



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo
natural mediante la estimación de fenómenos de sorción
y secuestro**

Tesis
que para obtener el grado de:

Maestra en Biotecnología

Por

Elizabeth Alejandra Motolinia Alcántara

Director

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Asesores

Dra. Angélica Román Guerrero

Dr. Carlos Omar Castillo Araiza

Julio 2018

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

La maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de posgrados de Calidad (PNPC) de CONACyT con la referencia 001465.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

México D.F. a 31 de Julio de 2018.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad

Iztapalapa aprobó la tesis:

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

Que presentó la estudiante

Elizabeth Alejandra Motolinia Alcántara

Comité Tutorial

Director: Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Asesora: Dra. Angelica Román Guerrero

Asesor: Dr. Carlos Omar Castillo Araiza

Jurado

Presidente:

Dr. Sergio Huerta Ochoa _____

Secretario:

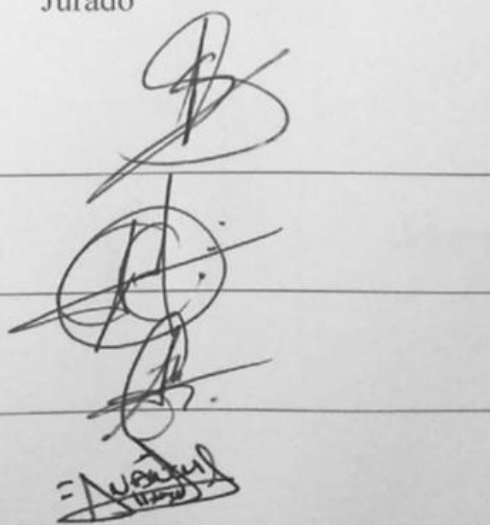
Dr. Carlos Omar Castillo Araiza _____

Vocal:

Dra. Angélica Román Guerrero _____

Vocal:

Dra. Nancy Velasco Álvarez _____



The image shows four handwritten signatures in black ink, each placed over a horizontal line. The signatures are written in a cursive style. The first signature is at the top, followed by the second, third, and fourth signatures below it. The lines are horizontal and extend across the width of the page.

Para Alejandra, Victor y Brayant

No te rindas que la vida es eso,

Continuar el viaje,

Perseguir tus sueños,

Destrabar el tiempo,

Correr los escombros,

Y destapar el cielo.

Mario Benedetti

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

Agradecimientos

Al Dr. Mariano Gutiérrez Rojas: por la oportunidad de formar parte del grupo de investigación de residuos sólidos, pero sobre todo por su confianza, amistad y cariño.

Al Dr. Omar castillo Araiza y a la Dra. Angelica Román Guerreo por enriquecer este trabajo con sus asesorías, experiencia y conocimiento.

A la Dra. Nancy Velasco Álvarez y el Dr. Sergio Huerta Ochoa por la revisión y comentarios realizados a esta tesis.

A mis compañeros de los laboratorios W-103, W-104 y W-108: a Bris, Sinahi, Paulina, Viri y Liz por hacer del trabajo una experiencia inolvidable y alegre, pero sobre todo por su amistad y cariño; a Victor y Pepe por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron el trabajo, a la Dra. Gloria Trejo por su apoyo y amistad.

A Néstor por contribuir con ideas y sugerencias que enriquecieron el trabajo realizado, pero sobre todo por su comprensión, amistad y amor en todo momento.

A mis compañeras de maestría; Monse y Cinthia que junto conmigo comenzaron esta etapa llena de aprendizaje, sobre todo gracias por su amistad.

A mis padres por enseñarme a luchar por mis sueños y a nunca rendirme, pero sobre todo por el inmenso amor que me han regalado y por estar a mi lado en los malos y buenos momentos que la vida me ha dado.

A mi hermano por ser mi inspiración y el motivo de demostrar que los sueños se hacen realidad, por su amor y por las alegrías que me regala día a día.

CONTENIDO

Introducción.....	XV
1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 Hidrocarburos.....	1
1.1.1 Contaminación de suelos por Hidrocarburos	1
1.1.2 Contaminación de suelos por hidrocarburos en México	2
1.2 Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.....	2
1.3 Límites máximos permisibles en México de hidrocarburos.	2
1.4 Disponibilidad y Biodisponibilidad	3
1.5 Fenómeno de sorción.	4
1.5.1 Isoterma de Langmuir	4
1.5.2 Influencia de la sorción de hidrocarburos en la biodisponibilidad	7
1.6 Secuestro de hidrocarburos	7
1.7 Tecnologías de biorremediación que favorecen la biodisponibilidad.....	9
1.7.1 Surfactantes sintéticos	10
1.7.2 Biosurfactantes	10
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
3 HIPÓTESIS	13
4 OBJETIVO GENERAL	13
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	14
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
6.1 Material biológico y medios de cultivo.....	16
6.1.1 Microorganismo	16

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

6.1.2 Medios de cultivo.....	16
6.2 Producción de Biosurfactante.	16
6.2.1 Actividad emulsificante	17
6.3 Hidrocarburos.....	17
6.4 Surfactante sintético.....	17
6.5 Suelo.....	17
6.6 Caracterización del suelo	17
6.6.1 Materia orgánica.....	17
6.6.2 Textura	18
6.6.3 pH.....	18
6.7 Esterilización de los suelos	19
6.7.1 Evaluación de crecimiento microbiano en muestras de suelos	19
6.8 Sorción de una MHC en suelo	20
6.8.1 Cinéticas de sorción de hidrocarburos	20
6.8.2 Isotermas de sorción.....	20
6.9 Extracción de Hidrocarburos de la fase líquida	21
6.10 Extracción de hidrocarburos de la fase sólida.....	21
6.11 Método de cuantificación de hidrocarburos.....	21
6.12 Evaluación del aumento en la biodisponibilidad de la MHC.....	21
6.13 Análisis estadístico.....	22
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
7.1 Caracterización fisicoquímica del suelo	23
7.2 Esterilización del suelo	23
7.3 Estimación de fenómenos de sorción.....	25
7.3.1 Cinética de sorción.....	25

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

7.3.2 Isotermas de sorción.....	28
7.3.2.1 Isoterma multicomponente de Langmuir.	28
7.3.3 Balance de masa.....	31
7.4 Estimación del secuestro de una MHC en suelo natural.....	33
7.5 Biodisponibilidad de una MHC en suelo natural.....	38
8 Conclusiones.....	42
9 Perspectivas.....	43
10 Bibliografía.....	44

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

Índice de figuras.

<i>Figura 1. Estructura química de los hidrocarburos, a) hexadecano b) fenantreno y c) pireno.....</i>	<i>1</i>
<i>Figura 2. Diferencia entre hidrocarburo biodisponible, disponible y secuestrado.....</i>	<i>4</i>
<i>Figura 3. A) Naturaleza anfifílica de los surfactantes, B) Aumento de la biodisponibilidad por efecto del surfactante.</i>	<i>9</i>
<i>Figura 4. Estrategia experimental.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 5. Procedimiento para evaluar la sorción durante la cinética e isoterma de sorción.</i>	<i>20</i>
<i>Figura 6. Crecimiento microbiano en el 1^{er} ciclo de esterilización evaluado en AST y PDA.</i>	<i>24</i>
<i>Figura 7. Crecimiento microbiano en el 2^o ciclo de esterilización evaluado en AST y PDA.</i>	<i>24</i>
<i>Figura 8. Cinética de sorción de HXD (A), PHE (B) y PYR (C). Cantidad de HXD sorbido (●), cantidad de PHE sorbido (◆) y cantidad de PYR sorbido (■) Los puntos representan el valor promedio de tres repeticiones independientes y las barras la DE.....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 9. Isoterma de sorción de HXD (A), PHE (B) y PYR (C) ajustadas con el modelo multicomponente de Langmuir. Cantidad de HXD sorbido (●), cantidad de PHE sorbido (◆) y cantidad de PYR sorbido (■) Los puntos representan el valor promedio de tres repeticiones y DE.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 10. Fracciones que componen la cantidad sorbida de hidrocarburos en suelo.</i>	<i>31</i>
<i>Figura 11. Estimación de secuestro y disponibilidad en tiempo 0h y 12 h de la cinética de sorción. HXD (A), PHE (B) y PYR (C). Secuestro (■), disponible (■) Los puntos representan el valor promedio de tres repeticiones independientes y las barras la DE.</i>	<i>36</i>
<i>Figura 12. Lotes obtenidos del biosurfactante producido por Acinetobacter bouvetii UAM25.</i>	<i>51</i>

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

Índice de Tablas.

Tabla 1. Límites máximos permisibles para HAPs	3
Tabla 2. Límites máximos permisibles para mezcla de hidrocarburos con diferente fracción	3
Tabla 3. Estudios de sorción de HAPs en suelo natural	6
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del suelo, valor promedio y DE.	23
Tabla 5. Parámetros del modelo multicomponente de Langmuir estimados para cada hidrocarburo.....	29
Tabla 6. HCs no sorbido y sorbido tiempo 0 h. Valor promedio y DE.	31
Tabla 7. HCs cuantificables tiempo 0 h. Valor promedio y DE.	32
Tabla 8. Hidrocarburos adicionados para la cinética de sorción. Valor promedio y DE.	32
Tabla 9. HCs secuestrados en el tiempo 0 h. Valor promedio y DE.	32
Tabla 10. HCs sorbidos en el tiempo 0 h. Valor promedio y DE.	33
Tabla 11. Estimación de secuestro y disponibilidad en la saturación.	37
Tabla 12. Evaluación del aumento en la biodisponibilidad de la MHC en suelo natural, cada valor representa el promedio de tres repeticiones y DE.	40
Tabla 13. Actividad emulsificante del biosurfactante producido por <i>Acinetobacter bouvetii</i> UAM25 no esterilizado y esterilizado y DE.....	51

Abreviaturas

HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
COPs	Contaminantes orgánicos persistentes
MHC	Mezcla de hidrocarburos
HXD	Hexadecano
PHE	Fenantreno
PYR	Pireno
FLU	Fluoreno
FLT	Fluoranteno
CMC	Concentración micelar crítica
AE	Actividad emulsificante.
AUC	Aceite usado de cocina
BAL	Biorreactor airlift
DCM	Diclorometano
ACE	Acetona

RESUMEN

La contaminación de suelos por petróleo es un problema de contaminación a nivel mundial debido a que está compuesto de hidrocarburos alifáticos y aromáticos policíclicos reportados con propiedades mutagénicas y carcinogénicas. Se han implementado diversas tecnologías de biorremediación para la recuperación de estos sitios; sin embargo, la eficiencia de estas tecnologías se ve afectada por la disminución en la biodisponibilidad de los contaminantes. La biodisponibilidad es el resultado del proceso de sorción-desorción en el suelo, debido a que una cantidad es secuestrada por el suelo, impidiendo que se les encuentre disponibles y por lo tanto no biodisponibles para el microorganismo u organismo según el caso de la tecnología de biorremediación que se aplique.

En este estudio se evaluó: (i) la sorción de una mezcla de hidrocarburos (MHC) compuesta de un hidrocarburo alifático (HXD) y dos aromáticos (PHE y PYR) en suelo natural; (ii) estimación los fenómenos de sorción involucrados en el secuestro de cada hidrocarburo mediante balances de masa y finalmente; (iii) el posible aumento en la biodisponibilidad utilizando un surfactante sintético y uno biológico. La eficiencia de ambos surfactantes fue comparada. El objetivo del trabajo fue evaluar los fenómenos de sorción que influyen en el secuestro de una MHC en un suelo natural y su efecto sobre la biodisponibilidad.

La sorción de la MHC se evaluó mediante cinéticas de sorción en donde se determinó el tiempo de equilibrio de cada hidrocarburo, en este punto se determinaron 12 h para permitir el equilibrio de los tres hidrocarburos que conforman la mezcla, posteriormente se evaluó la capacidad de sorción en 12 h mediante isothermas de sorción para cada hidrocarburo, como resultado se obtuvo que los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHE y PYR) presentaron una mayor tendencia a la sorción en el suelo estudiado con respecto al hidrocarburo alifático (HXD).

Mediante los balances de masa se demostró que, a partir de la cantidad total sorbida en el suelo, una parte se encuentra disponible (adsorbida por interacciones débiles) la cual podría ser aprovechada por el microorganismo u organismo (biodisponibilidad) según el caso de la tecnología de remediación que se quisiera aplicar y otra se encuentra secuestrada (adsorbida por interacciones fuertes y atrapados en poros), impidiendo que sea biodisponible debido a que resulta no extraíble mediante los métodos fisicoquímicos (extracción asistida por microondas) convencionales.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

Los resultados del balance de masa permitieron estimar el secuestro de los hidrocarburos, encontrando que, en sólo 12 h de contacto, el secuestro de la MHC aumentó significativamente ($p < 0.05$) para los tres hidrocarburos evaluados. Además, se observó que la cantidad secuestrada es mayor que la disponible para HXD y PYR, en contraste con el PHE en donde la cantidad secuestrada fue igual a la disponible. Es importante mencionar que las concentraciones estimadas de hidrocarburos secuestrados rebasan los límites máximos permisibles establecidos en la NOM-138-SEMARNAT_SSA1-2012 para los tres hidrocarburos estudiados.

Por último, debido al secuestro observado se decidió evaluar la utilización de un surfactante sintético (Tween 80) y uno biológico (producido por la cepa *Acinetobacter bouvetii* UAM25) en el posible aumento de la biodisponibilidad.

Se necesitó 15 veces la concentración micelar crítica (225mg/L) de Tween 80 para aumentar la biodisponibilidad de HXD en un 36.59 % y 8.41 % de PYR, en contraste con el PHE, donde ninguna de las concentraciones evaluadas de Tween 80, [5 y 15 veces su CMC] aumentaron su biodisponibilidad.

Bajo las condiciones evaluadas, ninguna de las concentraciones (150 y 225 mg/L) del biosurfactante producido por *Acinetobacter bouvetii* UAM25 fue capaz de aumentar la biodisponibilidad.

La principal aportación de este estudio fue integrar el proceso de sorción, secuestro y biodisponibilidad demostrando que se encuentran íntimamente relacionadas y que son factores que se deben tomar en cuenta en la remediación de sitios contaminados con hidrocarburos.

ABSTRACT

The contamination of soils by oil is a worldwide pollution problem because it is composed of aliphatic hydrocarbons and polycyclic aromatics reported with mutagenic and carcinogenic properties, several bioremediation technologies have been implemented for the recovery of such sites; however, the efficiency of these technologies is affected by the decrease in the bioavailability of the pollutants.

Bioavailability is the result of the sorption-desorption process in the soil because a quantity is sequestered by the soil, preventing them from being available and therefore not bioavailable.

In this study it was proposed: (i) to evaluate the sorption of a mixture of hydrocarbons (MHC) composed by an aliphatic hydrocarbon (HXD) and two aromatics (PHE and PYR); (ii) to assess the sequestration of each one by means of mass balances and finally; (iii) to evaluate the possible increase in the bioavailability using a synthetic surfactant and a biological one. The efficiency of both surfactants was compared. The objective of the work was to evaluate the sorption phenomena that influence the sequestration of an MHC in a natural soil and its effect on bioavailability.

The sorption of the MHC was evaluated by sorption kinetics in which the equilibrium time for each hydrocarbon was reached, at this point 12 h were determined to allow the equilibrium of the three hydrocarbons that make up the mixture, afterwards the sorption capacity was evaluated in 12 h by means of sorption isotherms for each hydrocarbon, as an important result it was obtained that the polycyclic aromatic hydrocarbons (PHE and PYR) had a higher tendency to sorption in the soil studied with respect to the aliphatic hydrocarbon (HXD).

Through mass balances it was observed that from total amount of MHC sorbed in the soil, one part is considered as available and another keep sequestered within the soil matrix, the latter decreases the bioavailability of hydrocarbons because it is not extractable by conventional physicochemical methods (microwave assisted extraction).

The results of the mass balance allowed to estimate the sequestration of the hydrocarbons, finding that in only 12 h of contact, MHC sequestration increased significantly ($p < 0.05$) for the three hydrocarbons evaluated. In addition, it was observed that sequestered amount is greater than that available for HXD and PYR, in contrast in PHE the sequestered amount was

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

equal to that available and the concentrations found in the sequestration exceed the maximum permissible limits established in NOM-138-SEMARNAT_SSA1-2012 for the three hydrocarbons studied.

