicho suelo procede de un sitio en el cual se confinaron residuos relacionados a actividades petroleras, como fondos de tanques de almacenamiento, principalmente.

Tabla 5.1.- Caracterización de suelos en estudio.

PARAMETRO	SUELO			
	1	2	3	4
HTP (mg/kg)	46 091	287 996.5	78 302	4 705
HIDROC. AROM. (mg/kg)	11 051	30 270	18 018	1 090
TIEMPO A LA INTEMPERIE (años)	5	6	6	4
MATERIA ORGÁNICA (%)	11.2	8.88	13.9	11.9
TEXTURA	ARENA MIGAJONOSA	ARENA	ARENA MIGAJONOSA	ARENA MIGAJONOSA

Un aspecto importante que hay que señalar es el alto contenido de materia orgánica que presentan las muestras, esto puede deberse principalmente a dos razones: i) el aporte de los hidrocarburos puede incrementar este parámetro, ii) los suelos procedentes de regiones tropicales son ricos en contenido de materia orgánica, y en zonas, existen diversos tipo de suelos con diferente composición predominando los de alto contenido de materia orgánica (Zavala, 1988).

Tomando como base estos resultados, y en los criterios señalados, se elaboró la tabla de calificación 5.2.

Tabla 5.2.- Calificación obtenida de suelos

CRITERIO	VALOR DE PONDERACION	CALIFICACIÓN POR MUESTRA DE SUELO (1-10 puntos)			
		1	2	3	4
HTP (mg/kg)	0.3	4.6	10	7.8	4.7
HAP (mg/kg)	0.4	10	10	10	1.09
ANOS DE INTEMPERISMO	0.1	10	10	10	9
MATERIA ORGÁNICA (%)	0.2	8.9	10	7.2	8.4

Con las calificaciones para cada suelo, se calculó un valor ponderado, que se obtuvo de multiplicar la calificación por el valor de ponderación, los resultados se muestran en la tabla 5.3:

Tabla 5.3.- Valores de ponderación para los suelos evaluados

CRITERIO	VALOR PONDERADO			
	1	2	3	4
HTP (mg/kg)	1.38	3	2.34	1.41
HA (mg/kg)	4	4	4	0.44
ANOS DE INTEMPERISMO	1	1	1	0.9
MATERIA ORGÁNICA	1.78	2	1.44	1.68
<b>TOTAL</b>	<b>8.16</b>	<b>10</b>	<b>8.78</b>	<b>4.43</b>

Como se observa, los valores de la suma de puntos ponderados para cada criterio, son muy cercanos, a excepción de la muestra 4 que es aproximadamente la mitad de los valores de las otras muestras. Debido a esta similitud, se aplicó un análisis estadístico, que permitiera determinar la existencia de diferencias significativas entre estos valores; y, de esta forma contar con criterios de selección más específicos. El método utilizado fue la prueba de Fredman la cual es una prueba no paramétrica que se aplica para comprobar la hipótesis nula de igualdad de tratamientos contra la hipótesis alterna de que algunos resultados producen observaciones que son diferentes a otras. Con base a lo anterior, se calcularon los siguientes datos estadísticos:

Se calcula el valor de  $X^2$ , el criterio es: si el valor de  $X^2$  es mayor al obtenido de tablas a una probabilidad menor al 0.005%, entonces hay diferencia entre grupos.

Cálculo de  $X^2$ .

$$X^2 = \frac{(K-1)(l^*b-l^2K(K+1)^2/4)}{A-l^*K(K+1)}$$

Como:

$$\begin{aligned} K &= 8 \\ L &= 4 \\ GL &= 7 \end{aligned}$$

y:

$$B = 1/l \quad (Ri)^2$$

$$A = Ri^2$$

Por lo tanto:

$$X^2 = 27.71$$

$$\text{La } X^2 \text{ de tablas: } X^2_{GL,\alpha} = X^2_{7,005} = 20.28$$

Como la  $X^2$  calculada es mayor a la obtenida de tablas, hay diferencia entre grupos; por lo tanto, se seleccionó el valor de mayor puntaje y fue el de la muestra del suelo 2 correspondiente al Pozo Mico, localizado en la región de Tabasco. Cabe señalar además, que esta muestra contenía la mayor concentración de HAP.

## 5.2.- Evaluación y caracterización de cepas productoras de biosurfactantes

### 5.2.1.- Identificación de cepas

Los resultados de la identificación de la cepas se muestran en la tabla 5.4.

Tabla 5.4.- Identificación de cepas productoras de biosurfactantes mediante el sistema API 20 y tinción de Gram.

NOMENCLATURA	TINCIÓN GRAM	IDENTIFICACIÓN	CONFIABILIDAD (%)
10	bacilos cortos Gramm negativos	<i>Serratia marcescens</i>	99
8	bacilos cortos Gramm negativos	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99

En la literatura se señala que ambas cepas identificadas han sido encontradas en sitios contaminados con hidrocarburos y poseen la capacidad para metabolizarlos, particularmente *Serratia marcescens*, es productora de biosurfactante (Cameotra, 1995; Gibello y col., 1995), en tanto que para *Klebsiella pneumoniae*, se ha encontrado que cuenta con mecanismos enzimáticos de hidrolasas que son precursores de la formación de polímeros de diferente composición (Gibello y col., 1995) y presenta actividad de fosfatasas (Maria-Judith y col., 1996), las cuales han sido involucradas en el metabolismo de hidrocarburos. También se ha reportado la existencia de una relación entre la degradación de hidrocarburos con la capacidad de sintetizar biosurfactantes, aunque también es posible que sean producidas cuando se utilizan otras fuentes de carbono (Banat, 1995).

Respecto a la capacidad de producir biosurfactantes por *Klebsiella pneumoniae*, hay pocos reportes, por ejemplo, se ha estudiado la producción de malamina por este microorganismo, cuya síntesis involucra la utilización de la 4-HPA hidroxilasa la cual al reaccionar con alcoholes fenólicos favorece la producción de metil quinonas, produciendo polímeros que tienen relación con la degradación de compuestos aromáticos; también pueden favorecer la formación de dibenzoquinonas, las cuales al condensarse producen polímeros de gran utilidad como son: fibras ó adhesivos (Gibello y col., 1995); ésta propiedad es importante tomarla en consideración, ya que el uso de estos polímeros podría favorecer además de la producción de biosurfactante, contribuir en la biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos.

Este microorganismo se conoce como un patógeno oportunista, lo que significa que en determinadas condiciones puede producir enfermedad, sin embargo, dentro de este género existen diversas especies, algunas no asociadas a infecciones, como las que proceden de muestras de ambientes contaminados, por ejemplo suelos contaminados con hidrocarburos, aguas residuales, etc. (Grimont y col., 1992).

### 5.2.2.- Producción de biosurfactantes

Con la finalidad de caracterizar la producción de biosurfactantes, por las cepas aisladas, a continuación se muestran las cinéticas en las figuras 5.1 y 5.2.

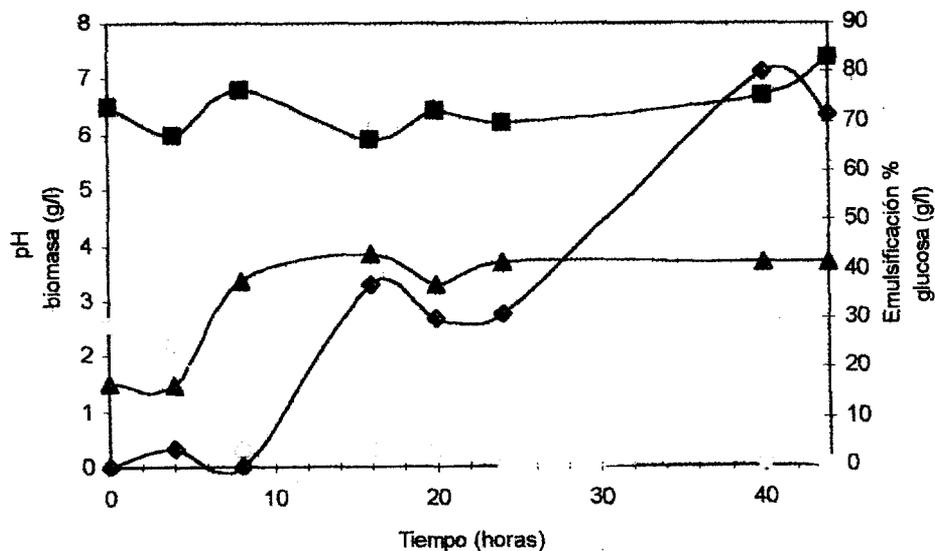


Figura 5.1.- Producción de biosurfactante por *Klebsiella pneumoniae*  
 pH—■—; biomasa —▲—; glucosa ○; emulsificación —◆—

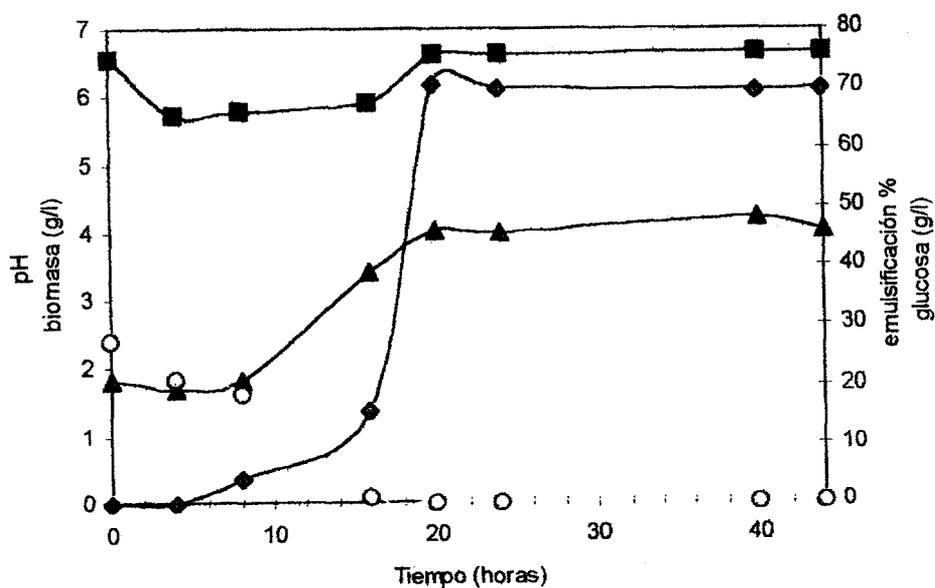


Figura 5.2.- Producción de biosurfactante por *Serratia marcescens*.  
 pH—■— biomasa —▲— glucosa ○ emulsificación —◆—

Para la cepa *Serratia marcescens* se observa una relación entre el incremento en la actividad emulsificante y el incremento en la biomasa, lo que indica que la producción de biosurfactante está asociado a crecimiento. Algo similar ha sido reportado en cultivos de producción de biosurfactantes, en donde se observa una parcial asociación a crecimiento microbiano, así mismo su regulación y la inducción están relacionados al pH, temperatura, velocidad de agitación, aireación y condiciones de limitación de nutrientes (Margaritis y col., 1979). En cambio la cepa de *Klebsiella pneumoniae* no presenta una relación de asociación entre la biomasa y la actividad emulsificante, por lo que su producción no está asociada a crecimiento.

Respecto a los cambios en los valores del pH durante la cinética, en ambos casos se observa una tendencia a disminuir entre las 4 y 16 horas de cultivo, estos cambios tienen relación con la producción de la actividad emulsificante: para el caso de *Klebsiella pneumoniae*, el biosurfactante comienza a producirse al disminuir el pH de su valor inicial 6.5 llegando a alcanzar un mínimo de 5.7, posteriormente al llegar a un valor de 6.7 (40 horas de cultivo), se observa un nivel máximo de actividad emulsificante. Para el caso de la *Serratia marcescens*, cuando el pH se reduce abajo de 6, la actividad emulsificante comienza a incrementarse, al disminuir hasta un valor de 5.7 unidades, a partir de este valor de pH se observa un incremento más pronunciado en la producción del biosurfactante, posteriormente el pH tiende a aumentar llegando a estabilizarse a 6.7, de la misma forma la producción del biosurfactante se estabiliza. Perfiles cinéticos similares en la producción de biosurfactantes han sido reportados en la literatura, donde el pH varía durante el cultivo, por ejemplo en el cultivo de *Coriobacterium lepus*, al utilizar queroseno como fuente de carbono, la cinética presenta una tendencia a disminuir el pH cuando produce biosurfactantes, este hecho es debido a la producción de ácidos grasos, que son intermediarios en la producción de biosurfactantes (Falatko y Novak, 1992). En cultivos de *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558, desarrollado en medio mineral con hidrocarburos ( $C_8$ - $C_{17}$ , sin  $C_{10}$  y  $C_{15}$ ) y glucosa como fuentes de carbono, se ha observado que

cuando el pH del cultivo disminuye a 6 la producción de biosurfactante alcanza su nivel máximo (Duvnjak y col., 1982).

También se ha reportado la producción de biosurfactantes en cultivos con glucosa y aceite vegetal como fuentes de carbono, así como de hidrocarburos y glucosa, los cuales fueron utilizados como ayuda en la solubilización y biodisponibilidad en la degradación de gasolina (Falatko y Novak, 1992). En otro estudio se obtuvieron biosurfactantes utilizando una mezcla de glucosa, peptona y extracto de levadura para ser utilizados en la biodegradación de lodos aceitosos (Rocha e Infante, 1997). Se sabe que los biosurfactantes se pueden producir en ausencia de sustratos insolubles en agua, por ejemplo, los celobioselípidos producidos por *Ustilago zea* son producidos a partir de glucosa como única fuente de carbono, (Kosaric y col., 1987), ver tabla 1.2.

Con base a los resultados anteriores se observa que la producción de biosurfactantes por *Serratia marcescens* y *Klebsiella pneumoniae*, están parcialmente asociados al crecimiento y utilizan glucosa como fuente de carbono.

### 5.2.3.- Selección de cepas productoras de biosurfactantes

Tomando como base los datos cinéticos de cada una de las cepas, se llevó a cabo un análisis de varianza para la regresión lineal, obteniéndose en estas la pendiente que corresponde a la velocidad de producción de actividad emulsificante, y comparandolas entre sí. Los resultados son mostrados en la tabla 5.5.

Tabla 5.5.- Velocidades de producción de actividad emulsificante para ambas cepas

<b>Cepa</b>	<b>Velocidad de producción de actividad emulsificante</b>	<b>Ajuste al modelo propuesto (%)</b>
<b><i>Serratia marcescens</i></b>	1.8781	73.7
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	1.3247	71.9

- Las estimaciones se realizaron para una  $\alpha=0.007$  para *K. Pneumoniae* y  $\alpha = 0.006$  para *S. Marcescens*.

El resultado del análisis estadístico, estableció que existen diferencias significativas de ambos microorganismos en la velocidad de producción de actividad emulsificante, siendo mayor para *S. Marcescens*. Esto significa que ésta cepa es capaz de alcanzar una actividad de emulsificación del 70% en menos tiempo que la cepa *K. pneumoniae*, la cual alcanza un valor del 81% en casi el doble de tiempo que *S. marcescens*.

Como criterios adicionales de selección, se llevaron a cabo el análisis comparativo de la concentración micelar crítica (CMC) o dilución micelar crítica (DMC), lavado de suelos, parámetros relacionados con la degradación y la solubilización de hidrocarburos, representa la concentración de surfactante a la cual se comienzan a formar micelas. Valores bajos de CMC o DMC, significa que requiere una menor cantidad de surfactante para formar micelas y por tanto favorecer la solubilización de sustancias hidrofóbicas, así mismo el lavado de suelos representa la capacidad de un surfactante para desorber hidrocarburos de un suelo (Francy, 1991; Abdul y col., 1990), los resultados son mostrados en la tabla 5.6.

Tabla 5.6.- Evaluación de surfactantes sintéticos y biológicos.

<b>PARÁMETRO</b>	<b>SURFACTANTE</b>			
	<b><i>Serratia marcescens</i></b>	<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	<b>TRITON X100</b>	<b>TERGITOL NP-10</b>
<b>DMC (ml/l)</b>	0.0014	0.0017	0.15@	0.00457@
<b>Lavado de suelo en lote (% de pérdida en peso de HTP)</b>	10.5	24.1	19.8	22.3

@ Valor de CMC (g/l)

Como se observa, prácticamente no existe diferencia en el valor de dilución micelar crítica para los biosurfactantes producidos por ambos microorganismos. En cuanto al parámetro de lavado de suelos, el biosurfactante producido por *Klebsiella pneumoniae* produce valores superiores, esto significa que éste presenta mayor capacidad para desorber hidrocarburos que en el caso del biosurfactante producido por *Serratia marcescens*.

Con relación a los surfactantes sintéticos, se observa que los mayores valores de actividad emulsificante y de solubilización de solutos en el suelo los presentó el Tergitol NP-10; en cambio el valor obtenido con CMC, resultó menor para el Tritón X100.

#### 5.2.4.- Pruebas de estabilidad de emulsión

Un parámetro importante en la biodegradación de hidrocarburos es la pseudosolubilización de estos mediante su emulsificación, esto se logra formando emulsiones estables, por lo que a continuación se evalúa este parámetro.

Con la finalidad de determinar la capacidad de los surfactantes para mantener estable una emulsión inmisible, se realizó una prueba de estabilidad en un sistema agua-queroseno en presencia de soluciones de los surfactantes sintéticos y biológicos. Este parámetro se considera importante, ya que para llevar a cabo la degradación de hidrocarburos es necesario incrementar su pseudosolubilización, así como el contacto entre los microorganismos y los contaminantes por degradar (Rosemberg y col., 1979).

