



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DETECCIÓN Y DEGRADACIÓN DE
HIDROCARBUROS POLINUCLEOAROMÁTICOS
EN AGUA POR UN CULTIVO AEROBIO MIXTO

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestro en Ingeniería (Ambiental)

Presenta:

Sixto Pérez Salazar

Abril, 2010

Índice

1	INTRODUCCIÓN.	1
1.1	Planteamiento del problema	1
1.2	Justificación	3
1.3	Hipótesis	5
1.4	Selección de hidrocarburos polinucleoaromáticos	5
1.5	Objetivos	7
1.5.1	Objetivo Principal	7
1.5.2	Objetivos Particulares	7
1.6	Antecedentes	8
2	MARCO TEÓRICO.	11
2.1	Procesos de tratamiento biológico	11
2.2	Transformación de compuestos orgánicos.	12
2.3	Biodegradación	14
2.3.1	Biodegradación bacteriana	14
2.3.2	Biodegradación de compuestos orgánicos recalcitrantes	16
2.4	Los microorganismos	17
2.4.1	Crecimiento bacteriano	18
2.4.2	Reacciones enzimáticas	22
2.5	Bioquímica de los procesos de tratamiento biológico	23
2.6	Cinética del crecimiento bacteriano	23
2.7	Técnicas de laboratorio	24
3	METODOLOGÍA.	27
3.1	Experimentación	27
3.2	Materiales y reactivos	27
3.2.1	Consortio bacteriano	27
3.2.2	Hidrocarburos polinucleoaromáticos	28
3.2.3	Reactivos	28
3.2.3.1	Grado analítico	28
3.2.3.2	Grado especial	29
3.2.4	Disoluciones necesarias para el agua de dilución	29
3.2.5	Agua de dilución	29
3.2.6	Material de vidrio	29
3.2.7	Otros materiales	30
3.3	Equipos	30
3.4	Experimentos	31
3.4.1	Tipos de experimentos	31
3.4.2	Preparación de las pruebas	31
3.4.3	Preparación del blanco de células	31
3.4.4	Preparación del blanco del compuesto	32
3.4.5	Preparación del matraz: HPA-consorcio.	32
3.5	Condiciones de reacción, seguimiento y toma de muestras	32
3.6	Estimación de la biomasa	33
3.7	Determinación de los HPAs.	33
3.7.1	Extracción del HPA de la prueba de biodegradación.	34
3.7.2	Análisis de los HPAs	34

3.7.2.1	Análisis cromatográfico	35
3.7.2.2	Análisis por espectrometría de masas	35
3.7.2.3	Análisis cualitativo y cuantitativo de los HPAs	36
3.7.2.4	Curvas de calibración.	36
4	RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.	37
4.1	Comportamiento del consorcio bacteriano con cada HPA a 50 ppm.	37
4.1.1	Crecimiento bacteriano con cada HPA a 50 mg/L	41
4.1.2	Resultados del crecimiento bacteriano	43
4.2	Crecimiento bacteriano a 20 y 5 mg/L de HPAs seleccionados	44
4.2.1	Consortio bacteriano con benzo(a)pireno	45
4.2.2	Consortio bacteriano con dibenzo(a,h)antraceno	46
4.2.3	Comparación del crecimiento bacteriano entre benzo(a)pireno y dibenzo(a,h)antraceno	47
4.2.4	Relación del crecimiento bacteriano con respecto a la concentración del benzo(a)pireno y dibenzo(a,h)antraceno	48
4.2.4.a	Benzo(a)pireno	49
4.2.4.b	Dibenzo(a,h)antraceno	49
4.3	Cinéticas de la biodegradación de los HPAs	50
4.3.1	Cinéticas de los 10 HPAs a 50 mg/L	51
4.3.2	Cinéticas a 20 y 5 mg/L de benzo(a)pireno	54
4.3.3	Cinéticas a 20 y 5 mg/L de dibenzo(a,h)antraceno	55
4.4	Constantes de las cinéticas de biodegradación	56
4.4.1	Constantes de las cinéticas de biodegradación con 50 mg/L de HPAs	56
4.4.2	Constantes de las cinéticas de biodegradación de HPAs a 20 mg/L	57
4.4.3	Constantes de las cinéticas de biodegradación de HPAs a 5 mg/L	57
4.5	Relación entre la tasa de biodegradación y la concentración utilizada del benzo(a)pireno y del dibenzo(a,h)antraceno	58
4.6	Relación del crecimiento bacteriano con respecto a la concentración del benzo(a)pireno y del dibenzo(a,h)antraceno	59
4.7	Relación del crecimiento bacteriano con respecto a la remoción del benzo(a)pireno y del dibenzo(a,h)antraceno	60
4.8	Características fisicoquímicas, estructurales y de toxicidad de los HPAs	61
5	CONCLUSIONES	73
6	RECOMENDACIONES	77
	Referencias	79
	Referencias de la Tabla 11	85
	Anexo A	86
	Anexo B	88

Índice de Tablas

Tabla 1	Conformación de las pruebas	33
Tabla 2	Condiciones de operación del cromatógrafo de gases.	35
Tabla 3	iones monitoreados	35
Tabla 4	Características físicas al final de las reacciones	43
Tabla 5	Definición de la Magnitud del Gradiente	44
Tabla 6	Crecimiento bacteriano frente a cada uno de los 10 HPAs Concentración alta: 50 mg/L del HPA	44
Tabla 7.a	Crecimiento bacteriano frente a los HPAs seleccionados Concentración media: 20 mg/L del HPA	47
Tabla 7.b	Crecimiento bacteriano frente a los HPAs seleccionados Concentración baja: 5 mg/L del HPA	47
Tabla 8	Constantes de la relación exponencial del crecimiento bacteriano para benzo(a)pireno y dibenzo(a,h)antraceno	50
Tabla 9	Constantes de la relación logarítmica de cada HPA	57
Tabla 10	Constantes de las relaciones logarítmicas de las degradaciones del benzo(a)pireno y dibenzo(a,h)antraceno a 20 mg/L	57
Tabla 11	Constantes de las relaciones logarítmicas de las degradaciones del benzo(a)pireno y dibenzo(a,h)antraceno a 5 mg/L	58
Tabla 12	Constantes de las regresiones logarítmicas de las tasas de Biodegradación del correspondiente HPA con respecto a Su concentración	59
Tabla 13	Constantes de las regresiones exponenciales del crecimiento bacteriano con respecto a la concentración del correspondiente HPA	60
Tabla 14	Constantes de las regresiones exponenciales del crecimiento bacteriano con respecto a la concentración utilizada del HPA	61
Tabla 15	Características fisicoquímicas, estructurales y de toxicidad de los HPAs	62
Tabla 16	Remoción del Benzo(a)pireno y del Dibenzo(a,h)antraceno	63

Índice de Gráficas

Gráfica	Página
4.1.a Comportamiento bacteriano frente al antraceno a 50 mg/l	38
4.1.b Comportamiento bacteriano frente al benzo(a)antraceno a 50 mg/l	38
4.1.c Comportamiento bacteriano frente al benzo(a)pireno a 50 mg/l	38
4.1.d Comportamiento bacteriano frente al benzo(g,h,i)perileno a 50 mg/l	39
4.1.e Comportamiento bacteriano frente al benzo(k)fluoranteno a 50 mg/l	39
4.1.f Comportamiento bacteriano frente al dibenzo(a,h)antraceno a 50 mg/l	39
4.1.g Comportamiento bacteriano frente al criseno a 50 mg/L	40
4.1.h Comportamiento bacteriano frente al fluoranteno a 50 mg/l.	40
4.1.i Comportamiento bacteriano frente al indenopireno a 50 mg/l	40
4.1.j Comportamiento bacteriano frente al pireno a 50 mg/l	41
4.1.1 Comparación del crecimiento bacteriano de los 10 HPAs	42
4.2.1.a Comportamiento bacteriano frente al benzo(a)pireno 20 mg/l	45
4.2.1.b Comportamiento bacteriano frente al benzo(a)pireno 5 mg/l	45
4.2.2.a Comportamiento bacteriano frente al dibenzo(a,h)antraceno a 20 mg/l	46
4.2.2.b Comportamiento bacteriano frente al dibenzo(a,h)antraceno 5 mg/l	46
4.2.3 Comparativo del crecimiento bacteriano del benzo(a)pireno y del Dibenzo(a,h)antraceno	48
4.2.4.a Crecimiento bacteriano frente al benzo(a)pireno a 50, 20 y 5 mg/L	49
4.2.4.b Crecimiento bacteriano frente al dibenzo(a,h)antraceno a 50, 20 y 5 mg/L	49
4.3.1.a Concentración remanente del antraceno	51
4.3.1.b Concentración remanente del benzo(a)antraceno	51
4.3.1.c Concentración remanente del benzo(a)pireno	52
4.3.1.d Concentración remanente del benzo(g,h,i)perileno	52
4.3.1.e Concentración remanente del benzo(k)fluoranteno	52
4.3.1.f Concentración remanente del criseno	53
4.3.1.g Concentración remanente del dibenzo(a,h)antraceno	53
4.3.1.h Concentración remanente del fluoranteno	53
4.3.1.i Concentración remanente del indenopireno	54
4.3.1.j Concentración remanente del pireno	54
4.3.2.a Concentración remanente del benzo(a)pireno a 20 mg/L	55
4.3.2.b Concentración remanente del benzo(a)pireno a 5 mg/L	55
4.3.3.a Concentración remanente del dibenzo(a,h)antraceno a 20 mg/L	56
4.3.3.b Concentración remanente del dibenzo(a,h)antraceno a 5 mg/L	56
4.6.a Benzo(a)pireno	59
4.6.b Dibenzo(a,h)antraceno	60
4.7.a Benzo(a)pireno	61
4.7.b Dibenzo(a,h)antraceno	61
4.8.a Comportamiento bacteriano con respecto a la estructura anillada De los HPAs	64
4.8.b Acción del consorcio bacteriano con respecto a la estructura anillada de los HPAs	64
4.8.c Comportamiento bacteriano con respecto a los puntos de ebullición.	65
4.8.d Acción del consorcio bacteriano con respecto a los puntos de ebullición.	65
4.8.e Remoción de HPAs con respecto a sus puntos de fusión.	66
4.8.f Remoción de HPAs y sus puntos de fusión	66
4.8.g Comportamiento bacteriano debido a la solubilidad de HPAs	67

4.8.h	Remoción de HPAs debido a sus solubilidades.	. 67
4.8.i	Relación del comportamiento bacteriano con el Coeficiente de partición Octanol-agua	. 68
4.8.j	Remoción de HPAs con respecto al Coeficiente de partición octanol-Agua	. 68
4.8.k	Comportamiento bacteriano debido a la presión de vapor	. 70
4.8.l	Relación de la remoción de HPAs con respecto a su presión de vapor	. 70
4.8.m	Relación entre la remoción de los HPAs y su constante de la ley de Henry	. 71

ndice de Figuras

Fig. 1 Fases del crecimiento bacteriano 21

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

La mayoría de compuestos orgánicos son producidos por plantas y animales, en 1981 había cerca de 1.8 millones de compuestos orgánicos sintéticos, cada año se sintetizan 250,000 nuevos compuestos, de los cuales se llegan a producir industrialmente entre 300 y 500 (Stumm y Morgan, 1981). Para 2005, la cantidad de compuestos existentes en el mundo se estimó en más de diez millones y el de estar rodeados por más de cien mil de ellos (Universidad de Granada, 2005). La cantidad de sustancias químicas producidas por el hombre y emitidas a la atmósfera ha crecido desde una tonelada en 1930 hasta más de 400 millones de toneladas para inicios del presente siglo, cada mes aparecen más de 600 sustancias químicas nuevas que se añaden a las 80,000 ya existentes. Por el momento, sólo se han demostrado los efectos en el ser humano de un 7% de estos agentes (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2009).

Con el avance industrial y el desarrollo de la vida urbana se ha incrementado, en gran medida, la gama de contaminantes ambientales; la creciente concientización pública para cuidar el medio ambiente ha despertado gran interés, especialmente en el deterioro a la calidad del agua, aspecto que representa una amenaza extrema a la capacidad de autorregulación de la biosfera.

Por más de un siglo en Norte América, Europa Occidental y Japón se han dedicado a resolver eventos cruciales de contaminación microbiana, antes de resolver problemas de contaminación por eutroficación, acidificación y contaminación por nitratos. Durante las últimas décadas se han realizado importantes investigaciones sobre los riesgos de micro contaminantes orgánicos. Diferentes autoridades se han enfocado a atender estos problemas de contaminación.

En 1977, el Congreso de los Estados Unidos de Norteamérica aprobó a través del "Federal Water Act" la Lista de Contaminantes Prioritarios propuesta por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (U. S. EPA por sus siglas en inglés) que

originalmente contenía 129 compuestos (Soniassy *et al.*, 1994). En 1981 fueron eliminados tres compuestos, permaneciendo 126. En 1982 la Comunidad Europea adoptó la misma Lista de Contaminantes Prioritarios, en la cual están incluidos los hidrocarburos polinucleoaromáticos (HPAs), lista que ratificó en 1987 y está vigente actualmente (EPA, 2007).

Los HPAs presentan estructuras químicas formadas por anillos bencénicos fusionados que comparten un par de átomos de carbono, formando una molécula plana (Wade, L. G., 2009)) Los HPAs son producidos por la industria petroquímica (Manahan, 2007) debido a que son componentes del petróleo crudo pero también se originan de fuentes naturales, como la combustión incompleta de material orgánico (Tinoco *et al.*, 1997) en la quema de bosques de coníferas (Manahan, 2007) y por muy diversas actividades antropogénicas (Tinoco *et al.*, 1997). Son también utilizados en medicamentos o para fabricación de pinturas, plásticos y pesticidas (Agency for Toxic Substances & Disease Center, 2009).

Con el desarrollo de la industria petroquímica se han presentado fugas y derrames de petróleo y otros compuestos tanto en industrias como de tuberías de transporte, originando la contaminación por HPAs en suelos y en ambientes acuáticos, siendo el principal grupo de sustancias sintéticas que se presentan en drenajes municipales e industriales (Dojlido y Best, 1993) representando riesgos potenciales por los efectos adversos para el hombre y el ambiente en situaciones de exposición incontroladas.

La presencia de HPAs en la biosfera representa un riesgo para el ser humano y para los animales, debido a sus propiedades carcinogénicas y mutagénicas (Tinoco *et al.*, 1997 y Manahan, 2007) así como teratogénicas (Sudip *et al.*, 2002).

La explotación e industrialización del petróleo, aunado al descontrolado consumo y deficiente disposición de este recurso, ha originado una seria preocupación concerniente al impacto que causa en el ambiente.

Las descargas industriales incontroladas presentan altos niveles de carga orgánica y toxicidad, afectando enormemente al medio ambiente (Uyttebroek M., 2007), por lo que es necesario aplicar medidas para controlar tales descargas hasta que presenten niveles permisibles de contaminantes, así como remediar la contaminación y la recuperación de los sistemas ambientales afectados.

En México existen normas para las descargas de sustancias orgánicas tóxicas, que obligan al industrial a dar seguimiento al control de descargas.

Existen diferentes tecnologías para el tratamiento de este tipo de descargas: tratamiento terciario, modificaciones a los procesos biológicos de tratamiento, combinaciones con procesos fisicoquímicos o procesos biotecnológicos avanzados utilizando microorganismos específicos, enzimas o microorganismos genéticamente modificados.

El tratamiento de las aguas residuales de este tipo de industrias debería incluir la remoción de compuestos orgánicos tóxicos recalcitrantes, evitando la propagación de la contaminación al ambiente o los subsecuentes problemas de transporte y confinamiento de residuos tóxicos o rellenos sanitarios.

La biodegradación de compuestos orgánicos específicos es una alternativa real para el control de la contaminación. El uso de cepas adaptadas a la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes y tóxicos es aplicable tanto al tratamiento de aguas residuales municipales e industriales como a la biorremediación de suelos y acuíferos. (Torres *et al*, 1997a).

1.2 Justificación

Durante la recolección de muestras ambientales en los “Estudios de Clasificación de los ríos: Coatzacoalcos, Conchos, Cazonas y Pánuco” desarrollados en el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua durante 1996-1997, era evidente la contaminación de

estos ríos debida a descargas y fugas de diferentes industrias petroquímicas, por lo que los HPAs fue uno de los parámetros seleccionados para su monitoreo. Aunque los procedimientos utilizados para el muestreo y análisis de los HPAs fueron los recomendados por organismos internacionales con amplia experiencia en el campo, las concentraciones encontradas de estos compuestos fueron menores a las esperadas con respecto a la contaminación observada en campo, suponiendo factores que favorecen su eliminación.

Park *et al.*, en 1990, documentaron serios problemas de contaminación por HPAs en suelos y agua, debido a descargas incontroladas de plantas de tratamiento de madera, plantas gaseras y refinerías de petróleo. Los HPAs son compuestos químicamente estables y fácilmente se adhieren a la materia orgánica del suelo, donde su atenuación se lleva a cabo primeramente por degradación microbiana y no por volatilización o foto oxidación, por lo que es importante entender sus vías de degradación por microorganismos del suelo.

Un compuesto orgánico en la naturaleza puede presentar diferentes reacciones, físicas, químicas y bioquímicas. Los HPAs en un cuerpo de agua superficial natural presentan los procesos físicos, volatilización y decantación entre otros; procesos fisicoquímicos, adsorción en sólidos sedimentables y distribución en agua y lípidos; procesos químicos, fotólisis, oxidación y reducción; y, procesos bioquímicos, como la degradación debida a bacterias o biodegradación (Howard *et al.*, 1991 y Chapman, 1996) por lo que la biodegradación es el factor más importante para su eliminación.

Los HPAs están diseminados en varios ecosistemas y son contaminantes de gran importancia debido a su toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad potenciales. Debido a su naturaleza hidrofóbica, la mayoría de los HPAs están enlazados a partículas de suelos y sedimentos, haciéndolos menos biodisponibles. La degradación microbiológica representa el mecanismo mayormente responsable para la recuperación ecológica de sitios contaminados con HPAs (Peng R. H., 2008) por lo que la

biodegradación, se proyecta como el proceso biológico para atenuar la contaminación y la detoxificación.

1.3 Hipótesis

El consorcio bacteriano elegido (ver punto 3.2.1) es capaz de degradar diez HPAs (ver 1.4) utilizándolos como única fuente de carbono en un medio acuoso aerobio.

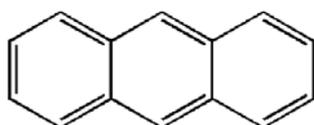
La degradación de cada HPA está dada por sus estructuras y características fisicoquímicas.

1.4 Selección de hidrocarburos polinucleoaromáticos

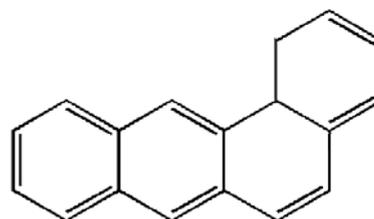
Debido a que en nuestro país la mayor contaminación ambiental es originada por la industria petroquímica el estudio se enfocó en los HPAs por ser constituyentes importantes del petróleo.