Finally, due to the observed sequestration, it was decided to evaluate the use of a synthetic surfactant (Tween 80) and a biological one (produced by *Acinetobacter bouvetii*) in the possible increase in bioavailability.

The critical micellar concentration (225mg / L) for Tween 80 was needed up to 15 times to increase the bioavailability of HXD in 36.59%, and 8.41% of PYR, in contrast to the PHE, where none of the evaluated concentrations of Tween 80, [5 and 15 times their CMC] increased their bioavailability.

Under the evaluated conditions none of the concentrations tested (150 and 225 mg / L) of the biosurfactant produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25 was able to increase the bioavailability.

The main contribution of this study was to integrate the process of sorption, sequestration and bioavailability by demonstrating that they are closely related where they are factors that must be taken into account in the remediation of sites contaminated with hydrocarbons.

INTRODUCCIÓN

En México la principal fuente generadora de contaminación por hidrocarburos es la industria petrolera, debido a procesos como extracción, refinación, transporte, distribución, almacenamiento y comercialización, actividades que provocan emisiones a la atmósfera, generación de residuos, además de derrames y fugas. Tan sólo en el 2017 se presentaron 277 eventos de fugas y derrames y se estimaron alrededor de 2,041 hectáreas de sitios contaminados cifra y superficie 30% y 59% superior en comparación con el año anterior.

El petróleo es una mezcla de hidrocarburos alifáticos, aromáticos policíclicos (HAPs) y otros compuestos que son una amenaza para la salud humana y el medioambiente, principalmente los HAPs que han sido reportados como compuestos con propiedades mutagénicas y carcinogénicas. Por lo anterior se han desarrollado tecnologías de biorremediación que involucran el uso de microorganismos u organismos que permitan la eliminación de este tipo de contaminantes, el interés por los estudios de biorremediación de suelo contaminados con HAPs ha ido en aumento, desde el 2010 hasta la fecha se han publicado 708 artículos científicos a nivel mundial.

No obstante, el éxito de las tecnologías de biorremediación depende de la biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo, la cual disminuye durante la sorción debido al secuestro, resultado de interacciones entre hidrocarburo-MO, hidrocarburo-arcilla y la difusión en poros. Una alternativa para aumentar la biodisponibilidad es el uso de surfactantes, moléculas que pueden ser obtenidas mediante síntesis química (surfactantes) y biológica (biosurfactantes).

En los últimos 10 años se han publicado 251 artículos del estudio de sorción de HAPs en suelo, sin embargo, solo 102 involucran la evaluación de biodisponibilidad y ninguno estima el secuestro (ISI Web of Knowledge junio 2018).

Teniendo como motivación fundamental ligar el secuestro como resultado del proceso de sorción y enfatizar el efecto sobre la biodisponibilidad en el presente trabajo se evaluó la sorción de una MHC en suelo natural mediante un método que permitiera la simulación de derrame y la estimación del secuestro. Posteriormente se evaluó el aumento en la biodisponibilidad mediante la aplicación de surfactante sintético y biológico producido por *Acinetobacter bouvetii* UAM 25.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

En el primer capítulo del documento se presenta una revisión bibliográfica que, de manera general, aborda el tema de la contaminación de suelos por hidrocarburos, los límites máximos permisibles que determinan la limpieza de suelos, los conceptos de disponibilidad y biodisponibilidad, el proceso de sorción y el secuestro, así como el uso de surfactantes para el aumento de la biodisponibilidad. En seguida se define el problema a partir del cual se plantea la hipótesis de trabajo y se derivan los objetivos. En el capítulo seis se detallan los materiales y los métodos utilizados para el alcance de los objetivos. En el capítulo siete se presentan y discute los resultados obtenidos. Finalmente, se exponen las conclusiones del trabajo y las recomendaciones de los estudios que faltan por realizar.

1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Hidrocarburos

Son compuestos formados por átomos de carbono e hidrógeno de gran abundancia, en la naturaleza se encuentran presentes principalmente en el petróleo, se pueden clasificar en hidrocarburos alifáticos también conocidos como hidrocarburos saturados constituidos por cadenas de diferentes longitudes, entre los que destaca el hexadecano (HXD) que se ha utilizado como hidrocarburo modelo por su fácil asimilación por microorganismos (Velasco-Alvarez *et al.*, 2011) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), que contienen dos o más anillos de benceno fusionados, estos últimos potencialmente tóxicos, con propiedades mutagénicas y carcinogénicas, clasificados como contaminantes orgánicos persistentes (COPs) debido a sus características de ser poco solubles en agua y resistentes a degradación (química, biológica, física) (Semple, Morriss y Paton, 2003; Ren *et al.*, 2018).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica (EPA, 2008) destaca 16 HAPs identificados como contaminantes prioritarios, lista que posteriormente adoptó la Unión Europea, entre estos se encuentran el fenantreno (PHE) y el pireno (PYR) (Semple, Morriss y Paton, 2003). Las estructuras químicas de estas moléculas se muestran en la Figura 1.

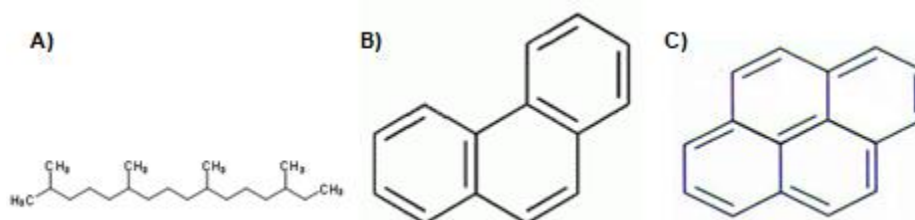


Figura 1. Estructura química de los hidrocarburos, a) hexadecano b) fenantreno y c) pireno.

1.1.1 Contaminación de suelos por Hidrocarburos

El suelo además de ser el soporte donde habitan y crecen plantas, animales y microorganismos, es el espacio donde se realizan las actividades agrícolas y ganaderas (Ortíz Brito, Ize y Gavilán, 2003) que sostienen la vida humana. El suelo se ha convertido en uno de los principales destinos para los hidrocarburos ingresando principalmente por la aplicación deliberada, por derrames y fugas provocando un problema de contaminación a nivel mundial.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

En consecuencia, el destino y el comportamiento de los hidrocarburos en los suelos ha sido objeto de una intensa investigación, con especial interés dirigido a la biodisponibilidad de contaminantes en el suelo (Semple, Morriss y Paton, 2003).

1.1.2 Contaminación de suelos por hidrocarburos en México

La industria petrolera es una de las más antiguas en México, en los estados de Tabasco, Veracruz, Campeche, Chiapas, se concentra la mayor actividad petrolera que provoca un gran movimiento de crudo y sus derivados. Debido a esto, son los más contaminados y en los cuales se han reportado las mayores emergencias ambientales, es importante destacar que el 85% de éstas, están constituidos por derrames.

De acuerdo con un Informe Anual (PEMEX, 2018) durante 2017 se presentaron 277 eventos de fugas y derrames ocasionados por fenómenos de corrosión y los actos vandálicos también se estimaron alrededor de 2,041 hectáreas de sitios contaminados, cifra y superficie 30% y 59%, respectivamente, superior en comparación con el año anterior.

1.2 Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

En la búsqueda de recuperar los suelos contaminados con hidrocarburos se han implementado diversas tecnologías de biorremediación.

Las tecnologías de biorremediación son el uso de organismos vivos (plantas, hongos y bacterias, entre otros) con la capacidad de degradar, transformar o remover los contaminantes del suelo. El éxito de estas tecnologías no sólo depende de las características físicas y químicas del contaminante, sino también de las interacciones complejas que se dan entre el contaminante y el suelo, definiendo así su biodisponibilidad (Volke y Velasco, 2004).

1.3 Límites máximos permisibles en México de hidrocarburos.

Con el objetivo de tener certeza en los resultados de la remediación de sitios contaminados, el Diario Oficial publicó en 2002 la Norma Oficial Mexicana de emergencias “NOM-EM-138-2002” que establece los límites máximos permisibles de contaminación en los suelos afectados por hidrocarburos, misma que fue modificada por última vez en el 2012, resultando la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSAI-2012 que incluye los límites máximos permisibles para HAPs (Tabla 1) y mezclas de hidrocarburos (Tabla 2) clasificadas de la siguiente manera:

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

- Hidrocarburos fracción ligera: mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan entre 5 y 10 átomos de carbono.
- Hidrocarburos fracción media: mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan entre 10 y 28 átomos de carbono.
- Hidrocarburos fracción pesada: mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan entre 28 y 40 átomos de carbono.

Tabla 1. Límites máximos permisibles para HAPs

Tipo de hidrocarburo	Uso de suelo (mg/kg)		
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación.	Residencial y recreativo	Industrial y comercial
HAPs	2-40	2-40	10-100

Tabla 2. Límites máximos permisibles para mezcla de hidrocarburos con diferente fracción

Fracción de hidrocarburos	Uso de suelo (mg/kg)		
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación.	Residencial y recreativo	Industrial y comercial
Ligera	200	200	500
Media	1200	1200	5000
Pesada	3000	3000	6000

1.4 Disponibilidad y Biodisponibilidad

La disponibilidad de los hidrocarburos en el suelo determinará la biodisponibilidad dando un indicio del alcance que podrá tener la tecnología de biorremediación (Reichenberg y Mayer, 2006).

La disponibilidad de un contaminante se define como la cantidad que se encuentra accesible para ser biodegradado, transformado o bioacumulado por el organismo, según sea el caso de la tecnología de biorremediación que se esté aplicando. (Enell *et al.*, 2005; Semple *et al.*, 2007).

La biodisponibilidad se refiere a la cantidad del contaminante disponible que fue capaz de interactuar con el microorganismo para ser biodegradado, transformado o bioacumulado (Semple, Morriss y Paton, 2003; Semple *et al.*, 2007).

Los conceptos antes mencionados suelen confundirse, por lo que en la Figura 2 se ilustra la diferencia entre ambas (An *et al.*, 2017).

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

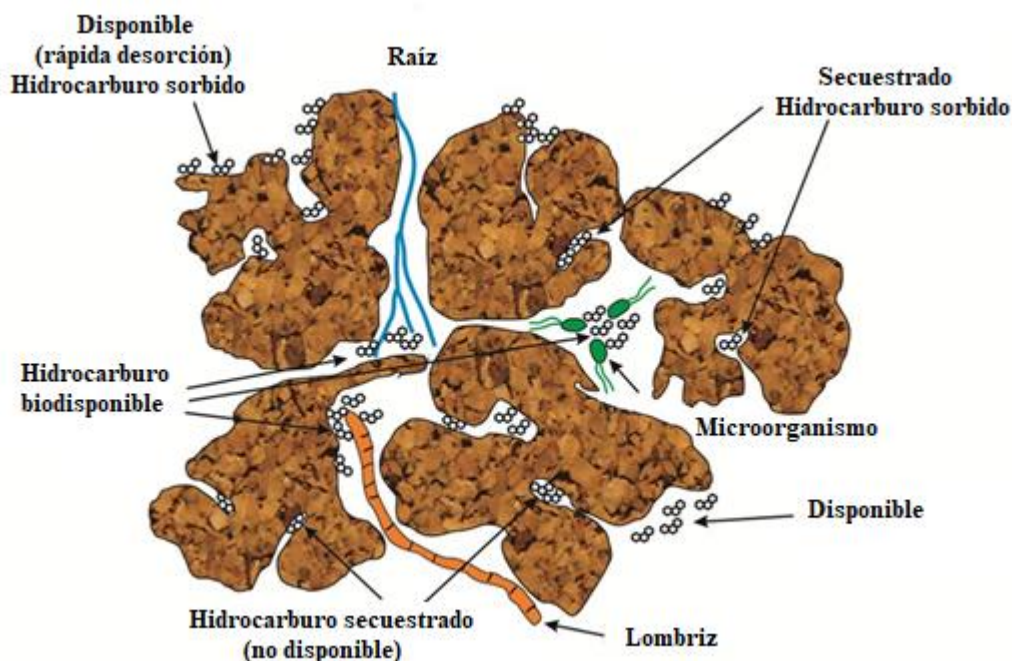


Figura 2. Diferencia entre hidrocarburo biodisponible, disponible y secuestrado.

1.5 Fenómeno de sorción.

La sorción o adsorción es un fenómeno de transferencia de masa en el cual un sólido poroso (sorbente) es capaz de retener moléculas (sorbato) de un fluido en su superficie (externa o interna).

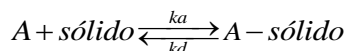
La sorción es difícil de cuantificar debido que comprende muchos mecanismos que actúan al mismo tiempo y con diversas intensidades, que dependen de las propiedades de los compuestos químicos y del tipo de sorbente, por lo que no se tiene una teoría única de este fenómeno y se vuelve un proceso crítico debido a las interacciones entre el contaminante y los diversos componentes del suelo que determinan su disponibilidad permitiendo, de esta manera, estimar su potencial de biodegradación (Semple *et al.*, 2007), una forma de caracterizar el proceso de sorción es mediante cinéticas e isotermas de sorción (Mechlińska *et al.*, 2009) (en el equilibrio termodinámico); para el caso de las isotermas, el modelo más aceptado es el propuesto por Langmuir (1916).

1.5.1 Isoterma de Langmuir

Langmuir fue el primero en proponer una teoría coherente de adsorción sobre una superficie desde un punto de vista cinético, explicando el fenómeno como un continuo “bombardeo” de moléculas sorbiéndose sobre la superficie mientras otras se desorben a la misma velocidad

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

por lo tanto el modelo se deduce a partir de representar las velocidades de adsorción y desorción en el equilibrio de acuerdo con la siguiente ecuación química.



Las velocidades de adsorción (r_a) y desorción (r_d) quedan expresadas de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} r_s &= k_s C_a (q_a^* - q_a) \\ r_d &= k_d q_a \end{aligned} \quad \text{Ec.1}$$

Donde C_a es la concentración de A en la fase fluida, q_a representa la concentración de A adsorbida en el sólido, q_a^* representa la concentración de A adsorbida cuando el sólido alcanza la saturación, k_a y k_d son las constantes cinéticas de adsorción y desorción respectivamente. En el equilibrio las velocidades son de igual magnitud; por lo tanto, al igualar las expresiones de velocidad se obtiene la ecuación 2.

$$q_a = \frac{k_{ea} q_a^* C_a}{1 + k_{ea} C_a} \quad \text{Ec.2}$$

Cuando se tiene dos o más moléculas que compiten por los mismos sitios de sorción, se debe de tomar en cuenta el equilibrio simultaneo de todas las moléculas presentes. En el caso de adsorción competitiva de 3 moléculas al igualar las expresiones de velocidad se obtiene la ecuación 3.

$$q_a = \frac{k_{ea} q_a^* C_a}{1 + k_{ea} C_a + k_{eb} C_b + k_{ec} C_c} \quad \text{Ec.3}$$

Donde la constante de equilibrio del proceso de adsorción-desorción (sorción), se define como

$$k_{ea} = \frac{\overrightarrow{k_s}}{\overleftarrow{k_d}}$$

Se han reportado diversos estudios de sorción mediante isothermas (Tabla. 3). La capacidad de sorción que reportan depende de las propiedades tanto del hidrocarburo como del adsorbente (suelo), la concentración del hidrocarburo en la fase circundante y la temperatura (Mechlińska *et al.*, 2009), sin embargo, la cuantificación de los hidrocarburos se realiza solo en la fase fluida y no el suelo, haciendo a un lado la diferencia entre la cantidad total sorbida, la cantidad disponible y la secuestrada.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