Los resultados de estabilidad de emulsión por el biosurfactante de *Serratia marcescens* y *Klebsiella pneumoniae*, se muestran en la figura 5.3 (a) y (b) respectivamente.

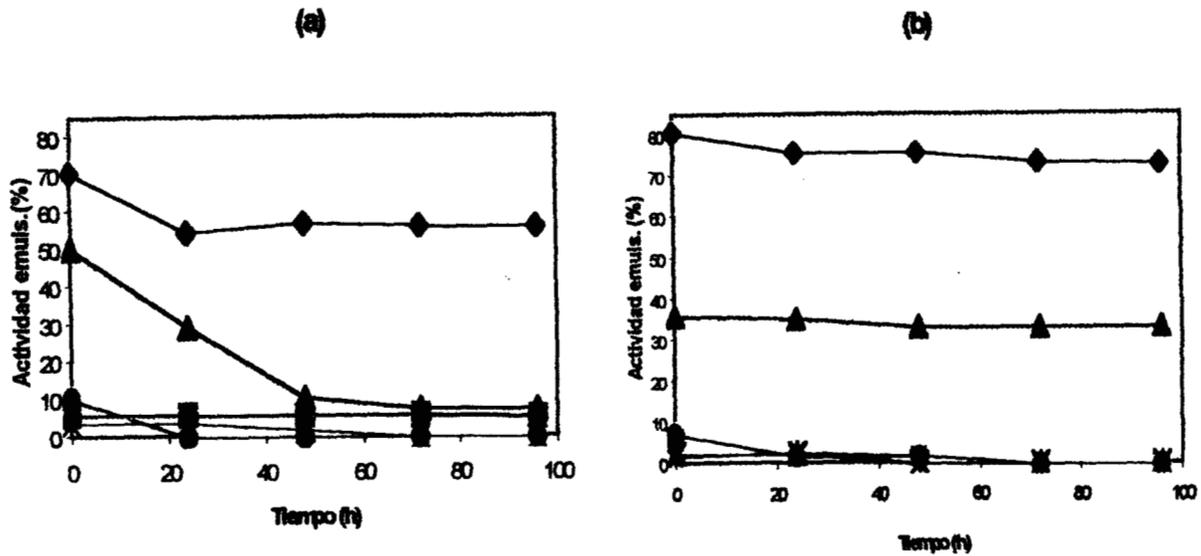


Figura 5.3.- Estabilidad de la actividad emulsificante para (a) *S. marcescens* y (b) *K. pneumoniae*, diluciones:  $10^0$ —◆—,  $10^{-1}$ —▲—,  $10^{-2}$ —●—,  $10^{-3}$ —■—,  $10^{-4}$ —+—

Comparando las actividades emulsificantes de los biosurfactantes producidos por ambos microorganismos se observa una mayor estabilidad de la emulsión para el biosurfactante producido por *K. Pneumoniae* contra el producido por *S. marcescens*, así mismo para este último se observa que para el caldo de cultivo sin diluir así como su primer dilución ( $10^{-1}$ ), el valor de la actividad emulsificante disminuye en mayor proporción (16% y 40%), respecto al de *K. Pneumoniae*.

Otro parámetro importante es el valor de la actividad emulsificante de los caldos de cultivo sin diluir (dil  $10^0$ ), en los cuales se observó que el caldo de *Klebsiella pneumoniae* produjo un valor mayor de actividad emulsificante respecto al de *Serratia marcescens*.

Los perfiles mostrados por las soluciones de los surfactantes sintéticos: Tergitol NP-10 y Triton X-100 se presentan en la figura: 5.4 (a) y (b), respectivamente, en ellos se observa que la emulsión producida por el Tritón X-100 en las soluciones sin diluir y en la primera dilución ( $10^{-1}$ ), fue la mejor hasta las 48 h, sin embargo después de este tiempo hay una tendencia a la disminución.

En el caso del Tergitol NP-10 para las soluciones sin diluir y su primera dilución ( $10^1$ ), muestran una disminución promedio del 10% a las 24 hs, después de este tiempo las soluciones permanecieron practicamente estables; así mismo el Tergitol NP-10 produjo valores mayores de actividad emulsificante en todas las diluciones empleadas.

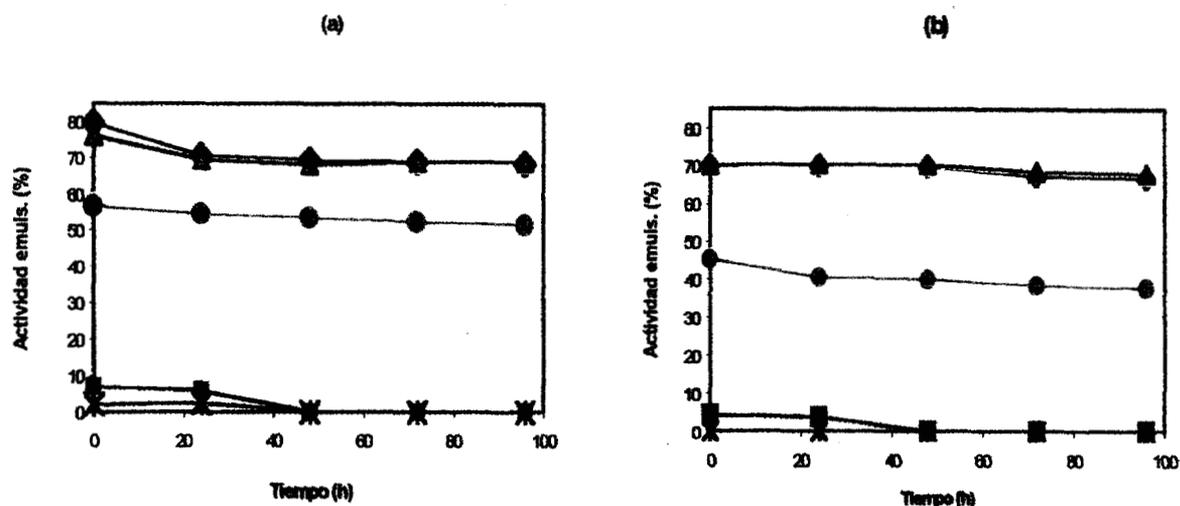


Figura 5.4.- Estabilidad de la actividad emulsificante para (a) Tergitol NP-10 y (b) Tritón X-100; diluciones:  $10^0$ —◆—,  $10^{-1}$ —▲—,  $10^{-2}$ —●—,  $10^{-3}$ —■—,  $10^{-4}$ —×—

Comparando la estabilidad de la actividad emulsificante entre el biosurfactante producido por *K. pneumoniae* y el Tergitol NP-10, se observa que el biosurfactante de ésta, presentó una mayor estabilidad de la emulsión con respecto al tiempo, además de que con el cultivo sin diluir se logró un valor mayor de actividad emulsificante, sin embargo sus diluciones mostraron valores menores de actividad emulsificante.

Estos resultados, indican que el biosurfactante producido por *K. Pneumoniae* y el Tergitol NP-10 mostraron valores superiores tanto de estabilidad de la emulsión como del porcentaje de actividad emulsificante, en comparación con el Tritón X-100 y el biosurfactante producido por *S. marcescens*.

### 5.2.5.- Biodegradación de surfactantes.

Con la finalidad de realizar un análisis comparativo de la posible toxicidad de surfactantes y biosurfactantes sobre un cultivo mixto degradador de hidrocarburos, se llevó a cabo una prueba de respuesta del crecimiento de este cultivo cuantificada indirectamente como absorbancia a 650 nm, los resultados se presentan en la figura 5.5.

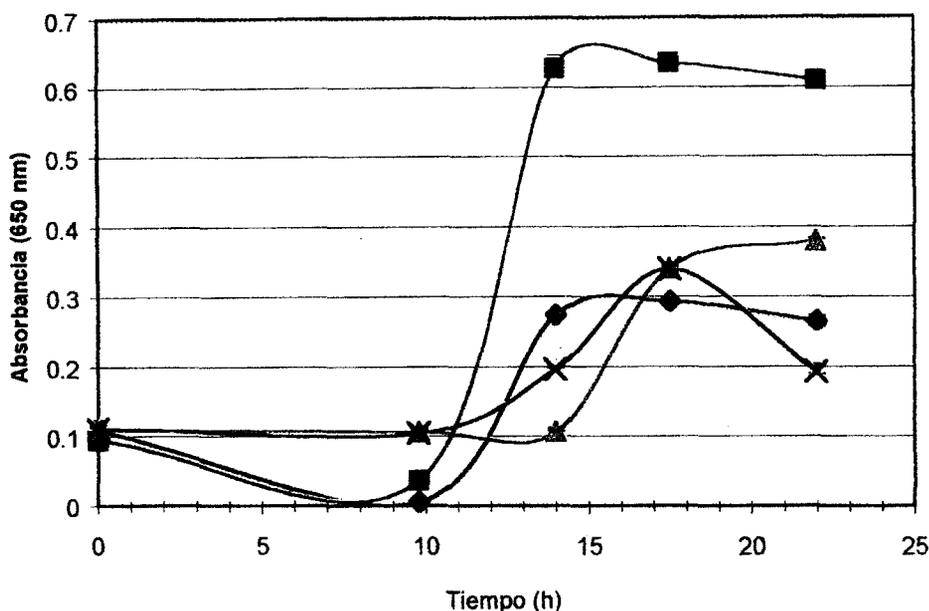


Figura 5.5.- Biodegradación de surfactantes por microorganismos degradadores de hidrocarburos, *K. pneumoniae* --◆-- *S. Marcescens* --■--, Triton X-100 --▲--, Tergitol NP-10 --\*--

De acuerdo con los perfiles mostrados por cada surfactante, se observó que el producido por *S. marcesecens* presentó una mayor respuesta al crecimiento de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, en tanto que los adicionados con Tergitol NP-10, Triton X100 mostraron tendencias similares entre si a las 9.8 y 17.5 h de cultivo.

Reportes en la literatura han informado que en algunos casos el uso de biosurfactantes muestra un efecto inhibitorio sobre los microorganismos

degradadores de hidrocarburos. Por ejemplo, la presencia del biosurfactante obtenido de *Pseudomonas aeruginosa* UG2, resultó ser inhibitorio al cultivo degradador de hidrocarburos en la biodegradación de HAP de alto peso molecular (Deschenes y col., 1996); en otros estudios se ha mostrado que en la mayoría de los casos los biosurfactantes son biodegradables (Banat, 1995; Kosaric y col., 1987; Cooper y Zajic, 1980), por lo que su aplicación puede favorecer, o al menos no interferir en la degradación de los hidrocarburos (Finnerty, 1994). Otros reportes han señalado que los microorganismos degradadores de hidrocarburos prefieren utilizar el biosurfactante en vez del contaminante; en este caso, sería conveniente buscar las condiciones que permitan una mayor velocidad de degradación del contaminante que la del surfactante (Sundaram y col., 1994).

En nuestro caso, la degradación del biosurfactante producido por *S. marcescens*, usado como única fuente de carbono, resultó ser más biodegradable que el producido por *Klebsiella pneumoniae* y que el Tergitol NP-10 y Triton X-100. Esto podría significar un posible consumo preferencial por parte de los microorganismos con los que se encuentren en contacto.

Con este resultado y el obtenido en la prueba de estabilidad de la emulsión, (la actividad emulsificante), se concluye que el biosurfactante producido por *K. pneumoniae* y el Tergitol NP-10, fueron los que presentaron las mejores propiedades relacionadas al mejoramiento de la disponibilidad de hidrocarburos en suelo, por lo que estos se seleccionaron para los estudios posteriores.

### **5.3.- Solubilización de fracciones de hidrocarburos en suelo contaminado**

Con la finalidad de evaluar la capacidad de solubilización de los hidrocarburos y sus fracciones sorbidas en el suelo, se llevaron a cabo pruebas de lavado del suelo, utilizando los dos surfactantes seleccionados: el biosurfactante producido por *K. pneumoniae* y el Tergitol NP-10.

### 5.3.1.- Hidrocarburos totales del petróleo

En la figura 5.6, se observa que el suelo contaminado al ser lavado con Tergitol NP-10, presentó una desorción del 20.6% de HTP en los primeros dos lavados mientras que, al utilizar el biosurfactante de *K. pneumoniae* solamente se removió el 16.7%; en los lavados subsiguientes se observa un comportamiento asintótico para ambos surfactantes, logrando una remoción final al 7° lavado con Tergitol NP-10, del 33.1% y de 24.3% del biosurfactante.

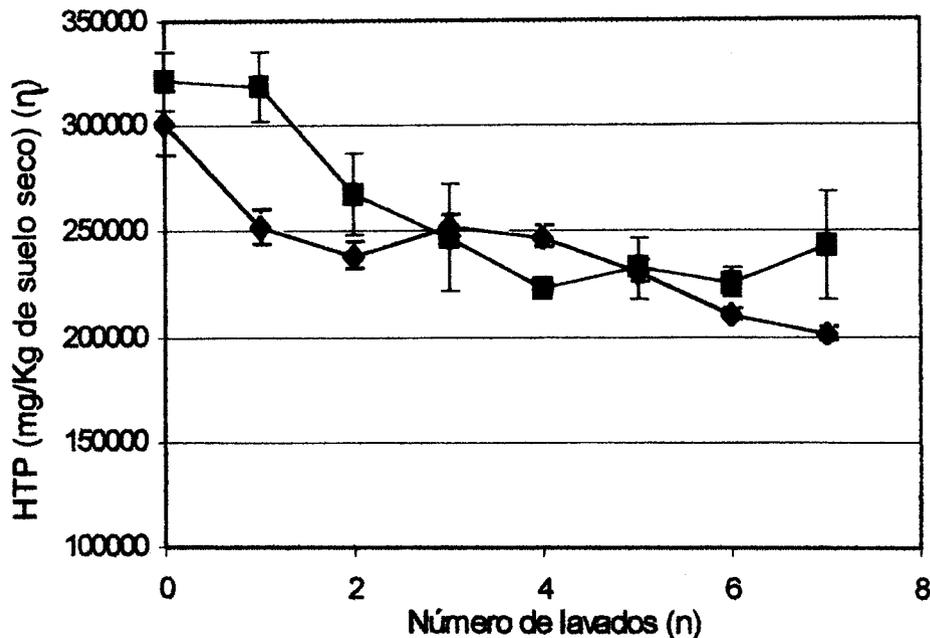


Figura 5.6.- HTP residuales en suelo lavado con Tergitol NP-10 --◆-- y el biosurfactante producido por *K. Pneumoniae* --■--.

Con la finalidad de establecer de manera global las diferencias de remoción de HTP ( $\eta$ ) con respecto al número de lavados ( $n$ ) para cada uno de los surfactantes, se establecieron las ecuaciones que describen el comportamiento de las curvas de lavado. Dichas ecuaciones se ajustaron a un polinomio de 4° grado y la primera derivada correspondió a la eficiencia relativa de remoción, es decir la cantidad de HTP removidos por Kg de suelo seco por lavado. Las ecuaciones se muestran a continuación:

Ecuación para Tergitol NP-10:

$$\eta = 565.39n^4 - 8983.9n^3 + 45946n^2 - 89696n + 302172$$

Primera derivada:

$$d\eta/dn = 2261.56n^3 - 26951.7n^2 + 91892n - 89696$$

Ecuación para biosurfactante:

$$\eta = -377.75n^4 + 5876.4n^3 - 25278n^2 + 6746.7n + 324423$$

Primera derivada:

$$d\eta/dn = -1511n^3 + 17629.2n^2 - 50556n + 6746.7$$

En la fórmula obtenida con la primera derivada se substituyeron los valores de cada lavado (n) y se obtuvo el valor de la eficiencia relativa de remoción. Los valores obtenidos para los tres primeros valores se muestran en la tabla 5.7.

Tabla 5.7.- Eficiencia relativa de remoción de HTP en suelo lavado con Tergitol NP-10 y el biosurfactante producido por *K. pneumoniae*.

NÚMERO DE LAVADOS	TERGITOL NP-10	BIOSURFACTANTE
	$\frac{d\eta}{dn}$ (mg de HTP/Kg de suelo por lavado)	$\frac{d\eta}{dn}$ (mg de HTP/Kg de suelo por lavado)
1	-22494.14	-27691.1
2	4373.68	-35936.5
3	4476.82	-27055.5
4	-8615.36	-10114.1
5	-21333.5	5821.7
6	-20108.24	11685.9
7	8629.78	-1587.5

Los resultados de eficiencia relativa de remoción de HTP, que tienen signo negativo representan la magnitud de la disminución de este, por lo que se observa que para el primer lavado se obtienen eficiencias de remoción de HTP similares para ambos surfactantes. Sin embargo, el 2° y 3° lavado no mostró mayor reducción el tergitol NP-10, en cambio al utilizar el biosurfactante, éste mostró una tendencia hacia la reducción de los HTP continuando ésta hasta el 4° lavado; posteriormente éste mismo mostró una tendencia asintótica. También se puede observar en ambos casos, que conforme aumentó el número de lavados la

eficiencia tendió a disminuir. Este resultado es similar al obtenido en estudios similares usando un solo tipo de hidrocarburo (Liu y col., 1991).

Estos resultados demuestran que la mayor capacidad de remoción de HTP para el Tergitol se obtiene en el primer lavado, en cambio para el biosurfactante, la mayor capacidad de desorción se presenta en el 2° y 3° lavado.

