

13 00551



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

ESTIMULACIÓN DE CULTIVOS MICROBIANOS
DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:
IRMA RUÍZ SILVA



MÉXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en los laboratorios de la Coordinación de Bioprocesos Ambientales del Instituto de Ingeniería, bajo la dirección de la doctora Susana Saval. Para su realización se contó con el apoyo financiero del CONACYT y del Programa de Becas del Instituto de Ingeniería, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Susana Saval Bohórquez.

Por su dirección, confianza y apoyo en todos los sentidos para la realización de este trabajo. Es un placer y un orgullo trabajar para alguien como usted.

A mi Jurado

Las Doctoras Amanda Gálvez, Carmen Wachter y a los Doctores Eduardo Barzana, Adalberto Koyola y Leobardo Serrano por sus comentarios, consejos y tiempo dedicado en la revisión de este trabajo

*A la Biol. Diana García Aguirre
y a la QFB. Magdala Juárez Martínez*

Por su valiosa ayuda en la realización de éste trabajo, contribuyendo con su experiencia y conocimiento en la validación de los métodos analíticos.

Al Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Por su dirección y consejo en la realización experimental de éste trabajo Y por haber formado parte de mi comité tutoral

A los Laboratorios Sanofi-SintheLabo, Siegfried Rhein y Z. Knoll

*Especialmente al QFB Víctor H, Queb R, QFB Ma Elsa Tapia H y QFB Ma Eugenia Barrón A
Con su apoyo y donaciones se llevó a cabo el presente trabajo*

A mi "Alma Mater" la Universidad Nacional Autónoma de México, a mi querida Facultad de Química, y al Instituto de Ingeniería

DEDICATORIAS

A DIOS.

Por ser mi luz, mi esperanza, mi todo, por que sin ti no hay nada más, por estar siempre conmigo aún cuando yo no siempre estaba contigo Y por mostrarme que el único camino a la verdad es a través de ti.

A mis Padres Jesús y María de Jesús.

Gracias por su infinita ternura y amor Por que toda mi formación se las debo a ustedes Con su ejemplo y sacrificio he llegado hasta este momento Que Dios me los bendiga Los quiero mucho

A mis Hermanos Ana y José Antonio.

Por su apoyo, cariño y tolerancia Por saber perdonar mis arranques y reír con mis bromas y seguir siempre unidos en las buenas y en las malas Los admiro y respeto mucho Siempre los querré

A mi cuñis Víctor

Por tu apoyo y consejo y por que has sabido ganarte nuestro cariño y respeto Gracias por formar parte de mi Familia

A mis tíos y primos,

especialmente a mis abuelitos mi Papá José, mi Mamá Pita y mi Papá Bolo, mi tío Pepe, mi tía Tere y mi tía Amelia los extraño mucho

A la Maestra Lupita Vélez

*Por todo su apoyo incondicional y amistad de tantos años. La admiro y la respeto mucho
Gracias por su cariño y confianza*

A mis Amigos

A mis Amigas de toda la vida Lore, Lupita, Meche, Elsa

Sofi, Ale, Vero, José y Rodolfo
Hemos vivido tantas cosas que estamos más allá de una simple amistad

Magda, Guillermo, Paly y Caro
Gracias por su confianza y cariño Por que cuando los he necesitado han estado conmigo

A mi abijada Valeria Samara
con el deseo de un feliz presente y un futuro prometedor Te quiero mucho

A mis amigos de la Maestría
Omar, Miriam, Arturo, Lilián y Atalo
Por todo lo que vivimos, por su apoyo y los momentos difíciles y por su amistad sincera

A mis amigos y compañeros del Instituto de Ingeniería
Diana, Beti,
Ara, Almita, Adriana, Norma, Gabi, Paly, Ana Laura, Alejandra, Luis, Raúl, Erick
Arturo
A los que se fueron a seguir su camino, pero siguen en mis recuerdos: Mónica, Jasminka, Martha y Héctor.
Por su amistad y cariño

A Bely García
Por tu apoyo y profesionalidad. Gracias por tu amistad

A todos mis profesores por compartir sus conocimientos y ayudar en mi formación como profesionalista y persona
Especialmente a la maestra Magdalena Acosta y Ruth Martín

A las personas que por no mencionarlas dejan de ser importantes en mi vida

A todos y cada uno de ustedes, gracias por darle color a mi vida, por formar parte de mi vida y permitirme
entrar a la suya, por que a través de la amistad, se está un paso mas cerca de Dios

“Bien, ni siquiera la muerte era tan terrible cuando yo era joven. Ahora se llaman irse, en su estúpida charla, en su medroso modo de hablar, porque no son capaces de enfrentarse con la verdad y definirla con sus palabras valientes...”

... ¡Oh, claro que llorábamos!

Era una despedida, y una despedida que duraría toda una vida. Pero no para siempre.

Taylor Caldwell, “Sólo él sabe escuchar”, 1996

CONTENIDO

	Página
Contenido	i
Lista de Tablas	iv
Lista de Figuras	v
Resumen	vii
I Introducción	1
II/III Hipótesis y Objetivos	4
1 Objetivo general	5
2 Objetivos particulares	5
III Hipótesis	5
IV Marco Teórico	6
1 Biodegradación de compuestos químicos	8
2 Adaptación (aclimatación)	9
3 Biodegradación de hidrocarburos	10
4 Combustibles derivados del petróleo	18
1 Propiedades físicas y químicas del diesel	22
2 Toxicidad del diesel	24
5 Alcaloides	25
1 Cafeína	26
2 Teofilina	30
3 Quinina	34
V Antecedentes	35
1 Estudios de biodegradación del diesel	36
2 Estudios de estimulación del crecimiento	39
1 Agentes tensoactivos	40
2 Compuestos inorgánicos	41

3	Compuestos orgánicos.....	42
VI	Procedimiento Experimental	45
1	Estrategia de trabajo.....	46
2	Desarrollo de técnicas.....	47
1	Cultivo inicial	47
2	Medios de cultivo	47
3	Diesel industrial	48
4	Alcaloides	49
5	Agente tensoactivo	49
6	Cuantificación de bacterias degradadoras.....	49
7	Enriquecimiento y adaptación del cultivo degradador de diesel.....	50
8	Aislamiento e identificación de bacterias degradadora de diesel.....	50
9	Conservación del inóculo.....	51
10	Reactivación del inóculo.....	52
3	Desarrollo experimental.....	53
1	Cultivo en mesocosmos	53
2	Obtención de muestras.....	54
3	Determinación del pH.....	55
4	Cuantificación de biomasa como proteína celular.....	55
5	Cuantificación de diesel.....	56
VII	Resultados y Discusión.....	61
1	Adición del agente tensoactivo.....	62
2	Elección de los alcaloides.....	63
3	Identificación de los microorganismos presentes en mayor proporción en el cultivo degradador de diesel industrial.....	66
4	Características del diesel industrial utilizado como substrato	70
5	Biodegradación de diesel industrial en presencia de alcaloides.....	73
VIII	Conclusión.....	92
	Recomendación.....	95
	Bibliografía	98
	Anexos	viii
1	Hojas de análisis de los alcaloides.....	ix
2	Validación de métodos analíticos y cromatográficos.....	xvi
3	Validación de la técnica de Löwry para la determinación de proteína celular.....	xx

4 Validación del método para la cuantificación de diesel residual por cromatografía de grasas.....	xxvii
5 Determinación de la frecuencia de obtención de muestras.....	xxxv
6 Datos experimentales del efecto de los alcaloides sobre el crecimiento y degradación de diesel.....	xxxvi
7 Efecto de diferentes concentraciones del alcaloide cafeina sobre el crecimiento y la degradación de diesel industrial.....	xlii
8 Determinación de la concentración de oxígeno en el sistema de mesocosmos empleado en este estudio.....	xliii
9 Determinación de la concentración de oxígeno necesaria para la mineralización de diesel.....	xlvi

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Página
IV 1	Clasificación del petróleo por su densidad	18
IV 2	Composición del diesel No. 2	22
IV 3	Especificaciones del diesel industrial bajo azufre	24
IV 4	Propiedades físicas de la cafeína	27
IV 5	Propiedades físicas de la teofilina	30
IV 6	Propiedades físicas de la quinina	34
VII 1	Rendimiento de biomasa con diferentes concentraciones de cafeína	65
VII.2	Morfología de las colonias aisladas del cultivo inicial	67
VII 3	Características del diesel industrial empleado como sustrato	70
VII 4	Tabla de mediciones	75
VII 5	ANOVA	76
VII.6	Análisis de rangos múltiples	77
VII.7	Velocidad específica de crecimiento aparente máxima $\mu_{ap\ max}$ (h^{-1})	83
VII 8	Tiempo de replicación celular (h)	84
VII 9	Rendimiento celular Y_x en función del diesel consumido	84

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
IV-1	Compuestos químicos constituyentes del petróleo	12
IV-2	Esquema de la formación de protocatecol (A) y catecol (B) a partir de diferentes compuestos aromáticos	16
IV-3	Esquema que ejemplifica la orto y la meta fisión en los anillos aromáticos	17
IV-4	Torre de destilación	19
IV-5	Principales yacimientos de combustibles fósiles y su producción mundial	20
IV-6	Necesidades energéticas en las distintas áreas del planeta	21
IV-7	Elaboración de productos petrolíferos durante julio del 2000	21
IV-8	Estructura química de los alcaloides utilizados en el presente estudio	26
IV-9	Espectro ultravioleta típico de la cafeína	28
V-1	Esquema hipotético de la entrada del alcano ligado al surfactante a una célula microbiana	38
VI-1	Conservación del inóculo en congelación	51
VI-2	Obtención y manejo de las muestras provenientes de los mesocosmos	55
VI-3	Determinación de proteína celular por la técnica de Löwry	57
VII-1	Curvas de crecimiento y degradación de diesel en presencia de diferentes concentraciones de cafeína	64
VII-2	Comunidad microbiana degradadora de diesel industrial crecido en MM1 a la dilución 10^{-3}	66

LISTA DE FIGURAS (continuación)

VII-3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> aislada del cultivo degradador del diesel industrial	68
VII-4	Cultivos degradadores de diesel industrial a los dos días de crecimiento	69
VII-5	Perfil de destilación de diesel industrial empleado en este estudio	71
VII-6	Perfiles cromatográficos típicos de un estándar de diesel industrial, un estándar de gasolina, y el combustible utilizado en este trabajo	72
VII-7	Evolución del crecimiento y la degradación del diesel industrial	74
VII-8	Gráficas de las cinéticas de crecimiento (a) y degradación (b) Las barras de error corresponden a \pm la desviación estándar	78
VII-9	Comparación de las curvas de crecimiento en presencia de alcaloides	80
VII-10	Comparación de las curvas de degradación de diesel industrial en presencia de alcaloides	80
VII-11	Curvas semilog de crecimiento en presencia de alcaloides	81
VII-12	Perfiles cromatográficos de diesel en los controles SD y BS	86
VII-13	Perfiles cromatográficos de diesel en el control sin alcaloide y en los cultivos con cafeína, quinina y teofilina	87
VII-14	Evolución del pH en los controles y en los cultivos con alcaloides	88

RESUMEN

Se ha demostrado que los microorganismos nativos que actúan en suelos que fueron contaminados tiempo atrás, presentan actividades metabólicas importantes enfocadas a la biodegradación de contaminantes orgánicos. Esta característica es la que permite que un suelo contaminado pueda ser saneado por atenuación natural, o bien, estimulando la actividad microbiana nativa. Sin embargo, en los suelos recién contaminados se hace necesaria la inoculación de cultivos exógenos, los cuales deben asegurar una biodegradación de los contaminantes rápida y segura. Se han intentado varias formas de bioestimulación, las más comunes son la adición sales minerales, derivados proteicos y otros compuestos, que han dado buenos resultados. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la adición de alcaloides naturales como una forma de estimular cultivos microbianos degradadores de diesel, específicamente quinina, cafeína y teofilina

Los experimentos se realizaron con un cultivo enriquecido de bacterias degradadoras de diesel. Se empleó diesel industrial como única fuente de carbono a una concentración del 1% (v/v), equivalente a 8300 mg/l. Los alcaloides se adicionaron a una concentración del 0.1% (p/v). Cada alcaloide se manejó por separado realizando pruebas por triplicado en cada caso. Se agregó un agente tensoactivo para permitir la emulsión del diesel con el medio acuoso.

Se determinó que el oxígeno es limitante en el sistema estudiado, siendo una variable constante en todos los sistemas.

El crecimiento en presencia de cualquiera de los alcaloides fue de aproximadamente 40 % menor, comparado con el control sin alcaloide. Se alcanzó un porcentaje de degradación con cafeína y teofilina del 92-93% y con quinina del 76%. Esto indicó que los microorganismos utilizaron al diesel como fuente de energía y en menor proporción para el crecimiento. Del análisis de resultados se concluye que los alcaloides sí tienen efecto sobre el crecimiento y la degradación del diesel.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

El progreso tecnológico que el hombre ha logrado en los últimos años es impresionante; entre otras habilidades, aprendió a combinar productos químicos con otros materiales para hacer su vida más cómoda y placentera. Mediante el uso de diversos compuestos químicos como fertilizantes, plaguicidas y fármacos, en el siglo XX logró producir grandes cantidades de alimentos, generar energía eléctrica empleando carbón y combustibles fósiles, pero se equivocó al no advertir que mientras producía tantos bienes, alteraba también en forma peligrosa los mecanismos originales que permiten el equilibrio adecuado de la naturaleza.

No solamente los compuestos químicos sintetizados en la actualidad, sino productos naturales como la lignina y muchos derivados del petróleo son depositados en el ambiente sin un pretratamiento que los vuelva menos dañinos. Otros son relativamente inocuos, pero al ser liberados a la biosfera, pueden sufrir transformaciones que los hacen potencialmente agresivos. La mayoría de estos compuestos poseen estructuras relativamente complejas, por lo cual su degradación es difícil. Este es el caso de insecticidas como el DDT, los detergentes e hidrocarburos aromáticos, muchos de ellos halogenados.

Los microorganismos son la clave en diversos procesos bioquímicos; poseen una gran cantidad de enzimas que participan en diversas rutas destinadas a la degradación de una enorme variedad de compuestos naturales convirtiendo los compuestos químicos complejos en materiales más simples. En la naturaleza, estos procesos ayudan a limpiar el ambiente.

Por lo anterior, es deseable que la biodegradación de dichos compuestos tóxicos se lleve a cabo mediante los microorganismos autóctonos de un sitio contaminado. Por ello es importante conocer la fisiología y características bioquímicas de los microorganismos involucrados en la biotransformación, y promover su actividad en beneficio del ambiente.

Los microorganismos encargados de la degradación de compuestos orgánicos contaminantes, se enfrentan a dificultades que les impiden desarrollarse en ambientes extremos como son: bajas temperaturas, valores de pH muy ácidos o alcalinos, baja humedad o presión osmótica elevada, esto además de la complejidad y concentración de los contaminantes que también conforman parte del ambiente extremo. De aquí surge la necesidad de buscar alternativas que faciliten la actividad microbiana enfocada a la degradación del contaminante.

En México, actualmente el interés público se centra en los problemas ocasionados por derrames de hidrocarburos en suelo o agua, y los esfuerzos de las grandes empresas gubernamentales se ven forzados a trabajar contra tiempo para remediar sitios contaminados. Diversos métodos químicos y físicos en muchas ocasiones resultan mas nocivos que la propia contaminación, por lo que el tratamiento con microorganismos resulta una mejor opción, aunque la degradación de los hidrocarburos puede ser lenta. Por ello es necesario buscar alternativas para acelerar la degradación mediante la estimulación de la actividad metabólica de los microorganismos.

Se han empleado muchas técnicas de estimulación, como la adición de nutrientes esenciales como fósforo y nitrógeno, empleo de factores del crecimiento como vitaminas y aminoácidos y en los últimos años el empleo de coenzimas. Es sabido que los aminoácidos incrementan el crecimiento microbiano, por tal motivo el empleo de sustancias de estructura química análoga como los alcaloides, podrían tener un efecto similar. El empleo de alcaloides en el campo de la biorremediación, es novedoso, existe poca información al respecto y aparentemente sólo ciertos productos químicos comerciales los contienen.

Por tal motivo se espera con este trabajo contribuir al conocimiento de la estimulación de microorganismos degradadores de hidrocarburos mediante adición de alcaloides, con un enfoque especial hacia la biorremediación de suelos contaminados con combustibles destilados.

II. OBJETIVOS
III. HIPÓTESIS

II. OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto estimulante de alcaloides sobre el desarrollo de cultivos degradadores de diesel industrial

II.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Elección de los alcaloides según sus características químicas y su disponibilidad.
- 2) Obtención de un cultivo microbiano adaptado a altas concentraciones de diesel industrial
- 3) Evaluar el efecto del alcaloide sobre el crecimiento microbiano
- 4) Evaluar el efecto del alcaloide sobre la biodegradación del diesel industrial.

III. HIPÓTESIS

Se ha demostrado que los alcaloides ejercen un efecto estimulante sobre el metabolismo, por lo que se espera que un cultivo microbiano adaptado a la presencia de diesel pueda incrementar la velocidad y grado de degradación de este combustible cuando se adicionan alcaloides.

II. OBJETIVOS
III. HIPÓTESIS

II. OBJETIVOS

II.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto estimulante de alcaloides sobre el desarrollo de cultivos degradadores de diesel industrial

II.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Elección de los alcaloides según sus características químicas y su disponibilidad.
- 2) Obtención de un cultivo microbiano adaptado a altas concentraciones de diesel industrial
- 3) Evaluar el efecto del alcaloide sobre el crecimiento microbiano
- 4) Evaluar el efecto del alcaloide sobre la biodegradación del diesel industrial.

III. HIPÓTESIS

Se ha demostrado que los alcaloides ejercen un efecto estimulante sobre el metabolismo, por lo que se espera que un cultivo microbiano adaptado a la presencia de diesel pueda incrementar la velocidad y grado de degradación de este combustible cuando se adicionan alcaloides.

