

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA** *Iztapalapa*



**Efecto de un campo eléctrico en la degradación de  
hexadecano por *Aspergillus niger* en un soporte inerte**

**T E S I S**

**Para obtener el grado de:  
Maestra en Biotecnología**

**P r e s e n t a**

**Nancy**

**Velasco**

**Alvarez**

**Director de tesis**

**Dr. Mariano Gutiérrez Rojas**

31 Mayo 2006

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados del **CONACyT**, y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el número de registro 0471-O.”

Iztapalapa, D. F. 31 de Mayo 2006

El jurado asignado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la  
Tesis:

**Efecto de un campo eléctrico en la degradación de hexadecano por *Aspergillus niger* en un soporte inerte**

**Que presentó**

**IBI. Nancy Velasco Alvarez**

Comité Tutorial:

Directo: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Asesor: Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

Asesor: Dr. Ignacio González Martínez

**Jurado:**

**Presidente: Dra. Tania L. Volke Sepúlveda**

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

\_\_\_\_\_

**Secretario: Dr. Ignacio González Martínez**

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

\_\_\_\_\_

**Vocal: Dra. Inés García Peña**

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología  
Instituto Politécnico Nacional

\_\_\_\_\_

**Vocal: Dr. Guillermo Aguilar Osorio**

Departamento de Alimentos y Biotecnología  
Facultad de Química, UNAM

\_\_\_\_\_

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de diferentes intensidades de corriente sobre el crecimiento y degradación de hexadecano (HXD) por *Aspergillus niger*, en cultivo sólido, con agrolita como soporte. El tamaño de partícula que mostró la menor dispersión de datos y el mayor consumo de oxígeno en el menor tiempo fue de 1.19 – 1.68 mm.

La caracterización de la celda electroquímica se realizó imponiendo diferentes intensidades de corriente, a partir de la cual, fueron seleccionadas dos corrientes; 6 y 19 mA. La celda electroquímica fue dividida en tres secciones longitudinales (ánodo, media y cátodo).

La degradación de HXD en la celda electroquímica sin corriente fue de 76%, favoreciéndose la producción de CO<sub>2</sub> y en menor medida la producción de biomasa.

Al aplicar la corriente de 6 y 19 mA, de manera continua, durante doce días de cultivo, la corriente produjo un efecto letal en las esporas de *A. niger*; el crecimiento y la degradación de HXD fueron nulos.

Al aplicar 6 mA de corriente desde el inicio del cultivo y sostenida durante 24 horas, las esporas mostraron un retraso en la fase lag, respecto a la celda electroquímica sin corriente, registrando cambios drásticos de pH, así como niveles bajos de degradación de HXD. En la parte anódica se degradó el 35% del HXD, en la parte media se degradó el 60% y en la sección catódica, se degradó el 46%. Observando cambios en la distribución de carbono degradado por *A. niger*, favoreciendo de igual manera, la producción de biomasa y la producción de CO<sub>2</sub>, en la sección anódica y media. En la sección catódica, se favoreció la producción de CO<sub>2</sub>.

Al aplicar la corriente de 6 mA después de la fase lag, durante 24 horas, los cambios de pH no fueron tan drásticos. La corriente produjo un efecto positivo en el micelio, mostrando los mayores niveles de degradación de HXD. En las tres secciones de la celda se obtuvo un promedio de 87% de HXD degradado, mostrando que al aplicar la corriente después de la fase lag, se obtienen de igual manera que al aplicar la

corriente al inicio del cultivo, cambios en la distribución del carbono consumido por *A. niger*, favoreciéndose completamente la producción de CO<sub>2</sub>.

## ABSTRACT

In the current work, different intensities of electric flow effect over the growth and degradation of the hexadecane (HXD) by *Aspergillus niger* in solid culture, with perlite as support. The size of the particle showing the least dispersion of data and the greatest oxygen consumption in the least time was of 1.19 – 1.68 mm. Characterization of the electrochemical cell was made by imposing different electric flow intensities upon which, two electric flows were selected: 6 y 19 mA. The electrochemical cell was divided into three longitudinal sections (anode, media and cathode).

Degradation of HXD in the electrochemical cell without electric flow was of 76% favoring to CO<sub>2</sub> production and with less extent to biomass production.

When applying a electric flow of 6 and 19mA in a continuous way, during twelve days of culture, the electric flow produced a lethal effect in the *A. niger* spores, HXD growth and degradation were null.

When applying 6mA of electric flow from the beginning of the culture and sustained during 24 hours, spores showed a delay in the lag phase compared to the electrochemical cell without electric flow, presenting drastic pH changes as well as low HXD degradation levels. In the anode 35% of HXD was degraded, in the medium part the 60% was degraded and in the cathode the 46%. Observing the changes in the degraded carbon distribution by *A. niger*, favoring in the same way to biomass and CO<sub>2</sub> production in the anode and medium section. In the cathode section, CO<sub>2</sub> production was favored.

When applying a electric flow of 6 mA after the lag phase, during 24 hours, pH changes were not as drastic. The electric flow produced a positive effect in the mycelium showing higher levels of HXD degradation. In the three sections of the cell an average of 87% of degraded HXD was obtained showing that when applying electric flow after the lag phase, as well as when applying electric flow at the

beginning of the culture, changes in the carbon distribution by *A. niger* are obtained totally favoring CO<sub>2</sub> production.

*A mi amado Esposo AYAX*



## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero durante la realización de este trabajo, a través de la beca otorgada

A mis queridos asesores, con especial cariño. Al Dr. Mariano Gutiérrez Rojas, por el gran apoyo y buenos consejos en la realización de esta tesis, a la Dra. Tania Volke Sepúlveda por su apoyo incondicional y sabios consejos y al Dr. Ignacio Martínez por su infinita paciencia y cariño.

A la Dra. Inés García Peña y al Dr. Guillermo Aguilar Osorio, por sus valiosos comentarios durante la revisión de la tesis.

A mis Padres Joaquín y Diana por el gran ejemplo que siempre han sido para mí.

A mis hermanos: Joaquín, Ulises y Diana por estar siempre a mi lado.

A la familia Segura Peralta, por sus incontables palabras de aliento.

A mis grandes amigos y compañeros del laboratorio; Itza, Ángeles, Ady, Erika, Guille, Ana, Ilde, Nacho, Memo, Guillermo y Liliana, por hacerme sentir como en familia, por su amistad y palabras de aliento en los momentos difíciles.

Principalmente a mi gran amor, amigo y cómplice en toda esta aventura, **Ayax** gracias por estas siempre a mi lado.

# CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	1
1. ANTECEDENTES .....	3
1.1. HIDROCARBUROS.....	4
1.1.1. Origen y composición de los hidrocarburos .....	4
1.1.2. Biodegradación de hidrocarburos .....	6
1.1.3. Microorganismos degradadores .....	9
1.1.4. Factores que limitan la biodegradación.....	15
1.2. SOPORTES INERTES.....	16
1.2.1. Utilización de soportes en cultivo sólido .....	16
1.2.1.1 Características de un soporte modelo.....	17
1.2.1.2. Características de la agrolita. ....	18
1.2.2. Aplicaciones de los soportes.....	20
1.3. TRATAMIENTO ELECTROQUÍMICO .....	21
1.3.1. Definición y características.....	21
1.3.2. Proceso electrocinético.....	22
1.3.3. Aplicación de tratamientos bio-electrocinético .....	25
1.3.4. Efecto de una corriente eléctrica.....	27
2. JUSTIFICACIÓN.....	29
3. HIPÓTESIS .....	31
4. OBJETIVOS .....	33
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	34
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES .....	34
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	35
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
6.1. PREPARACIÓN DEL SOPORTE.....	39
6.1.1. Tamizado y selección de tamaño de partícula.....	39
6.1.2. Contaminación del soporte .....	39
6.2. PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA CEPA.....	40
6.2.1. Microorganismo.....	40
6.2.2. Cosecha de esporas.....	40
6.2.3. Medios de cultivo .....	41
6.3. UNIDAD EXPERIMENTAL.....	41
6.3.1. Diseño de la celda electroquímica .....	41
6.3.2. Electroodos y soluciones electrolíticas.....	42
6.3.3. Caracterización de la celda electroquímica.....	42

6.3.4. Selección de las intensidades de corriente .....	43
6.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	43
6.4.1. Análisis fisicoquímicos .....	43
6.4.1.1. Humedad.....	43
6.4.1.2. pH.....	43
6.4.1.3. Carbono orgánico soluble .....	43
6.4.1.4. Determinación de HXD .....	44
6.4.2 Análisis microbiológicos.....	44
6.4.2.1. Respirimetría .....	44
6.4.2.2. Cuenta microbiana total.....	45
6.4.2.3. Obtención y cuantificación de biomasa .....	45
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
7.1. SELECCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA DEL SOPORTE.....	48
7.1.1. Producción de biomasa y degradación de HXD por <i>A. niger</i> .....	48
7.1.2. Cuantificación de O <sub>2</sub> durante la degradación de HXD por <i>A. niger</i> .....	50
7.2. ESTUDIO DE RENDIMIENTOS Y BALANCE DE CARBONO EN EL TAMAÑO DE PARTÍCULA SELECCIONADO .....	52
7.2.1. Acumulación de carbono orgánico soluble .....	53
7.2.2. Consumo de HXD y producción de biomasa .....	53
7.2.3. Consumo de O <sub>2</sub> y producción de CO <sub>2</sub> .....	55
7.2.4. Coeficiente respiratorio y balance de carbono.....	57
7.3 CELDA ELECTROQUÍMICA .....	59
7.3.1. Diseño de la celda electroquímica .....	59
7.3.2. Caracterización de la celda.....	61
7.3.3. Selección de las intensidades de corriente .....	64
7.4. EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DE LA CELDA ELECTROQUÍMICA .....	66
7.4.1. Perfil de pH y producción de biomasa.....	67
7.4.2. Producción de CO <sub>2</sub> .....	68
7.4.3. Degradación de HXD y acumulación de compuestos orgánicos solubles .....	69
7.4.4. Balance de Carbono .....	70
7.5. APLICACIÓN DE LAS INTENSIDADES DE CORRIENTES.....	71
7.5.1 Aplicación de corriente continua durante 12 días.....	72
7.5.1.1. Perfil del pH .....	73
7.5.1.2. Producción de CO <sub>2</sub> .....	75
7.5.1.3. Conteo en placa (UFC).....	76
7.5.2 Aplicación de corriente continua durante 24 horas al inicio del cultivo .....	79
7.5.2.1. Perfil del pH .....	79

7.5.2.2. Producción de biomasa .....	80
7.5.2.3. Producción de CO <sub>2</sub> .....	82
7.5.2.4. Degradación de HXD y acumulación de compuestos orgánicos solubles.....	84
7.5.2.5. Balance de carbono .....	87
7.5.3 Aplicación de corriente continua durante 24 horas después de la fase lag	90
7.5.3.1. Perfil del pH .....	90
7.5.3.2. Producción de biomasa .....	91
7.5.3.3. Producción de CO <sub>2</sub> .....	93
7.5.3.4. Degradación de HXD y acumulación de compuestos orgánicos solubles.....	94
7.5.3.5. Balance de carbono .....	97
8. CONCLUSIONES GENERALES .....	100
9. RECOMENDACIONES.....	103
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

## INTRODUCCIÓN

La firme demanda de energía en el mundo moderno ha determinado el uso intensivo del petróleo y sus derivados como fuente de energía. Muchos de sus componentes son empleados como materias primas básicas en la industria química y petroquímica. Este aumento en la explotación del petróleo ha determinado la aparición de crecientes fuentes de contaminación (Iturbe y col., 2002). La importancia de la contaminación producida por estos hidrocarburos está determinada por sus características mutagénicas, carcinogénicas y tóxicas. Además, su propiedad de escasa solubilidad en agua dificulta aún más su biodegradación natural. Se conocen diferentes tecnologías que ayudan a eliminar los compuestos referidos, como las fisicoquímicas; que utilizan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación y las de biorremediación las cuales involucran el uso de microorganismos para la remoción de este tipo de sustancias en el ecosistema afectado (Volke y Velasco, 2002).

Dentro de todas estas tecnologías las más usadas para la remoción de estos contaminantes son las de biorremediación. Sin embargo, estos procesos a pesar de ser efectivos, se llevan a cabo en periodos largos de tiempo, esto ha propiciado que se estudien nuevas estrategias para acelerar el proceso de biodegradación (Van Cauwenberghe, 1997). Una nueva alternativa de estudio, que conjuga las técnicas fisicoquímicas con las de biorremediación, es el uso de una corriente eléctrica que pueda acelerar el metabolismo de los microorganismos, acelerando la degradación de los compuestos orgánicos disminuyendo los tiempos de degradación y la constante inoculación en los procesos de biorremediación (Virkyute y col., 2002).

Se ha observado que la aplicación de una corriente eléctrica puede acelerar o disminuir el metabolismo de los microorganismos, debido a cambios de polaridad en las membranas, o bien a estímulos en la actividad enzimática, dependiendo del tipo de bacteria, intensidad de corriente, tiempo de exposición y condiciones del

medio. En bacterias acidófilas se ha observado una disminución en el metabolismo al aplicar una corriente eléctrica (Jackman y col., 1999), las bacterias Gram-positivas y levaduras han demostrado tener una menor sensibilidad al aplicar una corriente eléctrica, en contraste a las bacterias Gram-negativas (Ranalli y col., 2002).

Sin embargo, las diversas respuestas de los microorganismos a las intensidades de corriente se han estudiado principalmente en bacterias, dejando a un lado a un grupo importante de microorganismos como los hongos, los cuales han demostrado un gran potencial en la degradación de moléculas orgánicas.

Por lo anterior, resulta interesante estudiar el efecto que provoca la corriente eléctrica en un hongo filamentoso como *Aspergillus niger*, el cual ha demostrado un gran potencial en aplicaciones biotecnológicas para el mejoramiento ambiental y hexadecano (HXD) como molécula modelo, utilizada por su baja solubilidad en agua y su fácil asimilación para los microorganismos.

El presente trabajo propone evaluar el efecto de un campo eléctrico en la degradación de HXD por *A. niger*, utilizando un sistema modelo sólido (agrolita), permitiendo eliminar la complejidad analítica de los soportes naturales y que permita realizar investigación básica.

En el primer capítulo, se definen conceptos y antecedentes generales acerca de la composición, mecanismos de biodegradación y microorganismo degradadores de los hidrocarburos. La utilización de los soportes, y principalmente se hace una revisión sobre la aplicación de intensidades de corriente en suelos y microorganismos. En los capítulos subsecuentes se señala la justificación, hipótesis, objetivos y la estrategia experimental del trabajo. En el sexto capítulo, se describen los métodos y materiales utilizados. En el séptimo capítulo se presenta el análisis de los resultados y la discusión de los mismos. Finalmente, se presentan las conclusiones generales del trabajo y algunas recomendaciones.

---

No esperes nada del hombre  
si trabaja para su propia vida  
y no para su eternidad

*Antoine de Saint Exupéry*

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1. Hidrocarburos

### 1.1.1. Origen y composición de los hidrocarburos

El petróleo es una sustancia aceitosa de color oscuro a la que, por su composición de hidrógeno y carbono, se le denomina hidrocarburo. La composición elemental del petróleo normalmente está comprendida dentro de los intervalos que se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composición elemental del petróleo

Elemento	Peso
Carbón	84 – 87
Hidrógeno	11 – 14
Azufre	0 – 2
Nitrógeno	0.2

El petróleo puede estar en estado líquido o gaseoso. En el primer caso, es un aceite al que se le conoce como crudo. En el segundo, se le conoce como gas natural. Según la teoría más aceptada, el origen del petróleo y del gas natural es de tipo orgánico y sedimentario. Esta teoría menciona que el petróleo es el resultado de un complejo proceso físico-químico en el interior de la tierra, en el que, debido a la presión y las altas temperaturas, se produce la descomposición de enormes cantidades de materia orgánica localizada profundamente en el manto terrestre, que se convierten en aceite y gas.

A partir del descubrimiento del uso del petróleo como fuente de energía, fueron generándose crecientes fuentes de contaminación, principalmente por derrames accidentales, fugas, disposición inadecuada de recortes de perforación, lodos aceitosos y aceites lubricantes gastados, esto debido a la alta demanda de energía en el mundo moderno, lo que ha determinado el uso intensivo del petróleo y sus derivados (Iturbe-Argüelles y col., 2002). La importancia de la contaminación producida por estos compuestos está determinada por sus características mutagénicas, carcinogénicas y tóxicas. Además, su escasa solubilidad en agua dificulta aún más su biodegradación natural.



El petróleo contiene cientos de compuestos individuales, éstos son generalmente agrupados de acuerdo a su solubilidad en solventes orgánicos en cuatro clases (Sugiura y col., 1997):

**Alifáticos:** compuestos saturados lineales (alcanos) y cíclicos (cicloparafinas).

**Aromáticos:** compuestos aromáticos mono, di y polinucleares con cadenas alquílicas y/o fusionadas a anillos de cicloparafinas.

**Resinas o Polares:** agregados con gran variedad de componentes como piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas.

**Asfaltenos:** agregados compuestos por sustancias como hidrocarburos poliaromáticos, ácidos nafténicos, sulfuros, fenoles polihídricos, ácidos grasos y metaloporfirinas.

De todos estos compuestos aproximadamente el 58.2% de la composición del petróleo corresponde a hidrocarburos alifáticos, 28.6% a los aromáticos y 14.2% a los hidrocarburos polares (Tissot y Welte, 1984). Para fines particulares del presente trabajo nos enfocaremos únicamente a los hidrocarburos alifáticos, específicamente al hexadecano (HXD).

#### *Hidrocarburos alifáticos*

Los hidrocarburos alifáticos (alcanos de cadena lineal), de acuerdo con la longitud de la cadena hidrocarbonada pueden clasificarse como (Setti y col., 1993):

- *n*-alcanos líquidos, C12-C16
- *n*-alcanos semisólidos, C17-C28
- *n*-alcanos sólidos, >C28

Dentro de los alifáticos, se encuentra el hexadecano (C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>), un hidrocarburo alifático incoloro, insoluble en agua (0.9 µg/L en agua destilada a 25°C) cuyo peso molecular es de 226 g/mol, el cual constituye un componente común en el petróleo y es el mayor componente del diesel.

Diversos trabajos (Volke y col., 2003, Graham y col., 1999, Atlas 1981), han utilizado al hexadecano (HXD) como molécula modelo para el estudio de la biodegradación de hidrocarburos alifáticos por las siguientes razones: se encuentra en muchos de los sitios contaminados por hidrocarburos, se ha utilizado como un indicador del potencial de la degradación microbiológica de hidrocarburos por ser una molécula de baja solubilidad en agua y de fácil asimilación para los microorganismos.

### **1.1.2. Biodegradación de hidrocarburos**

Una característica común de los hidrocarburos es que son biodegradables (cambio en la estructura química de un compuesto llevado a cabo por los microorganismos) de forma aerobia. Sin embargo, la tasa de biodegradación aerobia depende de la complejidad de la molécula. Una de las causas de su escasa biodegradabilidad es su baja solubilidad en agua.

Numerosos microorganismos distribuidos en la naturaleza poseen la capacidad de utilizar hidrocarburos como única fuente de carbono y energía, por lo que el uso de estos microorganismos puede ser una alternativa para la eliminación de los mismos en el ecosistema afectado (biorremediación).

Algunas bacterias y hongos son solo algunos de los microorganismos que tienen la capacidad degradativa, obteniendo los nutrientes por digestión y la importancia relativa de cada uno depende de las condiciones del medio. Estos secretan enzimas digestivas, las cuales degradan moléculas específicas, desdoblándolas en compuestos simples y solubles que entran en las vías metabólicas normales de cada organismo. La descomposición es completa cuando los compuestos orgánicos son retornados al ambiente en forma inorgánica o mineral, en forma de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (mineralización) en el caso de los procesos aerobios.

La biodegradación de los hidrocarburos en los ecosistemas es compleja y depende de las características de la mezcla de hidrocarburos, de los factores ambientales que regulan la actividad biológica y de la naturaleza y capacidad metabólica de la comunidad microbiana. Se ha visto que la tasa de descomposición es mayor para los

hidrocarburos saturados, seguido por los aromáticos ligeros, mientras que los aromáticos de alto peso molecular exhiben tasas muy bajas de descomposición. No obstante, este esquema no es universal.

Blackburn y Hafker (1993) sugirieron que la susceptibilidad de biodegradación de los compuestos puede resumirse según se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Susceptibilidad de hidrocarburos a la degradación

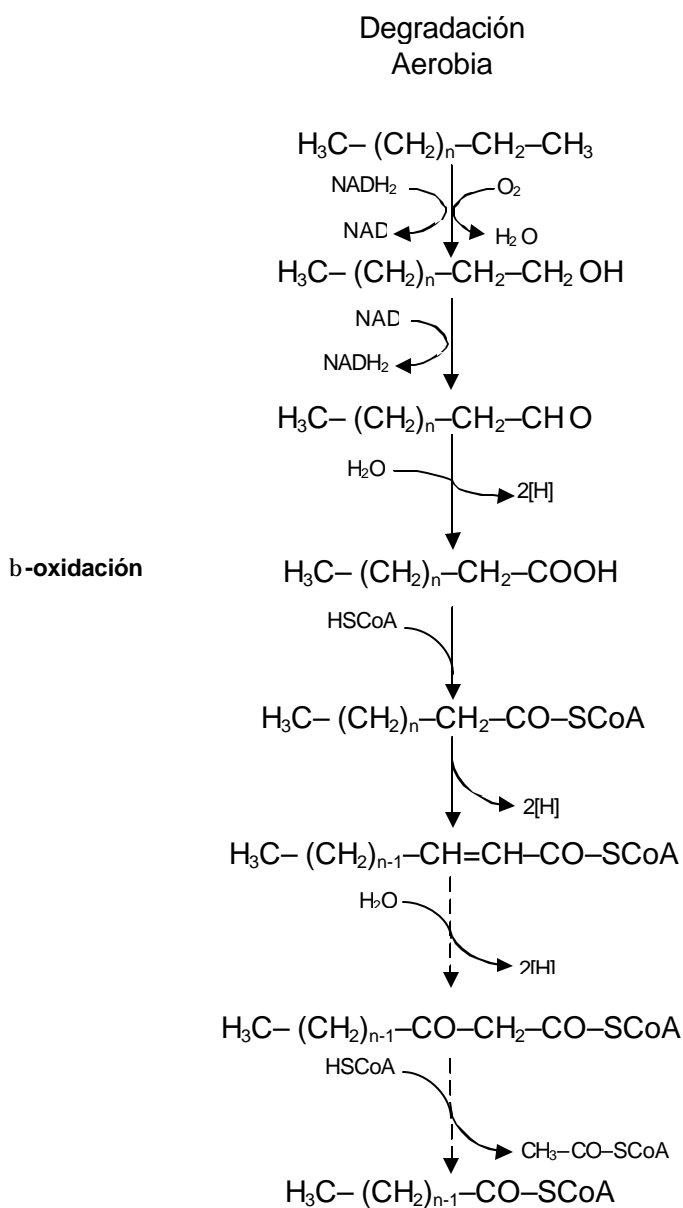
<b>Susceptibilidad de degradación</b>	<b>Hidrocarburos</b>
Altamente susceptibles	n-alcanos e iso-alcanos
Muy susceptibles	1-, 2-, 5-, y 6-cicloalcanos y aromáticos de 1-anillo aromático
Moderadamente	Cicloalcanos 3- y 4- anillos y aromáticos de 2 y 3- anillos-
Muy resistentes	Tetra-aromáticos, estereenos, triterpenos y aromáticos nafténicos
Altamente resistentes	Penta-aromáticos, asfaltenos y resinas

La susceptibilidad de los hidrocarburos a ser biodegradados por los microorganismos radica en el gasto energético que es requerido para incorporar el oxígeno molecular a este tipo de compuestos, por acción de las enzimas monooxigenasas, entre más larga la cadena y mayor número de anillos aromáticos mayor el gasto energético. La biodegradación de los hidrocarburos no sólo está controlada por la estructura química de los compuestos, también intervienen factores ambientales y físicos. Los primeros se refieren a las condiciones que permiten el desarrollo de los microorganismos nativos del suelo así mismo su actividad de biodegradación. En cuanto a los factores físicos, el más importante es la biodisponibilidad de los compuestos para los microorganismos, ésta involucra la afinidad del contaminante o la repartición de los contaminantes presentes en los suelos.

Algunos microorganismos llevan a cabo la degradación de compuestos alifáticos por la vía metabólica de la  $\beta$ -oxidación. Es decir el microorganismo toma al hidrocarburo como fuente de carbono para su crecimiento. Esto lo hace de diversas maneras,

dependiendo del tipo de microorganismo, de su estado fisiológico y de las condiciones del medio (Bouwer y Zehnder, 1993).

En la Figura 1 se presenta la estrategia general de biodegradación específicamente para hidrocarburos alifáticos, tanto para las bacterias como para hongos (Bouwer y Zehnder, 1993). Este proceso consiste en convertir la cadena hidrocarbonada del alcano en el ácido graso correspondiente por la oxidación del grupo metilo terminal.



**Figura 1.** Biodegradación bajo condiciones aerobias de un alcano.

En presencia de oxígeno la cadena del alcano puede ser atacada por una monooxigenasa o dioxigenasa, la cual introduce uno o dos átomos de oxígeno de la molécula de oxígeno a la cadena, formándose así un ácido graso. Una vez que el hidrocarburo se encuentra en forma de ácido graso, es empleado en la ruta catabólica de la  $\beta$ -oxidación, donde se remueven unidades de dos carbonos para la formación de acetil CoA. Es a partir de esta molécula que se genera la energía que necesita la célula para realizar procesos vitales, como desplazarse o dividirse, entre otros.

En esta etapa de la  $\beta$ -oxidación, ocurre uno de los ciclos metabólicos más importantes de la biología: el ciclo de los ácidos tricarbóxicos o ciclo de Krebs, ciclo que genera el potencial de reducción (NADH) necesario en la cadena respiratoria para la obtención de energía (ATP), con la consecuente mineralización de los hidrocarburos hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (Wackett y col., 1989).

### **1.1.3. Microorganismos degradadores**

Hoy en día se conocen un gran número de microorganismos (bacterias y hongos) capaces de utilizar estos hidrocarburos como única fuente de carbono y energía. Muchos de ellos se han aislado de diversos sitios como: la rizósfera de plantas nativas de zonas contaminadas (Díaz-Ramírez y col. 2003), del fondo y superficie marinos, de sitios con climas de baja temperatura, de sitios con clima desértico y de costas (Prince, 2003). También se han obtenido microorganismos degradadores halofílicos e incluso termotolerantes (Atlas, 1984).

Una buena parte de los estudios de biodegradación de hidrocarburos se han centrado en bacterias, por la facilidad que ofrecen para estudiar sus vías metabólicas y llevar a cabo construcciones genéticas que permitan degradar específicamente determinados compuestos contaminantes. Por ejemplo, Halden y col. (1999), demostraron la eficiencia de bacterias del género *Pseudomonas* en la degradación del ácido 3-phenoxybenzoico en suelos. Aitken y col. (1998), aislaron 11 cepas (bacterias) de distintos sitios contaminados con hidrocarburos con capacidad para degradar hidrocarburos poliaromáticos.

Algunas bacterias que han demostrado su capacidad para degradar hidrocarburos se presentan en la Tabla 3 (Prince, 2003; Díaz-Ramírez y col. 2003; Atlas, 1984).

**Tabla 3.** Bacterias degradadoras de hidrocarburos

<i>Achromobacter</i>	<i>Flavobacterium</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Gordonia rubripertincta</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Kocuria rosea</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Arthrobacter oxydans</i>	<i>Proteus</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Sarcina</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Sarcina</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Serratia</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Spurillum</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Cytophaga</i>	<i>Xanthobacter</i>
<i>Ervinia</i>	<i>Xanthomonas</i>

Por otro lado, los hongos filamentosos han llamado la atención debido a su abundancia en los suelos y se han sugerido como buenos candidatos para la degradación de hidrocarburos. Estudios recientes han demostrado que los hongos han sido los microorganismos más eficientes en la degradación de compuestos de alto peso molecular como lo son los hidrocarburos poliaromáticos y algunos plásticos, además de ser unos de los microorganismos más resistentes. Aunque su campo de estudio es muy poco ya que la mayoría de los estudios en la degradación de compuestos orgánicos se ha realizado por bacterias (Martín, y col., 2004).

En la Tabla 4 se presentan algunos géneros de hongos que han demostrado su capacidad degradativa sobre hidrocarburos (Prince, 2003; Díaz-Ramírez y col. 2003; Atlas, 1984).

**Tabla 4.** Hongos degradadores de hidrocarburos

<i>Acremonium</i>	<i>Humicola</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Monilia</i>
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Mortierelia</i>
<i>Aureobasidium</i>	<i>Paecilomyces</i>
<i>Beauveria</i>	<i>Penicillium janthinellum</i>
<i>Botrytia</i>	<i>Phoma</i>
<i>Chrysosporium</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Cladosporium</i>	<i>Saccchaaromycess</i>
<i>Cochliobolus</i>	<i>Sprotrichum</i>
<i>Cylindrocarpon</i>	<i>Spicaaria</i>
<i>Debaryomyces</i>	<i>Tolypocladium</i>
<i>Fusarium</i>	<i>Torulopsis</i>
<i>Geotrichum</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Gliocladium</i>	<i>Verticillium</i>
<i>Graphium</i>	

En la Tabla 5 se presentan algunos trabajos de biodegradación de hidrocarburos por hongos.