La reducción de HTP lograda en este experimento fue menor respecto a la de los reportes bibliográficos. Esto podría deberse a que en la mayoría de los casos se utilizan sustancias puras y/o en suelos con hidrocarburos no intemperizados y concentraciones relativamente inferiores a las de este estudio, por ejemplo: en estudios sobre la reducción de HTP en un suelo contaminado realizados por la American Petroleum Institute (API), en 1979 y la Environmental Protection Agency (EPA) en 1985, utilizaron una mezcla de alquilbenzen sulfonatos y alquil fenol etoxilato al 2%, la mezcla fue capaz de remover el 60% de gasolina en un suelo arenoso (Abdul y col., 1990). En otro estudio se evaluaron 2 surfactantes: un éster de ácido graso etoxilado no iónico y el Hyonic PE90 al 2%, a nivel de campo para la remoción de una mezcla de aromáticos, hidrocarburos clorados y productos del petróleo, logrando reducir el 50% de los contaminantes (Carolina y Abdul, 1991). En otro estudio en suelo contaminado con hexano, se encontró que el biosurfactante producido por *Pseudomonas aeuroginosa* fue capaz de remover al 50 % de hidrocarburos y favorecer así su biodegradación (Herman y col.,1997). Se han reportado también estudios del uso de biosurfactantes en la degradación de hidrocarburos (queroseno) presentes en el suelo, los cuales han demostrado que tienen la capacidad de solubilizarlos y favorecen su biodegradación (Sundaram y col., 1994), así mismo, favorecen la solubilidad del naftaleno en suelo, el 1,2,4-trimetil benceno, m-xileno y tolueno (Margaritis y col., 1979), así como del fenantreno (Deziel y col., 1996) y algunos otros contaminantes hidrofóbicos de interés ambiental como los bifenilos policlorados (Robinson y col., 1996).

**225552**

### 5.3.2.- Hidrocarburos alifáticos

Para determinar la fracción relativa al grupo de los alifáticos, se analizó el contenido de éstos hidrocarburos en el suelo sometido a 7 lavados con los surfactantes Tergitol NP-10 y el biosurfactante de *K. Pneumoniae*. Los resultados se muestran en la figura 5.7.

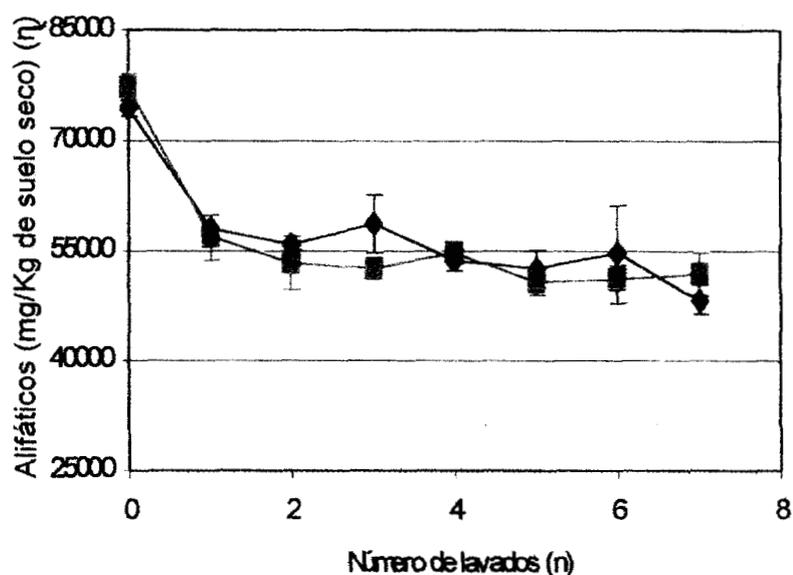


Figura 5.7.- Alifáticos residuales en suelo lavado con Tergitol NP-10 --◆-- y el biosurfactante producido por *K. Pneumoniae* --■--.

Como se observa en la figura 5.7, la remoción de alifáticos se llevó a cabo en mayor proporción en los dos primeros lavados, en el primero se removi6 la mayor cantidad. El Tergitol NP-10 fue capaz de solubilizar el 22% de los alifáticos contra el 26% de remoci6n que lograron remover los biosurfactantes; en los posteriores lavados en ambos casos se observ6 una menor remoci6n, con una tendencia asint6tica. Finalmente el biosurfactante present6 una reducci6n de los alifáticos del 32.9 % y, el Tergitol NP-10 de 35 %.

Debido al perfil similar que presentaron ambas curvas de lavado, se realiz6 un an6lisis de eficiencia relativa de remoci6n de alifáticos para determinar en los

primeros tres lavados, si existían diferencias por el uso de cada uno de los surfactantes evaluados.

Para obtener la cantidad de alifáticos removidos por número de lavados, se obtuvo la primera derivada del polinomio correspondiente, se substituyeron los valores para los tres primeros lavados y estos se compararon; las ecuaciones son las siguientes:

Ecuación para Tergitol:

$$d\eta = 76.633n^4 - 1396.5n^3 + 8561.5n^2 - 21315n + 73953$$

Primera derivada:

$$d\eta/dn = 306.532n^3 - 4189.5n^2 + 17123n - 21315$$

Ecuación para biosurfactante:

$$\eta = 145.18n^4 - 2384.3n^3 + 13488n^2 - 30952n + 77254$$

Primera derivada:

$$d\eta/dn = 580.72 n^3 - 7152.9 n^2 + 26976 n - 30952$$

Los valores de las eficiencias de remoción de alifáticos para cada uno de los polinomios ajustados se muestra en la tabla 5.8.

Tabla 5.8.- Eficiencia relativa de remoción de alifáticos en suelo lavado con Tergitol NP-10 y el biosurfactante de *K. pneumoniae*.

NÚMERO DE LAVADOS	TERGITOL NP-10	BIOSURFACTANTE
	$\frac{d\eta}{dn}$ (mg de alif./Kg de suelo por lavado)	$\frac{d\eta}{dn}$ (mg de alif./Kg de suelo por lavado)
1	-8074.977	-10548.18
2	-1374.816	-965.84
3	624.621	1279.34
4	-237.528	-328.32
5	-2122.125	-2304.5
6	-3190.032	-1164.88
7	-1602.11	6574.86

Estos resultados indican que la reducción de la fracción alifática es mayor al utilizar el biosurfactante en el primer lavado y similar para el segundo lavado; a

partir del tercer lavado, se observó un comportamiento asintótico; así mismo al utilizar el Tergitol NP-10 se mostró una reducción del contenido de esta fracción en los primeros dos lavados. Es conveniente señalar que en la literatura se indica que esta fracción es la más fácilmente removida por el uso de surfactantes, lo cual es debido, principalmente a que su sorción más débil con los componentes del suelo, además que, las moléculas que la conforman son mas pequeñas en comparación con las moléculas de mayor peso molecular como lo son los poliaromáticos (Liu y col., 1991). Con base a estos resultados se concluye que el biosurfactante es capaz de remover al grupo de alifáticos más eficientemente que el surfactante de referencia.

### 5.3.3.- Hidrocarburos aromáticos

Una tendencia similar en la remoción de la fracción aromática residual presentan los suelos al ser lavados con Tergitol NP-10 y el biosurfactante, en la figura 5.8 se observa que en el primer lavado, se desorbe el 27.5 % por el Tergitol y el 30% para el biosurfactante.

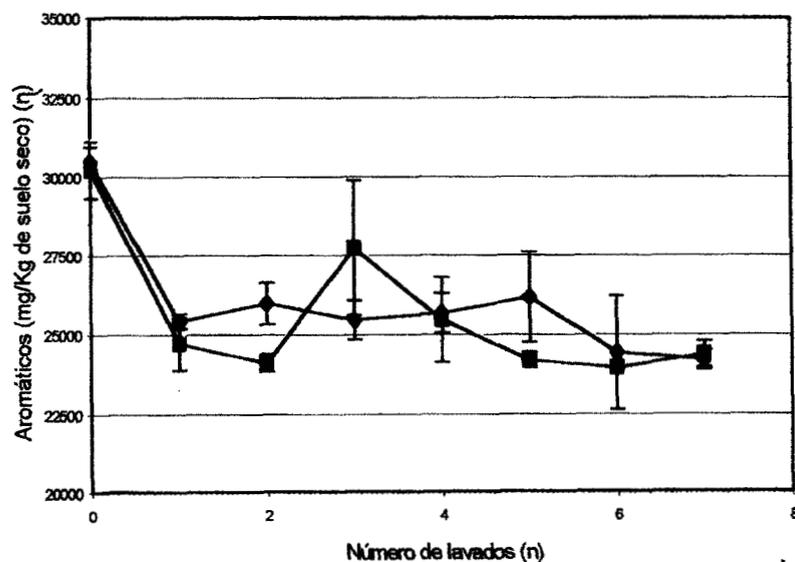


Figura 5.8.- Aromáticos residuales en suelo lavado con Tergitol NP-10 --◆-- y el biosurfactante producido por *K. Pneumoniae* --■--.

Los polinomios ajustados se obtuvieron de manera similar al análisis de la fracción alifática; estos fueron derivados con la finalidad de obtener las eficiencias relativas de remoción de la fracción aromática por el uso de cada surfactante por lavado. Los resultados se muestran en la tabla 5.9; y los modelos ajustados y sus derivadas a continuación:

Ecuación para Tergitol NP-10:

$$d\eta = 36.562n^4 - 615.81n^3 + 3433.9n^2 - 7287.7n + 18343$$

Primera derivada:

$$d\eta/dn = 146.248n^3 - 1847.43n^2 + 6867.8n - 7287.7$$

Ecuación para el Biosurfactante:

$$\eta = 79.261n^4 - 1187.6n^3 + 5748.1n^2 - 10022n + 18105$$

Primera derivada:

$$d\eta/dn = 317.044n^3 - 3562.8n^2 + 11496.2n - 10022$$

Tabla 5.9.- Eficiencia relativa de remoción de aromáticos en suelo lavado con Tergitol NP-10 y biosurfactantes producido por *K. Pneumoniae*.

NUMERO DE LAVADOS	TERGITOL NP-10	BIOSURFACTANTE
	$\frac{d\eta}{dn}$ (mg de arom./Kg de suelo por lavado)	$\frac{d\eta}{dn}$ (mg de arom./Kg de suelo por lavado)
1	-2121.082	-1771.556
2	228.164	1255.552
3	637.526	961.588
4	-15.508	-751.18
5	-853.45	-1980.5
6	-998.81	-824.09
7	425.89	4620

De acuerdo a los valores de las eficiencias relativas de remoción de la fracción aromática por parte de ambos surfactantes, se observó una reducción importante en el primer lavado, sin embargo en el segundo y tercer lavado se presentó una tendencia asintótica, posteriormente tiende a disminuir, siendo esta mayor por el uso del biosurfactante (4° y 5° lavado). Este hecho es importante ya que uno de los problemas de la degradación de esta fracción es su poca

disponibilidad debido a su sorción con alguno de los componentes del suelo, como la materia orgánica (Liu y col., 1991 y 1992) y, que el poder desorber esta fracción con pocos lavados significa que es posible utilizarlo en un proceso para la desorción de esta fracción y por lo tanto favorecer su disponibilidad para su eventual separación por métodos físicos y/o su tratamiento mediante microorganismos.

#### *5.3.4.- Asfaltenos*

En cuanto al efecto de los lavados con surfactantes del suelo contaminado con asfaltenos, en la figura 5.9 se observa, que en el primer lavado el Tergitol NP-10 fue capaz de remover el 27 % de los asfaltenos iniciales en comparación con el 18 % para el biosurfactante; en cambio en el tercero y cuarto lavado se obtuvo una reducción mayor por parte del biosurfactante, y finalmente al 7° lavado se logró una remoción del 66.6% respecto a la concentración inicial, en comparación con el 87.4 % del Tergitol NP-10.

Lo anterior es importante debido a que los asfaltenos son una fracción de los hidrocarburos que es de difícil degradación por lo que, solubilizarlo sería muy útil en un proceso de remediación, ya que podría separarse esta fracción del suelo contaminado y dejar los hidrocarburos que sean más degradables y/o recuperables, para su posterior utilización y/o tratamiento.

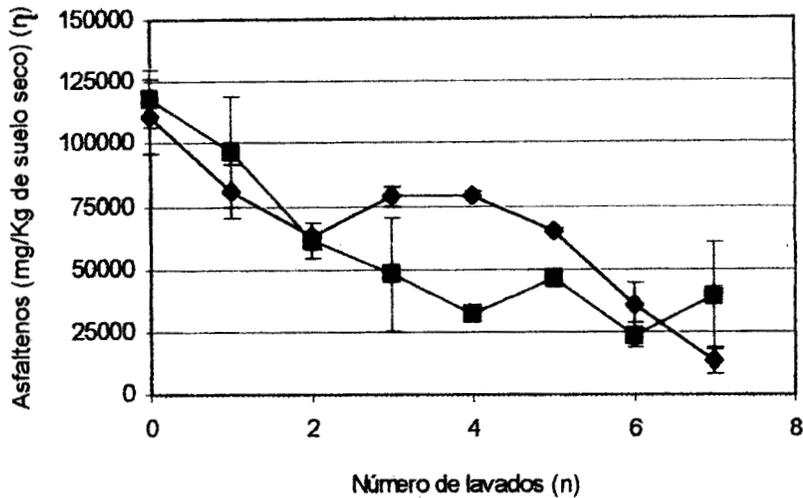


Figura 5.9.- Asfaltenos residuales en suelo lavado con Tergitol NP-10 --◆-- y el biosurfactante producido por *K. Pneumoniae* --■--.

Con la finalidad de establecer las diferencia en la desorción de la fracción de asfaltenos por el uso de ambos surfactantes, se realizó un análisis comparativo similar al aplicado en los casos anteriores. Las ecuaciones y sus derivadas se muestran a continuación:

Ecuación para Tergitol NP-10 es:

$$\eta = 377.61n^4 - 6480.2n^3 + 34340n^2 - 66739n + 113731$$

Primera derivada:

$$d\eta/dn = 1510.44n^3 - 19440.6n^2 + 68680n - 66739$$

Ecuación para el biosurfactante es:

$$\eta = -66.467n^4 + 835.27n^3 - 51.275n^2 - 29759n + 121015$$

Primera derivada:

$$d\eta/dn = -265.868n^3 + 2505.81n^2 - 102.55n - 29759$$

Los resultados de la eficiencia relativa de solubilización de asfaltenos se muestran en la tabla 5.10.

Tabla 5.10.- Eficiencia relativa de remoción de asfaltenos en suelo lavado con Tergitol NP-10 y biosurfactantes producido por *K. Pneumoniae*.

NUMERO DE LAVADOS	TERGITOL NP-10	BIOSURFACTANTE
	$\frac{dn}{dn}$ (mg de asfalt./Kg de suelo por lavado)	$\frac{dn}{dn}$ (mg de asfalt./Kg de suelo por lavado)
1	-15989.16	-27621.608
2	4942.12	-22067.804
3	5117.48	-14692.796
4	-6400.44	-7091.79
5	-20549	-860
6	-28265.56	2407.37
7	-20487.48	1115.12

Con base a los resultados de la desorción de la fracción de asfaltenos por el uso de surfactantes, se observa que el biosurfactante mostró valores de eficiencia relativa mayores a los mostrados por el uso del Tergitol NP-10 hasta el 4° lavado, después tender a ser asintótico. De acuerdo a estos resultados el biosurfactante fue capaz de reducir más eficientemente la fracción de asfaltenos en los cuatro primeros lavados.

Si bien se conoce que esta fracción es de muy difícil desorción debido a la complejidad de su estructura molecular lo cual favorece los fenómenos de sorción tanto a las partículas del suelo como a la materia orgánica (Deschenes y col., 1995); el presente caso no es así, y esto puede ser debido a la textura arenosa del suelo seleccionado, ya que se sabe que la sorción de los hidrocarburos en los suelos se da por la interacción con la materia orgánica y la partículas del suelo principalmente, los cuales a diferencia de los suelos arcillosos, el arenoso presenta menos superficie de contacto lo que puede facilitar su desorción por parte del uso de surfactantes (Dragun, 1998).

### 5.3.5.- Hidrocarburos polares

En la figura 5.10 se muestran los resultados correspondientes al lavado de la fracción polar. En ella se observa la curva de desorción de los hidrocarburos polares al utilizar biosurfactante de *K. pneumoniae* fue de 21% al primer lavado contra el 2% logrado con el Tergitol NP-10; sin embargo, en el 7° lavado el biosurfactante llegó a 39.9 % contra el 48.3% del Tergitol.

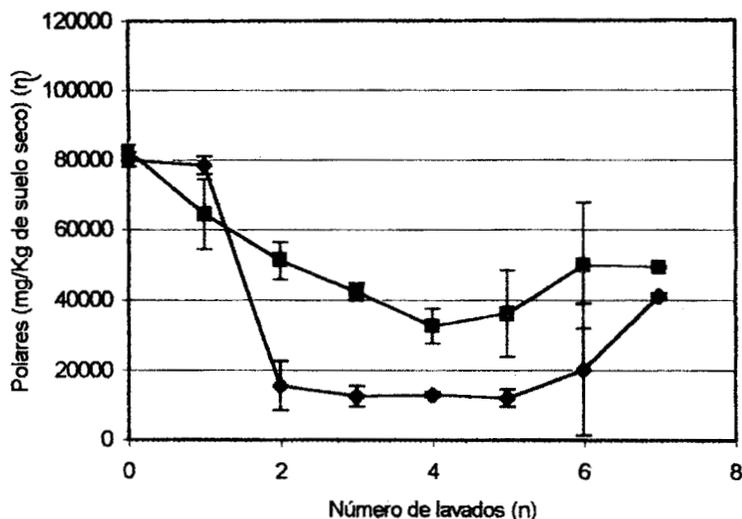


Figura 5.10- Hidrocarburos polares residuales en suelo lavado con Tergitol NP-10 --◆-- y el biosurfactante producido por *K. Pneumoniae* --■--.