Tabla 3. Estudios de sorción de HAPs en suelo natural

Suelo	Hidrocarburo	Descripción del estudio	Cinética	Tiempo de equilibrio	Modelo de isoterma	Capacidad de sorción	Referencia
Diferentes suelos con contenido de MO desde 0.18 hasta 6.25 % y contenido de arcilla en un rango de 0.5 a 20.6 %.	PYR	10 mL de una solución de PYR (20- 100 µg/L) preparado en 20 % V/V Acetonitrilo/Agua ultrapura millipore, adicionado con CaCl ₂ 0,005 M (electrolito) y NaN ₃ 0,01 M (biocida) se agregaron a viales que contenían 0.5 g de suelo.	Viales con 100 µg/L de PYR se mantuvieron a 100 rpm (25 °C).	Desde 180- 720 min	Langmuir	Rango de 0.9 hasta 2.2 mg/g	(Olu-Owolabi, Diagboya y Adebowale, 2014).
Suelo de Colombia con 3.5 % de MO y 70 % de arcilla	PYR	Se colocaron 4 g de suelo en tubos de vidrio, se adiciono solución de PYR que consistía en 5 mL CaCl ₂ y 200 mg/L de NaN ₃ desde 30 hasta 150 mg/kg.	Los tubos con 100 mg PYR /kg de suelo se mantuvieron 250 horas a 125 rpm (28 °C).	24 horas	Freundlich	0.687 mg/g	(Hwang, Ramirez y Cutright, 2003).
Suelos brasileños Kandiudult (K) con 7.8 % MO y 160 g/Kg de Arcilla y Vertisol (V) 5.6% MO 460 g/Kg de Arcilla.	PYR	Se evaluaron 2.5 y 5 g de cada suelo en matraces Erlenmeyer que contenían 50 mL de solución de PYR que consistía en agua desionizada/metanol (20 % V/V), 0.01 mol/L CaCl ₂ y 0.01 mol/L de NaN ₃ , se evaluaron concentraciones desde 15 - 100 µg/L.	Se mantuvieron 250 rpm 1250 min (25 °C).	80 -640 min en 5 g de suelo y 80 min en 2.5 g de suelo.	Langmuir	0.06 mg/g suelo k	(Teixeira <i>et al.</i> , 2011).
Suelo arcillo limoso 0.378% MO	PHE, PYR, FLU y FLT	Se empacaron columnas de plexiglás con un diámetro interno de 14 cm y una altura de 30 cm con 6500 g de suelo, se inundaron con MHC compuesta de PHE, PYR, FLU y FLT cada uno con una concentración de 100 µg/L y 3 % de metanol.	Se mantuvieron con un flujo de 2000 mL d ⁻¹ durante 34 días FLU (27°C)	34 días	Langmuir	PHE 1.2, PYR 0.085, FLU 0.803 y FLT 0.09 µg/g	(Yang <i>et al.</i> , 2013)
Suelo con 4.5 % MO.	PHE	Viales de vidrio que contenían desde 0.5 g hasta 4 g de suelo con PHE en un rango de 0.16–0.65 mg/kg.	Se mantuvieron 150 min (25 °C)	Sorción inmediata en muestras de suelo mayores a 0.5 g y más de 120 min en 0.5 g de suelo	Freundlich	0.183 mg/g	(Javier Rivas <i>et al.</i> , 2008).

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

1.5.2 Influencia de la sorción de hidrocarburos en la biodisponibilidad

La disponibilidad de los contaminantes disminuye después de ser sorbidos en el suelo, resultando en la disminución de la biodisponibilidad (Ren *et al.*, 2018). El proceso de sorción de los hidrocarburos comprende dos fases: sorción rápida y sorción lenta (Semple, Morriss y Paton, 2003; Semple *et al.*, 2007).

1.-Sorción rápida. Ocurre instantáneamente por el contacto de hidrocarburos con la superficie del suelo y es caracterizada por interacciones débiles entre el contaminante y el suelo (Van der Waals, enlace de hidrógeno), provocando que se les encuentre disponibles y puedan ser extraídos mediante métodos fisicoquímicos de extracción que involucran condiciones extremas.

2.-Sorción lenta. Implica hidrocarburos atrapados mediante interacciones fuertes e hidrocarburos físicamente atrapados en los poros, provocando que sean resistentes a la desorción y por lo tanto persistentes en el suelo, cantidad conocida como secuestrada o no disponible, no extraíble mediante métodos fisicoquímicos que involucran condiciones extremas.

Como resultado del proceso de sorción, la cantidad total de hidrocarburos presentes en el suelo se pueden encontrar disponibles o no disponibles (secuestrados), en la Figura 2 se muestra, gráficamente, las diferencias entre estos conceptos.

1.6 Secuestro de hidrocarburos

El fenómeno de secuestro de los hidrocarburos, como contaminantes del suelo, no sólo está relacionado con la característica del contaminante sino también está estrechamente relacionado con la composición del suelo (Alexander, 2001).

Se han planteado diversas hipótesis que pretenden explicar el secuestro de hidrocarburos en suelos, a continuación, se detallan las más importantes (Semple, Morriss y Paton, 2003):

1-. Sorción de hidrocarburos por la materia orgánica natural del suelo.

La materia orgánica presente en el suelo se encuentra formando estructuras amorfas ó cristalinas, se cree que estas últimas contienen cavidades rígidas en donde los hidrocarburos pueden interaccionar quedando atrapados.

Se ha demostrado que el secuestro está íntimamente ligado al contenido de MO (materia orgánica) presente en el suelo (Alexander, 2001; Rivas, 2006; Ren *et al.*, 2018). Olu-

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

Owolabi, Diagboya y Adebawale (2014), evaluaron la sorción de PYR en suelos tropicales encontrando mayor sorción en aquellos con mayor cantidad de MO; sin embargo, la sorción no fue proporcional a la cantidad presente.

Ren *et al.* (2018) menciona que no sólo la cantidad de MO influye sino también las características estructurales (aromaticidad y alifaticidad), polaridad y conformación física (condensada y homorfa).

2.- Sorción de hidrocarburos por las arcillas presentes en el suelo.

Hwang, Ramirez y Cutright (2003), evaluaron sorción y desorción de PYR en tres tipos de suelo con diferente contenido de arcilla, encontrando mayor sorción en el que contenía mayor cantidad de arcilla, resultados similares a los reportados por Cui *et al.* (2011) en la evaluación de la sorción de PYR en dos sedimentos. Sin embargo, se ha reportado que no sólo la cantidad de arcilla se relaciona con la sorción, sino que también depende del tipo de arcilla que contenga.

En el suelo se pueden encontrar diferentes tipos de arcilla como; caolinita, illita, mormolinollita, entre otras; las cuales difieren entre sí, por su estructura. Se sabe que las arcillas como la mormolinollita se expanden al humedecerse. La expansión expone una gran área de superficie interna para la adsorción, que excede en gran medida el área de superficie externa.

Contreras (2003), reportó la sorción de PHE en diferentes arcillas entre estas; caolinita, illita, mormolinollita, donde esta última presentó la mayor capacidad de sorción al resto de las arcillas.

3.- Sorción de hidrocarburos atrapados dentro de los poros (Rivas, 2006).

Los suelos se componen de diversas partículas de diferente tamaño de poro que van desde microporos (<0.002 mm) en arcilla hasta macroporos en arena (>0.05 mm). Se ha demostrado en diversos estudios que la desorción de contaminantes orgánicos persistentes (COPs) sorbidos en partículas que presentan microporos es más lenta en comparación con aquellas que contienen macroporos. Lo anterior puede deberse a que la transferencia de masa en los microporos se encuentra obstaculizada por la baja difusión, además de que los poros podrían no ser uniformes y de forma irregular, lo que puede complicar aún más la desorción de las moléculas sorbidas en los microporos (Cheng, Hu y Hu, 2012).

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

Considerando que el suelo es una integración compleja de MO, arcilla y diversos tamaños de poro que interactúan formando agregados los tres mecanismos pueden estar presentes en el secuestro de hidrocarburos resultando complicada su estimación.

1.7 Tecnologías de biorremediación que favorecen la biodisponibilidad

Debido a la disminución de la biodisponibilidad en los suelos provocada por el secuestro, se han realizado esfuerzos enfocados en tecnologías de remediación que favorezcan la biodisponibilidad, entre las más destacadas se encuentra el uso de surfactantes.

Los surfactantes son moléculas de naturaleza anfifílica, que contienen porciones hidrofílicas e hidrofóbicas (Figura 3 A), se acumulan en las interfases líquido-líquido, gas-líquido o sólido-líquido y son capaces de reducir la tensión superficial.

El efecto más importante del surfactante es la estimulación del transporte de masa del contaminante desde el suelo hasta la fase acuosa, aumentando la disponibilidad y por consiguiente las tasas de degradación (Makkar y Rockne, 2003; Ivshina *et al.*, 2016).

El mecanismo con que aumentan la disponibilidad es la siguiente: la porción hidrofóbica interactúa con el hidrocarburo presente en suelo y la porción hidrofílica con la fase acuosa formando una micela, la acumulación de monómeros permite transportar a los hidrocarburos a la fase acuosa en forma de estructuras micelares, resultando en el aumento de la disponibilidad y por tanto el aumento en la biodisponibilidad como se ilustra en la Figura 3 B). Los surfactantes pueden ser obtenidos mediante síntesis química (sintéticos) o por métodos biológicos (biosurfactantes), estos últimos presentan ventajas con respecto a los sintéticos como se describe a continuación.

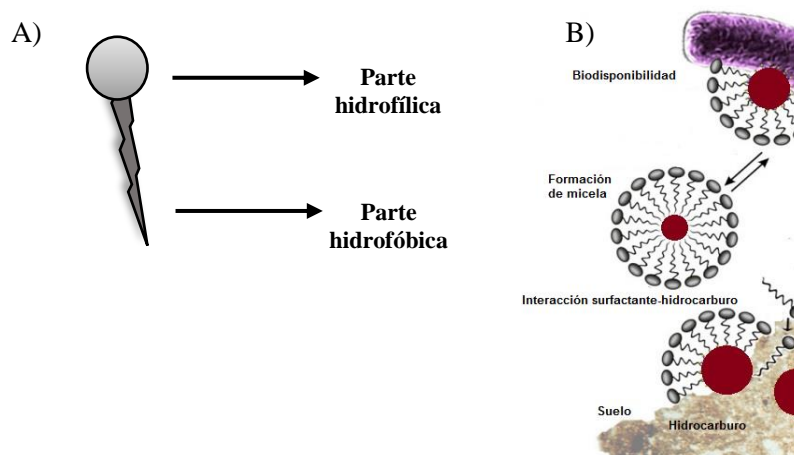


Figura 3. A) Naturaleza anfifílica de los surfactantes, B) Aumento de la biodisponibilidad por efecto del surfactante.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

1.7.1 Surfactantes sintéticos

La mayoría de los surfactantes sintéticos se derivan del petróleo y se sintetizan químicamente, se clasifican normalmente de acuerdo con la carga que lleva su grupo de cabeza hidrofílica, en surfactantes aniónicos, surfactantes no iónicos y surfactantes catiónicos.

El Tween 80 (Monooleato de Sorbitán Polioxietilénico 80) es un surfactante no iónico, con una CMC de 15 mg/L, se degrada fácilmente por microorganismos (Pinto y Moore, 2000; Zheng y Obbard, 2001) y se ha demostrado que libera de manera eficiente tanto el combustible diésel (Peters, Montemagno y Shem, 1992) como el PHE en sedimentos (Ick Yeom *et al.*, 1995).

1.7.2 Biosurfactantes

Los biosurfactantes tienen la capacidad de pseudosolubilizar los hidrocarburos, tienen varias ventajas adicionales sobre los surfactantes sintéticos que los hacen candidatos superiores en los esquemas de biorremediación como mayor biodegradabilidad, menor toxicidad, estabilidad en amplios intervalos de temperatura y pH, producción potencialmente menos costosa y se pueden obtener *in situ* en los sitios contaminados a partir de materias primas de bajo costo (Makkar y Rockne, 2003; Ivshina *et al.*, 2016; Ortega *et al.*, 2018).

Se han reportado diferentes tipos de biosurfactantes producidos por microorganismos que son capaces de reducir la tensión superficial del agua (de 72 a 30 mN m⁻¹) con los que se observa una baja CMC, se han caracterizado como ramnolípidos (*Pseudomonas aeruginosa*), soforolípidos (*Candida apícola*), surfactina (*Bacillus subtilis*) y tetraéster de trehalosa (*Rhodococcus erythropolis*), entre otros. El mecanismo que les permite aumentar la biodisponibilidad es a través de la formación de estructuras micelares que pueden ser liberadas en la solución y posteriormente, tomados o directamente sorbidos por el microorganismo (Figura 3B). Se han reportado otro tipo de biosurfactantes poliméricos con grupos hidrofóbicos distribuidos por toda la molécula como el Alasan (*Acinetobacter radioresistens* KA 53), Emulsan (*Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1) y Biodispersan (*Acinetobacter calcoaceticus* A2), entre otros; pueden potenciar la biodegradación de hidrocarburos mediante mecanismos distintos a la solubilización de micelas.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La contaminación de suelos por hidrocarburos es un problema a nivel mundial. El creciente interés por la limpieza de sitios contaminados ha estimulado la implementación de diversas tecnologías de biorremediación que incluyen el uso de organismos macro o microscópicos como agentes transformadores de la contaminación, la disminución de la biodisponibilidad de los contaminantes provoca que estas tecnologías no tengan el éxito esperado.

La eficiencia de las tecnologías de biorremediación no sólo depende del organismo empleado, sino también de las características del contaminante y de las propiedades del suelo que definen la disponibilidad y secuestro de los contaminantes en el suelo.

El secuestro de los hidrocarburos es resultado de diversas interacciones entre el hidrocarburo-suelo durante la sorción provocando la disminución y hasta la anulación de la biodisponibilidad. El uso de surfactantes químicos y biológicos es una alternativa para favorecer la biodisponibilidad. La magnitud del secuestro y de la biodisponibilidad de los hidrocarburos en el suelo dependen de los fenómenos de sorción por lo que se deben de evaluar y tomar en cuenta para la recuperación de sitios contaminados. Sin embargo, hasta el momento los estudios sobre sorción de hidrocarburos no evalúan el secuestro, dejado a un lado la estimación de los fenómenos de sorción involucrados. No evaluar el secuestro de hidrocarburos subestima la cantidad total de hidrocarburos sorbidos y, por lo tanto, la concentración de hidrocarburos en el suelo podría estar por encima de los límites máximos permisibles en la NOM-138-SEMARNAT/SSAI-2012. Por el contrario, la estimación de los fenómenos de sorción permite cuantificar el secuestro y la biodisponibilidad de los hidrocarburos.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

Por lo anterior en este estudio se pretende evaluar los fenómenos sorción de una MHC compuesta por HXD, PHE y PYR en suelo natural, mediante un método que permita estimar el secuestro. Además de evaluar, mediante un surfactante sintético (Tween 80) y uno biológico (producido por *Acinetobacter bouvetii* UAM25), la posible desorción como medida del aumento de la disponibilidad, favoreciendo de esta manera la biodisponibilidad de la mezcla de hidrocarburos.

3 HIPÓTESIS

Los fenómenos de sorción determinan el secuestro y la biodisponibilidad de una mezcla de hidrocarburos en suelo natural.

4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los fenómenos de sorción de una mezcla de hidrocarburos en suelo natural que influyen en el secuestro y su efecto sobre la biodisponibilidad.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una caracterización fisicoquímica del suelo a utilizar en el estudio.
- Evaluar la capacidad de sorción de una mezcla de hidrocarburos en suelo natural mediante isotermas de sorción.
- Estimar los fenómenos de sorción de una mezcla de hidrocarburos mediante un balance de masa.
- Estimar el aumento de la biodisponibilidad de la mezcla de hidrocarburos en condiciones de saturación mediante un surfactante sintético y uno biológico.

5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

La estrategia experimental consistió en dos etapas.

1. Evaluación de los fenómenos de sorción de una MHC mediante cinéticas de sorción con la finalidad de obtener el tiempo de equilibrio entre hidrocarburo-suelo. El tiempo de equilibrio se utilizó para realizar isotermas de sorción de cada hidrocarburo. Las isotermas de sorción se ajustaron al modelo multicomponente de Langmuir para estimar la capacidad de sorción de cada hidrocarburo. Balances de masa se realizaron en cada punto de las cinéticas y de las isotermas de sorción para estimar la cantidad sorbida, disponible y secuestrada de los hidrocarburos.
2. Evaluación del aumento en la biodisponibilidad de la MHC en el suelo natural por medio de surfactantes (sintético y biológico).