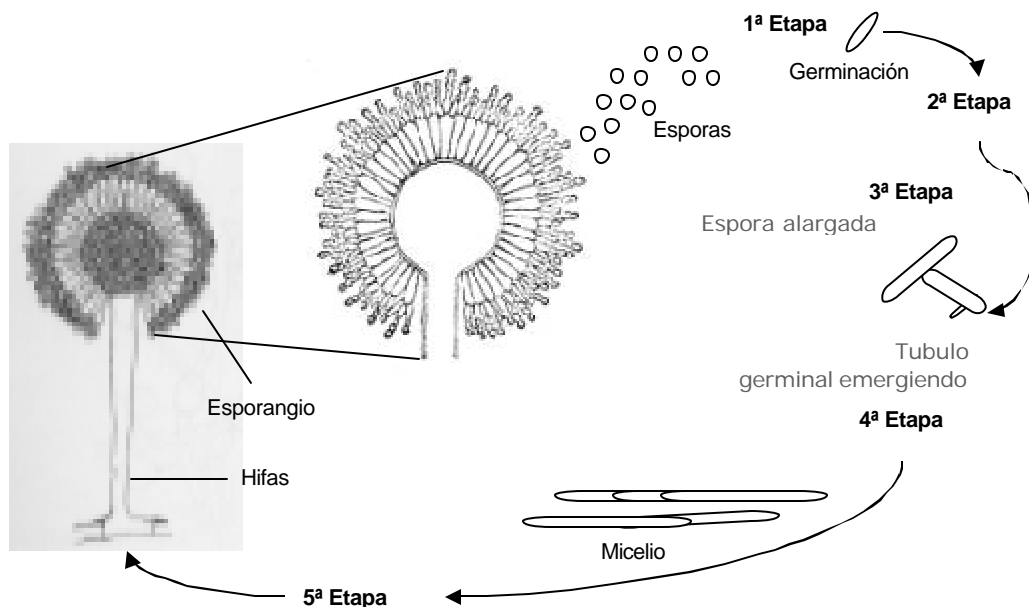
**Tabla 5.** Estudios de biodegradación de hidrocarburos por hongos

Microorganismo	Hidrocarburo (concentración)	Remoción (%) (Tiempo)	Referencia
<i>A. niger</i>	Hexadecano (180-717 mg/g)	100 - 40 (15 días)	Volke y col., 2005
<i>P.chrysosporium</i>	Benzo(a)pireno (71.97 ppm)	19 – 74 (10 días)	Dzul-Puc y col., 2005
<i>A. terreus</i>	Pireno y Benzo(a)pireno (50 y 25 ppm)	60 y 27.5 respectivamente (9 días)	Capotorti, y col., 2004
<i>Pleurotus sp</i>	Mezcla de hidrocarburos poli-aromáticos (10, 50 y 250 ppm)	19 – 53 (15 semanas)	Wolter, y col., 1997

La capacidad de los hongos para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos y llevarlos hasta CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O ofrece un potencial indiscutible para su utilización en procesos de tratamientos de descontaminación. Ese potencial radica fundamentalmente en las características de sus sistemas enzimáticos y en su crecimiento que les permite, a través del desarrollo de su micelio, colonizar diferentes

tipos de sustratos y acceder a los compuestos tóxicos. La elevada relación superficie/volumen celular de los hongos filamentosos los convierte en eficaces degradadores en determinados nichos como los suelos contaminados por moléculas orgánicas tóxicas.

Los hongos se reproducen mediante de esporas. Las esporas se desarrollan en el cuerpo fructífero del hongo y son diminutas estructuras esféricas que contienen una pequeña cantidad de protoplasma rodeado de pared celular. Un proceso común de producción de esporas implica la transformación de las hifas en numerosos segmentos cortos o en estructuras más complicadas de varios tipos. Este proceso sucede sin la unión previa de dos núcleos. Los principales tipos de esporas reproductivas formadas así son: oídios, conidios y esporangiosporas. Estas últimas se originan en el interior de unos receptáculos, parecidos a vesículas, llamados esporangios. En la Figura 2 se presenta el ciclo de germinación de las esporas en los hongos filamentosos de manera general.



**Figura 2.** Reproducción de hongos por esporas, en diferentes estadios de las esporas. Etapa 1.-espora sin germinar; Etapa 2.-espora hinchada; Etapa 3.-espora alargada; Etapa 4.-tubo germinal emergiendo y Etapa 5.-formación de hifas.



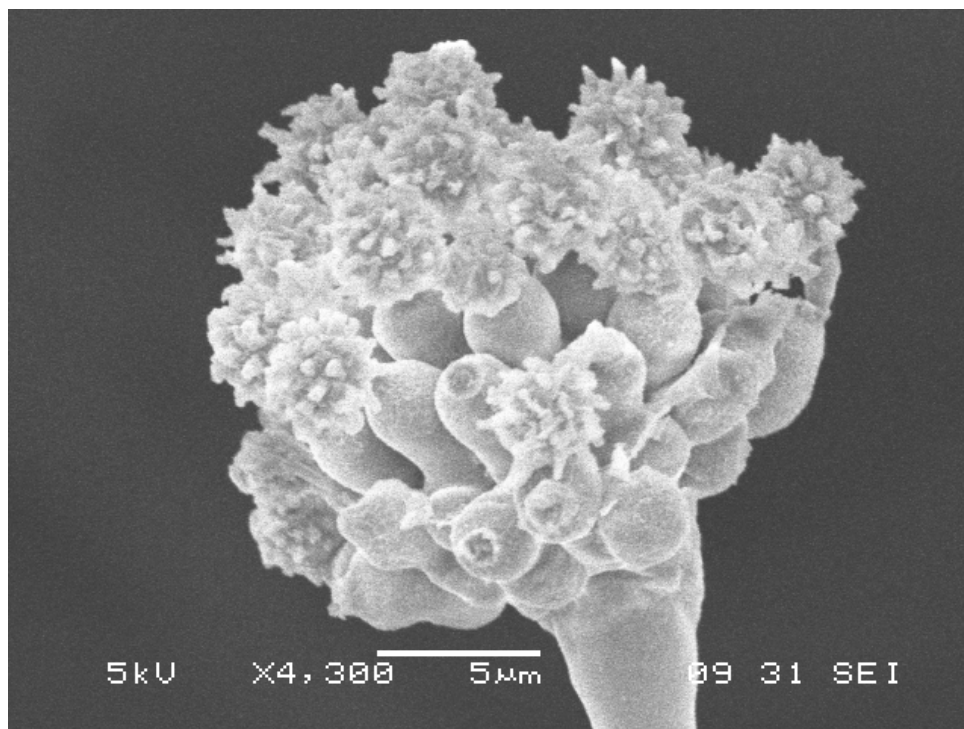
Cuando la espora llega a la superficie de un soporte, ésta se adhiere para iniciar su germinación; la adhesión de las esporas, así como la germinación está determinada por la presencia de proteínas hidrofóbicas de pared, denominadas hidrofobinas. Las cuales, son pequeñas proteínas moderadamente hidrofóbicas (Villena y Gutiérrez-Correa, 2003). Cuya propiedad característica es la formación de una membrana anfipática, en contacto con una interfase hidrofílica-hidrofóbica, lo cual permite cambiar la naturaleza de la superficie; particularmente *A. niger* produce hidrofobinas intracelulares en esporas y micelio (Askolin y col., 2001).

El siguiente paso para la germinación de las esporas es la hidratación, en este paso la espora se hincha y se aprecia un crecimiento, seguida por un metabolismo endógeno que permite la síntesis de los bloques estructurales y macromoléculas necesarias para dicha germinación. En este último paso interviene un disacárido (trehalosa) que controla la germinación de las esporas (Feofilova, 2001). Conforme ocurre la germinación, el tubo germinal comienza a emerger de la espora; posteriormente el alargamiento de los tubos germinales da origen a la formación de las hifas, las cuales crecen por alargamiento de las puntas y también por ramificación. La proliferación de hifas, resultante de este crecimiento, se llama micelio.

La esporulación se lleva a cabo generalmente cuando el hongo se encuentra bajo estrés o cuando hay un exceso de sustrato, entonces comienza nuevamente el ciclo de la germinación.

#### *Aspergillus niger*

Dentro de los hongos filamentosos se encuentra el *A. niger*. Este hongo ha demostrado un gran potencial en la industria alimentaria y en aplicaciones biotecnológicas para el mejoramiento ambiental. *Aspergillus niger* es un hongo de apariencia esponjosa (Figura 3). La formación del micelio en este hongo es a partir de las hifas de color blanco el cual se va tornando de color negro a medida que se van formando las esporas.



**Figura 3.** Morfología por microscópica electrónica del hongo filamentoso *Aspergillus niger*.

Este microorganismo ha sido usado en la producción de enzimas extracelulares como glucoamilasas, pectinasas y ácidos orgánicos, como el ácido glucónico. La producción de ácido cítrico y algunas enzimas producidas por *A. niger* son consideradas generalmente seguras por la “United States Food and Drug Administration” (Schuster, 2002). Además de los varios usos industriales, *A. niger* juega un papel muy importante en la biodegradación de moléculas tóxicas y/o desechos industriales (Volke y col., 2003), desechos de melazas de la industria azucarera y en conversión de lodos de tratamientos de agua (Prashant, 2005), sin embargo aunque está demostrado que el *A. niger* tiene una participación importante en la biodegradación de compuestos orgánicos tóxicos de baja solubilidad, es necesario considerar las condiciones físico-químicas en las que se encuentren estos sustratos para su biodegradación.

#### **1.1.4. Factores que limitan la biodegradación**

Cuando se habla de la biodegradación de moléculas orgánicas tóxicas, además de tener en cuenta las vías degradativas y la regulación de los microorganismos que van a llevar a cabo la biodegradación, también deben considerarse otros factores que puedan influir en la eficiencia de la biodegradación. Es decir, no sirve de nada contar con una cepa con una alta eficiencia degradativa, si hay factores que limiten su verdadero potencial de degradación. Por lo tanto a parte de la eficiencia de las rutas catabólicas y los procesos microbianos de mineralización hay que tener en cuenta que la etapa limitante de la biodegradación de la mayoría de compuestos en el medio ambiente se relaciona con la biodisponibilidad de los mismos (Martín y col., 2004).

El concepto de biodisponibilidad engloba diferentes factores físicos, químicos y biológicos del entorno y es diferente para cada organismo. Cuando se hace referencia a la biodisponibilidad en el suelo, hay que tener en cuenta las características físicas, químicas y biológicas, la textura, granulometría y la composición del suelo.

En suelos contaminados por largos períodos (suelos intemperizados), los contaminantes llegan a ser inaccesibles (no biodisponibles) para los microorganismos que se desarrollan entre los contaminantes y la materia orgánica del suelo (García y col., 2002). La biodisponibilidad y por tanto la velocidad de degradación, frecuentemente están limitados por procesos fisicoquímicos, como la sorción y desorción de los contaminantes hacia y desde la matriz de suelo, la difusión en la fase sólida y la disolución de contaminantes en la fase líquida (Bosma, y col., 1997). El efecto negativo de estos fenómenos es la acumulación y persistencia de los contaminantes, y depende del tipo y calidad del suelo contaminado (Guerin y Boyd, 1992).

Hoy en día se estudian nuevas alternativas que ayuden a los contaminantes a que estén más biodisponibles para su degradación por los microorganismos. Entre las tecnologías mas aplicadas para desorber los contaminantes de suelos destacan: el

uso de solventes no polares (ej. tolueno), el uso de surfactantes no iónicos (Brij 30, Tween 80, Triton X-100, etc.), extracción de vapores (remoción de volátiles y semivolátiles) (Volke y Velasco 2002; García y col., 2002; Laha y Luthy., 1992) y la aplicación de tratamientos electroquímicos (Virkytyte y col., 2002; Ko y col., 2000).

Una nueva propuesta que comienza a estudiarse para ayudar a acelerar los procesos de biorremediación es el uso de una corriente eléctrica. La cual, además de ayudar a que los contaminantes se encuentren biodisponibles, se ha demostrado que influye en el metabolismo de los microorganismos y que permite mantener una mejor homogeneidad de las sales disueltas en los suelos (Virkytyte y col., 2002), y para poder entender los fenómenos, que ocurren cuando se estudia una nueva estrategia de trabajo, son muy útiles los soportes inertes.

## **1.2. Soportes inertes**

### **1.2.1. Utilización de soportes en cultivo sólido**

Un soporte esta constituido por una matriz sólida porosa la cual puede ser o no ser biodegradable, con una gran superficie por unidad de volumen en la cual puede haber crecimiento microbiano en la interfase sólido/gas. La utilización de estos soportes sólidos es afectada por factores físicos y químicos, como el tamaño de partícula, la porosidad y la composición química; el costo y la disponibilidad, son otros factores importantes que hay que tomar en cuenta. Como consecuencia, la selección de un adecuado material sólido juega un papel importante en el desarrollo de un eficiente sistema de cultivo sólido (Couto y col., 2002).

Los procesos de cultivo en sistemas sólidos pueden ser definidos como "los procesos microbiológicos que ocurren en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles" (Viniestra-González, 1997). Esta definición abarca a procesos donde el soporte sólido es inerte y los sustratos que utiliza el microorganismo pueden ser sustancias solubles o insolubles en agua. En algunos casos se utilizan soportes que, además, aportan nutrientes para el desarrollo de los microorganismos, como: paja de avena, desechos

hortifrutícolas (Corlay, y col., 1999), bagazo de caña, bagazo de zanahoria, (Velasco, 2004). En otras ocasiones, se han buscado “soportes modelo”, en cuanto a su forma y tamaño, que permitan el uso de medios de cultivo bien definidos; algunos ejemplos de este tipo de soporte son: amberlita, espuma de poliuretano, arena y agrolita (Ooijkaas y col., 2000).

Este tipo de soportes modelo impregnados con medios definidos son una herramienta valiosa en investigación, ya que puede proporcionar grandes beneficios en procesos industriales. Éstos exhiben ventajas que no son obtenidos con sustratos naturales, además de que facilitan las mediciones de sustancias de interés, se tiene un mejor control fisiológico y cinético en los cultivos sólidos (Zhu y col., 1994). El uso de estos soportes ofrece una flexibilidad adicional cuando se diseña el medio óptimo para la producción de metabolitos, enzimas y esporas, entre otros (Larroche, 1996). Por ejemplo muchos hongos filamentosos debido a sus propiedades fisiológicas, enzimáticas y bioquímicas, son los mejores adaptados para estas condiciones y dominan la investigación en cultivos sólidos (Raimbault 1998). Los hongos requieren un contacto cercano con el sustrato debido a su nutrición heterótrofa, secreción de enzimas extracelulares, absorción de nutrientes a través de la pared celular y el crecimiento apical de sus hifas (Villena y Gutiérrez-Correa, 2003), algunos de estos hongos representan un grupo interesante de estudio, con un gran potencial en la biotransformación y biodegradación de moléculas orgánicas tóxicas en ambientes naturales.

#### **1.2.1.1 Características de un soporte modelo**

Las características deseadas de los soportes modelo para estudios de investigación en cultivos sólidos son: (Ooijkaas y col., 2000, Raimbault 1998).

- No debe existir degradación del soporte por los microorganismos, conservando se geometría durante el proceso.

- No deben contener inhibidores del crecimiento microbiano que pudiera incorporarse al medio ya sea por liberación directa o por reacción con otros componentes de la solución nutritiva adicionada.
- Debe ser rígido y con espacios interpartícula que permitan la aireación del sistema soporte-microorganismo.
- Debe tener una alta retención de agua, para lograr la actividad de agua necesaria para el crecimiento microbiano.
- No debe presentar interferencia con las técnicas analíticas.

Un soporte modelo interesante que se propone en el presente trabajo en el estudio de la biodegradación de HXD al aplicar una corriente eléctrica sobre *A. niger*, es la agrolita, una piedra de origen volcánico cuyas características se detallan en la siguiente sección.

#### **1.2.1.2. Características de la agrolita.**

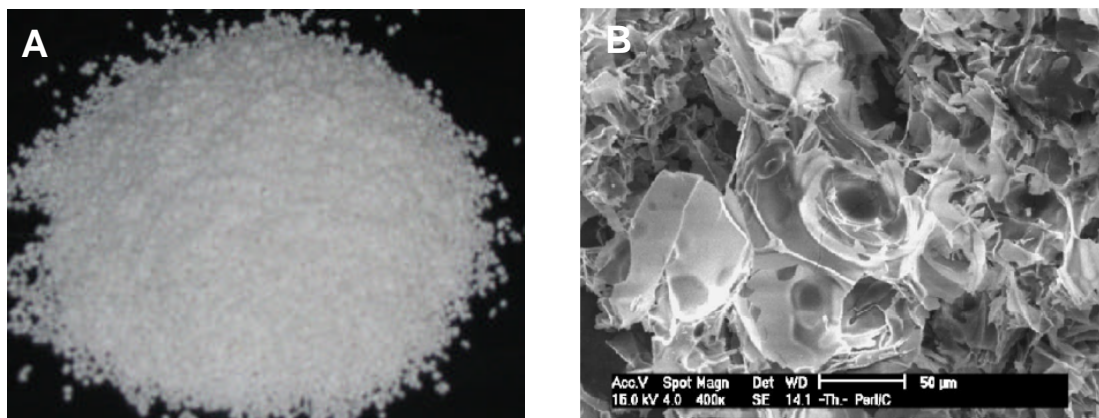
La agrolita es una roca silíceica de origen volcánica del grupo de las riolitas, es una piedra obtenida como consecuencia de un tratamiento térmico a unos 1000-1200 °C. Se presenta en partículas blancas, cuyas dimensiones varían entre 1.5 y 6 mm, con una densidad baja, en general inferior a los 430 kg/m<sup>3</sup>. Posee una capacidad de retención de agua de hasta cinco veces su peso y una elevada porosidad (>90%), su durabilidad está limitada al tipo de cultivo, pudiendo llegar a los 5-6 años. Su pH está cercano a la neutralidad (6.5-7,5), es un material con excelentes propiedades que facilitan la aireación y, en ocasiones se utiliza mezclada con otros sustratos como turba, arena, y otros (Rouliá y col., 2003).

La composición química de la agrolita se muestra en Tabla 6 (Dogan y col., 1997).

**Tabla 6.** Composición química de la agrolita

Compuestos	Cantidad (%)
SiO <sub>2</sub>	71 – 75
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	12.5 – 18
Na <sub>2</sub> O	2.9 – 4.0
K <sub>2</sub> O	4.0 – 5.0
CaO	0.5 – 2.0
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.1 – 1.5
MgO	0.03 - 0.5
TiO <sub>2</sub>	0.03 - 0.2
MnO <sub>2</sub>	0.0 - 0.1
SO <sub>3</sub>	0.0 - 0.1
FeO	0.0 - 0.1
PbO	0.0 - 0.5

Por lo anterior la agrolita (Figura 4), ofrece numerosas ventajas en comparación con los soportes naturales, en estudios de investigación como: un mejor control, homogeneidad y monitoreo de los procesos que se estén llevando a cabo.



**Figura 4.** Soporte inerte: Agrolita A) morfología macroscópica B) morfología por microscópica electrónica (Roulia y col., 2003)

Debido a estas propiedades la agrolita se ha utilizado satisfactoriamente como soporte modelo en estudios de fitorremediación de hidrocarburos del petróleo

(Escalante-Espinosa y col., 2005), en cultivos hidropónicos y como material absorbente para derrames de compuestos de petróleo en agua (Roulia y col., 2003).

### **1.2.2. Aplicaciones de los soportes**

Los soportes utilizados en cultivos sólido han tenido diferentes aplicaciones en el área ambiental, se han utilizado en la biorremediación y biodegradación de compuestos tóxicos, la detoxificación de desechos industriales, la producción de alimento para animales a partir de desechos sólidos, así como en la industria alimentaria y farmacéutica; en la elaboración de antibióticos, aislamiento y purificación de productos, biopesticidas, ácidos orgánicos, producción de alimentos fermentados, pigmentos y saborizantes (Raghavarao y col., 2003; Pandey, 2003).

Por ejemplo, Christen y col. (1993), utilizaron amberlita para el estudio del crecimiento y bioconversión de etanol por *Candida utilis*; Gutiérrez-Rojas y col. (1995), trabajaron con amberlita en la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger*; Ozawa y col. (1996), utilizaron espuma de poliuretano para la producción de proteasas; Murado y col. (1997), usaron espuma de poliuretano en la producción de amilasas por *Aspergillus oryzae*. También se han utilizado estos soportes para estudios de degradación de moléculas hidrofóbicas orgánicas tóxicas como: degradación de alcanos por *Pseudomonas* sobre espuma de poliuretano (Jerábková y col., 1997), biotransformación de hidrocarburos poliaromáticos, sobre arena como soporte (Rama-Mercier, y col., 1998), degradación de fenantreno por *Phanerochaete chrysosporium* y *Aspergillus niger*, en xerogel de óxido de silicio polimerizado como soporte sólido inerte (Peralta, 2001), degradación de HXD por *Aspergillus niger*, utilizando espuma de poliuretano como soporte (Volke y col., 2005).

Trabajos recientes han sugerido que los cultivos sólidos, podrían superar los efectos de la represión catabólica, la inhibición por producto final e inducir cambios en las características de las enzimas que se sintetizan (Shankaranand y col., 1992). En este sentido, esto podría explicar el hecho de que bajo estas condiciones los microorganismos soportan elevadas concentraciones de moléculas orgánicas tóxicas



en cultivos sólidos, en contraste con lo que ocurre en los cultivos líquidos en donde no es posible utilizar concentraciones iniciales altas de sustratos.

### 1.3. Tratamiento electroquímico

#### 1.3.1. Definición y características

El tratamiento electroquímico en suelos contaminados es considerado una tecnología emergente de remediación *in situ*, altamente efectiva para la remoción de metales pesados y compuestos orgánicos altamente solubles en agua (Pamukcu y Wittle 1994). El tratamiento electroquímico de un suelo contaminado (electroremediación), involucra la aplicación de una corriente directa de bajo voltaje o de un gradiente de potencial a través de un electrodo positivo (ánodo) y uno negativo (cátodo) que se insertan en el suelo, donde los principales mecanismos característicos de transporte de estos contaminantes durante el tratamiento electroquímico son (Virkyte y col., 2002):

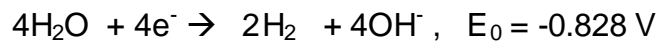
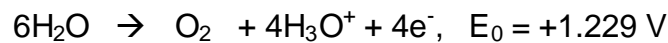
**Electromigración:** movimiento de especies iónicas disueltas, por efecto del campo eléctrico. Este mecanismo de transporte es el predominante para la remoción de contaminantes inorgánicos, como los metales pesados.

**Electroforesis:** movimiento de especies disueltas o suspendidas en el medio fluido por efecto de su carga dentro de un campo eléctrico.

**Electroósmosis:** movimiento del agua de solvatación por efecto del campo eléctrico.

Este fenómeno electroquímico es conocido desde hace mucho tiempo y de hecho los ingenieros civiles, lo han utilizado desde hace medio siglo para la remoción de humedad tanto de suelos como de paredes y techos. En la actualidad se usa también para la remoción de agua en los sólidos municipales de desecho (Pamukcu y Wittle, 1994).

Las reacciones involucradas en el proceso electroquímico son las siguientes:



Donde  $E_0$  es el potencial electroquímico de reducción estándar, el cual es una medida de la tendencia de los reactivos en sus estados estándar a avanzar a productos en sus estados estándar (Acar y Alshawabkeh, 1993).

### 1.3.2. Proceso electrocinético

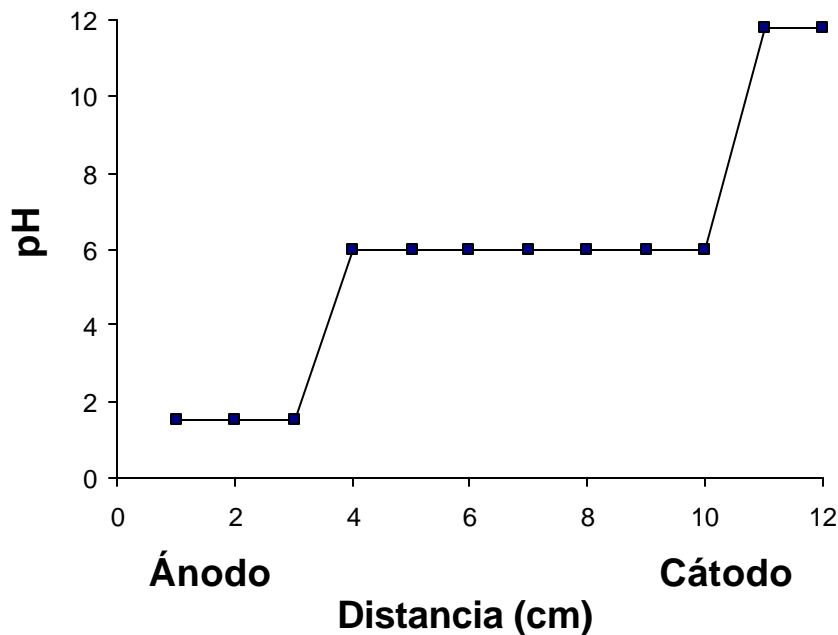
La técnica de remediación electrocinética implica además de la percolación de una fase líquida a través de la matriz del suelo, el transporte o la migración de las especies contaminantes, que son provocadas por un flujo electroosmótico y se ve afectado por los fenómenos de difusión y sorción (Shapiro y Probstein, 1993). La electrólisis en el ánodo y el cátodo producen, respectivamente, un frente ácido ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) y un frente alcalino ( $\text{OH}^-$ ), que junto con los iones cargados presentes en el electrolito y bajo la aplicación de un campo eléctrico provocan la migración de estos iones hacia el ánodo y el cátodo, con ello se propicia la concentración o precipitación de los contaminantes, en estos procesos se usan bajos niveles de corriente directa, del orden de  $0.1 - 50 \text{ mA/cm}^2$  (Acar y Alshawabkeh, 1993).

En la remediación electrocinética, el transporte de los productos de la electrólisis tales como los iones  $\text{H}_3\text{O}^+$  y  $\text{OH}^-$  generados en los electrodos afectan significativamente la química del suelo. El movimiento del  $\text{H}_3\text{O}^+$  hacia el cátodo ayuda en la desorción de especies de las superficies de la arcilla y en la disolución de las sales en el mismo suelo. La migración y difusión del  $\text{OH}^-$  en dirección opuesta puede ocasionar la precipitación prematura de cationes y moléculas de hidrocarburos transportados a esta región (Acar y Alshawabkeh, 1993).

Cuando ambos frentes (pH ácido y pH alcalino) se encuentran, se neutralizan uno a otro, esto provoca un cambio drástico de pH en cierta región de la celda. La ubicación del salto de pH está determinada por la movilidad relativa de los iones

hidronio e hidroxilo (Pamucku y Wittle, 1994). La alcalinización del suelo promueve el aumento de flujo electroosmótico, y por ende, la desorción de los contaminantes orgánicos del mismo; mientras que, si se mantiene un frente ácido a través de la celda, el flujo electro-osmótico disminuirá considerablemente y en consecuencia la desorción de los contaminantes orgánicos cesará también (Kim y col. 1999). Como se ha mencionado, las reacciones que ocurren en los electrodos son las que controlan el proceso de electroremediación.

En la Figura 5 se muestran los cambios de pH que generalmente se presentan en los procesos electroquímicos, donde se observan tres regiones de pH una ácida, un pH cercano al neutro y una alcalina.



**Figura 5.** Perfil de pH a lo largo de la celda electroquímica de ánodo hacia cátodo, al aplicar una intensidad de corriente durante los tratamientos electrocinéticos.

Estos cambios de pH tan drásticos pueden llegar afectar a las poblaciones microbianas presentes en el sistema, llegando a inactivar por completo las funciones metabólicas de los microorganismos (Guillou y Murr 2002; Ranalli y col. 2002; Hyo-

Sang y Lee 2001). Existen estudios donde se recirculan soluciones buffer a través de las celdas electroquímicas, para mantener el intervalo de pH deseado. Hyo-Sang y Lee (2001), experimentaron diferentes soluciones buffer como soluciones electrolíticas, éstas fueron utilizadas con el objeto de encontrar una solución buffer, con capacidad para mantener estable el pH al aplicar un potencial eléctrico de 40 mA durante 24 horas. Las soluciones estudiadas fueron recirculadas a través de la celda con un flujo de 80 mL/L, las soluciones fueron: fosfatos (pH=7), carbonato de amonio (pH=9) y una mezcla de fosfatos de amonio (pH=8). Este grupo observó que con la solución de fosfatos se logró mantener el intervalo del pH deseado, este estudio fue realizado en una celda rectangular. Por otro lado, Jackman y col., (2001) utilizaron un sistema muy similar al descrito anteriormente, utilizando una solución buffer de fosfato de sodio como electrolito, a diferencia del trabajo anterior Jackman y col., utilizaron un controlador de pH, manteniéndolo entre 6.5 – 7 con la misma solución de fosfatos de sodio.

Otro efecto que se produce al aplicar una intensidad de corriente es el calentamiento por electroresistividad (resistencia al paso de corriente a través del suelo), que ocurre cuando se incrementan las intensidades de corriente y en consecuencia aumenta el potencial de celda (voltaje), esto puede llegar a ser perjudicial para los microorganismos por diversas razones: puede ocasionar la acumulación de altas concentraciones de contaminantes orgánicos en ciertas zonas de la celda electrocinética, debido al arrastre de estas moléculas orgánicas por efecto de la electromigración, provocando toxicidad en las poblaciones presentes. La acumulación de sales (iones disueltos) e incrementos altos de temperatura son otro factor que puede disminuir considerablemente la actividad microbiana.