En este caso se determinó la eficiencia relativa de desorción de polares por el uso del Tergitol NP-10, para comprobarlo se realizó el análisis de las velocidades de desorción de polares por lavado para su comparación.

Ecuación para Tergitol:

$$\eta = -271.75n^4 + 3908.1n^3 - 13203n^2 - 12363n + 84641$$

Derivada:

$$d\eta/dn = -1087n^3 + 11724.3n^2 - 26406n - 12363$$

Ecuación para Biosurfactante:

$$\eta = -143.7n^4 + 1951.2n^3 - 5702.3n^2 - 10857n + 82047$$

Derivada:

$$d\eta/dn = -574.8n^3 + 5853.6n^2 - 11404.6n - 10857$$

Los resultados de eficiencia relativa de solubilización de la fracción polar se muestran en la tabla 5.11.

Tabla 5.11.- Eficiencia relativa de remoción de polares en suelo lavado con Tergitol NP-10 y biosurfactante producido por *K. Pneumoniae*.

NÚMERO DE LAVADO	TERGITOL NP-10	BIOSURFACTANTE
	$\frac{d\eta}{dn}$ (mg de polares/Kg de suelo por lavado)	$\frac{d\eta}{dn}$ (mg de polares/kg de suelo por lavado)
1	-16982.8	-28131.7
2	-14851.4	-26973.8
3	-7911.6	-15411.3
4	387.8	33.8
5	6598	12839.5
6	7270.2	16483.8
7	-1044	4444.7

De acuerdo con el análisis de los valores de las eficiencias relativas por el uso de cada surfactante empleado, se comprobó que en el primero segundo y tercer lavado el utilizar el biosurfactante, favoreció en mayor medida la desorción de esta fracción con respecto al Tergitol. Una explicación a este fenómeno nuevamente se refiere a la naturaleza arenosa del suelo, ya que sus características fisicoquímicas como es la menor superficie de contacto respecto a las arcillas, hace que se puedan favorecer más los fenómenos de desorción. Por lo tanto los polares se remueven más eficientemente con el biosurfactante producido por *K. pneumoniae* respecto al Tergitol NP-10.

En resumen, con los resultados obtenidos de los experimentos de lavado de suelo se concluye que de manera global en el primer lavado, se remueve la mayoría de los hidrocarburos comparado con los subsiguientes lavados. Así mismo, en el primero, el biosurfactante fue capaz de desorber con mas eficiencia que el Tergitol NP-10 las siguientes fracciones: aromáticos, polares, alifáticos y por último los asfaltenos, por lo tanto se utilizará la cantidad de surfactante equivalente a un lavado para los experimentos de biodegradación.

#### **5.4.- Eficiencia relativa de solubilización de HTP y sus fracciones, con relación a la cantidad de surfactante empleado**

Se calcularon las eficiencias relativas de solubilización de hidrocarburos y sus fracciones, las cuales representan la cantidad de hidrocarburos desorbidos por la cantidad de biosurfactante empleado por lavado, respecto a la cantidad de hidrocarburos desorbidos por la cantidad de Tergitol NP-10 utilizado por lavado; los criterios de análisis de resultados son los siguientes:

- *Si el cociente es mayor ó igual a 1, el biosurfactante solubiliza más cantidad de hidrocarburos con respecto al de referencia.*
- *Si el cociente es menor a 1, el surfactante de referencia es mejor.*

Los resultados de eficiencias para cada fracción respecto al número de lavados se muestran en la figura 5.11.

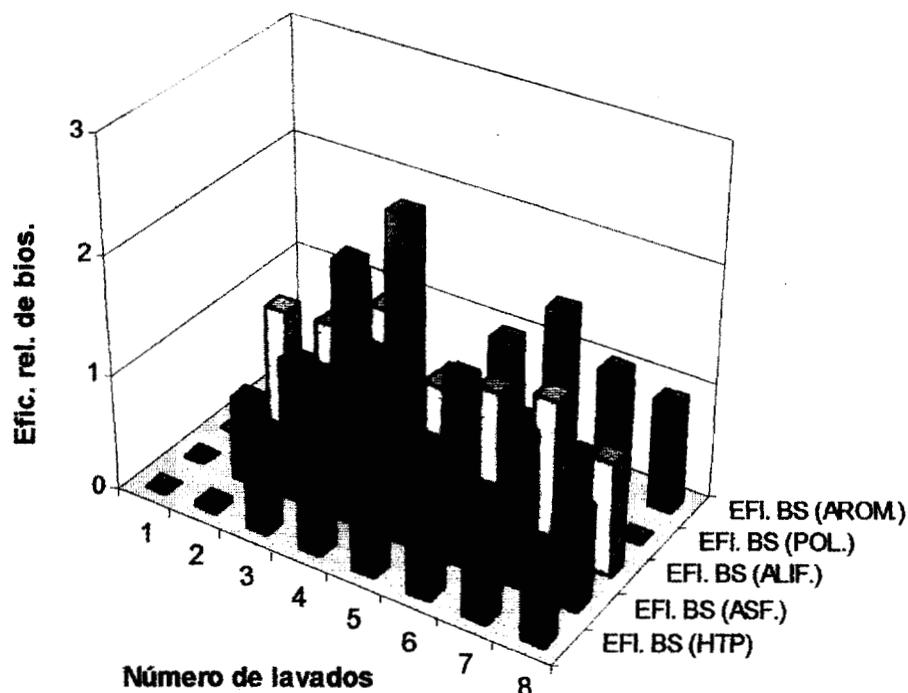


Figura 5.11.- Eficiencia relativa de solubilización de HTP y sus fracciones por biosurfactante, respecto al Tergitol NP-10 por número de lavado: eficiencia de remoción de: HTP ■, asfaltenos ■, alifáticos □, polares ▨, aromáticos ▩.

Estos resultados de máxima remoción se muestran en el resumen de la tabla 5.12, los valores se calcularon mediante el cociente de los mg de los HTP ó su fracción removidos por el biosurfactante entre los mg de los HTP removidos por el Tergitol NP-10.

Tabla 5.12.- Valores de eficiencia relativa de solubilización de HTP y sus fracciones del biosurfactante de *K. pneumoniae* respecto al Tergitol NP-10.

<b>Hidrocarburos</b>	<b>Eficiencia</b> <i>(mg de HC. rem. por biosurf./mg de HC rem. por Tergitol.)</i>	<b>Lavado No.</b>
Hidrocarburos totales del petróleo (HTP)	1.85	4
Asfaltenos	2.72	4
Alifáticos	1.58	3
Polares	1.01	4
Aromáticos	1.35	2

De acuerdo con los datos de eficiencia obtenidos y comparando las eficiencias entre cada una de las fracciones para los diferentes lavados, se observa que en la mayoría de los casos el valor de la eficiencia es mayor a 1, por lo tanto el biosurfactante mostró una mayor capacidad de remover hidrocarburos que el surfactante comercial de referencia: Tergitol NP-10.

Analizando individualmente las máximas eficiencias relativas para cada una de las fracciones de hidrocarburos, se observa que el biosurfactante fue capaz de remover 1.8 veces los HTP respecto al Tergitol NP-10 en el cuarto lavado; así mismo el biosurfactante fue 2.7 veces más eficiente en remover los asfaltenos, que al utilizar el Tergitol NP-10 en el cuarto lavado. En cuanto a la remoción de alifáticos se encontró que el biosurfactante fue 1.5 veces más eficiente que el Tergitol NP-10, en el tercer lavado. La eficiencia de remoción de la fracción polar, resultó ser mayor en el cuarto lavado por el uso del biosurfactante. Por último en cuanto a la eficiencia de remoción de la fracción aromática, esta fue de 1.3 veces al utilizar el biosurfactante en el segundo y quinto lavado

Con base a lo anterior se puede concluir que la eficiencia relativa de solubilización de hidrocarburos y sus fracciones por el uso del biosurfactante producido por *K. pneumoniae*, resultó ser mayor que la del Tergitol NP-10 de la siguiente manera: los asfaltenos se removieron en mayor proporción que los HTP, seguido de los alifáticos, los aromáticos y por último los polares.

## **5.5.- Biodegradación de HTP y sus fracciones en suelo contaminado**

### **5.5.1.- Biodegradación de hidrocarburos totales del petróleo**

Con la finalidad de establecer un análisis comparativo entre el uso del biosurfactante producido por *K. pneumoniae* con el Tergitol NP-10 en la

biodegradación de hidrocarburos en el suelo seleccionado. Se compararon las curvas de remoción de hidrocarburos y sus fracciones para cada una de las unidades experimentales. En cada una de las subsiguientes gráficas se representa en la ordenada los hidrocarburos residuales (totales como sus fracciones) en el suelo y no se determinaron en el sobrenadante. En primera instancia, figura 5.12, se presentan las curvas de remoción de HTP lograda por el biosurfactante en presencia del suelo contaminado y microorganismos degradadores de hidrocarburos.

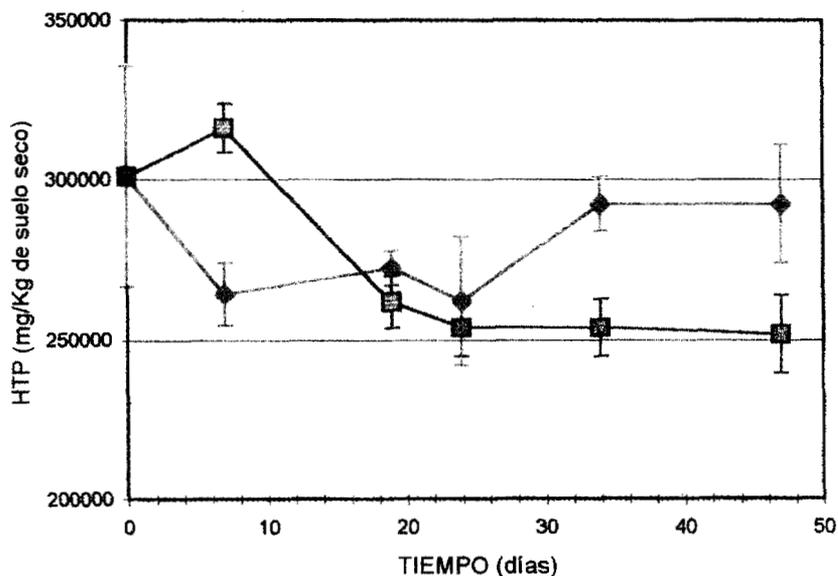


Figura 5.12.- HTP residuales en suelo del cultivo que contiene: biosurfactante y microorganismos degradadores de hidrocarburos -◆-, control estéril con biosurfactante -■-.

De igual forma en la figura 5.13, se muestra la remoción de los HTP mediante el uso del Tergitol NP-10.

225552

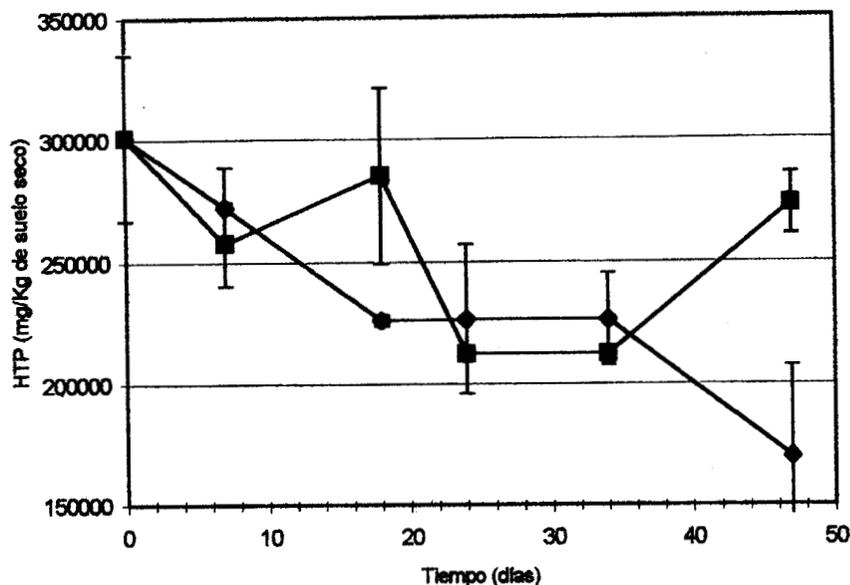


Figura 5.13.- HTP residuales en suelo del cultivo que contiene: Tergitol y microorganismos degradadores de hidrocarburos -♦-, control estéril y Tergitol -■-.

Comparando los valores de HTP residuales en el cultivo que contiene el suelo contaminado con el surfactante Tergitol NP-10 con el que contiene el biosurfactante de *Klebsiella pneumoniae*, se observa una reducción para ambos casos del 9% a los primeros 19 días, posteriormente con el cultivo que contenía el Tergitol NP-10 se logró una remoción final a los 47 días del 43%, en tanto que el cultivo con biosurfactante removió el 12.8% de los HTP presentes.

En cuanto a los controles sin microorganismos degradadores (estériles) y solo el surfactante de referencia (figura 5.13) mostraron una reducción final promedio del 19.3%, en cambio el control con biosurfactante mostró una reducción del 13.4%, es conveniente señalar que en éstas unidades experimentales no se detectó la presencia de microorganismos, lo cual indica que la remoción de hidrocarburos fue debida solo a la acción de los surfactantes adicionados.

En la figura 5.14 se muestran los valores de hidrocarburos residuales en los testigos que solamente contenían los microorganismos nativos del suelo.

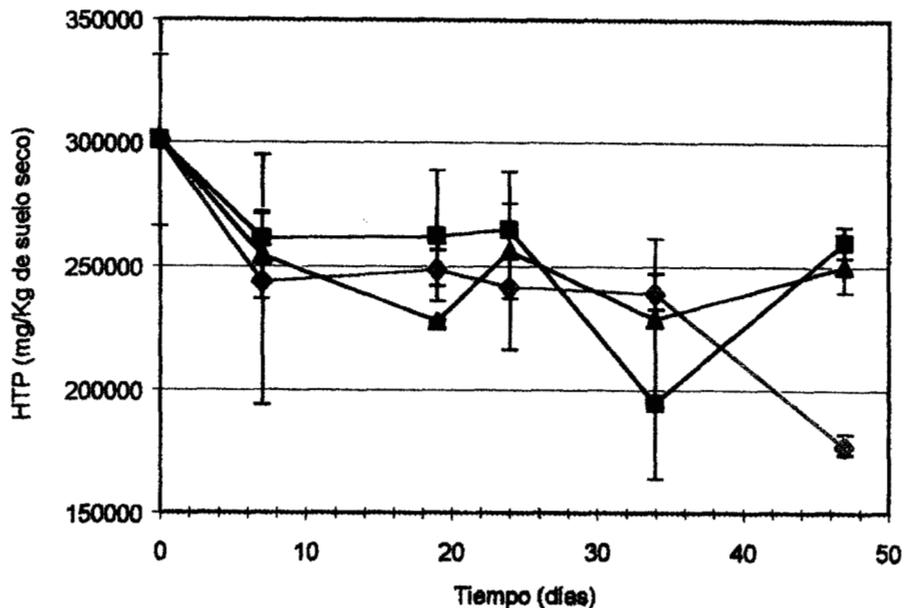


Figura 5.14.- HTP residuales en testigos que contienen: microorganismos degradadores de hidrocarburos -◆-, Tergitol -■-, biosurfactante -▲-.

Comparando los valores de remoción de HTP entre cultivos, testigos y controles, se observó lo siguiente: el cultivo con Tergitol NP-10 mostró una reducción final del 43.4%; en cambio, su testigo presentó una reducción del 13.5%, y su control de 19.3%, por lo tanto la diferencia en reducción adicional del 24% fue debida a la biodegradación; esto ocurrió en menor medida al utilizar el biosurfactante, ya que su cultivo logró una remoción del 12.8%, su control 13.4% y el testigo del 16.8%, lo que significa una contribución por degradación de solo 3.4% del testigo sobre el control ya que el cultivo resultó ser menor, estos resultados indican que: i) el Tergitol NP-10 contribuye a la biodegradación de los HTP, ii) el biosurfactante contribuye en menor proporción la biodegradación de los HTP, iii) parece haber una utilización como nutriente del surfactante por los microorganismos presentes en las unidades experimentales. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Sugira y col., 1997, en donde un petróleo tratado térmicamente e sometió a degradación, obteniéndose del 19 al 34% de

degradación a los 29 días de cultivo. En cuanto a la concentración de hidrocarburos utilizada en los experimentos se puede considerar alta (aproximadamente del 30%) con respecto a la mayoría de los experimentos reportados, tanto en suelo contaminado y en medio líquido, ya que las concentraciones de hidrocarburos utilizadas son de aproximadamente un orden de magnitud e incluso menores. Por ejemplo se encontró que en la degradación de desechos de aceites lubricantes se obtuvieron buenas degradaciones a concentraciones del 2%, y nada de degradación al usar el 30% (Prince y Sambasivam, 1993). En cuanto al uso de biosurfactantes en la degradación de hidrocarburos, se ha encontrado que por lo general favorecen la biodegradación, por ejemplo en la degradación de desechos aceitosos se encontró una remoción del 26% (Rocha e Infante, 1997).

Con la finalidad de complementar el análisis de la biodegradación y conocer de manera global el destino de las fuentes de carbono presentes en cada una de las unidades experimentales, se realizó un balance de carbono, mediante el cálculo del contenido del carbono aportado por cada una de las especies moleculares presentes por unidad experimental; para el caso de mezclas complejas de hidrocarburos como los HTP, se tomaron como modelo dos moléculas modelos de cada fracción, sin considerar la fracción de asfaltenos debido a que no se degradan. Así mismo, se consideró el carbono contenido en los microorganismos presentes en los cultivos, la materia orgánica del suelo, el contenido en las moléculas de los surfactantes adicionados y el CO<sub>2</sub> producido por cada unidad experimental, el cual fué medido durante todo el experimento y cuya gráfica se muestra en la figura 5.15.