La U. S. EPA propone regulaciones para 16 HPAs considerados en su Lista de Contaminantes Prioritarios, para este estudio se seleccionaron solamente los siguientes diez, tomando en cuenta que presentan tres, cuatro, cinco y seis anillos aromáticos:

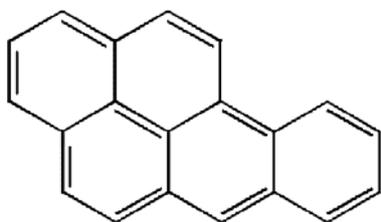
1.4.1 Antraceno



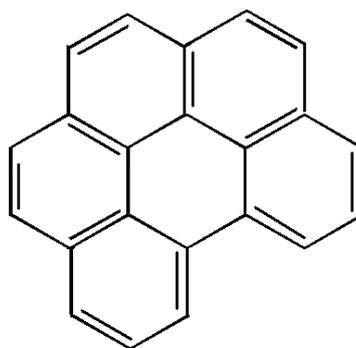
1.4.2 Benzo(a)antraceno



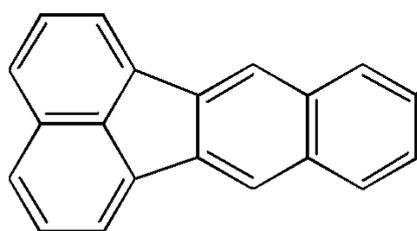
1.4.3 Benzo(a)pireno



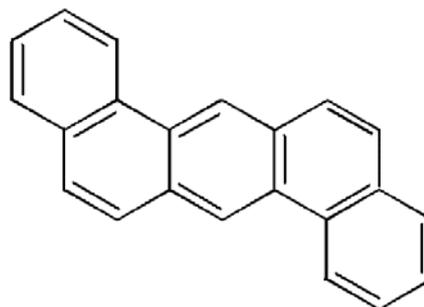
1.4.4 Benzo(g, h, i)perileno



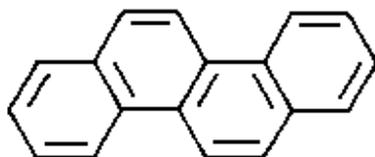
1.4.5 Benzo(k)fluoranteno



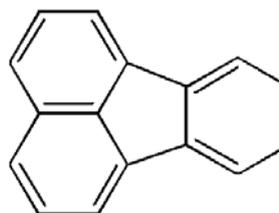
1.4.6 Dibenzo(a, h)antraceno



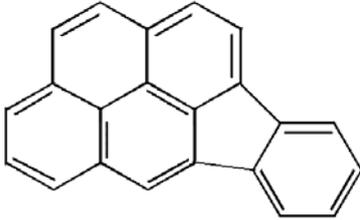
1.4.7 Criseno



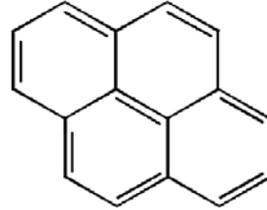
1.4.8 Fluoranteno



1.4.9 Indenopireno



1.4.10 Pireno



1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo Principal

Conocer la factibilidad de degradación, mediante un consorcio bacteriano, de diez hidrocarburos polinucleoarómicos seleccionados de la lista de contaminantes prioritarios.

1.5.2 Objetivos Particulares

- Adecuar un método de análisis químico para la detección y cuantificación de HPAs por cromatografía de gases/espectrometría de masas.
- Conocer la factibilidad de degradación de los HPAs con el consorcio bacteriano elegido en condiciones de temperatura ambiente.
- Determinar las cinéticas de degradación del sustrato por acción microbiana sobre los HPAs.
- Estudiar el efecto de la concentración de ciertos HPAs sobre su biodegradación.

- Analizar las características fisicoquímicas, estructurales y de toxicidad de los HPAs y encontrar la relación entre estructura de los HPAs y su biodegradabilidad.

1.6 Antecedentes

En 1994 Nielsen y Christensen probaron la biodegradación aerobia de diferentes compuestos aromáticos, entre ellos el naftaleno, tanto en agua como en sedimento. Los resultados mostraron degradación biológica, aunque no muy reproducible para el caso del naftaleno (Nielsen y Christensen, 1994).

En 1995 Bouchez aisló *Pseudomonas* y *Rhodococcus* de sitios industriales contaminados con brea y hulla, y con naftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno y elucidó el mecanismo bacteriano. Los sustratos mayormente disueltos en la fase acuosa mostraron mayor degradación. También caracterizó una serie de interacciones entre los sustratos involucrando cometabolismo, inhibición específica y en el caso de los más solubles la toxicidad.

En 1996 Johnsen realizó la caracterización de 41 biovariedades de *Pseudomonas fluorescens* que degradan fenantreno, aisladas de un sitio contaminado de gasificación de antracita. Las muestras de suelo fueron suspendidas en solución buffer de fosfatos. El sobrenadante fue incubado por 4 días a 20° C con el medio selectivo Gould's S1 para *Pseudomonas*. El cultivo fue transferido a cajas preparadas con 750 µl de fenantreno al 0.5 % (aproximadamente 250 mg/L referido al medio) e incubadas a 30° C por diez días. Aisló las bacterias de acuerdo a la degradación del fenantreno presentada por decoloración del medio. Aisló cerca de 522 colonias de las cuales 53 fueron capaces de degradar fenantreno (Johnsen, 1996).

En otro estudio realizado también con naftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno y en cultivos con *Rhodococcus* y *Pseudomonas*, Bouchez *et al* en 1996, determinaron los HPAs degradados a dióxido de carbono, biomasa y metabolitos

hidrosolubles, monitorearon la cinética de consumo de oxígeno y metabolitos hidrosolubles con equipo respirométrico. Los HPAs presentaron alta mineralización (56-77 % de carbón) y producción estimada de biomasa (16-35 % de carbón). La mineralización fue mayor y la biomasa menor en el caso de los HPAs pesados.

En 1996 Andersson y Henrisson probaron la degradación en suelo del antraceno, benzo(a)antraceno y dibenzoantraceno (HPAs de tres, cuatro y cinco anillos respectivamente) comparando la degradación ejercida de cinco hongos de pudrición blanca con la de microflora nativa. El suelo que utilizaron lo formaba el 94 % de arena, 2 % de materia orgánica (suelo estéril y natural). Con todas las especies hubo degradación, para el antraceno y benzoantraceno obtuvieron degradaciones > 90 %, para el dibenzoantraceno del 31 % en un período de 65 días. En el suelo esterilizado no encontraron reducciones de las concentraciones de los HPAs. El análisis cromatográfico no mostró mineralización de los HPAs, sólo rupturas parciales.

En 1996, Stutton *et al* 1996 probaron un consorcio compuesto por cinco especies de bacterias Gram (-) aisladas de un suelo contaminado con carbón, aclimatándolo con HPAs para la degradación de 4-metilquinolina y compuestos relacionados, pertenecientes a la subclase de HPAs, en condiciones aerobias. Realizaron las pruebas de biodegradación utilizando 100 mg/L de la 4-metilquinolina a 28° C por cinco días, la cuantificación la realizó por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Durante el proceso detectó la presencia de un primer metabolito y con su desaparición, la aparición de un segundo metabolito. La biodegradación se vio favorecida con el tratamiento por el consorcio y no con las especies individuales.

Valladares *et al.*, en 1997, estudiaron la degradación de petróleo refinado en medio acuoso, estableciendo a los HPAs como compuestos recalcitrantes altamente tóxicos y la biodegradación como su mecanismo de remoción natural. El consorcio microbiano I, lo aislaron de composta natural de *Agaricus bisporus* (constituida principalmente por material lignocelulósico) conteniendo 5 % de petróleo. El consorcio II, lo obtuvieron a partir de un suelo contaminado con gasolina. Los estudios de biodegradabilidad se

realizaron en matraces de 500 ml utilizando 200 ml de medio mineral modificado, las condiciones experimentales para el consorcio I fueron 10 % de inóculo y 14 000 ppm del petróleo y para el consorcio II de 7 000 ppm de gasolina. El pH fue de 6.9 con 15 días de incubación a 175 rpm. La determinación de los hidrocarburos la realizaron por diferencia de peso y por cromatografía de gases (CG). Los tipos de bacterias encontradas fueron Gram (-), cocos y bacilos cortos. Realizaron cinéticas de degradación, observando crecimiento en 7 días en el consorcio I, el consorcio II requirió un período de adaptación. Al final de los experimentos el pH bajo una unidad en los dos consorcios, el consorcio I presentó degradación del 90 % y el consorcio II del 79 %, suponiendo mayor degradación en el consorcio I debida a la existencia de cofactores (compuestos con estructuras aromáticas complejas).

Gómez *et al*, en 1997, estudiaron la degradación de benceno, tolueno y xileno por diferentes cepas, TOL, 2C y *P. fluorescens*, el xileno no fue degradado en forma independiente sino cuando se encontraba en presencia de los otros compuestos. Las concentraciones probadas de los compuestos fueron 5-50 mg/gramo (5000-50000 ppm).

Torres *et al*, en 1997b, estudiaron la biodegradación de mono-, di-, tri-, tetra- y pentaclorofenol (contaminantes en efluentes de industrias del papel, petróleo, petroquímica y plásticos sintéticos) con de degradación probadas a 200-600 mg/L (hasta una semana) no así para 800 mg/L (hasta dos semanas).

Un estudio de degradación por *Pseudomonas fluorescens* de cuatro plaguicidas entre ellos dos HPAs clorados (aldrín y dieldrín) mostraron excelentes porcentajes de remoción en soluciones de 10 mg/L compuesto en fase aerobia (Bandala *et al*, 1997).

En 1998 Richardson y Álvarez-Cohen 1998, probaron bacterias mesofílicas (15-35 °C) y bacterias termofílicas (45-55 °C) para la remoción de HPAs, obteniendo mejores resultados con estas últimas.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Procesos de sistemas biológicos

Los procesos de sistemas biológicos se utilizan para la remoción de contaminantes orgánicos disueltos o coloidales de las aguas residuales a través de la biodegradación debida a microorganismos, bacterias, protozoarios, rotíferos, hongos y algas para transformar la materia orgánica, que sufre diferentes reacciones de biotransformación. Estos procesos son muy eficientes.

Inicialmente los sistemas biológicos fueron utilizados exclusivamente para remover materia orgánica contenida en agua residual o para la estabilización de lodos residuales, practicando sólo algunas pruebas de laboratorio, tales como la determinación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), la demanda química de oxígeno (DQO) y los sólidos suspendidos (SS).

En los procesos de sistemas biológicos, los compuestos orgánicos contaminantes son transformados de estructuras químicas complejas a estructuras químicas más simples, si la transformación es completa, sus productos finales son dióxido de carbono y agua (CO_2 y H_2O respectivamente) aunque por contener materia orgánica también se obtienen amoníaco (NH_3), metano (CH_4) y material sedimentable (biomasa).

En estos sistemas biológicos se utilizan reactores con el fin de incrementar la velocidad de transformación de la materia orgánica, siendo muy importante la dinámica de la población bacteriana, la cual depende de varios factores como el pH, la temperatura, la disponibilidad y concentración de macronutrientes y micronutrientes, la presión osmótica, el tipo y concentración del sustrato, los aceptores de hidrógeno, las toxicidades del medio, sustratos y productos intermedios, el nivel y el tipo de mezclado principalmente.

Los sistemas biológicos pueden ser aerobios, anaerobios o combinados, dependiendo

de la presencia, ausencia o presencia/ausencia de oxígeno respectivamente. En los procesos aerobios los microorganismos aceptan electrones del oxígeno para realizar su respiración. El oxígeno molecular también es requerido como cosustrato en la biotransformación de una amplia variedad de compuestos químicos orgánicos incluyendo a los HPAs.

Existen procesos donde los microorganismos se encuentran suspendidos o fijos. Los primeros son sistemas de lodos activados, ya sean convencionales y sus variantes, en lagunas aereadas o de estabilización y en diferentes tipos de digestores anaerobios. Los segundos son sistemas de película fija como los biofiltros y los biodiscos.

Debido al conocimiento acerca de la toxicidad de muchos compuestos orgánicos complejos en aguas residuales, se han incrementado tecnologías para degradarlos o transformarlos, desarrollándose numerosas ramas de estudio, como el análisis detallado del comportamiento, la capacidad y cinética de degradación-transformación de compuestos específicos y de los procesos involucrados, las pruebas para identificar los efectos de inhibición, los procesos de adaptación de microorganismos, las actividades metabólicas y genéticas de las diferentes especies de microorganismos y su interacción en la comunidad microbiana que llevan a cabo el proceso de degradación-transformación.

2.2 Transformación de compuestos orgánicos

La mineralización es la conversión completa de un compuesto orgánico a los productos finales de dióxido de carbono y agua.

Un compuesto es biodegradable cuando por la acción de los microorganismos puede ser convertido a otro compuesto. No siempre la biodegradación de un compuesto es completa, simplemente es biotransformado a otro u otros compuestos llamados metabolitos intermedios.

La remoción de algunos compuestos también puede deberse a fenómenos de adsorción en la biomasa o bioadsorción. La persistencia de compuestos biodegradables puede deberse a la ausencia de condiciones y factores favorables que permitan su biodegradación.

Los compuestos orgánicos que no pueden ser transformados bajo ningún factor natural abiótico se les conoce como compuestos refractarios o recalcitrantes. Los HPAs se consideran compuestos recalcitrantes junto con muchos otros compuestos, como los plaguicidas; Sin embargo, existen microorganismos que son capaces de transformar un gran número de compuestos refractarios o recalcitrantes, con la intervención de factores que favorecen su biotransformación; En su gran mayoría, los compuestos orgánicos recalcitrantes solo son transformados a metabolitos intermediarios y a su vez ser utilizados por otras especies microbianas.

Muchos compuestos orgánicos son tóxicos para las bacterias, inclusive algunos de los metabolitos intermedios pueden llegar a presentar mayor toxicidad que los compuestos orgánicos iniciales, si la toxicidad de estos metabolitos intermedios llega a ser tal que detenga el proceso de biodegradación, se les clasifican como bioinhibidores.

Los compuestos orgánicos hidrosolubles son más fácilmente biotransformados que los que no lo son, debido a que pueden atravesar la membrana celular por simples fenómenos de transporte y como consecuencia son más rápidamente degradados en el interior de las células. Los compuestos con enlaces químicos dobles o triples (enlaces π) se degradan más fácilmente que los compuestos con enlaces simples (enlaces σ) debido a que por ser de mayor energía son más reactivos. Los compuestos orgánicos tales como alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos, amidas y aminoácidos son más biodegradables debido a sus propios grupos funcionales que presentan mayor reactividad que los correspondientes alcanos, alquenos, cetonas, ácidos dicarboxílicos, aminas y cloroalcanos.

2.3 Biodegradación

2.3.1 Biodegradación bacteriana

El proceso por el cual los microorganismos crecen y obtienen su energía es complejo. Primero se requiere que los nutrientes que existen en un medio sean absorbidos intracelularmente, esto se realiza por medio de diferentes mecanismos, una vez dentro de la célula, los nutrientes van siendo transformados a través de muy diversas reacciones bioquímicas y en muy diferentes rutas o vías metabólicas, en las cuales intervienen un sinnúmero de enzimas específicas; así, los nutrientes son transformados a un gran número de específicos metabolitos intermedios sirviendo a los microorganismos para elaborar su material celular y para su desarrollo.

Cuando la materia orgánica es más compleja, ciertos microorganismos pueden producir exoenzimas que hidrolizan los compuestos orgánicos, permitiendo su absorción dentro de las células y utilizarla en la síntesis celular, debido a que dichos microorganismos necesitan producir tales exoenzimas, requieren de mayor tiempo para que la materia orgánica sea biodegradada.

Las enzimas tienen un alto poder catalítico para convertir el sustrato en productos finales. Una sola molécula de enzima puede convertir muchas moléculas de sustrato por minuto en productos finales.

La biodegradación es una función de los microorganismos para transformar moléculas complejas a moléculas más sencillas y así poder utilizarlas en su desarrollo y como fuente de energía (Zilinskas, 1997; Torres *et al.*, 1997a; y Trejo y Quintero, 1997). Cuando el medio es aerobio, los microorganismos degradan la materia orgánica produciendo dióxido de carbono, agua y energía. Esta energía es utilizada por el microorganismo para su crecimiento, reproducción, movilidad y respiración (Torres *et al.*, 1997a).

Las enzimas son proteínas que pueden plegarse sobre sí mismas presentando conformaciones espaciales, llamadas estructuras terciarias o cuaternarias de las proteínas. Es debido a dicha conformación espacial y a la presencia de ciertos cofactores que las reacciones que se llevan a cabo.

Si la conformación espacial de las enzimas se ve modificada por la presencia de otras sustancias químicas, se inhiben sus funciones originando la acumulación de uno o varios de los metabolitos intermedios.

Una razón muy importante por la que las bacterias son eficientes en la biodegradación es debido a que poseen estos sistemas enzimáticos, capaces de oxidar compuestos inertes bioquímicamente, como los alcanos y los anillos saturados e insaturados que no presentan reacciones de hidrogenación.

Existen algunos problemas en los procesos de biodegradación, cuando se han aplicado diversas cepas para el tratamiento de contaminantes, la existencia de sustratos concomitantes que son mucho más atractivos para los microorganismos especializados que el compuesto a degradar, cuando el sustrato no está disponible permanentemente y su concentración varía y cuando existen microorganismos depredadores.

La tasa de biodegradación que sufren los compuestos xenobióticos depende del tipo y número de organismos biodegradadores presentes; de las características, concentración y biodisponibilidad del contaminante; de la presencia y biodisponibilidad de los nutrientes y micronutrientes en el medio; de los aceptores de hidrógeno y la presión osmótica, de otros factores como la toxicidad del medio y los productos intermedios, además del nivel y tipo de mezclado. Existe suficiente información acerca de los derivados dihidroxilados que se forman en la biodegradación de los compuestos aromáticos antes del rompimiento del anillo (Torres *et al.*, 1997).

2.3.2 Biodegradación de compuestos orgánicos recalcitrantes

Para favorecer la biodegradación de los compuestos orgánicos recalcitrantes, que no pueden ser transformados bajo ninguna circunstancia ambiental, se han realizado estudios de biodegradación de contaminantes específicos modificando diferentes factores y cofactores:

- El uso de tensoactivos, que favorecen la solubilidad de los compuestos recalcitrantes, sobre todo cuando presentan características hidrofóbicas (Chávez *et al.*, IMP, 1997). Se ha estudiado el aumento de la biodisponibilidad y biodegradación de naftaleno en suelo contaminado mediante el uso de un surfactante no-iónico (Ramírez y Gutiérrez, 1997)
- Por otro lado se han estudiado las cinéticas de degradación de ciertos HPAs por microorganismos específicos en suelo contaminado, utilizando aditivos como cafeína para incrementar su biodisponibilidad (Grimmer, 1995) y se han introducido cultivos microbianos degradadores para estimular su degradación, en suelo (Mahro *et al.*, 1996).

Se han modificado factores comunes de temperatura, pH, volumen de trabajo, modificando concentraciones de los nutrientes N y P y utilizando consorcios nativos y también bacterias exógenas (Trejo y Quintero, 1997).

Se ha variado el número de Reynolds para la mejor degradación de hidrocarburos del petróleo. (Aguilera-Vázquez, 1997).

Se ha practicado la biodegradación de ciertos HPAs y otros compuestos recalcitrantes a diferentes concentraciones, en suelo y mezcla de suelo-composta. (Kastner y Mahro, 1996; Eitzer, 1996).

Se ha ensayado la biodegradación de ciertos HPAs por microorganismos específicos, elucidando metabolitos (Schneider, 1996) y se ha estudiado en campo la habilidad del hongo degradador de lignina *Phanerochaete sordida* para la biodegradación de creosota, PCP y HPAs, en suelos contaminados (Kirk *et al*, 1995).

Además de estudiar la biodegradabilidad de compuestos específicos, se han desarrollado también estudios de identificación de los microorganismos que constituyen la biocomunidad en los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales, sus interacciones y capacidad de biodegradación, existiendo un vasto campo de estudio para conocer especies bien determinadas de microorganismos biodegradados de compuestos orgánicos recalcitrantes; cabe señalar que el porcentaje de microorganismos biodegradadores que han sido identificados es muy bajo.

2.4 Los microorganismos

Los microorganismos están constituidos por:

- La pared celular. Es una membrana flexible o rígida.
- Flagelos o cilios. Son apéndices de apariencia capilar y dan movilidad a las células.
- El citoplasma. Es una suspensión coloidal de nutrientes, proteínas, carbohidratos y otros compuestos orgánicos complejos, contienen también otros metabolitos.
- El núcleo celular. Es rico en ácidos nucleicos (ADN o ARN) que contienen toda la información genética necesaria para su reproducción y elaboración de todos sus componentes celulares. Algunas veces los microorganismos no presentan una membrana celular bien definida pero el material genético se encuentra próximo entre sí y aglutinado.
- Diferentes organelos para completar sus funciones metabólicas.

Para su desarrollo, los microorganismos requieren de al menos una fuente de carbono para la síntesis de su material celular, de energía, de macronutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio, y de ciertos micronutrientes vitales para la síntesis celular, como

azufre, calcio y magnesio, entre otros. De acuerdo a la fuente de carbono que utilizan pueden ser autótrofos o heterótrofos; son microorganismos autótrofos si utilizan dióxido de carbono (carbono inorgánico) para su desarrollo y son microorganismos heterótrofos si utilizan carbono orgánico.