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

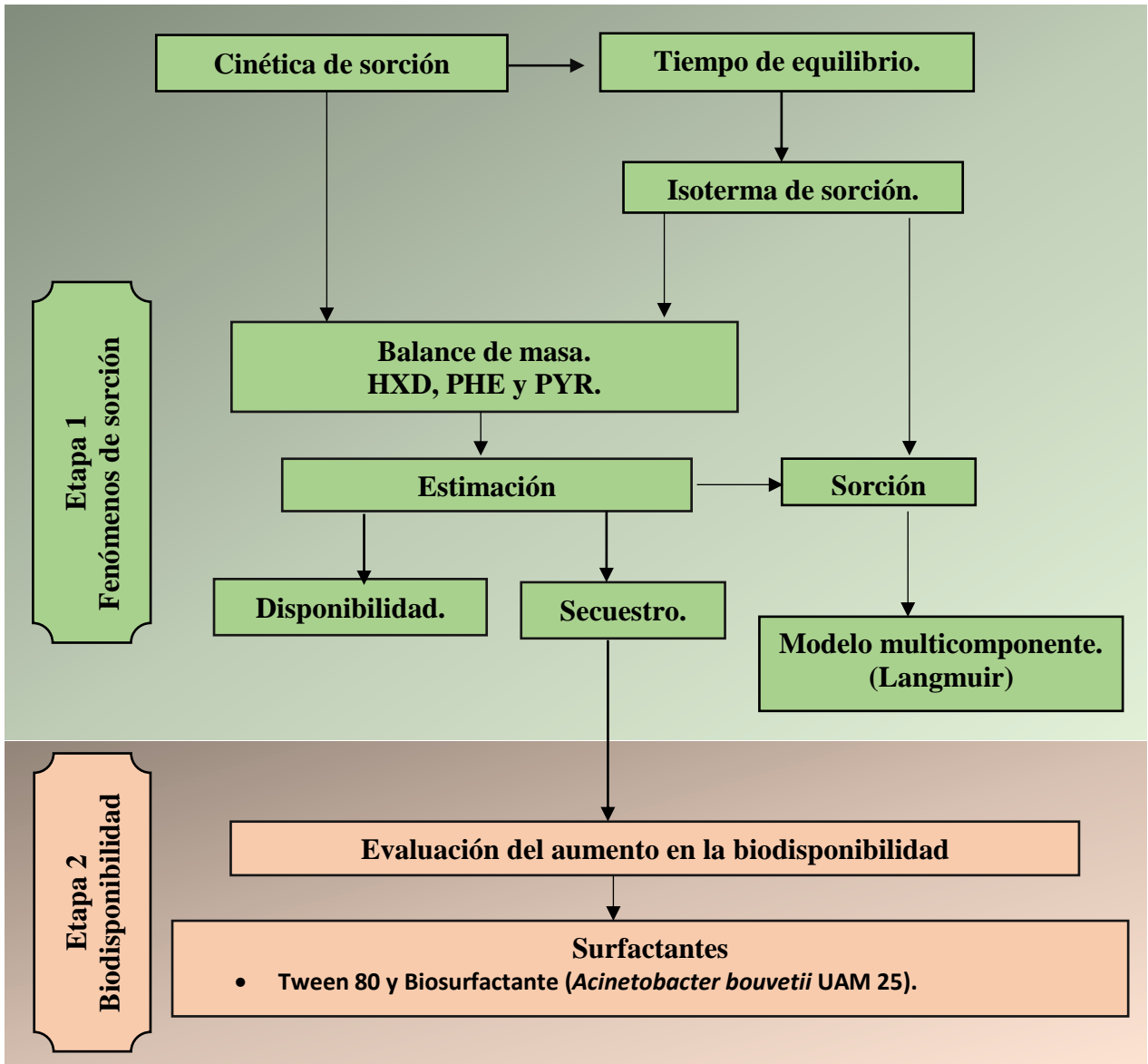


Figura 4. Estrategia experimental.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico y medios de cultivo.

6.1.1 Microorganismo

Se utilizó la bacteria *Acinetobacter bouvetii* (cepa UAM25). La cepa fue aislada de la rizósfera de *Cyperus laxus* LAM, una planta nativa de pantanos contaminados con petróleo en Veracruz, México (Díaz-Ramírez *et al.*, 2003). *A. bouvetii* fue identificada mediante un análisis del gen 16s RNAr (Tzintzun-Camacho *et al.*, 2012).

6.1.2 Medios de cultivo

La preservación y propagación de la cepa se realizó con agar soya tripticaseina (TSA, Bioxon). Para la producción del biosurfactante se utilizó medio mineral (MM) con la siguiente composición (g L^{-1}): 0.675 de NaNO_3 (J. T. Baker, 99.9%), 0.215 de K_2HPO_4 (J. T. Baker, 99.9%), 0.113 de KCl (J. T. Baker, 99.9%) y 0.11 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (J. T. Baker, 100.1%), el MM se ajustó a un pH inicial de 6.0 con HCl 1.0 M (Ortega *et al.*, 2018).

6.2 Producción de Biosurfactante.

La producción de biosurfactante a partir de aceite usado de cocina (AUC), como única fuente de carbono y energía, se realizó en un biorreactor airlift (BAL) por duplicado, integrado por una columna de vidrio de 2 L, con un diámetro externo de 0.077 m y un diámetro interno de 0.072 m, un tubo concéntrico de vidrio con diámetro interno de 0.033 m y altura de 0.204 m. Se utilizó un distribuidor de aire construido de acero inoxidable en forma de “L” (0.006 m de diámetro interno) con 7 perforaciones (0.001 m de diámetro y 0.004 m de separación) (Lizardi-Jiménez y Gutiérrez-Rojas, 2011).

El BAL fue operado a la velocidad superficial de gas (U_g): 0.6 cm s^{-1} durante 48 h a 30°C , con un volumen de operación de 1 L, con MM, una concentración inicial de AUC de 7.11 g L^{-1} inoculado con $1.0 \times 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ de *A. bouvetii* UAM25 (Ortega *et al.*, 2018). Anexo B. Una vez obtenido el biosurfactante se centrifugó para obtener el sobrenadante libre de células (18 500 g, 4°C , 20 min), se esterilizó y se cuantificó la actividad emulsificante como una medida indirecta de la producción. El biosurfactante esterilizado se almacenó en tubos de vidrio de 50 mL a 4°C .

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

6.2.1 Actividad emulsificante

La actividad emulsificante (AE) se determinó al sobrenadante libre de células sin esterilizar y después de ser esterilizado. Se determinó con 0.4 mL del sobrenadante, según el caso, a los que se agregaron 2.6 mL de Tris-HCl (20 mM, pH 7) con MgSO₄ (10 mM), enseguida se agregó 40 µL de mezcla n-hexadecano: 2-metilnaftaleno 1:1 (v:v) (Sar y Rosenberg, 1983). Por último, se agitó 2 min y se leyó la densidad óptica a los 3 min a 600 nm. Una absorbancia de 0.1 unidades a 600 nm multiplicada por el factor de dilución fue considerada como una unidad emulsificante por mL (UE mL⁻¹), anexo B.

6.3 Hidrocarburos

Los hidrocarburos utilizados fueron HXD, PHE con una pureza mayor al 96% y PYR con una pureza mayor al 98%. Todos los reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich.

Se trabajó con una mezcla compuesta por los tres hidrocarburos antes mencionados en una proporción de (100:1:1).

6.4 Surfactante sintético.

Se utilizó Tween 80 (Monooleato de Sorbitán Polioxietilénico 80) como surfactante sintético obtenido en Sigma-Aldrich

6.5 Suelo.

El suelo para los ensayos se obtuvo en un sitio de la Presa “El Pedernalillo” ubicada en el ejido La Zacatecana en el municipio de Guadalupe, en el estado de Zacatecas (22°44'23.5" N, 102°27'28.4" W). Se transportó al laboratorio, se secó a temperatura ambiente y se tamizó a un tamaño de partícula homogéneo de 2 mm.

6.6 Caracterización del suelo

6.6.1 Materia orgánica

Se utilizó la técnica de (Wlakey, 1947), que determina el carbono orgánico mediante combustión utilizando como oxidante dicromato de potasio. Se pesó 1 g de suelo y se tamizó en una malla número 100 (apertura 159 µm), se pasó a un matraz en donde se agregó 10 mL de dicromato de potasio 1N, se agitó para homogenizar y se agregaron 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, la mezcla se agitó suavemente y se dejó en reposo durante 10 min. Se

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

agregaron 100 mL de agua destilada, 10 mL de ácido fosfórico y 3 gotas del indicador difenilamina. Una vez terminados los pasos anteriores, se procedió a titular la muestra con una solución de sulfato ferroso 0.5 N, la titulación se consideró completa cuando la muestra adquirió una coloración verde brillante traslúcida.

6.6.2 Textura

La textura del suelo se midió mediante hidrómetro de Bouyoucos (Bouyoucos, 1962), se pesaron 55 g de suelo previamente secado y tamizado, se colocaron en un vaso de precipitado y se agregaron 20 mL de peróxido de hidrógeno al 8% v/v, se secó a baño maría, una vez secado se pesaron 50 g y se pasaron a un vaso de batidora, se agregaron 10 mL de hexametáfosfato de sodio 5% p/v y 10 mL de oxalato de sodio 5% p/v, se agregó agua destilada y se agitó durante 10 min, se vació el contenido en una probeta de 1 L se aforó y se agitó durante 1 min con una varilla para que las partículas del suelo quedaran distribuidas homogéneamente, se tomó la lectura después de 40 s y 2 h después. Posteriormente se determinó el contenido de arcilla, limo y arena con las ecuaciones 4, 5, 6 y 7, por último, se determinó la textura del suelo mediante el triángulo de textura (USDA).

$$\% \text{ de limo y arcilla} = \frac{\text{Densidad a los 40 s}}{\text{peso de la muestra de suelo}} \times 100 \quad \text{EC. 4}$$

$$\% \text{ de Arcilla} = (\text{Densidad a las 2 h}) / (\text{peso de la muestra de suelo}) \times 100 \quad \text{EC.5}$$

$$\% \text{ de Arena} = 100 - \% \text{ de limo y arcilla} \quad \text{EC. 6}$$

$$\% \text{ deLimo} = \% \text{limo y arcilla} - \% \text{ de arcilla} \quad \text{EC.7}$$

6.6.3 pH

Se pesaron 10 g de suelo por triplicado, se colocaron vasos de precipitado y se agregaron 25 mL de agua destilada, se agitaron durante 30 min y se midió el pH con un potenciómetro.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

6.7 Esterilización de los suelos

Se esterilizaron 300 g de cada muestra de suelo en matraces de 2 L a 15 lb in^{-2} durante 30 min a $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$, posteriormente se evaluó el crecimiento de microorganismos. El ciclo de esterilización se repitió hasta observar ausencia del crecimiento de microorganismos. El suelo estéril se almacenó en botellas Wheaton de 1 L.

6.7.1 Evaluación de crecimiento microbiano en muestras de suelos

Después de cada esterilización se evaluó si había crecimiento de bacterias en medio agar-soya-tripticaseína (AST) y hongos en medio agar papa-dextrosa (PDA).

Para lo anterior se colocó 1 g de suelo estéril en un tubo de cultivo con 10 mL de solución salina isotónica (NaCl, 0.9%) estéril, se agitó vigorosamente en un vórtex durante 1 min y se colocaron 100 μL en cada caja, por duplicado. Las cajas se incubaron a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 h para hongos y por 48 h para bacterias.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

6.8 Sorción de una MHC en suelo

6.8.1 Cinéticas de sorción de hidrocarburos

Se utilizaron tubos de vidrio de 15 mL, se adicionaron 100 mg de suelo seco estéril y se inundó con 60 μ L de mezcla de hidrocarburos (422.71 ± 0.12 de HXD/g de suelo, 4.2 ± 0.09 mg de PHE/g de suelo y 3.62 ± 0.03 mg de PYR/g de suelo) se mantuvieron sin agitación a temperatura constante (30°C) y se muestreó a las 0, 1, 2, 6, 12, 24 y 48 h.

En cada muestreo se agregó 1 mL de hexano, para remover los hidrocarburos en exceso y 3 mL de agua, se separó la fase líquida de la fase sólida para cuantificar los hidrocarburos en ambas fases mediante extracción líquido-líquido y sólido-líquido (Figura 5).

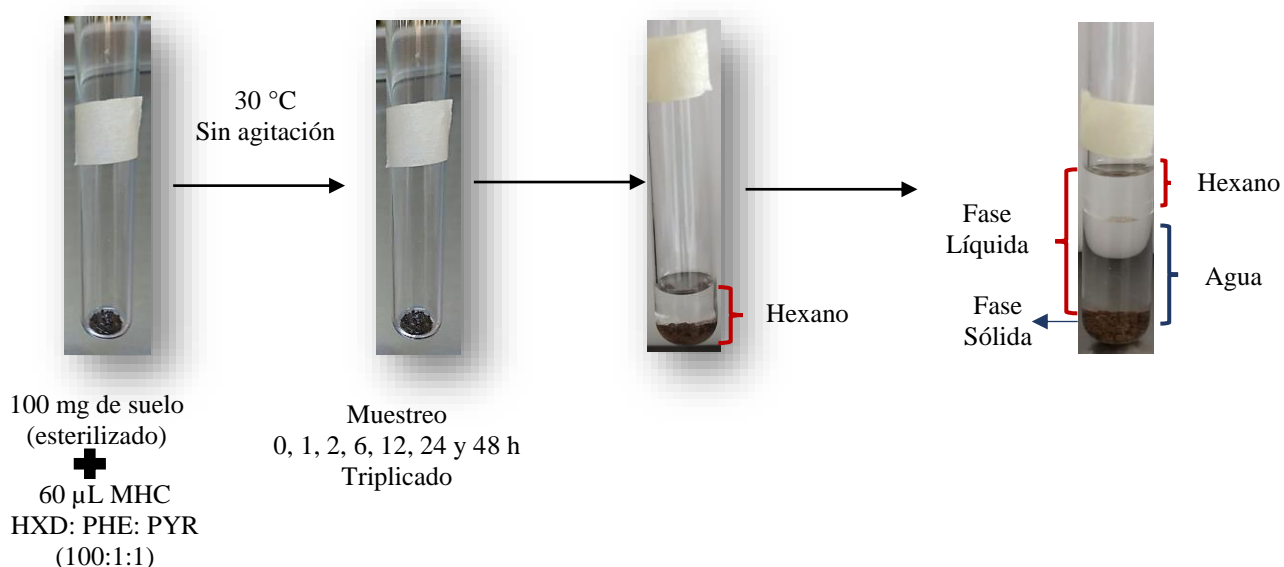


Figura 5. Procedimiento para evaluar la sorción durante la cinética e isoterma de sorción.

6.8.2 Isotermas de sorción

En tubos de vidrio de 15 mL se agregaron 100 mg de suelo y se adicionaron diferentes cantidades de la MHC (5, 15, 30, 45, 60 y 80 μ L) se dejaron sin agitación a 30°C durante el tiempo de equilibrio determinado en la cinética de sorción y se realizó el mismo protocolo de separación de fases que en la cinética de sorción (Figura 5).

Los resultados se analizaron por medio de regresión no lineal para estimar los parámetros cinéticos del modelo multicomponente de Langmuir y de esta manera comparar cuantitativamente la capacidad de sorción para cada hidrocarburo.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

6.9 Extracción de Hidrocarburos de la fase líquida

Para la cuantificación de los hidrocarburos en la fase líquida, se realizó una extracción líquido-líquido. Se separó la fase líquida mediante una pipeta y se pasó a un embudo de separación donde se agregaron 20 mL de una mezcla hexano-acetona (1:1), se agitó y se dejó en reposo durante 30 min, finalmente se separó la fase orgánica de la acuosa y se cuantificó la concentración de HXD, PHE y PYR en la fase orgánica por cromatografía de gases.

6.10 Extracción de hidrocarburos de la fase sólida

Una vez separada la fase líquida, la fase sólida se secó durante 48°C a 60 °C, posteriormente se realizó una extracción líquido-sólido mediante una extracción con solvente asistida por microondas (CEM, Mars Xpress) a 1600 W de potencia al 60%, 30 mL de la mezcla de solventes diclorometano (DCM) y acetona (ACE) (1:1) a 150 °C con una presión de 175 psi durante 30 min. Posterior a la extracción, las muestras se concentraron en un rotavapor (Büchi V-800) para su posterior cuantificación.