IV. MARCO TEÓRICO

IV. MARCO TEÓRICO

En un sitio específico de producción, manejo o durante su transporte, un compuesto químico orgánico puede sufrir cambios por mecanismos abióticos. La transformación fotoquímica ocurre en la atmósfera y en superficies muy cercanas al agua, suelo, vegetación, y estos procesos pueden destruir totalmente o modificar apreciablemente un número de diferentes tipos de compuestos químicos. Las reacciones no enzimáticas son también prominentes en el suelo, sin embargo tales procesos rara vez convierten los compuestos orgánicos a productos inorgánicos y muchas de estas reacciones sólo modifican la molécula, por lo que el producto resultante es por lo menos similar en estructura y toxicidad, al compuesto precursor.

Los procesos biológicos en cambio, pueden modificar moléculas orgánicas. Tales transformaciones, las cuales involucran enzimas como catalizadores, frecuentemente provocan importantes modificaciones en la estructura y propiedades toxicológicas del contaminante. Estos procesos bióticos pueden resultar en la conversión completa de la molécula orgánica a productos cada vez más simples incluso de tipo inorgánico^[4].

Esta información indica que los principales agentes causantes de la transformación biológica en suelos, sedimentos, aguas de desecho, aguas superficiales y subterráneas, son los microorganismos que habitan de manera natural en estos sitios^[66].

Los microorganismos son indispensables para el reciclaje de compuestos químicos en el ecosistema. En años recientes los microorganismos han sido utilizados para la biodegradación de productos de desecho de origen industrial así como del petróleo, de plaguicidas y de otros xenobióticos a través de las técnicas de biorremediación. Tales beneficios ayudan al ambiente no solo en la eliminación de los compuestos químicos tóxicos, sino de cierto modo también a minimizar el daño ambiental ocasionado^[18].

En 1989 el derrame de petróleo ocasionado por el supertanque *Exxon Valdez*, contaminó el mar de Alaska (Prince William Sound) con 11 millones de galones de petróleo, esto promovió

el desarrollo de técnicas biotecnológicas para la limpieza del derrame. La adición de elementos nutritivos a las líneas costeras contaminadas con petróleo estimuló a las bacterias autóctonas, resultando en un incremento significativo de la velocidad de biodegradación. Estos resultados sugirieron que los microorganismos autóctonos podrían ser adecuados para la biorremediación de derrames petroleros, si son provistos de suficientes nutrientes para su crecimiento y metabolismo^[46]

De esta forma, en la biorremediación se hace uso de las capacidades degradativas microbianas para la eliminación o transformación de compuestos orgánicos contaminantes a sustancias más simples^[18]

IV.1 BIODEGRADACIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS

En general, los microorganismos pueden usar compuestos orgánicos naturales y sintéticos para su crecimiento, las moléculas son simplemente el substrato orgánico a partir del cual la población puede obtener los elementos necesarios o la energía requerida para sus reacciones biosintéticas.

Un procedimiento común que permite incrementar la biomasa de una población microbiana con capacidad para usar compuestos orgánicos específicos como única fuente de carbono y de energía, es conocido como técnica de enriquecimiento. El método se basa en la ventaja selectiva que gana un organismo para usar un compuesto en particular como única fuente de carbono y energía. Bajo estas condiciones, una especie que puede crecer a partir de aquél compuesto químico se multiplicará y sólo muy pocas células de otros microorganismos sobrevivirán en este medio. Sin embargo, ciertas especies que usan los productos finales de la población bajo ensayo también pueden prosperar, por lo que en el aislamiento final del microorganismo de interés requiere de su cultivo sobre agar para poder seleccionar las colonias que crecen en tiempos relativamente cortos. El medio de cultivo con base de agar puede ser selectivo agregando el compuesto químico a prueba como única fuente de carbono y energía. Transferencias repetidas a medios frescos que contienen el compuesto probado y nutrientes inorgánicos, además de incrementar el grado de selectividad, permiten enriquecer la población de las especies deseadas^[4].

Como regla, la mineralización de un compuesto químico orgánico es característico en la biodegradación, en la cual el microorganismo convierte el substrato a CO₂, componentes celulares y productos típicos de las rutas catabólicas. Es común, sin embargo, que la mineralización en los ambientes naturales ocasionalmente puede no estar unida al crecimiento, lo que resulta en un número mínimo de células de poblaciones con características específicas. Algunas especies pueden crecer a expensas de una fuente de carbono y no mineralizarlo; sin embargo, si el oxígeno está presente, el producto orgánico excretado por una especie puede ser utilizado por otra y probablemente será convertido a CO₂, lo que da como resultado neto una mineralización^[82]

Existen dos categorías de biotransformación. En la primera, la biodegradación del substrato provee de carbono y energía para soportar el crecimiento, y así incrementar gradualmente la población causando una mineralización rápidamente; estos procesos están unidos al crecimiento^[66].

En la segunda categoría, la biodegradación no está unida a la multiplicación celular. Por ejemplo, bajo ciertas condiciones en aguas dulces y de desecho y posiblemente en otros ambientes naturales prácticamente todo el carbono orgánico es mineralizado y una pequeña o ninguna cantidad se acumula como biomasa. Esto es sorprendente y aún inexplicable porque la mineralización genera energía que resulta en la asimilación de carbono^[4,82].

IV.2 ADAPTACIÓN (ACLIMATACIÓN)

Antes de iniciar la biodegradación propiamente, se identifica un periodo en el cual es evidente la ausencia de la destrucción del compuesto químico. Este intervalo de tiempo es conocido como período de adaptación, aclimatación o fase lag. En ambientes naturales puede ser definido como el intervalo de tiempo entre la entrada del compuesto químico a un medio específico y la evidencia detectable de su pérdida^[4].

Los períodos de aclimatación han sido reportados para muchos compuestos que son introducidos en el suelo, sedimentos y lodos. Muchos compuestos químicos para los cuales se ha descrito una fase de adaptación incluyen^[4,66]:

- a) Herbicidas: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), metoxiclorofenil de alquilo (MCPA), tricloroetano (TCA), amitrole, pirazón, monuron, dalapson
- b) Insecticidas: metilparatión y azinfosmetil.
- c) Compuestos de amonio cuaternario: cloruro de dodeciltrimetilamonio.
- d) Hidrocarburos policíclicos aromáticos: naftaleno, antraceno.
- e) Otros: fenol, 4-clorofenol, pentaclorofeno (PCP), difenilmetano, ác. 3,5-diclorobenzóico

El período de aclimatación varía entre menos de una hora y varios meses dependiendo de la concentración del compuesto químico y de las condiciones microambientales

Durante el período de aclimatación, los microorganismos producen muchas enzimas, algunas son constitutivas y otras son inducibles. Estas últimas son formadas en cantidades apreciables sólo cuando el sustrato o algunos compuestos relacionados estructuralmente están presentes.

Una vez que la comunidad microbiana autóctona ha comenzado a aclimatarse al compuesto químico y su actividad es notable, puede mantener su estado activo por algún tiempo, resultando frecuentemente en una capacidad para degradar la mayoría de las moléculas relacionadas estructuralmente con el compuesto original^[81].

IV.3 BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS

La biodegradación está presente en forma natural en prácticamente todos los suelos. Un gran número de bacterias, mohos, levaduras y ciertos tipos de cianobacterias están involucrados en la oxidación aerobia de los hidrocarburos del petróleo. Los nutrientes que son necesarios para que el proceso se dé en forma natural dependen de la composición del suelo y de la concentración del contaminante^[42].

Para tener idea de la variedad metabólica que deben tener los microorganismos que degradan el petróleo crudo, se deben tomar en cuenta sus principales componentes (figura IV-1) que son:

- ❖ n-alcanos: 15-30%
- ❖ cicloalcanos: 30-50%
- ❖ compuestos mono y poli aromáticos: 5-20%
- ❖ compuestos aromáticos azufrados, oxigenados o nitrogenados: 2-15%

Los hidrocarburos aromáticos más comunes son: bencenos alquil sustituidos, naftalenos, fenantreno, pireno, fluoranteno, benzo(a)antraceno, criseno, trifenileno, benzo(g,h,i)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(e)perileno y benzo(g,h,i)perileno; además de los compuestos que contienen azufre, nitrógeno y oxígeno como piridina, quinolina, sulfuros, tioles, pirroles, fenoles, cetonas, ésteres y alcoholes, entre otros^[65]

Los microorganismos pueden desintegrar casi todos los hidrocarburos bajo condiciones apropiadas. Hay bacterias que no actúan sobre los hidrocarburos de cadena larga, pero que oxidan el metano (metilótrofas). Los hidrocarburos alifáticos de cadena corta, como el etano, el propano y el butano son oxidados por algunas bacterias de distintos géneros entre las que destacan *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Nocardia*^[70].

Los hidrocarburos alifáticos de cadena larga sufren el ataque de un mayor número de bacterias, principalmente de *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* y *Nocardia* entre otras. Algunas levaduras del género *Candida* son capaces también de oxidar estos hidrocarburos. Ciertas bacterias oligocarbófilas pueden vivir solamente del vapor de petróleo cuando éste se encuentra flotando sobre el agua^[77].

El género *Pseudomonas* en presencia de oxígeno, pueden remover fragmentos de dos unidades de carbono a partir de una molécula de n-alcanos mediante reacciones de β -oxidación^[70].

Muchas bacterias, algunas levaduras y hongos poseen capacidad para metabolizar los hidrocarburos aromáticos. Entre las primeras destacan principalmente los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Spirillum*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Bacillus* y *Nocardia*. Esta degradación produce anillos aromáticos que portan casi exclusivamente grupos hidroxilo. Estos anillos se convierten después en ácidos alifáticos, para lo cual hace falta oxígeno molecular que es incorporado por las oxigenasas^[46].

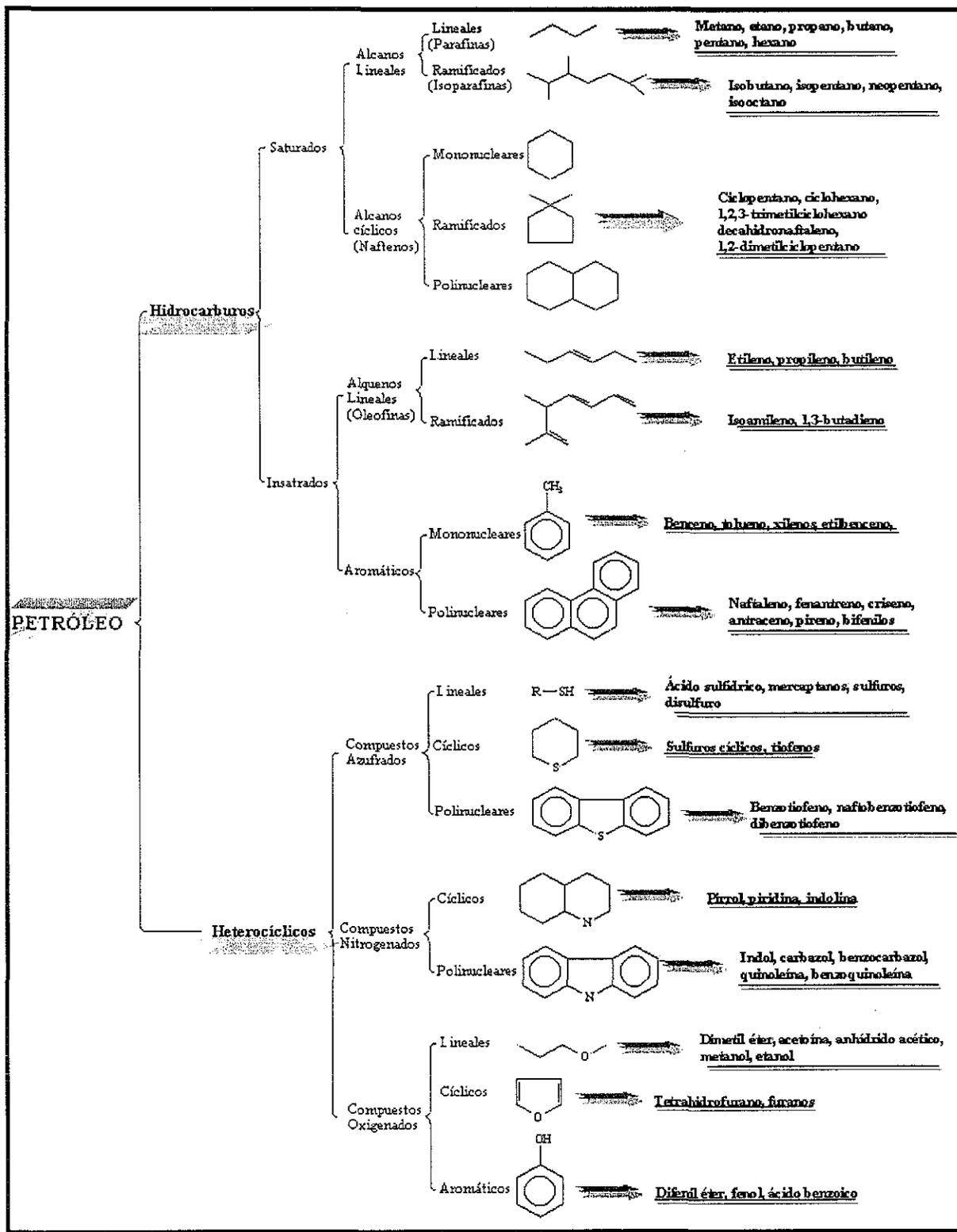
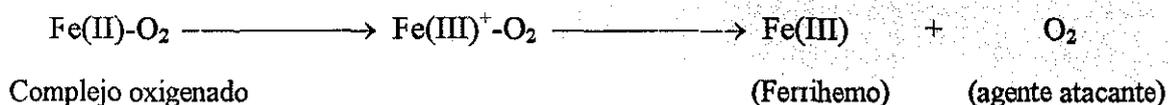


Figura IV-1 Compuestos químicos constituyentes del petróleo

La importancia del catabolismo de compuestos aromáticos es ahora muy apreciado, ya que después de los residuos glucosilados, el anillo bencénico es una de las estructuras químicas más ampliamente distribuidas en la biosfera^[24]

Las oxigenasas se clasifican en dos grupos de acuerdo a su modo de ruptura del anillo aromático^[23,24]: a) dioxigenasas y b) monooxigenasas

A) **DIOXIGENASAS** - Las dioxigenasas catalizan la introducción de dos átomos de oxígeno al sustrato. Típicamente constan de cuatro subunidades con un peso molecular aproximado de 40,000 cada una. Algunas investigaciones han revelado que las dioxigenasas son activas cuando el hierro está en forma ferrosa, siendo la formación del complejo Fe(II)-O₂ un primer paso que es esencial para la asociación catalítica. Un mecanismo propuesto es el siguiente:



Sin embargo, otras investigaciones han revelado que existen dioxigenasas que son activas cuando contienen Fe(III) y éste permanece en forma oxidada durante la reacción. Estas enzimas no contienen un grupo *hemo* como grupo prostético.

Generalmente, antes de que el anillo bencénico pueda ser abierto por una dioxigenasa, la estructura debe de adquirir dos grupos hidroxilo. Dichas dioxigenasas se han identificado como sigue:

- 1) Dioxigenasas que realizan meta-fisión ó extradiólicas.- Llamada también protocatecol-4,5-dioxigenasa. Rompe el anillo entre un carbono hidroxilado y su carbono adyacente no hidroxilado. Requieren ión ferroso en lugar del sustrato aromático y son incoloras. Este parece ser el sitio del ataque inicial por oxígeno. Son multímeros de un tipo simple de subunidad y uno o dos átomos del ión ferroso están asociados con cada subunidad^[79].
- 2) Dioxigenasas que realizan orto-fisión ó intradiólicas.- También llamada 3,4-dioxigenasa para catecoles. Dan coloración café, ya que contienen un enlace con el ión férrico. Este ión férrico

permanece en la forma oxidada y por lo tanto, parece unirse al sustrato aromático en un complejo quelante; el oxígeno ataca directamente al sustrato mientras está formando el complejo. Son homomultímeras o están compuestas de dos subunidades diferentes y contienen cantidades variables del ión férrico por mol de enzima^[23,79].

B) **MONOOXIGENASAS** - A las monooxigenasas también se les conoce como hidrolasas u oxidasas de función mixta. Catalizan la incorporación de un sólo átomo de oxígeno. Preparan al benceno para la fisión. Son flavoproteínas, en donde el FAD es primero reducido por el NAD(P)H; después el NAD⁺ deja el sitio activo antes de que entre oxígeno al sitio activo para formar un hidroperóxido con el FAD reducido.

Las monooxigenasas se clasifican como internas o externas. Las monooxigenasas que requieren un cosustrato en adición al sustrato hidroxilado existente, son conocidas como monooxigenasas externas. Si el sustrato hidroxilado existente sirve también como cosustrato, entonces la monooxigenasa se clasifica como interna. Muchas monooxigenasas internas contienen flavinas como cofactores y están desprovistas de metales.

Una monooxigenasa bien caracterizada es la salicilato hidroxilasa. La enzima contiene un FAD y una cadena polipeptídica que tiene un peso molecular de 57,200; exhibe una marcada especificidad hacia sustratos que presentan un grupo sustituyente hidroxilo o carboxilo en la posición orto.

Las dioxigenasas y cicloisomerasas normales, exhiben una baja actividad para los sustratos halogenados^[23].

El hecho de que el ataque por oxígeno provoque un rápido recambio de diferentes compuestos inertes (a menudo aromáticos), no descarta a los procesos anaerobios, los cuales también tienen una importante contribución en la operación del ciclo del carbono. Así, la deshalogenación reductiva es una reacción importante que es catalizada por organismos anaerobios^[24].