Ya que los microorganismos también requieren de energía para su desarrollo, los autótrofos obtienen esa energía a partir del sol, como en la fotosíntesis, mientras que los microorganismos heterótrofos obtienen su energía a través de sus diferentes reacciones metabólicas como las de óxido-reducción. Si la energía utilizada por los microorganismos es solar se clasifican como autótrofos fotosintéticos; si la energía es proporcionada por reacciones como la óxido-reducción se les conoce como autótrofos quimiosintéticos. Los heterótrofos reciben la energía requerida para la síntesis celular de la oxidación o fermentación de la materia orgánica.

2.4.1 Crecimiento bacteriano

Crecimiento microbiano es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo. No se refiere al crecimiento de un único microorganismo o su ciclo celular, sino al aumento de la población bacteriana.

Ciclo celular es el proceso de desarrollo de una bacteria considerada de forma aislada. A lo largo del ciclo celular, tiene lugar la replicación del material genético de la bacteria, la síntesis de sus componentes celulares, el crecimiento para alcanzar un tamaño mayor al inicial y su división por bipartición de la bacteria para dar lugar a dos células hijas.

El crecimiento de una población resulta de la suma de los ciclos celulares de todos sus individuos. Cada individuo se encuentra en un punto diferente del ciclo celular. Por consiguiente, en un momento determinado en una población se encuentran células que acaban de dividirse, otras que están replicando su ADN y elongándose, otras que están iniciando la división celular, etc.

Las bacterias crecen siguiendo una progresión geométrica en la que el número de individuos se multiplica al cabo de un tiempo determinado llamado tiempo de generación.

Si la bacteria crece en un medio líquido, las células reproducidas continúan su vida independientemente, en la mayoría de los casos forman una suspensión de células libres.

Si la célula es aislada y comienza a crecer sobre un substrato sólido, el resultado del crecimiento al cabo del tiempo es una colonia.

Se llama unidad formadora de colonia (UFC) a una célula viva y aislada en un sustrato, que se encuentra en la superficie o suspendida dentro de un medio semisólido, que bajo condiciones ambientales adecuadas produce una colonia del orden de decenas de millones de células descendientes en un lapso de tiempo determinado.

Una UFC puede corresponder a más de un tipo de célula cuando éstas forman parte de grupos unidos fuertemente (estreptococos o diplococos, por ejemplo) ya que cada grupo formará una sola colonia.

Desde el punto de vista microbiológico, un microorganismo muere cuando pierde de forma irreversible la capacidad de dividirse. El fundamento de esta definición es que si un microorganismo ha perdido la capacidad de dividirse no podrá formar una colonia sobre un medio de cultivo y no será posible detectar su presencia por los **métodos** microbiológicos tradicionales.

Es decir, cuando no se produce aumento en el número de microorganismos no hay crecimiento. Sin embargo, un microorganismo puede estar muerto desde el punto de vista microbiológico y continuar desarrollando una actividad metabólica que se traduzca, por ejemplo, en liberación de toxinas.

Por otra parte, hay que considerar que la capacidad de multiplicación (crecimiento) de un microorganismo puede verse transitoriamente afectada por lesiones o por las condiciones físicas o químicas del entorno. En estos casos, podríamos considerar como muertos a microorganismos que pueden reanudar su crecimiento si las condiciones son de nuevo favorables.

Medida de la masa celular. El sistema se basa en que las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo. La turbidez depende de la masa en suspensión y, por tanto, midiendo esta se puede estimar aquella. Este es el parámetro de medida más fácil de usar en los cultivos de laboratorio.

En un cultivo bacteriano en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano (Fig. 1):

- Fase lag o de adaptación. Durante la que los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (de abundancia de nutrientes) para poder iniciar el crecimiento exponencial o logarítmico.
- Fase exponencial o logarítmica. En ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima. Esta fase corresponde a la de multiplicación o crecimiento bacteriano, N corresponde al número de bacterias.
- Fase estacionaria. En esta fase no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo) las células desarrollan un metabolismo diferente al de la fase de exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios.

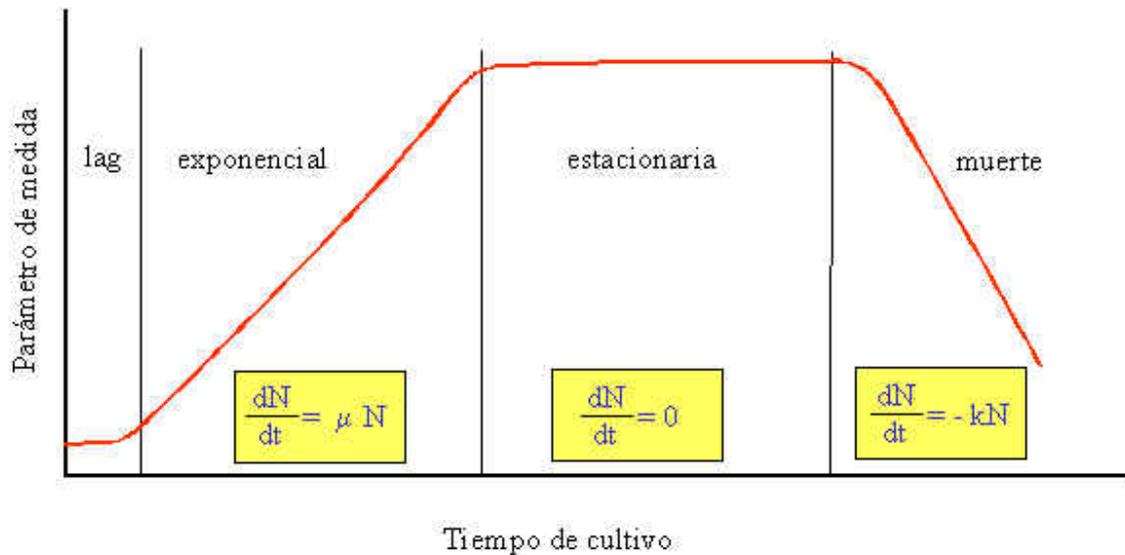


Figura 1. Fases del crecimiento bacteriano

Los microorganismos entran en fase estacionaria bien porque se agota algún nutriente esencial del medio, porque los productos de desecho que han liberado durante la fase de crecimiento exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano o bien por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento.

La fase estacionaria tiene gran importancia porque probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en muchos ambientes naturales.

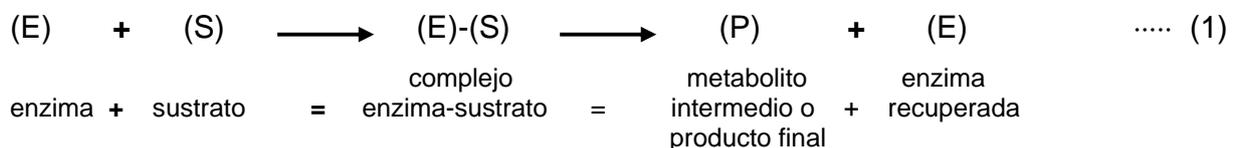
Fase de muerte. Se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo. Las fases, parámetros y cinética de crecimiento discutidas para el caso de los medios líquidos se presentan también en los sólidos. La cinética de crecimiento, en este caso, sólo se puede seguir utilizando unos sistemas de detección especiales siendo el más sencillo, la medida del número de células viables por unidad de superficie o por unidad de masa.

2.4.2 Reacciones enzimáticas

Las enzimas actúan como catalizadores para que se lleven a cabo reacciones determinadas, la reacción de una enzima determinada forma parte de una vía metabólica y una vía metabólica es un sinnúmero de reacciones enzimáticas. En cada reacción, la enzima forma un compuesto complejo con el sustrato transformándolo en un metabolito intermedio y entonces lo libera quedando la enzima disponible para seguir reaccionando con más sustrato, el metabolito intermedio en el que fue transformado el sustrato puede reaccionar con otra enzima (diferente a la anterior) que a su vez lo transforma en otro metabolito intermedio diferente. De hecho, puede formarse una secuencia de complejos y productos antes de llegar al producto final.

Las enzimas tienen un alto grado de especificidad respecto al sustrato, la célula debe producir una enzima específica para cada sustrato que utiliza.

Una reacción enzimática puede representarse por la siguiente ecuación:



La actividad de las enzimas varía de acuerdo al pH, la temperatura y otros factores como la concentración del sustrato, teniendo un pH y temperatura óptimos en la que presentan mayor reactividad. Las enzimas requieren de mucho menor energía en la formación de metabolitos intermedios y productos en comparación con la energía que liberan los productos cuando son utilizados para que la célula realice sus funciones; como en caso de la formación del adenosin trifosfato (ATP) que al liberar un radical fosfato y transformándose adenosin difosfato (ADP) desprende una gran cantidad de energía que es utilizada para que la célula realice sus funciones de movilidad o síntesis, mientras que para la recreación de una nueva molécula de ATP a partir de la molécula de ADP y un radical fosfato requiere de mucho menor energía por ser una reacción del tipo enzima-sustrato.

Las reacciones bioquímicas son muy complejas, en general existen dos tipos de reacciones: las de síntesis que requieren de poca energía cuando se forman metabolitos (reacciones anabólicas) y las que liberan o producen gran cantidad de energía cuando los metabolitos son destruidos (reacciones catabólicas).

2.5 Bioquímica de los procesos de tratamiento biológico

A diferencia de los cuerpos de agua, donde los microorganismos se desarrollan naturalmente, en los procesos de tratamiento biológico los microorganismos se desarrollan bajo condiciones controladas. Con base en su metabolismo los microorganismos se dividen en tres clases: aerobios, anaerobios y facultativos.

Los microorganismos aerobios se desarrollan en presencia de oxígeno y los anaerobios en ausencia del mismo, mientras que los facultativos tienen la capacidad de desarrollarse en ambos medios.

Debido a las diferentes condiciones, los sistemas de tratamiento presentan entre sí diferentes características microbiológicas, así como en sus aplicaciones, su ingeniería y su control. La materia orgánica es utilizada por los microorganismos y transformada en diferentes productos dependiendo del metabolismo aerobio o anaerobio de la célula.

Los microorganismos anaerobios utilizan alrededor del 10 % de la energía contenida en el sustrato para su reproducción y el 90 % restante lo utilizan para la evolución de gas metano, mientras que los microorganismos aerobios utilizan del 60 al 65 % de la energía del sustrato en la formación de nuevas células y el resto es disipado en forma de calor.

2.6 Cinética del crecimiento bacteriano

Se le llama cinética del crecimiento bacteriano a la velocidad con la que una población

microbiana crece, y depende de las características de los nutrientes presentes y sus concentraciones.

En los sistemas de tratamiento biológico mixto, cada microorganismo tiene su propia curva de crecimiento.

La etapa y la forma de las curvas de crecimiento en el sistema dependen de la naturaleza y disponibilidad de los nutrientes, así como de los factores ambientales, el control de estos, incluyendo el suministro adecuado de nutrientes, asegura que los microorganismos tengan condiciones favorables para desarrollarse.

Para asegurar un buen funcionamiento de un sistema biológico continuo se requiere controlar todos los factores y que los microorganismos permanezcan el tiempo necesario en el sistema para su reproducción. La descomposición de la materia orgánica se puede controlar una vez conociendo la tasa de crecimiento de los microorganismos.

2.7 Técnicas de laboratorio

Las principales matrices en las que se han estudiado los HPAs son suelos, sedimentos, agua y peces. También existen estudios de hidrocarburos en aire, aunque en menor proporción debido a que no han recibido la importancia debida.

La recolección de muestras es un paso muy importante, se debe asegurar que el hidrocarburo de interés debe permanecer en la muestra hasta su extracción y posterior análisis, el muestreo se realiza utilizando botellas de vidrio limpias, lavadas y libres de cualquier posible contaminación por hidrocarburos, las muestras deben ser refrigeradas y almacenadas en la oscuridad. Si la muestra no es extraída inmediatamente, se debe añadir un preservativo, para prevenir proliferaciones bacterianas.

La metodología para analizar HPAs se divide en dos etapas, la primera incluye la extracción o separación de los HPAs de la matriz ambiental en la que se encuentran, bien puede ser extracción líquido-líquido, en el que los HPAs son transportados a un medio líquido de baja polaridad química, o bien puede ser por extracción líquido-sólido, donde la muestra es filtrada utilizando películas o filtros que retienen los HPAs, entonces son transportados en refrigeración y protegidos de la luz al laboratorio. Posteriormente el hidrocarburo es recuperado de la película o filtro con diferentes tipos de disolventes orgánicos. La segunda etapa incluye la determinación del HPA específico y su cuantificación por cromatografía de gases o de líquidos, acoplada a diversos detectores específicos altamente confiables.

El análisis de hidrocarburos en sedimentos considera almacenar las muestras a temperaturas muy bajas (-20°C) en la oscuridad (Schumacher, B.A. y J.H. Zimmerman, 2004). La extracción en sedimentos se realiza con disolventes apropiados en un baño ultrasónico o se realiza utilizando un equipo Soxhlet también con disolventes apropiados por períodos hasta de 72 horas, con recambio diario de disolvente.

El aislamiento de hidrocarburos desde diferentes lípidos, provenientes de tejidos animales, se realiza por la separación por cromatografía de columnas adsorbentes o cromatografía de capas fina. Para columnas cromatográficas, se utiliza sílica gel con una cama de alúmina. La elusión con un disolvente polar y no polar, permiten el aislamiento de varias fracciones saturadas, insaturadas, hidrocarburos aromáticos y componentes polares (metil-ésteres, alcoholes, ácidos, fenoles y compuestos heterocíclicos). La interferencia de ésteres encontrados en el aislamiento de hidrocarburos aromáticos se puede evitar, con la separación previa por saponificación de los ésteres de ácidos grasos, los que son removidos fácilmente.

El análisis del compuesto por cromatografía de gases se realiza inyectando con una microjeringa directamente junto a un septum en un vaporizador en la columna. El análisis puede ser realizado utilizando un capilar o un soporte de columnas lleno con varios sustratos polares o apolares.

La combinación de cromatografía de gases y espectrometría de masas representan una técnica analítica de gran velocidad, sensibilidad y gran selección durante la extracción. Actualmente, la U. S. EPA ofrece métodos de extracción y análisis de hidrocarburos a partir de diferentes matrices ambientales, considerando también el control de calidad para asegurar los resultados analíticos.

La U. S. EPA establece la determinación de la concentración de los HPAs dentro del gran grupo de compuestos orgánicos semivolátiles, método 8270C, en extractos preparados a partir de todo tipo de matrices de residuos sólidos, suelos y agua subterránea. Esta metodología establece que para el análisis de estos compuestos a partir de muestras de agua, sean utilizadas grandes cantidades de muestra, desde uno hasta varios litros. Para realizar el presente estudio, fue necesario adaptar dicha metodología para extraer los HPAs a partir de cantidades muy pequeñas de muestra, un mililitro, y fue necesario determinar las condiciones óptimas de trabajo, desde el manejo de muestra y de materiales hasta el adecuado manejo de aparatos e instrumentos de laboratorio, a fin de que los resultados a obtener fueran confiables, analizar las premisas y llegar así a conclusiones apropiadas, para conocer más acerca de la biotransformación de estos compuestos, que son de gran importancia en el marco de la contaminación ambiental.

3 METODOLOGÍA

3.1 Experimentación

La fase experimental se dividió en dos partes: La primera comprende el estudio del comportamiento, crecimiento, del consorcio bacteriano seleccionado (ver 3.2.1) con cada HPA (ver 3.2.2) realizando diez pruebas, cada una por duplicado para contar con un mínimo de resultados comparables (Boccafusco *et al*, 1981). En las diez pruebas, la concentración del HPA fue exactamente medida y cercana a 50 mg/L; posteriormente, sólo dos de los HPAs, el benzo(a)pireno y el dibenzo(a,h)antraceno, se ensayaron a dos concentraciones más cada uno, 25 y 5 mg/L, también desarrollándolas por duplicado. La medición de la biomasa en las pruebas se estimó de forma indirecta al determinar su densidad óptica.

La segunda parte comprendió la extracción, detección y cuantificación del compuesto en estudio, remanente en el seno de las pruebas. Los ensayos para la implementación del método analítico fue realizada antes de efectuar las pruebas de degradación, con el fin de determinar de inmediato los compuestos de interés.

La primera fase de la experimentación fue realizada en el Laboratorio de Bioprocesos del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México, la segunda parte de la experimentación se realizó en el Laboratorio de Cromatografía de Química Analítica del Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.

3.2 Materiales y reactivos

3.2.1 Consorcio bacteriano

En los experimentos se utilizó un consorcio bacteriano liofilizado llamado Polytox, comercializado por Polybac Co. en Bethelhem, PA (Estados Unidos) y utilizado principalmente para realizar pruebas rápidas de toxicidad biológica con diferentes fines.

El inóculo se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante cuando es utilizado en las pruebas rápidas de toxicidad, suspendiendo 1.6 g del material liofilizado en 250 ml de agua de dilución (ver punto 3.2.5) y se agitó durante un minuto, entonces se permitió un minuto de sedimentación y el sobrenadante estuvo listo para ser utilizado.

3.2.2 Hidrocarburos polinucleoaromáticos

La calidad de los HPAs probados fue material de referencia marca Chem Service con certificado de análisis.

Se prepararon soluciones stock de cada uno de los diez HPAs en dimetilsulfóxido, conteniendo aproximadamente 1,500 ppm del compuesto,

3.2.3 Reactivos

3.2.3.1 Grado analítico

- a) Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)
- b) Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)
- c) Fosfato dibásico de sodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
- d) Cloruro de amonio (NH_4Cl)
- e) Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
- f) Cloruro de calcio (Ca_2Cl)
- g) Cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)
- h) Sulfato de sodio anhidro granular (Na_2SO_4)
- i) Dimetilsulfóxido, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$
- j) Agua destilada
- k) Ácido sulfúrico 6 N

3.2.3.2 Grado especial

- a) Diclorometano (CH_2Cl_2) nanogrado

3.2.4 Disoluciones necesarias para el agua de dilución

- a) Disolución buffer de fosfatos: Se disolvieron 8.5 g de KH_2PO_4 , 21.75 K_2HPO_4 , 33.4 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 1.7 g de NH_4Cl en 500.0 ml de agua destilada.
- b) Disolución de sulfato de magnesio: Se disolvieron 22.5 g de $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ en 1000.0 ml de agua destilada.
- c) Disolución de cloruro de calcio: Se disolvieron 27.5 g de Ca_2Cl en 1000.0 ml de agua destilada.
- d) Disolución de cloruro férrico: Se disolvieron 0.25 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ en 1000.0 ml de agua destilada.

3.2.5 Agua de dilución

El agua de dilución se burbujeó inicialmente con aire durante 30 minutos afín de saturarla de oxígeno, posteriormente se agregó 1.0 ml de cada una de las siguientes disoluciones por litro de agua de dilución: buffer de fosfatos, sulfato de magnesio, cloruro de calcio y cloruro férrico.

3.2.6 Material de vidrio

Matraces erlenmeyer de 250 ml.

Embudos de separación de 500 ml con tapón de vidrio y llave de teflón.

Embudos de filtración rápida.

Matraces de 250 ml de cuello esmerilado 24/40.

Viales de vidrio de 4 ml con tapón de rosca y septa de teflón.

Viales de vidrio de 2 ml con tapón de rosca y septa de teflón.

Pipetas Pasteur de 8 pulgadas.

Pipetas graduadas de 5 ml.

Microjeringas de 10 μ l.

Vasos de precipitados de 250.

Vasos de precipitados de 500 ml.

Tubos de ensaye de 150 X 200 mm con tapón de rosca.

3.2.7 Otros materiales

Soportes universales.

Tapones de algodón.

Fibra de vidrio.

Micropipetas Drummond de 25, 50, 100 y 200 μ l.

Cinta de papel adhesivo.

Papel aluminio.

3.3 Equipos

Agitador orbital Barnstead, velocidad variable de 16 plazas.

Espectrofotómetro de UV/VIS Spectronic modelo 20D de longitud de onda variable.

Refrigerador Forma Scientific.

Agitador multiplazas Burrel 75.

Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series II con inyector automático HP7973 acoplado a espectrómetro de masas HP 5971, equipado con columna capilar de sílica fundida al 5 % de fenilmetilsilicona de 0.2 μ X 0.2 mm X 20 m .