Sin embargo, una de las tecnologías que comienza a explorarse dentro de este mismo campo, es el tratamiento bio-electrocinético que es el uso de una corriente eléctrica de baja intensidad -en contraste con las utilizadas para la remoción de metales pesados-, puesto que además de la remoción de las moléculas orgánicas tóxicas presentes en los suelos contaminados se ha demostrado que se estimula el

metabolismo de los microorganismos acelerando la degradación de estos compuestos (Loo, 1994).

### **1.3.3. Aplicación de tratamientos bio-electrocínético**

Esta tecnología ha sido diseñada para promover el crecimiento, la reproducción y el metabolismo de microorganismos, capaces de transformar contaminantes orgánicos presentes en un suelo (Van Cauwenberghe, 1997). La aplicación de esta tecnología requiere de intensidades bajas de corriente en el suelo, causando la migración de compuestos orgánicos junto con el agua hacia los electrodos (Jackman y col. 2001). Además, los nutrientes pueden dispersarse uniformemente bajo la influencia de una corriente eléctrica dentro del área en tratamiento, esta tecnología evita los problemas asociados con el transporte de microorganismos, a través de los suelos arcillosos (Virkyute y col. 2002).

Esta tecnología también ha sido utilizada para reforzar la remoción de metales pesados del suelo, además de obtener un aumento en la actividad de la población microbiana nativa (Universidad de Oxford, 1996).

La primera demostración exitosa del uso de la bio-electrocínética para la remediación de suelos, se realizó en Holanda en 1986 (Van Cauwenberghe, 1997). En 1993, Raloff describió un proyecto llamado "Lasagna", que combina un proceso biológico y uno electro-osmótico, en donde capas alternas de bifenilos policlorados (PCBs) se degradaron por acción microbiana. Una vez que los PCBs se fragmentaron a moléculas más pequeñas, se aplicó electro-ósmosis para transportar las moléculas hasta un sitio de tratamiento.

Jackman y col. 2001, demostraron que la aplicación directa de una corriente eléctrica en el suelo favorece la biodegradación de compuestos orgánicos. Utilizaron un suelo arcilloso (1 kg) contaminado con ácido 2,4 diclorofenoxi-acético (811 ppm), que depositaron en una celda (22 x 7 x 4 cm), en donde aplicaron una corriente continua de  $0.89 \text{ mA/cm}^2$  durante 21 días. Inocularon con *Burkholderia spp. RASC c2* ( $1.88 \times 10^{11}$  células) y observaron una degradación de aproximadamente 75% en 22

días. Por otro lado, Hyo-Sang y Lee (2001), limpiaron un suelo contaminado con diesel (4,000 ppm), utilizando una celda (20 x 8 x 6 cm) en la que aplicaron una corriente eléctrica de 0.83 mA/cm<sup>2</sup>. Después de 8 días, se obtuvo una degradación de 60% por acción de *Pseudomonas sp.* ( $2-3 \times 10^7$  células/mL).

Para este tipo de estudios electrocinéticos se han utilizado distintas formas geométricas en las celdas electroquímicas. Por ejemplo: DeFlaun y Condee (1997), utilizaron una celda de acrílico (60 x 30 x 15 cm), para evaluar el movimiento de bacterias por efecto de una corriente eléctrica; Yee y col. (1998), utilizaron un reactor cilíndrico de 150cm de altura y 25cm de diámetro interno para la degradación de percloroetileno y diclorofenol; Ko y col. (2000), utilizaron una columna de vidrio de 10cm de largo X 2.5cm de diámetro, en la cual evaluaron la remoción del fenantreno; mientras que Guillou y Murr (2002), utilizaron una placa de platino de 23 X 20mm, evaluando la inactivación de *Saccharomyces cerevisiae*.

En las celdas de forma rectangular, se presenta un problema, debido a que el soporte se encuentra expuesto al aire, provocando una sequedad del mismo, dejando espacios secos del soporte por los cuales hay un impedimento al paso de corriente, lo que provoca una disminución en el flujo electroosmótico. Esto se debe a que el flujo electroosmótico está fuertemente ligado con el grado de humectación del suelo lo cual puede provocar un aumento en la resistencia del sistema el cual se ve reflejado en un aumento en el potencial de celda y temperatura (Alshawabkeh y col., 1999).

Sin embargo, ninguno de los trabajos citados ha discutido sobre la influencia que tiene la geometría de las celdas electroquímicas sobre los procesos electrocinéticos. Fue hasta 2005 cuando Murillo realizó un estudio sobre el diseño y evaluación de una celda electroquímica con suelo contaminado, observando que con las celdas herméticas y de forma cilíndrica se pueden eliminar los efectos de la interfase aire-suelo sobre los procesos electroquímicos.

Por lo tanto, para evitar contribuciones de interfase aire-suelo las cuales puedan afectar los tratamientos, al aplicar una corriente eléctrica, la celda electroquímica que

se utiliza en este trabajo, se construyó a partir de la celda diseñada por Murillo (2005), ajustando el diseño de acuerdo a las necesidades requeridas en el presente trabajo.

Otro tipo de tratamientos que comienza a explorarse dentro de esta técnica es el estímulo de una corriente eléctrica sobre el metabolismo y/o actividad de los microorganismo.

#### **1.3.4. Efecto de una corriente eléctrica**

Otra nueva línea que comienza a estudiarse derivada de los tratamientos bio-electrocinéticos, es el estudio únicamente del efecto que causa a los microorganismos la aplicación de una intensidad de corriente, en donde no se involucra la migración de los compuestos orgánicos, como ocurre en los tratamientos electrocinéticos.

Jackman y col. (1999), observan que al aplicar una intensidad de corriente de 20 mA/cm<sup>2</sup> durante 80 horas, se disminuye el crecimiento de bacterias acidofílicas en suelo, ellos mencionan que el bajo crecimiento de estas bacterias es debido a los cambio de orientación que se presentan en la polaridad de la membrana, teniendo como resultado una baja viabilidad en las bacterias y como consecuencia el crecimiento de esta bacterias sea menor en contraste al control (sin corriente). Resultados similares son reportados por Ranalli y col. (2002), donde observan que las bacterias Gram-positivas y levaduras son menos sensibles a los tratamientos electrocinéticos que las bacterias Gram-negativas, mencionando que estos resultados son debido a las reacciones químicas inducidas por los tratamientos electrocinéticos, a nivel de la membrana celular.

Existe diversos estudios en el área de biología molecular que demuestran que los campos eléctricos pueden afectar las funciones biológicas de los organismos y esto pueda darse por la estimulación en la síntesis de ATP (Zrimec y col., 2002).

En investigaciones recientes realizadas en la UAM (2003), se estudió la aplicación de diferentes intensidades de corriente (0, 5, 12.5 y 20 V) en un soporte inerte (agrolita),

con *Aspergillus niger* como inóculo, donde se observó que al aplicar un potencial eléctrico de 12.5V (0.8 mA/cm<sup>2</sup>) se favoreció el crecimiento del hongo.

En la Tabla 7 se presentan algunos trabajos en donde se aplican diferentes intensidades de corriente, observando únicamente la respuesta del microorganismo a la corriente eléctrica.

**Tabla 7.** Estudios electrocinéticos, aplicando diferentes intensidades de corriente. Los resultados descritos se comparan con controles sin corriente.

Microorganismo	Resultado	Compuesto	Corriente aplicada	Referencia
Consortio microbiano	Crecimiento microbiano 50% más	-----	22.5 V/m	Lageman y col., 1995
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> y Bacterias acidofilicas	Estimulación del metabolismo	Glucosa	20mA/cm <sup>2</sup>	Jackman y col., 1999
<i>Escherichia coli</i>	Estimulación en la síntesis de ATP	Glucosa	2.5-50 V/cm	Zrimec y col., 2002
<i>Clostridium thermocellum</i>	Incremento en la producción de etanol 61%	Extracto de levadura	1.5 V	Shin y col., 2002
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Incremento en la producción de etanol 12%			
<i>Aspergillus niger</i>	Se favoreció el crecimiento	Glucosa	0.8 mA/cm <sup>2</sup>	UAMI, 2003



---

## 2. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado, que el uso de corrientes eléctricas puede acelerar el metabolismo de los microorganismos, particularmente los procesos de biodegradación, como consecuencia de cambios de polaridad en las membranas o bien generando estímulos en la actividad enzimática.

Los estudios hasta ahora reportados, sobre el efecto que ocasiona la aplicación de intensidades de corriente en los microorganismos se han estudiado principalmente en bacterias y en menor proporción en levaduras. Se ha reportado una gran variedad de respuestas, dependiendo del tipo de bacteria, intensidad de corriente, tiempo de exposición y condiciones del medio.

Sin embargo, hasta el momento no existen trabajos relacionados con el efecto que provoca la corriente eléctrica en hongos filamentosos, microorganismos que ha demostrado tener un gran potencial de aplicación en el área ambiental.

Es por esto que surge la inquietud de estudiar el efecto que provoca la corriente eléctrica en un hongo filamentoso como *Aspergillus niger*, durante la degradación de hexadecano (HXD), en un sistema modelo sólido, que elimine la complejidad analítica de los ambientes naturales y que permita realizar investigación básica, como herramienta para la comprensión de las variables que inciden en este proceso.

---

## 3. HIPÓTESIS

La aplicación de una corriente eléctrica modifica la degradación de hexadecano por *Aspergillus niger*.

---

## 4. OBJETIVOS

#### **4.1. Objetivo general**

- Evaluar el efecto de un campo eléctrico en el crecimiento y respiración de *Aspergillus niger* durante la degradación de HXD en un soporte inerte.

#### **4.2. Objetivos particulares**

- Diseñar una celda electroquímica, que permita la evaluación de la respiración y crecimiento de *A. niger* al aplicar una corriente eléctrica
- Determinar el efecto del tamaño de partícula del soporte inerte en la degradación de HXD y crecimiento de *A. niger*
- Caracterizar la celda con el soporte a diferentes intensidades de corriente
- Seleccionar las intensidades de corriente que serán aplicadas durante los cultivos
- Evaluar el efecto de las intensidades de corriente seleccionadas sobre el crecimiento, respiración y degradación de HXD por *A. niger*

---

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la Figura 5.1 se presenta la estrategia experimental seguida en el desarrollo de este trabajo. El trabajo experimental se realizó en tres etapas: la primera consta de una parte microbiológica, la segunda es un parte electroquímica y la tercera etapa, es la aplicación simultánea de las dos primeras.

En la primera etapa se realizó la selección del tamaño de partícula del soporte, sin corriente eléctrica, a través de la cuantificación del consumo de O<sub>2</sub>, la degradación de HXD y la producción de biomasa, así como la estandarización de las técnicas analíticas.

El la segunda etapa se diseñó la celda electroquímica, de acuerdo a las necesidades requeridas para la aplicación de las intensidades de corriente, la caracterización de la misma y la selección de las intensidades de corriente.

Durante la tercera etapa, las intensidades de corriente seleccionadas fueron aplicadas a los cultivos, cuantificando el consumo de O<sub>2</sub>, producción de CO<sub>2</sub>, degradación de HXD y producción de biomasa.



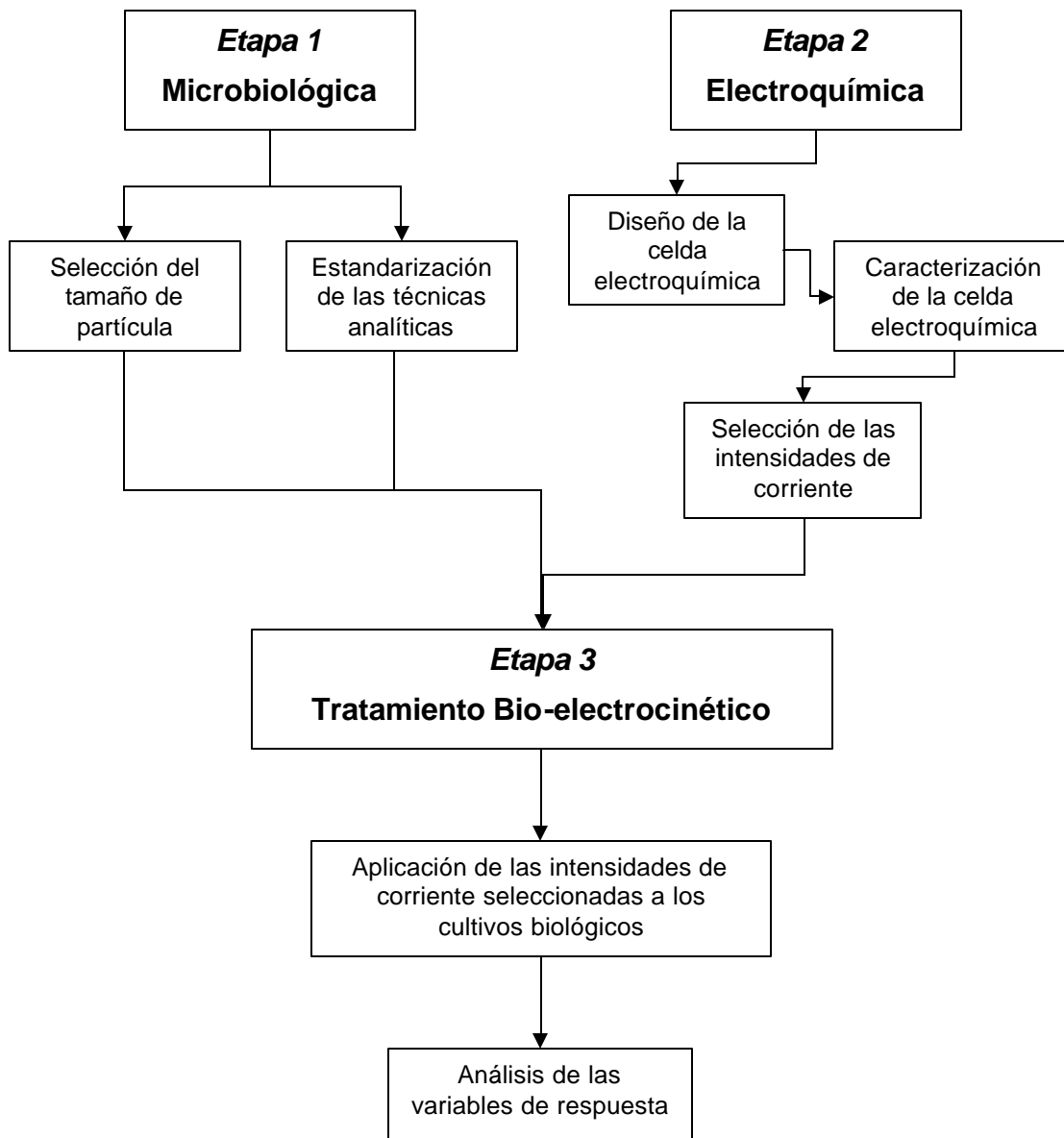


Figura 5.1. Estrategia experimental por etapas

---

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar acabo el trabajo experimental, fue necesario la preparación del soporte, el diseño de los medios de cultivo, la propagación de la cepa, el diseño de la celda electroquímica y la estandarización de las técnicas analíticas, que a continuación se describen.

## **6.1. Preparación del soporte**

### **6.1.1. Tamizado y selección de tamaño de partícula**

Como soporte modelo inerte se utilizó agrolita (Dicalite, México). Se hizo pasar por diferentes tamaños de malla (16, 12, 10 y 6), recolectándose tres diferentes tamaños de partícula:

- i. Entre 1.19 y 1.68 mm.
- ii. Entre 2 y 3.36 mm.
- iii. Mayor y 3.36 mm.

Una vez separada la agrolita, fue lavada con agua caliente y secada a temperatura ambiente, para su posterior utilización.

### **6.1.2. Contaminación del soporte**

La agrolita limpia, seca y separada de acuerdo al tamaño de partícula, ésta fue contaminada artificialmente con HXD (Sigma). El HXD fue utilizado como única fuente de carbono para el microorganismo. Para contaminar la agrolita con HXD (180mg de HXD/g de agrolita seca) se realizaron los pasos siguientes:

1. Se solubilizó el HXD en hexano (1.9 mL de hexano por cada 180 mg. de HXD)
2. Se impregnó y homogeneizó la agrolita con la solución de HXD-hexano
3. La agrolita contaminada se extendió en charolas y se evaporó el hexano a temperatura ambiente

La agrolita contaminada fue depositada en recipientes de vidrio almacenada por no más de una semana.

## 6.2. Propagación y conservación de la cepa

### 6.2.1. Microorganismo

La cepa utilizada fue *Aspergillus niger* ATCC 9642, seleccionada en estudios previos de degradación de HXD. La cepa se resembró por estría en cajas Petri con PDA (agar de papa-dextrosa), se incubó por siete días a 30°C. El procedimiento se repitió en matraces Erlenmeyer (250 mL) hasta completar tres ciclos, antes de usarla para los objetivos de este trabajo. La cepa fue conservada en refrigeración a -4°C, en una solución de glicerol (15% v/v) en criotubos de 1.5 mL; en cada criotubo se colocaron 3 cuadros de 0.5 cm<sup>2</sup> de agar (PDA) con micelio de 7 días.

### 6.2.2. Cosecha de esporas

Las esporas de *A niger* fueron cosechadas de un cultivo de 7 días (30°C) en medio PDA. Las esporas fueron suspendidas en una solución de Tween 80 (0.5%), en condiciones asépticas. La suspensión de esporas, con cuentas de aproximadamente 1x10<sup>8</sup> esp/mL, se utilizó para inocular las unidades experimentales para el estudio. La concentración de esporas para los ensayos en agrolita fue de 2.0 x 10<sup>7</sup> esporas por g de agrolita seca.

### 6.2.3. Medios de cultivo

En la Tabla 6.1 se muestran los medios de cultivo utilizados para la obtención de biomasa de *A. niger* y para los experimentos de biodegradación de HXD. En ambos casos el pH fue ajustado a 5.

**Tabla 6.1.** Composición de los medios de cultivo utilizados

Componente	MA (g/L)	MB (g/L)
NaNO <sub>3</sub>	5.1	21.23
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6	3.004
MgSO <sub>4</sub>	0.45	0.882
KCl	0.3	3.05
Extracto de levadura	3	-----
Sacarosa	20	-----
HXD (mg/g de soporte)	-----	180
Oligoelementos* (mL/L)	6	6

Donde **MA** es el medio utilizado para la obtención de biomasa y **MB** es el medio para los experimentos de biodegradación del HXD.

\*la solución de oligoelementos esta compuesta en g/L por: 0.100 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.015 CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.161 ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.008 MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

El medio MB se diseñó con base en los requerimientos nutricionales del microorganismo ajustando una relación C/N=25 con nitrato de sodio como fuente de nitrógeno y HXD como fuentes de carbono.

El medio utilizado para la biodegradación de HXD se basó en experimentos previos realizados en la UAM-I (Volke y col., 2003 y 2005).

## 6.3. Unidad Experimental

### 6.3.1. Diseño de la celda electroquímica

Para el diseño y construcción de la celda electroquímica fue necesario considerar las siguientes características:

- i. Material resistente
- ii. Capacidad para 15 g de soporte seco
- iii. Dos depósitos para las soluciones electrolíticas

- iv. Dos compartimentos para los electrodos
- v. Hermética, para evitar fugas de gases y contaminaciones
- vi. Sistema de aireación
- vii. Conectores para la cuantificación en línea del CO<sub>2</sub> producido y el O<sub>2</sub> consumido

El diseño de la celda electroquímica se basó en trabajos anteriores, realizados en el área de electroquímica de la UAM-I, en donde se evaluó y caracterizó la electroremediación de un suelo contaminado por hidrocarburos (Murillo, 2005). El diseño de la celda electroquímica se adaptó a las necesidades requeridas para la evaluación del efecto de la corriente eléctrica en *Aspergillus niger* durante la degradación de HXD.

### **6.3.2. Electroodos y soluciones electrolíticas**

Los electrodos utilizados como ánodo y cátodo fueron construidos a partir de una placa de titanio recubierta con óxido de rutenio. Estos electrodos permiten cerrar el circuito eléctrico a través de las reacciones de oxidación y reducción del agua. Estos electrodos fueron fabricados en el área de electroquímica en la UAM-I.

Las soluciones electrolíticas utilizadas fueron soluciones de 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, para ambos compartimentos de la celda electroquímica (ánodo y cátodo).

### **6.3.3. Caracterización de la celda electroquímica**

La caracterización de la celda se realizó aplicando diferentes intensidades de corriente eléctrica (0 – 50 mA/cm<sup>2</sup>) a través de los electrodos, colocados dentro de la celda electroquímica. Esta corriente fue aplicada a través de un potencióstato-galvanostato (EG & G, PARC 173). Durante la aplicación de las distintas corrientes eléctricas, al soporte impregnado con el medio de cultivo -con y sin HXD-, los potenciales de celda (V) se registraron por medio de un multímetro digital de alta impedancia (PROTEK, modelo 506), obteniéndose una gráfica de intensidad de

corriente (mA) contra potencial de celda (V), a partir de la cual se seleccionaron las intensidades de corriente para los experimentos posteriores.

#### **6.3.4. Selección de las intensidades de corriente**

Las consideraciones realizadas para la selección de las intensidades de corriente fueron las siguientes: intervalos en donde se conserva la linealidad, entre la corriente impuesta y el potencial de celda; cambios en la pendiente de este fenómeno ó aumentos de temperatura dentro del sistema.

### **6.4. Técnicas analíticas**

Al final de los tratamientos de biodegradación, se obtuvieron las muestras necesarias para los análisis fisicoquímicos (humedad, pH, TOC y HXD residual) y microbiológicos (respirometría, producción de biomasa y conteo en placa). El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa estadístico NCSS.

#### **6.4.1. Análisis fisicoquímicos**

##### **6.4.1.1. Humedad**

La humedad se determinó por medio de una termo balanza Ohaus modelo MB45, por diferencia de peso entre el material húmedo y el material seco. Una cantidad conocida de muestra húmeda (1 a 1.5 g), se colocó en charolas de aluminio, dejándose a 110°C hasta peso constante.

##### **6.4.1.2. pH**

A 1 g de agrolita seca, se adicionaron 10 mL de agua destilada, la suspensión se agitó durante 5 minutos. Se tomó la lectura de pH en el sobrenadante con un potenciómetro digital (Conductronic pH 20).

##### **6.4.1.3. Carbono orgánico soluble**

El carbono orgánico total (TOC, por sus siglas en inglés) fue determinado en un TOC-5000A Shimadzu, a partir del mismo extracto utilizado para la determinación de pH. En tubos de ensaye de 10 mL, se colocaron 5 mL de muestra, previamente filtradas con filtros de nylon con tamaño de poro de 0.5  $\mu\text{m}$  (Millez<sup>®</sup> HN Millipore).

Para eliminar el CO<sub>2</sub> disuelto en el líquido, todas las muestras se acidificaron con 0.3 mL de una solución de 1 N de HCl y se burbujearon con aire por 3 min.

#### **6.4.1.4. Determinación de HXD**

Para la cuantificación del HXD residual, se utilizó el método EPA 3540C (extracción sólido-líquido de compuestos orgánicos semivolátiles y no volátiles en suelos y sedimentos, USEPA, 1986), de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Se colocó aproximadamente 1 g de muestra seca más sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua residual (~1 g), en un cartucho de celulosa (135 x 80 mm), con algodón en la parte superior, para evitar pérdidas.
- Los cartuchos se colocaron en un equipo de extracción Soxhlet (250 mL), con 160 mL de acetona-hexano (1:1).
- Cada muestra se mantuvo en extracción continua con reflujo durante seis horas a 70 °C.
- El HXD extraído se concentró en un rota-evaporador al vacío (R-295, Büchi, Zwitterland).
- El HXD extraído se resuspendió en matraces aforados de 10 mL con tetracloroetileno.
- El HXD recuperado se cuantificó por espectroscopía infrarroja (FTIR), Perkin Elmer 2000, usando una celda de KCl.

#### **6.4.2 Análisis microbiológicos**

##### **6.4.2.1. Respirimetría**

Para los experimentos que permitieron seleccionar del tamaño de partícula, para los estudios en la celda electroquímica, se utilizaron 8 g de agrolita seca contaminada con y sin HXD. Las muestras se colocaron en botellas Wheaton de 500 mL y se conectaron a un respirómetro Comput-OX 244 (N-CON), registrando el consumo de O<sub>2</sub> en línea durante 19 días.



Para los estudios en donde fueron aplicadas las intensidades de corriente se depositaron 15 g de agrolita seca con y sin HXD (control) en las celdas electroquímicas, conectadas a un respirómetro Micro-Oxymax System (Columbus Instruments), se cuantificó el consumo de O<sub>2</sub> y/o producción de CO<sub>2</sub> en línea durante 12 días.

En el caso de ambos sistemas experimentales, se mantuvo un espesor de ~3 cm de muestra en cada reactor, esto para mantener las mismas condiciones de aireación.

Las condiciones de los cultivos fueron las siguientes: temperatura constante a 30°C en un baño de temperatura controlada; la humedad de la agrolita se ajustó a valores entre 73 y 75 % (~1.92mL/g de agrolita) con el medio de cultivo MB (sección 5.2.5), el pH fue ajustado a 5 con una solución de ácido fosfórico al 0.1M. Todo esto bajo condiciones asépticas.

#### **6.4.2.2. Cuenta microbiana total**

La cuenta de células viables se realizó por diluciones seriadas de una muestra de agrolita (3 g base húmeda), las cuales se inocularon en cajas Petri con agar de papa y dextrosa (PDA) por triplicado. Las cajas Petri fueron incubadas a 30°C durante 72 horas. Se reporta el número de microorganismos, como unidades formadoras de colonias (UFC) por g de muestra de agrolita (base seca).

#### **6.4.2.3. Obtención y cuantificación de biomasa**

La biomasa producida al término de los cultivos se estimó a través de la cuantificación de proteínas por medio del método de Lowry (1951), utilizando los reactivos comerciales de *Bio-Rad Dc protein Assay Kit* y biomasa de *A. niger* como estándar. Para la obtención de proteína, se hidrolizaron 0.5 g de muestra de agrolita seca y pulverizada, por calentamiento en 10 mL de solución de 0.5 N de NaOH durante 10 minutos en un baño de agua hirviendo.

Después de la hidrólisis se tomaron 200 µL de muestra, se agregaron 100 µL de reactivo A (solución alcalina de tartrato de cobre) y 800 µL de reactivo B (reactivo Folin diluido), los tubos se agitaron e incubaron durante 15 minutos a temperatura

ambiente. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro Ultrospec II (LKB Biochorn), utilizando como blanco agua tratada bajo las mismas condiciones que las muestras.

Las curvas de calibración se realizaron a partir de biomasa de *A. niger*. La biomasa de *A. niger* se propago en matraces Erlenmeyer con medio MA (sección 5.2.3) a 30°C durante 32 horas. La biomasa obtenida se filtró al vacío con papel Whatman 42, lavando con agua destilada para retirar las sales del medio, dejando secar a 60°C durante 24 horas y pulverizando con nitrógeno líquido. La estimación de la biomasa se realizó mediante curvas de calibración obtenidas con concentraciones conocidas de biomasa de *A. niger*, a la cual se le realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente.

Para los balances de carbono se determinó la composición de la biomasa experimentalmente en un analizador elemental CNH (Perkin Elmer 2400).

Experimentos con agrolita con y sin HXD demostraron que sus componentes no interfieren en la cuantificación de la proteína por el método de Lowry, ni en la cuantificación de HXD por FTIR.

---

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **7.1. Selección del tamaño de partícula del soporte**

La selección de un tamaño de partícula adecuado en los sistemas de cultivo sólido es de gran importancia, puesto que se ha demostrado que dicha variable puede afectar el crecimiento, la biodisponibilidad y degradación de los sustratos, al modificar algunas de las condiciones de operación como la humedad, la aireación, dispersión del contaminante en el tamaño de partícula, el pH y la temperatura (Couto y col., 2002). Un tamaño de partícula muy pequeño puede ocasionar dificultades de aireación, humedad y cambios de pH, y verse afectado el crecimiento. Además se ha demostrado que el tamaño de partícula está muy ligado a la transferencia de masa en los sistemas en estado sólido, ya que de él dependen la superficie específica de exposición a la acción degradadora de los microorganismos y la facilidad de aireación a través del soporte (Ooijkaas y col., 2000, Raimbault 1998).

Por lo anterior, en esta sección se muestran los resultados obtenidos por efecto del tamaño de partícula de la agrolita en la respiración y producción de biomasa a partir de la degradación de HXD, por *A. niger*. Con estos experimentos se pretendió encontrar el tamaño de partícula más adecuado; el cual presente los resultados más confiables, así como los tiempos de duración de las cinéticas para los tratamientos al aplicar una intensidad de corriente.

En las siguientes secciones se presentan los resultados de degradación de HXD, la producción de biomasa y los resultados de respirometría, los cuales fueron realizados en reactores de 500 mL (botellas Wheaton).

#### **7.1.1. Producción de biomasa y degradación de HXD por *A. niger***

En la Tabla 7.1, se presenta la producción de biomasa por *A. niger*, en función del tamaño de partícula del soporte así como la degradación del HXD después de 19 días de cultivo en condiciones controladas por los diferentes tamaños de partícula del soporte.