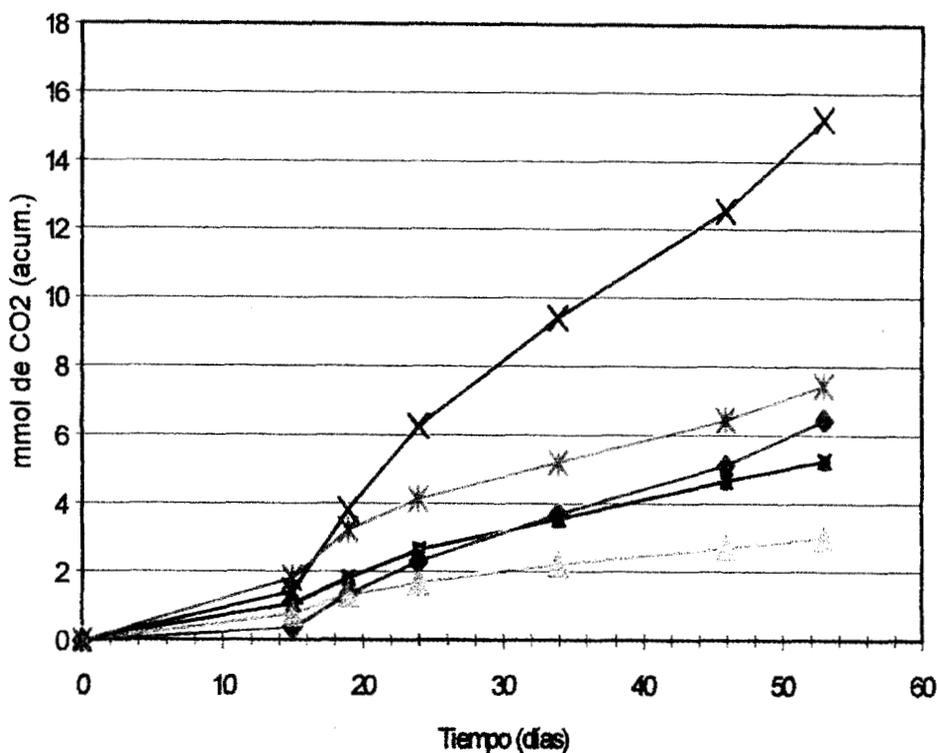


Figura 5.15.- Evolución de CO<sub>2</sub> acumulada en las unidades experimentales: -▲- biosurfactante, -■- microorganismos degradadores de hidrocarburos, -◆- Tergitol, -\*-\* biosurfactante con microorganismos degradadores de hidrocarburos, -X- Tergitol con microorganismos degradadores de hidrocarburos.

Con base a lo anterior se obtuvieron los valores de carbono para cada una de las especies consideradas, los resultados se muestran en la tabla 5.13.

Tabla 5.13.- Valores del contenido de carbono en cada uno de los componentes de las unidades experimentales.

Unidad experimental	Carbono (mg/U.E.)						
	HTP	HTPres.	Biomasa	Materia orgánica	Tergitol	Biosurf.	CO <sub>2</sub>
microorganismos degradadores de hidroc.	1281	755.750	210	140.2	NA	NA	62.41
Tergitol	1281	1107.99	69.18	140.2	97.05	NA	77.29
Bisurfactante	1281	1065.54	85.15	140.2	NA	38.32	36.27
Tergitol + microorganismos degradadores de hidroc.	1281	724.32	222.58	140.2	97.05	NA	181.6
Biosurfactante + microorganismos degradadores de hidroc.	1281	1245.19	14.32	140.2	NA	38.32	89.12

Donde: HTP.- Hidrocarburos totales del petróleo; HTPres.- Hidrocarburos totales del petróleo a los 47 días; NA.- No adicionado.

Se obtuvo la ecuación de balance global de carbono, cuyo desarrollo se muestra en la sección de anexos y la cual se representa por la siguiente expresión:

$$\text{Carbono}_{\text{Total Inicial}} = \text{Carbono}_{\text{biomasa}} + \text{Carbono}_{\text{CO}_2} + \text{Carbono}_{\text{subproductos}} + \text{Carbono}_{\text{residual}} + \text{Carbono}_{\text{materia orgánica}}$$

De la ecuación de balance global es posible calcular todos sus miembros, a excepción del carbono<sub>subproductos</sub>, el cual será calculado por diferencia y será analizado de acuerdo a lo que se especifica en la tabla 5.14.

Tabla 5.14.- Interpretación de los valores obtenidos para el carbono<sub>subproductos</sub>

Valor de carbono <sub>subproductos</sub>	Interpretación
Cero	Hay consumo total del carbono: mineralización.
Positivo	Acumulación de subproductos: desorción de HTP, biotransformación y baja mineralización.
Negativo	Hay un aporte adicional de fuente de carbono al de los HTP.

Notas:

*Biotransformación*.- Modificación de una o algunas moléculas por acción microbiana en formas más oxidadas.

*Aporte adicional de fuente de carbono*.- se refiere a aquellas especies moleculares que pueden ser fuente de carbono para los microorganismos, como son los surfactante adicionados.

De acuerdo a las consideraciones anteriores, los resultados numéricos del balance para el carbono<sub>subproductos</sub> se muestran en la tabla 5.15.

Tabla 5.15.- Resultados del contenido de carbono<sub>subproductos</sub> por cada tratamiento.

Tratamiento	Carbono <sub>subproductos</sub> (Tergitol NP-10)	Carbono <sub>subproductos</sub> (Biosurfactante)	Carbono <sub>suelo</sub>
MO deg. de HC	---	---	112.64
Tergitol NP-10	- 210.71	---	---
Biosurfactante	---	- 85.47	---
Tergitol + MO. deg. de hidroc.	- 84.75	---	---
Biosurf. + MO. deg. de hidroc.	---	- 246.14	---

En los datos mostrados en la tabla anterior se observa que en todos los casos en donde se utilizaron los surfactantes, tanto el sintético como el biológico, se obtuvieron valores negativos para el carbono<sub>subproductos</sub>, lo cual significa que hubo un aporte adicional a la fuente de carbono que podría provenir del surfactante o biosurfactante, por lo que se puede suponer que estos se biodegradan además de los HTP presentes.

Por otra parte, el testigo que contiene sólo el suelo contaminado sin esterilizar mostró un valor positivo en el balance de carbono, lo que significa que hay una acumulación de subproductos que proceden de la biotransformación de los hidrocarburos, y que se refleja en el valor de reducción de hidrocarburos que fue del 41%.

Respecto los resultados de la producción de CO<sub>2</sub>, por cada unidad experimental, la mayor producción de CO<sub>2</sub> se encontró en el cultivo que contenía el Tergitol NP-10 y microorganismos degradadores de hidrocarburos, seguido del cultivo con biosurfactante y microorganismos degradadores de hidrocarburos; siguiendoles los testigos con microorganismos degradadores; por último el que presentó menor producción de CO<sub>2</sub> fue el testigo con biosurfactante. De acuerdo a los resultados derivados del balance de carbono se observó que el cultivo con Tergitol fue el que produjo mayor cantidad de CO<sub>2</sub>, mostró mayor degradación y un valor negativo de carbono<sub>subproductos</sub> cercano a cero, lo que significa que favoreció la biodisponibilidad de los HTP; al utilizar el biosurfactante se observó una menor degradación, un valor mas negativo del carbono<sub>subproductos</sub> y una menor producción de CO<sub>2</sub> con respecto al Tergitol, esto significa que los microorganismos degradadores de hidrocarburos consumen parte del biosurfactante y los microorganismos nativos del suelo degradan preferentemente los HTP en presencia del biosurfactante.

Respecto al número de microorganismos presentes en las unidades experimentales, se observó mayor desarrollo para microorganismos degradadores de hidrocarburos al utilizar ambos surfactantes (figura 5.16).

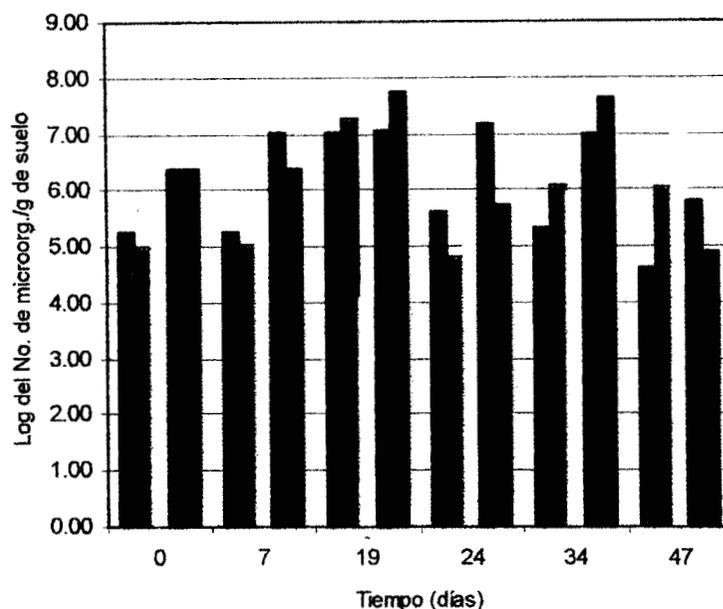


Figura 5.16.- Cuenta de microorganismos degradadores de hidrocarburos en sobrenadante de las unidades experimentales: ■- Tergitol con microorg. deg. de HC, ■- biosurfactante con microorg. deg. de HC., - - biosurfactante, ■- Tergitol, ■- microorg. degradadores.

Las cuentas de microorganismos degradadores de hidrocarburos en los cultivos y testigos (figura 5.16), se observa que en el cultivo que contiene biosurfactante y microorganismos degradadores, presentó un comportamiento con una ligera tendencia al incremento, al igual que el cultivo que contiene el Tergitol y microorganismos degradadores, lo cual explica la actividad degradadora en las unidades experimentales.

De acuerdo a lo anterior al comparar con los valores finales de degradación se concluye que el cultivo con Tergitol NP-10 y microorganismos degradadores de hidrocarburos presentó mayor remoción de HTP, en cambio al utilizar el

biosurfactante se logró una mejor remoción sin la presencia de microorganismos degradadores de hidrocarburos pero inferior respecto al Tergitol. Sin embargo es necesario determinar que fracciones de los hidrocarburos son las que se biodegradan más y así establecer diferencias más específicas de su acción.

### 5.5.2.- Biodegradación de hidrocarburos alifáticos

La reducción de alifáticos observada en cada una de las unidades experimentales se ilustra en la figura 5.17, en la que se observa primeramente que en el cultivo que contenía el biosurfactante se logró reducir el contenido de hidrocarburos alifáticos en un 95.4% a los 34 días; así mismo, en el cultivo con Tergitol NP-10 (figura 5.18), se redujeron el 95.5% de los alifáticos a los 47 días, en cambio en sus respectivos controles no se produjo una reducción clara de esas fracciones.

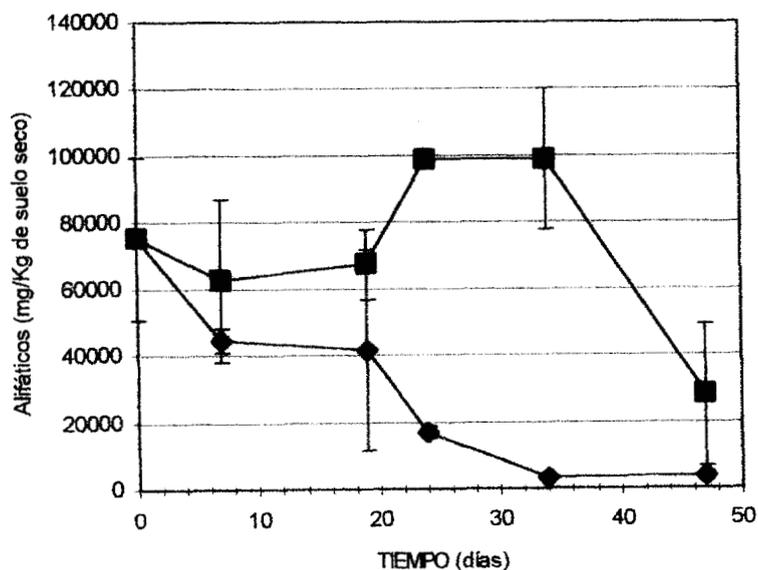


Figura 5.17.- hidrocarburos alifáticos residuales en suelo del cultivo que contiene: biosurfactante y microorganismos degradadores de hidrocarburos -◆- y su control: biosurfactante en condiciones estériles -■-.

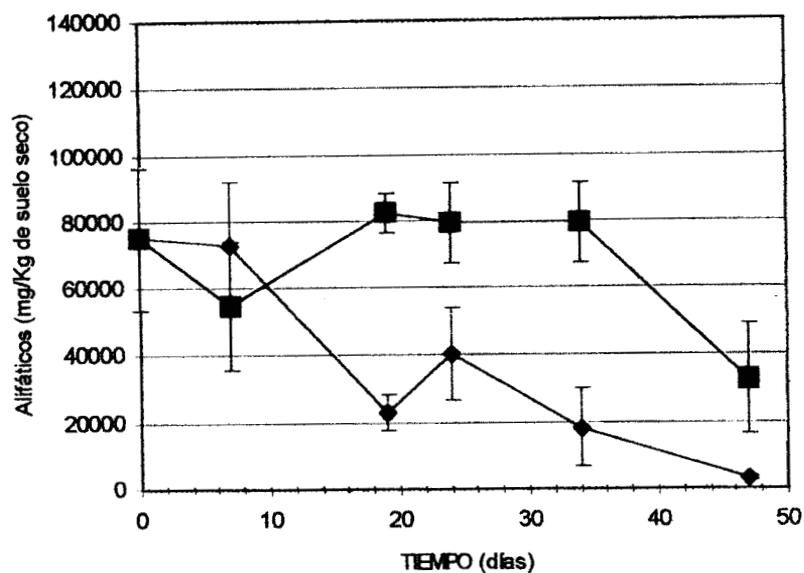


Figura 5.18.- Hidrocarburos alifáticos residuales en suelo del cultivo que contiene: Tergitol NP-10 y microorganismos degradadores de hidrocarburos -◆-y su control:Tergitol NP-10 en condiciones estériles -■-.

En la figura 5.19, se observa que los testigos no estériles lograron una reducción de la fracción alifática del 93.5% para el Tergitol NP-10 y del 85.5% para el que contenía solamente microorganismos degradadores de hidrocarburos, en cambio el testigo que contenía el biosurfactante y suelo contaminado, logró una reducción final de la fracción alifática del 58%.

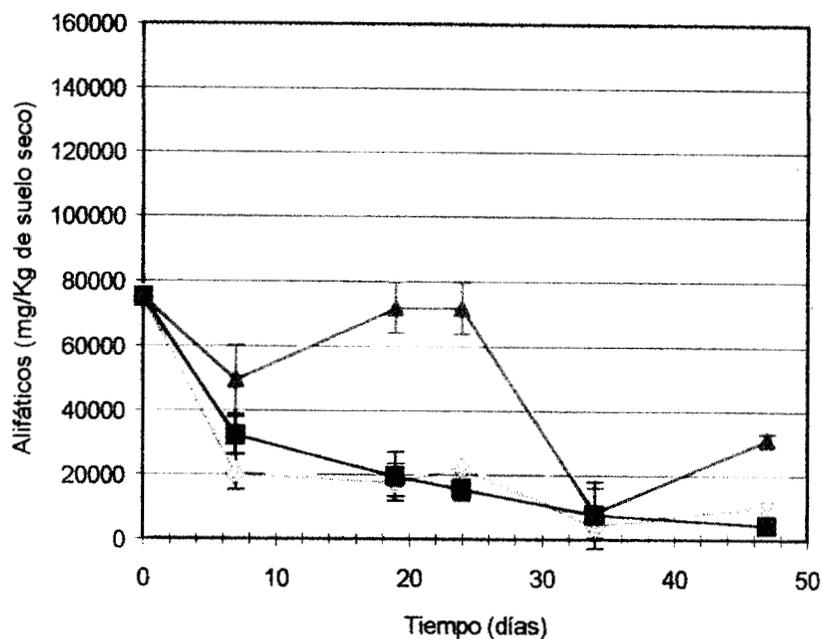


Figura 5.19.-Alifáticos residuales en testigos que contienen: microorganismos degrad. de hidrocarburos ◆, Tergitol ■, biosurfactante ▲.

De acuerdo con los datos anteriores se observó que el uso de ambos surfactantes favorecen la biodegradación de la fracción alifática, sin embargo la diferencia en la biodegradación entre el cultivo y su testigo fue baja cuando se utilizó el Tergitol NP-10; y fue ligeramente mayor en un 2% para el cultivo; en cambio esta diferencia fue superior al usar el biosurfactante y microorganismos degradadores de hidrocarburos, lograndose un 37.5% adicional. Por lo tanto, se puede concluir que el uso de ambos surfactantes favorece la biodegradación de la fracción alifática, siendo el biosurfactante el que la favorece en mayor medida, ya que en menor tiempo degradó el 95% de los alifáticos, a diferencia del Tergitol NP-10 que presentó resultados similares pero a los 47 días de experimentación. Estos resultados concuerdan con la tendencia del número de microorganismos degradadores de hidrocarburos la cual presenta un ligero incremento para los cultivos que contienen ambos surfactantes, que fueron los que presentaron los niveles de CO<sub>2</sub> más altos comparados con las demás unidades experimentales. Los niveles de biodegradación encontrados son comparables a los reportados en

la bibliografía, donde se menciona que esta fracción es la más fácil de biodegradar (Atlas, 1984).