Rotavapor Büchi PE121.

Baño de vapor Büchi 461.

Recirculador a temperatura constante Lauda RM20.

Balanza analítica Sartorius AC210P.

3.4 Experimentos

3.4.1 Tipos de experimentos

A) Blanco de células. Interacción del consorcio bacteriano con los nutrientes minerales, sin fuente alguna de carbono.

B) Blanco del compuesto. Interacción del hidrocarburo poliaromático con los nutrientes minerales, sin presencia del inóculo.

C) Pruebas. Interacción del consorcio bacteriano, en presencia de nutrientes minerales, con el hidrocarburo poliaromático en correspondiente, como única fuente de carbono.

D) Biotransformación del correspondiente hidrocarburo poliaromático debida al consorcio y determinación de su cinética de biodegradación.

3.4.2 Preparación de las pruebas

Las pruebas fueron llevadas a cabo en matraces erlenmeyer de 250 ml con tapón de algodón, los cuales contenían 50 ml de mezcla total de reacción. En todos los casos los matraces contenían el agua de dilución que proveía de los nutrientes minerales (Tabla 1).

3.4.3 Preparación del blanco de células

Al matraz se agregaron 45 ml de agua de dilución y 5 ml del inóculo, de tal forma que en el seno de la prueba no existió material alguno que pudiera ser utilizado por el consorcio como fuente de carbono (Tabla 1).

3.4.4 Preparación del blanco del compuesto

Se agregó al matraz 40 ml aproximadamente de agua de dilución, la cantidad necesaria del HPA para obtener una concentración aproximada de 50 mg/L al completar el volumen a 50 ml con agua de dilución. Este matraz no contenía inóculo (Tabla 1).

3.4.5 Preparación del matraz: HPA-consorcio

Conteniendo el matraz 40 ml aproximadamente de agua de dilución, se agregaron 5 ml de inóculo y la cantidad necesaria del HPA para obtener una concentración aproximada de 50 mg/L más al completar el volumen a 50 ml con agua de dilución; de esta forma el matraz contiene el inóculo y al compuesto como fuente única de carbono en presencia de nutrientes (Tabla 1). Este tipo se realizó por duplicado (pruebas A y B) para poder contar con un mínimo de resultados comparables (Buccafusco *et al*, 1981).

Tabla 1. Conformación de las prueba

Prueba	Agua de dilución (ml)	Inóculo (ml)	Concentración del compuesto (mg/L)	Volumen de reacción (ml)
Blanco de células	45	5	0	50
Blanco del HPA	50	0	50	50
Prueba A	45	5	50	50
Prueba B	45	5	50	50

3.5 Condiciones de reacción, seguimiento y toma de muestras

Los matraces se incubaron a 32 °C y se sometieron a agitación orbital de 150 rpm durante 144 horas.

Para la estimación de la biomasa, se tomó 1.0 ml de la mezcla de reacción al inicio y al final de los experimentos para cada uno de los HPAs probados.

Para determinar la concentración de los HPAs se tomó 1.0 ml de la mezcla de reacción al tiempo 0, y después cada 24 horas hasta completar las 144, esto es a las 24, 48, 72, 96 y 144 horas.

3.6 Estimación de la biomasa

La biomasa se estimó indirectamente al determinar la densidad óptica de la mezcla de reacción de cada uno de los HPAs: Se tomó 1.0 ml de la mezcla de reacción y se diluyó a 5.0 ml con agua destilada, se midió su absorbancia a 610 nm en espectrofotómetro UV/VIS al inicio y al final del experimento.

3.7 Determinación de los HPAs

La identificación y cuantificación de los HPAs se realizó en dos etapas:

La etapa uno consistió en extraer el correspondiente HPA de la prueba de biodegradación, a través de extracciones líquido/líquido con diclorometano, posteriormente el extracto orgánico se secó con sulfato de sodio anhidro y, la etapa dos comprendió el análisis en un sistema de cromatografía de gases con columna capilar de polaridad intermedia, acoplado a un espectrómetro de masas como detector (GC-MSD por sus siglas en inglés).

La principal modificación de la metodología utilizada en este estudio para la extracción y cuantificación de los HPAs, con respecto a la establecida por la U. S. EPA para muestras de agua, es el volumen de muestra. Mientras que la U. S. EPA señala uno o más litros de muestra, en este estudio se utilizó solamente un mililitro de muestra, exigiendo que la manipulación de la muestra fuera más cuidadosa, ya que cualquier pérdida de material es de suma importancia.

3.7.1 Extracción del HPA de la prueba de biodegradación

La extracción del correspondiente HPA se practicó de dos maneras:

A. Se tomó 1.0 ml de la mezcla de prueba y se colocó en un embudo de separación, se diluyó a 250 ml con agua destilada, se adicionó ácido sulfúrico 6 N hasta obtener un pH ≤ 2 , posteriormente se extrajo con tres porciones de diclorometano de 25 ml cada una, las fases orgánicas se secaron haciéndolas pasar por una cama de sulfato de sodio anhidro granular. El extracto seco se concentró en rotavapor a presión reducida a no más de 40 °C hasta llegar a un volumen aproximado de un mililitro. El extracto concentrado se trasvasó cuantitativamente a un vial de 4 ml enjuagando el matraz de destilación con 1 ml de diclorometano por tres ocasiones. El extracto trasvasado cuantitativamente se evaporó a 1 ml con corriente de nitrógeno seco, obteniéndose de esta forma el extracto del HPA correspondiente en diclorometano seco.

B. En un vial de 4 ml se colocó 1.0 ml de la mezcla de prueba, se adicionaron dos gotas de ácido sulfúrico 6 N hasta obtener un pH ≤ 2 , se agregó 1.0 ml de diclorometano y se agitó mecánicamente durante 60 minutos, se dejaron separar las fases, la fase orgánica (fase inferior) se trasvasó por medio de una pipeta pasteur a un vial de 2 ml al que se adicionó sulfato de sodio anhidro granular para secarla, la fase orgánica seca se trasvasó a un segundo vial de 2 ml obteniéndose así el extracto del HPA correspondiente.

3.7.2 Análisis de los HPAs

La detección y cuantificación de los HPAs está basada en el método 8270C de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (U. S. EPA) para el análisis de compuestos semivolátiles y fue modificado para satisfacer las necesidades analíticas del estudio.

3.7.2.1 Análisis cromatográfico

Se inyectó 1 µl del extracto de HPA al cromatógrafo de gases equipado con una columna capilar de sílica fundida al 5 % de fenilmetilsilicona.

Las condiciones de operación del cromatógrafo de gases se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases

Parámetro	Valor
Temperatura de inyección	290 °C
Temperatura inicial del horno	70 °C
Tiempo inicial	0.5 min
Incremento de temperatura/1 min	8 °C
Temperatura final del horno	290 °C
Temperatura de la interfase	290 °C
Tiempo final a 290 °C	21 min

3.7.2.2 Análisis por espectrometría de masas

Una vez que el HPA es eluido de la columna cromatográfica entra al espectrómetro de masas que cumple las veces de detector, el detector se activó en la modalidad monitoreo selectivo de iones para identificar y cuantificar cada HPA estudiado.

Los iones monitoreados de los HPAs fueron los siguientes:

Tabla 3. Iones monitoreados

Compuesto	Ion prioritario	Iones secundarios
Antraceno	178	176, 179
Benzo(a)antraceno	228	229, 226
Benzo(a)pireno	252	253, 125
Benzo(g, h, i)perileno	276	138, 277
Benzo(k)fluoranteno	252	253, 125
Dibenzo(a, h)antraceno	278	139, 279
Criseno	228	226, 229
Fluoranteno	202	101, 203
Indenopireno	276	138, 227
Pireno	202	200, 203

3.7.2.3 Análisis cualitativo y cuantitativo de los HPAs

La confirmación analítica de cada HPA se realizó considerando sus tiempos de elución y sus iones característicos, para la cuantificación de cada HPA se consideró la respectiva abundancia del ion prioritario y aplicándola en la regresión lineal para obtener por interpolación la concentración de cada compuesto.

3.7.2.4 Curvas de calibración

Se prepararon disoluciones estándar de cada uno de los HPAs en concentraciones de 100, 50, 25, 20, 10, 5, 4, 2, 1, 0.5, 0.4, 0.2 y 0.1 µg/ml y se analizaron en el sistema GC-MSD, se graficaron las correspondientes abundancias obtenidas contra las concentraciones de las disoluciones preparadas, obteniéndose sus regresiones lineales. Las regresiones lineales fueron utilizadas para determinar las concentraciones de los HPAs. El coeficiente de correlación de cada una de las regresiones lineales fue mayor a 0.9900.

Las curvas de calibración se verificaron cada 10 inyecciones y en todos los casos el coeficiente de correlación permaneció mayor a 0.9900.

Aunque la U. S. EPA es un organismo mundialmente reconocido, que busca continuamente métodos más adecuados y confiables para la determinación de compuestos tóxicos en las diferentes matrices ambientales, no se encontró, durante el desarrollo del presente estudio, metodología alguna que estableciera procedimientos para la extracción, detección y determinación de los HPAs en este tipo de pruebas. Es de suma importancia establecer y contar con métodos específicos, reproducibles y confiables que favorezcan la detección y cuantificación de los HPAs aplicables a este tipo de pruebas.

4 RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Este capítulo muestra los resultados obtenidos de las pruebas de biodegradación, tanto el comportamiento del consorcio bacteriano con cada HPA, respecto al aumento de su biomasa, como la remoción de cada HPA, por la acción del consorcio bacteriano utilizado. También presenta la comparación del crecimiento bacteriano del consorcio y la remoción de cada HPA con las propiedades fisicoquímicas de estos últimos.

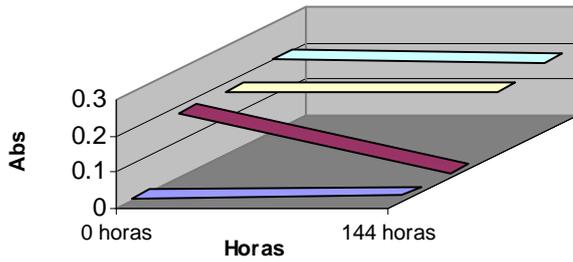
4.1 Comportamiento del consorcio bacteriano con cada HPA a 50 ppm

El comportamiento, con respecto al crecimiento del consorcio bacteriano (ver 3.2.1) frente a cada HPA de forma individual a 50 mg/L (ver 3.2.2) se estimó indirectamente por medición de la densidad óptica de las pruebas a 610 nm (ver capítulo 3).

Para determinar el incremento de la biomasa en los experimentos, se midieron las densidades ópticas al inicio de cada reacción, tiempo 0, y al final de éstas, a las 144 horas.

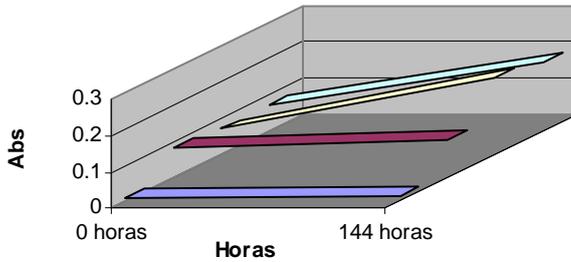
Las pruebas realizadas fueron: 1. Blanco de células, 2. Blanco del compuesto, y 3. Las pruebas por duplicado de cada hidrocarburo polinucleoaromático, cabe señalar que los tres tipos de reacciones contenían nutrientes minerales.

El comportamiento del consorcio bacteriano frente a 50 mg/L del HPA, se muestra en las gráficas desde la 4.1.a hasta la 4.1.j. Los resultados numéricos de todas las pruebas se encuentran en el Anexo A.



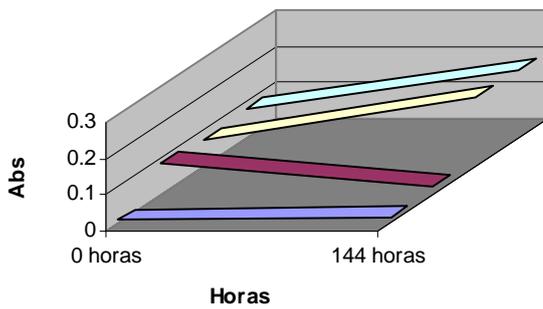
■ Blanco de células ■ Blanco del compuesto ■ Prueba A ■ Prueba B

Gráfica 4.1.a Comportamiento bacteriano frente al antraceno a 50 mg/L



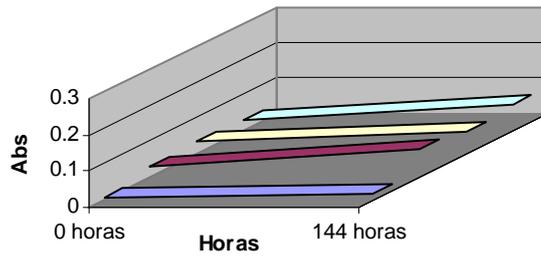
■ Blanco de células ■ Blanco del compuesto ■ Prueba A ■ Prueba B

Gráfica 4.1.b Comportamiento bacteriano frente al benzo(a)antraceno a 50 mg/L



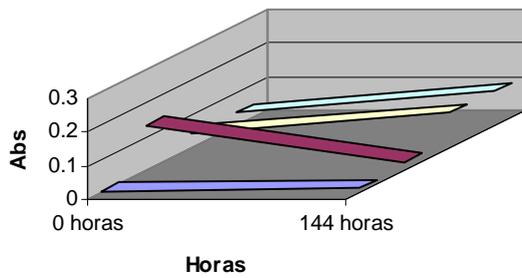
■ Blanco de células ■ Blanco del compuesto ■ Prueba A ■ Prueba B

Gráfica 4.1.c Comportamiento bacteriano frente al benzo(a)pireno a 50 mg/L



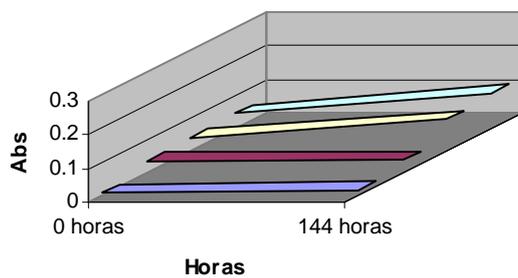
Blanco de células Blanco del compuesto Prueba A Prueba B

Gráfica 4.1.d Comportamiento bacteriano frente al benzo(g,h,i)perileno



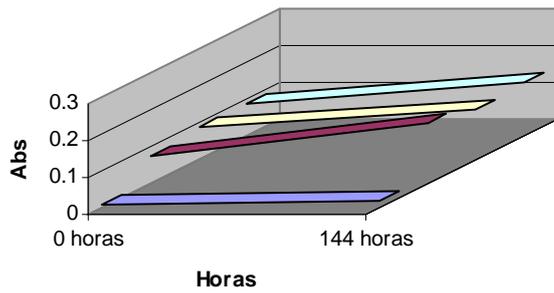
Blanco de células Blanco del compuesto Prueba A Prueba B

Gráfica 4.1.e Comportamiento bacteriano frente al benzo(k)fluoranteno a 50 mg/L



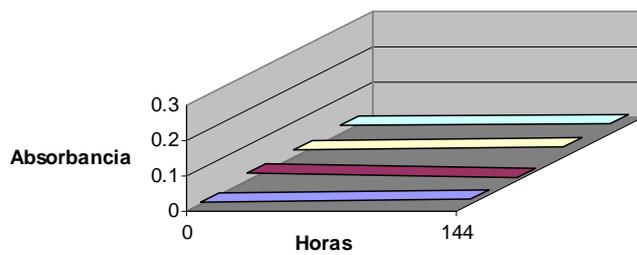
Blanco de células Blanco del compuesto Prueba A Prueba B

Gráfica 4.1.f Comportamiento bacteriano frente al Dibenzo(a,h)antraceno a 50 mg/L



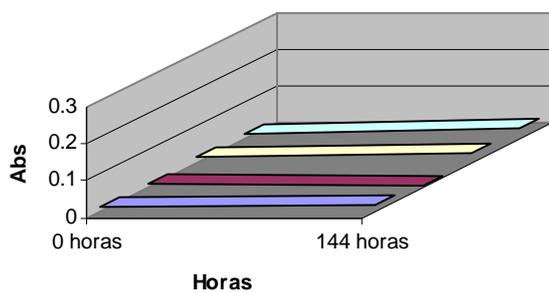
Blanco de células Blanco del compuesto Prueba A Prueba B

Gráfica 4.1.g Comportamiento bacteriano frente al criseno a 50 mg/L



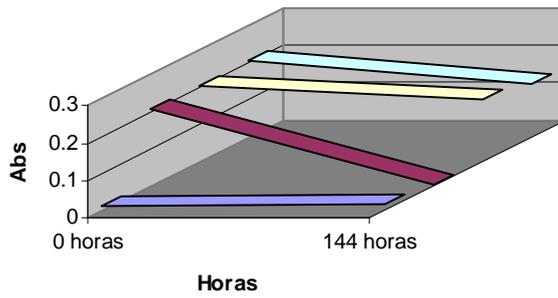
Blanco de células Blanco del compuesto Prueba A Prueba B

Gráfica 4.1.h Comportamiento bacteriano frente al fluoranteno a 50 mg/L



Blanco de células Blanco del compuesto Prueba A Prueba B

Gráfica 4.1.i Comportamiento bacteriano frente al Indenopireno a 50 mg/L

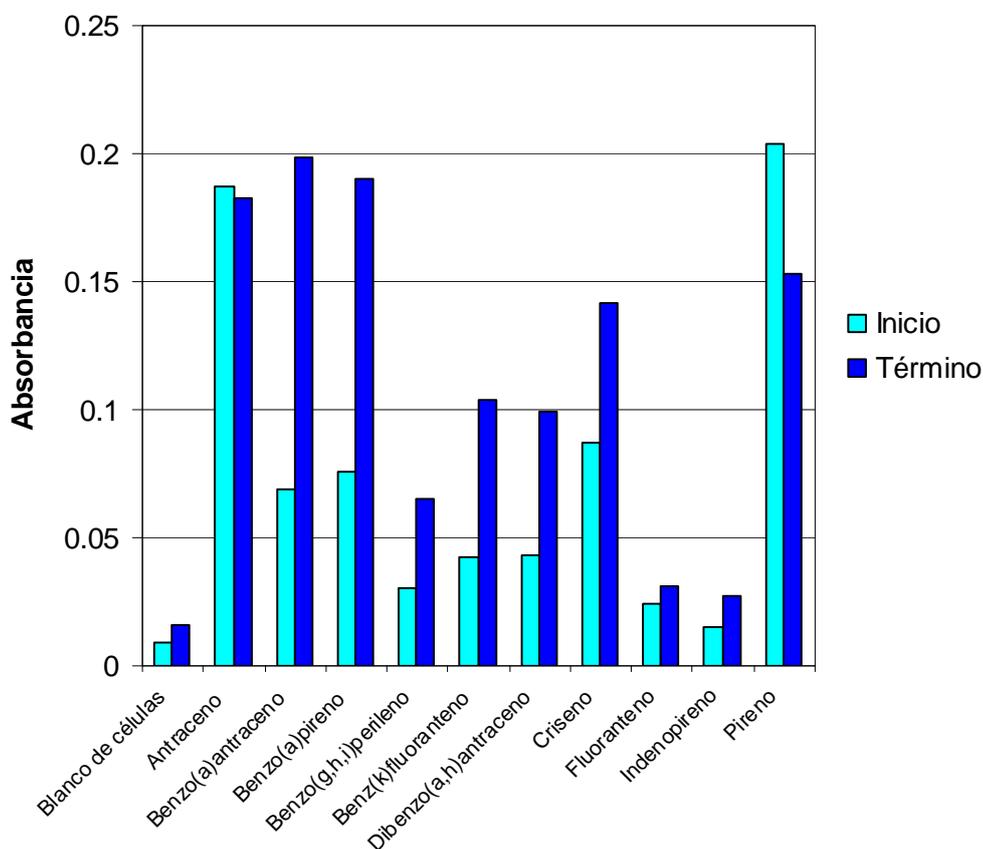


■ Blanco de células ■ Blanco del compuesto □ Prueba A □ Prueba B

Gráfica 4.1.j Comportamiento bacteriano frente al pireno a 50 mg/L

4.1.1 Crecimiento bacteriano con cada HPA a 50 mg/L

La comparación del crecimiento bacteriano frente a cada uno de los diez HPAs estudiados, a 50 mg/L, se muestra en la gráfica 4.1.2, de acuerdo a la absorbancia medida en las reacciones.