Muchos microorganismos anaerobios pueden poseer capacidades para degradar algunos xenobióticos que son considerados recalcitrantes bajo condiciones aerobias. Numerosos estudios han revelado que los benzoatos sustituidos, incluyendo compuestos aromáticos halogenados,

nitro y aminoaromáticos, hidrocarburos y compuestos fenólicos, pueden ser degradados por bacterias bajo condiciones anaerobias^[24,16,29]

El grado del metabolismo anaerobio de compuestos orgánicos y su mineralización a CO₂ y CH₄, depende de la disponibilidad de luz o aceptores inorgánicos de electrones tales como NO₃⁻, SO₄²⁻, o CO₂^[23].

Por conveniencia, en la biodegradación de compuestos recalcitrantes estos son agrupados en tres clases^[22]:

- 1) Alifáticos
- 2) Policíclicos
- 3) Aromáticos

La mayoría de los compuestos aromáticos son convertidos por bacterias a catecol y protocatecato (figura IV-2), los cuales se convierten rápidamente en otros substratos por las subsecuentes reacciones de ruptura oxidativa. Por ejemplo, los compuestos aromáticos halogenados pueden ser convertidos a catecol, protocatecato o sus correspondientes clorocatecol y cloroprotocatecato^[12].

El anillo aromático del catecol y del protocatecato son escindidos vía reacciones de orto ó meta fisión (figura IV-3) Los productos de cada fisión, cis,cis-muconato y 3-carboxi-cis,cis-muconato, producen en dos reacciones subsecuentes el primer intermediario común, el 4-oxoadipato enol lactona. Este compuesto es metabolizado para producir succinato y acetil-CoA. La canalización de diversos compuestos dentro de unas pocas rutas metabólicas centrales beneficia al microorganismo al simplificar los circuitos reguladores, control genético y reducir los requerimientos energéticos.

La ruta de meta-fisión utiliza la enzima catecol-3,4-dioxigenasa para abrir el anillo adyacente al grupo hidroxilo. El metabolismo conduce a la formación de piruvato, formato y acetaldehído^[23].

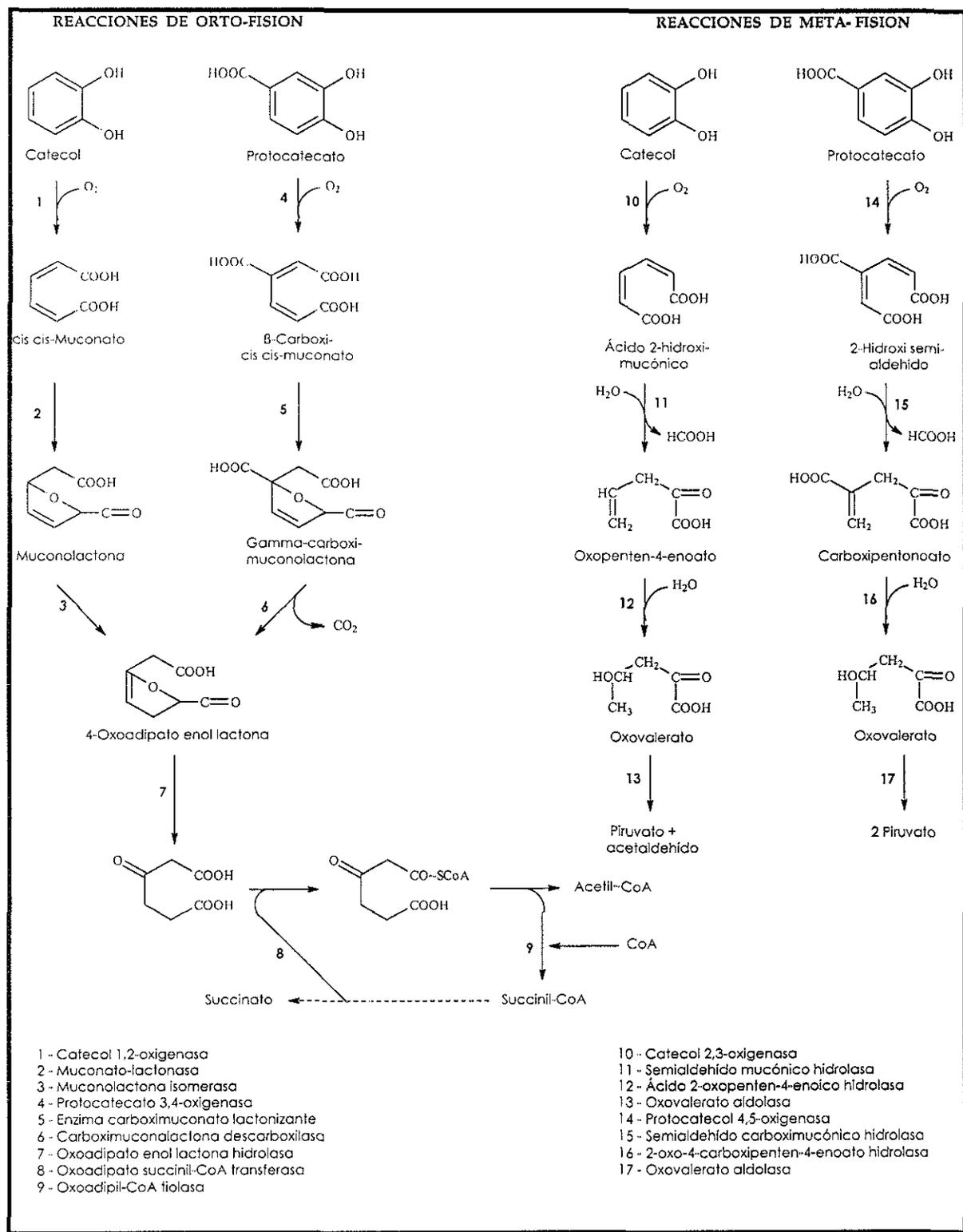


Figura IV-3 Esquema que ejemplifica la orto y la meta fisión en los anillos aromáticos

IV.4 COMBUSTIBLES DERIVADOS DEL PETRÓLEO

El petróleo (aceite de piedra) es una mezcla compleja en la que coexisten en fases sólida, líquida y gaseosa, compuestos denominados hidrocarburos, constituidos por átomos de carbono e hidrogeno y pequeñas proporciones de heterocompuestos de nitrógeno, azufre, oxígeno y algunos metales. Su color varía entre ámbar y negro.

La industria mundial de hidrocarburos líquidos clasifica el petróleo de acuerdo a su densidad API (parámetro internacional del Instituto Americano del Petróleo), que diferencia las calidades del crudo como se muestra en la tabla IV.1.

Tabla IV.1 Clasificación del petróleo por su densidad

Aceite Crudo	Densidad (g/cm ³)	Densidad Grados API
Extrapesado	> 1.0	10.0
Pesado	0.92 – 1.0	10.0 – 22.3
Mediano	0.87 – 0.92	22.3 – 31.1
Ligero	0.83 – 0.87	31.1 – 39.0
Superligero	< 0.83	> 39.0

Para exportación, en México se preparan tres variedades de petróleo crudo:

- ✧ **Istmo:** Ligero con densidad de 33.6 grados API y 1.3% de azufre en peso.
- ✧ **Maya:** Pesado con densidad de 22 grados API y 3.3% de azufre en peso.
- ✧ **Olmeca:** Superligero con densidad de 39.3 grados API y 0.8% de azufre en peso.

El petróleo se separa en fracciones en torres de destilación (figura IV-4) las cuales después de un procesamiento adicional, dan origen a los productos y/o combustibles principales que se venden en el mercado: el gas LP (utilizado en estufas domésticas), gasolina para los automóviles, turbosina para los aviones jet, diesel para los vehículos pesados y combustóleo para el calentamiento en las operaciones industriales^[93].

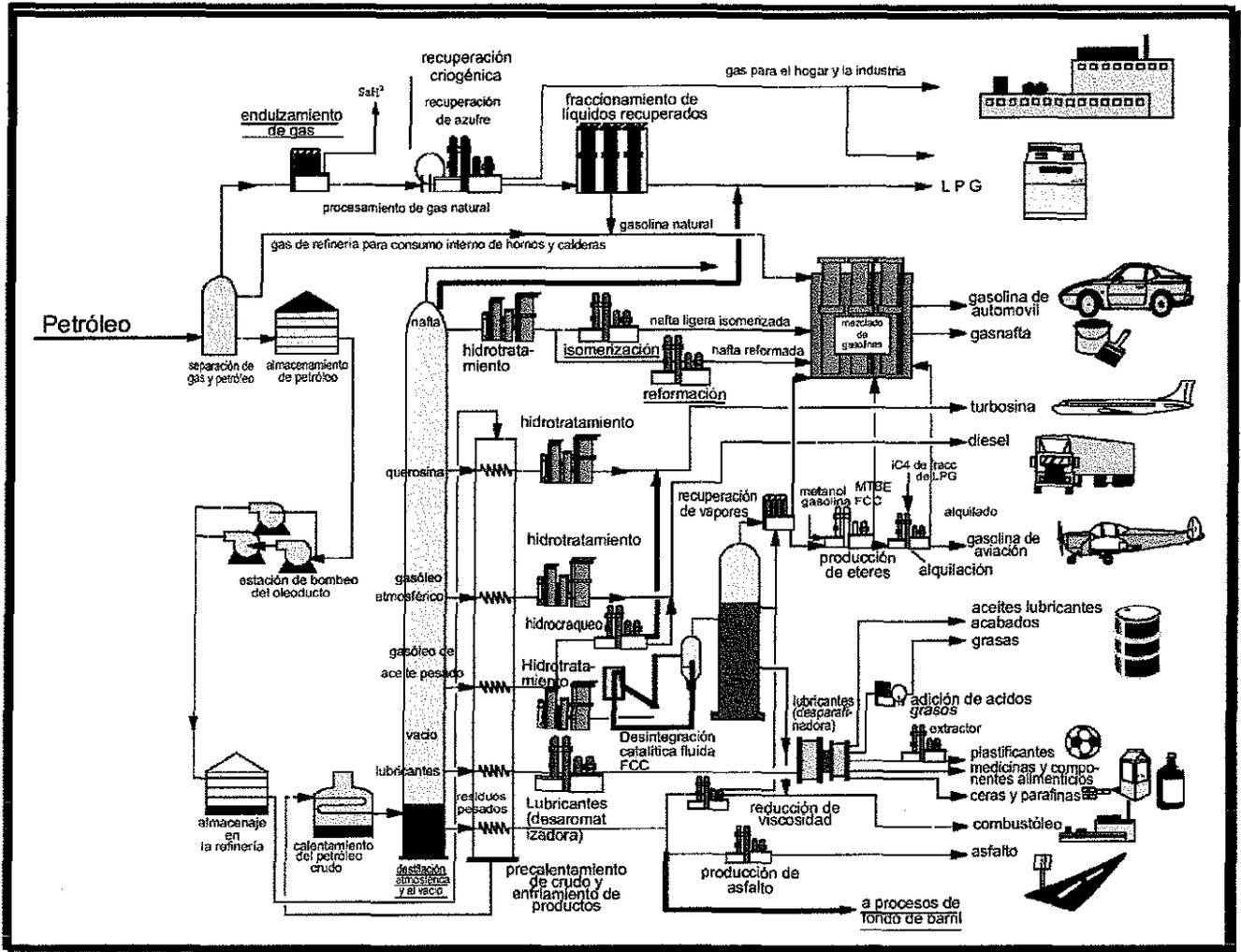


Figura IV-4 Torre de Destilación (tomado de la página web del Instituto Mexicano del Petróleo, 2001).

Por definición un combustible es una sustancia que puede proporcionar energía calorífica apta para producir trabajo mecánico, se clasifica de acuerdo a su estado físico. Existen combustibles sólidos como el carbón mineral, líquidos que son los destilados del petróleo y gaseosos, que es el gas natural^[25].

El diesel proviene de la refinación del petróleo y es utilizado en motores de combustión interna. Los motores diesel fueron inventados en 1897 por el ingeniero alemán Rudolf Diesel (1858-1913), hacen uso del calor generado cuando la mezcla de aire-combustible es comprimida a 500-550 lb/in² como única fuente de ignición. Por sus características dicho motor al ser más pesado solo se emplea en vehículos cuyo motor esté fijo como en el caso de camiones, barcos o plantas generadoras^[74].

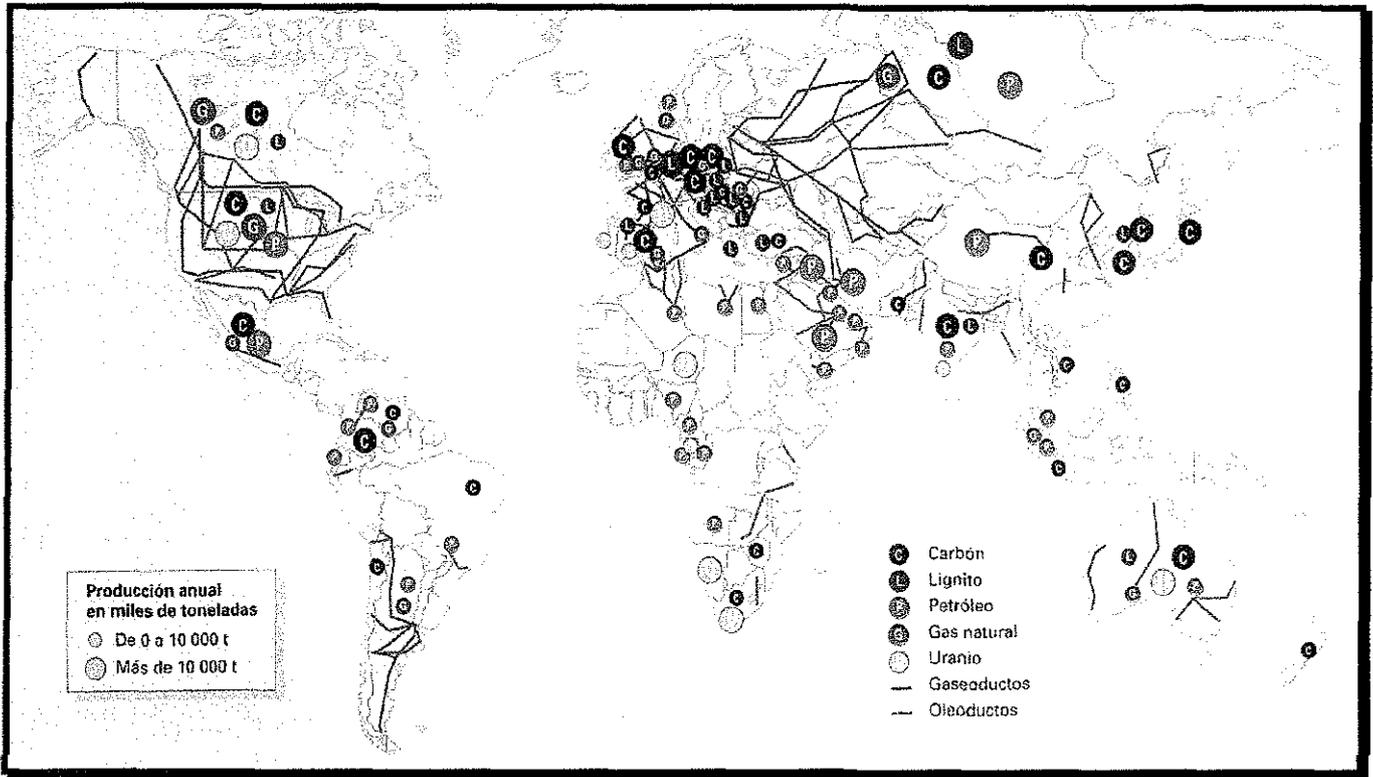


Figura IV-5 Principales yacimientos de combustibles fósiles y su producción mundial (tomado de Atlas Mundial del Medio Ambiente, 1997).

Los derivados del petróleo tienen una repercusión económica global muy importante, buena parte de la energía que se consume en la actualidad corresponde a la utilización de combustibles fósiles (figura IV-5). En 1991 Estados Unidos fue el principal consumidor de petróleo con 774 millones de toneladas métricas. Los combustibles y su uso desmedido ha ocasionado problemas de contaminación por derrames que ocurren durante el abastecimiento de dichos energéticos para satisfacer las necesidades del mercado, las cuales se cubren con la disponibilidad de recursos que se estima en 90 mil millones de toneladas de petróleo en el mundo (figura IV-6) ^[9]

En México, PEMEX es la empresa que produce y distribuye los productos del petróleo en el país y mantiene relaciones comerciales en el resto del mundo. La elaboración de productos petrolíferos en julio del 2000 se presentan en la gráfica de la figura IV-7, donde se aprecia que el diesel alcanzó una producción de 280 7 miles de barriles diarios ^[93].