### 5.5.3.- Biodegradación de hidrocarburos aromáticos

Respecto al análisis de la fracción aromática en los cultivos se observa en la figura 5.20 que el cultivo con biosurfactante mostró una reducción de la fracción aromática a los 34 días de experimento del 81.9%, en tanto su control logró una remoción ligeramente superior del 83.3% pero a los 47 días, es conveniente señalar que en esta unidad experimental a los 19, 24 y 34 días, la concentración de la fracción aromática se mantuvo constante, por lo que presentó desorción hasta los 47 días de experimentación; en cambio el cultivo presentó valores más consistentes hacia la disminución en la concentración a partir de los 19 días, este efecto es debido a la actividad microbiana.

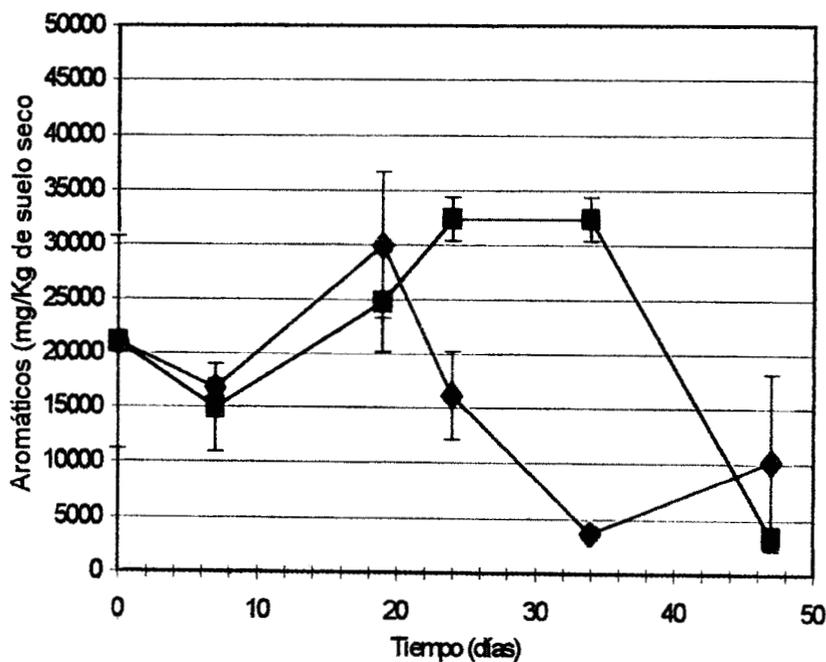


Figura 5.20.- Fracción aromática residual en suelo del cultivo que contiene: biosurfactante y microorganismos degrad. de hidrocarburos -♦- control estéril con biosurfactante -■-.

En tanto el cultivo que contenía el Tergitol NP-10 y microorganismos degradadores de hidrocarburos, mostró una reducción del 93.5% a los 47 días, en cambio su control presentó una reducción del 62%, estos resultados son mostrados en la figura 5.21. Es conveniente señalar que el comportamiento gráfico de la fracción aromática mostrada por los controles durante el tiempo de experimentación mostró una tendencia a mantenerse constante esto es debido a que la fracción aromática está formada principalmente por moléculas de elevado peso molecular y conformados básicamente por unidades bencénicas de diferente complejidad, las cuales los HAP son los que tienden a sorberse con mayor fuerza a los componentes del suelo, por lo que es más difícil su desorción. Este hecho ha sido mencionado en la bibliografía donde se reporta que en suelos intemperizados contaminados con sustancias químicas, a mayor tiempo de intemperización la resistencia a la desorción se incrementa; así mismo los HAP se sorben más fuertemente en algunas fracciones de hidrocarburos como lo es la orgánica así como en los poros de los suelos (Volkering y col., 1992), por lo tanto la diferencia en la reducción de esta fracción por el uso del Tergitol NP-10, entre el cultivo y su control es debida a la biodegradación.

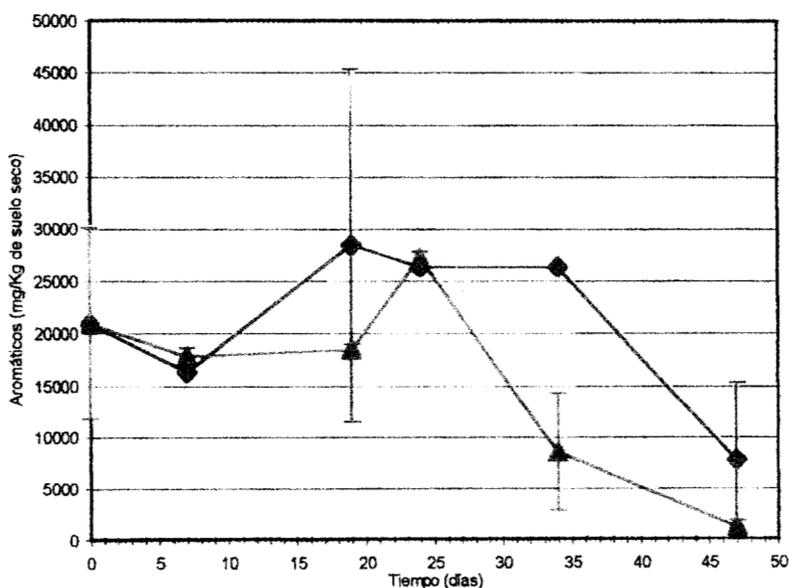


Figura 5.21.- Aromáticos residuales en suelo del cultivo que contiene: Tergitol NP-10 y microorganismos degrad. de hidrocarburos -◆- control estéril -■-

Comparando ambos cultivos (figuras 5.20 y 5.21), se observa que hasta los 34 días de experimento se obtuvo una biodegradación del 81.9% al utilizar el biosurfactante, contra el 58.8% logrado por el Tergitol NP-10, sin embargo a los 47 días, éste último surfactante logró remover el 93.5% contra el 81.7% del biosurfactante, este hecho es importante ya que al parecer existen diferencias en la velocidad de biodegradación de esta fracción.

En la figura 5.22, se observa en los testigos un comportamiento similar en la reducción de la fracción aromática al utilizar el biosurfactante de *K. pneumoniae* y el Tergitol NP-10, así como el que contienen solamente los microorganismos degradadores de hidrocarburos, sin embargo este último mostró una reducción de la fracción aromática del 79.6%, la cual fue inferior en la mayoría de los tiempos evaluados con respecto a otros testigos con biosurfactante o Tergitol NP-10, que lograron porcentajes de remoción de 84.6% y 80.6% respectivamente.

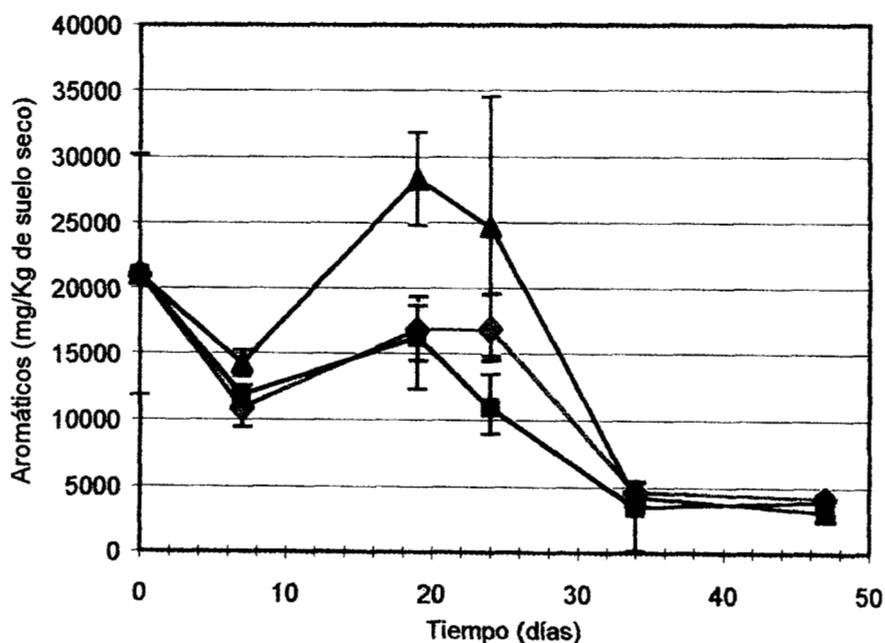


Figura 5.22.-Aromáticos residuales en testigos que contienen: microorganismos degradadores de hidrocarburos -◆-, Tergitol -■-, biosurfactante -▲-.

Estos resultados demuestran que i) el uso de ambos surfactantes favorecen la biodegradación de la fracción de hidrocarburos aromáticos y ii) es indistinto utilizar microorganismos degradadores de hidrocarburos.

#### 5.5.4.- Biodegradación de hidrocarburos polares

La reducción de la fracción polar por parte del cultivo con biosurfactante, suelo y microorganismos degradadores de hidrocarburos fue del 65 % (figura 5.23), la cual resultó ser menor al cultivo que contiene Tergitol NP-10, microorganismos degradadores de hidrocarburos y suelo logrando una reducción del 90.8%.

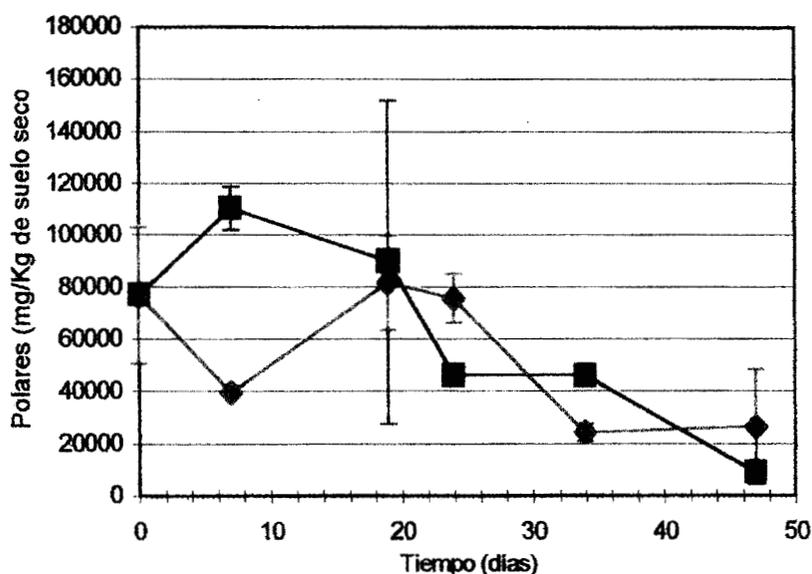


Figura 5.23.- Polares residuales en suelo del cultivo que contiene: biosurfactante y microorganismos degrad. de hidrocarburos -◆- control estéril con biosurfactante -■-.

En cambio el control que conteía biosurfactante y suelo, presentó una reducción de la fracción polar del 87.9%, mientras que su similar que conteia el Tergitol NP-10, logró una reducción del 83.7% (figura 5.24).

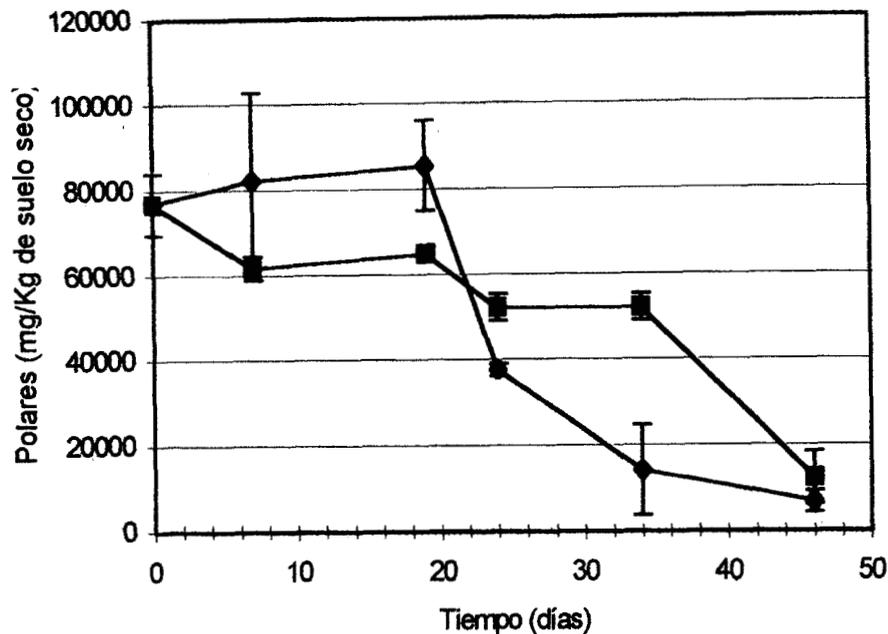


Figura 5.24.- Polares residuales en suelo del cultivo que contiene: Tergitol NP-10 y microorganismos degradadores de hidrocarburos -♦- control estéril con Tergitol -■-.

Los resultados muestran que existe una contribución a la remoción por degradación mediante el uso del Tergitol NP-10 del 7.6% (del cultivo respecto a su control); en cambio al utilizar el biosurfactante su control presentó mayor remoción de esta fracción que el cultivo; estos resultados indican que el Tergitol NP-10 contribuyó poco en la biodegradación de la fracción polar y el biosurfactante no lo hizo.

Respecto al análisis de los testigos (figura 5.25), el testigo con biosurfactante y suelo mostró una reducción del 87.1%, y el que contenía el Tergitol NP-10 del 79.9%. En contraste, con el testigo que contenía suelo y microorganismos degradadores de hidrocarburos se logró una remoción de la fracción polar del 92.5%.

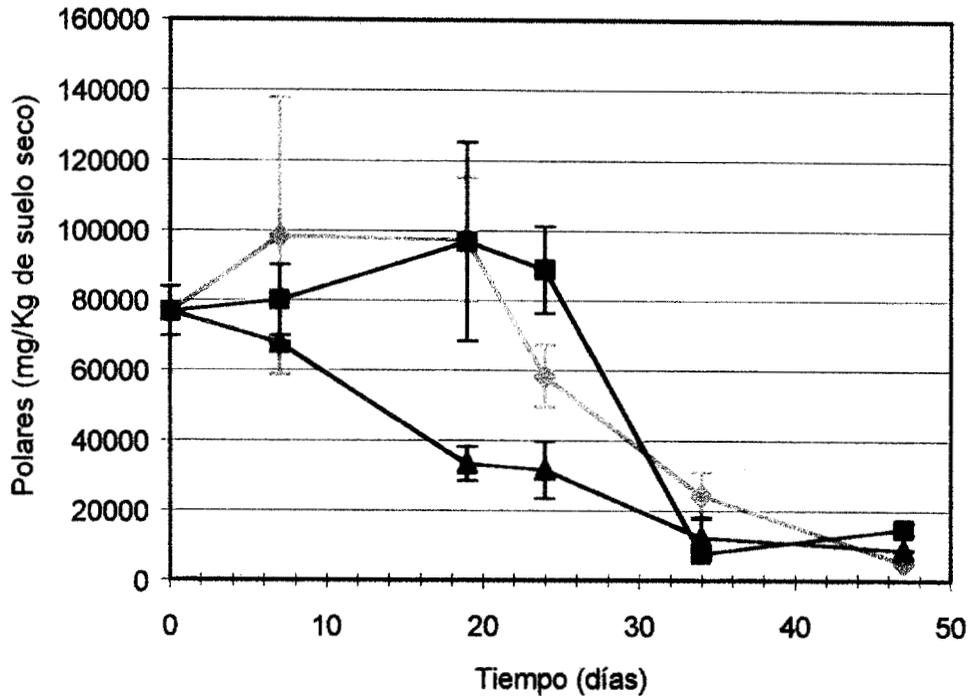


Figura 5.25.-Polares residuales en testigos que contienen: microorganismos degradadores de hidrocarburos y suelo -◆-, Tergitol con suelo -■-, biosurfactante con suelo -▲-.

Al comparar los resultados de remoción de la fracción polar entre los testigos, se observa que el testigo que contenía solamente microorganismos degradadores de hidrocarburos mostró una biodegradación muy parecida a la obtenida con el cultivo que contenía el Tergitol NP-10, suelo contaminado y microorganismos degradadores de hidrocarburos, esto indica que la sólo adición de microorganismos degradadores de hidrocarburos favoreció la biodegradación de la fracción polar. Resultados similares han sido reportados en la literatura, en donde se ha demostrado que el uso de biosurfactantes no favorecían *per se* la biodegradación de los hidrocarburos polares (Deschenes y col., 1996).

### 5.5.5.- Biodegradación de asfaltenos

De acuerdo a los resultados obtenidos se observa que al utilizar el biosurfactante tanto en el cultivo y su control (figura 5.26), se obtuvieron reducciones similares del orden del 41% a los 24 días, lo cual significa que la remoción fue debida a la desorción.