Gráfica 4.1.1 Comparación del crecimiento bacteriano de los 10 HPAs

En la gráfica 4.1.1 observamos que el crecimiento bacteriano es alto con el benzo(a)antraceno y el benzo(a)pireno, mediano con el benzo(k)fluoranteno, dibenzo(a,h) antraceno y criseno, y más bajo con el benzo(g,h,i)perileno, mientras que es prácticamente nulo frente al antraceno, indenopireno y pireno.

Para reafirmar la interpretación anterior del crecimiento bacteriano frente a cada HPA, se desarrolló la escala gráfica arbitraria mostrada en la tabla 5 para representar la magnitud del gradiente de la densidad óptica, en unidades de absorbancia, obtenido en las pruebas.

4.1.2 Resultados del crecimiento bacteriano

Las características físicas que presentan las mezclas al final de las reacciones son muy importantes; cuando la mezcla muestra opacidad distribuida homogéneamente debido a ciertos sólidos suspendidos, podría indicar la existencia de crecimiento bacteriano, en cambio, cuando la mezcla de reacción presenta un precipitado, pudiera deberse a que de haberse volatilizado el dimetilsulfóxido, disolvente utilizado para solubilizar el correspondiente HPA en la solución stock, dicho HPA podría haberse precipitado, o bien, que no hubo interacción entre el HPA y el consorcio bacteriano, siendo nula la degradación del HPA debida al consorcio.

A continuación en la tabla 4, se reportan las características físicas presentadas al final de las reacciones.

Tabla 4. Características físicas al final de las reacciones

COMPUESTO	CARACTERÍSTICAS FINALES	CRECIMIENTO BACTERIANO
Antraceno	Solución transparente, escaso precipitado	Nulo
Benzo(a)antraceno	Solución transparente, precipitado	Nulo
Benzo(a)pireno	Líquido ligeramente opaco con material suspendido	Positivo
Benzo(g,h,i)perileno	Líquido ligeramente opaco con material suspendido	Positivo
Benzo(k)fluoranteno	Líquido ligeramente opaco con material suspendido	Positivo
Criseno	Solución prácticamente transparente	Nulo
Dibenzo(a,h)antraceno	Líquido con material suspendido	Positivo
o		
Fluoranteno	Líquido con material suspendido	Positivo
Indenopireno	Líquido con material suspendido	Positivo
Pireno	Líquido prácticamente transparente	Nulo

Para interpretar los resultados anteriores, del crecimiento bacteriano frente a cada HPA, se desarrolló la siguiente escala para representar la magnitud del gradiente de la densidad óptica, en unidades de absorbancia, obtenido en las pruebas, esta escala gráfica arbitraria se muestra en la tabla 5 a continuación:

Tabla 5. Definición de la Magnitud del Gradiente

Gradiente del incremento de biomasa (absorbancia)	Expresión de la Magnitud del Gradiente
0.000	---
0.001 – 0.050	+
0.051 – 0.100	++
0.101 – 0.150	+++
0.151 – 0.200	++++
0.201 – 0.250	+++++
0.251 – 0.300	++++++
0.301 – 0.350	+++++++

Representado los resultados obtenidos, de acuerdo a la escala anotada anteriormente, el orden de mayor a menor crecimiento del consorcio bacteriano frente a cada HPA a 50 mg/L se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Crecimiento bacteriano frente a cada uno de los 10 HPAs. Concentración alta: 50 mg/L del HPA

HPA	Resultado	Magnitud
Antraceno	No hubo crecimiento	---
Benzo(a)antraceno	No hubo crecimiento	---
Benzo(a)pireno	Crecimiento	+++
Benzo(g,h,i)perileno	Crecimiento	+
Benzo(k)fluoranteno	Crecimiento	++
Criseno	No hubo crecimiento	---
Dibenzo(a,h)antraceno	Crecimiento	++
Fluoranteno	Crecimiento	+
Indenopireno	Crecimiento	+
Pireno	No hubo crecimiento	---

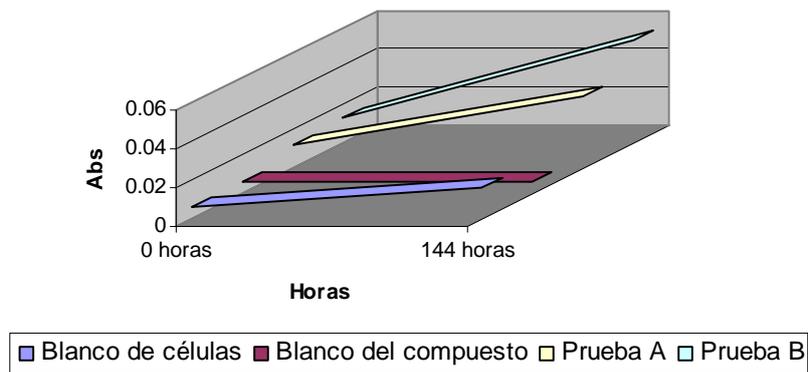
4.2 Crecimiento bacteriano a 20 y 5 mg/L de HPAs seleccionados

Para contar con una comparación, de cómo afecta el crecimiento bacteriano cuando interactúa con un HPA lineal y uno ramificado, se seleccionaron el benzo(a)pireno y el

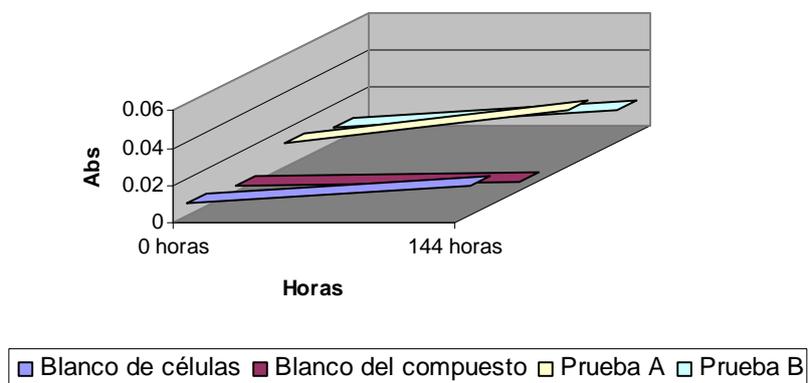
dibenzo(a,h)antraceno, las moléculas de estos dos HPAs tienen el mismo número de anillos aromáticos (cinco) pero cada HPA presenta diferente conformación estructural. Estos dos HPAs seleccionados muestran biotransformación a 50 mg/L.

4.2.1 Consorcio bacteriano con benzo(a)pireno

El comportamiento bacteriano frente a 20 y 5 mg/mL de benzo(a)pireno, se muestra en las gráficas 4.2.1.a y 4.2.1b, respectivamente. Los resultados numéricos de todas las pruebas se encuentran en el Anexo A.



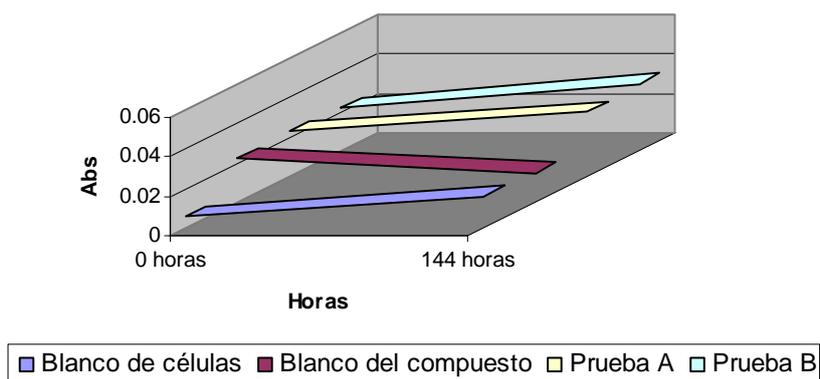
Gráfica 4.2.1.a Comportamiento bacteriano con 20 mg/L de benzo(a)pireno



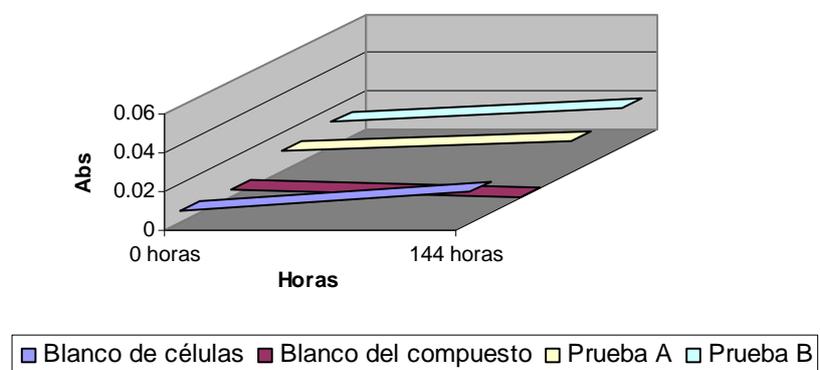
Gráfica 4.2.1.b Comportamiento bacteriano con 5 mg/L de benzo(a)pireno

4.2.2 Consorcio bacteriano con dibenzo(a,h)antraceno

El comportamiento bacteriano frente a 20 y 5 mg/mL de dibenzo(a,h)antraceno, se muestra en las gráficas 4.2.2.a y 4.2.2.b, respectivamente. Los resultados numéricos de todas las pruebas se encuentran en el Anexo A.



Gráfica 4.2.2.a Comportamiento bacteriano con 20 mg/L de dibenz(a,h)antraceno



Gráfica 4.2.2.b Comportamiento con 5 mg/L de dibenzo(a,h)antraceno

La escala de los resultados obtenidos del comportamiento del consorcio bacteriano frente a 20 y 5 mg/L, tanto para el benzo(a)pireno como para el dibenzo(a,h)antraceno, se muestra en las tablas 7.a y 7.b.

Tabla 7.a Crecimiento bacteriano frente a los HPAs seleccionados.
Concentración media: 20 mg/L del HPA

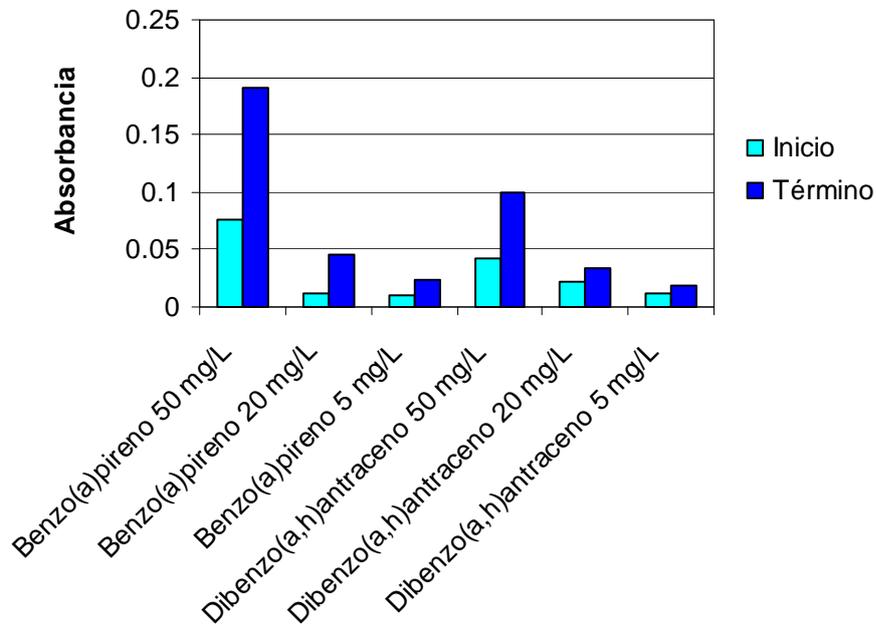
HPA	Resultado	Magnitud
Benzo(a)pireno	Crecimiento	+
Dibenzo(a,h)antraceno	Crecimiento	+

Tabla 7.b Crecimiento bacteriano frente a los dos HPAs seleccionados.
Concentración baja: 5 mg/L del HPA

HPA	Resultado	Magnitud
Benzo(a)pireno	Crecimiento	+
Dibenzo(a,h)antraceno	Crecimiento	+

4.2.3 Comparación del crecimiento bacteriano entre benzo(a)pireno y dibenzo(a,h)antraceno.

El crecimiento bacteriano comparativo frente al benzo(a)pireno y al dibenz(a,h)antraceno, cada uno a las tres concentraciones ensayadas, 50, 20 y 5 mg/L, se muestra a continuación en la gráfica 4.2.3:



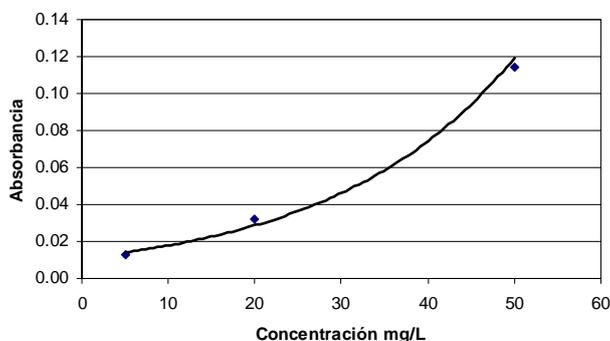
Gráfica 4.2.3 Comparativo del crecimiento bacteriano del benzo(a)pireno y del dibenzo(a,h)antraceno

4.2.4 Relación del crecimiento bacteriano con respecto a la concentración del benzo(a)pireno y dibenzo(a,h)antraceno

Cabe mencionar, que las diversas regresiones que se presentan a partir de esta sección, son las que presentan mayor factor de correlación, habiéndose realizado comparaciones entre regresiones logarítmicas, exponenciales, potenciales e inclusive lineales.

4.2.4.a Benzo(a)pireno

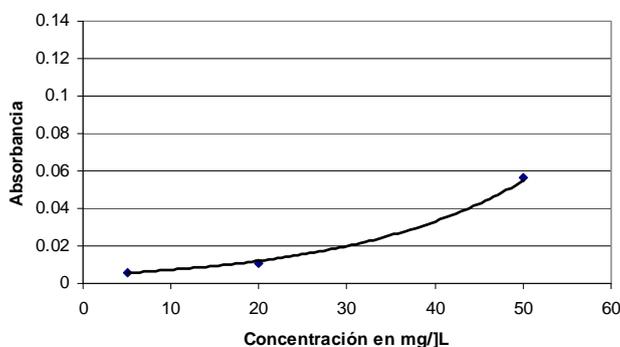
La gráfica 4.2.4.a, muestra la relación del crecimiento bacteriano con respecto a las tres concentraciones probadas para el benzo(a)pireno:



Gráfica 4.2.4.a Crecimiento bacteriano frente a benzo(a)pireno a 50, 20 y 5 mg/L

4.2.4.b Dibenzo(a,h)antraceno

La gráfica 4.2.4.b muestra la relación del crecimiento bacteriano frente a las tres concentraciones probadas para el dibenzo(a,h)antraceno:



Gráfica 4.2.4.b Crecimiento bacteriano frente a Dibenzo(a,h)antraceno a 50, 20 y 5 mg/L

El crecimiento bacteriano del benzo(a)pireno y del dibenzo(a,h)antraceno en el intervalo de concentraciones practicadas, cumple con una función exponencial de la forma:

$$y = a e^{bx} \quad \dots \text{Ec. (2)}$$

Donde:

y = Absorbancia de la suspensión

a = Pendiente de la regresión

b = Constante

x = Concentración del HPA

Las constantes de las funciones exponenciales del benzo(a)pireno y del dibenzo(a,h)antraceno del crecimiento bacteriano se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Constantes de la relación exponencial del crecimiento bacteriano para benzo(a)pireno y dibenzo(a,h)antraceno

HPA	a	b	r^2	R
Benzo(a)pireno	0.0111	0.0474	0.9902	0.9951
Dibenzo(a,h)antraceno	0.0044	0.0505	0.9952	0.9976

De la tabla anterior se observa que para el benzo(a)pireno, la pendiente de crecimiento bacteriano es mayor que para el dibenzo(a,h)antraceno, lo que demuestra un mayor crecimiento bacteriano en el HPA lineal, en comparación con un HPA ramificado.

Los valores obtenidos de r^2 , 0.9902 y 0.9952, para el benzo(a)pireno y el dibenzo(a,h)antraceno respectivamente son muy cercanos a 1.0000, lo que representa que el grado con el que el crecimiento bacteriano, para cada uno de estos dos HPAs, se ajusta a una función exponencial.

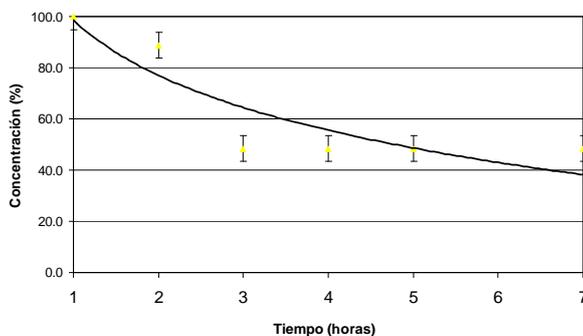
4.3 Cinéticas de la biodegradación de los HPAs

Se determinaron las cinéticas de biodegradación de cada uno de los diez HPAs a 50 mg/L, al medir la concentración remanente del respectivo HPA en las reacciones cada 24 horas, a partir del tiempo 0 hasta 144 horas, de acuerdo al método descrito en el capítulo 3.7 Determinación de los HPAS, por cromatografía de gases/espectrometría de masas.

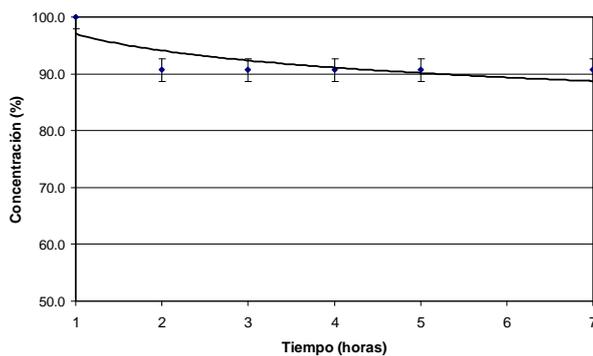
Dichas determinaciones se realizaron en: 1. Blanco de células, 2. Blanco del compuesto, y 3. Las pruebas por duplicado con cada HPA.

4.3.1 Cinéticas de los 10 HPAs a 50 mg/L

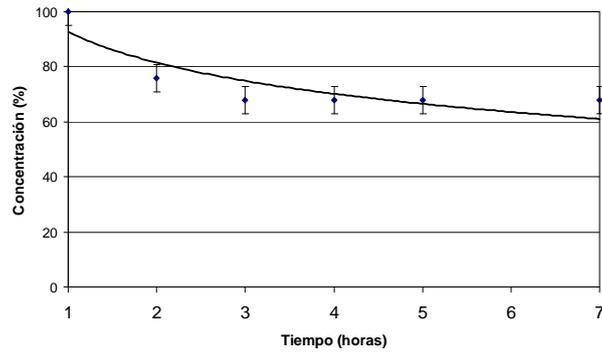
En las gráficas de la 4.3.1.a, a la 4.3.1.j, correspondientes a 50 mg/L de cada uno de los 10 HPAs estudiados, podemos ver la disminución paulatina de la concentración del HPA por la acción biológica del consorcio, infiriendo de primera instancia, que se debe a la transformación que sufre el HPA respectivo, por la acción biológica del consorcio.