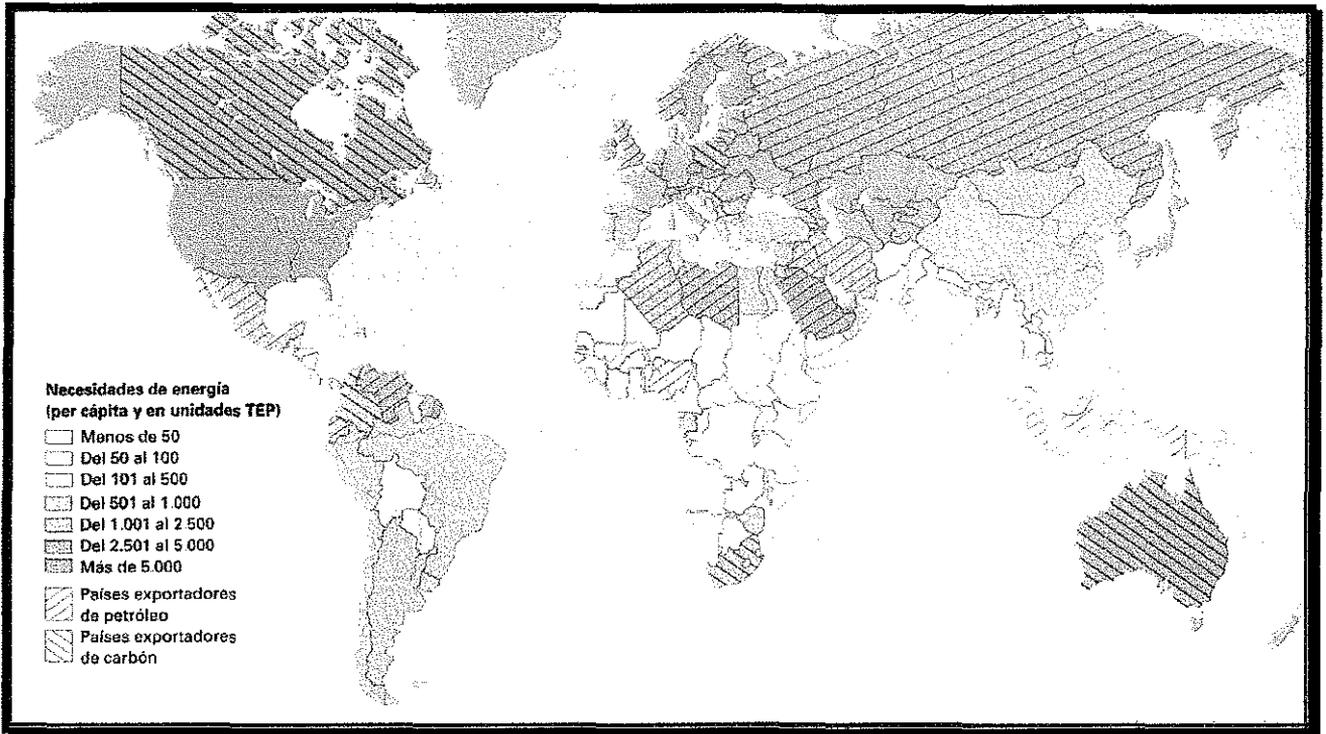
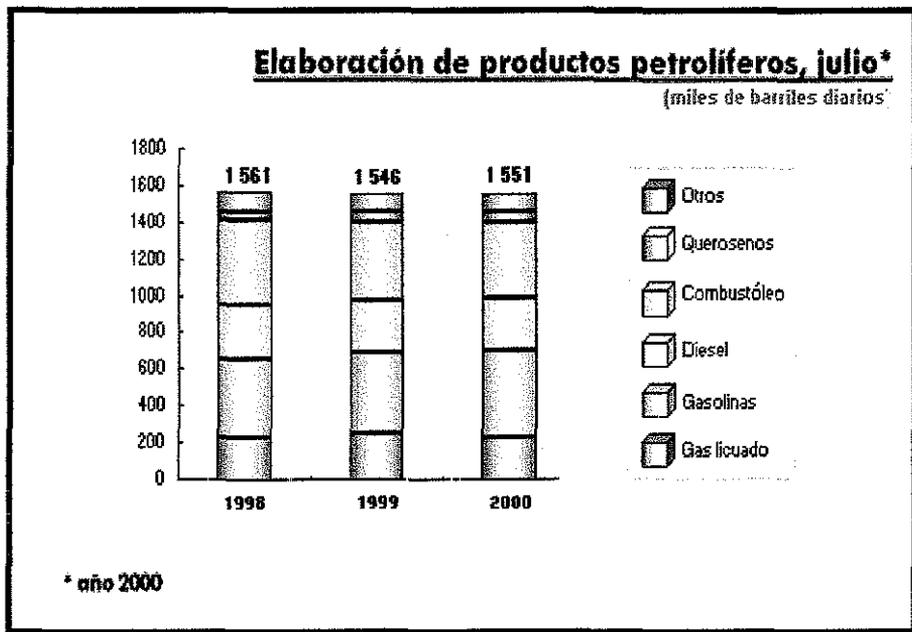


Figura IV-6 Necesidades energéticas en las distintas áreas del planeta (tomado de Atlas Mundial del Medio Ambiente, 1997).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura IV-7 Elaboración de productos petrolíferos durante Julio del 2000 (tomado de página web de PEMEX, julio del 2000)

IV.4-1 Propiedades físicas y químicas del diesel

Por definición, la fracción del petróleo crudo que se utiliza como combustible diesel es aquella que destila a una temperatura más alta que la gasolina o el queroseno pero más baja que los aceites pesados, esto es, entre 148.89°C y 357.22°C^[74].

En países desarrollados al diesel se le denomina “diesel No. 2” Su composición química se muestra en la tabla IV 2; en general está conformado por un 12.7% de parafinas, 43.7% de naftalenos y 43.6% de aromáticos^[59,76]. Su número de clasificación química es: CAS 68334-30-5 y su número de clasificación ACX es X1012054-0

Tabla IV.2 Composición de diesel No. 2

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (% VOLUMEN)	COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (% VOLUMEN)
Parafinas	0.9	Parafinas	7.4
C ₁₀ Cicloparafinas	0.6	C ₁₅ Cicloparafinas	5.5
Aromáticos	0.4	Aromáticos	3.2
Parafinas	2.3	Parafinas	5.8
C ₁₁ Cicloparafinas	1.7	C ₁₆ Cicloparafinas	4.4
Aromáticos	1.0	Aromáticos	2.5
Parafinas	3.8	Parafinas	5.5
C ₁₂ Cicloparafinas	2.8	C ₁₇ Cicloparafinas	4.1
Aromáticos	1.6	Aromáticos	2.4
C ₁₃ Parafinas	6.4	C ₁₈ Parafinas	4.3

Las propiedades físicas reportadas para el diesel son las siguientes^[93]:

Descripción: Combustible, líquido amarillo-café

Densidad: 0.87-0.90 g/ml a 20°C

Punto de fusión: -18°C

Punto de ebullición: 282-338°C

Solubilidad:

en agua: < 1 mg/ml a 19°C

en dimetilsulfóxido (DMSO): ≥ 10 mg/ml a 19°C

en otros solventes: acetona, éter, benceno, etanol 95%, metanol, hexano y aceite de maíz

Temperatura de inflamación: 52°C

Estabilidad: bajo condiciones normales de laboratorio

Olor: a combustible

Clase de riesgo: 3

Requerimiento de etiqueta: líquido inflamable

Usos: combustible para motores de barcos y aviones

Precauciones de almacenamiento: mantener en refrigeración

Efectos a la salud: Los síntomas de exposición a los vapores incluyen náusea, vómito, tos, disnea, irritación de la piel y los ojos, depresión del sistema nervioso central, dolor de cabeza, anestesia, irritación, calambres, angustia, coma y muerte.

El combustible diesel, también se elabora a partir de mezclas de gasóleos con querosinas y aceite cíclico ligero, el cual es producto del proceso de la desintegración catalítica.

En un tiempo, la producción del diesel involucró utilizar lo que quedaba después de remover productos valiosos del petróleo. El proceso es muy complejo ya que comprende cortes específicos de las diferentes fracciones de petróleo para cumplir con las especificaciones de calidad. La producción de un diesel estable y homogéneo requiere de experiencia, respaldada por un estricto control de laboratorio^[93].

En México, el diesel industrial también denominado diesel industrial bajo azufre, tiene las especificaciones que se muestran en la tabla IV.3.

Tabla IV.3 Especificaciones del diesel industrial bajo azufre

Propiedad	Unidad	Método (2)(3)	Especificación
Peso específico a 20/4 °C		D 1298	Reportar
Temperatura de inflamación	°C	D 93	52 mínimo
Temperatura de escurrimiento	°C	D 97	+ 10 máximo
Azufre total	% peso	D 4284	0.05 máximo
Agua y sedimento	% volumen	D 1796	0.05 máximo
Viscosidad cinemática a 40°C	cSt	D 445	1.9 / 5.8
Color A.S.T.M.		D 1500	5.0 máximo

OBSERVACIONES:

- (1) El diesel industrial bajo azufre es para uso exclusivo en quemadores de flama abierta, no debe utilizarse en motores de combustión interna, por no satisfacer los requerimientos necesarios para dicho uso
- (2) Los métodos ASTM corresponden a los revisados en la última edición publicada
- (3) La tolerancia de precisión y pruebas que están en los métodos ASIM, repetibilidad y reproducibilidad, se aplicarán en los análisis comparativos de calidad del producto. ESTA CONCEPCION NO ES APLICABLE EN LOS CENTROS PRODUCTORES, LOS QUE INVARIABLEMENTE DEBERÁN CUMPLIR CON EL LÍMITE ESPECIFICADO

IV.4-2 Toxicidad del diesel

No hay datos disponibles sobre toxicidad del diesel, sin embargo, se ha publicado que la exposición ocupacional al diesel ocasiona cáncer de laringe principalmente en trabajadores del transporte, mineros, bomberos y ferrocarrileros^[62]. Con animales de laboratorio se ha demostrado que la inhalación de partículas de diesel quemado acrecientan las reacciones alérgicas^[54].

Es importante destacar que los automotores (gasolina y diesel) emiten en la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) el 75 % de los contaminantes arrojados a la atmósfera, en específico las partículas emitidas anualmente constituyen 20,000 toneladas, las cuales representan cerca del 5 % del total^[93].

No hay datos disponibles sobre los efectos teratogénicos o posibles efectos mutantes del diesel. Los datos de toxicidad disponible se refieren en especial a los componentes individuales de la mezcla de hidrocarburos, especialmente de los compuestos poliaromáticos.

Recientemente, investigadores japoneses detectaron un compuesto, que producen los motores diesel, cuyo poder cancerígeno es más peligroso que el de los componentes conocidos hasta ahora, la 3-nitrobenzantrona, la cual podría estar relacionada con el aumento de casos de cáncer de pulmón en las ciudades con elevado tráfico^[93]. Sin embargo, esto aún no se ha demostrado.

IV.5 ALCALOIDES

Los alcaloides son una clase específica de compuestos químicos encontrados principalmente en vegetales. Representan una variedad de metabolitos secundarios de complejidad química variable y son importantes por su acción farmacológica; algunos tienen actividad como venenos, narcóticos o alucinógenos. Generalmente, los alcaloides son sustancias alcalinas; sus moléculas contienen átomos de carbono, hidrógeno y nitrógeno el cual es la causa de su basicidad^[53,59]

Los alcaloides son moléculas tóxicas a insectos, vertebrados y en algunos casos pueden inhibir el crecimiento de bacterias y de semillas de plantas. Se postula que su estructura está modelada en un proceso denominado “modelo molecular evolucionado” para interactuar al mismo tiempo con una o diferentes moléculas blanco. Muchos alcaloides tienen un amplio espectro de actividad, por lo cual se consideran compuestos de defensa multipropósito^[90].

Para el presente estudio se eligieron tres alcaloides que son cafeína, teofilina y quinina, los cuales tienen semejanza con los componentes esenciales para las células como son la adenina y el triptofano (figura IV-8). Las propiedades específicas de estos alcaloides se tratan en los siguientes incisos.

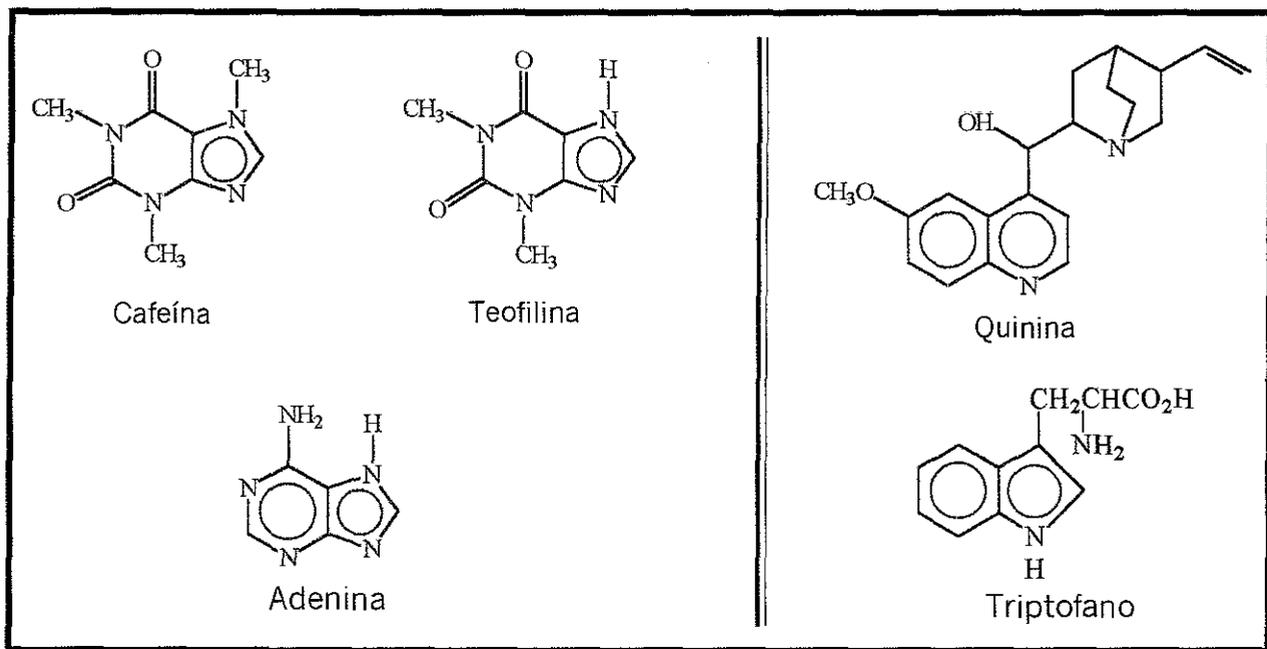


Figura IV-8 Estructura química de los alcaloides utilizados en el presente estudio.

IV.5-1 Cafeína

La cafeína tiene en su estructura a una base purica con dos anillos en la molécula, uno de cinco y otro de seis miembros. Cada anillo incluye dos átomos de nitrógeno. La cafeína, llamada también teína y trimetilxantina ($C_8H_{10}N_4O_2$) es comúnmente conocida, se encuentra en la planta del café, en el té, el guaraná, el mate y la nuez de cola^[10]. Su estructura química se muestra en la figura IV-8

Cuando la cafeína es purificada se le encuentra como polvo blanco o agujas blancas brillantes, usualmente fundidas. Es muy sensible a la luz. Sus propiedades físicas se resumen en la Tabla IV 4^[93].

Tabla IV.4 Propiedades físicas de la cafeína

PROPIEDAD	VALOR	PROPIEDAD	VALOR
CAS RN	58-08-2	Solubilidad (23°C)	
Peso Molecular	194.19 g/mol	Agua	10-50 mg/ml
Densidad (19°C)	1.23 g/cm ³	Dimetilsulfóxido	10-50 mg/ml
Gravedad específica	1.23 (18/4 °C)	Etanol	< 1 mg/ml
Punto de Fusión	238°C	Metanol	Soluble
Punto de ebullición	178°C (sublima)	Acetona	5-10 mg/ml
pH (1%)	6.9	Olor	Inodoro
UV max [HCl 0.1N]	275 nm		
pKa	0.6; 14.0		

Sinónimos. La cafeína también es conocida con los siguientes nombres, 1,3,7-trimetilxantina; 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-1H-purina-2,6-diona; 1,3,7-trimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropurina; 1,3,7-trimetil-2,6-dioxopurina; 7-metilteofilina; 1-metilteobromina; metilteobromina; metilteobromida; alert-pep; cafipel; guranina; kofeína; mateína; teína; organex; rina, cefenium.

Reactividad. La cafeína puede reaccionar con agentes oxidantes fuertes. Es incompatible con el yodo, sales de plata. Es una base muy débil. Se descompone en presencia de álcalis fuertes.

Estabilidad. Los polvos o cristales de cafeína pueden ser muy higroscópicos. En solución acuosa (1.12 mg/ml) es estable por tres semanas a 5°C al abrigo de la luz. A temperatura ambiente en cuarto iluminado una solución es estable por 3 días. Las soluciones de cafeína en agua, DMSO, etanol o acetona son estables por 24 horas bajo condiciones normales de laboratorio.

Usos. La cafeína es utilizada en la elaboración de brebajes y medicinas, es ampliamente usada como estimulante, diurético y quimioesterilizante contra plagas en granos almacenados. Es además usada en el tratamiento de shock, asma y enfermedades cardíacas. En medicina veterinaria, se usa para irritaciones cardíacas, como estimulante respiratorio y diurético.

Toxicidad. La cafeína pura es un teratógeno experimental. Tiene efectos sobre el sistema nervioso central. Es irritante para los humanos. Es un carcinógeno experimental. Está clasificado en riesgo clase 6.1 de acuerdo al NPT Chemical Health and Safety Data.

Sus efectos sobre microorganismos, no han sido reportados. Existe un estudio llevado a cabo por Timpson en 1977, el cual reportó que la cafeína tiene un potente efecto mutagénico sobre cepas de *Escherichia coli*, pero a dosis muy elevadas.

El espectro ultravioleta típico de la cafeína se presenta en la figura IV-9^[93].