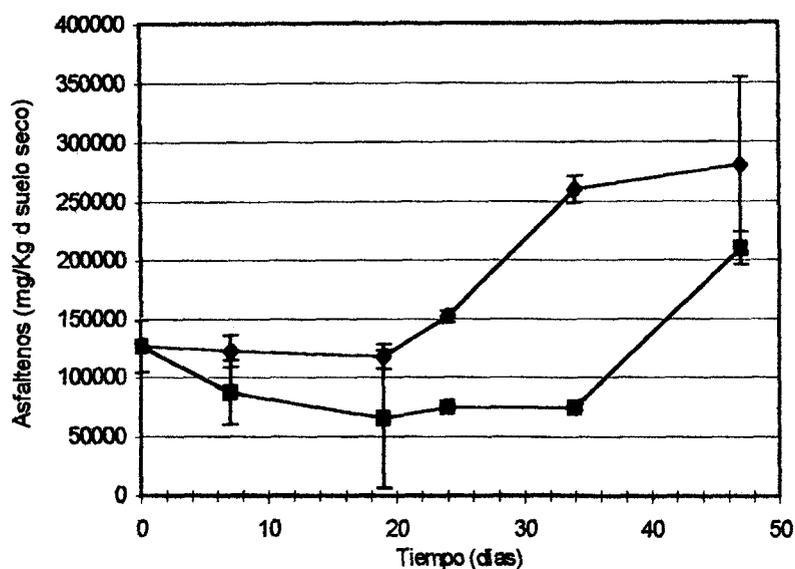


Figura 5.26.- Asfaltenos residuales en suelo del cultivo que contiene: biosurfactante y microorganismos degradadores de hidrocarburos -◆- control estéril con biosurfactante -■-.

Al utilizar el Tergitol NP-10 (figura 5.27), se observaron remociones del 52 al 57% mostrados por el cultivo y control respectivamente y no habiendo remoción en su testigo.

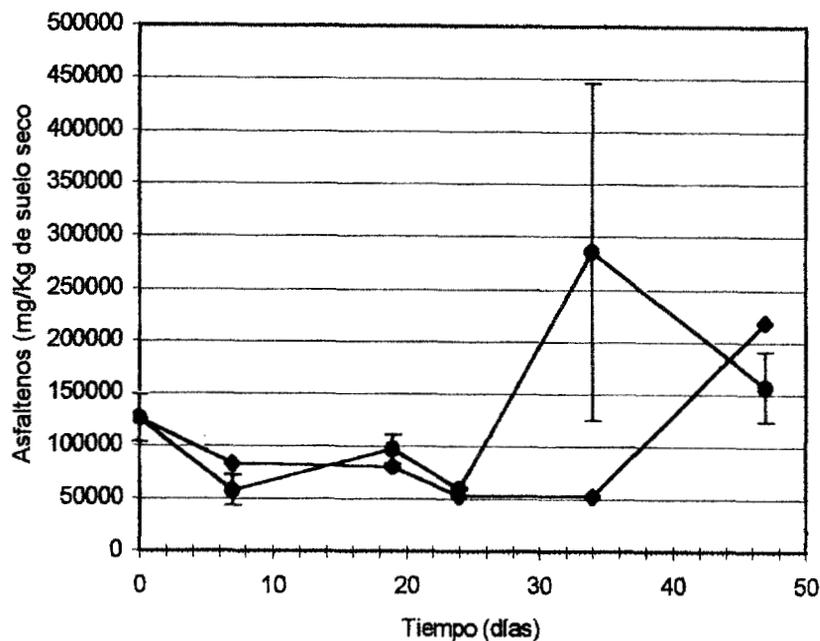


Figura 5.27.- Asfaltenos residuales en suelo del cultivo que contiene: Tergitol NP-10 y microorganismos degradadores de hidrocarburos -◆- control estéril con Tergitol -■-.

Así mismo el testigo que contenía microorganismos degradadores de hidrocarburos y el suelo contaminado, presentó remociones en esta fracción, similares al control con Tergitol NP-10 (figura 5.28).

Cabe hacer mención que después de los 24 días, en la mayoría de las unidades experimentales la fracción de asfaltenos tendía a acumularse. Una razón por la que se acumulan los asfaltenos puede ser porque después de los 24 días, la cantidad presente de surfactante ya no es capaz de desorberlos más y la concentración se mantiene constante y, como la concentración es expresada con relación al total de hidrocarburos presentes, se observa una acumulación.

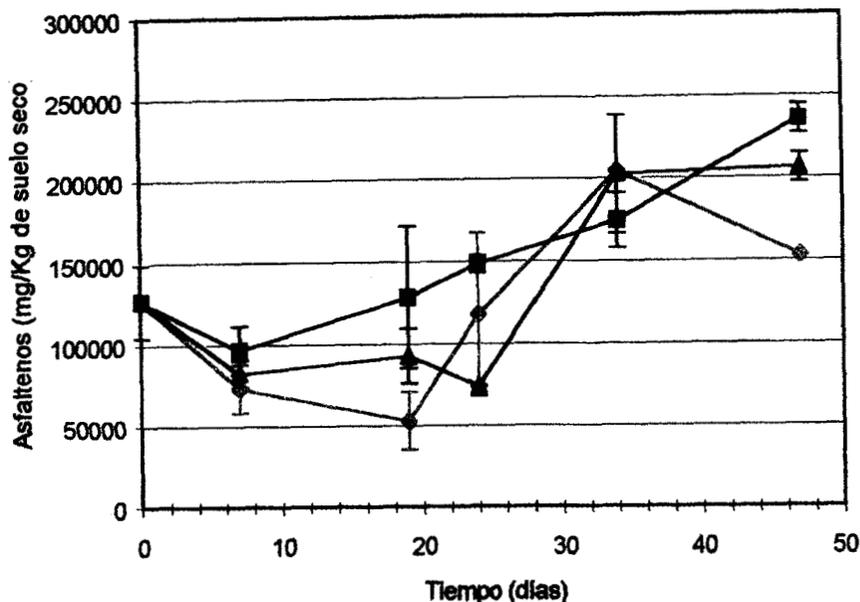


Figura 5.28.- Asfaltenos residuales en testigos que contienen: microorganismos degradadores de hidrocarburos y suelo -◆-, Tergitol con suelo -■-, biosurfactante con suelo -▲-.

Los resultados muestran que: i) no hubo biodegradación de asfaltenos, ii) la reducción en el contenido de la fracción de asfaltenos no fue debida a la desorción por los surfactantes adicionados, iii) en ambos casos se presentó una acumulación de esta fracción, lo cual se debió a la desaparición de las otras fracciones por lo que su proporción aumentó. Además, se utilizó menor cantidad de surfactante que su óptimo obtenido en los experimentos de sorción, por lo que su desorción fue diferente; también, de las características fisicoquímicas de las moléculas que conforman esta fracción, la cual está constituida por moléculas intemperizadas de alto peso molecular teniendo como principales características fisicoquímicas su baja solubilidad, poca volatilización, y una alta sorción en el suelo; esto es similar a lo que se ha reportado en bibliografía en donde se ha encontrado que, aunado a la degradación de alifáticos y aromáticos, la concentración de las resinas y asfaltenos persisten y tienden a incrementarse (Rocha e Infante C., 1997).

De acuerdo con los resultados anteriores se puede resumir que los surfactantes favorecen la biodisponibilidad de los hidrocarburos en el suelo contaminado de prueba, de acuerdo al resumen de resultados mostrado en la tabla 5.16:

Tabla 5.16.- Resumen de resultados de biodegradación de hidrocarburos y sus fracciones, así como los principales efectos

Fracción	Biodegradación (%)	Tiempo para máxima biodegradación (días)	Condiciones de tratamiento
HTP	43.45	47	Tergitol NP-10 y MO degradadores de hidrocarburos.
Alifáticos	95.4	34	Biosurfactante
Aromáticos	81.7	34	Biosurfactante y microorganismos degradadores de hidrocarburos consumo más rápido.
	93.0	47	Tergitol y flora nativa.
Polares	92.6	34	Microorganismos degradadores de hidrocarburos.

De acuerdo a resultados, se concluye que el biosurfactante producido por *Klebsiella pneumoniae* es capaz de favorecer la biodisponibilidad de la fracción aromática y alifática de manera similar y en algunos casos, mejor que el Tergitol NP-10; en cambio, este surfactante favoreció la biodisponibilidad de los HTP. En el caso de la fracción polar se encontró que solo era necesaria la adición de microorganismos degradadores de hidrocarburos que cualquiera de los surfactantes empleados en este trabajo para favorecer su biodegradación. Por último, la fracción de asfaltenos no fue biodegradada tendiendo a acumularse.

Con base en los resultados anteriores, el uso de biosurfactantes puede ser una alternativa que debe ser tomada en consideración en trabajos futuros sobre la biodegradación de hidrocarburos intemperizados, así como su posible participación en un proceso de lavado de suelo; además de aquellos, en donde se evalué la biodisponibilidad; aunado todo esto, a que hay escasos reportes

bibliográficos sobre *Klebsiella pneumoniae* como productor de biosurfactantes, así como la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas.

En cuanto al proceso de obtención del surfactante, todavía es necesario optimizar su producción, a fin de abatir costos y por lo tanto hacerlo competitivo con los productos comerciales. También es necesaria una evaluación de su uso en diferentes tipos de suelo contaminado, cuyo análisis permitirá que sea tomado en consideración como una buena alternativa de tratamiento tanto técnica como económicamente viable.

## 6.- CONCLUSIONES

- Se seleccionó el biosurfactante producido por la cepa de *Klebisella pneumoniae*, así como un surfactante sintético de referencia: Tergitol NP-10, debido a que presentaron los mayores valores de actividad emulsificante, estabilidad de emulsión y eficiencia en el lavado de suelos.
- El biosurfactante producido *Klebisella pneumoniae* fue más eficiente que el Tergitol NP-10 en remover los hidrocarburos y sus fracciones por cantidad de surfactante empleado, en el siguiente orden: asfaltenos > alifáticos > HTP > aromáticos > polares.
- La remoción de HTP y sus fracciones removidas por los surfactantes seleccionados, fueron mayores en los dos primeros lavados (excepto asfaltenos y polares).
- En los estudios de biodegradación se concluye que el biosurfactante producido por *Klebisella pneumoniae* fue capaz de favorecer la biodegradación de la fracciones alifática y aromática en un 95.4 % y 81.9% respectivamente.

## 7.- RECOMENDACIONES

- Aplicar el biosurfactante en otro tipo de sistemas de biodegradación y ante otro tipo de contaminantes hidrófobos a fin de ampliar su aplicación potencial.
- Determinar el tipo de moléculas que se degradan de la fracción aromática, mediante un análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas, a fin de evaluar si la aplicación de biosurfactantes favorece la biodegradación de los HAP de interés ambiental.
- Determinar la remoción de la fracción de asfalténos por el biosurfactante de *Klebsiella pneumoniae* en otro tipo de suelos, con la finalidad de conocer su efectividad de remoción.

## 8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdul S. A., Thomas L. G., Rai N. D. (1990). Selection of surfactants for the removal of petroleum products from shallow sandy aquifers. *Ground Water*, vol. 28, No. 6, pp. 920-926.

Andreas T. (1993). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in presence of synthetic surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 60, No. 1, pp. 258-263.

Apilab Plus Instruction Manual V3.3.3 (1998). BioMérieux S. A., France.

Atlas R. M. (1984). *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Company, pp. 99.

Banat I. M. (1995). Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technology*. Vol. 51, pp.12.

Bartha R., Premer D. (1965). Features of a flask method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Science*. No. 100, pp. 68-70.

Bohn L. H., Mc Neal L. B., O'Connor G. A. (1993). *Química del Suelo*. Editorial Limusa, S. A. de C. V. Primera edición, pp. 15-32.

Carolina C y Abdul S. S. (1991) Aqueous surfactant washing of residual oil contamination from sandy soil. *GWMR*. pp. 121-127.

Cameotra S. S., (1995). Biosurfactant production by an oil field bacterial strain. *Journal of Microbial Biotechnology*, vol. 10, No. 1, pp. 8-16.

Cerniglia E. C. (1981). Microbial transformation of aromatic hydrocarbons. Capítulo 3 en *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Company, pp. 100-127.

Cooper D. G., Goldenberg B. G. (1987). Surface active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 53, pp. 224-229.

Cooper D.G., Zajic D.E. (1980). Surface active compounds by microorganisms. *Advances in Applied Biotechnology*, vol. 26. pp 229-253.

Deschenes L., Lafrance P., Villeneuve P. J. (1996). Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. *Applied Microbiology Biotechnology* No. 46, pp. 638-646.

Deschenes L., Lafrance P., Villeneuve P. J. Samson R. (1995). Surfactant influence on PHA biodegradation in a creosote-contaminated soil. Batelle Memorial Institute 3<sup>rd</sup> International in situ and on site Bioreclamation Symposium (San Diego, Ca., april, 1995). Battelle Press, pp. 51-58.

Deziel E., Paquette G., Villemur R., Lepine F., Bisailon J.G. (1996). Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology. vol. 62, No. 6, pp. 1908-1912.

Douglas W. L., Milton L. L., Keith D. B., Robert C. K., Daniel L. V. (1981) Chemical class separation and characterization of organic compounds in synthetic fuels. Anal. Chem. No. 53 pp. 1612-1620.

Dragun J. (1998). The Soil Chemistry of Hazardous Materials. 2<sup>o</sup> edition. Amherst Scientific Publishers. Amherst Massachusetts, pp 1-168.

Duvnjak Z., Cooper D. G., Kosaric N. (1982). Production of surfactant by *Arthrobacter paraffiensus* ATCC 19558. Biotechnology and Bioengineering, vol. XXIV, pp. 165-175.

Etienne B. G., Hebrero R. J., Garduño O. R. A. (1983). Microorganismos para degradar residuos de derrames accidentales de petróleo crudo en suelo. XI Petroleum World Congress. Agust-september 1983, London UK.

Falatko D. M., Novak J. T. (1992). Effects of biologically produced biosurfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. Water Environmental Research, vol. 64, No. 2, pp 164-169.

Finnerty W. R. (1994) Biosurfactants in environmental biotechnology. Current Opinion in Biotechnology. No. 5 pp. 291-295.

Foth H. D., Turk L. M. (1979). Fundamentos de la ciencia del suelo. John Wiley & Sons, Inc. Compañía Editorial Continental S. A. pp. 13-17.

Francy D. S. (1991). Biosurfactant production by subsurface microorganisms. A Thesis Subitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Master of Science. UMI Dissertation Services. pp. 1-28

Gibello A., Ferrer E., Sanz J., Martin M. (1995). Polymer production by *Klebsiella pneumoniae* 4-hydroxyphenylacetic acid hydrolase genes cloned in *Escherichia coli*. Applied Environmental Microbiology. vol. 6, No. 12, pp. 4167-4171.

Gibson D. T., Mahandevan V., Jerina D. M. Yagi H., Yeh H. J. C. (1975). oxidation of carcinogens benzo(a)bpnyrene and benzo(a)antracene to dihidrodliols by a bacterium. Science No. 189, pp 295-297.

Gibson D. T., Parales R. E. (2000). Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. No. 11. pp 236-243.

Grimont F., Patrick A. D., Richard C. (1992). The Prokaryotes, The Genus *Klebsiella*. Capitulo 147, 2° ed, vol. 3 ed. Spriger Verlag. pp 2776-2796.

Gutiérrez-Rojas M., (2000). Increasing bioavailability of recalcitrant molecules in contaminated soils. Capitulo 13, en *Environmental Biotechnology and Cleaner Bioprocesses* (E. Olguín, G. Sánchez and E. Hernández, Eds.) Taylor and Francis, London, pp. 167-177.

Harayama S. (1997). Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Current Opinion in Biotechnology*. No. 8. pp. 268-273.

Herman D. C., Lenhard R. J., Miller R. M. (1997) Formation and removal of hydrocarbon residual in porous media: Effects of attached bacteria and biosurfactants. *Environmental Science and Technology*. vol. 31, No. 5, pp. 1290-1294.

Itho S., Shigeo I. (1982). Sophololipids from *Torulopsis bombicola*: possible relation to alkane uptake. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 3, No. 6.

Jackson M. L. (1976) *Soil Chemical Analysis*. Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.

Joshi M. M. (1996). Bioremediation as single or combined system for treatment of PAH-contaminated soils. A Dissertation presented to The Graduate Faculty of the University of Akron. UMI Dissertation Services. pp.1-23.

Kastner M., Jammali-Breuer M., Mahro B. (1994). Enumeration and characterization of soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PHA). *Applied Microbiology and Biotechnology*. vol. 41, No. 2, pp. 267-273.

Kosaric N., Cairns W. L., Gray NCC. (1987). *Biosurfactants and Biotechnology*. Surfactants Sciences Series, Marcel Dekker, New York. vol. 25.

Kotterman M. (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by the white rot fungus *Bjerkandera sp.* Strain BOS55. Thesis Wageningen Agricultural University, pp.11-25.

Kunze G. W y Dixon J., (1986) *Method of Soil Analysis (part I)*. Physical and mineralogical methods 2° ed. American Society of Agronomy. Inc. Soil Science Society of America. Inc. Madison, Wisconsin. USA. pp 363-409.

Later W. L., Lee L. M., Bartle D.K., Kong C. R. y Vassillaros D. L. (1981). Chemical class separation and characterization of organic compounds in synthetic fuels. *Analitic Chemistry*. No. 53, pp. 1612-1620.

Liu Z., Laha S., Luthy R. G. (1991). Surfactant solubilization of polycyclic aromatic compounds in soil-water suspensions. *Water Science Technology*. vol. 23, pp. 475-485.

Liu Z., Edwards A. D., Luthy R. G. (1992). Sorption of non-ionic surfactants onto soil. *Water Resarch*, vol. 26, No. 10, pp. 1337-1345.

Margaritis A., Zajic J. E., Gerson D. F. (1979). Production and surface-active properties of microbial surfactants. *Biotechnology and Bioengineering*; vol XXI, pp. 1151-1162.

Maria-Judith B. D., Nair S., Jason J., Chandramohan D. (1996). Crude oil degradation by phosphate-solubilizing bacteria. *Journal of Marine Microbiology*. No. 4, pp. 91-95.