6.11 Método de cuantificación de hidrocarburos

La cuantificación de los hidrocarburos se realizó en un cromatógrafo de gases VARIAN 3900 con auto inyector (CP-8410). Se utilizó una columna capilar AT-1HT (15 m × 0.25 mm × 0.1 µm) y helio como gas acarreador, con un flujo de 2 mL min⁻¹. Alícuotas de 2 µL de las muestras fueron inyectadas en modo split. La temperatura del inyector y del detector fue de 300 °C, la temperatura del horno inicial fue 100 °C (2 min) y se aumentó 20 °C por minuto hasta los 200 °C (1 min). El tiempo de análisis fue de 8 min.

6.12 Evaluación del aumento en la biodisponibilidad de la MHC

Para evaluar el aumento en la biodisponibilidad de la MHC mediante surfactante sintético y biosurfactante (Tween 80 y *Acinetobacter bouvetii*). Se utilizaron tubos de vidrio de 15 mL con 100 mg de suelo contaminado a una concentración de saturación (determinada mediante la isoterma de sorción), se adicionó Tween 80 y biosurfactante estéril, los tubos se mantuvieron 72 h a 200 rpm a 30 °C, después de las 72 h se centrifugó (10 000 g, 20 min, 25 °C) y se decantó la fase acuosa para la cuantificación de los hidrocarburos removidos.

Se evaluaron dos concentraciones de Tween 80, 5 y 15 veces su CMC (150 mg/L y 225 mg/L), para el biosurfactante producido por *Acinetobacter bouvetii*; se evaluó la

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

concentración obtenida en un lote (225 mg/L) (Ortega *et al.*, 2018) y 150 mg/L, se corrieron blancos que consistían en agua destilada, cada experimento se realizó por triplicado.

6.13 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc, 2011). Se realizaron un análisis de varianza (ANOVA), prueba Tukey y prueba t con α igual a 0.05 (n=3).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización fisicoquímica del suelo

Diversos factores relacionados directamente con las características de suelo interfieren en la disponibilidad y secuestro los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), principalmente el contenido la materia orgánica y el contenido de arcilla (Hwang, Ramirez and Cutright, 2003; Ren *et al.*, 2018; Xiaoya Ren 2017). En la Tabla 4 se muestra las propiedades fisicoquímicas determinadas en el suelo utilizado en este estudio.

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del suelo, valor promedio y DE.

Partículas (%)			Textura	MO (%)	pH
Arcilla	Limo	Arena			
23.4	25.8	50.8	Franco	2.95 ± 0.63	6.7 ± 0.02

El suelo caracterizado para este estudio es de textura franco, rico en materia orgánica (2.95%), contiene 23.4% de arcilla, es ligeramente ácido y tamaño de poro que van desde microporos (<0.002 mm) en arcilla (Cheng, Hu y Hu, 2012) hasta macroporos en arena (>0.05 mm).

7.2 Esterilización del suelo

Con el objetivo de evaluar la sorción de la MHC en el suelo, se esterilizó para evitar interferencia de una posible degradación por los microorganismos nativos durante la fase experimental de este trabajo.

La eliminación de los microorganismos nativos se realizó mediante ciclos de esterilización consecutivos de 30 min (15 lb y 121 °C). Para poder determinar a partir de cuantos ciclos de esterilización ya no había presencia de microorganismos se evaluó el crecimiento de bacterias (AST) y de hongos (PDA). Figura 6 y 7. A partir de estos resultados se concluyó que se necesitan dos ciclos de esterilización para los posteriores experimentos.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

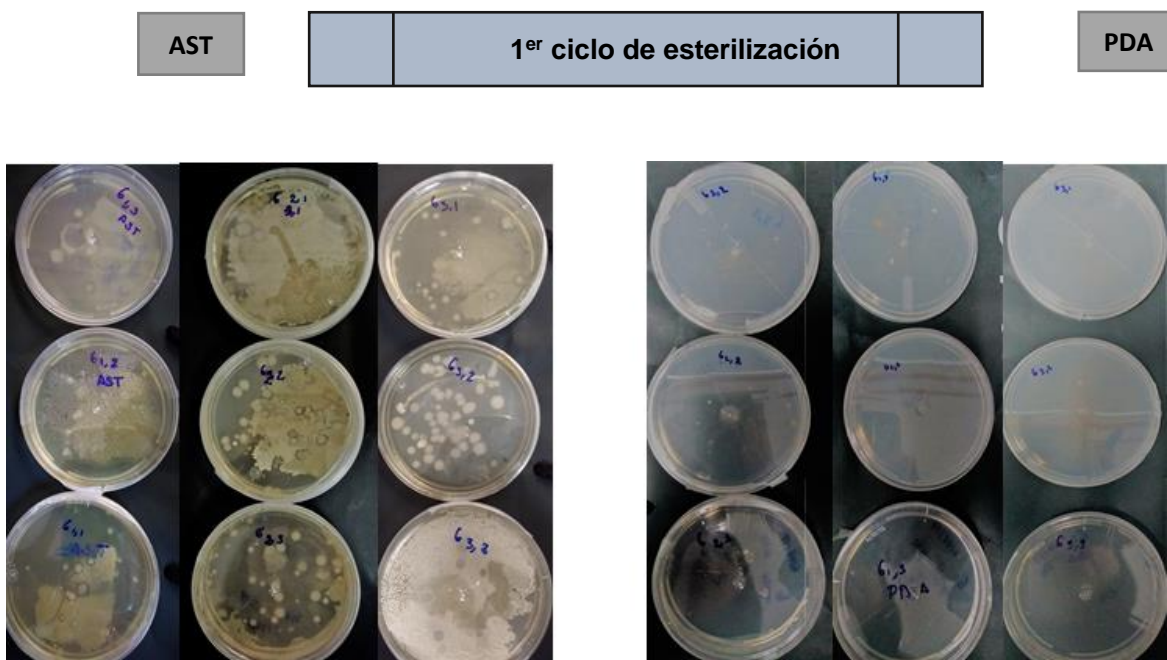


Figura 6. Crecimiento microbiano en el 1^{er} ciclo de esterilización evaluado en AST y PDA.

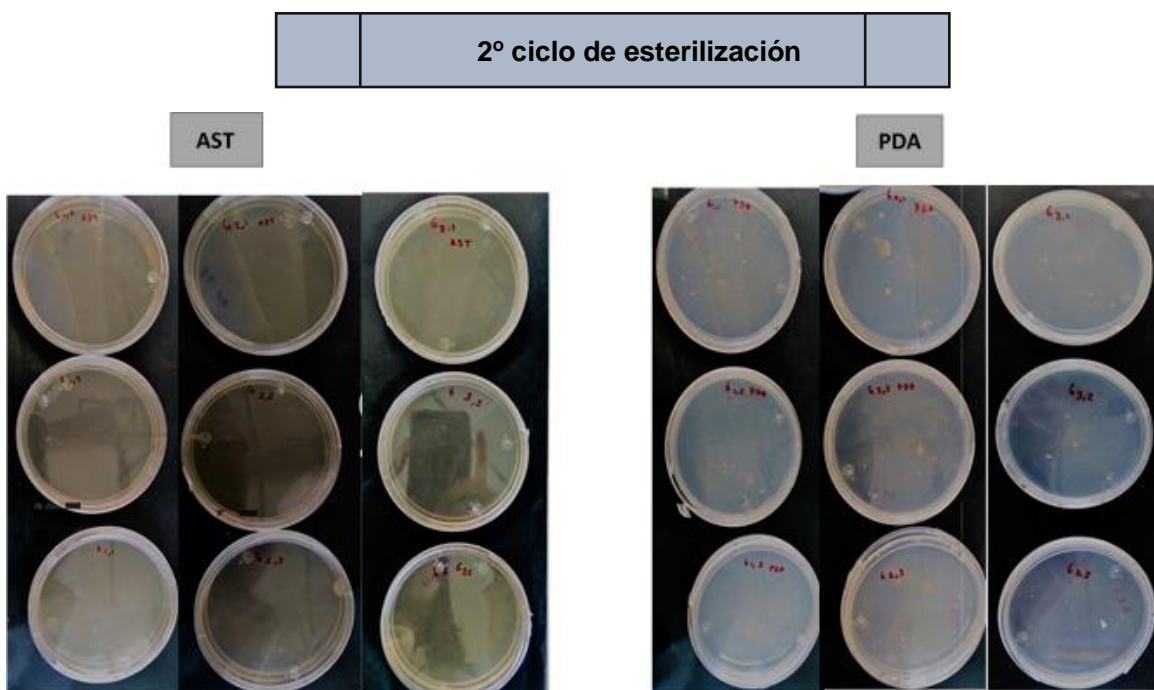


Figura 7. Crecimiento microbiano en el 2^o ciclo de esterilización evaluado en AST y PDA.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

7.3 Estimación de fenómenos de sorción

La estimación de fenómenos de sorción de la MHC en el suelo se realizó mediante un estudio cinético de sorción con la finalidad de determinar el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio termodinámico, que posteriormente se utilizó para la elaboración de las isotermas de sorción. En ambos experimentos se estimó la cantidad sorbida, disponible y secuestrada mediante un balance de masa.

7.3.1 Cinética de sorción

Las cinéticas de sorción para cada hidrocarburo que formaron la mezcla se muestran en la Figura 8. Las tendencias de las cinéticas de sorción sugirieron una sorción inmediata de HXD, PHE y PYR en el tiempo 0h, como resultado del contacto directo entre hidrocarburos y suelo, seguida de un periodo inicial rápido de sorción para los tres hidrocarburos, debido a que los sitios de sorción presentes en el suelo se encuentran todos accesibles, aunado al hecho de que se tiene un mayor gradiente de concentración entre la fase orgánica y la matriz del suelo. Este periodo se observó de 0-1 h para HXD, 0-2 h en el caso de PHE y PYR, seguida de una segunda etapa en donde la rapidez de sorción se ve afectada por la disminución de sitios de sorción. Para HXD se observó de 1-6 h, para PHE de 2-6 h y PYR de 2-12 h y finalmente una tercera etapa en la cual se alcanza el equilibrio, 6, 6 y 12 h para HXD, PHE y PYR respectivamente. El comportamiento anterior, se puede explicar suponiendo que una porción se adsorbe rápidamente al suelo a través de interacciones débiles, mientras que las fracciones restantes tardan más tiempo en adsorberse y alcanzar el equilibrio de sorción debido a la difusión en poros, interacciones con la materia orgánica y arcillas (Semple *et al.*, 2007).

Para determinar el tiempo de equilibrio para cada hidrocarburo se realizó un análisis de varianza (ANOVA), los resultados fueron los siguientes: el HXD sorbido fue de 46.28 ± 8.18 mg g⁻¹ de suelo en 1 h, 10.94% respecto al inicial, después de este tiempo no varió significativamente ($p < 0.05$). Por lo anterior, se estimó que el tiempo en el que el HXD llegó al equilibrio y saturó el suelo fue de 1 h, Figura 8 (A). En la Figura 8 (B) se observa que el PHE sorbido durante las primeras 6 h fue de 1.08 ± 0.019 mg g⁻¹ de suelo 25.71% de la inicial, posterior a este tiempo no se observó un cambio significativo ($p < 0.05$). Debido a lo anterior, se determinó que el tiempo en el que el PHE llegó al equilibrio y saturó el suelo fue de 6 h. Resultados similares se observaron con el PYR, se sorbieron 1.12 ± 0.003 mg g⁻¹ suelo

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

después de 12 h 30.93% de la inicial y no se observaron cambios significativos posteriormente. Por lo tanto, se determinó que el tiempo en el que el PYR llegó al equilibrio y saturó el suelo fue de 12 h.

Con base en lo anterior, se establecieron 12 h como tiempo de equilibrio para la MHC mismo que se estableció para los posteriores estudios de sorción mediante isotermas. Cabe mencionar que el PHE y PYR son de los hidrocarburos más estudiados debido a sus propiedades reportadas como mutagénicas y carcinogénicas; sin embargo, existe poca información sobre su comportamiento en suelos. Los tiempos de equilibrio reportados son variados debido a que éste depende de las condiciones evaluadas y el tipo de suelo.

En la Tabla 3 de la sección 1.5.1, se muestra una síntesis de diversos estudios de sorción en suelo para HAPs, se han alcanzado tiempos de equilibrio que van desde 80 hasta 720 min en el caso de PYR y para PHE sorción inmediata hasta 120 min. Es importante resaltar que en ninguno de estos estudios se cuantifica hidrocarburos en suelo por lo tanto no toman en cuenta que, como resultado de proceso de sorción, una cantidad del total de hidrocarburos sorbida se encuentra disponible y otra se encuentra secuestrada.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

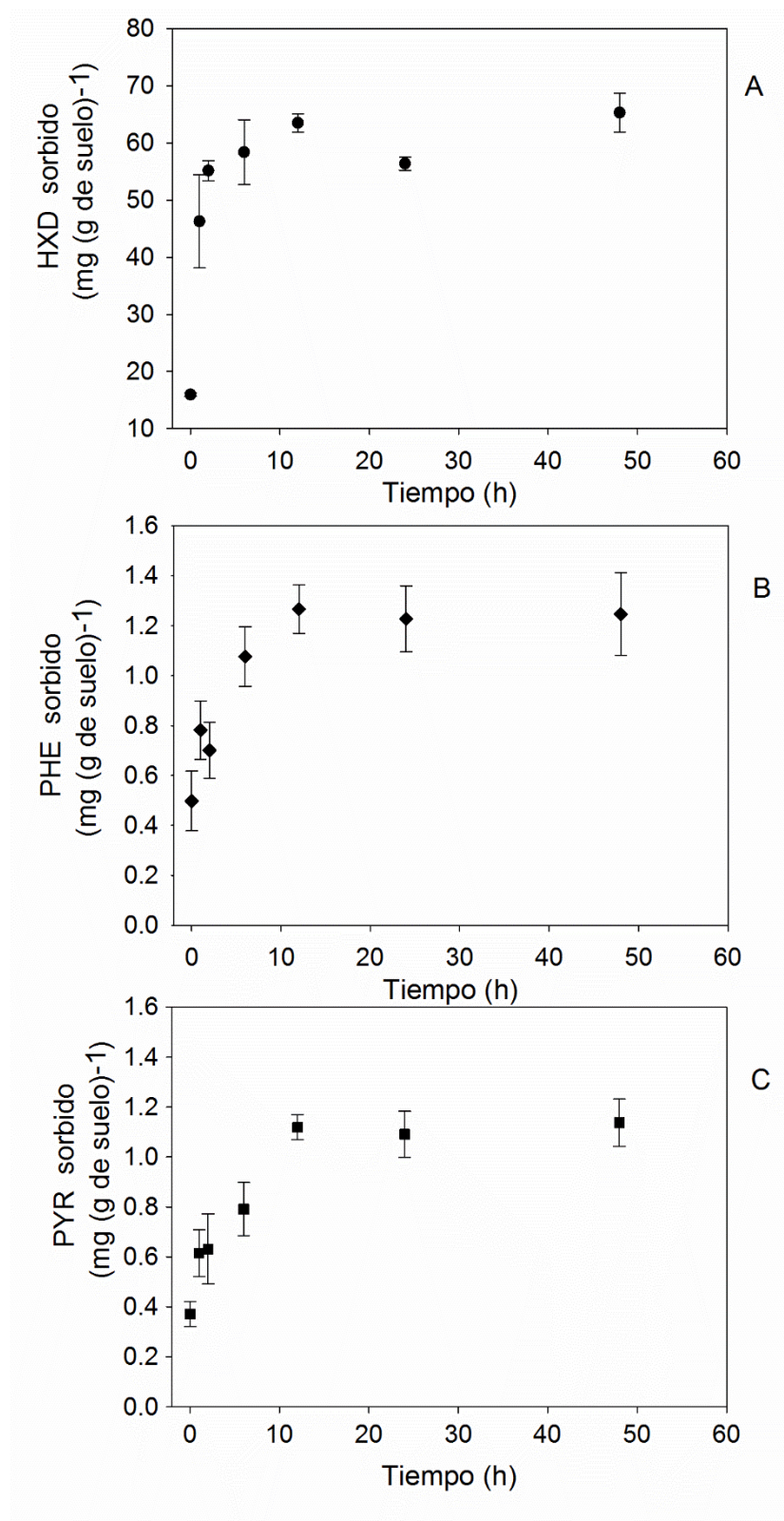


Figura 8. Cinética de sorción de HXD (A), PHE (B) y PYR (C). Cantidad de HXD sorbido (●), cantidad de PHE sorbido (◆) y cantidad de PYR sorbido (■) Los puntos representan el valor promedio de tres repeticiones independientes y las barras la DE.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

7.3.2 Isotermas de sorción

Mediante isotermas de sorción se describió el equilibrio de la cantidad de HXD, PHE y PYR sorbido en el suelo a temperatura constante (28 °C), en función de la cantidad presente. Con estos experimentos fue posible inferir sobre la saturación del suelo con la mezcla de hidrocarburos. En la Figura 9 se muestran los resultados para las diferentes cantidades de la MHC después de 12 h de contacto. Se observó que el suelo se saturó con 30 µL de la MHC (ver Figura 9), la cantidad sorbida fue de 58 ± 9.78 , 1.12 ± 0.03 y 1.05 ± 0.01 mg g⁻¹ de suelo de HXD, PHE y PYR. Se decidió trabajar con la concentración de saturación encontrada para los estudios de biodisponibilidad.