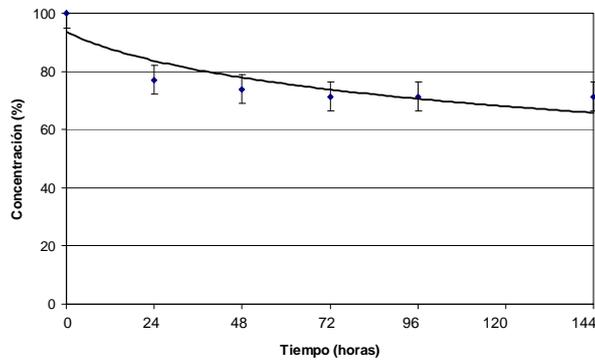
Gráfica 4.3.1.a Concentración remanente del antraceno



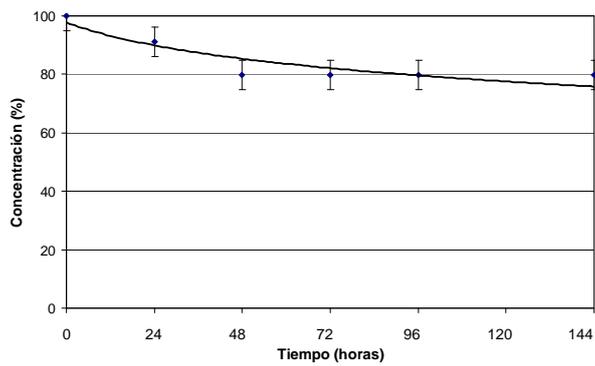
Gráfica 4.3.1.b Concentración remanente del benzo(a)antraceno



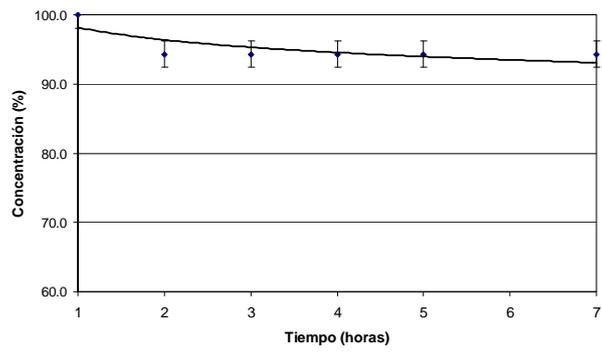
Gráfica 4.3.1.c Concentración remanente del benzo(a)pireno



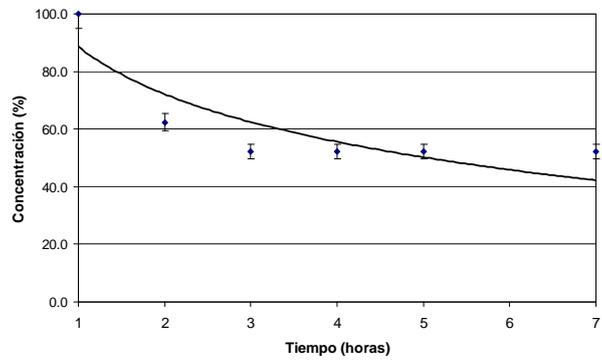
Gráfica 4.3.1.d Concentración remanente del benzo(g,h,i)perileno



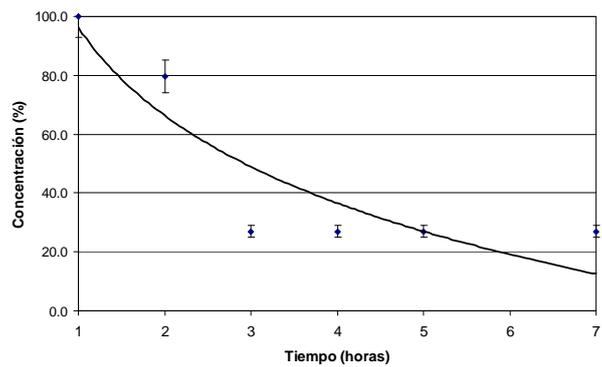
Gráfica 4.3.1.e Concentración remanente del benzo(k)fluoranteno



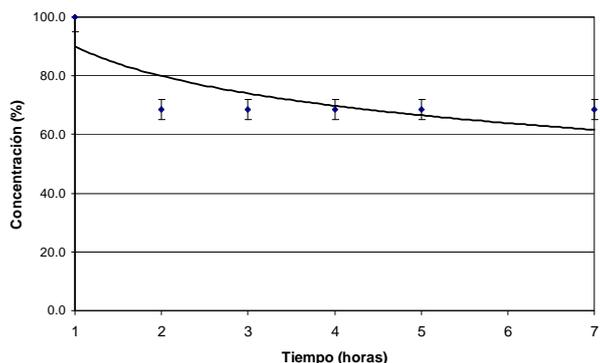
Gráfica 4.3.1.f Concentración remanente del criseno



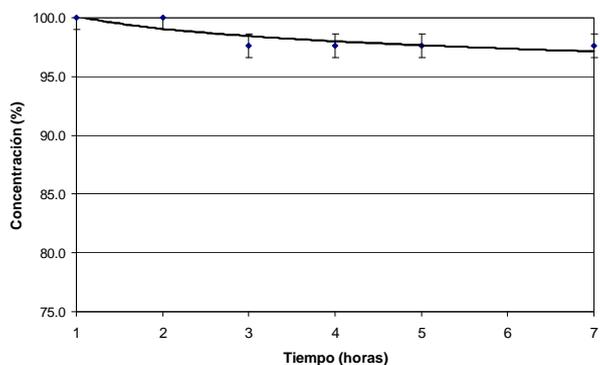
Gráfica 4.3.1.g Concentración remanente del dibenz(a,h)antraceno



Gráfica 4.3.1.h Concentración remanente del fluoranteno



Gráfica 4.3.1.i Concentración remanente del indenopireno

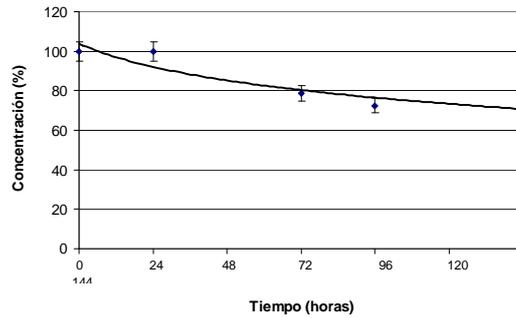


Gráfica 4.3.1.j Concentración remanente del pireno

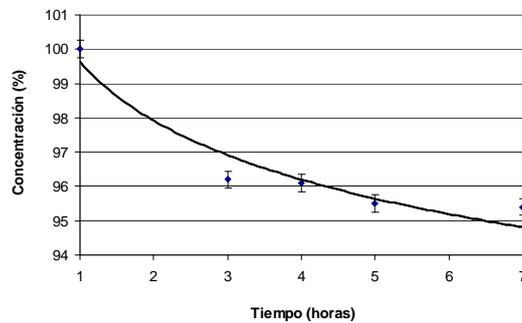
4.3.2 Cinéticas a 20 y 5 mg/L de benzo(a)pireno

De los 10 HPAs, de acuerdo en lo descrito en el punto 4..2, se determinaron las cinéticas de biodegradación a 20 y 5 mg/L del benzo(a)pireno. Los porcentajes de biodegradación al tiempo de 144 horas.

En las siguientes gráficas 4.3.2.a y 4.3.2.b, podemos ver que hay disminución de la concentración inicial del benzo(a)pireno a 20 y 5 mg/L respectivamente, comprobando así la acción la acción biológica del consorcio sufrida sobre el HPA. Los porcentajes de remoción correspondientes, se reportan en la tabla 15, página 63.



Gráfica 4.3.2.a Concentración remanente de benzo(a)pireno a 20mg/L

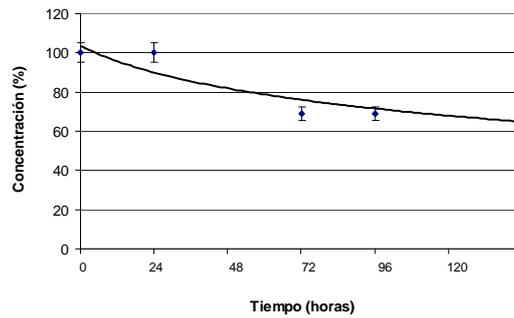


Gráfica 4.3.2.b Concentración remanente del benzo(a)pireno a 5 mg/L

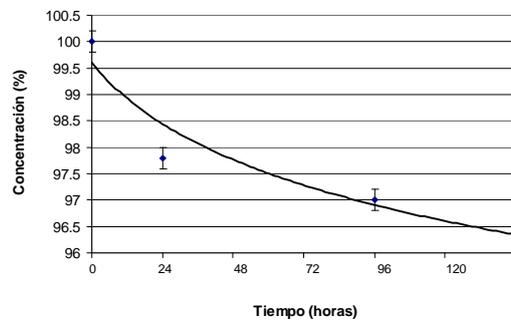
4.3.3 Cinéticas a 20 y 5 mg/L de dibenzo(a,h)antraceno

De los 10 HPAs, de acuerdo en lo descrito en el punto 4.3.2, se determinaron las cinéticas de biodegradación a 20 y 5 mg/L del dibenzo(a,h)antraceno. Los porcentajes de biodegradación al tiempo de 144 horas.

En las siguientes gráficas 4.3.3.a y 4.3.3.b, podemos ver que hay disminución de la concentración inicial del dibenzo(a,h)antraceno a 20 y 5 mg/L respectivamente, comprobando así la acción la acción biológica del consorcio sufrida sobre el HPA. Los porcentajes de remoción correspondientes, se reportan en la tabla 13, página 23.



Gráfica 4.3.3.a Concentración remanente del dibenzo(a,h)antraceno a 20 mg/L



Gráfica 4.3.3.b Concentración remanente del dibenzo(a,h)antraceno 5 mg/L

4.4 Constantes de las cinéticas de biodegradación

4.4.1 Constantes de las cinéticas de biodegradación con 50 mg/L de HPAs

Las cinéticas de biodegradación de los HPAs, debidas al consorcio bacteriano seleccionado, presentan una regresión del tipo logarítmico, de acuerdo a la siguiente función:

$$Y = a \ln(x) + b \quad \dots \text{Ec. (3)}$$

Donde:

y = Remoción del HPA en porcentaje (%)

a = Pendiente de la regresión

b = Constante

x = Tiempo en horas

En la tabla 9 se presentan las constantes obtenidas en las cinéticas de biodegradación de los HPAs con 50 mg/L:

Tabla 9. Constantes de la relación logarítmica de cada HPAs

HPA	a	B	r ²	r
Antraceno	-30.951	98.451	0.8084	0.8991
Benzo(a)antraceno	-6.8151	98.44	0.7763	0.8811
Benzo(a)pireno	-20.378	95.332	0.8626	0.9288
Benzo(g,h,i)perileno	-14.24	93.515	0.7809	0.8839
Benzo(k)fluoranteno	-15.777	100.26	0.9484	0.9739
Criseno	-2.6328	98.205	0.622	0.7887
Dibenz(a,h)antraceno	-30.0	95.525	0.8472	0.9204
o				
Fluoranteno	-51.858	101.75	0.8803	0.9382
Indenopireno	-23.157	94.698	0.7763	0.8811
Pireno	-1.5324	100.12	0.7429	0.8619

4.4.2 Constantes de las cinéticas de biodegradación de HPAs a 20 mg/L

En la tabla 10 se anotan las constantes obtenidas en las cinéticas con 20 mg/L del benzo(a)pireno y del dibenz(a,h)antraceno:

Tabla 10. Constantes de las relaciones logarítmicas de las degradaciones del benzo(a)pireno y dibenzo(a,h)antraceno con 20 mg/L

HPA	a	b	r ²	R
Benzo(a)pireno	-17.052	103.94	0.8767	0.7686
Dibenzo(a,h)antraceno	-20.048	103.87	0.8358	0.6985
o				

4.4.3 Constantes de las cinéticas de biodegradación de HPAs a 5 mg/L

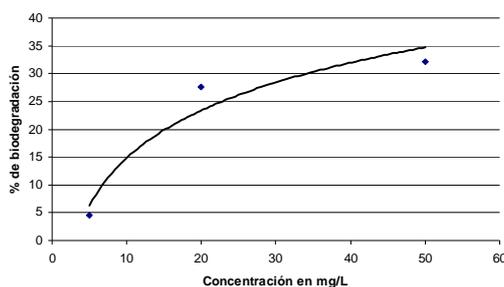
En la tabla 11 se anotan las constantes obtenidas en las cinéticas con 5 mg/L del benzo(a)pireno y del dibenz(a,h)antraceno:

Tabla 11. Constantes de la relaciones logarítmicas de las degradaciones del benzo(a)pireno y del dibenzo(a,h)antraceno con 5 mg/L

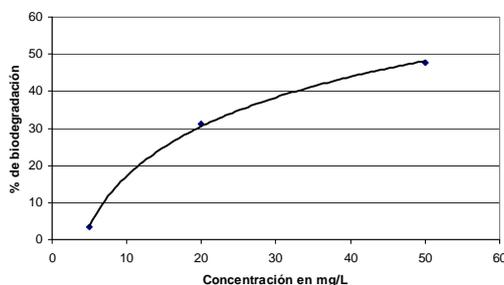
	a	b	r ²	R
Benzo(a)pireno	-2.481	99.6637	0.9304	0.8656
Dibenzo(a,h)antraceno	-31.463	106.54	0.8962	0.8032

4.5 Relación entre la tasa de biodegradación y la concentración utilizada del benzo(a)pireno y del dibenz(a,h)antraceno

Las siguientes gráficas 4.5.a y 4.5.b, muestran que tanto para el benzo(a)pireno como para el dibenzo(a,h)antraceno, su tasa de biodegradación debida al consorcio bacteriano, aumenta logarítmicamente en el rango de 5 a 50 mg/L:



Gráfica 4.5.a Benzo(a)pireno



Gráfica 4.5.b Dibenzo(a,h)pireno

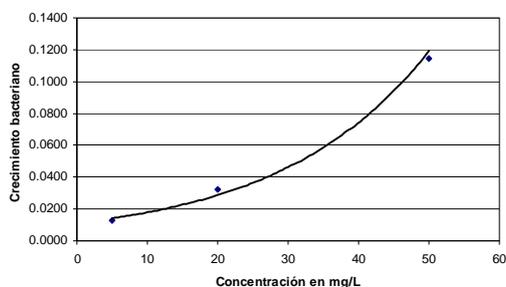
Las constantes de las respectivas regresiones logarítmicas se muestran a continuación en la tabla 12:

Tabla 12. Constantes de las regresiones logarítmicas de las tasas de biodegradación del correspondiente HPA con respecto a su concentración.

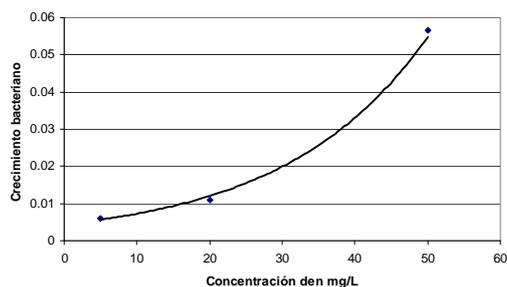
	a	b	r ²	R
Benzo(a)pireno	12.359	-13.62	0.9387	0.8812
Dibenzo(a,h)antraceno	19.299	-27.92	0.9993	0.9986

4.6 Relación del crecimiento bacteriano con respecto a la concentraciones del benzo(a)pireno y del dibenz(a,h)antraceno

Las siguientes gráficas 4.6.a y 4.6.b, muestran que tanto para el benzo(a)pireno como para el dibenzo(a,h)antraceno, el crecimiento del consorcio bacteriano utilizado, aumenta exponencialmente con respecto a la remoción de cada HPA, en el rango de concentración de 5 a 50 mg/L, para cada HPA:



4.6.a Benzo(a)pireno



4.6.b Dibenzo(a,h)antraceno

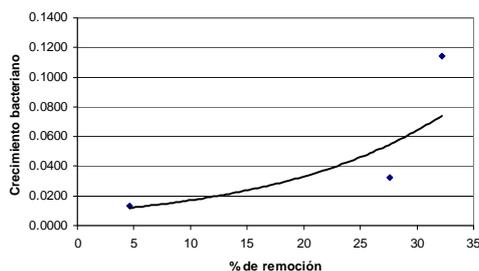
Las constantes de las respectivas regresiones exponenciales se muestran a continuación en la tabla 13:

Tabla 13. Constantes de las regresiones exponenciales del crecimiento bacteriano con respecto a la concentración del correspondiente HPA.

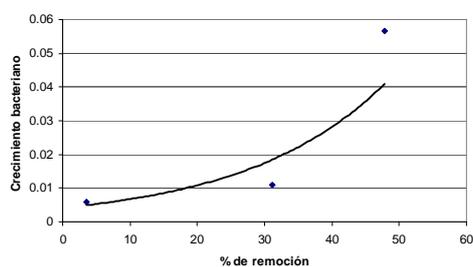
	A	b	r ²	R
Benzo(a)pireno	0.0474	0.0111	0.9902	0.9804
Dibenzo(a,h)antraceno	0.0044	0.0505	0.9952	0.9904

4.7 Relación del crecimiento bacteriano con respecto a la remoción del benzo(a)pireno y del dibenz(a,h)antraceno

Las siguientes gráficas 4.7.a y 4.7.b, muestran que tanto para el benzo(a)pireno como para el dibenzo(a,h)antraceno, el crecimiento del consorcio bacteriano utilizado, aumenta exponencialmente en el rango de 5 a 50 mg/L de cada HPA:



Gráfica 4.7.a Benzo(a)pireno



Gráfica 4.7.b Dibenzo(a,h)antraceno

Las constantes de las respectivas regresiones exponenciales se muestran a continuación en la tabla 14:

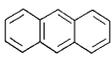
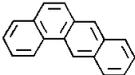
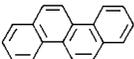
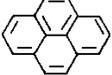
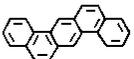
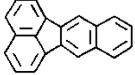
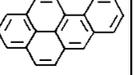
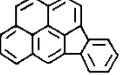
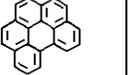
Tabla 14. Constantes de las regresiones exponenciales del crecimiento bacteriano con respecto a la concentración utilizada del HPA.

	a	b	r ²	R
Benzo(a)pireno	0.0663	0.0088	0.8043	0.6489
Dibenzo(a,h)antraceno	0.0477	0.0042	0.8462	0.7160

4.8 Características fisicoquímicas, estructurales y de toxicidad de los HPAs.

En la tabla 15 se reportan las características fisicoquímicas, estructurales y de toxicidad de los diez HPAs estudiados, con las cuales se comparan el crecimiento bacteriano y el porcentaje de remoción obtenido de los HPAs en las pruebas realizadas a 32 °C bajo agitación orbital de 150 rpm. De forma concluyente se puede decir que sólo seis de los diez HPAs experimentaron biodegradación con el consorcio bacteriano elegido.