Martens D. A. and Frankenberger T. Jr. (1995). Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil treated with an advanced oxidative process-Fenton's reagent. *Journal of Soil Contamination*. vol 4, No 2, pp. 175-190.

Mriganka M. G., Ick T. Y., Zhou S., Cox C. D., Robinson K. G. (1995). Surfactant-enhanced bioremediation of PAH and PCB contaminated soils. *Gas Abstracts*. vol. 3, No. 8, pp. 15-23.

Patterson G. T. (1993). Soil sampling and methods of analysis. Edited by Martin R. Carter for Canadian Society of Soil Science: Lewis Publishers. U.S.A., pp. 7-10.

Prince M., Sambasivam Y. (1993). Bioremediation of petroleum wastes from the refining lubricants oils. *Environmental Progress*. vol. 12, No. 1. pp. 5-11.

Ramírez I. M. E. (1998). Biodisponibilidad y biodegradación de naftaleno en suelo. Tesis de maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Meropolitana Unidad Iztapalapa, pp. 36-40.

Rehm, H. J., Reed G. (1986) *Biotechnology a Comprehensive Treatise in 8 Volumens*. Volume 4: Microbial Products ii. Gemany. VCH Verlagsgesellschaft. Pp 104-111.

Research Triangle Institute (1995). Toxicological Profile for Polycyclic Hydrocarbons. U.S. Departement of Health and Human Services, Public Health Service, Agency of Toxic Substances and Disease Registry.

- Robinson K. G., Mriganka M., Shi Z. (1996). Mineralization enhancement of non aqueous phase and soil-bound PCB using biosurfactants. *Water Science and Technology*. vol. 34, No. 7, pp. 303-309.
- Rocha C., Infante C. (1997). Enhanced oily sludge biodegradation by a tensoactive agent isolated from *Pseudomonas aeruginosa* USB-CS1. *Applied Microbiol. Biotechnology*. No. 47, pp. 615-619.
- Rosemberg E., Perry A., Gibson D.T., Gutnick D. L. (1979). Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: specificity of hydrocarbon substrate. *Applied and environmental Microbiology*. vol. 37, No. 3, pp. 409-413.
- Scheller U., Zimmers T., Becher D., Schauer F., Schunck W. (1998). Oxigenation cascade in conversion of n-alkanes to  $\alpha,\omega$ -dioic acids catalyzed by cytochrome P450 52A3. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 273, No. 9. pp. 35528-32534.
- Smith R. J., Tomiecek R. M., Swallow V. P., Weightman L. R., Nakles V. D., Helbling M. (1994). Definition of degradation edpoints for PHA contaminated soils using a risk-based approach. Capitulo 43. In *Hydrocarbon Contaminated Soils. Volumen V. Perspectives Analysis, Assesment and Fate, Toxicity Testing, Risk Assesment, Remediation, Innovative Technologies, Polycylic Aromatic Hydrocarbons*. Calabrese E. J., Kostecki P. T., Bonazountas M. Editors. pp. 531-567.
- Steilljes E. M., Watkin E. D. (1993). Comparison of environmental Imapacts posed by different hydrocarbon mixtures: a nedd for site specific composition analyses. *Hydrocarbon Contaminated Soils and Groundwater*. Capitulo 36. Lewis Publishers. pp. 549-569.
- Sugiura K., Ishihara M., Shimauchi T., Harayama S. (1997). Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environmental Science & Technology*. vol. 31, No. 1. pp. 46-47.
- Sundaram N. S, Sarwar M., Bang S. S., Islam M. R. (1994). Biodegradation of anionic surfactants in the presence of petroleum contaminants. *Chemosphere*. Vol. 29, No. 6, pp. 1253-1261.
- Thibault L.S., Anderson M, Frankenberger W. T. (1996). Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils. *Applied and Environmental Microbiology*. vol 62, pp. 283-267.
- Tumeo M., Breddock J., Venator T., Rog S., Owens D. (1994). Effectiveness of biosurfactant in removing weathered crude oil from subsurface beach material. *Spill Science & Technology Bulletin*. Elsevier Science LTD. vol. 1, No. 1. pp 53-59.
- U.S. EPA, (1992). Risk Reduction Engineering Laboratory Treatability Data Base, EPA 600/C-92-003b, version 4.0, Cincinnati, Ohio.

U.S. EPA, (1986). Superfund Public Health Evaluation Manual, EPA 540/1-86/060, Washington, D. C.

Volkering F., Beure A. M., Sterkenburg A. Van Andel J. G. (1992). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. Applied Microbiology Biotechnology. No. 36, pp. 548-552.

Volkering F., Breure M. A., Van Andel G. J., Rulkens W. H. (1995). Influence of non ionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Applied of Environmental Microbiology. vol. 61, No. 5, pp. 1699-1705.

Wang Z., Fingas M., Li K. (1994). Fractionation of a light crude oil and identification and quantiation of aliphatic, aromatic and biomarker compounds by GC-FID and GC-MS, part I. Journal of Chromatographic Science. vol. 32, pp. 361-365.

Zavala C. J. (1988). Regionalización Natural de la Zona Petrolera de Tabasco "caso de estudio". Primera edición. Gobierno del Estado de Tabasco, pp.13-14.

## ANEXO

### Balance de carbono

Se realizó estimando el contenido del carbono de cada una de las posibles fuentes de carbono presentes en cada unidad experimental, con base al siguiente balance:

$$\text{Carbono}_{\text{total}} = \text{Carbono}_{\text{HTP}_{\text{res}}} + \text{Carbono}_{\text{consumido}}$$

Como:

$$\text{Carbono}_{\text{consumido}} = \text{Carbono}_{\text{biomasa}} + \text{Carbono}_{\text{CO}_2} + \text{Carbono}_{\text{subproductos}}$$

Entonces:

$$\text{Carbono}_{\text{total inicial}} = \text{Carbono}_{\text{HTP}} + \text{Carbono}_{\text{materia orgánica}} + \text{Carbono}_{\text{surf.}} + \text{Carbono}_{\text{biom. inoc.}}$$

*Nota: la biomasa inicial del inoculo es prácticamente despreciable.*

Como al final del experimento el carbono se pudo haber degradado ó desorbido, por lo tanto los HTP totales se expresan de la siguiente manera:

$$\text{Carbono}_{\text{HTP}} = \text{Carbono}_{\text{biomasa}} + \text{Carbono}_{\text{CO}_2} + \text{Carbono}_{\text{subproductos}} + \text{Carbono}_{\text{residual}}$$

*Nota: el carbono de biomasa es el estimado respecto a un rendimiento teórico sobre consumo de HTP.*

Substituyendo en la ecuación inicial de balance, se obtiene el balance global:

$$\text{Carbono}_{\text{Total Inicial}} = \text{Carbono}_{\text{biomasa}} + \text{Carbono}_{\text{CO}_2} + \text{Carbono}_{\text{subproductos}} + \text{Carbono}_{\text{residual}} + \text{Carbono}_{\text{materia orgánica}} + \text{Carbono}_{\text{surfactante}}$$

De la ecuación de balance global es posible calcular todos los miembros, a excepción del carbono<sub>subproductos</sub>, el cual será calculado por diferencia. A continuación se detallan los cálculos realizados.

### Cálculo de carbono de biomasa

Con base al rendimiento global de biomasa por gramo de HTP consumido, se tiene de bibliografía (Rhem y Reed, 1986), es de 0.74 g de biomasa/g de HTP consumido, por lo tanto:

$$\frac{\text{mg de HTP consumido.}}{\text{U.E.}} \times \frac{0.74 \text{ mg de biomasa}}{\text{mg de HTP cons.}} = \frac{\text{mg de biomasa}}{\text{U.E.}}$$

De bibliografía (Rhem y Reed, 1986), se tiene que el contenido de carbono en las células es de 0.459 mg de carbono/mg de biomasa, por lo tanto:

$$\frac{\text{mg de biomasa}}{\text{U. E}} \times \frac{0.459 \text{ mg de carbono}}{\text{mg de biomasa}} = \frac{\text{mg de carbono}}{\text{U.E}}$$

Carbono de CO<sub>2</sub> (teórico).

Suponiendo que el carbono consumido que no se utilizó para la producción de biomasa, se fue a CO<sub>2</sub>, por lo tanto:

$$\frac{\text{mg de HTP consumido}}{\text{U.E.}} \times \frac{(1 - 0.74) \text{ mg de CO}_2}{\text{mg de HTP consumido}} = \frac{\text{mg de CO}_2}{\text{U.E.}}$$

Como el peso molecular del CO<sub>2</sub> es 44, por tanto el contenido de carbono en la molécula del CO<sub>2</sub> es de:

$$\frac{12}{44} = 0.27 \frac{\text{mg de carbono}}{\text{mg de CO}_2}$$

Por lo tanto:

$$\frac{\text{mg de CO}_2}{\text{U.E.}} \times \frac{0.27 \text{ mg de carbono}}{\text{mg de CO}_2} = \frac{\text{mg de carbono}}{\text{U.E.}}$$

*Carbono de HTP totales o residuales*

Se calcula el contenido de carbono en diferentes moléculas representativas de las especies presentes en los hidrocarburos, por lo tanto se seleccionan las siguientes:

*Alifáticos*

2-metil nonano, con fórmula: C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>, contenido de carbono: 120/142 = 0.845

1-metil 2-etil ciclopentano, con fórmula:  $C_8H_{16}$ , contenido de carbono:  $96/112 = 0.857$ .

*Aromáticos*

1,2,7-metil naftaleno, con fórmula:  $C_{13}H_{10}$ , contenido de carbono:  $156/169 = 0.92$

Pireno, con fórmula:  $C_{16}H_{10}$ , contenido de carbono:  $192/202 = 0.905$

*Polares.*

Orto-cresol, con fórmula:  $C_7H_{10}O$ , contenido de carbono:  $84/102 = 0.82$

Ácido palmítico, con fórmula  $C_{16}H_{32}O_2$ , contenido de carbono:  $192/256 = 0.75$

Promediando los valores obtenidos de cada fracción se tiene:

$$\frac{0.845 \text{ mg de carbono}}{\text{mg de HTP}}$$

Por lo tanto:

$$\frac{\text{mg de HTP residuales}}{\text{U.E.}} \times \frac{0.845 \text{ mg de carbono}}{\text{mg de HTP}} = \frac{\text{mg de carbono}}{\text{U.E.}}$$

*Carbono de suelo*

Se estima que en el suelo contiene un promedio del 79% de la materia orgánica es de carbono, por lo tanto en nuestro suelo seleccionado contiene un 8.88% de materia orgánica, entonces:

$$\frac{8.88 \text{ mg de materia orgánica}}{100 \text{ mg de suelo}} \times \frac{0.79 \text{ mg de carbono}}{\text{mg de materia orgánica}} \times \frac{2000 \text{ mg de suelo}}{\text{U.E.}}$$

$$= \frac{140.3 \text{ mg de carbono}}{\text{U.E.}}$$

*Carbono de surfactantes*

*Tergitol NP-10*

Fórmula:  $C_{35}H_{61}O_{11}$ , peso molecular: 682, contenido de carbono:  $420/682 = 0.615$  mg de carbono/mg de Tergitol NP-10.

Si se colocó en cada unidad experimental: 157.8 mg de Tergitol NP-10, por lo tanto:

$$\frac{0.615 \text{ mg de carbono}}{\text{mg de Tergitol NP-10}} \times \frac{157.8 \text{ mg de Tergitol NP-10}}{\text{U.E.}} = \frac{97.047 \text{ mg de carbono}}{\text{U.E.}}$$

*Biosurfactante*

Se presume que el biosurfactante producido es un derivado de glicolípidos, por lo que se toman 3 moléculas caracterizadas de estas sustancias:

$C_{16}H_{29}O_6$ , peso molecular: 317, contenido de carbono:  $192/317 = 0.606$  mg de carbono/mg de biosurfactante.

$C_{36}H_{63}O_{16}$ , peso molecular: 751, contenido de carbono:  $432/751 = 0.575$  mg de carbono/mg de biosurfactante.

$C_{42}H_{71}O_{14}$ , peso molecular: 799, contenido de carbono:  $504/799 = 0.63$  mg de carbono/mg de biosurfactante.

Promediando los valores obtenidos se tiene: 0.595 mg de carbono/mg de biosurfactante.

De acuerdo al rendimiento obtenido en el caldo de cultivo con biosurfactante es de 3.22 g de biosurfactante/litro, como se utilizó 20 ml, entonces se utilizó 64.4 mg de biosurfactante/U.E.

Entonces:

$$\frac{0.595 \text{ mg de carbono}}{\text{mg de biosurfactante}} \times \frac{64.4 \text{ mg de biosurfactante}}{\text{U.E.}} = \frac{38.318 \text{ mg de carbono}}{\text{U.E.}}$$

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**Biosurfactante.**- Molécula de origen vegetal, animal ó microbiano, que posee una parte hidrofóbica y una hidrofílica y por lo tanto tiende a agregarse en las fases (actividad superficial).

**Biodegradación.**- Rompimiento de sustancias orgánicas por microorganismos. Actividad enzimática de microorganismos en suelos estimulados por la adición de oxígeno (aeróbicos) ó en su ausencia (anaeróbicos) y nutrimentos, en diversos medios.

**Biodisponibilidad.**- Disponibilidad de los compuestos químicos a la degradación por microorganismos potencialmente degradadores; disponibilidad de un químico tóxico a causar un efecto adverso en organismos superiores.

**Hidrocarburos poliaromáticos.**- Grupo de moléculas, formadas por 2 ó más anillos bencénicos y en algunos casos sustituidos; alguna son promotores carcinógeos y por tanto de interés ambiental.

**Biorremediación.**- Proceso por medio del cual los organismos vivos degradan ó transforman los contaminantes orgánicos a niveles ambientalmente seguros en suelos, materiales superficiales, agua, lodos y residuos.

**Intemperismo.**- Disminución de la biodisponibilidad con el paso del tiempo en el cual el petróleo derramado cambia de composición persistiendo las fracciones de mayor peso molecular y de difícil degradación.

**Hidrocarburos alifáticos.**- Fracción del petróleo compuesta principalmente por alcanos lineales, ramificados y naftenos los cuales están compuestos por 2 ó más anillos constituidos de 5 ó 6 átomos de carbono, se encuentran entre el 40-60% en el petróleo.

**Hidrocarburos aromáticos.**- contiene por lo menos una molécula de anillo aromático con alguna(s) molécula(s) sustituyente(s) derivado del benceno, tolueno y xileno; en esta se encuentran además los hidrocarburos poliaromáticos (HAP), naftenoaromáticos, y compuestos cíclicos del azufre, representan del 20-45% del total de los hidrocarburos.

**Asfaltenos.**- Conocidas también como resinas están formados por la fracción policíclica de alto peso molecular de los crudos en los que se incluyen átomos de O, S y N, constituyen los extremos pesados del petróleo y de alto peso molecular de las series naftenoaromáticas y aromáticas, representan del 10-30% de los hidrocarburos.

**Hidrocarburos totales del petróleo.**- contenido total de hidrocarburos en una muestra, cuantificada por métodos establecidos.

**Derrame de hidrocarburo.**- Descarga accidental ó intencional de hidrocarburos el cual puede alcanzar diferentes estratos y medios.

Remediación.- Limpieza u otros métodos para remover o contener un derrame de materiales peligrosos en el medio ambiente.

Surfactante.- Una sustancia de origen natural ó sintético que promueve la solubilización, mojado y emulsificación de diversos tipos de compuestos químicos.

Sorción.- Efecto combinado de adsorción y/o absorción. La sorción ocurre cuando un ion ó molécula disuelta se adhiere a la superficie de un sólido ó se disuelve en el sólido.

Adsorción.- Proceso mediante el cual átomos, iones ó moléculas son retenidos por la superficie de un material a través de procesos de intercambio iónico.

Absorción.- Proceso por el cual un líquido penetra en la estructura sólida de las fibras absorbentes o partículas las cuales se hinchan por efecto del acomodo del líquido.



Casa abierta al tiempo

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

## UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

### IDONEA COMUNICACION DE RESULTADOS

**EVALUACION DE CEPAS  
PRODUTORAS DE BIOSUR-  
FACTANTES Y SU APLICA-  
CION EN LA BIODEGRADA-  
CION DE LA FRACCION  
AROMATICA EN UN SUELO  
INTEMPERIZADO CONTAMI-  
NADO CON PETROLEO**

En México, D.F. se presentaron a las 11:00 horas del día 13 del mes de JULIO del año 2001 en la Unidad IZTAPALAPA de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del Jurado.

DR. SERGIO HUERTA OCHOA;  
DR. SANTIAGO FLORES Y DE HOYOS;  
DR. ROBERTO ZAZUETA SANDOVAL Y  
DR. MARIANO GUTIERREZ ROJAS

bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último se reunieron a la presentación de la Idónea Comunicación de Resultados para la obtención del Grado de

Maestro en: BIOTECNOLOGIA

de MARCO ALEJANDRO MONTES DE OCA GARCIA



quien presentó una comunicacion de resultados, cuya denominación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 78 fracciones I, II, III y V del Reglamento de Estudios Superiores de esta Universidad, los miembros del Jurado resolvieron:

MARCO ALEJANDRO MONTES DE OCA GARCIA  
FIRMA DEL INTERESADO

-Aprobado-

### REVISOR

LIC. CARMEN LLORENS FABREGAT  
DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el Presidente del Jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

### VISTO BUENO

DR. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA  
DIRECTOR DE DIVISION

### PRESIDENTE

DR. SERGIO HUERTA OCHOA

### VOCAL

DR. SANTIAGO FLORES Y DE HOYOS

### VOCAL

DR. ROBERTO ZAZUETA SANDOVAL

### SECRETARIO

DR. MARIANO GUTIERREZ ROJAS