Para determinar la capacidad de sorción, realizar la comparación de cada hidrocarburo en el suelo y tomando en cuenta que se estudia una mezcla compuesta por tres hidrocarburos que compiten por los sitios de sorción se ajustó el modelo multicomponente de Langmuir.

7.3.2.1 Isoterma multicomponente de Langmuir.

El modelo multicomponente de Langmuir (Ecuación 8) se expresa en función de dos parámetros la constante de equilibrio de sorción y la capacidad máxima de sorción ambos son función de la afinidad entre el sorbato y el sorbente (Langmuir, 1916). Se compararon los parámetros obtenidos mediante el ajuste. En la Tabla 5 se presentan los valores generados mediante la isoterma multicomponente de Langmuir.

$$q_a = \frac{k_{ea} q_a^* C_a}{1 + k_{ea} C_a + k_{eb} C_b + k_{ec} C_c} \quad \text{Ec.8}$$

q_a^* = concentración de A adsorbida cuando el sólido alcanza la saturación

q_a = concentración de A adsorbida en el sólido

C_a = concentración de A no sorbida

k_{ea} = constante de equilibrio

$$k_{ea} = \frac{\overrightarrow{ks}}{\overleftarrow{kd}} \quad \text{EC.9}$$

ks = constante de equilibrio de sorción

kd = constante de equilibrio de desorción

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

Tabla 5. Parámetros del modelo multicomponente de Langmuir estimados para cada hidrocarburo

Hidrocarburo	Ke (g mg⁻¹)	Qa* (mg g⁻¹)	r²
HXD	0.01 ± 0.007	73.61 ± 9.86	0.84
PHE	1.4 ± 0.4	1.63 ± 0.11	0.97
PYR	2.3 ± 0.5	1.35 ± 0.11	0.93

Ke , constante de equilibrio de sorción; **Qa*** capacidad máxima de sorción. Se expresa el valor obtenido para cada parámetro ± DE.

Las constantes de equilibrio (k_{ea}) para los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHE y PYR) son 100 veces mayor a la obtenida para el hidrocarburo alifático ensayado (HXD) lo que indica que tienden a sorberse con mayor facilidad que el HXD. Es decir, una vez que el HXD se sorbe, fácilmente se desorbe, lo contrario sucede con el PHE y el PYR. Lo anterior podría deberse a interacciones fuertes entre los HAPs y la MO presente en el suelo, dando como resultado una mayor afinidad por los sitios de sorción.

Al analizar la capacidad máxima de sorción (q_a^*) se observa que el suelo sorbe 70 veces más HXD que PHE y PYR esto podría deberse a la proporción de la mezcla adicionada (HXD, PHE y PYR 100:1:1). La capacidad máxima de sorción de PHE y PYR fue de 1.63 ± 0.11 y 1.35 ± 0.11 mg g⁻¹ de suelo respectivamente, no habiendo diferencia significativa entre ambos ($p < 0.05$). La capacidad de sorción depende de las propiedades tanto del hidrocarburo como del adsorbente (suelo), la concentración del hidrocarburo en la fase circundante y la temperatura (Mechlińska *et al.*, 2009).

En la Tabla 3 de la sección 1.5.1, se puede observar diferentes estudios de sorción mediante isotermas, la capacidad máxima de sorción reportada para el PHE varía desde 1.2 µg g⁻¹ hasta 0.183 mg g⁻¹ de suelo, en el caso de PYR la capacidad máxima reportado varía desde 0.085 µg g⁻¹ hasta 2.2 mg g⁻¹ de suelo, como ya se mencionó anteriormente ninguno de estos estudios hace diferencia entre la cantidad total sorbida, la cantidad disponible y la secuestrada.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

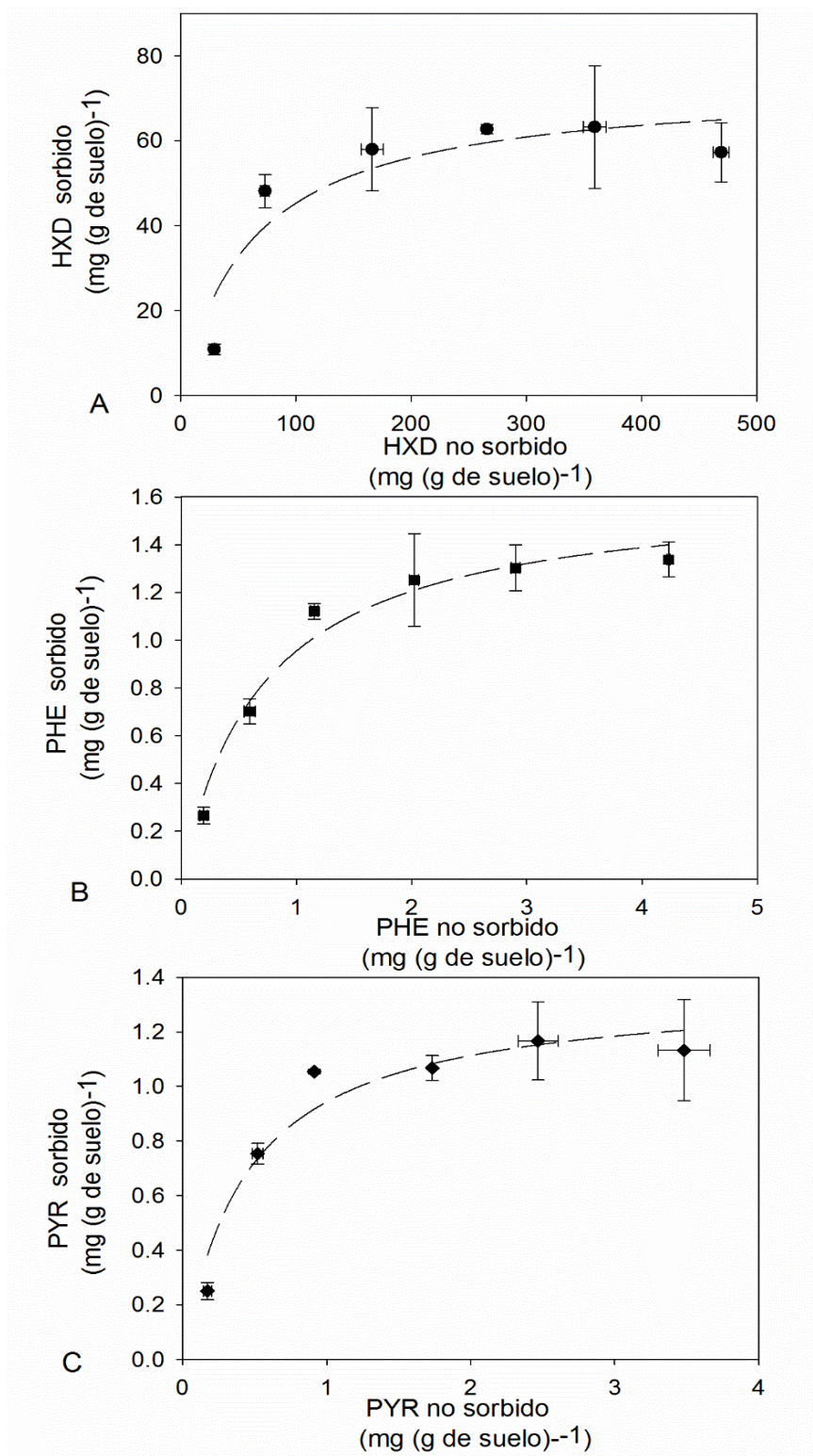


Figura 9. Isotherma de sorción de HXD (A), PHE (B) y PYR (C) ajustadas con el modelo multicomponente de Langmuir. Cantidad de HXD sorbido (●), cantidad de PHE sorbido (◆) y cantidad de PYR sorbido (■) Los puntos representan el valor promedio de tres repeticiones y DE.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

7.3.3 Balance de masa

Para estimar los fenómenos de sorción se realizó un balance de hidrocarburos que permitió cuantificar la cantidad de hidrocarburo disponible (hidrocarburo adsorbido mediante interacciones débiles, cuantificable mediante métodos fisicoquímicos) y la cantidad secuestrada (hidrocarburo adsorbido atrapado por interacciones fuertes y en poros, no cuantificable mediante métodos fisicoquímicos) (Figura 10). El balance de hidrocarburos se realizó, en cada punto de la cinética y de la isoterma de sorción.

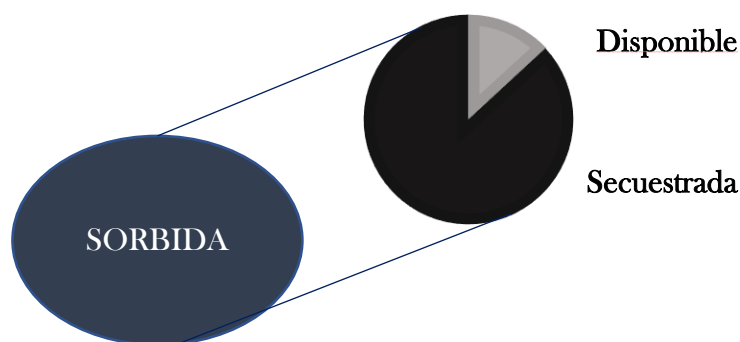


Figura 10. Fracciones que componen la cantidad sorbida de hidrocarburos en suelo.

A continuación, se muestra cómo se obtuvo el balance de hidrocarburos obtenido en el tiempo 0 h de la cinética de sorción.

De acuerdo con el método realizado para la cinética de sorción y la isoterma de sorción (sección 6.8), las extracciones realizadas en la fase líquida y sólida permitieron obtener la cantidad de hidrocarburos no sorbidos y disponibles, respectivamente (Tabla 6). La cantidad disponible en el tiempo 0 h de la cinética fue de 6.78 ± 0.89 , 0.21 ± 0.02 y 0.07 ± 0.01 mg g⁻¹ de suelo para HXD, PHE y PYR, respectivamente.

Tabla 6. HCs no sorbido y sorbido tiempo 0 h. Valor promedio y DE.

Tiempo (h)	No sorbido (mg g ⁻¹ de suelo)			Sorbido disponible (mg g ⁻¹ de suelo)		
	HXD	PHE	PYR	HXD	PHE	PYR
0	399.74 ± 9.63	3.71 ± 0.07	3.26 ± 0.04	6.78 ± 0.89	0.21 ± 0.02	0.07 ± 0.01

Mediante la ecuación 10 se determinó la cantidad total cuantificable obtenida mediante las extracciones realizadas en ambas fases (Tabla 7), se observó que la cantidad total de HXD, PHE y PYR cuantificable fue 1.03, 1.07 y 1.07 veces menor a la cantidad adicionada

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

($p < 0.05$) (Tabla 8). Lo anterior indicó un posible secuestro de HXD, PHE y PYR por parte del suelo desde el tiempo cero.

$$\text{Cuantificables} = \text{HC no sorbido} + \text{HC disponible} \quad \text{EC. 10}$$

Tabla 7. HCs cuantificables tiempo 0 h. Valor promedio y DE.

Tiempo (h)	Cuantificables (mg g ⁻¹ de suelo)		
	HXD	PHE	PYR
0	406.52 ± 9.67	3.92 ± 0.08	3.33 ± 0.04

Tabla 8. Hidrocarburos adicionados para la cinética de sorción. Valor promedio y DE.

Hidrocarburo	mg g ⁻¹ suelo
HXD	422.71 ± 0.12
PHE	4.2 ± 0.09
PYR	3.62 ± 0.03
Total	430.53 ± 0.15

Con base en lo anterior se estimó el secuestro con la ecuación 11. La cantidad secuestrada para HXD, PHE y PYR fue de 16.19 ± 9.67, 0.28 ± 0.12 y 0.29 ± 0.05 mg g⁻¹ suelo respectivamente (ver Tabla 9).

$$\text{Secuestrado} = \text{HC adicionado} - \text{HC cuantificables} \quad \text{EC.11}$$

Tabla 9. HCs secuestrados en el tiempo 0 h. Valor promedio y DE.

Tiempo (h)	SECUESTRADO (mg g ⁻¹ de suelo)		
	HXD	PHE	PYR
0	16.19 ± 9.67	0.28 ± 0.12	0.29 ± 0.05

Finalmente, se estimó la cantidad total de hidrocarburos sorbidos en el tiempo 0 h de la cinética mediante la ecuación 12. La cantidad sorbida de HXD, PHE y PYR fue de 22.97 ± 9.67 mg de HXD g⁻¹ de suelo, 0.49 ± 0.12 mg de PHE g⁻¹ de suelo y 0.36 ± 0.05 mg de PYR g⁻¹ de suelo, a las 0 h de la cinética (ver Tabla 10).

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

$$HC \text{ sorbido} = HC \text{ secuestrado} + HC \text{ disponible}$$

EC.12

Tabla 10. HCs sorbidos en el tiempo 0 h. Valor promedio y DE.

Tiempo (h)	SORBIDO (mg g ⁻¹ de suelo)		
	HXD	PHE	PYR
0	22.97 ± 9.63	0.49 ± 0.12	0.36 ± 0.05

Con base en lo anterior, el balance de hidrocarburos permitió estimar los fenómenos de sorción, permitiendo caracterizar el hidrocarburo adsorbido como disponible y secuestrado. La sorción inmediata y la presencia de secuestro en tiempo inicial de la cinética de sorción podrían deberse a la manera en que se adicionaron los hidrocarburos, inundando con la MHC al suelo seco, permitiendo que estos interaccionaran de manera directa con la MO y las arcillas presentes. Se ha demostrado que la humedad del suelo es un factor importante en la sorción de los compuestos orgánicos. Kim *et al.*, 2017 demostraron que la saturación de agua redujo la capacidad de sorción del suelo seco aproximadamente un orden de magnitud para HAPs (PHE y PYR). Lo anterior puede deberse a que el proceso de saturación de agua puede disminuir la hidrofobicidad de la materia orgánica del suelo al modificar la conformación molecular, exponiendo los grupos funcionales hidrofílicos, además de reducir drásticamente la capacidad de sorción de las superficies minerales ya que el agua supera a los compuestos hidrófobos en las superficies minerales debido a la fuerte polaridad de los minerales y el agua (Liu y Lee 2006).

7.4 Estimación del secuestro de una MHC en suelo natural.

La cantidad de hidrocarburos secuestrados (hidrocarburo no cuantificable mediante métodos fisicoquímicos), estimados mediante el balance de hidrocarburos (sección 7.3.3), en el tiempo 0 h y 12 h de la cinética de sorción se muestra en la Figura 11.

Se observó que de la cantidad sorbida de HXD, PHE y PYR, la cantidad secuestrada en el tiempo 0 h aumentó significativamente al tiempo 12 h, de 16.19 ± 9.67 mg g⁻¹ de suelo a 58.06 ± 1.71 mg g⁻¹ de suelo para HXD, de 0.29 ± 0.12 mg g⁻¹ de suelo a 0.59 ± 0.1 mg g⁻¹ de suelo para PHE y de 0.3 ± 0.051 a 1.10 ± 0.05 mg g⁻¹ de suelo para PYR. Por lo anterior, el secuestro de los tres hidrocarburos evaluados aumentó con el tiempo comportamiento que podría deberse al mayor contacto de los hidrocarburos con el suelo permitiendo la adsorción

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

en microporos y la interacción de MO y arcillas presentes en estos. (Alexander, 2001; An *et al.*, 2017).