**Tabla 7.1.** Producción de biomasa y consumo de HXD por *A. niger* después de 19 días de cultivo

Tamaño de partícula (mm)	Biomasa (mg/g agrolita)	HXD degradado (mg/g agrolita)	HXD degradado (%)
1.19 – 1.68	94.4 ± 2.7 A	115.3 ± 4.5 A	71 ± 3 A
2.3 -3.36	50.6 ± 50.9 AB	100.7 ± 21.4 A	62 ± 13 A
mayor a 3.36	39.9 ± 32.2 B	105.3 ± 15.4 A	65 ± 9 A

Los resultados son las medias con sus desviaciones estándar para N=3

Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ( $\alpha=0.5$ ), el análisis fue realizado entre los diferentes tamaños de partícula.

Como se puede observar, con el tamaño de partícula más pequeño *A. niger* generó una producción de biomasa de 95 mg/g soporte, mientras que con el tamaño de partícula mayor, se obtuvo una menor producción de biomasa. Al realizar el análisis estadístico con las medias de cada uno de los tamaños de partícula en la producción de biomasa, se observó que el tamaño de partícula menor y el más grande, fueron significativamente diferentes. Sin embargo, en la degradación de HXD no se encontró una diferencia significativa entre los tres tamaños de partícula. No obstante, la dispersión de datos (desviación estándar) que se presentó en los resultados obtenidos para los dos tamaños de partícula mayores, tanto en la producción de biomasa como en la degradación de HXD, fueron significativamente mayores (hasta 15 veces) respecto a los obtenidos por el tamaño más pequeño.

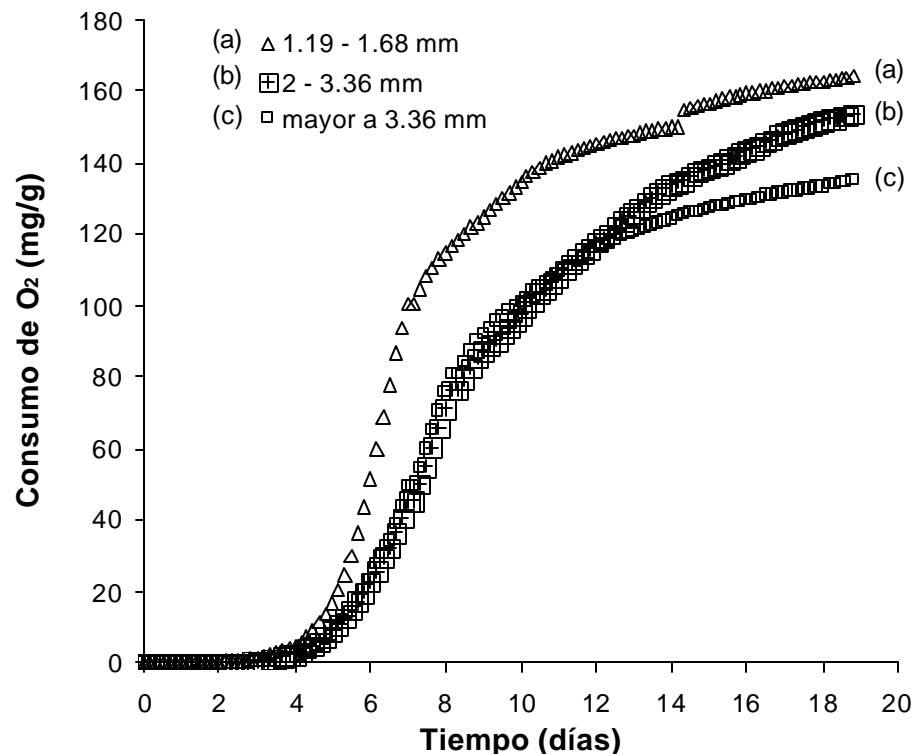
Lo anterior puede atribuirse a que, entre más pequeño el tamaño de partícula, el contacto entre el hongo y el sustrato es mayor. Muchos hongos filamentosos requieren un contacto cercano con el sustrato debido a su nutrición heterótrofa, la secreción de enzimas extracelulares, la absorción de nutrientes a través de la pared celular y el crecimiento apical de sus hifas (Villena y Gutiérrez-Correa, 2003). De esta manera, un tamaño de partícula mayor podría alejar el sustrato del hongo, aunque esto también depende de la porosidad del soporte (Rodríguez y Sanromán, 2005).

Respecto a los controles –agrolita con HXD sin inóculo y agrolita sin HXD con inóculo- la producción de biomasa y degradación de HXD fue nula.

En este experimento se demostró una clara dispersión entre los diferentes tamaños de partícula; al aumentar el tamaño de partícula aumenta la dispersión de los datos obtenidos para cada variable de respuesta. Por lo tanto, y de acuerdo a los resultados obtenidos, el mejor tamaño de partícula tal que permite una mínima dispersión de datos en el crecimiento y degradación HXD en *A. niger* fue el más pequeño (1.19-1.68mm).

### 7.1.2. Cuantificación de O<sub>2</sub> durante la degradación de HXD por *A. niger*

Cuando la velocidad de degradación de un compuesto es relativamente lenta, como en el caso del HXD, el proceso puede seguirse continuamente por la cuantificación del CO<sub>2</sub> producido y/o el O<sub>2</sub> consumido (respirometría). La cantidad de CO<sub>2</sub> producido en un medio con hidrocarburos como única fuente de carbono, es una medida directa de su mineralización (Starnecker y Menner, 1996).



**Figura 7.1.** Cinética del consumo de oxígeno acumulado durante la degradación de hexadecano por *A. niger*, un soporte inerte (agrolita) con tres diferentes tamaños de partícula.

Las etapas iniciales de la biodegradación del HXD dependen directamente del oxígeno molecular ( $O_2$ ), debido a que las principales rutas degradativas para hidrocarburos alifáticos involucran enzimas oxigenasas (Bouwer y Zehnder, 1993).

En la Figura 7.1, se muestra la cinética de consumo de  $O_2$  durante la degradación de HXD por *A. niger* en los diferentes tamaños de partícula del soporte, durante 19 días de cultivo. Se observa que hay un consumo significativamente mayor ( $\alpha=0.5$ ) de  $O_2$  durante los primeros 12 días de cultivo cuando se usa como soporte el tamaño de partícula más pequeño (1.19 – 1.68 mm); mientras que en los otros experimentos que utilizan tamaños de partícula mayores (2 – 3.36 y mayor a 3.36 mm) no se observó una diferencia significativa en el consumo de  $O_2$  en la misma etapa. Por otra parte, se observó que el tiempo de las cinéticas cambió significativamente en función del tamaño de partícula (Figura 7.1).

En la Tabla 7.2, se presentan las tasas máximas de consumo de  $O_2$  y el tiempo en el que éstas se alcanzan. Estos datos fueron calculados ajustando un polinomio de tercer grado sobre las curvas del  $O_2$  consumido (Figura 7.1), para cada uno de los tamaños de partícula, obteniendo una ecuación de la cual, al obtener la segunda derivada e igualando a cero se obtuvo el tiempo, así como la tasa máxima de consumo de  $O_2$ .

**Tabla 7.2.** Tasas máximas de consumo de  $O_2$  en función al tamaño de partícula de la agrolita

Tamaño de partícula (mm)	Tasa máxima de consumo (mg de $O_2$ /g*d)	Tiempo de la tasa máxima (días)
1.19 – 1.68	16.6 ± 0.7 A	6.8 ± 0.5 A
2.3 – 3.36	15.1 ± 0.2 B	9.0 ± 0.9 B
mayor a 3.36	14.3 ± 0.6 B	8.3 ± 0.4 B

Los resultados son las medias con sus desviaciones estándar para N=3

Letras iguales no hay diferencia significativa. El análisis se realizó entre tamaños de partícula ( $\alpha=0.5$ )

Como se puede observar, el tamaño de partícula más pequeño generó la tasa máxima de consumo de  $O_2$  en el menor tiempo, siendo significativamente mayor que la respuesta para los otros dos tamaños de partícula. A partir de estos resultados, se

consideró que el tamaño de partícula más adecuado los experimentos posteriores fuera el tamaño de partícula de 1.19 a 1.68 mm.

Estos experimentos demostraron el efecto del tamaño de partícula del soporte en el crecimiento y degradación de HXD por *A. niger*, demostrando que el soporte de menor tamaño de partícula, presento la mayor producción de biomasa, así como la tasa máxima de consumo de O<sub>2</sub> en el menor tiempo, durante la degradación de HXD; lo que nos hace suponer que es en este tamaño de partícula, donde la degradación de HXD es más rápida, en contraste a los otros dos experimentos en donde se utilizaron los tamaños de partícula mayores, además que fue donde se presentaron las menores dispersiones de los datos tanto en la producción de biomasa como en la degradación de HXD, lográndose un sistema con mayor homogeneidad con el tamaño de partícula menor.

A partir de estos resultados se decidió que el tamaño de partícula del soporte, utilizado para los experimentos posteriores fuera el de menor tamaño, así como que la duración de los cultivos fueran de 12 días, considerando que en éste tamaño de partícula seleccionado, a partir del día 12 de cultivo hasta el día 19 el consumo de O<sub>2</sub> no fue significativamente diferente.

## **7.2. Estudio de rendimientos y balance de carbono en el tamaño de partícula seleccionado**

En los siguientes experimentos, se determinaron parámetros cinéticos y rendimientos a partir de una cinética de respiración, utilizando el tamaño de partícula previamente seleccionado. El objetivo de esta parte del estudio fue determinar la distribución del carbono en biomasa, formación de carbono soluble (TOC) y producción de CO<sub>2</sub>, a partir de la degradación de HXD por *A. niger* al cabo de doce días de cultivo en condiciones controladas, antes de utilizar el dispositivo diseñado para la aplicación de las intensidades de corriente.



### 7.2.1. Acumulación de carbono orgánico soluble

Con la finalidad de determinar la acumulación de compuestos solubles durante la degradación del HXD por *A niger*, se determinó el carbono soluble acumulado (TOC) después de 12 días de cultivo. El carbono soluble acumulado fue de  $9.05 \pm 0.51$  (mg TOC/g de agrolita seca). Este resultado muestra que la cantidad de compuestos orgánicos solubles en agua, provenientes de la degradación incompleta del HXD (ácidos grasos ó cetonas), es despreciable con respecto a la concentración inicial de HXD (180mg/ g soporte). Asimismo, los resultados indican que durante la oxidación del HXD por este hongo hay una mínima formación de compuestos solubles, por lo que es posible afirmar que el HXD fue transformado casi en su totalidad a biomasa y CO<sub>2</sub>.

Para comprobar lo anterior se cuantificó la producción de biomasa y la degradación de HXD a partir del mismo experimento.

### 7.2.2. Consumo de HXD y producción de biomasa

En la Tabla 7.3, se presenta la producción de biomasa acumulada después de 12 días de cultivo, a partir de la degradación de HXD por *A niger*.

Como se puede observar, el 82% de la concentración inicial del HXD se degradó; no obstante, se esperaba un degradación total del HXD, por ser un molécula de fácil asimilación, además de que en estudios previos se demostró la degradación completa de HXD por *A. niger* después de 15 días de cultivo sólido (Volke y col. 2005). En dicho estudio se utilizaron altas concentraciones iniciales de HXD (180–717 mg/g) bajo condiciones similares, pero con espuma de poliuretano como soporte inerte. Por lo anterior, los resultados obtenidos en este experimento sugieren que la degradación incompleta del HXD se debe al tipo de soporte que se utilizó en el presente trabajo

**Tabla 7.3.** Producción de biomasa y degradación de HXD durante 12 días de cultivo por *A. niger*

	mg /g de agrolita seca	mg /g*día
Producción de biomasa	205 ± 17	18.10 ± 1.471
Consumo de HXD	147 ± 1.7 (82%)	12.97 ± 0.16

Como ya se mencionó, la agrolita es un material poroso, por lo que puede suponerse que al contaminarla artificialmente con HXD, éste queda alojado dentro de los microporos de la partícula, dificultando el acceso del microorganismo hacia el sustrato. Este comportamiento provoca que el tiempo de degradación del total de la concentración inicial del HXD, en este tipo de soporte, podría llevarse a cabo en un periodo de tiempo más largo, en contraste con otros soportes que se han utilizado, como es la espuma de poliuretano; esta espuma *está formada por estructuras laminares de poliuretano, facilitando el acceso del hongo hacia el sustrato, obteniendo de esta manera, degradaciones mayores en este tipo de soportes.*

Se conocen estudios donde se reporta una degradación menor al 90% del HXD total por ejemplo, Setti y col. (1993), reportaron una degradación de HXD del 86% con una concentración inicial de 12 g/L por *Pseudomonas sp.* después de 31 días de cultivo; Colombo y col. (1996), demostraron una degradación de compuestos alifáticos del 80% con una concentración inicial de 6.5 mg/g después de 90 días de cultivo. A diferencia de los trabajos anteriores, en el presente trabajo, se demostró una degradación de HXD superior (147 ± 1.7 mg/g), en un periodo de tiempo más corto (12 días) por un hongo filamentoso, en cultivo sólido.

Con estos resultados se demostró que *A. niger* es capaz de degradar altas concentraciones de HXD, en un soporte inerte como la agrolita, bajo las condiciones iniciales en el presente trabajo.

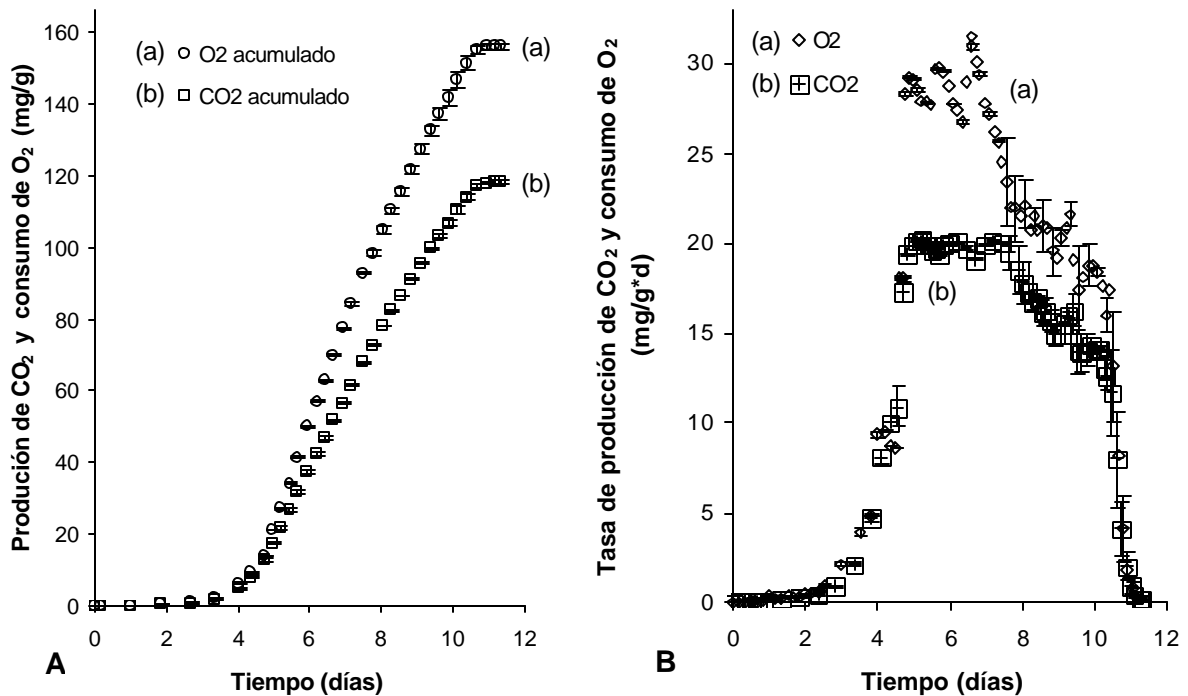
Otra de las variables cuantificables de la degradación del HXD fue la producción de biomasa, en este estudio se obtuvo una producción de biomasa de 205 mg/g de agrolita manteniendo una relación C/N=25. Se ha demostrado que el carbono

proveniente de los sustratos es incorporado principalmente en la biomasa cuando se tienen relaciones C/N menores a 30 (Volke y col., 2005; Graham y col., 1999), esto concuerda con lo obtenido en este trabajo, en donde la producción de biomasa fue superior al CO<sub>2</sub> producido, obteniéndose una relación de 0.69 ± 0.11 mg C-biomasa/mg C-HXD. Volke y col. (2005), reportan una producción de biomasa entre 0.41 y 0.48 mg C-biomasa/mg C-HXD manteniendo una relación constante C/N de 25; sin embargo, al variar estas relaciones C/N (29 – 115) obtuvieron una producción de biomasa en un intervalo de 0.19 – 0.48 mg C-biomasa/mg C-HXD, utilizando diferentes concentraciones de HXD (180 - 717 mg/g soporte) por *A. niger* durante 15 días de cultivo, demostrando que la producción de biomasa esta fuertemente ligada a las condiciones nutricionales en el medio, no así a las concentraciones iniciales de los sustratos.

La cuantificación del O<sub>2</sub> consumido así como la producción de CO<sub>2</sub> es otra de las variables cuantificadas durante la degradación del HXD.

### 7.2.3. Consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>

En la Figura 7.2 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación en línea del consumo de O<sub>2</sub> y la producción de CO<sub>2</sub> durante la degradación del HXD por *A. niger* durante 12 días de cultivo. Al final del cultivo (12 días), se alcanzó una producción máxima de CO<sub>2</sub> de 118 mg/g, mientras que el consumo total de O<sub>2</sub> fue de 156 mg/g, este valor es 1.3 veces mayor al registrado para el CO<sub>2</sub> total producido, indicando una baja mineralización del HXD. Durante los primeros cuatro días de cultivo tanto la producción de CO<sub>2</sub> como el consumo de O<sub>2</sub> se mantuvieron en niveles bajos, aunque por arriba del control (sin HXD). A partir del quinto día, el consumo de oxígeno se incrementó, correspondiendo al aumento en la producción de CO<sub>2</sub>.



**Figura 7.2.** Producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub> durante la degradación de HXD (180 mg/g de soporte) durante 12 días de cultivo por *A. niger*. **A)** Consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>, acumulado **B)** Tasa de producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub>

Otro resultado que se puede observar es el periodo de duración de la fase lag durante la producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub> acumulados, la cual está directamente relacionada con el tiempo de germinación de las esporas, representando aproximadamente un 37% del total del periodo de cultivo. La duración de la fase lag depende del tipo de microorganismo, las condiciones de cultivo ó del sustrato; por ejemplo: utilizando glucosa como única fuente de carbono, el tiempo aproximado de la fase lag puede ser entre 10 – 20 horas dependiendo de la concentración inicial de carbohidratos (Volke y col., 2005), para mezclas de hidrocarburos alifáticos puede llegar a ser hasta de 7 – 9 días, utilizando cultivos mixtos definidos a partir de una concentración inicial de 10,000 mg de hidrocarburos alifáticos/L (Díaz-Ramírez, 2004). En la Figura 7.2B, se presentan las tasas de consumo de oxígeno y producción de CO<sub>2</sub>, los valores calculados a partir de los datos de producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub>. La tasa máxima de consumo de O<sub>2</sub>

fue de 31.5 mg de O<sub>2</sub>/g\*d, mientras que la tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> fue de 20.2 mg de CO<sub>2</sub>/g\*d, registrándose entre el quinto y sexto día de cultivo; cabe mencionar que en el presente trabajo no se realizaron cinéticas de degradación de HXD ni de crecimiento; sin embargo es posible suponer que durante este período del cultivo y también se llevó a cabo la mayor degradación de HXD. Después de este periodo tanto la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> como la de consumo de O<sub>2</sub> decayeron hasta el final del cultivo.

A partir de estos resultados, se obtuvo un coeficiente  $Y_{C-CO_2/C_s}$  de  $0.25 \pm 0.002$  (mg C-CO<sub>2</sub>/mg C-HXD), lo que indica que el 25% del carbono del HXD consumido fue bio-transformado a CO<sub>2</sub>, después de 12 días de cultivo. Estos resultados son muy similares a lo reportado por Graham y col., (1999), quienes reportan coeficientes  $Y_{C-CO_2/C_s}$  entre 0.11 – 0.53 mg C-CO<sub>2</sub>/mg C-HXD con diferentes relaciones C/N (entre 9 y 58). Schoefs y col., (2004), encontraron coeficientes  $Y_{C-CO_2/C_s}$  de 0.29 mg C-CO<sub>2</sub>/mg C-HXD en un microcosmos de lodos, con bajas relaciones de C/N y HXD (~2 mg /g de suelo) como única fuente de carbono. Recientemente, Volke y col (2005), reportaron  $Y_{C-CO_2/C_s}$  de 0.40 – 0.48 mg C-CO<sub>2</sub>/mg C-HXD, utilizando diferentes concentraciones de HXD.

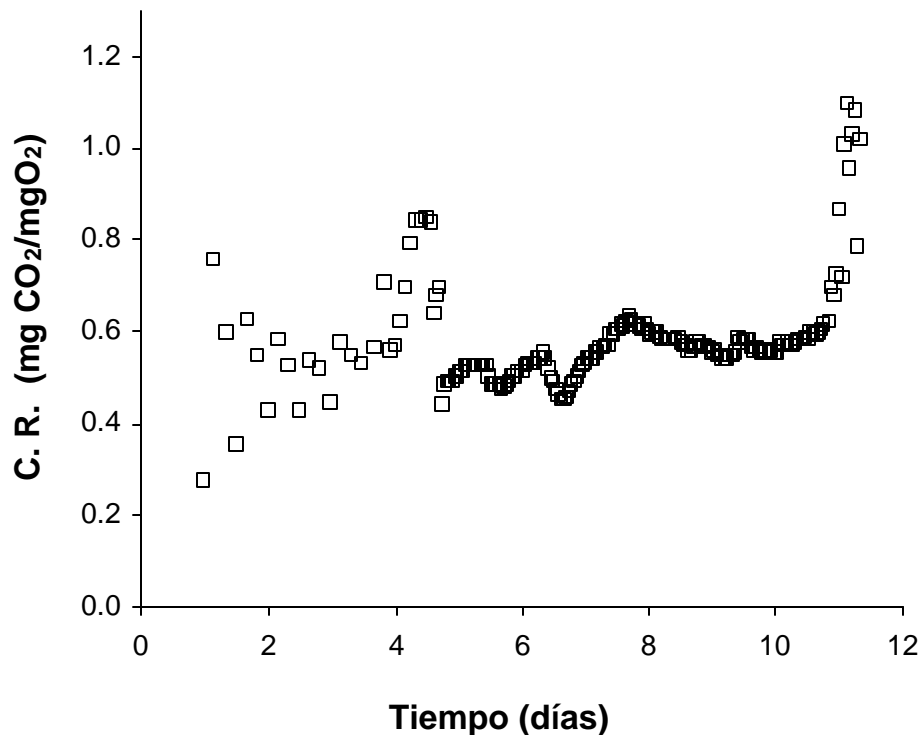
A partir de los datos obtenidos hasta el momento, fue posible conocer la distribución del carbono en cada uno de los productos del metabolismo del HXD, por *A. niger* (TOC, producción de biomasa y producción de CO<sub>2</sub>).

#### 7.2.4. Coeficiente respiratorio y balance de carbono

El coeficiente respiratorio proporciona información relacionada al metabolismo endógeno o respiratorio durante la degradación de HXD, aunque esto también depende de los niveles de oxidación del sustrato y de las condiciones de cultivo (Volke, y col. 2003). En la Figura 7.3 se presenta el coeficiente respiratorio de *A. niger* durante el cultivo, estos resultados fueron obtenidos a partir de la relación entre el CO<sub>2</sub> producido, y el O<sub>2</sub> consumido durante el cultivo. El coeficiente respiratorio durante los días 4 y 11 de cultivo fueron casi constantes, durante este tiempo el

coeficiente respiratorio corresponde al consumo de HXD como fuente de energía y carbono por *A. niger*. El incremento en el coeficiente respiratorio después de 11 días de cultivo puede estar relacionado a la autólisis de la biomasa causada por el agotamiento de otros nutrientes como el nitrógeno o el fósforo (Volke, y col. 2003).

Los bajos coeficientes respiratorios que se observaron durante el cultivo (0.48 y 0.6) indican que la mayor parte el O<sub>2</sub> consumido es utilizado para la formación de biomasa y/o producción de metabolitos y, en menor cantidad, para la producción de CO<sub>2</sub> como respuesta de la mineralización del HXD y esto se corrobora al calcular el Y<sub>CO<sub>2</sub>X</sub> donde se obtiene un  $0.58 \pm 0.05$ , que indica que hay una mayor producción de biomasa, respecto a la producción de CO<sub>2</sub>.



**Figura 7.3.** Coeficiente respiratorio (C.R) de *A. niger*, durante la degradación de HXD

Después de obtener el coeficiente respiratorio se realizó un balance de carbono. En la Tabla 7.4, se muestra la distribución del carbono consumido por *A. niger* proveniente del HXD, después de 12 días de cultivo a 30°C, expresado en

rendimientos de producción de CO<sub>2</sub> ( $Y_{CO_2/S}$ ), producción de biomasa ( $Y_{X/S}$ ) y producción de TOC ( $Y_{TOC/S}$ ). Se observó que el carbono consumido, fue principalmente incorporado a la biomasa, seguido por la producción de CO<sub>2</sub> y finalmente y en menor proporción a la producción de compuestos solubles.

**Tabla 7.4.** Balance de carbono para la degradación de HXD por *A. niger*, después de 12 días de cultivo; expresado en rendimientos de CO<sub>2</sub> ( $Y_{CO_2/S}$ ), biomasa ( $Y_{X/S}$ ) y TOC ( $Y_{TOC/S}$ )

$Y_{CO_2/S}$ (mg C-CO <sub>2</sub> /mg C-HXD)	$Y_{X/S}$ (mg C-biomasa/mg C-HXD)	$Y_{TOC/S}$ (mg TOC/mg C-HXD)	Carbono recuperado (%)
0.258 ± 0.02	0.690 ± 0.057	0.073 ± 0.004	102 ± 6

Cabe mencionar que para realizar el balance de carbono se utilizó la siguiente composición química de biomasa de *A. niger*: C<sub>0.42</sub>N<sub>0.08</sub>H<sub>0.07</sub>, la cual fue obtenida experimentalmente.

Se logró una degradación de HXD por *A. niger* de 147 mg/g de soporte (82%) durante 12 días de cultivo, de los cuales el 70% del carbono degradado fue incorporado a biomasa, el 25% fue mineralizado y el 7% se encontró carbono orgánico soluble.

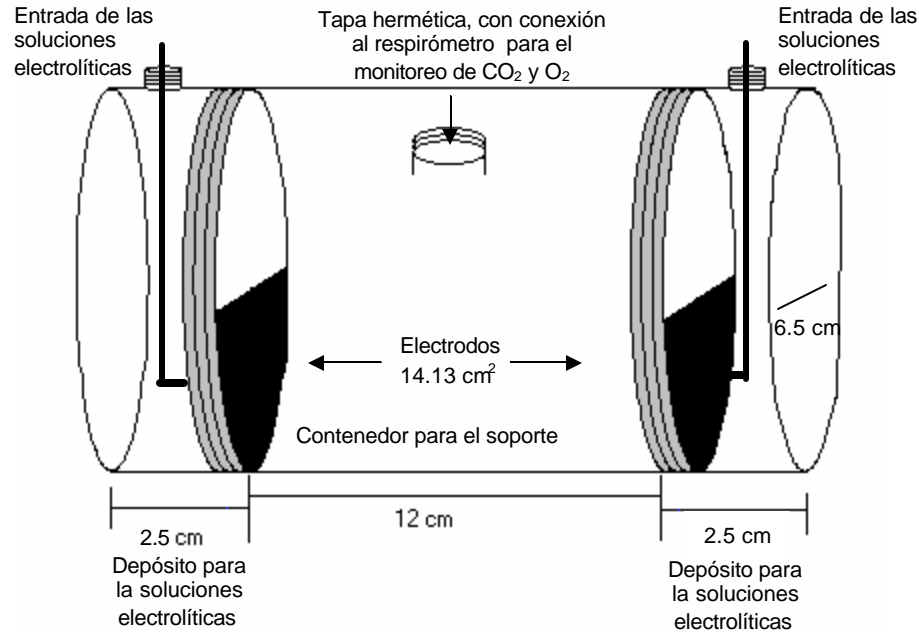
### 7.3 Celda electroquímica

En esta sección se presenta el diseño de la celda electroquímica, la caracterización y la selección de las intensidades de corriente a partir de la celda especialmente diseñada para los posteriores experimentos. Utilizando el tamaño de partícula previamente seleccionado.

#### 7.3.1. Diseño de la celda electroquímica

La celda electroquímica fue construida en acrílico, de forma cilíndrica con las siguientes dimensiones: 12 cm de largo por 6.5 cm de diámetro, con capacidad para aproximadamente 15 g de agrolita, con una superficie para colocar los electrodos de 14.13 cm<sup>2</sup> a los extremos de la unidad experimental. Se construyeron dos compartimentos a los costados para las soluciones electrolíticas y una tapa

hermética con válvulas de salida para la cuantificación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$  en la fase gaseosa. En la Figura 7.4 se muestra el diseño de la celda electroquímica.



**Figura 7.4.** Diseño de la celda electroquímica

En este trabajo se seleccionaron electrodos de titanio recubiertos con óxido de rutenio. En la literatura se utilizan diferentes materiales para ánodo y cátodo, por ejemplo: platino (Araújo y col. 2004), acero inoxidable (Ganeva y col. 2002), carbón y acero inoxidable (Jackman y col. 2001) y grafito con alambre de platino (Park y col. 1999). Sin embargo, los electrodos utilizados en el presente trabajo, han demostrado que son más eficientes durante la oxidación y reducción del agua, además de ser más resistente al paso de corriente e inertes a la corrosión por las especies químicas utilizadas en el medio de cultivo.