Tabla 15. Características fisicoquímicas, estructurales y de toxicidad de los HPAs

Propiedad fisicoquímica	HIDROCARBURO POLINUCLEOAROMÁTICO									
	Antraceno	Benzo(a)-antraceno	Criseno	Fluoranteno	Pireno	Dibenzo(a,h)-antraceno	Benzo(k)-fluoranteno	Benzo(a)-pireno	Indenopireno	Benzo(g,h,i)-perileno
Estructura semidesarrollada										
Fórmula Molecular	C ₁₄ H ₁₀ ⁽⁴⁾	C ₁₈ H ₁₂ ⁽²⁾	C ₁₈ H ₁₂ ⁽⁸⁾	C ₁₆ H ₁₀ ⁽¹⁵⁾	C ₁₆ H ₁₀ ⁽⁹⁾	C ₂₂ H ₁₄ ⁽¹⁰⁾	C ₂₀ H ₁₂ ⁽¹¹⁾	C ₂₀ H ₁₂ ⁽¹²⁾	C ₂₂ H ₁₂ ⁽¹³⁾	C ₂₂ H ₁₂ ⁽¹³⁾
Número de anillos	3	4	4	4	4	5	5	5	6	6
Punto de fusión °C	217 ⁽¹⁾	160 ⁽³⁾	255 ⁽⁸⁾	110.8 ⁽¹⁵⁾	156 ⁽⁹⁾	267 ⁽¹⁰⁾	217 ⁽¹¹⁾	178.1 ⁽¹²⁾	164 ⁽¹³⁾	222 ⁽¹⁴⁾
Punto de ebullición °C	340 ⁽¹⁾	435 ⁽³⁾	448 ⁽⁸⁾	375 ⁽¹⁵⁾	393 ⁽⁹⁾	535 ⁽¹⁰⁾	480 ⁽¹¹⁾	493 ⁽¹²⁾	536 ⁽¹³⁾	550 ⁽¹⁴⁾
Peso específico (g/ml)	1.25 ⁽¹⁾	1.274 ⁽⁷⁾	1.274 ⁽⁸⁾	1.252 ⁽¹⁵⁾	1.27 ⁽⁹⁾	1.282 ⁽¹⁰⁾		1.33 ⁽¹²⁾		
Densidad de vapor	6.15 ⁽¹⁾	2.8 E-5 @25		7	6 E-4 @25					
Presión de vapor @20	1 @ 145 ⁽¹⁾	7.3E-6 @25 ⁽²⁾	5.7E-7 @25 ⁽⁶⁾	2.54E-1 @25	8.86E-4 @25 ⁽⁹⁾	3.7E-10 @25	9.59E-11	8.40E-07	1.00E-10	1E-10 ⁽¹⁸⁾
Solubilidad en mg/l @25	1.29 ⁽⁴⁾	0.01 @24	0.006 ⁽¹⁸⁾	0.265 ⁽¹⁵⁾	0.16 ⁽⁹⁾	0.0005 ⁽¹⁸⁾		0.0038	0.062 ⁽¹⁸⁾	0.00026 ⁽¹⁸⁾
PM (g/mol)	178.23 ⁽¹⁾	228.29 ⁽³⁾	228.27 ⁽⁸⁾	202.26 ⁽¹⁵⁾	202.26 ⁽⁹⁾	278.35 ⁽¹⁰⁾	252.32 ⁽¹¹⁾	252.52 ⁽¹²⁾	276.34 ⁽¹³⁾	276.34 ⁽¹⁴⁾
Coeficiente de partición Octanol/agua	4.45 ⁽¹⁸⁾	5.61 ⁽⁷⁾	5.61 ⁽⁸⁾	5.33 ⁽¹⁸⁾	5.18 ⁽⁹⁾	5.97 ⁽¹⁰⁾	6.84 ⁽¹¹⁾	5.98 ⁽¹²⁾	6.6 ⁽¹³⁾	7.23 ⁽¹⁴⁾
Constante de la Ley de Henry atm*m ³ /mol @25	1.78E-06 ⁽¹⁸⁾	1.2E-6 ⁽²⁾	1.67E-06 ⁽⁶⁾	1.95E-03 ⁽¹⁸⁾	1.30E-05 ⁽¹⁸⁾	2.00E-09 ⁽¹⁸⁾		2.70E-07	5.89E-10 ⁽¹⁸⁾	
Toxicidad LD50 mg/kg oral ratón (reportada)	4900 ⁽¹⁹⁾	240	99	2000 ⁽¹⁶⁾	10000 ⁽¹⁷⁾	360	2820	4095	72	
Crecimiento bacteriano obtenido experimentalmente	0	+++	++	+	0	++	++	+++	+	+
% de biodegradación de los diez HPAs estudiados, obtenido experimentalmente	----	---	---	73	---	47.8	21	32.2	32	29

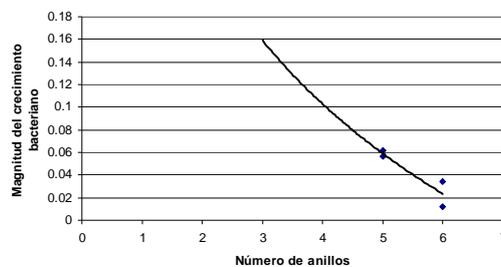
Nota: El número en paréntesis es la cita bibliográfica del dato reportado

En la tabla 16, se reporta el porcentaje de remoción del benzo(a)pireno y del dibenzo(a,h)antraceno a las concentraciones tratadas, 50, 20 y 5 mg/L del HPA.

Tabla 16. Remoción del Benzo(a)pireno y del Dibenzo(a,h)antraceno

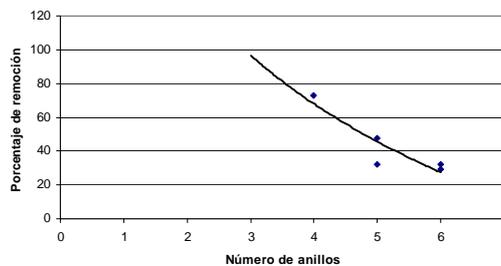
Concentración en mg/L	Benzo(a)pireno Remoción %	Dibenzo(a,h)antraceno Remoción %
50	32.2	47.8
20	27.6	31.2
5	4.6	3.5

Como se observa en la gráfica 4.8.a, mientras más alto sea el número de anillos en los HPAS estudiados, disminuye más el crecimiento bacteriano, de acuerdo a la función logarítmica: $y = 0.1961 \ln(x) + 0.3746$, con un factor de correlación $r^2 = 0.8279$.



Gráfica 4.8.a Comportamiento bacteriano con respecto a la estructura anillada de los HPAS

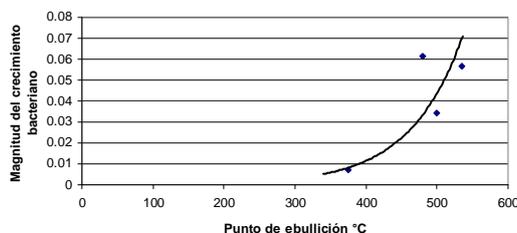
En la gráfica 4.8.b se observa que cuando los HPAs estudiados tienen número mayor de anillos, existe la tendencia a disminuir la remoción de dichos HPAs, de acuerdo a la función logarítmica: $y = 0.99973 \ln(x) + 206.53$, con un factor de correlación de 0.8272.



Gráfica 4.8.b Acción del consorcio bacteriano con respecto a la estructura anillada de los HPAS

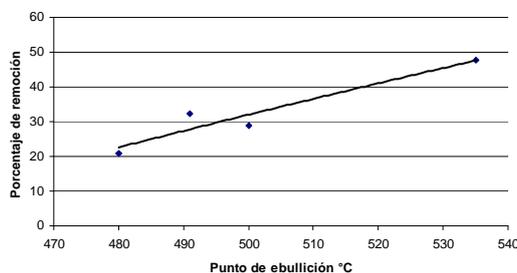
De las dos regresiones anteriores, 4.8.a y 4.8.b, se concluye que al tener un número mayor de anillos los HPAs estudiados, su remoción se realiza en menor grado, y como consecuencia baja el crecimiento bacteriano.

La grafica 4.8.c indica que hay mayor crecimiento bacteriano en los HPAs estudiados que tienen mayor punto de ebullición, de acuerdo a la función exponencial $y = 5 \times 10^{-05} e^{0.0134x}$, con un factor de correlación de 0.8372.



Gráfica 4.8.c Comportamiento bacteriano con respecto a los puntos de ebullición

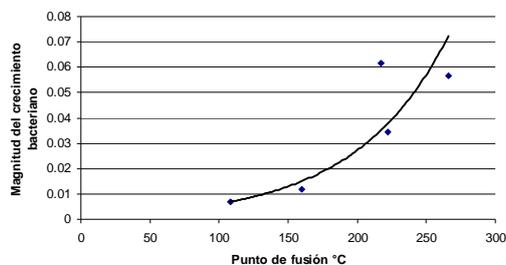
En la gráfica 4.8.d se observa que al ser más alto el punto de ebullición de los HPAs estudiados es mayor su remoción, conforme a la regresión logarítmica $y = 230.36 \ln(x) - 1399.6$, con un factor de correlación de 0.9186.



Gráfica 4.8.d Acción del consorcio bacteriano con respecto a los puntos de ebullición

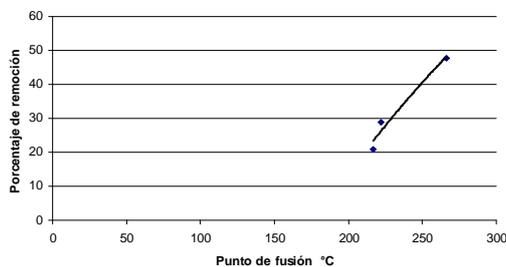
Al existir una relación directa entre el punto de ebullición con la volatilidad de los compuestos, de las gráficas anteriores 4.8.c y 4.8.d, se asume que por tener más permanencia en el seno de la reacción los HPAs estudiados con mayor punto de ebullición, hay mayor acción del consorcio bacteriano en estos, provocando aumento en la biomasa y aumento en la remoción de los HPAs.

En la gráfica 4.8.e, se observa una relación exponencial entre el punto de fusión de los HPAs seleccionados, con el crecimiento bacteriano del consorcio elegido, conforme a la función $y = 0.0014 e^{0.0148 x}$, con una correlación de 0.8829.



Gráfica 4.8.e Remoción de HPAs con respecto a sus puntos de fusión

En la gráfica 4.8.f se observa una relación logarítmica entre el punto de fusión de los HPAs seleccionados con respecto a la remoción de los HPAs, conforme a la función $y = 121.05 \ln(x) - 627.75$, con un factor de correlación de 0.9633.



Gráfica 4.8.f Remoción de HPAs y sus puntos de fusión

Estas gráficas 4.8.e y 4.8.f, análogamente a las gráficas anteriores 4.8.c y 4.8.d de los puntos de ebullición de los HPAs, indican que en los HPAs estudiados al aumentar sus puntos de ebullición permanecen más en el seno de la reacción, permitiendo mayor acción bacteriana sobre el HPA, y como consecuencia mayor crecimiento bacteriano y mayor remoción del HPA correspondiente.

Se observa en la gráfica 4.8.g, que al aumentar la solubilidad de los HPAs disminuye el crecimiento bacteriano, correspondiente a la función exponencial $y = 0.0345 e^{-6.5894 x}$, con un factor de correlación de 0.7485

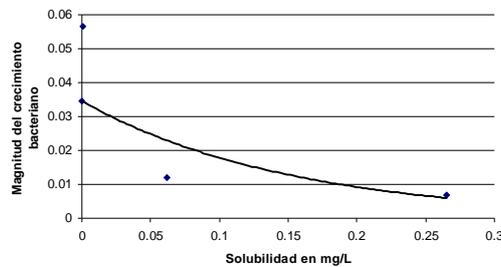
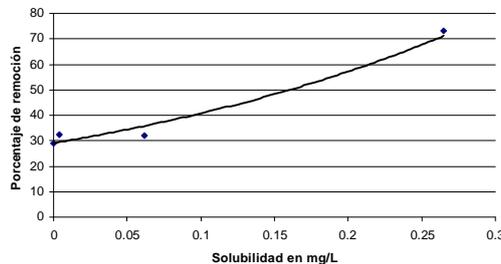


Figura 4.8.g Comportamiento bacteriano debido a la solubilidad de HPAs

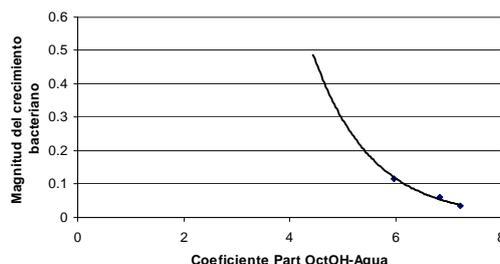
Se observa en la gráfica 4.8.h, que al aumentar la solubilidad de los HPAs aumenta su remoción debida al consorcio seleccionado, conforme a la función logarítmica $y = 29.046 e^{3.3829 x}$, cuyo factor de correlación es 0.9613.



Gráfica 4.8.h Remoción de HPAs debido a sus solubilidades

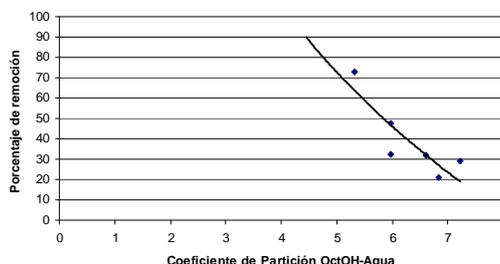
La gráfica 4.8.g muestra una tendencia que no es conocida, por el contrario, la gráfica anterior, 4.8.h muestra una tendencia bien conocida, a mayor solubilidad del compuesto recalcitrante, en este caso los HPAs, hay mayor remoción por estar más biodisponible. El análisis y discusión del comportamiento bacteriano debido al comportamiento bacteriano, gráfica 4.8.g, se hace al final de esta sección.

Se puede observar en la gráfica 4.8.i, que al aumentar el coeficiente de partición octanol – agua de los HPAs estudiados, al crecimiento bacteriano disminuye conforme a la función exponencial: $y = 29.338 e^{-0.9207 x}$, que presenta un coeficiente de correlación de 0.9633.



Gráfica 4.8.i Relación del comportamiento bacteriano con el Coeficiente Part OctOH - Agua

Se puede observar en la gráfica 4.8.j, que al incrementarse el coeficiente de partición octanol – agua de los HPAs estudiados, la remoción de los HPAs disminuye conforme a la función logarítmica: $y = 146.23 \ln (x)+ 308.15$, que presenta un coeficiente de correlación de 0.7498.

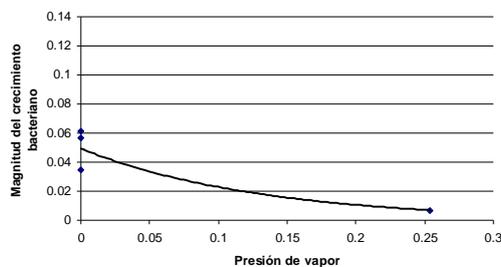


Gráfica 4.8.j Remoción de HPAs con respecto al Coeficiente Part OctOH – Agua

El coeficiente de partición octanol – agua de un compuesto, nos dice la medida de la solubilidad diferencial de un compuesto en la mezcla bifásica, el n-octanol simula bien el material lipídico de la biota o partículas y sedimentos orgánicos, mostrando su carácter hidrófobo o la afinidad de dicha sustancia hacia los lípidos de una sustancia disuelta en agua (Figueruelo el al., 2004). Al ser más elevado el coeficiente de partición es mayor su absorción dérmica.

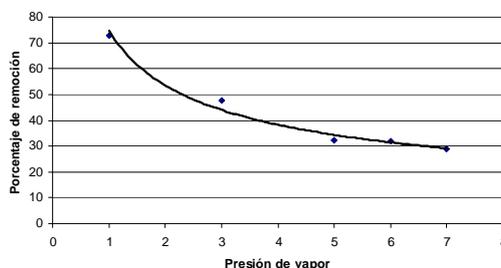
De las dos gráficas anteriores, 4.8.i y 4.8.j, se deduce que al incrementarse el coeficiente de partición octanol-agua de los HPAs son menos solubles en el agua y por tanto menos biodisponibles para el consorcio bacteriano, por lo que su remoción disminuye y como consecuencia también disminuye el crecimiento bacteriano.

La siguiente gráfica 4.8.k muestra que al presentar los HPAs estudiados mayor presión de vapor el crecimiento bacteriano aumenta, conforme a la función: $y = 0.3281 e^{7.6857(x)}$, con un coeficiente de correlación de 0.9362.



Gráfica 4.8.k Comportamiento bacteriano debido a la presión de vapor

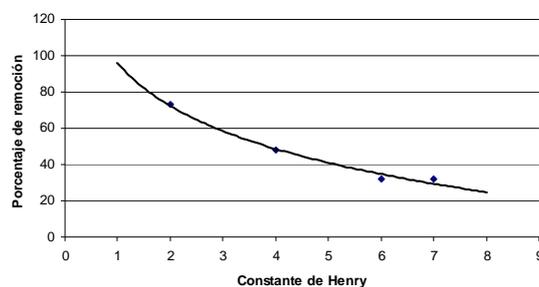
En la gráfica 4.8.l se observa que al presentar los HPAs estudiados mayor presión de vapor su remoción es menor, conforme a la función exponencial $y = 79.909 x^{-0.4839}$, con un coeficiente de correlación de 0.9797.



Gráfica 4.8.l Relación de la remoción de HPAS con respecto a su presión de vapor

La presión de vapor es la presión a la cual una sustancia en fase líquida se encuentra en equilibrio con su fase vapor, al ser más fuerte o alta la presión de vapor en los HPAS estudiados se volatilizan más fácilmente, permitiendo menor acción del consorcio bacteriano y por lo tanto su menor crecimiento y menor remoción del HPAs.

En la gráfica 4.8.m se observa que la relación existente entre la constante de la ley de Henry y la remoción que presentan los HPAs estudiados cumple la función $y = -34.286 \ln(x) + 96.111$ con un factor de correlación de 0.9875. Esta constante demuestra la tendencia de un compuesto a volatilizarse del agua o suelo húmedo, relacionando tres variables, la presión de vapor, la solubilidad en agua y el peso molecular del compuesto,



Gráfica 4.8.m Relación entre la remoción de los HPAs y su constante de la ley de Henry

El peso específico de todos los HPAs estudiados es mayor que el peso específico del agua, por lo que dichos HPAs disueltos o dispersos en fase acuosa tienden a irse al fondo del recipiente de reacción, las comparaciones de esta propiedad fisicoquímica en las pruebas realizadas indican que el peso específico no tiene ninguna relación ni con el comportamiento bacteriano, para que se realice el crecimiento bacteriano del consorcio seleccionado ni con la remoción de dichos HPAs.

Al comparar los pesos moleculares de los HPAs estudiados en las pruebas realizadas, se deduce que no tienen relación alguna con el comportamiento bacteriano ni con la remoción de dichos HPAs, pero sí tienen relación con su número de anillos, ver gráficas 4.8.a y 4.8.b, y sus interpretaciones.

Al comparar la toxicidad de los HPAs estudiados con el comportamiento bacteriano y con la remoción de dichos HPAs, se deduce que no tienen relación entre sí, aunque era de esperar que a mayor toxicidad de los HPAS hubiera menor crecimiento bacteriano y por consecuencia menor remoción, no se sabe qué especie del consorcio bacteriano seleccionado para estas pruebas, deduciendo que en el consorcio hay especies que pueden ser afectadas o no por la toxicidad de estos HPAs.

La constante de la Ley de Henry no mostró tampoco ninguna relación con el crecimiento bacteriano pero sí con la remoción de los compuestos, ver gráfica 4.8.m y su interpretación.

5 CONCLUSIONES

5.1 De los 10 HPAs estudiados, el consorcio bacteriano seleccionado para el estudio fue capaz de degradar los siguientes HPAs en un medio acuoso a 50 mg/L , 32 °C y bajo agitación orbital de 150 rpm durante 144 horas: benzo(a)pireno (32.2%), benzo(g,h,i)perileno (29%), benzo(k)fluoranteno (21%), dibenzo(a,h)antraceno (21%), fluoranteno (73%) e indenopireno (29%).

Los dos HPAs, el benzo(a)pireno y el dibenzo(a,h)antraceno, mostraron biodegradación a las concentraciones de 20 y 5 mg/L.

Los dos HPAs, el benzo(a)pireno y el dibenzo(a,h)antraceno, sus biodegradaciones mostraron relaciones exponenciales con respecto a sus concentraciones utilizadas de 50, 20 y 5 m/L, con un coeficiente de correlación superior a 0.99

5.2 Las cinéticas de degradación de los HPAs estudiados a 50 mg/L, presentaron relaciones logarítmicas con los siguientes coeficientes de correlación: benzo(a)pireno 0.8626, benzo(g,h,i)perileno 0.7809, benzo(k)fluoranteno de 0.9484, dibenzo(a,h)antraceno de 0.8472, fluoranteno de 0.8803 e indenopireno de 0.7763.

Para los dos HPAs, benzo(a)pireno y dibenzo(a,h)antraceno con 20 mg/L, sus cinéticas de degradación presentan funciones logarítmicas con coeficientes de correlación de 0.8767 y 0.8358 respectivamente.

Para los dos HPAs, benzo(a)pireno y dibenzo(a,h)antraceno con 5 mg/L, sus cinéticas de degradación presentan funciones logarítmicas con coeficientes de correlación de 0.9304 y 0.8962 respectivamente.

5.3 La tasa de biodegradación contra la concentración utilizada del benzo(a)pireno y del dibenzo(a,h)antraceno, en el rango de 5 a 50 mg/L, muestran relaciones logarítmicas con coeficientes de correlación de 0.9387 y 0.9993 respectivamente.

5.4 Las relaciones del crecimiento bacteriano con respecto a las concentraciones del benzo(a)pireno y del dibenzo(a,h)antraceno muestran relaciones exponenciales con coeficientes de correlación de 0.9902 y 0.9952 respectivamente.