El secuestro observado en este estudio puede deberse a diversas hipótesis que se han planteado sobre el secuestro de los compuestos orgánicos en el suelo (ver sección 1.4). La primera afirma que el contenido de MO está estrechamente relacionado con el secuestro de los hidrocarburos, debido a que la MO contiene diferentes grupos funcionales que pueden interactuar con los contaminantes formando enlaces químicos relativamente estables (An *et al.*, 2017).

La MO presente en el suelo suele contener componentes altamente aromáticos que pueden formar enlaces tipo $\pi - \pi$, causando la sorción irreversible (Zhu *et al.*, 2004). Wang y Zhang (2014), afirman que la presencia de compuesto aromáticos en la MO del suelo está estrechamente relacionada con la unión de PHE debido a interacciones $\pi - \pi$ entre los anillos de PHE y los restos aromáticos presentes en la MO. Con base en lo anterior y tomando en cuenta que el suelo evaluado es rico en materia orgánica, podrían estar sucediendo interacciones de este tipo entre la MO presente en el suelo y el PHE y PYR.

La segunda hipótesis planteada es el secuestro debido a la sorción en arcillas presentes en el suelo; Li y Gupta (1994), evaluaron la sorción y desorción de hidrocarburos (benceno, tolueno y xileno) en tres tipos de arcillas caolinita, illitas y motmorillonita encontrando una mayor sorción en motmorillonita.

Comportamiento similar obtuvo Contreras en 2003, quien evaluó la sorción de PHE en caolinita y motmorillonita. Una explicación es que la motmorillonita es una arcilla expandible 2: 1 con una gran área superficial (aproximadamente $800,000 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$) mientras que la illita es una arcilla no expandible 2:1 con un área superficial de $100\,000 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$ y la caolinita es una arcilla 1: 1 no expandible y con áreas superficial de $30\,000 \text{ m}^2 \text{ kg}^{-1}$.

La tercera hipótesis es la sorción en microporos (Cheng, Hu y Hu, 2012), el suelo evaluado en este estudio contiene 23.4 % de arcillas que contienen microporos ($<0.002 \text{ mm}$) y 50.8 de arena que contiene macroporos ($>0.05 \text{ mm}$). Cui *et al.* (2011) observaron que la desorción de PYR evaluado en sedimentos es más lenta en las partículas de arcilla que arena.

Lo anterior puede deberse a que la difusión en los microporos de la arcilla es menor comparada a la difusión en los macroporos de la arena posiblemente por impedimento

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

estérico que se presentan cuando el diámetro de microporo es comparable con la dimensión de las moléculas difusoras. Además, el tamaño de los microporos en minerales naturales no es uniformes y presentan forma irregular, lo que puede complicar aún más la desorción de las moléculas de los microporos.

Las hipótesis antes mencionadas pueden darse de manera conjunta en el secuestro de los hidrocarburos por lo cual se identifica como un fenómeno complejo.

Con base en lo anterior, el secuestro estimado en este estudio podría deberse a presencia de MO con grupos aromáticos, arcillas como la motmorillonita y secuestro en microporos resultando en una desorción irreversible de los hidrocarburos.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

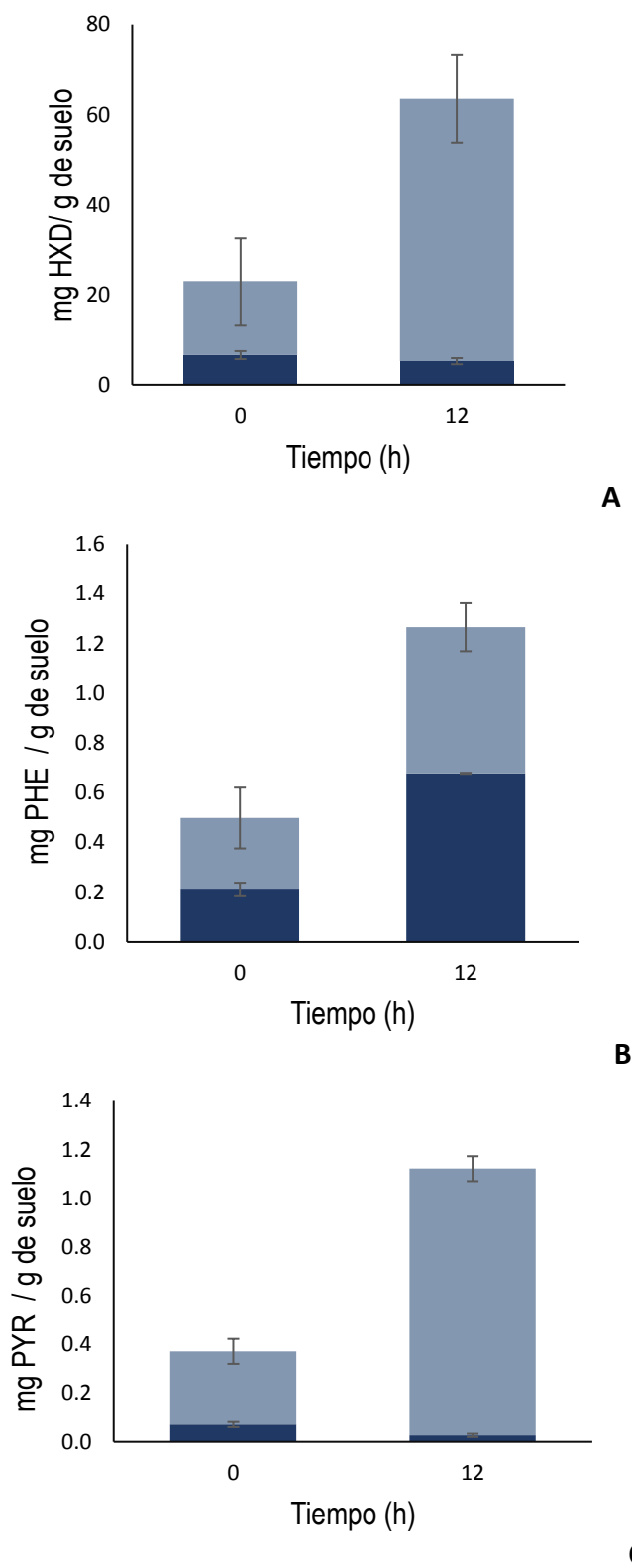


Figura 11. Estimación de secuestro y disponibilidad en tiempo 0h y 12 h de la cinética de sorción. HXD (A), PHE (B) y PYR (C). Secuestro (■), disponible (■) Los puntos representan el valor promedio de tres repeticiones independientes y las barras la DE.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

Para determinar si la cantidad secuestrada es mayor o menor a la cantidad disponible se realizó una comparación mediante una prueba t con α igual a 0.05 ($n=3$) obteniendo lo siguiente: En el tiempo de equilibrio de 12 h, la cantidad secuestrada de HXD y PYR es significativamente mayor a la disponible ($p<0.05$), para HXD el secuestro fue de $58.06 \pm 1.71 \text{ mg g}^{-1}$ de suelo mientras que el disponible fue de $5.44 \pm 0.69 \text{ mg g}^{-1}$ de suelo, en el caso del PYR la cantidad secuestrada y disponible fue de $1.10 \pm 0.05 \text{ mg g}^{-1}$ de suelo y $0.03 \pm 0.01 \text{ mg g}^{-1}$ de suelo respectivamente, en contraste con PHE, en donde la cantidad secuestrada es igual a la disponible ($p<0.05$), $0.59 \pm 0.12 \text{ mg g}^{-1}$ de suelo y $0.68 \pm 0.021 \text{ mg g}^{-1}$ de suelo respectivamente.

El secuestro de los hidrocarburos también se observó durante la isoterma de sorción, en la Tabla 11 se muestra la cantidad sorbida, disponible y secuestrada en el punto de saturación del suelo.

Se obtuvieron resultados similares a los de la cinética de sorción en donde la cantidad secuestrada de HXD y PYR es significativamente mayor ($p<0.05$) a la disponible. El HXD secuestrado y disponible fue de $52.84 \pm 10 \text{ mg g}^{-1}$ de suelo y $5.14 \pm 2.17 \text{ mg g}^{-1}$ de suelo respectivamente, para el PYR el secuestro fue de $1.02 \pm 0.05 \text{ mg g}^{-1}$ de suelo y disponible $0.02 \pm 0.008 \text{ mg g}^{-1}$ de suelo. En contraste con el PHE en el que la cantidad disponible ($0.73 \pm 0.13 \text{ mg g}^{-1}$ de suelo) es igual ($p<0.05$) a la secuestrada ($0.38 \pm 0.14 \text{ mg g}^{-1}$ de suelo).

Con base en los resultados anteriores el hidrocarburo que más se secuestra es el PYR debido a que de la cantidad total sorbida el 98.07% se encuentra secuestrado

Tabla 11. Estimación de secuestro y disponibilidad en la saturación.

Hidrocarburo	Sorbido	Disponible	Secuestrado
	mg g ⁻¹ de suelo		
HXD	57.98 ± 0.66	5.14 ± 2.17	52.84 ± 10
PHE	1.11 ± 0.07	0.73 ± 0.19	0.38 ± 0.17
PYR	1.04 ± 0.07	0.02 ± 0.008	1.02 ± 0.05

Nuestras observaciones toman relevancia debido a que la cantidad secuestrada para los tres hidrocarburos evaluados en la saturación del suelo se encuentra por encima de los límites máximos permisibles en la NOM-138-SEMARNAT_SSA1-2012 para HAPs, siendo de 52,840, 380 y 1,020 mg kg⁻¹ de suelo para HXD, PHE y PYR respectivamente.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

Considerando que los hidrocarburos que conforman la mezcla HXD, PHE y PYR tienen 16, 14 y 20 átomos de carbono la mezcla entra en la clasificación de fracción media, por lo anterior, la cantidad total de los hidrocarburos secuestrados en el suelo ($54,240 \text{ mg kg}^{-1}$ de suelo) se encuentra por encima de los límites máximos permisibles para mezcla de hidrocarburos establecidos en la NOM-138-SEMARNAT_SSA1-2012. Resultados similares se obtuvieron en la cinética de sorción.

Con base en lo anterior, suelos que ya han sido biorremediados y diagnosticados como sitios libres de contaminación bajo lo establecido por la NOM-138-SEMARNAT_SSA1-2012 resultan en un diagnóstico erróneo debido a que no se considera el secuestro y su posible liberación al medio ambiente.

En algunos reportes recientes (An *et al.*, 2017) se menciona que el secuestro pudiera ser temporal por cambios en el entorno que podrían provocar que los hidrocarburos sean liberados al medio ambiente, provocando daños a los organismos, incluyendo a los seres humanos. La temperatura ambiente puede cambiar el estado de los contaminantes (Lamichhane, Bal Krishna y Sarukkalige, 2016); por ejemplo, se ha demostrado que las tasas de desorción de PHE y PYR aumentaron significativamente al incrementar la temperatura de 7°C a 23°C (Enell *et al.*, 2005), trabajos similares (Hiller, Jurkovič y Bartal, 2008) observaron una disminución en la sorción de PHE y PYR en un 20.9 y 32.4% respectivamente, al incrementar la temperatura de 4 a 27°C , debido a que la solubilidad de ambos HAPs incrementa favoreciendo la desorción.

El cambio de pH en el suelo es otro factor que podría provocar la liberación de los contaminantes. Tian *et al.* (2015) demostraron que la disminución en el pH favorece la desorción de PHE, evaluaron pH de 2.3 a 6.6 encontrando desorciones de 2.79 mg y 0.68 mg respectivamente. El pH afecta el grado de capacidad de adsorción debido a la distribución de la carga superficial del adsorbente, variando el grado de adsorción de acuerdo con los grupos funcionales de adsorbato.

7.5 Biodisponibilidad de una MHC en suelo natural.

Diversas investigaciones han demostrado que la adición de moléculas con actividad surfactante favorece la biodisponibilidad de hidrocarburos en suelos y que el uso de biosurfactantes tiene ventajas sobre los surfactantes químicos.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

Las perspectivas para el uso de biosurfactantes en la remediación del suelo dependen de la capacidad de estos compuestos para mejorar la desorción y la disolución de los contaminantes. Estos factores pueden estar relacionados dado que la desorción, la disolución o el transporte mejorado pueden aumentar la biodisponibilidad del contaminante. Por lo anterior en este trabajo se utilizó un surfactante químico Tween 80 y un biosurfactante producido por *Acinetobacter bouvetii* UAM25 con la finalidad de lograr la desorción de los hidrocarburos secuestrados y de esta manera favorecer la disponibilidad resultado en el aumento de la biodisponibilidad.

En la Tabla 12 se muestra la cantidad sorbida de HXD, PHE y PYR en la saturación, del suelo, así como la cantidad disponible y secuestrada. A partir de la cantidad sorbida de HXD en la saturación se logró desorber $4.32 \pm 0.85\%$ y $46.43 \pm 1.88\%$ con la concentración de 150 y 225 mg L⁻¹ de Tween 80, 4.4 y 47.37 veces más que el testigo (ver Tabla 12). Para el PHE se logró desorber 10.48 ± 0.79 y $12.75 \pm 3.73 \%$ con 150 y 225 mg L⁻¹ de Tween 80, 1.9 y 2.3 veces más en comparación con el testigo, por último, en el caso de PYR la desorción fue 1.8 y 4.8 veces más que el testigo, alcanzando 4.38 ± 1.7 y $11.53 \pm 0.05\%$ de desorción con 150 y 225 mg L⁻¹ de Tween 80.

Con base en lo anterior, el Tween 80 con la concentración de 225 mg L⁻¹ fue capaz de aumentar la disponibilidad del HXD debido a que no sólo desorbió el 100% de la cantidad disponible si no también 36.59 % del HXD secuestrado; no así con 150 mg L⁻¹ de Tween 80 que desorbió sólo 37.69 % de la cantidad disponible.

En el caso de PHE con ninguna de las dos concentraciones evaluadas se favorece la disponibilidad, ya que la desorción en ambas concentraciones no fue significativamente diferente ($p < 0.05$) y sólo se desorbió 7.72 y 11.17% de la cantidad disponible.

Para el PYR se logró aumentar la disponibilidad con ambas concentraciones de Tween 80, desorbiendo 1.26% y 8.41% de la cantidad secuestrada con 150 y 225 mg L⁻¹ de Tween 80.

Los resultados antes mencionados concuerdan con las constantes de equilibrio obtenidas mediante el modelo multicomponente de Langmuir (sección 7.3.3.1) debido a que el hidrocarburo que se desorbió con mayor facilidad en presencia de surfactante fue el HXD en contraste con los HAPs evaluados.

Con base en lo anterior, el Tween 80 es capaz de liberar HXD y PYR del suelo, sin embargo, la cantidad de secuestro presente después del tratamiento con Tween 80, 19,277.2 mg Kg⁻¹

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

para HXD y 934.2 mg Kg⁻¹ de PYR con 225 mg L⁻¹ de Tween 80, sigue estando por encima de los límites máximos permisibles por la NOM-138-SEMARNAT/SSAI-2012 (Ver sección 1.3).

Tabla 12. Evaluación del aumento en la biodisponibilidad de la MHC en suelo natural, cada valor representa el promedio de tres repeticiones y DE.

Tratamiento	DESORBIDO %		
	HXD	PHE	PYR
BLANCO	0.98 ± 0.23	5.4 ± 2.2	1.2 ± 0.2
150 mg L⁻¹	4.32 ± 0.85	10.48 ± 0.79	4.38 ± 1.7
TWEEN 80			
225 mg L⁻¹	46.43 ± 1.88	12.75 ± 3.73	11.53 ± 0.05
BS			
150 mg L⁻¹	0.64 ± 0.06	4.05 ± 0.37	1.89 ± 0.84
225 mg L⁻¹	0.76 ± 0.18	3.92 ± 0.08	1.65 ± 0.6

Se ha demostrado que Tween 80 libera de manera eficiente hidrocarburos ligados al suelo; sin embargo, diversos autores mencionan que se necesitan cantidades por arriba de la CMC para lograr la desorción (Makkar y Rockne, 2003).