En la Figura 7.5, se muestra una imagen de la celda diseñada a partir de las especificaciones antes mencionadas, que se caracterizó para seleccionar las intensidades de corriente para estudios posteriores.



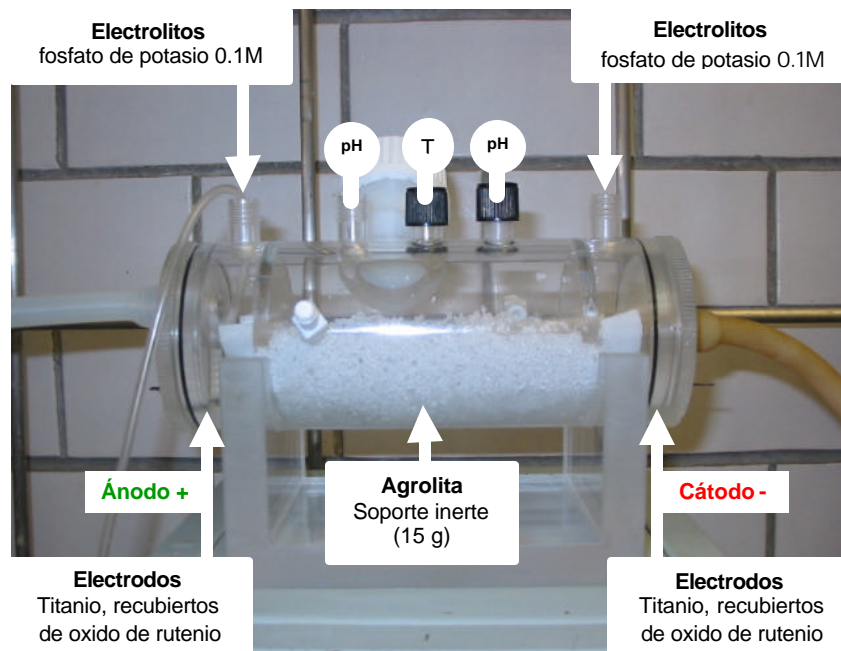
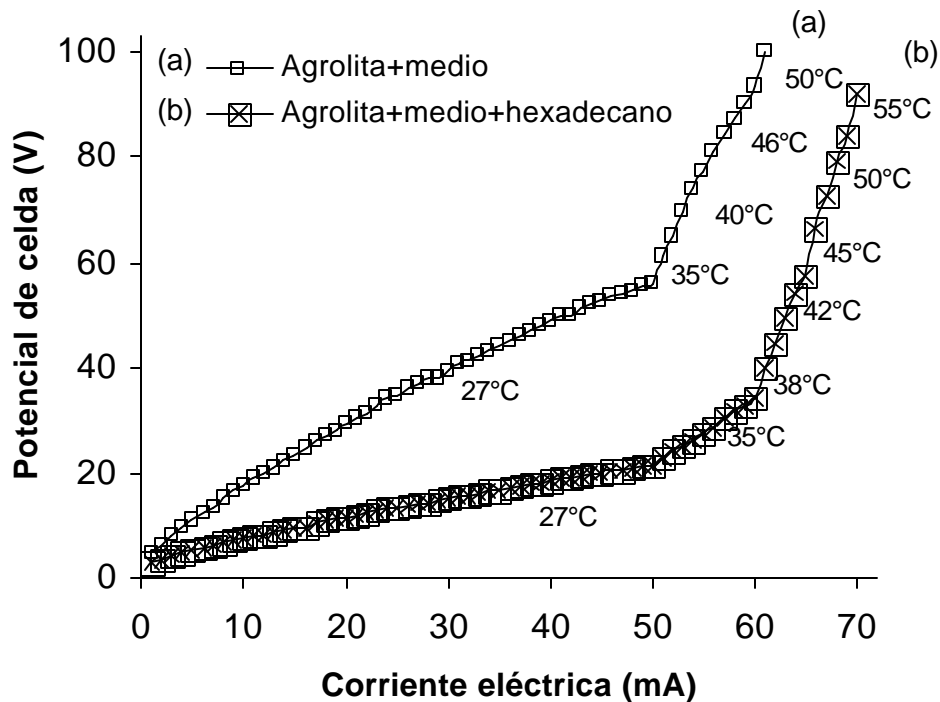


Figura 7.5. Celda electroquímica

### 7.3.2. Caracterización de la celda

La caracterización de la celda fue realizada con el fin de determinar los valores que adquiere el potencial de celda, al imponer diferentes intensidades de corriente eléctrica. Esto se hace por medio de los electrodos a través de la agrolita -con y sin HXD- más el medio de cultivo. En este experimento, se obtuvo una gráfica (Figura 7.6) de corriente eléctrica (mA) contra potencial de celda (V). La Figura 7.6a, corresponde a la caracterización de la celda con la agrolita y el medio de cultivo; y la otra (Figura 7.6b), corresponde a la agrolita más medio de cultivo con HXD. Las Figuras 7.6 a y b muestran un incremento en el potencial de celda conforme aumenta la corriente eléctrica, en ambos casos. En el caso de la agrolita con medio de cultivo se observó un incremento de temperatura y un cambio de pendiente a partir 50 mA; conforme fue aumentando la corriente eléctrica la temperatura también fue en aumento hasta llegar a 50°C; al aplicar una corriente de 60 mA, lo que corresponde a un potencial de celda de 100 V.



**Figura 7.6.** Caracterización de la celda electroquímica. Se impone una corriente determinada a la celda y se mide el potencial que resulta de la celda. La celda contiene a) agrolita más medio de cultivo, b) agrolita más medio de cultivo más HXD.

Respecto a la agrolita con HXD y medio de cultivo, de igual manera, se observó un incremento y un cambio de temperatura a partir de 50 mA; sin embargo, el aumento de la temperatura y el cambio de pendiente en este caso no fue tan drástico como lo fue con la agrolita sin HXD, en este caso se alcanzó una temperatura de 55°C al aplicar un corriente de 70 mA, generando un potencial de celda de 92 V.

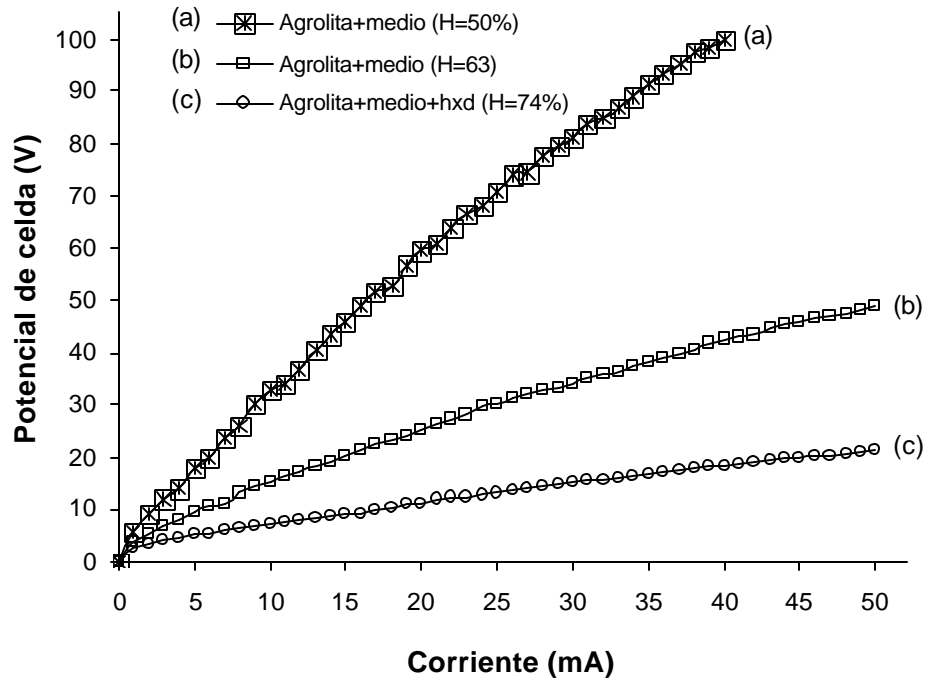
Estos resultados sugieren que el soporte con HXD presenta una menor resistencia al paso de la corriente en contraste con el soporte sin HXD.

Como consecuencia de la caracterización de la celda se observó que al aumentar la corriente eléctrica y con el aumento de la temperatura en el interior del sistema, se propició la evaporación del agua del medio de cultivo, debido a la hermeticidad de la celda, el agua evaporada se condensó en la parte superior de la celda para después volverse a integrar al medio, lo cual contribuyó a un aumento de la resistencia, al haber una cantidad menor de agua en el medio. Este fenómeno de evaporación-

condensación explica por qué se observa en las curvas de caracterización un aumento en la resistencia al paso de corriente.

También se observó (Figura 7.6b) que la agrolita contaminada con HXD presenta una menor resistencia, en contraste con la agrolita sin HXD. Estas diferencias sugieren que, al momento de contaminar la agrolita con HXD, cierta cantidad de éste queda depositado dentro de los microporos, mientras que otra parte queda depositada en la superficie del soporte, quedando una mayor cantidad de agua disponible al ser humedecido con el medio de cultivo, lo que ayuda a que disminuya la resistencia al paso de la corriente; mientras que el soporte sin HXD, presenta una mayor resistencia, ya que al humedecer el soporte con el medio queda una menor cantidad de agua disponible.

Cuando se aplica la corriente eléctrica, se llevan a cabo reacciones de oxidación y reducción del agua libre presente en el medio de cultivo a través de los electrodos, de acuerdo a las reacciones es decir, se forman aniones ( $\text{OH}^-$ ) y cationes ( $\text{HO}_3^+$ ) que son atraídos a través del campo eléctrico. Los aniones migran hacia el ánodo, mientras que los cationes migran hacia el cátodo, a través del flujo electrocinético (Alshawabkeh, y col., 1999). Esta migración depende de la cantidad de agua disponible en la agrolita: entre menor cantidad de agua disponible haya en el medio, mayor será la resistencia al paso de la corriente (lo que se ve reflejado en un aumento en el potencial de celda). Esto pudo comprobarse en experimentos con diferentes intensidades de corriente con diferentes contenidos de humedad, como se muestra en la Figura 7.7.



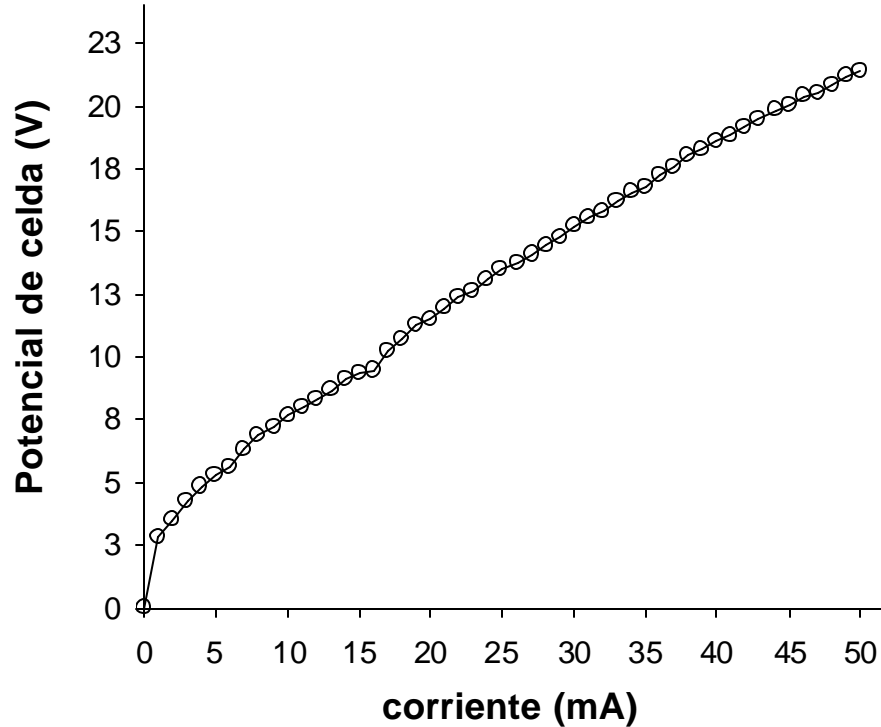
**Figura 7.7.** Efecto de la humedad en el soporte al paso de la corriente. Donde H es el contenido de humedad en la agrolita (ajustado con el medio de cultivo).

A partir de la caracterización de la celda se confirmó la importancia del contenido de humedad en los soportes, sobre los potenciales de celda, que se establecen al aplicar una intensidad de corriente. A partir de estos resultados se seleccionaron las intensidades de corriente para posteriores experimentos, en donde se aplicaran las intensidades de corriente seleccionadas.

### 7.3.3. Selección de las intensidades de corriente

La selección de las intensidades de corriente, se realizó considerando los intervalos de potencial de celda (V), el aumento de temperatura y con base en intensidades de corriente utilizadas en trabajos similares al presente estudio.

La selección de las intensidades de corriente para los tratamientos posteriores, en donde la humedad de la agrolita se ajustó entre 72 – 75 %, se hizo a partir de la Figura 7.8 donde se presentan los datos de potencial de celda vs intensidad de corriente, en donde fue seleccionada una corriente entre 0 y 50 mA, lo que equivale a un potencial entre 3 y 22 V.



**Figura 7.8.** Intervalo de corriente seleccionada para los experimentos en donde se aplicaran las intensidades de corriente

Al aplicar una corriente mayor a 50 mA, se observó un incremento gradual en la temperatura por arriba de 30°C, hasta llegar a 55°C (Figura 7.6). Este aumento de temperatura puede afectar el metabolismo de *A. niger*, disminuyendo su actividad metabólica, puesto que la temperatura óptima de este microorganismo es de 30°C. Por esta razón se consideró que el intervalo de corriente aplicada a los tratamientos fuera de 0 a 50 mA lo equivalente de 3 a 22 V.

Dentro del intervalo de corriente seleccionado, se eligieron dos intensidades de corriente para los tratamientos, en donde se evalúa el efecto de la corriente sobre la degradación de HXD por *A. niger*. Las dos intensidades de corriente que fueron seleccionadas para los tratamientos fueron de 6mA y 19mA, que de acuerdo al área de los electrodos corresponden a 0.42 y 1.34 mA/cm<sup>2</sup> respectivamente, estas intensidades de corriente se encuentran dentro de un intervalo de potencial de celda

entre 3 y 25V respectivamente, estas corriente fueron seleccionadas de acuerdo a la información presentada en la literatura y a antecedentes previos (UAM, 2003).

Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta sección fueron: el diseño y construcción de la celda electroquímica, la cual fue construida de acrílico, a partir de las especificaciones requeridas para los posteriores experimentos. La caracterización de la celda se realizó utilizando la agrolita contaminada con HXD, de tamaño 1.19 - 1.68 mm previamente seleccionada, ajustando la humedad de la agrolita con el medio de cultivo entre 72 y 75 %.

Esta caracterización se realizó imponiendo diferentes intensidades de corriente eléctrica, obteniendo una gráfica de corriente eléctrica vs potencial de celda, con esta gráfica, se demostró que al aumentar la corriente eléctrica por arriba de 50 mA, la temperatura se incrementa por encima de 30°C, lo cual puede ser perjudicial para el crecimiento y metabolismo del hongo, por lo que, el intervalo de corriente seleccionado fue entre 0 y 50 mA. A partir de este intervalo de corriente, se seleccionaron las dos intensidades de corriente (6 y 19 mA) que se aplicaran en los experimentos posteriores, en donde se evaluara el efecto de la corriente eléctrica sobre la degradación de HXD por *A. niger*.

Sin embargo, antes de aplicar las intensidades de corriente a la celda electroquímica, fue necesario evaluar el buen funcionamiento de la celda electroquímica, con el tamaño de partícula de soporte, previamente seleccionada. Esto se realizó a través de un experimento de respirometría.

#### **7.4. Evaluación del funcionamiento de la celda electroquímica**

En esta sección se presentan los resultados de un experimento de respirometría, utilizando la celda electroquímica, con el objetivo de evaluar el buen funcionamiento de la misma. Para analizar las variables de respuesta, la celda fue dividida en tres secciones longitudinales (~ 4 cm por sección). La división de la celda se realizó debido a la formación de gradientes de pH provocados por la aplicación de la corriente. Por tal motivo, antes de aplicar la corriente en la celda, se evaluó el

funcionamiento de la celda así como la homogeneidad en las variables de respuesta a lo largo de la celda. A las tres secciones de la celda se les denominó; sección ánodo, sección media y la sección cátodo.

Las variables que se evaluaron después de doce días de cultivo, en la celda electroquímica sin corriente eléctrica fueron, pH, la producción de biomasa, la producción de CO<sub>2</sub>, la degradación de HXD y acumulación de compuestos orgánicos solubles.

#### 7.4.1. Perfil de pH y producción de biomasa

En la Tabla 7.5, se muestra el perfil de pH y la producción de biomasa, que se obtuvo al final del cultivo en la celda electroquímica. Los valores de pH en las diferentes secciones de la celda, no mostraron diferencias significativas, mostrando un pH promedio entre las tres secciones de la celda de  $5.90 \pm 0.18$ .

**Tabla 7.5.** Valores de pH y producción de biomasa, después de 12 días de cultivo en la celda electroquímica sin corriente eléctrica. Los resultados son las medias con sus desviaciones estándar para N=3.

pH* y biomasa			
	Ánodo	Media	Cátodo
pH	$5.95 \pm 0.29$	$6.08 \pm 0.31$	$5.67 \pm 0.27$
Biomasa (mg/g agrolita seca)	$198.48 \pm 14$	$201.91 \pm 4$	$198.17 \pm 9$

\* pH inicial = 5

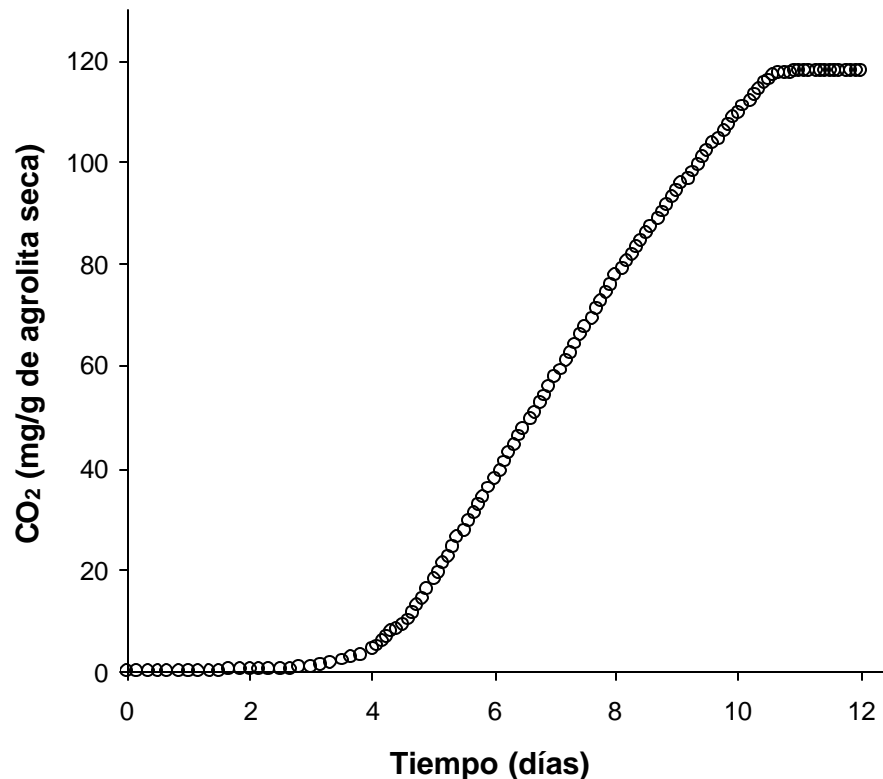
Por otro lado, la producción de biomasa a partir de la degradación de HXD, fue muy similar en las tres secciones de la celda, no mostrando diferencias significativas entre éstas. Obteniendo una producción de biomasa promedio en las tres secciones de la celda de  $199.52 \pm 1.77$  (mg/g de agrolita seca).

Estos resultados mostraron como el crecimiento de *A. niger* fue homogéneo en todo lo largo de la celda electroquímica así como la distribución de pH, por lo tanto se puede afirmar que el diseño de la celda electroquímica es un sistema adecuado, permitiendo evaluar el crecimiento, para los posteriores experimentos, en donde se

evaluó el efecto de la corriente eléctrica sobre *A. niger* durante la degradación de HXD.

#### 7.4.2. Producción de CO<sub>2</sub>

En la Figura 7.9, se muestran los resultados de la producción de CO<sub>2</sub> acumulado en línea, durante doce días de cultivo en la celda electroquímica, con una producción de CO<sub>2</sub> de 117.92 mg/g, al final del cultivo. Estos resultados mostraron ser muy similares a los obtenidos, durante el estudio de rendimientos y balance de carbono (sección 7.2.3), en donde se obtuvo una producción de CO<sub>2</sub> acumulado de 118.13 mg/g al final del cultivo, con el mismo tamaño de partícula, bajo las mismas condiciones nutricionales y durante el mismo periodo, solo que en diferentes sistemas.



**Figura 7.9.** Cuantificación de CO<sub>2</sub> en línea durante los doce días de cultivo en la celda electrocinética.



Con estos resultados se demostró que la celda electroquímica permitió cuantificar la producción de CO<sub>2</sub> y/o el consumo de O<sub>2</sub> fue el apropiado, mostrando una buena hermeticidad de la celda electroquímica, puesto que se obtuvieron resultados muy similares a los experimentos anteriores, donde se utilizó un sistema hermético diferente.

#### 7.4.3. Degradación de HXD y acumulación de compuestos orgánicos solubles

Los resultados de degradación de HXD y acumulación de compuestos orgánicos solubles, se muestran en la Tabla 7.6, donde se observa una degradación promedio en las tres secciones de la celda electroquímica del  $76 \pm 1.6$  (%) y una acumulación de compuestos orgánicos solubles promedio de  $3 \pm 0.4$  (mg/g de agrolita seca). En ambos casos, los resultados no mostraron diferencias significativas en las tres secciones de la celda electroquímica.

**Tabla 7.6.** Degradación de HXD y acumulación de compuestos orgánicos solubles, después de 12 días de cultivo en la celda electroquímica sin corriente eléctrica. Los resultados son las medias con sus desviaciones estándar para N=3.

<b>Degradación de HXD y acumulación de compuestos orgánicos solubles (TOC)</b>			
	Ánodo	Media	Cátodo
Degradación de HXD (mg/g de agrolita seca)	136.14 ± 2.85 (76 ± 1.58 %)	135.67 ± 3.68 (75 ± 2.05 %)	137.27 ± 4.11 (76 ± 2.29 %)
TOC (mg/g agrolita seca)	3.10	3.05	3.03

Al igual que las anteriores variables de respuesta, la degradación de HXD y la acumulación de compuestos orgánicos solubles fueron homogéneas a lo largo de la celda.

A partir de las variables anteriores se realizó el balance de carbono, para conocer la distribución del carbono en cada una de las secciones de la celda electroquímica.

#### 7.4.4. Balance de Carbono

En la Tabla 7.7, se muestra la distribución del carbono en cada una de las secciones, cabe mencionar que el CO<sub>2</sub> cuantificado es el total producido en toda la celda expresado en mg/g, obteniendo una recuperación de carbono promedio de 103 ± 1.17, en las tres secciones de la celda.

Estos resultados mostraron una distribución homogénea del carbono degradado a lo largo de la celda. Del total de carbono degradado se observó que el 3 % se recuperó como compuestos orgánicos solubles, el 28 % fue mineralizado y un 72% fue recuperado en biomasa.

**Tabla 7.7.** Balance de carbono de la degradación de HXD por *A. niger*, durante 12 días de cultivo; expresado en rendimientos de CO<sub>2</sub> ( $Y_{CO_2/s}$ ), biomasa ( $Y_{x/s}$ ) y compuestos orgánicos solubles ( $Y_{TOC/s}$ ), en las tres secciones de la celda.

Región celda	$Y_{CO_2/s}$ (mg C-CO <sub>2</sub> /mg C-HXD)	$Y_{x/s}$ (mg C-biomasa/mg C-HXD)	$Y_{TOC/s}$ (mg TOC/mg C-HXD)	Carbono recuperado (%)
Ánodo	0.28 ± 0.01	0.72 ± 0.04	0.03 ± 0.001	103 ± 3
Media	0.28 ± 0.01	0.74 ± 0.03	0.03 ± 0.01	104 ± 4
Cátodo	0.28 ± 0.02	0.71 ± 0.01	0.03 ± 0.001	101 ± 5

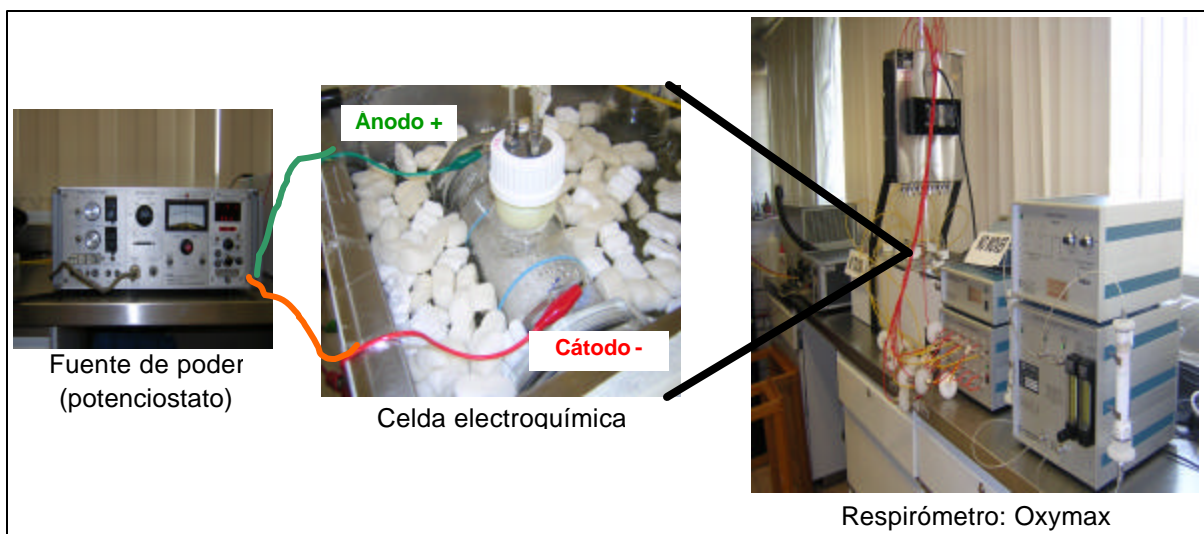
Los resultados obtenidos en la celda electroquímica fueron muy similares a los obtenidos en la sección 7.2.2, donde se evaluó el rendimiento y balance de carbono con el tamaño de partícula, utilizando un sistema diferente (botellas Wheaton de 500 mL). Por lo tanto se puede asegurar el buen funcionamiento de la celda así como la homogeneidad de la misma, respecto a la distribución del pH, la producción de biomasa, la producción de CO<sub>2</sub>, la degradación de HXD, la formación de compuestos orgánicos solubles y la distribución de carbono. Mismas variables que fueron analizadas al aplicar una corriente eléctrica para evaluar el efecto de la corriente sobre la degradación de HXD por *A. niger* en los posteriores experimentos.

A partir de estos resultados se puede asegurar que el comportamiento de *A. niger* al aplicar una corriente eléctrica, a través de la celda electroquímica, será únicamente al efecto que esta corriente provoque y no a un mal funcionamiento de la celda electroquímica diseñada especialmente para estos experimentos.

### 7.5. Aplicación de las intensidades de corrientes

En esta sección se presentan, los resultados relativos a los cambios en el crecimiento y degradación de HXD, por *A. niger* durante doce días de cultivo, al aplicar las diferentes intensidades de corriente eléctrica.

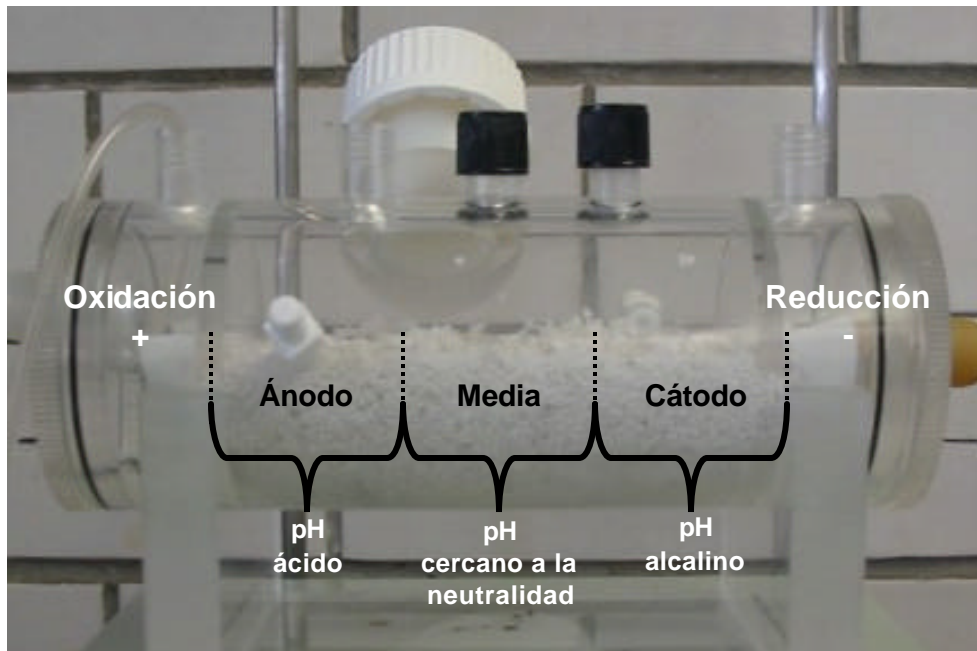
Los tratamientos en donde se evaluó el efecto de la corriente en *A. niger*, se realizaron de la siguiente manera: la agrolita contaminada artificialmente con HXD, junto con el medio y el inóculo fueron depositados dentro de la celda electroquímica (bajo condiciones asépticas), ésta fue colocada dentro de un baño a temperatura controlada (30°C). A través de los electrodos colocados dentro de la celda electroquímica se impusieron las diferentes intensidades de corriente previamente seleccionadas. Finalmente la celda electroquímica fue conectada a un respirómetro. En la Figura 7.10, se muestran la estrategia experimental y equipos utilizados durante la aplicación de las intensidades de corriente.