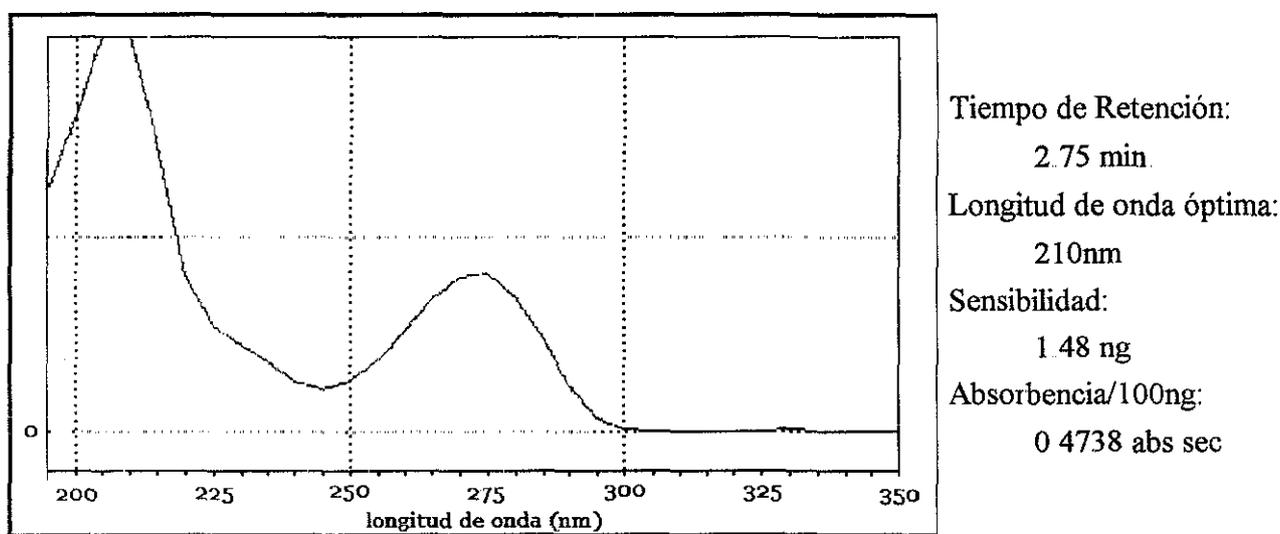


Figura IV-9 Espectro ultravioleta típico de la cafeína

Propiedades Bioquímicas. La cafeína tiene cuatro propiedades bioquímicas identificadas *in vitro*, aunque la relación entre éstas y los efectos del fármaco *in vivo* aún no están bien establecidas. En orden ascendente de la dosis de respuesta, éstas son:

- 1 Bloqueo de los receptores de adenosina. La tolerancia a la cafeína está asociada con un incremento en la actividad de los receptores de adenosina y un desvío de los receptores *A1* a un alto estado de afinidad y consecuentemente una disminución de la actividad de los receptores β -adrenérgicos.

2. Inhibición de la fosfodiesterasa Esta enzima es responsable del rompimiento del AMP cíclico (AMPC) y además su acción de metilxantina conduce al incremento de la función del AMPC como segundo mensajero
- 3 Acción sobre los canales de calcio para incrementar la entrada de Ca^{++} al interior de la célula y disminución del secuestro por los sarcolemas. Esta acción puede estar relacionada con el débil efecto positivo inotrópico de la cafeína a altas dosis, junto con el incremento en AMPC y actividad de proteína-quinasa debido a la inhibición de la fosfodiesterasa.
- 4 Unión a los receptores del ácido gama amino benzoico (GABA) en el sitio de la benzodiazepina

Impacto en el ambiente. La cafeína está presente en la naturaleza y es también producida comercialmente para ser adicionada a bebidas, medicinas y otros productos de consumo. Puede ser liberada al ambiente en forma de contaminante durante su producción o uso, en forma directa o en aguas de desecho, así como a partir de lixiviados en rellenos sanitarios. Una vez liberada al suelo, la cafeína presenta una alta movilidad por que es muy soluble. No se volatiliza a la atmósfera. No presenta fenómenos de bioconcentración y es biodegradable en ecosistemas acuáticos, y en el suelo, la cafeína existe predominantemente adsorbida a partículas.

IV.5-2 Teofilina

La teofilina (1,3-dimetilxantina) es el alcaloide principal del cacao, que se extrae de la cáscara de su fruto. Su fórmula estructural tiene una gran semejanza con la cafeína (figura IV-10)^[93].

La teofilina (C₇H₈N₄O₂) puede ser purificada y se le encuentra como polvo cristalino. Sus propiedades físicas se resumen en la Tabla IV 5^[80].

Tabla IV.5 Propiedades físicas de la teofilina

PROPIEDAD	VALOR	PROPIEDAD	VALOR
CAS RN	58-55-9	Solubilidad (21 5°C)	
Peso Molecular	180 1658	Agua	1-5 mg/ml
Densidad (19°C)	1 23 g/cm ³	DMSO	10-50 mg/ml
Punto de Fusión	272-274°C	Etanol	< 1 mg/ml
pKa	8.81	Acetona	< 1 mg/ml
Olor	Inodoro		

El peso molecular de la teofilina es de 198 18 cuando está pura, se describe como un polvo blanco e inodoro, de sabor amargo, su intervalo de fusión es de 271°C-274°C^[10,24,31].

Síntesis. La teofilina, comercialmente se obtiene por medio de síntesis química, siendo un intermediario en la ruta de obtención de la cafeína a partir de urea^[27,33].

Solubilidad. La solubilidad reportada de la teofilina es de 8.3 mg/ml en agua, 12.5 mg/ml en etanol y de 11 6 mg/ml en cloroformo. La solubilidad en agua se incrementa al aumentar el pH siendo muy soluble en soluciones alcalinas y en amoniaco. Se incrementa su solubilidad en presencia de aminas alifáticas primarias, secundarias y terciarias y cuando forma sales con bases fuertes^[33].

Hidratos. Se ha reportado que la teofilina existe tanto en forma anhidra como monohidratada. La forma anhidra se obtiene por secado del fármaco a 150°C durante 3 horas^[37].

Sinónimos. La teofilina se conoce también como: 3,7-dihidro-1,3-dimetil-1H-purina-2,6-diona; 1H-purina-2,6-diona; 1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahidropurina; aerolato; broncodil; elixicon; elixofilina; quadrinal; synofilato; pseudoteofilina; teofilina-225; labofilina; LASMA^[76].

Estabilidad. La teofilina generalmente es muy estable a diferentes intervalos de pH, sin embargo, en presencia de soluciones fuertemente alcalinas con pH mayores a 12 durante periodos de tiempo prolongados presenta descomposición por una aparente apertura del anillo. Es una base estable al aire, pero sufre cambio de color a amarillo, al ser expuesta continuamente a la luz. En solución, es susceptible de sufrir una oxidación en la posición 8, formándose ácido dimetil formaldehído^[33].

Usos. Entre las aplicaciones de la teofilina están: empleo como diurético, relajante del músculo liso, tratamiento de shock, asma, enfermedades cardíacas, antiasmático en varias enfermedades respiratorias, bronquitis, enfermedades obstructivas cardíacas y enfisema, estimulante del miocardio, tratamiento de condiciones bronquiales; usos veterinarios como diurético, estimulante cardíaco y vasodilatador^[76].

Toxicidad. La teofilina es un teratógeno experimental. Tiene efectos sobre el sistema nervioso central. Sus efectos son mayores cuando se administra por vía parenteral, intravenosa, rectal o intraperitoneal y efectos moderados cuando se administra por vía subcutánea u oral.

Los síntomas con los que se asocia incluyen náusea, vómito, hematómesis, diarrea, dolor de cabeza, irritabilidad, insomnio, convulsiones tónicas y clónicas generalizadas, hipotensión, albuminuria. Colapso, falla en la presión sanguínea, agitación, hiperventilación. Estimulación del sistema nervioso central, nerviosismo, temblores, apnea, incremento en la perfusión y la muerte.

Métodos de Análisis. Existen diferentes métodos reportados en la literatura desarrollados para la identificación y cuantificación de la teofilina:

1. Espectroscopía ultravioleta.- Presenta un máximo de absorción a 243-245nm ($E_{1cm}^{1\%} = 170$) y de ($E_{1cm}^{1\%} = 500$) en solución de boratos a pH = 9.5^[33].
2. Espectroscopía infrarroja - Los principales picos se presentan a 741, 1525, 1560, 1625, 1640 1667 cm^{-1} ^[33].
3. Otros métodos espectroscópicos - Se utiliza también la Resonancia Magnética nuclear (RMN), ya sean protónicos o de ^{13}C y espectroscopía de masas (EM)^[68,75].
4. Titulométricos - Acidimétricos, alcalimétricos y titulaciones en medio no acuoso^[33].
5. Espectrofotométricos: Espectrofotometría ultravioleta y visible^[30]
6. Polarográficos^[30]
7. Cromatográficos.- Cromatografía en capa fina^[33], cromatografía en papel^[75], cromatografía de gases^[37] y cromatografía líquida de alta resolución^[13,44]
8. Inmunoensayos.- Radio inmuno-ensayos (RIA) e inmuno transferencia (EMIT)^[75]

Propiedades Bioquímicas. La teofilina es estructuralmente clasificada como un derivado de las xantinas, desde 1930 se ha utilizado para el alivio asintomático y prevención del asma bronquial^[12]. Es un inhibidor competitivo de la fosfodiesterasa, la enzima que se encarga de la degradación de la 3',5'-adenosín monofosfato cíclico (AMPC); incrementando de esta forma las concentraciones intracelulares de AMPC, sin embargo, este mecanismo de acción propuesto es discutible, puesto que se basa en estudios *in vitro* que utilizan concentraciones que *in vivo* serían tóxicas^[115,30].

La teofilina tiene dos distintos modos de acción en las vías respiratorias de pacientes con obstrucción reversible; relajante del músculo liso (broncodilatación) y supresión de la respuesta al estímulo de las vías respiratorias (efectos profilácticos no broncodilatadores). Mientras los mecanismos de acción de la teofilina no son conocidos con certeza, los estudios en animales sugieren que la broncodilatación está mediada por la inhibición de dos isoenzimas de la fosfodiesterasa (PDE III y PDE IV), mientras que las acciones profilácticas no broncodilatadoras están probablemente mediadas por uno o más mecanismos moleculares, que no involucran la inhibición de PDE III o antagonismo de los receptores de adenosina.

Algunos de los efectos adversos asociados con la teofilina parecen ser mediados por la inhibición de la PDE III (hipotensión, taquicardia, dolor de cabeza y émesis) y antagonismo de los receptores de adenosina (alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral).

La teofilina incrementa la fuerza de contracción de los músculos del diafragma. Esta acción parece ser debida al aumento en la toma de calcio a través de los canales mediados por adenosina^[93].

Respecto a los efectos de la teofilina en los microorganismos, a la fecha no se han reportado estudios relacionados.

IV.5-3 Quinina

Las quinolinas (quinina), constituyen otro grupo de alcaloides que derivan del triptofano. La biogénesis de la quinina aún no es entendida en detalle, pero se sabe que el nitrógeno indólico del triptofano permanece en la porción quinolinica. La quinina está presente en la quina que es la corteza del quino. El quino es el nombre común de varias especies del género cinchona, los árboles habitan la región septentrional y occidental de América del Sur. Su estructura química se muestra en la figura III-8^[10]

La quinina ($C_{20}H_{24}N_2O_2$) es un polvo blanco muy sensible a la luz. Sus propiedades químicas se resumen en la tabla III.6^[93].

Tabla IV.6 Propiedades físicas de la quinina

PROPIEDAD	VALOR	PROPIEDAD	VALOR
CAS RN	130-95-0	Solubilidad (23°C)	
Peso Molecular	324.4218	Agua	500 mg/L
Punto de Fusión	57°C	Olor	Inodoro
Cte Henry	$8.58E^{-016}$ atm·m ³ /mol		

Sinónimos. La quinina se conoce también como: Metoxi- α -(5-vinil-2-quinuclidinil)-4-quinolinemetanol; 6'-metoxicinchonon-9-ol; sulfato de 6'-metoxicinchona-9-ol; quin-260; quin-amino; quinamm; novoquinina; legatrin.

Usos. Es un fármaco empleado como antipirético, antimalario, neuromuscular.

Respecto a los efectos de la quinina en los microorganismos procariotes, no se han reportado estudios relacionados.

V. ANTECEDENTES

V. ANTECEDENTES

V.1 ESTUDIOS DE BIODEGRADACION DEL DIESEL

La biodegradación puede ser definida como la disminución en la complejidad de los compuestos químicos catalizada biológicamente. En este caso, los compuestos orgánicos biodegradados frecuentemente aunque no necesariamente, conduce a su conversión en productos inorgánicos. Tal conversión de un substrato orgánico a productos inorgánicos es conocida como mineralización^[4].

Diferentes condiciones deben ser satisfechas para que la biodegradación tome lugar en el ambiente. Esto incluye las siguientes:

- a) La existencia de un determinado organismo con el apropiado potencial catabólico
- b) El organismo debe estar presente en el ambiente que contenga al producto químico
- c) El compuesto químico debe estar accesible al organismo que tiene las enzimas requeridas
- d) Si la enzima inicial de la degradación es extracelular, el enlace atacado por esa enzima debe estar expuesto para que la catálisis pueda ocurrir
- e) Si la enzima encargada de la degradación es intracelular, entonces la molécula debe penetrar la superficie celular hacia los sitios donde actúa la enzima

La biorremediación ha surgido recientemente como una alternativa tecnológica para la limpieza de suelos y acuíferos contaminados, donde se aprovecha el potencial de los microorganismos para mineralizar o transformar contaminantes orgánicos en compuestos químicamente más sencillos^[76].

El biotratamiento de suelos contaminados con petróleo o sus derivados es una alternativa a los métodos fisicoquímicos. De manera natural, las bacterias, hongos, levaduras y algunas cianobacterias son capaces de llevar a cabo oxidaciones aeróbicas de muchos compuestos

químicos orgánicos en el suelo, en este caso, también se requieren nutrientes para incrementar el proceso natural. La cantidad y tipo de nutrientes depende de la naturaleza del suelo y de la concentración de los contaminantes, así como de la distancia del nivel freático a la superficie, la oxigenación, el potencial redox y otras características físicas del suelo^[20,84].

Muchos hidrocarburos derivados del petróleo se encuentran adsorbidos a partículas sólidas del suelo o en líquidos que son inmiscibles con el agua, por lo cual, la biodisponibilidad del contaminante a degradar puede estar drásticamente reducida^[4].

En la lucha contra la contaminación ocasionada por derrames de petróleo, se han empleado a menudo agentes tensoactivos sintéticos. Los tensoactivos interaccionan con la interfase petróleo-agua creando una emulsión que facilita a los microorganismos su degradación^[48]. Pero éstos ocasionan mayores problemas de contaminación en aguas costeras debido a su toxicidad y persistencia, ya que su principal función es solubilizar y diluir los hidrocarburos^[36,61]. Además, pueden frenar el crecimiento y la actividad de bacterias degradadoras. Hay microorganismos que pueden emulsionar al petróleo y sus derivados al producir sustancias denominadas biosurfactantes, tal es el caso de la especie de *Pseudomonas aeruginosa*, que produce un glicolípido capaz de reducir la tensión superficial de la interfase petróleo-agua, con la ventaja de no ser tóxico^[2,18].

La levadura *Candida tropicalis* produce material de pared celular de mananas y ácidos grasos los cuales contribuyen a la formación de gotitas de petróleo (fig V-1), para facilitar la penetración a la célula^[49].

El cometabolismo se ha reportado para mezclas que contienen diferentes clases de componentes, como es el caso del petróleo crudo. Tal metabolismo se ha reportado en bacterias marinas que degradan n-alcános de C16 a C30 en sedimentos contaminados con petróleo^[40].

El diesel ha probado ser un compuesto orgánico difícil de biodegradar y los estudios sobre este compuesto se han centrado en la búsqueda de microorganismos capaces de biodegradarlo y en encontrar formas de estimulación *in situ* con adición de compuestos como nitrógeno y fósforo. En un estudio sobre la biodegradación aerobia de hidrocarburos presentes en el diesel por *Pseudomonas fluorescens*^[65] se encontró mayor degradación de n-alcános (C14-C18), los compuestos poliaromáticos resultaron ser resistentes a la biodegradación y solo fenantreno fue degradado en 7 meses.

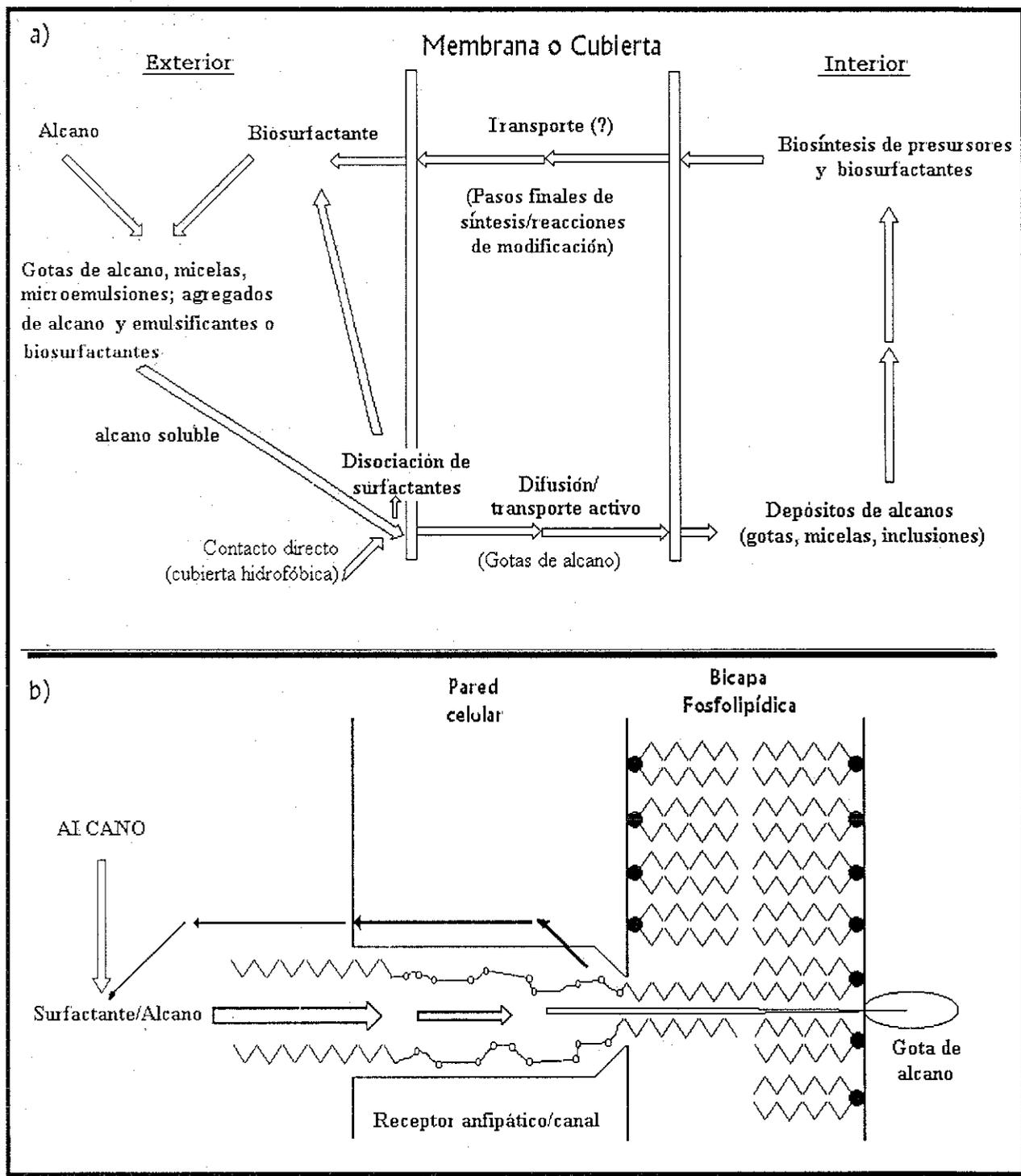


Figura V-1 Esquema hipotético de la entrada del alcano ligado al surfactante a una célula microbiana
 a) esquema general; b) concepto del canal receptor.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Otras investigaciones se han realizado con suelos artificiales para estudiar de una forma más controlada la biodegradación del diesel y poder seguir la aparición de los compuestos intermedios para entender los mecanismos involucrados en el proceso de biodegradación^[37].