5.5 Las relaciones del crecimiento bacteriano con respecto a las remociones del benzo(a)pireno y al dibenzo(a,h)antraceno presentan regresiones exponenciales con coeficientes de correlación de 0.8043 y 0.8462 respectivamente.

5.6 Los porcentajes de remoción del benzo(a)pireno son: 32.2 % a 50 mg/L, 27.6 % a 20 mg/L y 4.6 % a 5 mg/L.

5.7 Los porcentajes de remoción del dibenzo(a,h)antraceno son: 47.8 % a 50 mg/L, 31.2 % a 20 mg/L y 3.5 % a 5 mg/L.

5.8 Existen tendencias logarítmicas entre el crecimiento bacteriano y la remoción de los HPAs reportados con respecto a su número de anillos. Sus coeficientes de correlación son 0.8279 y 0.8272 respectivamente.

5.9 Existe tendencia exponencial entre el crecimiento bacteriano y los puntos de ebullición de los HPAs con un factor de correlación de 0.8372.

5.10 Existe relación lineal entre la acción del consorcio bacteriano con respecto a los puntos de ebullición de los HPAs con coeficiente de correlación de 0.9186.

5.11 Existe relación exponencial entre los puntos de fusión y los HPAs con un coeficiente de correlación de 0.8829.

5.12 Existe relación logarítmica entre los puntos de fusión y el porcentaje de remoción de los HPAs, con un coeficiente de correlación de 0.9633.

5.13 Existe una tendencia exponencial entre el crecimiento bacteriano y la solubilidad de los HPAs, con coeficiente de correlación de 0.7485.

5.14 Existe relación exponencial entre la remoción de los HPAS y su solubilidad, con coeficiente de correlación de 0.9613.

5.15 Existe relación exponencial entre el crecimiento bacteriano y el coeficiente de partición octanol-agua, con un coeficiente de correlación de 0.9633.

5.16 Existe una tendencia logarítmica entre el porcentaje de remoción de los HPAs y el coeficiente de partición octanol-agua, con un coeficiente de correlación de 0.7498.

5.17 Existe relación exponencial entre el crecimiento bacteriano y la presión de vapor de los HPAs, con un coeficiente de correlación de 0.9362.

5.18 Existe relación potencial entre el porcentaje de remoción y la presión de vapor de los HPAs, con un coeficiente de correlación de 0.9797.

5.19 Existe una relación logarítmica entre el porcentaje de remoción de los HPAs y la constante de Henry, con un coeficiente de correlación de 0.9875.

5.20 La metodología analítica para la extracción con diclorometano de los 10 HPAs estudiados a partir de las mezclas acuosas de reacción, y su posterior detección y cuantificación por cromatografía de gases/espectrometría de masas fue implementado tomando como base el método 8270C de la U. S. EPA, adecuándolo para satisfacer las necesidades analíticas del presente estudio.

5.21 Aunque la U. S. EPA es un organismo mundialmente reconocido, que busca continuamente métodos más adecuados y confiables para la determinación de compuestos tóxicos en las diferentes matrices ambientales, no se encontró, durante el desarrollo del presente estudio, metodología alguna que estableciera procedimientos

para la extracción, detección y determinación de los HPAs en este tipo de pruebas. Es de suma importancia establecer y contar con métodos específicos, reproducibles y confiables que favorezcan la detección y cuantificación de los HPAs aplicables a este tipo de pruebas.

5.22 Es necesaria una base de datos sobre parámetros cinéticos de biodegradación. La mayoría de los datos publicado es información cualitativa, y cuando es cuantitativa los valores de los parámetros no son intrínsecos, limitando su aplicación.

La información sobre la cinética de biodegradación es esencial durante el diseño del sistema de tratamiento y para el proceso de establecer límites de descarga de éstos compuestos al medio ambiente.

6 RECOMENDACIONES

Es recomendable que para futuros experimentos, la toma de muestra líquida a ser analizada se realice automatizadamente por medio de una manguera o tubo de teflón de diámetro milimétrico, para evitar aperturas del matraz, minimizando el volumen de muestra evaporada, de esta forma la determinación de la concentración del HPA correspondiente será más exacta, así como la determinación de la densidad óptica.

Debido a que en algunas de las pruebas se observó posible volatilización del HPA, se recomienda su medición en la fase gaseosa del matraz, y conocer la cantidad del HPA que se está volatilizando.

Es recomendable que los matraces de reacción sean silanizados, para evitar cualquier posible adsorción del HPA al vidrio y evitar pérdidas de material.

Podrían realizarse pruebas con menores concentraciones de los HPAs, sobre todo con los que muestran mayor toxicidad y poder minimizar el impacto inicial que tiene el consorcio frente al HPA de toxicidad muy alta.

En general podrían realizarse este tipo de pruebas de diferentes HPAs a diferentes concentraciones y con diferentes microorganismos, ya sea por especie o en consorcios.

Para aprovechar la ventaja que representa la biodegradación, todo su potencial para lograr la completa mineralización, o por lo menos la reducción de la toxicidad es que el tratamiento sea cuidadosamente diseñado y operado para prevenir la formación de contaminantes secundarios. La formación de compuestos que se han derivado de la degradación de compuestos tóxicos puede representar un grave problema, ya que muchos de estos compuestos pueden ser más tóxicos al ambiente que sus antecesores.

En México, el conocimiento de ésta tecnología de tratamiento es escaso y se deben

establecer líneas de investigación con el propósito de establecer estudios de vanguardia en el área que ayuden a resolver los problemas que se producen en los efluentes industriales debido a productos que no son fácilmente biodegradables, tales como los compuestos aromáticos que requieren de la manipulación de microorganismos seleccionados para su degradación.

REFERENCIAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY POLYCYCLIC AROMATIC. *Hydrocarbons Toxic Substances Portal* (PAHs), Atlanta. 2009.

Last reviewed: February 1, 2009. Fecha de consulta nov. 2009.

Disponible en <http://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=25>, age

AGUILERA-VÁZQUEZ, L.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; y SAUCEO-CASTAÑEDA, G. (1997). Efecto del número de Reynolds sobre la biodegradación de hidrocarburos en fermentaciones en medio sólido. *VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II simposio Internacional de Bioprocesos*. 1997, B018, p. 231.

ANDERSON, B. E. y HENRYSSON, T. (1996). Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996, Vol. 46, p. 647-652.

BANDALA, E. R.; OCTAVIANO, J. A.; ALBITER, V.; y TORRES, L.G. (1997). Degradation of four pesticides by free *Pseudomonas fluorescens*. *VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II simposio Internacional de Bioprocesos*. 1997, CP047, p. 304.

BOUCHEZ. M. (1995). Polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation: non-conventional substrates metabolism, *Govt. Reports Announcements & Index (GRA&I)*. 1996, Issue 21, NTIS/DE96753702, p. 254.

BOUCHEZ. M.; BLANCHET, D.; y VANDECASTEELE, J. P. (1996). The microbiological fate of polycyclic aromatic hydrocarbons, carbon and oxygen balances for bacterial degradation of model compounds, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996, Vol. 45, ISS 4, p 556-61.

BUCCAFUSCO, R. J.; ELLS, S. J.; y LEBLANC, G. A. (1981). Acute Toxicity of Priority Pollutants to Bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* Vol. 26, p. 446-452.

CHÁVEZ, B.; INCHÁUSTEGUI, A.; RODRÍGUEZ, C.; SALGADO, R. y GARCÍA, M. (1997). Estudios preliminares de bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II simposio Internacional de Bioprocesos. SP103, 20 pp.

DOJLIDO, J. y BEST, G. A., Organic Substances in Water en: Dojlido, J. y Best, G. A. (1993). *Chemistry of Water and Water Pollution*. Ellis Horwood Limited (Ed.), England. 1993. ISBN 0138789193.

CHAPMAN, D. (1996). *Water Quality Assessments, A guide to the use of biota, sediments and water in environmental monitoring*, UNESCO, WHO, UNEP, Great Britain, 1996. ISBN 0 419 21590 5.

EITZER, B. D. (1996). Environmental Fate of Toxic Organic Compounds in Composting Made from Waste Materials, en *Environmental Contamination and Toxicology*. New York. 1996. ISBN 0007-4861.

EPA, 2007. Water Quality Standards; Establishment of Numeric Criteria for Priority Toxic Pollutants; States' Compliances. *Federal Register*. 2007 (Rev.). Vol. 57, Issue 246, p. 60848 (57 FR 60848).

FIGUERUELO, J. E. y MARINO D. M. (2004). *Química Física del ambiente y de los Procesos Medioambientales*. Barcelona. 2004. Ed. Reverté. ISBN: 84, p. 242.

GÓMEZ, C.; ACUÑA, M. E.; AURIA, R. y REVAH, S. (1997). Biodegradación de benceno, tolueno y xileno por cepas puras, *VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II simposio Internacional de Bioprocesos*. 1997. BP050, p. 269.

GRIMMER, F.; JACOB, J.; DETTBARN, G. y RAAB, G. (1995). Study to improve the bioavailability of polycyclic aromatic, *GOVT. REPORTS ANNOUNCEMENTS & INDEX (GRA&I)*, Issue 20. 1996. NTIS/DE96733252), p. 72.

HOWARD, P. H.; BOETHLING, R. S.; JARVIS, W. F.; MEYLAN, W. M., y MICHALENKO, E. M. (1991). *Handbook of Environmental Degradation Rates*, Lewis Publishers, Inc., Chelsea, Michigan 1991.

JOHNSEN, K.; ANDERSEN, S.; y JACOBSEN, C. S. (1996). Phenotypic and Genotypic Characterization of Phenanthrene-Degrading Fluorescent *Pseudomonas* Biovars. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996. Vol. 44, p. 3818-3825.

KASTNER, M, y MAHRO, B. (1996). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996. Vol. 44, ISS 5, p. 668-75.

KIRK, T. K.; LAMAR, R. T. y HAMMEL, K. E. (1995). Development of bioremediation technologies that are based on the xenobiotic-degrading abilities. Fedrip Database, *National Technical Information Service (NTIS)*. 1995. Vol. 6, Issue 3, p. 320-328.

MAHRO, B.; ESCHENBACH, A.; SCHAEFER, G. y KAESTNER, M. (1996). Possibilities and limitations for the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (OAH) in soil, *DECHEMA Monogr. Biodegradation*. Vol. 133. p. 509-516.

Manahan, S. E. (2007). *Introducción a la química ambiental*. 2006. Edit. Reverte. ISBN 8429179070.

NIELSEN, H. y CHRISTENSEN, T. H. (1994). Variability of biological degradation of aromatic hydrocarbons in an aerobic aquifer determined by laboratory batch experiments. *Journal of Contaminant Hydrology*. Netherlands. 1994, Vol. 15, p. 305-320.

PARK, K.; SIMS, R.; DUPONT, W.; DOUCETTE y MATTHEWS, J. E. (1990). Fate of PAH compounds in soil types: influence of volatilization, abiotic loss and biological activity. *Environ. Toxicol. Chem.* 1990, Vol. 9, p. 187-195.

PENG, R. H.; XIONG, A. S.; XUE, Y.; FU, X. Y.; GAO, F.; ZHAO, W.; TIAN, Y. S. y YAO, Q.H. (2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol.* 2008, Rev. Jul. 24.

RAMÍREZ, M. E. y GUTIÉRREZ, M. (1997). Biodegradación de PAH en suelo utilizando surfactantes no iónicos., VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II simposio Internacional de Bioprocesos. 1997, B019, p. 232.

RICHARDSON, R. y ALVAREZ-COHEN, L. (1998). Thermophilic biodegradation of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Water Research.* Vol. **33**, (11), p. 2535-2544.

SCHNEIDER, J.; GROSSER, R.; JAYASIMHULU, K.; XUE, W. y WARSHAWSKY, D. (1996). Degradation of pyrene, benz(a)anthracene, and benzo(a)pirene by *Mycobacterium sp.* Strain RJGII-135, Isolated from a former coal gasification site. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 62, ISS 1, p. 3-19.

SCHUMACHER, B.A. y ZIMMERMAN, J.H. (2004). Composite Sampling for Soil VOC Analysis." Presented at National Environmental Monitoring Conference, Washington, D. C., 2004, p. 19-22.

SONIASSY, R. ; SANDRA, P. y SCHLETT, C. (1994). Water Analysis, Organic Micropollutants, Hewlett-Packard Company. Printed in Germany. 1994.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, XIX Ed. (1995). Editado por Andrew D. Eaton, Leonore S. Clesceri y Arnold E. Greenberg.

STUMM, W. and MORGAN, J. (1981). *Aquatic Chemistry*, Wiley, New York, 1981.

SUDIP, K. S.; OM, V. S. y RAKESH, K. J. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. Review. *TRENDS in Biotechnology*. Vol. 20. No. 6.

STUTTON, S. D.; PFALLER, S. L. K.; SHANN, J. R.; WARSHAWSKY, D.; KINKLE, B. K. y VESTAL, J. R.. (1996). Aerobic Biodegradation of 4-Methylquinoline by a Soil Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, p. 2910-14.

TINOCO, R.; ROMÁN, R. y VÁZQUEZ-DUHALT, R. (1997). Alteración de las Propiedades Catalíticas del Citocromo C por modificaciones químicas para la oxidación de hidrocarburos poliaromáticos. *VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II simposio Internacional de Bioprocesos*. 1997, B016, p.229.

TORRES, L. G.; MIJAILOVA, P. y MÖELLER, G. (1997a). Uso de cepas adaptadas a la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes y tóxicos., *Ingeniería Hidráulica en México*. Vol. XII. Núm. 3. sept – dic., p. 15-25.

TORRES, L. G.; HERNÁNDEZ, M.; BANDALA, E. R.; ALBITER, V. y JIMÉNEZ, B. (1997b). Degradación de una mezcla de clorofenoles en un biofiltro aerobio. *VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II simposio Internacional de Bioprocesos*. CP045, p. 302.

TREJO, M. R. y QUINTERO, R. (1997). Biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo. *VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II simposio Internacional de Bioprocesos*. SP106, p. 23.

UYTTEBROEK, M.; VERMEIR, S.; WATTIAU, P.; RYNGAERT, A. y SPRINGAEI, D. (2007). Characterization of cultures enriched from acidic polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil for growth on pyrene at low pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, Vol. 73, (10), p. 3159-64.

VALLADARES, M. G.; MORALES, D.; QUINTERO, R. y TREJO, M. R. (1997). Biodegradación de petróleo refinado en medio acuoso. *VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II simposio Internacional de Bioprocesos*. B008, p. 221.

WADE, L. G. (2009) *Organic Chemistry*. 7th edition. ISBN13: 9780321610065. ISBN10: 0321610067.

ZILINSKAS, R. A. (1997), Bioremediation in the Marine Environment. *VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos*.

REFERENCIAS DE LA TABLA 11

- (1) <http://www.jtbaker.com/msds/englishhtml/a7020.htm>
- (2) <http://www.chrom.tutms.tut.ac.jp/JINNO/DATABASE/04benz%5Ba%5Danthracene.html>
- (3) <http://web.ncifcrf.gov/rtp/LASP/intra/forms/msds/msds-benzanathracene.pdf>
- (4) <http://en.wikipedia.org/wiki/Anthracene>
- (5) <http://www.chrom.tutms.tut.ac.jp/JINNO/DATABASE/00alphabet.html>
- (6) <http://www.chrom.tutms.tut.ac.jp/JINNO/DATABASE/06chrysene.html>
- (7) http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtasht/_icsc03/icsc0385.htm
- (8) http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtasht/_icsc16/icsc1672.htm
- (9) http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtasht/_icsc14/icsc1474.htm
- (10) http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtasht/_icsc04/icsc0431.htm
- (11) http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtasht/_icsc07/icsc0721.htm
- (12) http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtasht/_icsc01/icsc0104.htm
- (13) http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtasht/_icsc07/icsc0730.htm
- (14) http://www.ilo.org/public/english/protection/safework/cis/products/icsc/dtasht/_icsc07/icsc0739.htm
- (15) <http://en.wikipedia.org/wiki/Fluoranthene>
- (16) <http://chemicaland21.com/specialtychem/finechem/FLUORANTHENE.htm>
- (17) <http://chemicaland21.com/industrialchem/organic/PYRENE.htm>
- (18) http://www.toronto.ca/health/pdf/cr_appendix_b_pah.pdf
- (19) http://www.nanotech.wisc.edu/CNT_LABS/MSDS/Solvents/MSDS%20Anthracene.htm

ANEXO A

4.1.a Antraceno a 50 mg/l

	Densidad óptica	
	0 horas	144 horas
Blanco de células	0.009	0.016
Blanco del compuesto	0.18	0.011
Prueba A	0.176	0.175
Prueba B	0.199	0.190

4.1.b Benzantraceno a 50 mg/l

	Densidad óptica	
	0 horas	144 horas
Blanco de células	0.009	0.016
Blanco del compuesto	0.083	0.106
Prueba A	0.069	0.210
Prueba B	0.069	0.187

4.1.c Benzo(a)pireno a 50 mg/l

	Densidad óptica	
	0 horas	144 horas
Blanco de células	0.007	0.015
Blanco del compuesto	0.088	0.022
Prueba A	0.073	0.193
Prueba B	0.079	0.188

4.1.d Benzo(g,h,i)perileno a 50 mg/l

	Densidad óptica	
	0 horas	144 horas
Blanco de células	0.007	0.015
Blanco del compuesto	0.026	0.077
Prueba A	0.033	0.061
Prueba B	0.028	0.069

4.1.e Benzo(k)fluoranteno a 50 mg/l

	Densidad óptica	
	0 horas	144 horas
Blanco de células	0.007	0.015
Blanco del compuesto	0.135	0.026
Prueba A	0.045	0.105
Prueba B	0.04	0.103

4.1.f Dibenzo(a,h)antraceno a 50 mg/l

	Densidad óptica	
	0 horas	144 horas
Blanco de células	0.007	0.015
Blanco del compuesto	0.037	0.040
Prueba A	0.039	0.094
Prueba B	0.047	0.105

4.1.g Criseno a 50 mg/l

	Densidad óptica	
	0 horas	144 horas
Blanco de células	0.009	0.016
Blanco del compuesto	0.073	0.165
Prueba A	0.088	0.136
Prueba B	0.087	0.147

4.1.h Fluoranteno a 50 mg/l

	Densidad óptica	
	0 horas	144 horas
Blanco de células	0.007	0.015
Blanco del compuesto	0.029	0.009
Prueba A	0.096	0.030
Prueba B	0.096	0.031

4.1.i Indenopireno a 50 mg/l

	Densidad óptica	
	0 horas	144 horas
Blanco de células	0.009	0.016
Blanco del compuesto	0.008	0.003
Prueba A	0.017	0.028
Prueba B	0.014	0.027

4.1.j Pireno a 50 mg/l

	Densidad óptica	
	0 horas	144 horas
Blanco de células	0.009	0.016
Blanco del compuesto	0.207	0.005
Prueba A	0.201	0.165
Prueba B	0.207	0.141

4.2.1.a Benzo(a)pireno 20 mg/l

	Densidad óptica	
	0 horas	144 horas
Blanco de células	0.006	0.016
Blanco del compuesto	0.006	0.006
Prueba A	0.012	0.037
Prueba B	0.013	0.053

4.2.2.a Dibenz(a,h)antraceno a 20 mg/l

	Densidad óptica	
	0 horas	144 horas
Blanco de células	0.006	0.016
Blanco del compuesto	0.022	0.015
Prueba A	0.023	0.033
Prueba B	0.022	0.034

4.2.1.b Frente al Benzo(a)pireno 5 mg/l

	Densidad óptica	
	0 horas	144 horas
Blanco de células	0.006	0.016
Blanco del compuesto	0.003	0.005
Prueba A	0.013	0.030
Prueba B	0.008	0.017

4.2.2.b Dibenzo(a,h)antraceno 5 mg/l

	Densidad óptica	
	0 horas	144 horas
Blanco de células	0.006	0.016
Blanco del compuesto	0.004	0.000
Prueba A	0.011	0.016
Prueba B	0.013	0.02

ANEXO B

Artículo en congreso internacional:

PÉREZ, S. y TORRES, L.G. Biotransformation of ten PHA's by means of an aerobic mixed culture. *The Fifth International In Situ and On-Site bioremediation Symposium*. San Diego, California. 1999, p. 197-202.