**Figura 7.10.** Estrategia experimental y equipos utilizados durante la aplicación de las intensidades de corriente

La celda fue dividida en tres secciones. La división de la celda se realizó considerando que al momento de aplicar una intensidad de corriente hay formación de aniones y cationes debido a la oxidación y reducción del agua, formando un gradiente de pH a lo largo de la celda, que producirá efectos que son necesarios evaluar. En la sección ánodo se lleva a cabo la oxidación del agua, generándose un pH ácido, sección media; en donde podrían ser neutralizados los aniones con los cationes, generándose un pH cercano a la neutralidad, y sección cátodo: donde se lleva a cabo la reducción del agua, generándose un pH alcalino. Cada sección fue de aproximadamente 4 cm con ~5 g.

En la Figura 7.11, se muestra la división de la celda electroquímica, así como el pH que es generado al aplicar la corriente eléctrica, en cada una de las secciones.



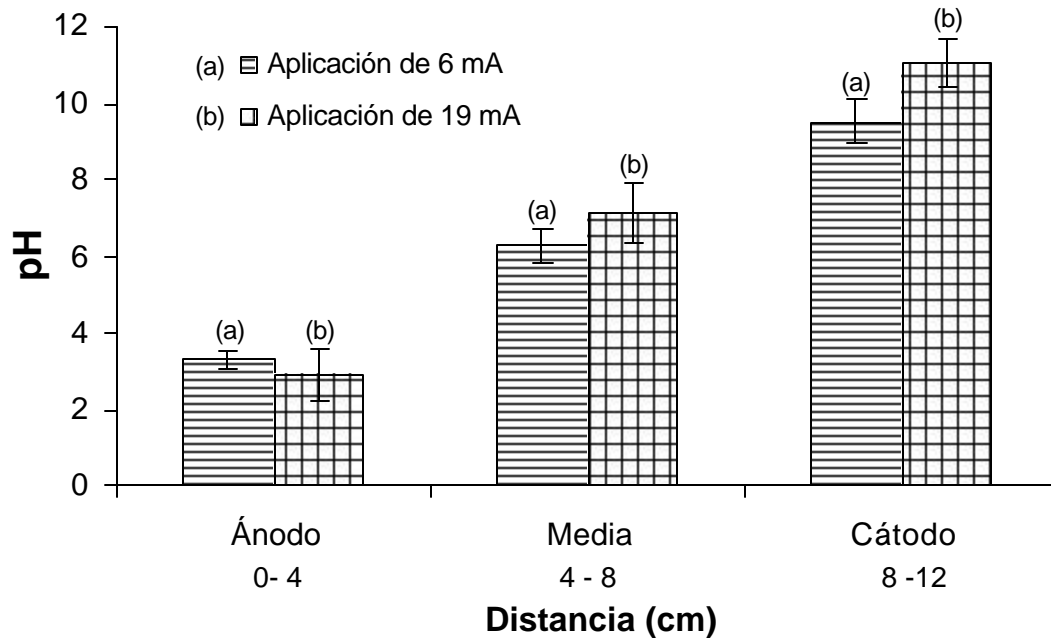
**Figura 7.11.** División de la celda electroquímica y niveles de pH generados durante la aplicación de una corriente eléctrica

### 7.5.1 Aplicación de corriente continua durante 12 días

En esta sección se muestran los resultados obtenidos al aplicar dos intensidades de; 6 y 19 mA (de manera independiente), durante los doce días de cultivo.

### 7.5.1.1. Perfil del pH

En la Figura 7.12, se muestra el gradiente de pH que se obtuvo al final de los doce días de cultivo. Como se observa en ambas celdas electroquímicas (6 y 19 mA) se obtuvo la misma tendencia de pH en las tres secciones de la celda (ánodo, media y cátodo).



**Figura 7.12.** Gradiente de pH a lo largo de la celda electroquímica. a) Al aplicar 19 mA de corriente eléctrica y b) Al aplicar 6 mA de corriente eléctrica. En ambos casos, la aplicación de la corriente se mantuvo de manera continua durante los doce días de cultivo.

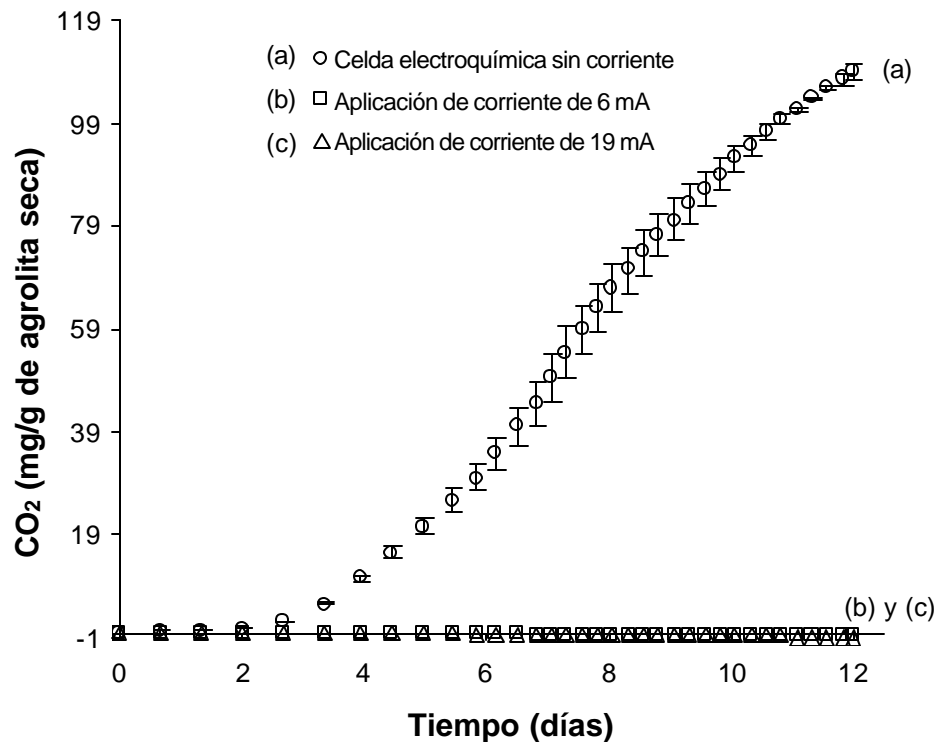
En la sección anódica de las dos celdas, al final de los doce días de aplicación de corriente continua de 6 y 19 mA, se obtuvo un pH más ácido (3.29 y 2.94 respectivamente), respecto al pH inicial (5). Mientras que, en la parte media de las celdas se alcanzó un pH cercano al neutro (6.58 y 7.23) en ambas intensidades de corrientes y sin diferencias significativas entre ambas. En la región catódica (Figura 7.12a) se generó un pH alcalino (9.5), al aplicar una intensidad de corriente de 6 mA, mientras que para 19 mA (Figura 7.12b) se obtuvo un pH de 11, en este caso si se logró observar una diferencia significativa de pH entre ambas intensidades de corriente.

Estos valores de pH generados en la sección anódica y catódica al final del cultivo no fueron favorables para el crecimiento y desarrollo de *A. niger*, puesto que el pH óptimo de este microorganismo es entre 4 y 6, a valores de pH mayores de 9 y menores a 3, la actividad metabólica de *A. niger* puede llegar a ser nula. Estos cambios de pH se deben principalmente a la formación de iones hidronio e hidroxilo, los cuales forman respectivamente, un pH ácido y un pH alcalino (Acar y Alshawabkeh, 1993); sin embargo, cuando ambos grupos de iones se encuentran se neutralizan.

Aunque existen otros trabajos relacionados al presente estudio experimental (Hyo-Sang y Lee, 2001; Jackman y col., 2001), en la mayoría de ellos se induce un contacto físico entre las soluciones electrolíticas y el soporte, lo que facilita la recirculación de soluciones buffer a través del soporte para mantener el intervalo de pH deseado, sin embargo en el presente trabajo no fue posible mantener un contacto físico entre la agrolita y la solución electrolítica, puesto que en un inicio de los experimentos se utilizó un electrodo de malla de platino, el cual al momento de colocar las soluciones electrolíticas y debido a que el soporte es de naturaleza porosa, toda la celda quedo completamente inundada por las soluciones electrolíticas. Recordando que la celda electroquímica, fue diseñada con los compartimentos para las soluciones electrolíticas en los extremos de la celda, dejando un espacio para los electrodos entre las soluciones y el compartimiento para el soporte. Debido a lo anterior, los electrodos de malla de platino fueron reemplazados por unos de placa del mismo material, para evitar la inundación del soporte, lo cual provocaría un efecto negativo en el crecimiento de *A. niger* y en el paso de corriente. Por lo tanto al no haber un contacto físico entre el soporte y las soluciones electrolíticas se dificultó mantener el pH, al no permitir el flujo de una solución buffer a través del soporte, tratando de mantener el pH en el intervalo deseado.

### 7.5.1.2. Producción de CO<sub>2</sub>

En la Figura 7.13, se muestra la producción de CO<sub>2</sub> acumulada en toda la celda, al aplicar las intensidades de corriente, de manera continua durante doce días de cultivo. Estos resultados mostraron que al aplicar una intensidad de corriente al inicio del cultivo de 6 y 19 mA, la producción de CO<sub>2</sub> es nula, en contraste a la celda electroquímica sin corriente en donde se observa una producción de CO<sub>2</sub> de 109 ± 1.5 mg/g de agrolita seca (Figura 7.13a), resultado muy similar al que se obtuvo durante la evaluación del buen funcionamiento de la celda electroquímica (117.92 mg/g).



**Figura 7.13.** Cuantificación de CO<sub>2</sub> en línea durante la degradación de HXD por doce días de cultivo; a) producción de CO<sub>2</sub> en la celda electroquímica sin corriente, b) producción de CO<sub>2</sub> al aplicar 6 mA y c) producción de CO<sub>2</sub> al aplicar 19 mA. En ambos casos, la aplicación de la corriente se mantuvo de manera continua durante los doce días de cultivo.

Este resultado podría explicarse por los cambios drásticos que se observaron de pH en la región anódica y catódica (Figura 7.12), donde el crecimiento de *A. niger* en estas condiciones podría ser desfavorable, por lo tanto al observar estos resultados

se realizó un conteo en placa (UFC), de cada sección de la celda con el fin de determinar la viabilidad de las esporas, después de aplicar las intensidades de corriente durante doce días.

### 7.5.1.3. Conteo en placa (UFC)

En la Tabla 7.8, se muestran los resultados obtenidos del conteo en placa, después de aplicar las intensidades de corriente durante todo el cultivo, así como dos experimentos más, que se montaron en paralelo, ambos sin corriente eléctrica; uno con HXD más inóculo y el otro sin HXD más inóculo.

**Tabla 7.8.** Conteo en placa de *A. niger*, después de aplicar las intensidades de corriente durante doce días, además de las celdas sin corriente.

		UFC/g agrolita seca		
		Ánodo	media	cátodo
<b>Con corriente</b>	6 mA	Np	Np	Np
	19 mA	Np	Np	Np
<b>Sin corriente</b>	con HXD	$2.2 \times 10^{+09} \pm 2.6 \times 10^{+08}$	$2.5 \times 10^{+09} \pm 9.9 \times 10^{+08}$	$1.9 \times 10^{+09} \pm 5.3 \times 10^{+08}$
	sin HXD	$1.4 \times 10^{+07} \pm 3.2 \times 10^{+06}$	$1.1 \times 10^{+07} \pm 8.4 \times 10^{+06}$	$1.7 \times 10^{+07} \pm 1.9 \times 10^{+06}$

Np = No presencia de UFC

Al cuantificar las UFC en las tres secciones de las celdas electroquímicas, se observó un resultado muy similar al de la producción de CO<sub>2</sub>, en donde la celda electroquímica sin corriente, -con y sin HXD- fueron las únicas celdas donde se observó viabilidad de las esporas, obteniendo una cuenta de UFC para la celda electroquímica; sin corriente y sin HXD, muy similar a la concentración de esporas inoculadas ( $2.0 \times 10^{+07}$ ), mientras que en la celda electroquímica sin corriente y con HXD se encontró dos órdenes de magnitud arriba del número inicial de esporas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede sugerir que los cambios tan drásticos de pH que se detectaron, al aplicar las intensidades de corriente al inicio del cultivo, lograron afectar desfavorablemente el crecimiento de *A. niger*. Sin



embargo, en la sección media de la celda electroquímica, se observó un pH cercano al neutro, al aplicar un corriente de 6 mA y 19 mA (6.58 y 7.23, respectivamente), y de igual manera se presentó una viabilidad nula en las esporas. Por otro lado, al aplicar 6 mA, el voltaje de la celda se mantuvo constante (7 V) durante todo el tiempo del cultivo; mientras que al aplicar 19 mA (correspondiente a 20 V), el voltaje fue aumentando después del sexto día de cultivo, hasta llegar a un voltaje de 34 V; esta variación del voltaje probablemente fue a causa del fenómeno de evaporación-condensación que se presentó en la celda electroquímica durante el cultivo. A pesar de estas diferencias en el comportamiento del voltaje de la celda, cuando se impusieron ambas intensidades de corriente, la respuesta de *A. niger* fue la misma.

Estos resultados sugieren que el efecto que se observó en las esporas, no fue debido al pH, sino al prolongado tiempo de exposición de corriente eléctrica en el que se mantuvieron las esporas, tanto para 6 mA como para 19 mA; puesto que, al evaluar el buen funcionamiento de la celda electroquímica (sección 7.4), se observó una respuesta favorable de *A. niger*, obteniéndose una producción de biomasa de 200 mg/g y una degradación de HXD del 76%, bajo un pH muy similar al obtenido en la parte media de la celda electroquímica al aplicar las intensidades de corriente. Por lo tanto, se puede asumir que la inactivación de las esporas fue al tiempo de exposición a la corriente eléctrica y no a la intensidad de la corriente.

Una posible explicación de esta respuesta en las esporas, al aplicar las intensidades de corriente, puede darse durante la germinación. Para que la germinación de las esporas ocurra, primero tiene que existir una adherencia de la espora hacia el soporte sólido, para posteriormente comenzar con la germinación de éstas, al no haber una adhesión, la germinación puede dificultarse. Villena y Gutiérrez-Correa (2003), aseguran que la estabilidad y estructura de las biopelículas (que tienen que ver con la germinación de las esporas), dependen de la adhesión inicial de éstas al soporte, tanto la adhesión de las esporas como la germinación de las mismas, están determinadas por la presencia de proteínas hidrofóbicas conocidas como hidrofobinas (Villena y Gutiérrez-Correa, 2003). Estas hidrofobinas en presencia de

una intensidad de corriente o un cambio de pH pueden cambiar su polaridad y de esta manera provocar un efecto negativo en la adhesión, no permitiendo su germinación, hasta llegar a tener un efecto letal como lo observado en el presente estudio.

Otras posibles causas de la inactivación de los microorganismos, al ser sometidos a intensidades de corriente, pueden atribuirse a numerosos mecanismos, incluyendo; la alteración en la función de la membrana, causando cambios en la química de la membrana celular (Babayán y Bezrukov, 1985), y más significativamente cambios en el potencial de membrana y consecuentemente en el transporte de membrana; en los procesos de transferencia de energía, inhibición de enzimas específicas o en la permeabilidad de la membrana (Ranalli, y col. 2002).

Se conocen diversos trabajos (Spilimbergo y col., 2003; Ranalli y col., 2002; Babayan y Bezrukov, 1985), en donde se ha estudiado el comportamiento, al aplicar diferentes intensidades de corriente desafortunadamente, la mayoría de ellos si no es que todos los trabajos, han sido realizados con bacterias. Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden ser interesantes, al utilizar un hongo filamentoso como *A. niger*. Demostrando que la aplicación de una corriente eléctrica de 6 y 19 mA durante doce días de manera continua, afecta el crecimiento y la degradación de HXD, provocando efectos letales en las esporas de *A. niger*.

A partir de estos resultados surgió la pregunta; ¿el tiempo de exposición de la corriente eléctrica fue realmente, lo que provocó un efecto letal en las esporas de *A. niger*? Si es así, entonces al disminuir el tiempo de exposición, surge otra pregunta ¿en que momento, habría que aplicar la corriente eléctrica? ¿Es necesario dejar que las esporas germinen, antes de aplicar una corriente eléctrica?

Para poder contestar estas preguntas, se plantearon dos experimentos. El primero se realizó aplicando una corriente eléctrica de 6 mA al inicio del cultivo, durante 24 horas. El segundo experimento se realizó aplicando la misma intensidad de corriente eléctrica (6 mA) después de la fase lag (DFL) de crecimiento del hongo, es decir después de 114 horas de cultivo, también durante 24 horas; en esta etapa del cultivo

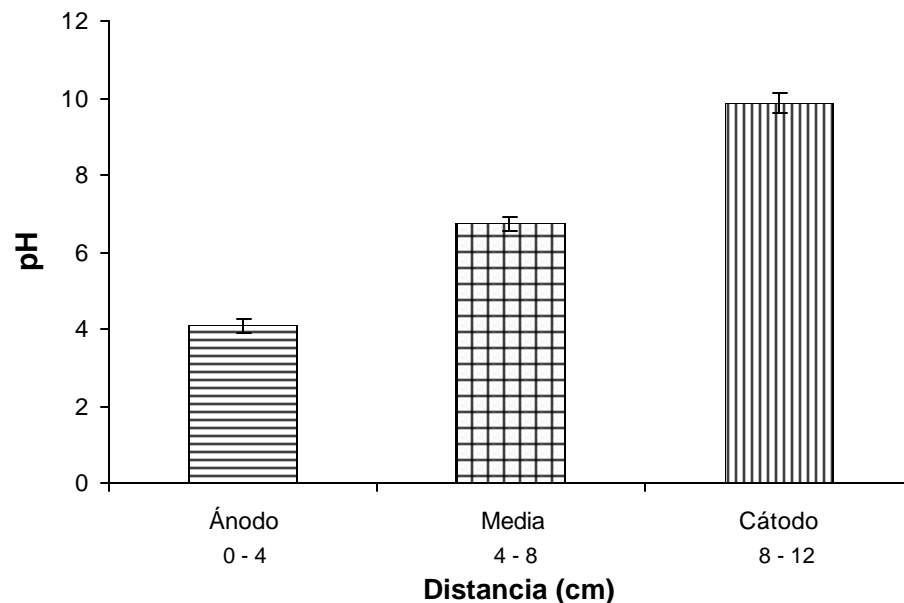
la germinación de las esporas ya se llevó a cabo, además de haber formación de micelio. En ambos casos el cultivo fue de doce días.

### 7.5.2 Aplicación de corriente continua durante 24 horas al inicio del cultivo

En esta sección se presentan los resultados obtenidos, al aplicar una corriente al inicio del cultivo de 6 mA durante 24 horas, después la corriente se retiró y el cultivo se continuó durante doce días.

#### 7.5.2.1. Perfil del pH

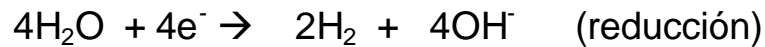
En la Figura 7.14, se muestran los gradientes de pH al final del cultivo, al aplicar una corriente eléctrica de 6 mA durante las primeras 24 horas de cultivo.



**Figura 7.14.** Gradientes de pH a lo largo de la celda electroquímica, al final de doce días de cultivo, al aplicar una corriente de 6 mA al inicio del cultivo durante 24 horas.

Al aplicar la corriente eléctrica al inicio del cultivo con un pH inicial de 5, se observó un pH ácido en la sección anódica (4.08), un pH cercano al neutro en la sección media (6.74) y un pH alcalino en la sección catódica (9.88). Estos resultados fueron muy similares a los obtenidos, al aplicar la corriente continua durante doce días

(sección 7.5.1.1). Estos cambios de pH son generados principalmente por las reacciones (Figura 7.15) de oxidación y reducción del agua que se llevan a cabo al cerrar el circuito eléctrico, al aplicar una corriente eléctrica, en donde hay formación de aniones y cationes, provocando estos gradientes de pH a lo largo de la celda electroquímica (Acar y Alshawabkeh, 1993).

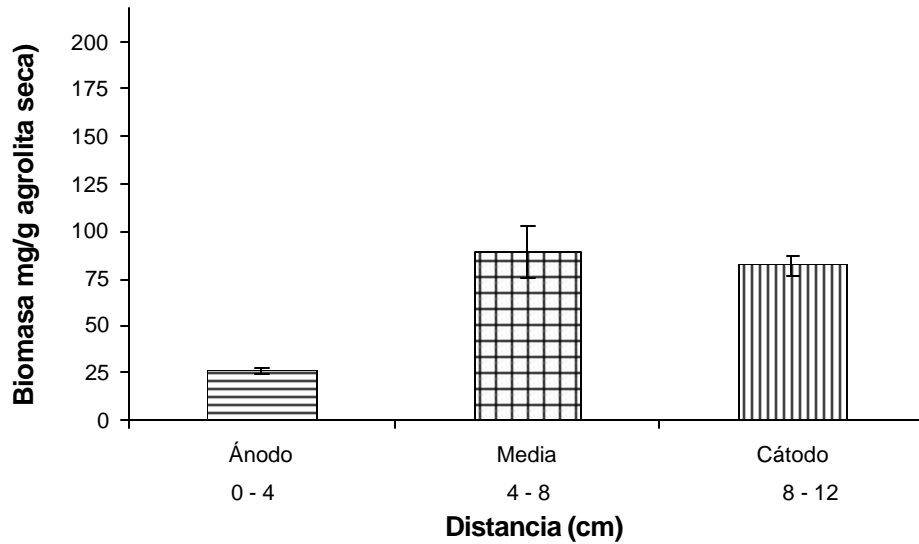


**Figura 7.15.** Reacciones que se llevan a cabo al cerrar el circuito eléctrico.

Estos gradientes de pH son similares a los que se obtuvieron cuando se impone la misma intensidad de corriente, pero durante doce días, como se ha descrito anteriormente. A diferencia de lo obtenido en tiempos largos de exposición a la corriente, en donde se determinó un crecimiento nulo del hongo; al aplicar la corriente durante sólo 24 horas, si se observó un crecimiento del hongo; por lo tanto, para determinar el efecto del pH sobre el crecimiento de *A. niger*, durante la degradación de HXD, se cuantificó la producción de biomasa que se presenta en la siguiente sección.

#### 7.5.2.2. Producción de biomasa

La producción de biomasa en las diferentes secciones de la celda electroquímica después de doce días de cultivo, se presenta en la Figura 7.16. Al cuantificar la producción de biomasa, en cada sección, se observó una producción diferente de biomasa. La mayor concentración de biomasa se cuantificó en la parte media de la celda y en la sección catódica ( $89 \pm 13$  y  $82 \pm 5$  mg/g, respectivamente), y la menor concentración de biomasa en la región anódica (hasta tres veces menor respecto a las otras secciones;  $26 \pm 2$  mg/g). El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre la concentración de biomasa en la parte media y en la región catódica sin embargo, estos valores sí fueron significativamente diferentes a los obtenidos en la región anódica.



**Figura 7.16.** Cuantificación de biomasa después de doce días de cultivo, al aplicar una corriente de 6 mA al inicio del cultivo, durante 24 horas.

Al comparar estos resultados, con los obtenidos durante la evaluación de la celda electroquímica sin corriente (sección 7.4.1), donde la concentración de biomasa, en promedio de las tres secciones de la celda electroquímica fue de  $199.52 \pm 1.77$  (mg/g de agrolita seca), al aplicar la corriente eléctrica (6 mA), se observó una menor concentración de biomasa (hasta 2.3 veces menor respecto a la sección media y catódica, mientras que para la sección anódica fue 7.6 veces menor).

Estas diferencias entre los valores de biomasa con corriente y sin corriente, no se pueden atribuir a los cambios de pH provocados por la corriente, puesto que en la sección anódica se observó un pH de 4 y en la sección catódica con un pH de 6.74, el crecimiento de *A. niger* podía ser favorable, como lo observado en la celda sin corriente, en donde se observó un pH de 6 y una concentración de biomasa superior, en contraste a la biomasa cuantificada al aplicar la corriente al inicio del cultivo. Mientras que en la sección catódica se observó una concentración de biomasa similar a la sección media, a pesar del nivel de pH (9.88) observado. Estos resultados nos indican que existe un efecto en las esporas al aplicar una intensidad de corriente y no al pH, probablemente a cambios en el metabolismo como

consecuencia de los cambios que pudieran presentarse en la pared celular al exponer a las esporas de *A. niger* a una corriente (Guillou y Murr 2002; Hyo-Sang y Lee 2001; Jackman y col., 1999). Otra posible causa es que al aplicar la intensidad de corriente al inicio, la espora pasa por un periodo de adaptación a esta corriente, para después continuar con su crecimiento. Shin y col. (2002), proponen que un microorganismo sufre un periodo de adaptación metabólica al aplicar un potencial eléctrico; ellos observan que después de 96 horas de cultivo, la producción de etanol por la bacteria *Clostridium thermocellum* ATCC 35609, aumenta con respecto a la producción detectada durante las primeras 78 horas. Esto no se pudo demostrar en el presente estudio, puesto que no se realizaron cinéticas de crecimiento. Por otro lado Jackman y col. (1999), observan el comportamiento de bacterias acidofílicas, en suelo bajo condiciones ácidas, ellos mencionan que el bajo crecimiento de las bacterias acidofílicas, sometidas a distintas intensidades de corriente (20 y 50 mA/cm<sup>2</sup>), no se debe ni a los productos de la electrólisis, ni a cambios de temperatura; más bien a cambio de orientación de la polaridad de la membrana, teniendo como consecuencia una baja viabilidad en las células, lo que hace que el crecimiento de estas bacterias sea menor en contraste al control (sin corriente). Sin embargo, diversos autores mencionan que factores como; cambios de pH, duración e intensidad de la corriente eléctrica, concentración de células y cambios en la temperatura son algunos de los factores que también contribuyen a la viabilidad de la células (Spilimbergo y col., 2003; Ranalli y col., 2002; Guillou y Murr 2002).

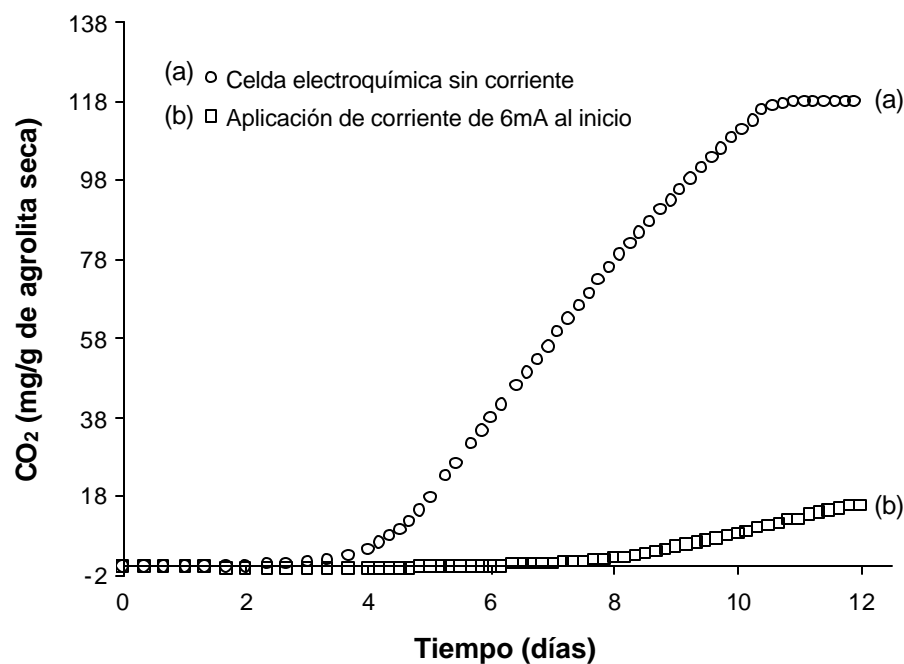
Otro factor que puede justificar estos resultados, es el cambio en el metabolismo de *A. niger* al aplicar una corriente, donde se vea favorecida la mineralización del HXD (producción de CO<sub>2</sub>) y no así la formación de biomasa. Los resultados del CO<sub>2</sub> producido se muestran en la siguiente sección.