También existen estudios encaminados a examinar la influencia de la exposición subletal de los hidrocarburos poliaromáticos (HPA) en cultivos microbianos, encontrando que la población microbiana puede adaptarse aunque lentamente a esas concentraciones. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que las comunidades bacterianas se pueden adaptar a exposiciones crónicas de los hidrocarburos^[88]

Los líquidos en fase no acuosa (NAPLs, por sus siglas en inglés) como el petróleo y sus derivados son los más conocidos debido a que constituyen el principal problema de derrames en suelo y agua. Se han postulado tres mecanismos para explicar cómo son utilizados los NAPLs por los microorganismos^[4]:

- 1 El compuesto debe estar en fase acuosa.
- 2 El microorganismo produce sustancias que reducen el diámetro de las “gotas” del compuesto a menos de $1\mu\text{m}$ y estas son asimiladas por el microorganismo (pseudosolubilización).
- 3 Las células tienen contacto directo con el compuesto y éste pasa a través de la superficie celular.

V.2 ESTUDIOS DE ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO

Bajo condiciones óptimas, los microorganismos pueden sintetizar todos sus nutrientes. Sin embargo, en condiciones extremas, por ejemplo alta concentración de contaminantes, temperaturas extremas o niveles desfavorables de oxígeno, se reduce mucha de su capacidad metabólica natural. Un problema mayor es el desarrollar y mantener un microorganismo con capacidad específica para degradar un determinado compuesto químico o el encontrar una cepa autóctona con las características deseadas para el tratamiento^[36,50]. De aquí surge la necesidad de

investigar la acción de otras sustancias de origen natural que estimulen el metabolismo de tal forma que la biomasa funcione mejor para las condiciones especificadas trayendo como consecuencia un aumento en la velocidad de degradación del contaminante logrando su erradicación^[69]

Se han realizado algunos estudios para encontrar alternativas de biorremediación *in situ*, sin embargo, se tiene el problema de que a pesar de ser la biorremediación una alternativa viable, tiene la desventaja de ser muy lenta^[87]

Se han investigado diferentes métodos por los cuales la biodegradación de los NAPLs puede ser mejorada, siendo tres los más exitosos y aplicados en gran escala^[60]:

- ✧ Adición de agentes tensoactivos
- ✧ Adición de sustancias o nutrimentos inorgánicos
- ✧ Adición de nutrimentos orgánicos
- ✧ Empleo de bacterias exógenas o preparaciones comerciales

V.2-1 Agentes tensoactivos

Los surfactantes sintéticos son usualmente clasificados de acuerdo a la naturaleza del grupo polar. Sin embargo, los surfactantes microbianos son diferenciados comúnmente basándose en su naturaleza bioquímica y a la especie microbiana que lo producen. Las principales clases de biosurfactantes incluyen glicolípidos, fosfolípidos y ácidos grasos, lipopéptidos/lipoproteínas, surfactantes poliméricos y particulados.

Muchos surfactantes son producidos por bacterias. Son generalmente metabolitos con una típica estructura anfifílica, en donde la porción hidrofóbica es un ácido graso de cadena corta, un hidroxilípido o un alfa-alkil-beta-hidroxi-lípido; la porción hidrofílica puede ser de carbohidrato, aminoácido, péptido cíclico, fosfato, ácido carboxílico, o un alcohol. Las propiedades físicas y químicas, reducción de la tensión superficial y estabilidad de la emulsión formada es muy importante en la búsqueda para catalogar a un biosurfactante potencial^[42].

En muchos casos se hace uso de los surfactantes para ayudar a biodegradar combustibles en los sitios contaminados, una ventaja adicional cuando el sitio en cuestión ha sido “contaminado” con el surfactante además del combustible, es que posterior a una bioestimulación con nutrientes inorgánicos, la microflora puede utilizar al surfactante como fuente de carbono y degradarlo también^[50]

Sustancias comerciales como el Suggee^[60] o el Cöresit^[73], se emplearon como agentes dispersantes del petróleo crudo y en la degradación de aceites lubricantes, empleando además un cultivo microbiano enriquecido

En otros estudios, se investiga la acción de agentes tensoactivos no aniónicos, donde se ha demostrado que acrecentan la destrucción de compuestos derivados del petróleo y estimulan la actividad microbiana al facilitar la biodisponibilidad de los hidrocarburos^[34,64]. Bajas concentraciones del agente tensoactivo (50 a 100 mg/L) acrecentan significativamente la biodegradación de combustibles. Sin embargo, en un estudio empleando dodecil sulfato de sodio (SDS) a altas concentraciones (500 a 1000 mg/L) se reportó que puede tener un efecto inhibitorio, debido a la lisis de la membrana celular bacteriana^[52]

Muchos microorganismos parecen producir una mezcla compleja, de biosurfactantes, particularmente durante su crecimiento en sustratos inmiscibles en agua.

El interés en los biosurfactantes se ha incrementado considerablemente en los años recientes, debido a que son candidatos potenciales para muchas aplicaciones comerciales en la industria del petróleo, farmacéutica y procesamiento de alimentos^[42]

V.2-2 Compuestos inorgánicos

Muchos trabajos se han realizado siguiendo el camino más simple para acelerar la degradación del petróleo, que es el de adicionar nitrógeno y fósforo (p. ejem. trietilfosfato) en las zonas de contaminación, en forma de urea y fosfato de octilo con parafinas para producir un fertilizante de baja liberación. Esta alternativa pareció ser prometedora en la acción microbiana para la degradación del petróleo, pero esto no ha sido suficiente^[89,93].

Se han empleado también materiales inertes, adicionales al uso de nutrimentos como fosfatos y amonio, entre los primeros estudios se encuentra uno realizado en aguas marinas costeras contaminadas con diesel, a las cuales extra a los nutrimentos, se les adicionó perlas de vidrio, o carbón orgánico particulado. Los resultados indicaron que hubo un efecto estimulante sobre la velocidad de degradación del diesel, mayor a cuando los nutrimentos o las partículas inertes se agregan en forma separada^[50,67].

La presencia en el medio del cultivo de materiales inorgánicos como la montmorilonita, bentonita o kaolinita, incrementan la velocidad de degradación de compuestos orgánicos como el almidón, ácido úrico o hidrolizados proteicos^[26,32].

La adición de hierro en acuíferos contaminados con combustibles, tiene un efecto sobre la velocidad y transporte de los contaminantes. Los microorganismos usan al ión férrico como aceptor final de electrones en la oxidación de los hidrocarburos solubles una vez que el oxígeno y los nitratos se han agotado^[93].

V.2-3 Compuestos orgánicos

Es conocido que el adicionar de sustancias naturales a un medio de cultivo químicamente definido estimulan el crecimiento microbiano. Entre éstas sustancias se encuentran vitaminas y compuestos relacionados con los ácidos nucleicos y aminoácidos presentes en extractos de productos naturales los cuales no están presentes en medios químicamente definidos^[7].

En otros campos de investigación se han realizado experimentos con diferentes sustancias que tienen el efecto de estimular el crecimiento microbiano. En algunos estudios realizados con coenzimas, por ejemplo, la pirroloquinolina quinona (PQQ) se reportó que en cantidades traza aplicada en cultivos microbianos, causa una marcada reducción de la fase lag pero no incrementa el crecimiento en la fase exponencial^[1,6,4,5].

En otras investigaciones, la adición de aminoácidos demostró que incrementa la biomasa en la fase estacionaria pero no afectan el tiempo de generación^[8]. También se han empleado

hidrolizados de microorganismos y de derivados sanguíneos de animales^[57,91], para estimular el crecimiento microbiano dado que muchas de las bacterias heterótrofas son incapaces de crecer, a menos que se les suministren uno o más factores de crecimiento específicos^[92]

Los factores de crecimiento son compuestos orgánicos específicos necesarios en muy pequeñas cantidades y que no pueden ser sintetizados por las células. El término de factor de crecimiento es usado por los bioquímicos para indicar cualquier miembro de un complejo biológicamente activo, especialmente si se desconoce su naturaleza química o su función en el metabolismo celular.

Cada uno de estos compuestos esenciales se sintetiza mediante una secuencia distinta de reacciones enzimáticas; cada enzima se produce bajo la regulación de un gen específico. Cuando un microorganismo experimenta una mutación genética que ocasiona la incapacidad de una de estas enzimas para funcionar, la cadena se rompe y ya no se produce más el producto final. Por tanto, el microorganismo debe obtener el compuesto del ambiente, pues tal compuesto se ha convertido en un factor de crecimiento para él. Las sustancias que sirven como factores de crecimiento son vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas, como precursores metabólicos de ácidos nucleicos, ácidos grasos y compuestos isoprenoides^[14,38,92].

VITAMINAS.- Fueron los primeros factores de crecimiento descubiertos. En los organismos vivos, la mayoría de las vitaminas actúan formando a las coenzimas, como vitaminas del complejo B o al ácido nicotínico que es precursor de la coenzima NAD (ácido nalidíxico).

AMINOÁCIDOS.- La incapacidad de sintetizar un aminoácido se relaciona con la falta de enzimas necesarias para su síntesis. Los aminoácidos necesarios pueden proporcionarse ya sea como aminoácidos libres o como pequeños péptidos.

PURINAS Y PIRIMIDINAS. - Son las estructuras básicas de los ácidos nucleicos y las coenzimas, pero también son factores de crecimiento para ciertos microorganismos.

Sin embargo, para el fin que se pretende lograr, cualquiera de las alternativas anteriores, haría poco viable desde el punto de vista económico la posibilidad de aplicarlos en casos reales, en donde, la zona contaminada es muy grande, los procesos de biodegradación lentos y los nutrientes naturales son insuficientes.

A este respecto, se propone que algunos alcaloides puedan tener función de estimulación, por su similitud estructural con aminoácidos y nucleótidos. No se ha reportado en la literatura científica sobre su acción como bio-estimuladores del crecimiento microbiano, debido a que las investigaciones se han volcado sobre su uso terapéutico dado las propiedades farmacológicas de algunos de ellos. No obstante, se han encontrado algunos productos comerciales como *BYO-GON PX-109*, que contienen compuestos de este tipo y que reportan tener un efecto sobre el metabolismo celular

En este sentido, se debe de tener cuidado con lo sugerido en la propaganda del producto, ya que se ha reportado muy poco sobre la acción de los alcaloides en el metabolismo microbiano y las investigaciones como las realizadas por Timson^[86], en donde reporta el efecto mutagénico de la cafeína sobre cultivos de *Escherichia coli* se encaminan a usar a los microorganismos como modelos de ciertos efectos de alcaloides que puedan ser extrapolados a uso humano.

Otros estudios enfocados al empleo de alcaloides, se enfocan a su biodegradación, como el caso del estudio llevado a cabo por Mazzafera^[55], en donde se estudió la degradación de la cafeína medio líquido por una cepa de *Serratia marcescens* aislada de un suelo cultivado con café. La bacteria utilizó la cafeína como única fuente de carbono y nitrógeno.

VI. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

VI. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

VI.1 ESTRATEGIA DE TRABAJO

Se planteó estudiar la estimulación de un cultivo microbiano degradador de combustibles a través de la adición de un alcaloide natural adicionado a niveles no tóxicos, que permita la biodegradación de altas concentraciones de diesel en tiempos menores a lo comúnmente observado. Para ello se utilizó un cultivo microbiano mixto aislado de un suelo contaminado, que fue desarrollado en este laboratorio

La estimulación de los cultivos se realizó empleando tres alcaloides puros adicionados a los cultivos de manera independiente a una misma concentración. Los cultivos contenían diesel como única fuente de carbono. En todos los casos se adicionó una pequeña concentración de un agente tensoactivo para emulsionar el combustible en el medio acuoso. Se hizo el seguimiento de diesel residual y del pH, así como del crecimiento celular.

VI.2 DESARROLLO DE TÉCNICAS

VI.2-1. Cultivo inicial

El cultivo mixto de microorganismos degradadores de diesel utilizado en este estudio, se obtuvo a partir de un cultivo microbiano previamente aislado del suelo de una instalación industrial donde ocurrieron derrames de diesel en el pasado. El cultivo mixto se desarrolló en instalaciones del Instituto de Ingeniería por este grupo de investigación.

A partir de una muestra del suelo contaminado que fue transferida a solución salina isotónica. Se realizaron diluciones seriadas de la suspensión de suelo, y alícuotas de 1 ml se sembraron en medio mineral sólido conteniendo 50 µl de diesel como única fuente de carbono. Las placas se dejaron crecer por cinco días. Las colonias obtenidas se cosecharon y se transfirieron a medio mineral líquido con diesel como única fuente de carbono. El cultivo se dejó crecer en agitación constante a 25°C. Periódicamente se llevaba a cabo transferencias del cultivo, aumentando gradualmente el volumen de medio mineral así como la concentración de diesel, hasta llegar a tener aproximadamente un litro de cultivo con 50 ml de diesel. El cultivo se mantuvo bajo presión selectiva y fue de donde se tomó el inóculo para realizar el experimento. Este fue denominado cultivo inicial.

VI.2-2. Medios de cultivo

Se utilizaron dos medios de cultivo. El medio mineral 1 (MM1) sirvió para aislar y cuantificar bacterias degradadoras de diesel, su composición fue la siguiente:

MEDIO MINERAL MÍNIMO 1

K ₂ HPO ₄	0.25 g/L
NH ₄ Cl	1.00 g/L
pH=6.9	

El medio mineral 2 (MM2), es un medio modificado del empleado por Rigway^[71] y se empleó para la adaptación del cultivo a altas concentraciones de diesel industrial, para la conservación del inóculo y para realizar los experimentos; su contenido es el siguiente:

MEDIO MINERAL MÍNIMO 2 (MM2)			
Solución microelementos			
KH ₂ PO ₄	0.5 g/L	Fe(NH ₄) ₂ SO ₄ •6H ₂ O	3.53 mg/L
Na ₂ HPO ₄	1.42 g/L	CuSO ₄ •5H ₂ O	0.039 mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.38 g/L	ZnSO ₄ •7H ₂ O	0.021 mg/L
MgCl ₂ •6H ₂ O	0.05 g/L	CoCl ₂ •6H ₂ O	0.041 mg/L
CaCl ₂	0.01 g/L	Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.025 mg/L
		H ₃ BO ₄	2.86 mg/L
pH=6.89		MnSO ₄ •H ₂ O	1.54 mg/L

La solución de microelementos se preparó por separado y se adicionó al medio mineral 2 a la concentración requerida. Antes de su esterilización, de ser necesario el pH se ajusta con NaOH 1M.

Las sales empleadas en ambos medios fueron reactivos analíticos marca *Merck*.

Cuando fue necesario tener cualquiera de los dos medios en forma sólida, se agregó agar bacteriológico, a una concentración de 15 g/L. Para la preparación de estos medios, una vez disuelto el agar se vació en porciones de 30 ml en frascos de vidrio con tapa de cierre hermético y contratapa de teflón. Se esterilizaron en autoclave a 121°C/1.5 kg/cm² durante 20 minutos. Los frascos se dejaron enfriar para permitir la solidificación del medio. Una vez inoculados se les agregaron 200 µl de diesel industrial y se permitió su distribución homogénea.

VI.2-3. Diesel industrial

El diesel industrial utilizado como sustrato en este trabajo, fue proporcionado por una terminal de Almacenamiento y Distribución de PEMEX Refinación.

Se analizó el diesel industrial por destilación de acuerdo al método ASTM D-86. También se obtuvo su perfil cromatográfico de acuerdo al método 8015 y se cuantificó su porcentaje en un analizador *Horiba* de destilación.

El diesel industrial se esterilizó por filtración a través de una membrana *Millipore* de 0.22 μm y se conservó a 4°C. Se adicionó a los medios de cultivo ya estériles en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente.

VI.2-4. Alcaloides

Para el estudio se emplearon tres alcaloides que fueron elegidos por sus características estructurales y por la facilidad para obtenerlos comercialmente, ya que estos se emplean como principio activo en medicamentos. Los alcaloides elegidos fueron: cafeína (C), quinina (Q) y teofilina (T). Los estándares contaron con los certificados de análisis correspondientes proporcionados por los laboratorios *Sanofi-Synthelabo* y *Siegfried Rhein* (Anexo I).

Para estudiar el efecto de los alcaloides sobre la actividad microbiana éstos se adicionaron al medio de cultivo en proporción al 0.1% (p/v) antes de la esterilización.

VI.2-5. Agente Tensoactivo

Para los experimentos se adicionó un agente tensoactivo comercial no iónico que es un derivado etoxilado del alcohol láurico. Su función fue facilitar la emulsión del diesel en el medio de cultivo. Se adicionó a una concentración final del 0.05% (v/v).