Pinto y Moore (2000), evaluaron la liberación de HAPs en cuatro suelos mediante Tween 80 encontrando que sólo concentraciones altas (1,000 x CMC) lograron liberar 69% del PHE enlazado al suelo envejecido, en contraste con este estudio en el cual solo se logró 12.75% de desorción lo anterior podría deberse a la concentración de Tween 80 evaluada fue 67 veces más baja.

En contraste, con los resultados obtenidos para el surfactante sintético, el biosurfactante producido por *Acinetobacter bouvetii* UAM25 logró desorber 7.2%, 8.5% del HXD disponible con 150 mg L⁻¹ y 225 mg L⁻¹ respectivamente, en el caso de PHE logró desorber 6.15 y 5.96% de la cantidad disponible, por ultimo para el PYR resorbió 98.4 y 85.9% de la cantidad disponible, los resultados antes mencionados no son significativamente diferentes a lo obtenido en el testigo ($p < 0.05$).

Por lo anterior bajo las condiciones evaluadas, el biosurfactante producido por *Acinetobacter bouvetii* UAM25 no fue capaz de aumentar la disponibilidad por lo tanto la biodisponibilidad no se verá favorecida para estudios de biorremediación. Van Dyke *et al.* (1993) evaluaron la recuperación de contaminantes hidrofóbicos de suelo mediante el

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

biosurfactante producido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 obteniendo 41.9 % de desorción de la cantidad total agregada al suelo. Sin embargo, este estudio no tomó en cuenta la cantidad disponible y secuestrada por lo tanto queda incertidumbre si la recuperación del suelo puede deberse a la cantidad disponible o secuestrada.

8 Conclusiones.

- ❖ Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHE y PYR) presentaron una mayor tendencia a la sorción en el suelo estudiado con respecto al hidrocarburo alifático (HXD).
- ❖ Los hidrocarburos secuestrados durante la cinética de sorción y la isoterma de sorción rebasan los límites máximos permisibles por la NOM-138-SEMARNAT_SSA1-2012 para los tres hidrocarburos evaluados y en mezcla.
- ❖ Se demostró que la cantidad total sorbida de hidrocarburos en el suelo se encuentra en dos formas: disponible y secuestrada
- ❖ El secuestro es un fenómeno que se debe tomar en cuenta en la limpieza de los sitios contaminados con hidrocarburos de lo contrario se puede llegar a diagnósticos erróneos sobre la limpieza de estos.
- ❖ El biosurfactante sintético evaluado fue capaz de aumentar la biodisponibilidad de HXD y PYR.
- ❖ Bajo las condiciones evaluadas el biosurfactante producido por *A.bouvetii* UAM25 no fue capaz de aumentar la biodisponibilidad de los hidrocarburos evaluados.

9 Perspectivas.

Se demostró el secuestro de los tres hidrocarburos que conforman la mezcla; sin embargo, para demostrar que las hipótesis planteadas son responsables de este fenómeno es necesaria la caracterización de la MO, la arcilla y el tamaño de poro, que permitirán indagar sobre las interacciones que se puedan estar dando entre éstas y los hidrocarburos.

Una vez conocidas las propiedades del suelo se plantea eliminar la MO del suelo y evaluar la sorción, eliminar las arcillas y evaluar sorción, separar las arcillas y evaluar la sorción en arcillas con la finalidad de determinar qué factor es el que influye más en secuestro de los hidrocarburos.

En el caso de la biodisponibilidad se debe investigar sobre las posibles interacciones que se den entre el surfactante y el suelo ya que se podría estar dando una sorción impidiendo la desorción de los hidrocarburos.

También se plantea evaluar la posible desorción de la cantidad secuestrada a cambios de pH, temperatura y determinar si una vez liberados del suelo éste conserva su vocación original y sus propiedades como la fertilidad. Lo anterior podría evaluarse mediante el crecimiento de plantas de uso comestible antes y después de la liberación de los hidrocarburos secuestrados y con esto demostrar el efecto del secuestro sobre la fertilidad.

10 Bibliografía.

- Alexander, M. (2001) “14 Bioavailability of Organic Compounds Sequestered in Soils”, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, pp. 197–202. doi: 10.1007/978-3-662-04643-2_14.
- An, X. *et al.* (2017) “Research progress on aging of organic pollutants in geosorbents: a review”, *Acta Geochimica*. Science Press, 36(1), pp. 27–43. doi: 10.1007/s11631-016-0129-z.
- Bouyoucos, G. J. (1962) “Hydrometer Method Improved for Making Particle Size Analyses of Soils”, *Agronomy Journal*, 54(5), p. 464. doi: 10.2134/agronj1962.00021962005400050028x.
- Cheng, H., Hu, E. y Hu, Y. (2012) “Impact of mineral micropores on transport and fate of organic contaminants: A review”, *Journal of Contaminant Hydrology*. Elsevier B.V., 129–130, pp. 80–90. doi: 10.1016/j.jconhyd.2011.09.008.
- Contreras, M. L. (2003) “Informes Técnicos Ciemat Estudio de Adsorción de Fenantreno en Diferentes Tipos de Arcillas”.
- Cui, X. *et al.* (2011) “Biodegradation of pyrene in sand, silt and clay fractions of sediment”, *Biodegradation*, 22(2), pp. 297–307. doi: 10.1007/s10532-010-9399-z.
- Díaz-Ramírez, I. J. *et al.* (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”, *Canadian Journal of Microbiology*, 49(12), pp. 755–761. doi: 10.1139/w03-098.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

- Van Dyke, M. I. *et al.* (1993) “Evaluation of microbial surfactants for recovery of hydrophobic pollutants from soil”, *Journal of Industrial Microbiology*, 11(3), pp. 163–170. doi: 10.1007/BF01583718.
- Enell, A. *et al.* (2005) “Desorption kinetics studies on PAH-contaminated soil under varying temperatures”, *Chemosphere*, 61(10), pp. 1529–1538. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.04.092.
- EPA, U. (2008) “POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs)/ NAPHTHALENE”, (1272), pp. 3–4.
- Hiller, E., Jurkovič, L. y Bartal, M. (2008) “Effect of Temperature on the Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil and Sediment”, *Soil and Water Res*, 2008(1), pp. 231–240.
- Hwang, S., Ramirez, N. y Cutright, T. J. (2003) “The role of soil properties in pyrene sorption and desorption”, pp. 65–80.
- Ick Yeom, Mriganka M. Ghosh, Chris D. Cox, and K. G. R. (1995) “Micellar Solubilization of”, *Environ. Sci. Techno*, 29(12), pp. 3015–3021. doi: 10.1021/es00012a019.
- Ivshina, I. *et al.* (2016) “Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil spiked with model mixtures of petroleum hydrocarbons and heterocycles using biosurfactants from *Rhodococcus ruber* IEGM 231”, *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier B.V., 312, pp. 8–17. doi: 10.1016/j.jhazmat.2016.03.007.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

- Javier Rivas, F. *et al.* (2008) “Polycyclic aromatic hydrocarbons sorption on soils: Some anomalous isotherms”, *Journal of Hazardous Materials*, 158(2–3), pp. 375–383. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.01.083.
- Kim, P. G. *et al.* (2017) “Effects of soil water saturation on sampling equilibrium and kinetics of selected polycyclic aromatic hydrocarbons”, *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 184, pp. 86–92. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.05.170.
- Lamichhane, S., Bal Krishna, K. C. y Sarukkalige, R. (2016) “Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal by sorption: A review”, *Chemosphere*. Elsevier Ltd, 148, pp. 336–353. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.01.036.
- Li, Y. y Gupta, G. (1994) “Adsorption/desorption of hydrocarbons on clay minerals”, *Chemosphere*, 28(3), pp. 627–638. doi: 10.1016/0045-6535(94)90304-2.
- Lizardi-Jiménez, M. A. y Gutiérrez-Rojas, M. (2011) “Evaluación de las zonas hidrodinámicas locales en un reactor airlift trifásico: Buscando el Re de fase líquida más bajo”, *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(1), pp. 59–65.
- Makkar, R. S. y Rockne, K. J. (2003) “Comparison of Synthetic Surfactants and Biosurfactants in Enhancing Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(10), p. 2280. doi: 10.1897/02-472.
- Mechlińska, A. *et al.* (2009) “Evolution of models for sorption of PAHs and PCBs on geosorbents”, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(4), pp. 466–482. doi: 10.1016/j.trac.2009.01.005.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

“Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSAI-2012. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificación para la remediación.” (2012). Disponible en: http://187.217.215.146/iso9k2k/documentos/Leyes_Ambientales/NOM-138-SEMARNAT_SSA1-2012.PDF.

Olu-Owolabi, B. I., Diagboya, P. N. y Adebowale, K. O. (2014) “Evaluation of pyrene sorption-desorption on tropical soils”, *Journal of Environmental Management*. Elsevier Ltd, 137, pp. 1–9. doi: 10.1016/j.jenvman.2014.01.048.

Ortega, N. D. *et al.* (2018) “Stable bioemulsifiers are produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25 growing in different carbon sources”, *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, 0(0), p. 0. doi: 10.1007/s00449-018-1920-5.

Ortíz Brito, O., Ize, I. y Gavilán, A. (2003) “La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México”, *Gaceta Ecológica ISSN: 1405-2849*, 69(Saval 1995), pp. 83–92. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

PEMEX (2018) “Etróleos exicanos”.

Peters, R. W., Montemagno, C. D. y Shem, L. (1992) “Surfactant Screening of Diesel-Contaminated Soil capillary number, at which residual saturation is reached and oil”, 9(2), pp. 113–136.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

- Pinto, L. J. y Moore, M. M. (2000) “Release of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons From Contaminated Soils By Surfactant and Remediation of This Effluent By Penicillium Spp”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(7), p. 1741. doi: 10.1897/1551-5028(2000)019<1741:ROPAHF>2.3.CO;2.
- Reichenberg, F. y Mayer, P. (2006) “Two complementary sides of bioavailability: accesibility and chemical activity of organic contaminants in sediments and soils”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(5), p. 1239. doi: 10.1897/05-458R.1.
- Ren, X. *et al.* (2018) “Sorption, transport and biodegradation – An insight into bioavailability of persistent organic pollutants in soil”, *Science of the Total Environment*. Elsevier B.V., 610–611, pp. 1154–1163. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.089.
- Rivas, F. J. (2006) “Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soils: A short review of chemical oxidation based treatments”, *Journal of Hazardous Materials*, 138(2), pp. 234–251. doi: 10.1016/j.jhazmat.2006.07.048.
- Sar, N. y Rosenberg, E. (1983) “Emulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains”, *Current Microbiology*, 9(6), pp. 309–313. doi: 10.1007/BF01588825.
- Semple, K. T. *et al.* (2007) “Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurement”, *Environmental Pollution*, 150(1), pp. 166–176. doi: 10.1016/j.envpol.2007.07.023.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

- Semple, K. T., Morriss, a. W. J. y Paton, G. I. (2003) “Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis”, *European Journal of Soil Science*, 54(December), pp. 809–818. doi: 10.1046/j.1365-2389.2003.00564.x.
- Teixeira, S. C. G. *et al.* (2011) “Study of pyrene adsorption on two Brazilian soils”, *Water, Air, and Soil Pollution*, 219(1–4), pp. 297–301. doi: 10.1007/s11270-010-0707-3.
- Tian, W. *et al.* (2015) “Leachability of phenanthrene from soil under acid rain and its relationship with dissolved organic matter”, *Environmental Earth Sciences*, 73(7), pp. 3675–3681. doi: 10.1007/s12665-014-3653-3.
- Tzintzun-Camacho, O. *et al.* (2012) “Comparison of mechanisms of hexadecane uptake among pure and mixed cultures derived from a bacterial consortium”, *International Biodeterioration and Biodegradation*. Elsevier Ltd, 70, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.01.009.
- Velasco-Alvarez, N. *et al.* (2011) “Enhanced hexadecane degradation and low biomass production by *Aspergillus niger* exposed to an electric current in a model system”, *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 102(2), pp. 1509–1515. doi: 10.1016/j.biortech.2010.07.111.
- Volke, T. y Velasco, J. (2004) *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*.
- Wang, H. B. y Zhang, Y. J. (2014) “Mechanisms of interaction between polycyclic aromatic hydrocarbons and dissolved organic matters”, *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 49(1), pp. 78–84. doi: 10.1080/10934529.2013.824311.
- Wlakey, A. (1947) “A critical examination of a rapid method for determination of organic

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

carbon in soils - effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents”, *Soil Science*, pp. 251–257. doi: 10.1097/00010694-194704000-00001.

Yang, L. *et al.* (2013) “Study of dynamic sorption and desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons in silty-clay soil”, *Journal of Hazardous Materials*. Elsevier B.V., 244–245, pp. 77–85. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.11.029.

Zheng, Z. y Obbard, J. P. (2001) “Effect of non-ionic surfactants on elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil-slurry by *Phanerochaete chrysosporium*”, 429(December 2000).

Zhu, D. *et al.* (2004) “Evidence for pi-pi electron donor-acceptor interactions between pi-donor aromatic compounds and pi-acceptor sites in soil organic matter through pH effects on sorption.”, *Environmental science & technology*, 38, pp. 4361–4368. doi: 10.1021/es035379e.

Biosurfactante producido por *Acinetobacter bouvetii* UAM25

Se obtuvieron dos lotes del biosurfactante producido por *Acinetobacter bouvetii* UAM25 (Figura 12), ambos lotes se centrifugaron y el sobrenadante libre de células se esterilizó y se le determinó la actividad emulsificante como medida indirecta de la producción, en la tabla 13 se observa la actividad obtenida para el sobrenadante antes de esterilizar y esterilizado, el lote B aumentó significativamente la actividad emulsificante por lo tanto se eligió para el aumento de la biodisponibilidad (sección 7.5).

Tabla 13. Actividad emulsificante del biosurfactante producido por *Acinetobacter bouvetii* UAM25 no esterilizado y esterilizado y DE.

REACTOR	AE (UE mL⁻¹)	
	No esterilizado	Esterilizado
A	14.75 ± 4.8	16.21 ± 4.9
B	24.82 ± 0.77	32.24 ± 0.22

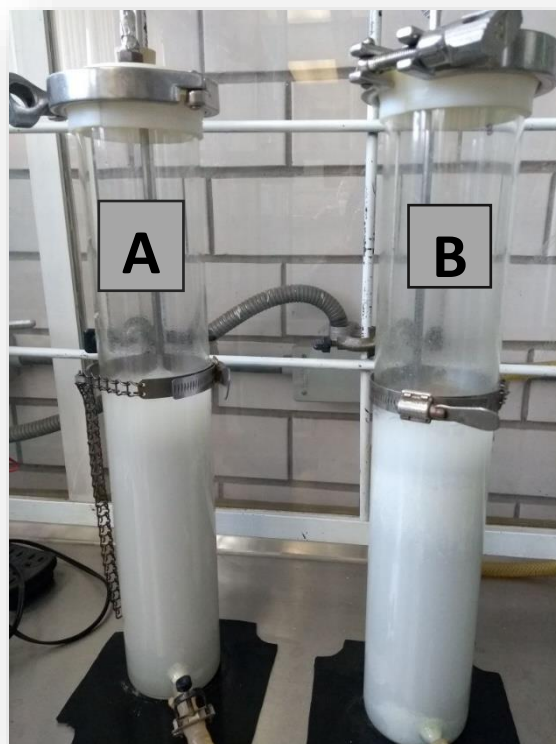


Figura 12. Lotes obtenidos del biosurfactante producido por *Acinetobacter bouvetii* UAM25.

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00254
Matrícula: 2163803283

Evaluación de la biodisponibilidad de una MHC en suelo natural mediante la estimación de fenómenos de sorción y secuestro

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

01 AGO 2018

COORDINACIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

En la Ciudad de México, se presentaron a las 16:00 horas del día 31 del mes de julio del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. SERGIO HUERTA OCHOA
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO
DRA. NANCY VELASCO ALVAREZ
DR. CARLOS OMAR CASTILLO ARAIZA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: ELIZABETH ALEJANDRA MOTOLINIA ALCANTARA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. SERGIO HUERTA OCHOA

VOCAL

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

VOCAL

DRA. NANCY VELASCO ALVAREZ

SECRETARIO

DR. CARLOS OMAR CASTILLO ARAIZA