### **7.5.2.3. Producción de CO<sub>2</sub>**

La producción de CO<sub>2</sub> es una medida de la mineralización de los compuestos degradados, en este caso de la mineralización del HXD degradado por *A. niger*. En la Figura 7.17, se presentan los resultados de CO<sub>2</sub> producido, durante doce días de

cultivo. Como se observa, las dos cinéticas de producción de  $\text{CO}_2$  mostraron respuestas diferentes; la celda electroquímica sin corriente (Figura 7.17a) fue la que mostró la mayor producción de  $\text{CO}_2$ , en contraste a la producción de  $\text{CO}_2$  al aplicar una corriente de 6 mA durante 24 horas, al inicio del cultivo (Figura 7.17b).

Al aplicar la corriente eléctrica al inicio del cultivo se observó claramente un retraso en la fase lag, de siete días, es decir cuatro días más que la celda electroquímica sin corriente.



**Figura 7.17.** Cuantificación de  $\text{CO}_2$  en línea durante doce días de cultivo. a) Celda electroquímica sin corriente y b) Celda electroquímica con corriente de 6 mA, al inicio del cultivo durante 24 horas

Debido al pH alcalino (9.88) generado en la sección catódica, parte del  $\text{CO}_2$  producido fue solubilizado en el medio en forma de bicarbonatos, por tal motivo fue imposible cuantificar el  $\text{CO}_2$  total producido durante la degradación de HXD, puesto que el equipo (respirómetro Micro-Oxymax) sólo registra el  $\text{CO}_2$  en la fase gas y el tamaño de las muestras fue el exacto para el análisis de las demás variables de respuesta, por lo que no se logró cuantificar el  $\text{CO}_2$  disuelto en el medio.

Sin embargo, independientemente de los problemas en la cuantificación de la producción de CO<sub>2</sub>, es claro que al aplicar la corriente eléctrica al inicio del cultivo, provocó un rezago durante la fase lag de *A. niger*, aumentando casi el doble de tiempo, en contraste a la celda electroquímica sin corriente, probablemente debido a un periodo de adaptación del hongo, o a un retraso en la germinación en las esporas debido a un cambio en la polaridad en las proteínas hidrofóbicas. Jackman y col. (1999), en contraste a lo observado en el presente estudio, observaron durante el crecimiento de bacterias acidofílicas, al aplicar una corriente de 20 mA/cm<sup>2</sup>, utilizando diferentes concentraciones de sedimentos (5, 10 y 30%), una disminución de 33, 67 y 9% respectivamente en la fase lag. El grupo sugiere que estos cambios pueden deberse a la acidificación del medio al aplicar la intensidad de corriente, generando una activación en las bacterias en comparación al control sin corriente. Ellos mencionan que la fase lag es dependiente de la concentración de sedimento y de la presencia o ausencia de corriente eléctrica.

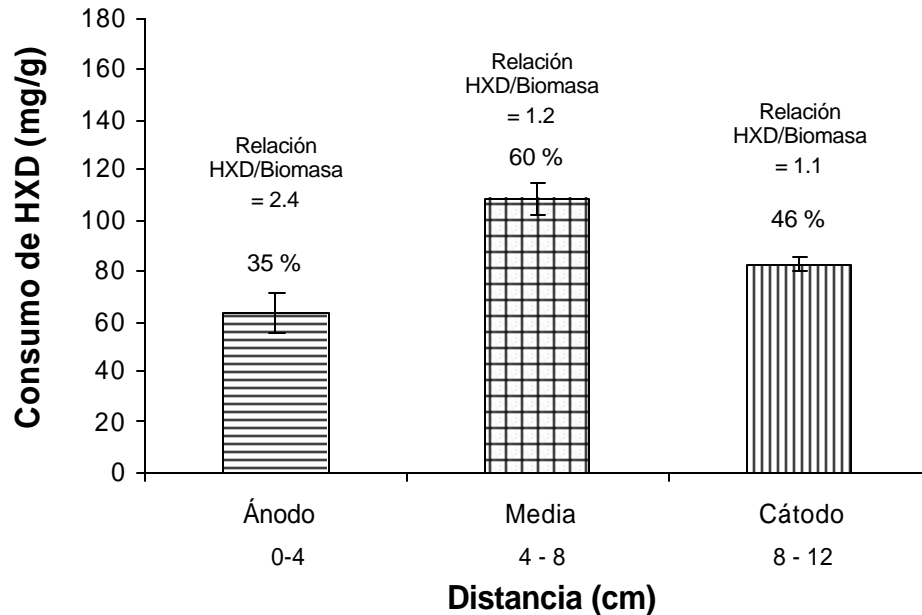
El retraso en la fase lag, la baja producción de biomasa así como los cambios de pH observados durante la aplicación de corriente eléctrica al inicio del cultivo, también fueron reflejados en la degradación de HXD. Los resultados se muestran en la siguiente sección.

#### **7.5.2.4. Degradación de HXD y acumulación de compuestos orgánicos solubles**

En la Figura 7.18, se presentan los resultados de degradación de HXD por *A. niger*, después de 12 días de cultivo, al aplicar una corriente eléctrica de 6 mA, durante 24 horas, al inicio del cultivo. Como se observa en la Figura 7.18, la degradación de HXD, fue diferente en cada una de las secciones de la celda electroquímica. En la sección anódica se obtuvo una degradación de  $63 \pm 7.7$  (mg HXD/g de agrolita seca), seguida por la región catódica con una degradación de  $82 \pm 2.5$  (mg HXD/g de agrolita seca) obteniéndose la mayor degradación, en la región media de la celda ( $109 \pm 6.6$  mg HXD/g de agrolita seca), siendo significativamente diferentes la degradación de HXD entre las regiones de la celda electroquímica. Estos resultados



mostraron una degradación de HXD, inferior a la observada durante la evaluación del funcionamiento de la celda electroquímica sin corriente (sección 7.4.3), donde se obtuvo una degradación promedio en las tres secciones de la celda electroquímica de  $136 \pm 3.5$  mg HXD/g de agrolita seca, correspondiente al 76% de HXD degradado.



**Figura 7.18.** Degradación de HXD durante doce días de cultivo, al aplicar una corriente de 6 mA al inicio del cultivo, durante 24 horas, así como la relación HXD degradado/biomasa producida (mg de HXD consumido/mg de biomasa producida).

La degradación más baja de HXD, que se observó al aplicar la corriente al inicio del cultivo, fue en la sección anódica (35%), en donde también se obtuvo la concentración más baja de biomasa ( $26 \pm 2$  mg/g) con un pH de 4; sin embargo, bajo estas condiciones, la degradación de HXD podía ser favorable para *A. niger* (cuyo pH óptimo está entre 4 y 6). En la sección media y catódica, se obtuvieron concentraciones de biomasa muy similares ( $89 \pm 13$  y  $82 \pm 5$  mg/g, respectivamente), con diferentes porcentajes de degradación de HXD y valores de pH. En la sección media, se observó una degradación de HXD del 60% con un pH de 6.7; mientras que en la sección catódica, se obtuvo una degradación de HXD del 46% con un pH de

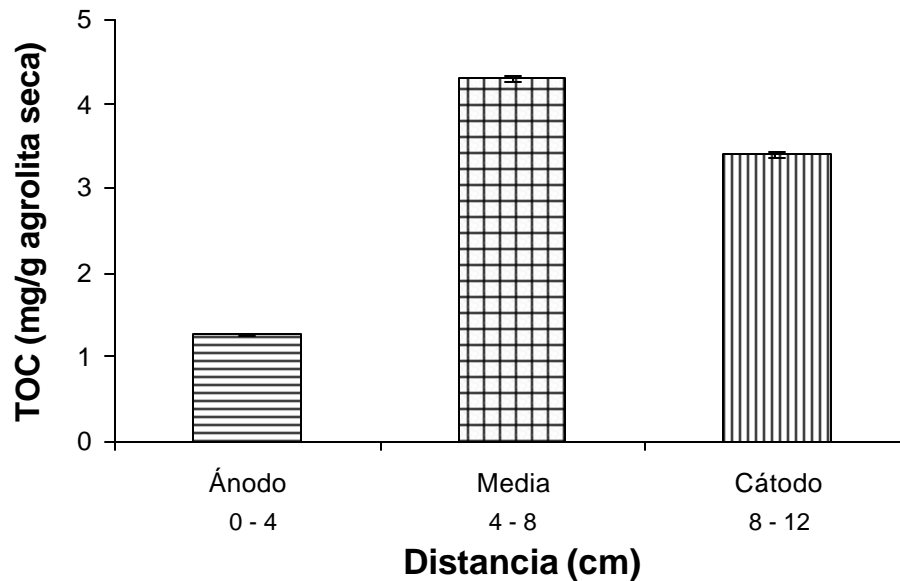
9.9. Estas diferencias se podrían asumir al afecto que provocó la corriente en las esporas y no a los cambios de pH, generados durante la aplicación de la corriente al inicio del cultivo, puesto que a valores de pH alcalinos (9.9), la concentración de biomasa y degradación de HXD fue mayor que, en valores de pH ácidos (4), en donde teóricamente todas las funciones metabólicas de *A. niger* son favorables.

Sin embargo, al relacionar el consumo de HXD con la producción de biomasa (mg HXD consumido/mg de biomasa producida), en cada una de las secciones de la celda electroquímica (Figura 7.18), se observó que la biomasa producida en la sección anódica fue la más efectiva, es decir la relación HXD:biomasa fue dos veces mayor con respecto a las de las otras secciones. Esta relación indica que el consumo de HXD, que se llevó a cabo en esta sección de la celda, fue degradado por una menor cantidad de biomasa; en contraste a las otras dos secciones, No obstante, los objetivos del presente trabajo están enfocados a la degradación del HXD, por lo que a pesar de observar que en la sección anódica de la celda se tiene una mayor eficiencia del micelio, al final del cultivo se observó la menor degradación de HXD, independientemente de la efectividad del micelio de *A. niger*.

Por lo tanto con estos resultados podemos asumir que la aplicación de una corriente de 6 mA al inicio del cultivo provoca un retraso en la germinación de las esporas de *A. niger* provocando una baja degradación de HXD y producción de biomasa.

Otra variable que se cuantificó fue la acumulación de carbono soluble, como una medida de los compuestos solubles producidos por *A. niger*. Como se puede observar en la Figura 7.19, la acumulación de carbono soluble presento el mismo comportamiento que la degradación de HXD; en donde se observó la mayor producción de carbono soluble, en la sección media de la celda (4.3 mg/g), seguida por la sección catódica (3.4 mg/g) y finalmente en donde se observó la menor producción de éstos compuestos, fue en la sección anódica (1.3 mg/g). Estos resultados mostraron, que entre mayor sea la cantidad de HXD degradado la concentración de carbono soluble será mayor. Sin embargo, la concentración de carbono soluble acumulado durante la aplicación de la corriente, no fue significativa

con respecto a la cantidad de HXD degradado y aunque la cantidad del carbono soluble fue despreciable, de igual manera se consideró para ajustar el balance de carbono.



**Figura 7.19.** Acumulación de compuestos orgánicos solubles durante la degradación de HXD por *A. niger* durante doce días de cultivo, al aplicar una corriente de 6mA al inicio del cultivo, durante 24 horas.

#### 7.5.2.5. Balance de carbono

Como ya se mencionó (sección anterior), la producción de  $\text{CO}_2$  no fue cuantificada en su totalidad, por lo que fue necesario ajustar el  $\text{CO}_2$  para poder cerrar el balance de carbono. El ajuste en la producción de  $\text{CO}_2$  se realizó, considerando los resultados obtenidos del balance de carbono, durante el estudio de rendimiento y balance de carbono (sección 7.2.4) y durante la evaluación de la celda electroquímica sin corriente eléctrica (sección 7.4.4), en donde se obtuvo una recuperación de carbono promedio de  $101 \pm 5$  (%). El ajuste se realizó de acuerdo a la siguiente ecuación de balance:

$$\left[ \begin{array}{c} \text{Carbono recuperado} \\ \text{durante la} \\ \text{degradación de HXD} \\ (101 \pm 5 \%) \end{array} \right] = \left[ \begin{array}{c} \text{Carbono} \\ \text{incorporado} \\ \text{en biomasa} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{c} \text{Carbono} \\ \text{soluble} \\ \text{(TOC)} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{c} \text{Carbono} \\ \text{cuantificado} \\ \text{como CO}_2 \\ \text{en toda la celda} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{c} \text{Carbono} \\ \text{no} \\ \text{cuantificado} \end{array} \right]$$

A partir de esta ecuación se realizó el balance de carbono, considerando el carbono presente en la biomasa, proveniente de la degradación de HXD (mg C-biomasa/mg C-HXD), el TOC (mg TOC/mg C-HXD), el carbono del CO<sub>2</sub> total cuantificado para las tres secciones (mg C-CO<sub>2</sub>/mg C-HXD), y el CO<sub>2</sub> restante se denominó como carbono atrapado en el cultivo no cuantificado.

En la Tabla 7.9, se presentan los resultados de la distribución del carbono consumido por *A. niger*, proveniente del HXD en cada una de las regiones de la celda electroquímica.

**Tabla 7.9.** Balance de carbono de la degradación de HXD por *A. niger*, durante 12 días de cultivo; expresado en rendimientos de CO<sub>2</sub> ( $Y_{CO_2/S}$ ), biomasa ( $Y_{X/S}$ ) y carbono orgánico soluble ( $Y_{TOC/S}$ ), después de aplicar una corriente de 6 mA al inicio del cultivo, durante 24 horas.

Sección celda	$Y_{X/S}$ (mg C-biomasa/mg C-HXD)	$Y_{TOC/S}$ (mg TOC/mg C-HXD)	$Y^*_{CO_2/S}$ (mg C-CO <sub>2</sub> /mg C-HXD)	$Y^{**}_{C\ NC/S}$ (mg C-NC/mg C-HXD)	Carbono recuperado (%)
Ánodo	0.20 ± 0.01	0.02 ± 0.003	0.08 ± 0.01	0.70 ± 0.02	101 ± 5
Media	0.41 ± 0.09	0.05 ± 0.003	0.05 ± 0.00	0.51 ± 0.09	101 ± 5
Cátodo	0.49 ± 0.02	0.05 ± 0.001	0.06 ± 0.00	0.41 ± 0.01	101 ± 5

\* Para el balance de carbono, el CO<sub>2</sub> se considero, que proviene homogéneamente de las tres secciones de la celda

\*\* NC; carbono no cuantificado

Al analizar el balance de carbono recuperado, se observaron respuestas diferentes en cada una de las secciones de la celda electroquímica: en la sección anódica se obtuvo una degradación de HXD del 35%; de los cuales el 78% del carbono fue

biotransformado como CO<sub>2</sub> (8% como CO<sub>2</sub> cuantificado y el resto como CO<sub>2</sub> no cuantificado), un 20% del carbono fue incorporado a la biomasa y un 2% como carbono orgánico. En la región media se obtuvo una degradación de HXD del 60 %; de los cuales el 56% del carbono fue biotransformado como CO<sub>2</sub> (5% como CO<sub>2</sub> cuantificado y el resto como CO<sub>2</sub> no cuantificado), el 41% fue incorporado a biomasa y el 5% como carbono orgánico soluble y en la región catódica se obtuvo una degradación de HXD del 46%; de los cuales el 46% del carbono fue biotransformado como CO<sub>2</sub> (6% como CO<sub>2</sub> cuantificado y el resto como CO<sub>2</sub> no cuantificado), un 49% fue incorporado a biomasa y el 5% como carbono orgánico soluble. Estos resultados mostraron una distribución del carbono degradado, completamente diferente a la obtenida en la celda electroquímica sin corriente (sección 7.4.4), en donde la producción de biomasa se privilegió puesto que el 72% (en promedio) del carbono degradado fue incorporado a la biomasa, el 28% fue mineralizado y solo el 3% se obtuvo como carbono orgánico soluble.

Los resultados obtenidos en la sección media y catódica de la celda, sugieren que al aplicar la corriente al inicio del cultivo, se provocó un cambio en la distribución del carbono consumido, favoreciéndose de igual manera la producción de CO<sub>2</sub> como la producción de biomasa, es decir, el ATP generado durante la degradación del HXD, es utilizado casi en la misma proporción, tanto para la degradación completa del HXD (CO<sub>2</sub>), como para la regeneración de *A. niger* (en la síntesis de moléculas como ácidos nucleicos, carbohidratos y proteínas). Estos resultados también mostraron que a pesar de que, en estas secciones de la celda se obtuvieron valores similares de biomasa, diferentes valores de pH (6.7 y 9.9), así como niveles de degradación de HXD diferentes, la distribución del carbono fue muy similar, sin embargo en la sección catódica, la espora fue más sensible a la corriente ó al pH, obteniendo los valores más bajos de degradación de HXD.

Mientras que en la sección anódica, se observó una distribución del carbono consumido completamente contraria a la observada en la celda electroquímica sin corriente (sección 7.4.4), en éste caso la mayor proporción del carbono consumido

fue biotransformado a CO<sub>2</sub> (78%), y en una menor proporción en biomasa (20%), estos resultados se atribuyen a cambios en el metabolismo de *A. niger*, donde la producción de CO<sub>2</sub> es favorecida, sugiriendo que la corriente eléctrica estimuló en mayor medida la producción de CO<sub>2</sub> y en menor medida la producción de biomasa.

Por lo tanto, con estos resultados se demostró que al aplicar una intensidad de corriente de 6 mA durante 24 horas, al inicio del cultivo, las esporas fueron susceptibles a la corriente, más que a los cambios de pH generados por la aplicación de la corriente, provocando un retraso en la fase lag, y como consecuencia una baja producción de biomasa así como una degradación de HXD menor, a la obtenida en la celda electroquímica sin corriente.

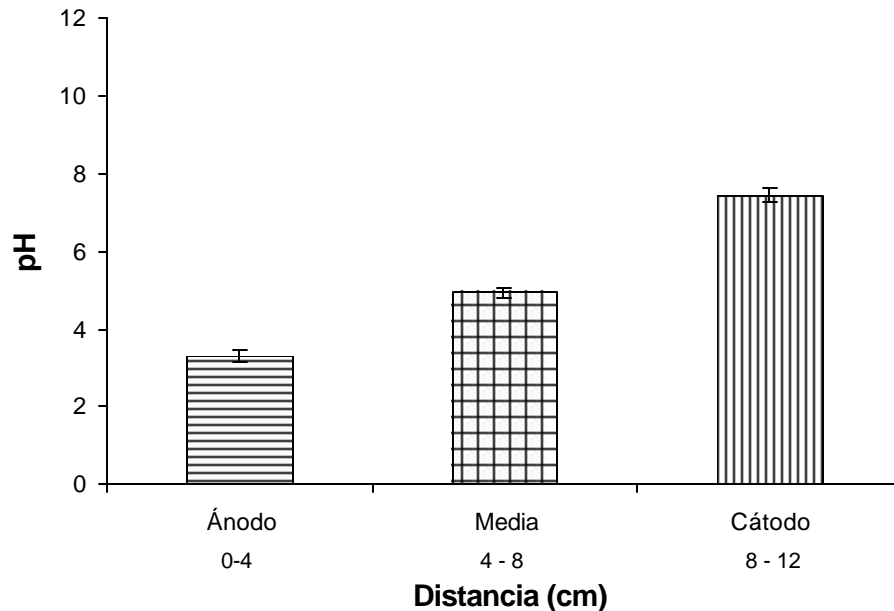
Aunque la degradación de HXD fue baja, estos resultados mostraron cambios interesantes en el distribución del carbono degradado por *A. niger*, al aplicarse la corriente al inicio del cultivo, durante 24 horas. Por lo que se decidió evaluar las respuestas de *A. niger* durante la degradación de HXD cuando se aplica una corriente eléctrica después de 114 horas de cultivo, es decir cuando la germinación ya concluyo y hay formación de micelio. Estos resultados se presentan en la siguiente sección.

### **7.5.3 Aplicación de corriente continua durante 24 horas después de la fase lag**

En esta sección se presentan los resultados obtenidos al aplicar una corriente de 6 mA a micelio de *A. niger*. La aplicación de corriente fue después de la fase lag (DFL) es decir, después de 114 horas de cultivo, durante 24 horas.

#### **7.5.3.1. Perfil del pH**

En la Figura 7.20, se muestra el perfil de pH en donde se observa un pH ácido en la región anódica y en la parte media de la celda (3.27 y 4.95 respectivamente), en la sección catódica se determinó un pH ligeramente alcalino (7.46), observando diferencias significativas entre los valores de pH en cada un de las secciones de la celda electroquímica.



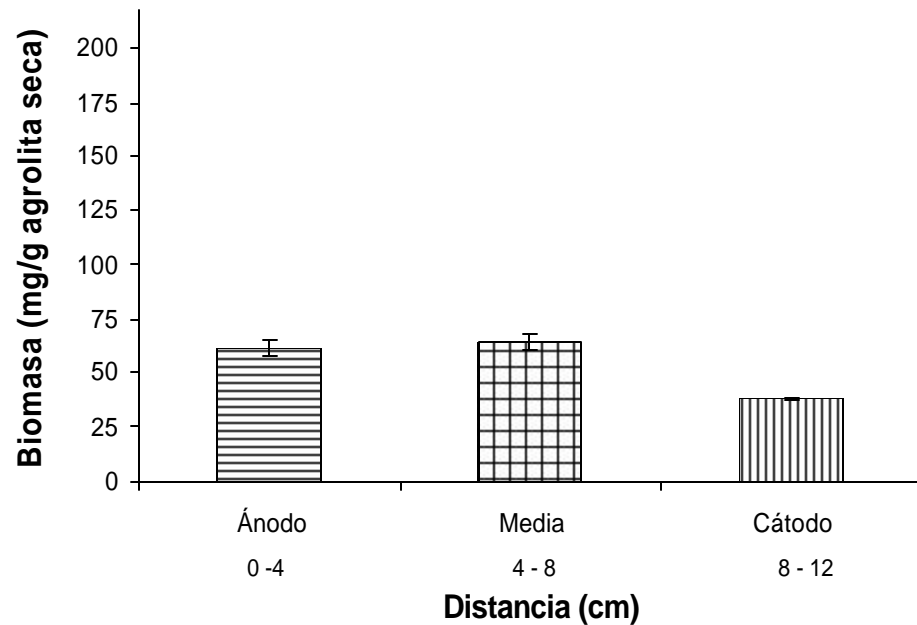
**Figura 7.20.** Gradiente de pH a lo largo de la celda electroquímica, al final de doce días de cultivo, al aplicar una corriente eléctrica de 6 mA después de la fase lag (DFL) durante 24 horas.

Los cambios de pH al aplicar la corriente eléctrica DFL, no fueron tan drásticos, incluso en la sección media de la celda se mantuvo el mismo valor de pH inicial (5), en contraste a lo observado al aplicar la corriente eléctrica al inicio del cultivo y en presencia de esporas (sección anterior), en donde los cambios de pH fueron muy drásticos, alcanzando valores de pH de 11 en la sección catódica.

Estos cambios de pH no tan drásticos que se presentaron al aplicar la corriente eléctrica DFL, fue posiblemente, a las reacciones bioquímicas de *A. niger* durante el crecimiento, reproducción y la degradación de HXD, lo que ayudó además del buffer, a que los cambios de pH no fueran tan severos. En la siguiente sección se muestra el efecto que causó la corriente eléctrica aplicada al micelio de *A. niger* en la producción de biomasa.

### 7.5.3.2. Producción de biomasa

En la Figura 7.21, se muestra la concentración de la producción de biomasa en las diferentes secciones de la celda electroquímica después de doce días de cultivo.



**Figura 7.21.** Producción de biomasa después de doce días de cultivo, al aplicar una corriente eléctrica de 6 mA después de la fase lag (DFL), durante 24 horas.

Como se puede observar en la Figura 7.21, la mayor concentración de biomasa se cuantificó en la parte media de la celda y en la región anódica ( $64 \pm 3$  y  $61 \pm 4$  mg de biomasa/g de agrolita seca, respectivamente), en donde no hay diferencias significativas. En la región catódica se cuantificó una concentración de biomasa dos veces menor respecto a las otras dos regiones de la celda ( $38 \pm 1$  mg de biomasa/g de agrolita seca), mostrando una diferencia significativa respecto a la parte media de la celda y la región anódica. Al comparar estos resultados, con los obtenidos en la celda electroquímica sin corriente (sección 7.4.1), donde la concentración de biomasa, fue de  $199.52 \pm 1.77$  (mg/g de agrolita), al aplicar la corriente eléctrica de 6 mA DFL, se observó una menor concentración de biomasa (hasta 3.2 veces menor respecto a la sección media y anódica, mientras que para la sección catódica fue de 5.2 veces menor).

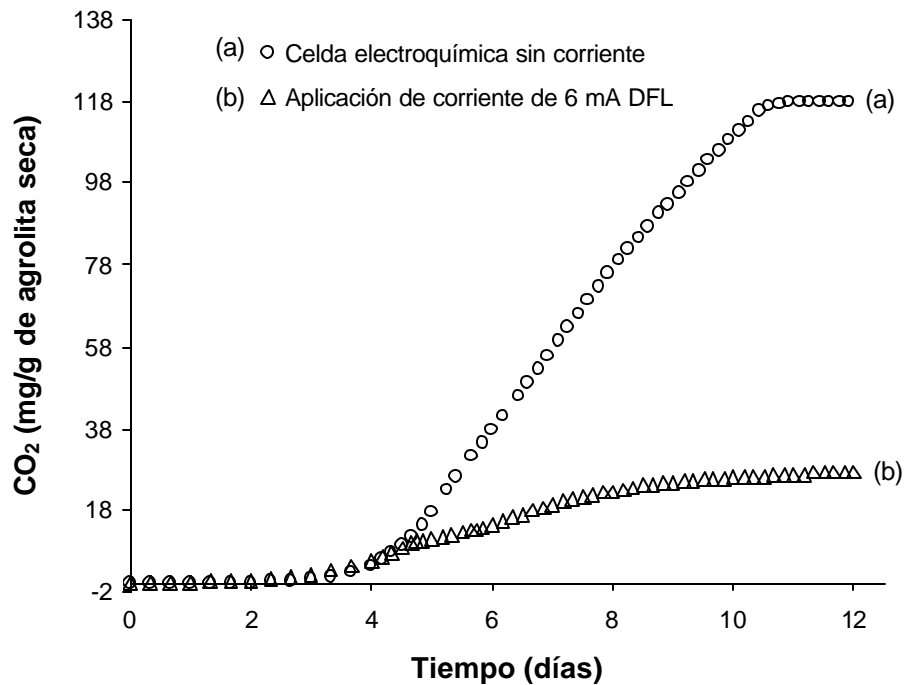
Estos resultados sugieren, que la corriente eléctrica produce modificaciones en la estructura del micelio de *A. niger*, provocando una disminución en la concentración



de biomasa, al aplicar la corriente eléctrica DFL, ya que en la sección media de la celda, en donde se mantuvo el pH igual al inicial (5), la producción de biomasa fue muy baja en contraste a la generada en la celda sin corriente.

### 7.5.3.3. Producción de CO<sub>2</sub>

En la Figura 7.22, se presentan los resultados de CO<sub>2</sub> producido, expresado en mg de CO<sub>2</sub> producido por g de agrolita seca durante los doce días de cultivo.



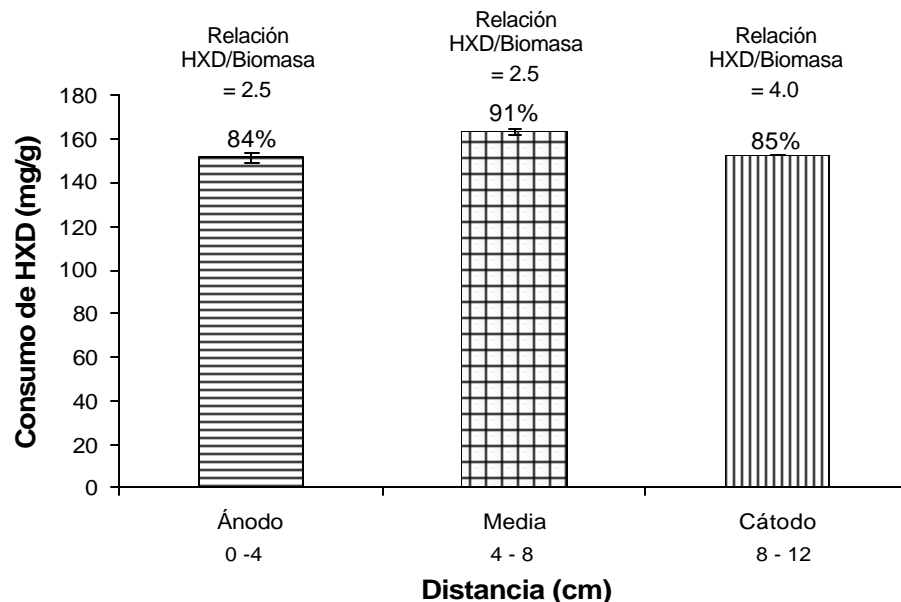
**Figura 7.22.** Cuantificación de CO<sub>2</sub> en línea durante doce días de cultivo. a) Al aplicar 6 mA después de la fase lag (DFL), durante 24 horas y b) celda electroquímica sin corriente.

En la Figura 7.22, se observa como la producción de CO<sub>2</sub> es la misma en ambas celdas, durante los primeros 4 días sin embargo, al aplicar la corriente, la producción de CO<sub>2</sub> disminuye, aun 24 horas después de retirar la corriente, la producción de CO<sub>2</sub> sigue siendo menor a la producción de CO<sub>2</sub> en la celda sin corriente, sin embargo, al igual que la sección anterior, la cuantificación de CO<sub>2</sub> fue incompleta, debido a los cambios de pH generados por la corriente.