Los frascos con medio de cultivo y el agente tensoactivo se dejaron agitando un día antes de iniciar los experimentos para asegurar su homogenización en el medio líquido.

VI.2-6. Cuantificación de bacterias degradadoras

Un mililitro del cultivo se adicionó a 9 ml de solución mineral estéril, se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-7} . En cada caso se tomó un mililitro y se transfirió a un tubo de ensaye con 9 ml de medio mineral. De cada dilución se tomó 1 ml y se transfirió a un frasco de vidrio de 250 ml conteniendo medio sólido.

Se incubaron a 25°C por cinco días. En todos los casos las diluciones se manejaron por triplicado. Al término del período de incubación se procedió al conteo seleccionando aquella dilución que tuvo entre 30 y 300 colonias cultivables.

VI.2-7. Enriquecimiento y adaptación del cultivo degradador de diesel

Para el enriquecimiento del cultivo degradador y su adaptación a altas concentraciones de diesel industrial se utilizaron frascos de vidrio de 250 ml con tapa de cierre hermético y contratapa de teflón con un volumen de medio mineral de 100 ml. Estas condiciones permitieron una cámara de aire para la oxigenación del cultivo entre uno y otro muestreo y se evitó la pérdida de los hidrocarburos volátiles de menor peso molecular. Todos los cultivos se incubaron a 25°C con agitación constante a 150 rpm en una incubadora *New Brunswick Scientific*. Los cultivos se manejaron por duplicado.

Se tomó una alícuota de 10 ml del cultivo inicial, que provenía de un cultivo crecido en presencia de 50 µl de diesel industrial en 100 ml de medio, y se dejó incubando cinco días en presencia del mismo volumen de diesel industrial. Se realizaron varias transferencias aumentando el volumen de diesel industrial cada vez, dentro de un período de aproximadamente 2 semanas, cuando el crecimiento podía ser observado en forma de turbidez. El volumen de diesel industrial se llevó hasta 1000 µl (1% v/v), equivalente a 8300 mg/L. Este cultivo constituyó el inóculo para realizar los experimentos, el cual fue mantenido en crioconservación a -10°C con glicerol 30%.

A partir del cultivo enriquecido se hizo el aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en mayor proporción.

VI.2-8. Aislamiento e identificación de bacterias degradadoras de diesel

La identificación de algunas bacterias presentes en el cultivo degradador de diesel se realizó llevando a cabo un aislamiento y purificación de las cepas encontradas en mayor proporción. El aislamiento se realizó en medio sólido MM1 con diesel. Después de 5 días de crecimiento, se observaron las colonias y se tomaron aquellas cuya morfología colonial fuera diferente y se les realizó tinción de Gram para su observación al microscopio. Se sembraron

para proceder al aislamiento y purificación de las mismas, siguiendo el método de picadura y sembrado por estría en medio para conteo en placa^[66] La purificación se realizó en un total de seis resiembras y después de la confirmación de la pureza de las colonias por tinción Gram se procedió a su identificación mediante pruebas bioquímicas usando la serie de identificación de bacilos Gram negativos (API 20 E, no. cat 20 120, *Bio-Mériux*) siguiendo las instrucciones del manual de la técnica. Un control positivo se corrió usando la cepa *Pseudomonas putida* ATCC 23793

VI.2-9. Conservación del inóculo

Un volumen de 100 ml de cultivo enriquecido, obtenido en presencia de diesel industrial al 1 % (v/v) se transfirió a tubos de centrifuga de *Nalgene* de 50 ml. Se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min en una microcentrífuga *Eppendorf 5416*. La biomasa se resuspendió en 20 ml del medio MM2, se le adicionaron 2 ml de glicerol (*Merck*) estéril al 30%. Se distribuyó en alícuotas de 1.5 ml en criotubos *Nalgene* para ser almacenados en congelación a -10°C (figura VI-1) De esta forma los cultivos se pueden conservar entre 8 a 12 meses.

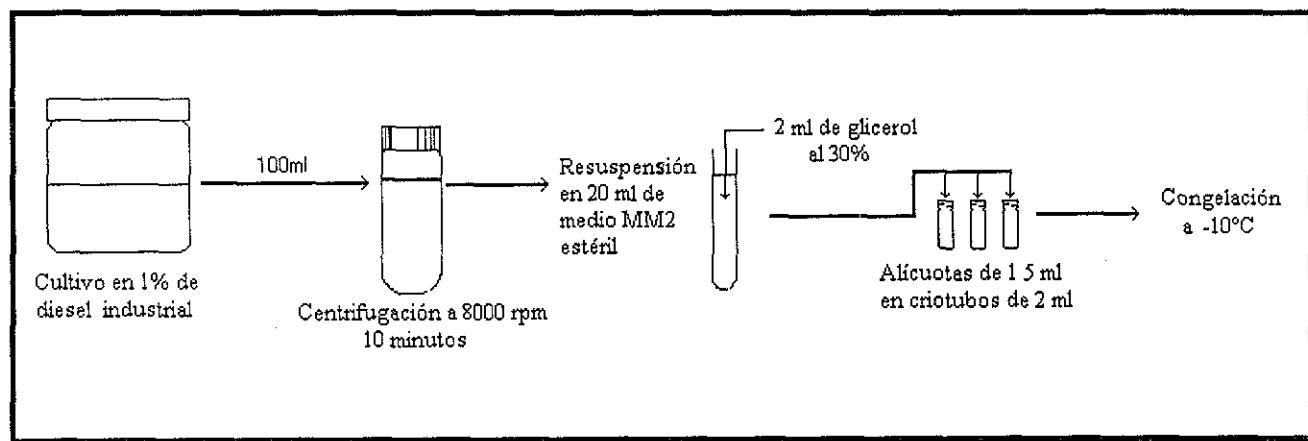


Figura VI-1 Conservación del inóculo en congelación.

En una alícuota de 1 ml se hizo la determinación de proteína celular del inóculo, la cual fue equivalente a 1.6 mg/ml.

VI.2-10. Reactivación del inóculo

Antes de iniciar un experimento, se descongeló un criotubo a temperatura ambiente poniendo el contenido en medio MM2 líquido con diesel industrial al 1%. A los 8 días se hizo una transferencia para dejar crecer durante 15 días más con dos alimentaciones intermedias de diesel industrial al 1%

Al término de la incubación, todo el contenido se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 minutos y se resuspendió en 20 ml de MM2. De aquí se inoculó 1 ml por cada mesocosmos. La concentración de microorganismos presentes en el inóculo se determinó por medio de la cuantificación de proteína celular. La concentración se mantuvo más o menos constante a 1.47 mg/ml

VI.3 Desarrollo Experimental

VI.3-1 Cultivo en mesocosmos

Los experimentos se llevaron a cabo en frascos de vidrio de 1000 ml con tapa hermética y contratapa de teflón, a estas unidades se les denominó mesocosmos. El volumen de medio MM2 fue de 600 ml, estas condiciones permitieron una cámara de aire para la oxigenación del cultivo entre uno y otro muestreo y se evitó la pérdida de los hidrocarburos volátiles de menor peso molecular

El medio contenía además, al agente tensoactivo, al diesel industrial y la biomasa y en los casos así requeridos los alcaloides que se agregaron individualmente.

En todos los casos, los mesocosmos se mantuvieron a 25°C en agitación rotatoria constante a 150 rpm.

Se prepararon 6 mesocosmos, 3 para los controles y 3 para evaluar la adición de los alcaloides. Cada unidad experimental se preparó por triplicado, lo que dio un total de 18 mesocosmos

Los mesocosmos correspondientes a las muestras con alcaloides se etiquetaron de la siguiente forma:

BSDC (contenía biomasa (B), surfactante (S) al 0.05%, diesel industrial (D) al 1% y cafeína (C) al 0.1%)

BSDQ (contenía biomasa (B), surfactante (S) al 0.05%, diesel industrial (D) al 1% y quinina (Q) al 0.1%).

BSDT (contenía biomasa (B), surfactante (S) al 0.05%, diesel industrial (D) al 1% y teofilina (T) al 0.1%).

Los mesocosmos correspondientes a las muestras control se etiquetaron de la siguiente forma:

BSD (biomasa (B), surfactante (S) al 0.05% y diesel industrial (D) al 1%. Este control permitió definir si los alcaloides tienen o no algún efecto sobre el crecimiento y la degradación del diesel industrial)

BS (biomasa (B) y surfactante (S) al 0.05%. Este control se empleó para observar si los microorganismos utilizan al surfactante como fuente de carbono y si este afecta o no el crecimiento)

SD (surfactante (S) al 0.05% y diesel industrial (D) al 1%. Este control dió una medida de las pérdidas abióticas de diesel).

Los mesocosmos fueron inoculados con 1 ml de cultivo reactivado según se indicó en el inciso VI 2-10.

VI.3-2 Obtención de muestras

Bajo condiciones estériles se tomaron 10 ml de muestra al tiempo cero y durante el tiempo que duró la experimentación, como se indica en la figura VI-2. Cada muestra se transfirió a un tubo de centrifuga estéril y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min. Se separó el sobrenadante y se transfirió a un embudo de separación de 60 ml. Se agregaron 2 ml de hexano grado HPLC para la extracción, se agitó suavemente 20 veces, se dejó reposar para permitir la separación de fases. La fase acuosa se separó para medir el pH. La fase orgánica se aforó a 10 ml y se transfirió a un vial de 10 ml, se etiquetó y se guardó en refrigeración, en esta muestra se cuantificó el diesel residual. La biomasa se resuspendió en 1 ml de MM2 limpio y se transfirió a un tubo *ependorf* de 2 ml para la determinación de proteína celular

Todo el material empleado en la toma de muestras, extracción, aforo y conservación, se lavó perfectamente bien con *Extrán* (Merck) y se enjuagó con agua desionizada y con sistema de tres disolventes: metanol, acetona, hexano grado reactivo en ese orden, y se dejaron secar para esterilizar el material que así lo requería

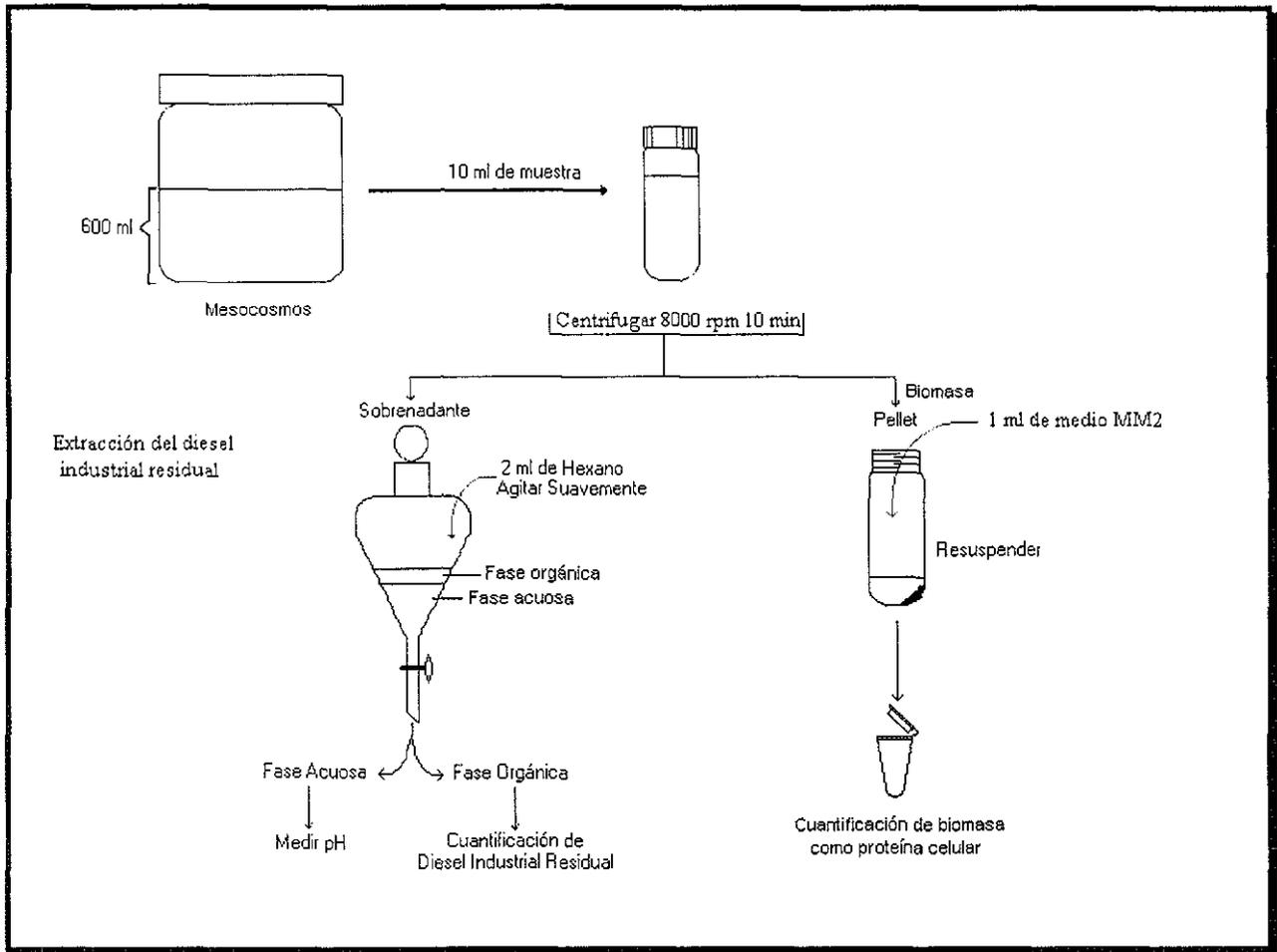


Figura VI-2 Obtención y manejo de las muestras provenientes de los mesocosmos.

VI.3-3. Determinación del pH

La fase acuosa proveniente de la extracción del combustible se vació en un vaso de precipitados de 25 ml, se tomó la medición de pH con un potenciómetro *Conductronic pH 20* previamente calibrado.

VI.3-4. Cuantificación de biomasa como proteína celular

Se utilizó el método de Löwry para cuantificar la biomasa como una medida directa del crecimiento celular empleando un *kit* de *BIO-RAD* (DC Protein Assay 500-0116).

Para montar la técnica se siguieron los mismos pasos sugeridos por el fabricante con algunas modificaciones para adaptarlo a las condiciones de laboratorio como se describen a continuación:

A muestras de un mililitro de cultivo colocadas en un tubo *ependorf* de 2 ml perfectamente limpio y estéril se le agregaron 40 μ l de hidróxido de sodio (*Merck*) 0.1M y 40 μ l de Tritón X-100 (*Sigma*) al 0.1%, se agitó vigorosamente en un vórtex. Los tubos se colocaron en baño María con agua hirviendo durante 10 minutos, se dejaron enfriar, se tomaron 100 μ l y se transfirieron a un tubo de ensaye limpio. Se adicionaron 500 μ l del reactivo A' (solución de tartrato de cobre alcalino y SDS), se mezcló y se agregaron 4 ml del reactivo B (solución de Folin). Se mezcló nuevamente y se dejaron en reposo durante 15 minutos para permitir el desarrollo de color. Se leyó absorbencia a 750 nm en un espectrofotómetro *Hach DR/2000* usando celdas de vidrio de 1 cm de diámetro.

Para la curva estándar de proteína se empleó albúmina sérica bovina (*Sigma*) que se conservó en refrigeración dentro de un desecador. La curva se preparó a partir de un *stock* preparado con albúmina y MM2 considerando concentraciones de 0.30 a 3.0 mg/ml, como blanco de reactivos se usó MM2. En la figura VI-3 se presenta gráficamente el procedimiento descrito y el procedimiento de validación se detalla en el Anexo 3.

VI.3-5. Cuantificación de diesel

Extracción del diesel industrial

Se tomó como base el método EPA 8015 (USEPA, 1996) modificado para adaptarse a las condiciones del equipo disponible en el laboratorio. El volumen de hexano conteniendo el diesel residual de las extracciones se transfirió a un matraz aforado de 10 ml, se aforó con hexano limpio y el total de volumen se transfirió a un vial de 10 ml, se colocó un septo de teflón y se selló con un anillo de aluminio y se almacenó en refrigeración a 4°C hasta su análisis por cromatografía de gases.