Aun así, estos resultados mostraron un cambio sobre la distribución del carbono degradado por *A. niger* al aplicar la corriente DFL, no obstante con los datos obtenidos hasta el momento no es posible determinar si fue un efecto positivo o negativo. En la siguiente sección se muestran los datos de degradación de HXD, con lo cuales se podrá determinar el efecto de la corriente sobre el micelio de *A. niger*.

#### 7.5.3.4. Degradación de HXD y acumulación de compuestos orgánicos solubles

La degradación de HXD después de doce días de cultivo, al aplicar una corriente eléctrica de 6 mA durante 24 horas después de la fase lag se presenta en la Figura 7.23. Como se puede observar la degradación de HXD, fue diferente en cada una de las secciones de la celda electroquímica, observando la mayor degradación de HXD en la sección media de la celda ( $163 \pm 1.7$  mg HXD/g), la cual fue significativamente mayor respecto a las otras dos regiones de la celda, en donde se observó una degradación promedio de  $152 \pm 0.9$  mg HXD/g.



**Figura 7.23.** Degradación de HXD durante doce días de cultivo, al aplicar una corriente de 6 mA después de la fase lag (DFL), durante 24 horas.

Estos resultados mostraron una degradación de HXD, superior a la observada durante la evaluación del funcionamiento de la celda electroquímica sin corriente (sección 7.4.3), donde se observó una degradación promedio, de las tres secciones de la celda electroquímica de  $136 \pm 3.5$  mg HXD/g, correspondiente al 76% de HXD degradado.

Estos resultados demuestran que el aumento en la degradación de HXD fue estimulada por la corriente eléctrica aplicada, obteniendo una degradación del 91% en la sección media de la celda, en donde el pH se mantuvo en 5, con lo cual es posible afirmar que la estimulación en la biodegradación de HXD por *A. niger* fue debida solamente a la corriente eléctrica aplicada. Incluso en la sección anódica, con un pH de 3.3, y en la región catódica, con pH de 7.46, se observaron niveles altos de degradación de HXD.

Al comparar la degradación de HXD y la producción de biomasa en la celda con y sin corriente se observó un resultado interesante. En la celda sin corriente, se observó la mayor concentración de biomasa ( $199.52 \pm 1.77$  mg/g, promedio de las tres secciones de la celda), y la menor degradación de HXD (76%, en promedio de las tres secciones de la celda), en contraste a los resultados generados al aplicar una corriente DFL, en donde se observó una menor concentración de biomasa hasta 3.6 veces menor ( $54 \pm 12$  mg/g, en promedio de las tres secciones de la celda), y una mayor degradación de HXD (87%, en promedio de las tres secciones de celda).

Al relacionar el consumo de HXD con la producción de biomasa (mg HXD consumido/mg de biomasa producida), en cada una de las secciones de la celda electroquímica, se observó una mayor eficiencia del micelio en la sección catódica, con una relación HXD:biomasa de cuatro, esto quiere decir que la degradación de HXD que se obtuvo en esta sección de la celda fue consumido por una menor cantidad de biomasa, como se observó en la sección anterior (7.5.2.4), pero en este caso, fue en la sección catódica, en presencia de un pH alcalino. No obstante, como se mencionó en la sección anterior los objetivos del presente trabajo están enfocados a la degradación del HXD.

Por lo tanto con estos resultados se puede sugerir que el efecto de la corriente eléctrica, sobre los parámetros relacionados con la degradación de HXD, sobre el micelio de *A. niger* (estimulación en la actividad enzimática, cambios en la membrana celular ó cambio de polaridad), fueron estimulados en presencia de una corriente eléctrica.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Shin y col. (2002), quienes evaluaron la producción de etanol por *Clostridium thermocellum* ATCC 35609, aplicado diferentes intensidades de corrientes (0.75, 1.5, 3, y 5 V), durante un periodo de tiempo entre 15 y 78 horas, observando un aumento en la producción de etanol del 26, 52 y 14 % respectivamente, en contraste con el control sin corriente. De la misma manera Jackman y col. (2001), quienes demostraron que al aplicar una corriente de 0.89 mA/cm<sup>2</sup> durante 21 días a través del suelo, se favorece la biodegradación de compuestos orgánicos, como el ácido 2,4-diclorofenoxi acético (2,4-D), obteniendo una degradación del 75% en 22 días en comparación con el control sin corriente en donde se obtuvo una degradación del 39% en 24 días, utilizando una bacteria (*Burkholderia spp. RASC c2*).

Sin embargo, cabe mencionar que los dos trabajos citados anteriores, fueron realizados con bacterias, en donde al igual que el presente trabajo, se observó una estimulación del metabolismo de un hongo filamentoso (*A. niger*), al ser sometido a una corriente eléctrica.

Otra variable que se cuantificó fue la acumulación de carbono soluble. En este caso la producción de compuestos solubles producidos por *A. niger* durante la degradación de HXD, fue despreciable en las tres secciones de la celda obteniéndose una acumulación de éstos compuestos entre 2.3 y 2.8 mg/g, cantidad despreciable, respecto a la cantidad de HXD degradado; sin embargo, aunque las cantidades fueron despreciables de igual manera fueron utilizadas para ajustar el balance de carbono.

### 7.5.3.5. Balance de carbono

Al igual que la sección anterior el CO<sub>2</sub> fue ajustado para poder cerrar el balance de carbono, este ajuste se hizo de la misma manera que la sección anterior (7.5.2.5).

En la Tabla 7.10, se presentan los resultados de la distribución del carbono consumido por *A. niger* proveniente del HXD, en cada una de las regiones de la celda electroquímica, incluyendo el CO<sub>2</sub> no cuantificado. Observado, una distribución similar del carbono degradado, en las tres secciones de la celda.

**Tabla 7.10.** Balance de carbono de la degradación de HXD por *A. niger*, durante 12 días de cultivo; expresado en rendimientos de CO<sub>2</sub> ( $Y_{CO_2/s}$ ), biomasa ( $Y_{x/s}$ ) y TOC ( $Y_{TOC/s}$ ), después de aplicar 6 mA después de la fase lag (DFL), durante 24 horas.

Sección celda	$Y_{x/s}$ (mg C-biomasa/mg C-HXD)	$Y_{TOC/s}$ (mg TOC/mg C-HXD)	$Y^{**}_{CO_2/s}$ (mg C-CO <sub>2</sub> /mg C-HXD)	$Y^*_{C\ NC/s}$ (mg C-NC/mg C-HXD)	Carbono recuperado (%)
Ánodo	0.20 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.73 ± 0.01	101 ± 5
Media	0.19 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.74 ± 0.01	101 ± 5
Cátodo	0.12 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.81 ± 0.00	101 ± 5

\* NC = carbono no cuantificado

\*\* Para el balance de carbono, el CO<sub>2</sub> se considero, proviene homogéneamente de las tres secciones de la celda

Al analizar la respuesta de *A. niger* al aplicar la corriente eléctrica DFL, se observó que del 87 ± 0.4 % del HXD degradado (promedio en las tres regiones de la celda), el 81 ± 4 % fue biotransformado a CO<sub>2</sub> (6% como CO<sub>2</sub> cuantificable y el resto como CO<sub>2</sub> no cuantificado), el 17 ± 0.4 % fue incorporado a la biomasa y un 2 % como compuestos orgánicos solubles, contrario a lo observado en la celda control en donde se degradó solo el 76 % del HXD, del cual el 28 ± 0.01 % del carbono consumido fue mineralizado, 72 % incorporado a la biomasa y el 3 % como carbono orgánico soluble. Como se observa, la distribución de carbono se invierte completamente entre la celda electroquímica sin corriente y la celda electroquímica con corriente DFL. Estos cambios pueden atribuirse a cambios en la membrana

celular y estímulos en la actividad enzimática, en donde se incrementa la degradación completa de HXD, en presencia de la corriente eléctrica; sin embargo esto no puede afirmarse puesto que no se realizó ningún estudio de actividad enzimática para poder corroborar el resultado, lo mismo ocurre con los cambios en la membrana. Existen estudios en donde se ha reportado este tipo de estímulos, en levaduras. Ganeva y col., (2002), observaron como se favorece la actividad de la invertasa al aplicar 15 pulsos eléctricos de 3 a 3.15 kV/cm con duración de 3 ms cada uno durante 6 horas, obteniendo 49 % más actividad, con respecto al control sin corriente, demostrando cambios irreversibles en la permeabilidad de la membrana y aumentos en la porosidad de la pared celular, lo que favorece la liberación de la invertasa en *S. cerevisiae*. En contraste Ranalli y col (2002), ellos estudiaron la producción de ATP por *S. cerevisiae* al aplicar diferentes intensidades de corriente (10, 50 y 100 mA) durante distintos periodos de tiempo (18, 34 y 48 horas), obteniendo niveles más bajos de ATP al aplicar las intensidades de corriente, debido a alteraciones en la función membranal. Las diferentes respuestas entre los anteriores trabajos se pueden atribuir al tiempo de exposición y la intensidad de corriente (Spilimbergo y col. 2003).

Con estos resultados se demostró que al aplicar una corriente eléctrica de 6 mA, después de la fase lag; una vez que las esporas germinaron y hay formación de micelio, los cambios de pH no son tan severos, incluso se mantiene en niveles donde el hongo puede crecer sin dificultad, condiciones bajo las cuales la degradación de HXD se ve estimulada, alcanzando degradaciones mayores a las observadas en la celda electroquímica con corriente.

Por otro lado con estos resultados se logró observar un cambio completamente notorio en la distribución del carbono consumido por *A. niger* al aplicar la corriente eléctrica DFL, favoreciéndose la producción de CO<sub>2</sub> y en menor medida la producción de biomasa., en contraste al observado en la celda electroquímica sin corriente.

Los resultados obtenidos en la celda que contiene la agrolita humectada al 75%, con el medio de cultivo, y en presencia de una suspensión de esporas, en ausencia y en presencia de una corriente eléctrica impuesta, muestran comportamientos diferentes respecto al balance de carbono obtenido después de la degradación de HXD. Mientras que el 20% del carbono consumido fue incorporado a la biomasa, al imponer una corriente eléctrica, en ausencia de corriente el 72% del carbono consumido fue incorporado en biomasa. Estos resultados sugieren que la aplicación de una corriente eléctrica por 24 horas durante la biodegradación de HXD por *A. niger* provoca un cambio en el metabolismo. Desafortunadamente con los resultados obtenidos en el presente estudio no es posible determinar a que nivel fue modificado este metabolismo. De manera general esta modificación podría atribuirse a: cambios en la polaridad de la membrana, favoreciéndose el paso del sustrato hacia el interior de la membrana, y por ende un aumento en la degradación del sustrato; estímulos en la actividad enzimática, principalmente en las monooxigenasas, provocando una mayor mineralización del sustrato y en menor medida la producción de biomasa, e inhibición a nivel de las rutas metabólicas, inhibiendo a su vez el paso hacia la ruta anabólica.

---

## 8. CONCLUSIONES GENERALES



El tamaño de partícula más adecuado fue de 1.19 - 1.68 mm, generando la menor dispersión de datos y el mayor consumo de O<sub>2</sub> en el menor tiempo.

La construcción del diseño de la celda electroquímica permitió determinar los valores que adquiere el potencial de celda, al imponer diferentes intensidades de corriente a través del soporte. Seleccionando dos corrientes 6 y 19 mA.

La biodegradación de HXD por *A. niger* en la celda electroquímica sin corriente, durante doce días de cultivo, permitió una distribución homogénea a lo largo de la celda respecto a las variables respuesta, con niveles de degradación de HXD de 76%, favoreciéndose la producción de CO<sub>2</sub> (72%) y en menor medida la producción de biomasa (28%)

Al aplicar una corriente de 6 y 19 mA, durante todo el cultivo, la corriente produjo un efecto letal en las esporas de *A. niger*, mostrando una degradación de HXD y producción de biomasa nulos.

Al aplicar una corriente al inicio del cultivo de 6 mA durante 24 horas, la corriente produjo un efecto negativo en las esporas, mostrando un aumento en la fase lag, por más de tres días, respecto a la celda sin corriente. La degradación de HXD fue menor al 60%, registrando cambios de pH drásticos y cambios en el balance de carbono en *A. niger*; favoreciéndose de igual manera la producción de biomasa (45%), como la producción de CO<sub>2</sub> (45%), tanto en la sección anódica como en la parte media. En la sección catódica se favoreció la producción de CO<sub>2</sub> (70%), y en menor medida la producción de biomasa (20%).

Al aplicar una corriente eléctrica, después de la fase lag de 6 mA durante 24 horas, la corriente produjo un efecto positivo en el micelio de *A. niger*; obteniendo los mayores niveles de degradación de HXD, cambios de pH menos drásticos, así como en el balance de carbono; favoreciendo la producción de CO<sub>2</sub> (76%) y en menor proporción la producción de biomasa (17%) en las tres secciones de la celda.

En resumen, los resultados del presente trabajo demostraron que la aplicación de una corriente eléctrica de sobre *A. niger*, durante la degradación de HXD, provoca

cambios en su metabolismo, al pasar de un proceso anabólico a un proceso catabólico.

---

## 9. RECOMENDACIONES

Algunas recomendaciones para estudios posteriores, relacionados con el presente trabajo son:

- Evaluar las cinéticas de degradación de hexadecano, producción de biomasa y pH
- Determinar los coeficientes respiratorios, a partir del consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub>
- Cuantificar la producción de CO<sub>2</sub> soluble en el medio
- Evaluar el efecto de la corriente eléctrica, en la estructura de las espores y micelio de *A. niger*

---

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acar Y. B. y Alshawabkeh A. N. 1993. Principles of electrokinetic remediation. *Environmental Science and Technology*. **27**: 2638-2647.
- Aitken MD., Stringfellow WT., Nagel RD., Kazunga C. y Chen SH. 1998. Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can J. Microbiol.* **44**: 743-752.
- Alshawabkeh A. N., Yeung A. T. y Bricka M. R. 1999. Practical aspects of in-situ electrokinetic extraction. *J. Environ. Eng.* **125**: 27-35.
- Araújo F. Q. O., Coelho Z. M<sup>a</sup> A., Margarit P. C. I., Vaz-Junior A. C. y Rocha-Leão M. M<sup>a</sup> H. 2004. Electrical stimulation of *Saccharomyces cerevisiae* cultures. *Brazilian Journal of Microbiology*. **35**: 97-103.
- Askolin S., Nakari-Setälä T. y Tenkanen M. 2001. Overproduction, purification, and characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobin HFBI. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 124-130.
- Atlas R. M. 1984. Petroleum Microbiology, Edit. Macmillan Publishing Co., New York, pp. 5-26.
- Atlas R. M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* **45**: 180–209.
- Babayan T. L. y Bezrukov M. G. 1985. Autolysis in yeasts. *Acta Biotechnol.* **5**: 129-136.
- Blackburn J. W. y Hafker W. R. 1993. The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. *Trends Biotechnol.* **11**: 328-33.
- Bosma T., Middeldorp P., Schraa G. y Zehnder A. 1997. Mass transfer limitation of biotransformation: Quantifying bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 248-252.

- Bouwer E. J. y Zehnder A. J. B. 1993. Bioremediation of organic compounds-putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotechnol.* **11**: 360-367.
- Capotorti G., Digianvincenzo P., Cesti P., Bernardi A. y Guglielmetti G. 2004. Pyrene and benzo(a)pyrene metabolism by an *Aspergillus terreus* strain isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil. *Biodegradation* **15**: 79-85.
- Christen P., Auria R., Villegas E. y Revah S. 1993. Growth of *Candida utilis* in solid state fermentation. *Biotechnology Advances.* **11**: 549-557.
- Colombo J.C., Cabello M. y Arambarri A.M. 1996. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and ligninolytic fungi. *Environ. Pollut.* **94**: 355–362.
- Corlay C.L., Ferrera-Cerrato R., Etchevers Barra J. D., Echegaray A.A. y Santizo R.J.A. 1999. Microbial groups kinetics of composting and vermicomposting processes. *Agrociencia.* **33**: 375-380.
- Couto SR., Gundín M., Lorenzo M. y Sanromán A. 2002. Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Proc Biochem.* **38**: 249-255.
- DeFlaun M. F. y Condee C. W. 1997. Electrokinetic transport of bacteria. *Journal of Hazardous Material.* **55**: 263-277.
- Díaz-Ramírez I., Ramírez-Saad H., Gutiérrez-Rojas M. y Favela-Torres E. 2003. Biodegradation of Maya crude oil fractions by bacterial strains and a defined mixed culture isolated from *Cyperus laxus* rhizosphere soil in a contaminated site. *Can. J. Microbiol.* **49**: 755–761.
- Díaz-Ramírez I.J. 2004. Biodegradación de hidrocarburos por cultivos mixtos definidos aislados de la rizósfera de *Cyperus Laxus* Lam. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Dogan M., Alkan M. y Cakir U. 1997 Electrokinetic properties of perlite. *Journal of Colloid and Interface Science.* **192**: 114-118.

- Dzul-Puc J. D., Esparza-García F., Barajas-Aceves M. y Rodríguez-Vázquez R. 2005. Benzo(a)pyrene removal from soil by *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse and pine sawdust. *Chemosphere* **58**: 1-7.
- Escalante-Espinosa E., Gallegos-Martínez M. E., Favela-Torres E. y Gutiérrez-Rojas M. 2005. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere*. **59**: 405–413.
- Feofilova E. P. 2001. The kingdom Fungi: Heterogeneity of physiological and biochemical properties and relationships with plants, animals, and prokaryotes (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* **37**:124-137.
- Ganeva V., Galutzov B. y Teissie J. 2002. Electroinduced release of invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **24**: 1853-1856.
- García R. M., Saucedo C.G., Flores H. S. y Gutiérrez R. M. 2002. Mass transfer and hydrocarbon biodegradation of aged soil in slurry phase. *Biotechnol. Prog.* **18**: 728-733.
- Graham D.W., Smith, V., Cleland D. y Law K.P. 1999. Effects of nitrogen and phosphorus supply on hexadecane biodegradation in soil systems. *Water, Air, Soil Pollut.* **111**: 1–18.
- Guerin W. F. y Boyd S. A. 1992. Differential bioavailability of soil sorbed naphthalene to two bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1142-1152.
- Guillou S. y El Murr N. 2002. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in solution by low-amperage electric treatment. *J Appl Microbiol.* **92**:860-865.
- Gutiérrez-Rojas M., Córdova J., Auria R., Revah S. y Favela-Torres E. 1995. Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid-state fermentation on inert support. *Biotechnol. Lett.* **17**:219-224.



- Halden R., Tepp S., Halden B. y Dwryer D. 1999. Degradation of 3 phenoxybenzoic acid in soil by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310 (pPOB) and two Modified *Pseudomonas* Strains. *Appl Environ Microbiol.* **65**: 3354-3359.
- Hyo-Sang L. y Lee K. 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soil by bacterial cells transported by electrokinetics. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**: 1038-1045.
- Iturbe-Argüelles R., Flores Torres C., Chávez López C. y Roldán Martín A. 2002. Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas. *Ingeniería Investigación y Tecnología III.* **1**: 25-35.
- Jackman A. S. Maini G., Sharman K. A. y Knowles J. C. 1999. The effects of direct electric current on the viability and metabolism of acidophilic bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* **24**: 316-324.
- Jackman A. S. Maini G., Sharman K. A., Sunderland G. y Knowles J. C. 2001. Electrokinetic movement and biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in silt soil. *Biotechnol. Bioeng.* **74**: 40-48.
- Jerábková H., Králová B., Krejčů V., Sanchez J. L. I. y Roig M. G. 1997. Use of polyurethane foam for the biodegradation of *n*-alkanes by immobilised cells of *Pseudomonas*. *Biotechnology Techniques.* **11**: 391-394.
- Kim S-O., Moon S-H. y Kim K-W. 1999. Enhanced electrokinetic soil remediation for removal of organic contaminants. *Environ. Tech.* **21**:417-426.
- Ko S.-O., Schlautman M. A y Carraway E. R. 2000. Cyclodextrin-enhanced electrokinetic removal of phenanthrene from a model clay soil. *Environ. Sci. Technol.* **34**: 1535-1541.
- Lageman Pool, van Vulpen y Norris. 1995. In situ electrobioreclamation in low-permeability soils. En: Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons. Hinchee, R.E., Kittel J.A. y Reisinger H. J. (Eds.). Battelle Press, Columbus, OH. pp: 287-292.

- Laha S. y Luthy, R. G. 1992. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-Water systems. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 1367-1380.
- Larroche C. 1996. Microbial growth and sporulation behaviour in soli-state fermentation. *J. Sci. Ind. Res.* **5**: 408-423.
- Loo W. W. 1994. Electrokinetic enhanced passive in-situ bioremediation of soil and groundwater containing gasoline, diesel and kerosene. Proc. 11<sup>th</sup> HAZMACON 94, *Haz. Mater. Mgmt. Conf. Exhib.* pp: 254-264.
- Lowry, OH. 1951. Protein measurement whit Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275
- Martín Moreno C., González Becerra A. y Blanco Santos M. J. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev. Iberoam. Micol.* **24**: 103-120.
- Murado M. A., González M. P., Torrado A. y Pastrana L. M. 1997. Amylase production of *Aspergillus oryzae* on polyurethane foams. Some mechanistic approaches from an empirical model. *Process. Biochem.* **32**: 35-42.
- Murillo R. B. 2005. Diseño de un dispositivo para evaluar y caracterizar la electroremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Tesis de Maestría UAM-I.
- Ooijkaas L. P., Weber F. J., Buitelaar R. M., Tramper J. y Rinzema A. 2000, Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Tibtech.* **18**: 356–360.
- Ozawa S., Sato K. y Endo I. 1996. Repeated batch production of alkaline protease by solid-state fermentation using urethane foam as carriers. *Bioprocess. Eng.* **14**: 63-68.

- Pamukcu, S. y J.K. Wittle. "Electrokinetically enhanced insitu soil decontamination," in Remediation of hazardous waste Contaminated Soils, Marcel Dekker, Inc., New York, 1993. pp 245-294
- Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochem Eng J.* **13**: 81–84.
- Park H. D., Laivenieks M., Guettler V. M., Jain M. K. y Zeikus G. J. 1999. Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolite production. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2912-2917.
- Peralta-Pérez M. del R. 2001. Obtención y caracterización de un soporte sólido modelo para el estudio del metabolismo de hongos filamentosos degradadores de fenantreno. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. Departamento de Biotecnología. México D. F.
- Prashant M. Bapat., Sucharita Kundu y Pramod P. Wangikar. 2005. An optimized method for *Aspergillus niger* spore production on natural carrier substrates. Article in press.
- Prince, R. C. 2003. Biodegradation of petroleum and other hydrocarbons. Encyclopedia of Environmental Microbiology. Publicado en internet por: John Wiley & Sons, Inc. New Jersey (<http://www.mrw.interscience.wiley.com>).
- Raghavarao K. S. M. S., Ranganathan T. V. y Karanth N. G. 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **13**: 127–135.
- Raimbault M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Elect. J. Biotechnol.* **1**:174–188.
- Raloff Janet. 1993. Lasagna: a new recipe for 'dirty' soils - Lasagna Project uses layers of cleanup zones and wastes to clean contaminated deep clay soils. Science News. Publicado en:  
[http://www.zinkle.com/p/articles/mi\\_m1200/is\\_n21\\_v144/ai\\_14633106](http://www.zinkle.com/p/articles/mi_m1200/is_n21_v144/ai_14633106)

- Rama-Mercier, R., Mougín C., Sigoillot J-C., Sohier L., Chaplain V. y Asther M. 1998. Wet sand cultures to screen filamentous fungi for the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnology Techniques*. **12**: 725-728.
- Ranalli G., Iorizzo M., Lustrato G., Zanardini E. y Grazia L. 2002. Effects of low electric treatment on yeast microflora. *J. Appl. Microbiol.* **93**: 877-883.
- Rodríguez Couto S. y Sanromán M<sup>a</sup> A. 2005. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochem Eng. J.* **22**: 211-219.
- Roulia M., Chassapis K., Fotinopoulos CH., Savvidis TH. y Katakis D. 2003. Dispersion and sorption of oil spills by emulsifier-modified expanded perlite. *Spill Science & Technology Bulletin*. **8**: 425–431.
- Schoefs O., Perrier M. y Samson R. 2004. Estimation of contaminant depletion in unsaturated soils using a reduced-order biodegradation model and carbon dioxide measurement. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 53–61.
- Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J. C. y van Dijck P. W. M. 2002. On the safety of *Aspergillus niger*-a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 426-435.
- Setti L., Lanzarini G., Pifferi P. G. y Spagna G. 1993. Further research into aerobic degradation of n-alkanes in a heavy oil by a pure culture of a *Pseudomonas* sp. *Chemosphere*. **26**: 1151-1157.
- Shankaranand V. S., Ramesh M. V. y Lonsane B. K. 1992. Idiosyncrasies of solid-state fermentation systems in the biosynthesis of metabolites by some bacterial and fungal cultures. *Process Biochem.* **27**: 33-36.
- Shapiro A. P. y Probst R. F. 1993. Removal of contaminants from saturated clay by electroosmosis. *Environ. Sci. Technol.* **27**: 283-291.
- Shin H. S., Zeikus J G. y Jain M. K. 2002. Electrically enhanced ethanol fermentation by *Clostridium thermocellum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **58**: 476-481.

- Spilimbergo S., Dehghani F., Bertucco A. y Foster N. R. 2003. Inactivation of bacteria and spores by pulse electric field and high pressure CO<sub>2</sub> at low temperature. *Biotechnol Bioeng.* **82**: 118-125.
- Starnecker, A. y Menner, M. 1996. Assessment of biodegradability of plastics under simulated composting conditions in a laboratory test system. *Int. Biodet. Biodeg*: 85-92.
- Sugiura K., Ishihara M., Shimauchi T. y Harayama S. 1997 Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 45-51.
- Tissot B. P. y Welte D. H. 1984. Petroleum formation and occurrence. Ed. Springer-Verlag, Berlin.
- UAM. 2003. Programa de investigación multidisciplinario: Estudios de tratabilidad para la remediación de suelos intemperizados contaminados con hidrocarburos. Reporte final.
- Universidad de Oxford. 1996. IBS Viridian S.A., Tecnología de EA S. A <http://www.ost.gov.uk/link/news/9810-8.htm>
- Van Cauwenberghe L. 1997. Electrokinetics technology evaluation reports TO-97-03. GWRTAC E Series. USA. <http://www.gwrtac.org>
- Velasco A. N. 2004. Efecto de pretratamientos fisicoquímicos en la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en un suelo intemperizado, por composteo. Tesis de Especialidad en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Villena Gretty K. y Gutiérrez-Correa M. 2003. *Aspergillus niger* biofilms for celulasas production: some structural and physiological aspects. *Perú Biol.* **10**:78-87.

- Viniegra-González G. (1997). Solid-State Fermentation: definition, characteristics, limitations and monitoring. In Roussos S., Lonsane B. K., Raimbault M. y Viniegra-González G. Eds. *Advances in Solid State Fermentation*, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Chapter 2: pp. 5–22.
- Virkutyte J., Sillanpaa M. y Latostenmaa P. 2002. Electrokinetic soil remediation - critical overview. *The Science of the Environment*. **289**: 97-121.
- Volke S. T. y Velasco T. J. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados., Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT).
- Volke Sepúlveda T. L., Gutiérrez-Rojas M. y Favela-Torres E. 2003. Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. **87**: 81–86.
- Volke Sepúlveda T. L., Gutiérrez-Rojas M. y Favela-Torres E. 2005. Biodegradation of high concentrations of hexadecane by *Aspergillus niger* in a solid-state system: Kinitic analysis. *Bioresource Technology*. Article in press.
- Wackett L. P., Brusseau G. A., Hueseholder S. R. y Hansen R. S. 1989. Survey of microbial oxygenase: Trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2960-2964.
- Wolter M., Zadrazil F., Martens R. y Bahadir M. 1997. Degradation of eight highly condensed polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus sp.* Florida in solid wheat straw substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 398-404.
- Yee D. C., Chauhan S., Yankelevich E., Bystritskii V. y Wood T. K. 1998. Degradation of perchloroethylene and dichlorophenol by pulsed-electric discharge and bioremediation. *Biotechnol. Bioeng.* **59**: 438-444.
- Zhu Y., Smits J. P., Knol W. y Bol J. 1994. A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as carrier. *Biotechnol. Lett.* **16**: 643-648.
- Zrimec A. Jerman I. y Lahajnar G. 2002. Alternating electric fields stimulate ATP synthesis in *Escherichia coli*. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **7**: 172-174.

Iztapalapa, D. F. 31 de Mayo 2006

El jurado asignado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la  
Tesis:

**Efecto de un campo eléctrico en la degradación de hexadecano por *Aspergillus niger* en un soporte inerte**

Que presentó

**IBI. Nancy Velasco Alvarez**

Comité Tutorial:

Directo: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Asesor: Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

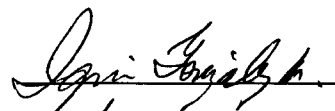
Asesor: Dr. Ignacio González Martínez

**Jurado:**

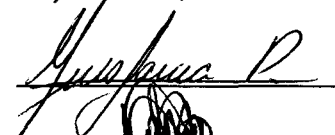
**Presidente: Dra. Tania L. Volke Sepúlveda**  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



**Secretario: Dr. Ignacio González Martínez**  
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



**Vocal: Dra. Inés García Peña**  
Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología  
Instituto Politécnico Nacional



**Vocal: Dr. Guillermo Aguilar Osorio**  
Departamento de Alimentos y Biotecnología  
Facultad de Química, UNAM