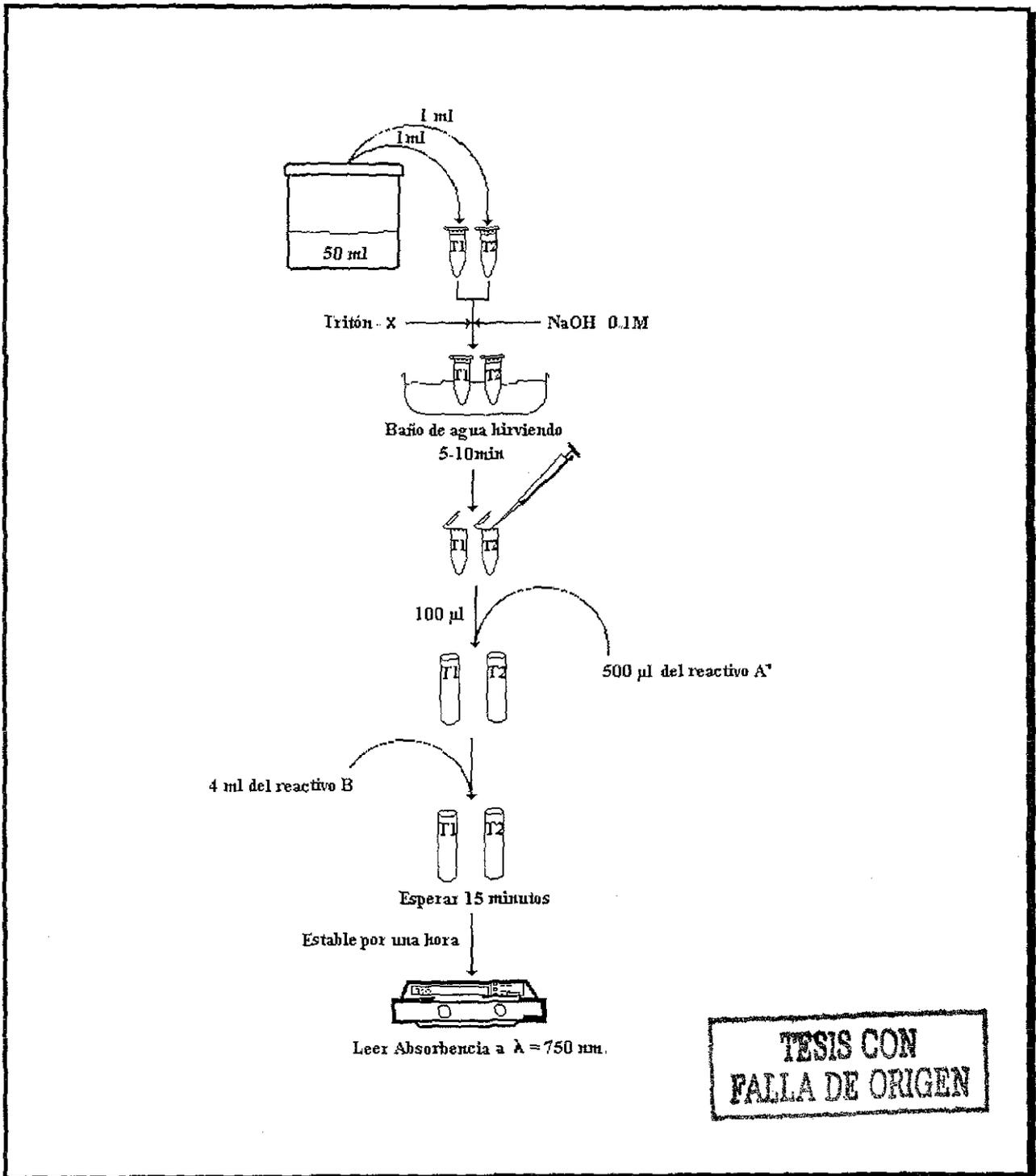


Figura VI-3 Determinación de proteína celular por la técnica de Löwry.

Preparación de la solución estándar de diesel industrial

En un matraz aforado de 25 ml se agregó hexano grado HPLC hasta la base del cuello, se colocó en la balanza analítica y se dejó estabilizando 10 minutos y se anotó el peso (P1). Se aforó con el diesel industrial usando una pipeta automática gota a gota y procurando que las gotas no escurrieran por el cuello del matraz y se esperaron otros 10 min., se anotó el peso (P2). Se terminó de aforar usando hexano y se anotó inmediatamente el peso (P3). Se agitó tres veces y se vació a un vial y se selló de inmediato.

La concentración de diesel industrial en la solución estándar se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$C = \frac{P2 - [(P1 + P3) - P2]}{V} \times 10^6$$

donde:

C = concentración del estándar en mg/L

P1 = masa en gramos del matraz + hexano

P2 = masa en gramos del matraz + hexano + diesel

P3 = masa en gramos del diesel + todo el hexano

V = volumen del matraz

10^6 = factor de corrección que da las unidades en mg/L

En el presente estudio la solución estándar tenía una concentración equivalente a 38,076 mg/L

Para la curva de calibración, a partir de la solución estándar se prepararon las diluciones requeridas. Los puntos de la curva se ajustaron para que las muestras entraran en ellas sin necesidad de realizar diluciones de las mismas, con esto se evita la introducción de un error

mayor en la cuantificación. Las concentraciones se hicieron tomando como base la mayor concentración utilizada en los experimentos, de manera que se consideraran los siguientes puntos:

- 1 4949.8800 mg/L
- 2 3008.0040 mg/L
- 3 10001.3988 mg/L
- 4 498.7956 mg/L
- 5 300.8004 mg/L

La validación de la técnica se presenta en el Anexo 4

Inyección en el Cromatógrafo de Gases

Se utilizó un cromatógrafo de gases *Varian* modelo 3350, con detector FID y columna capilar de 30 m marca J&W DB-5ms P/N 125-5532 30 m x 0.53 mm D I., 1.5 μ m con una fase equivale a (5%-Fenil)-metilpolisiloxano (no polar)

Las muestras se inyectaron de mayor a menor concentración (orden del experimento) y el volumen fue de 1 μ l en todos los casos. Se tuvo especial cuidado en la limpieza de la jeringa con hexano y enjuagándose entre muestra y muestra 10 veces con hexano y dos con la muestra a inyectar

Condiciones de operación

Los gases empleados incluyeron helio (pureza 99.998), empleado como gas acarreador, con un flujo de 16 ml/min y una presión de 8 psi y un venteo de 40.0 ml/min. Como *Make up* se utilizó nitrógeno (pureza 99.998) con un flujo de 14 ml/min. Para el detector se usó aire (grado cero) con un flujo de 300 ml/min, y el del hidrógeno (pureza 99.995) de 30 ml/min. Con la opción de split

Como ya se mencionó, se usó un detector de ionización de flama a una temperatura de 300°C. La rampa de temperatura inició con una temperatura inicial del horno de 60°C con un incremento de 5°C/min hasta los 100°C, enseguida un incremento de 20°C hasta 280°C permaneciendo 8 min. De esta forma cada análisis tomó 24 min.

Se recurrió al empleo de un estándar externo, que en este trabajo se trató de diferentes estándares de diesel industrial inyectados a intervalos regulares.

Los resultados obtenidos se presentan en forma de gráfica en el capítulo correspondiente a Resultados y Discusión y en forma de tabla en el Anexo 6.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1 ADICIÓN DEL AGENTE TENSOACTIVO

Generalmente, en el cultivo líquido de microorganismos degradadores de hidrocarburos se observan dos fases, la acuosa que contiene el medio mineral y la orgánica constituida por los hidrocarburos de interés. Por supuesto que esto es una función directa del tipo de hidrocarburo que se adicione, de su densidad, de su solubilidad y de la concentración a la que se encuentre. En el caso de combustibles como el diesel que se utilizó en el presente estudio, aun en bajas proporciones siempre forma una capa que flota sobre el agua debido a la gran diversidad de hidrocarburos que los constituyen, principalmente los de mayor complejidad.

Para que los microorganismos puedan degradar a los hidrocarburos es indispensable que estén en contacto directo con éstos^[85]. Por ello se decidió incluir un agente tensoactivo como ingrediente del medio, con el fin de permitir la conformación de una sola fase y permitir la homogeneidad del cultivo, para de esta manera asegurar la representatividad de las muestras durante el seguimiento de los experimentos.

Se decidió utilizar un agente tensoactivo no-iónico, ya que según la literatura aumentan la transferencia de masa^[40,93]. Se decidió también por un producto comercial disponible en el mercado, debido al interés que existe de llevar el proceso a escala de campo. El producto empleado, cuyo nombre comercial no se mencionará en este trabajo por razones de confidencialidad, es un alcohol graso etoxilado, cuyas bondades ya han sido comprobadas en sitios contaminados que han sido sometidos a remediación química y a biorremediación. Este producto causa una mínima reducción en el flujo subterráneo^[14,19], es biodegradable y no causa dispersión de hidrocarburos en suelos de la zona no-saturada^[34].

El hecho de que el agente tensoactivo sea biodegradable fue una característica clave en este trabajo para elegir su concentración en los mesocosmos. La concentración estaría en función de la mínima necesaria para emulsionar completamente al diesel. Usar una alta concentración del tensoactivo, que asegurara la absoluta homogeneidad del diesel en el medio acuoso, podría

ocasionar que los microorganismos utilizaran al tensoactivo como fuente de carbono. Asimismo se ha reportado que concentraciones de tensoactivos entre 500 y 1000 mg/L, pueden inhibir la biodegradación de los propios hidrocarburos ^[34,51], e incluso pueden causar daño a la célula por lisis de la membrana celular. De aquí la importancia de definir la concentración a utilizar en este trabajo

Con base en lo anterior, se probaron diferentes concentraciones del agente tensoactivo para encontrar la mínima que, por un lado, asegurara la homogeneidad del diesel en el medio líquido y por otro lado, que no interfiriera de manera negativa al ser consumido como fuente de carbono. La concentración mínima que proporcionó el efecto deseado fue del 0.05% (v/v).

VII.2 ELECCIÓN DE LOS ALCALOIDES

Los alcaloides elegidos para este trabajo en particular fueron: cafeína, teofilina y quinina. Para su elección se tomaron en consideración varios aspectos importantes, los 4 más importantes fueron:

- ◇ Actividad biológica. Se tomó como base su semejanza estructural con respecto a compuestos que se han identificado como factores de crecimiento comunes que son: aminoácidos, vitaminas y nucleótidos
- ◇ Disponibilidad en el mercado. Los alcaloides como reactivos analíticos son productos de importación, por lo que se requiere de un permiso especial otorgado por la Secretaría de Salud^[45], motivo por el cual la elección de los alcaloides también se encaminó a buscar aquellos que fueran de relativa fácil adquisición en el mercado nacional, y en este caso en particular, la industria farmacéutica mexicana elabora medicamentos conteniendo los 3 alcaloides elegidos como principio activo, por lo que se pudieron conseguir con relativa facilidad.
- ◇ Concentración del alcaloide en la fuente original. También se tomó como base la concentración a la cual los alcaloides se encuentran en la planta de origen. Para el caso de la quinina es del 2 al 3% en la corteza de la cinchona americana, para teofilina en granos frescos de café alrededor del 0.55% y para la cafeína del 0.75 al 1.5%^[10,93].

◇ Ausencia de toxicidad del alcaloide hacia el crecimiento microbiano. Dado que hay muy poca información en la literatura sobre los efectos tóxicos de los alcaloides elegidos sobre la actividad microbiana, se decidió probar diferentes concentraciones de los mismos tomando como base el único dato que reporta la literatura que se refiere al efecto tóxico de cafeína al 0.1% sobre la interacción de *B. thuringiensis* y larvas de gusano^[58]. Este dato se tomó como punto de partida para un primer experimento, en el que los tres alcaloides se manejaron por separado a la misma concentración porcentual, debido a que para fines prácticos resultaba más sencillo hacer ajuste por porcentaje que por concentración molar.

Después de 15 días de cultivo, donde se adicionaron los tres alcaloides por separado no se observó crecimiento a simple vista y este dato se confirmó por la ausencia de proteína celular medida de acuerdo al método de Löwry. Este experimento confirmó que los microorganismos no utilizan al alcaloide como fuente de carbono.

Con base en los resultados obtenidos se decidió adicionar una concentración de cafeína del 0.1%, la cual se aplicó también para los otros dos alcaloides, teofilina y quinina.

Adicionalmente, se llevaron a cabo otros cultivos adicionando tres diferentes concentraciones de cafeína: 0.01% (BSDC_{0.01}), 0.1% (BSDC_{0.1}) y 0.5% (BSDC_{0.5}), en los cuales se midió el crecimiento y la biodegradación del diesel. Los resultados obtenidos se presentan en la figura VII-1 y los datos detallados en el Anexo 7.

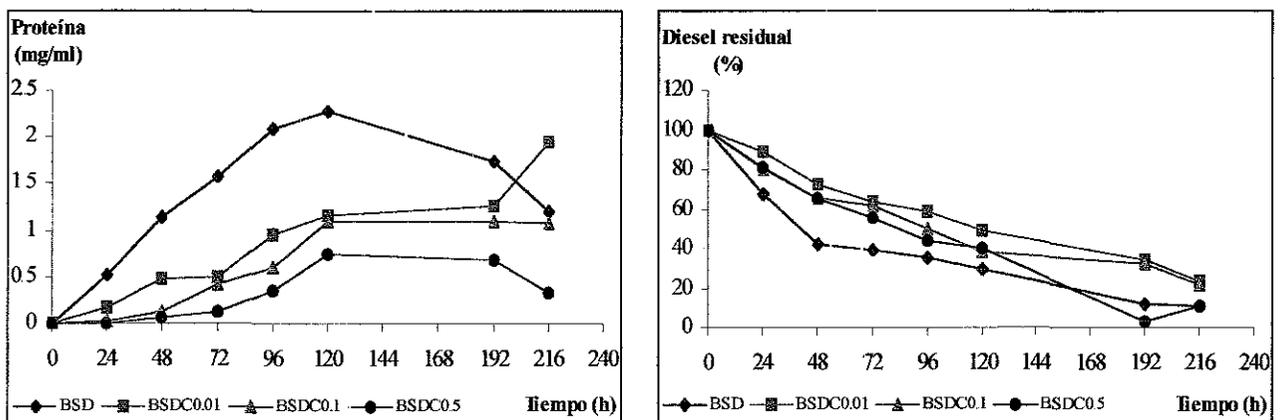


Figura VII-1. Curvas de crecimiento (izquierda) y biodegradación del diesel (derecha) en presencia de diferentes concentraciones de cafeína.

Se puede apreciar que la adición de cafeína sí tiene efecto negativo sobre el crecimiento y que éste es mayor a medida que se aumenta la concentración, pero también con ésta

concentración se obtuvo una degradación casi igual al control control con alcaloide. Este resultado se discutirá más adelante.

Con respecto a las curvas de degradación del diesel, se observa una menor degradación conforme disminuye la concentración de cafeína. Sin embargo, al final de la cinética, a las 216 horas de cultivo, se alcanza prácticamente el mismo porcentaje de degradación que para el control. Lo anterior podría sugerir que a mayor concentración de cafeína (para éste caso entre 0.1%-0.5%), hay inhibición de la síntesis de material celular (anabolismo), y que el diesel se utiliza más como fuente de energía que como fuente de carbono.

Con los datos obtenidos al final del experimento, a las 216 horas, se calculó el rendimiento de biomasa respecto al diesel consumido, los resultados se muestran en la Tabla VII.1. El rendimiento obtenido con la adición de 0.1% de cafeína, que fue de 0.395, fue muy cercano al rendimiento alcanzado en el control, que fue de 0.458. A una concentración de cafeína del 0.5%, el rendimiento fue muy bajo debido principalmente al marcado efecto negativo sobre el crecimiento, lo que confirma que el diesel está siendo usado como fuente de energía primordialmente.

Tabla VII.1 Rendimiento de biomasa con diferentes concentraciones de cafeína

<i>A 216 h</i>	BSD	BSDC_{0.01}	BSDC_{0.1}	BSDC_{0.5}
Concentración de cafeína (%)	0	0.01	0.1	0.5
Concentración de biomasa (mg/L)	1200	1943.7	1070.9	333.5
Concentración de diesel consumido (mg/L)	2621.135	2418.154	2710.391	3140.186
Y_x	0.458	0.804	0.395	0.106

VII.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS PRESENTES EN MAYOR PROPORCIÓN EN EL CULTIVO DEGRADADOR DE DIESEL INDUSTRIAL

El cultivo inicial corresponde a una comunidad microbiana. En la figura VII-2 se muestra el aspecto de los microorganismos que están en mayor proporción en dicha comunidad, de la cual se pudieron identificar al menos cinco tipos de colonias morfológicamente diferentes a simple vista, al crecer en el medio MM1 sólido. Se obtuvo una cuenta entre 10^6 y 10^7 ufc/ml.



Figura VII-2 Comunidad microbiana degradadora de diesel industrial crecido en MM1 a la dilución 10^{-3} .

En la tabla VII.2 se describe la morfología de las colonias de acuerdo a las observaciones macroscópicas. De los 5 tipos de colonias diferentes se realizó una tinción de Gram para hacer las observaciones microscópicas necesarias.

Tabla VII.2 Morfología de las colonias aisladas del cultivo inicial

Colonia	Observaciones Macroscópicas	Observaciones Microscópicas
1	Colonia blancas, rizoides, planas	Bacilos muy cortos, delgados, Gram negativos, redondos (cocobacilos)
2	Colonias grandes blancas, bordes regulares, cóncavas	Levaduras grandes
3	Colonias pequeñas, en punta de alfiler, incoloras	Bacilos muy pequeños, delgados Gram negativos
4	Colonias blancas, cóncavas de bordes regulares y de apariencia húmeda	Bacilos agrupados cortos, con bordes redondos Gram negativos
5	Colonias grandes, mucoides, de bordes regulares que presentan una coloración amarillo-verdosa	Bacilos cortos, Gram negativos, extremos redondeados sin agrupación

Como se puede observar, la mayor parte de las colonias cultivables degradadoras de diesel están constituidas por bacterias, situación que era de esperarse porque el pH neutral del medio favorece preferencialmente su desarrollo, además porque la literatura indica que las bacterias son las que han demostrado mayor habilidad para degradar el diesel.

Posteriormente, en el aislamiento de las colonias que se realizó bajo presión selectiva con diesel industrial al 1%, se identificaron cepas de *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa*, con un 98.4% y 99.2% de confiabilidad respectivamente. Estas cepas son las que se marcaron en la tabla VII.2 con los números 4 y 5, respectivamente. Para las colonias 1, 2 y 3 se obtuvo del 30% al 50% de confiabilidad, por lo que su identificación no fue considerada, probablemente su aislamiento no pudo realizarse adecuadamente. En la figura VII-3 se observa el crecimiento después del aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* en medio MM1.

Se ha reportado que el género *Pseudomonas* agrupa gran cantidad de especies que utilizan diversos hidrocarburos como única fuente de carbono^[49]. Se esperaba que de igual forma el cultivo utilizado en este estudio presentara alguna especie de *Pseudomonas*, que por sus capacidades metabólicas resultara vital en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Pseudomonas cepacia ha sido aislada de suelos contaminados y se ha empleado en diversos estudios de biodegradación de contaminantes orgánicos^[39], por lo que no resulta extraño que esté presente en el cultivo inicial que fue utilizado en el presente estudio. *Pseudomonas aeruginosa* también se ha reportado que tiene capacidad para degradar hidrocarburos^[69].

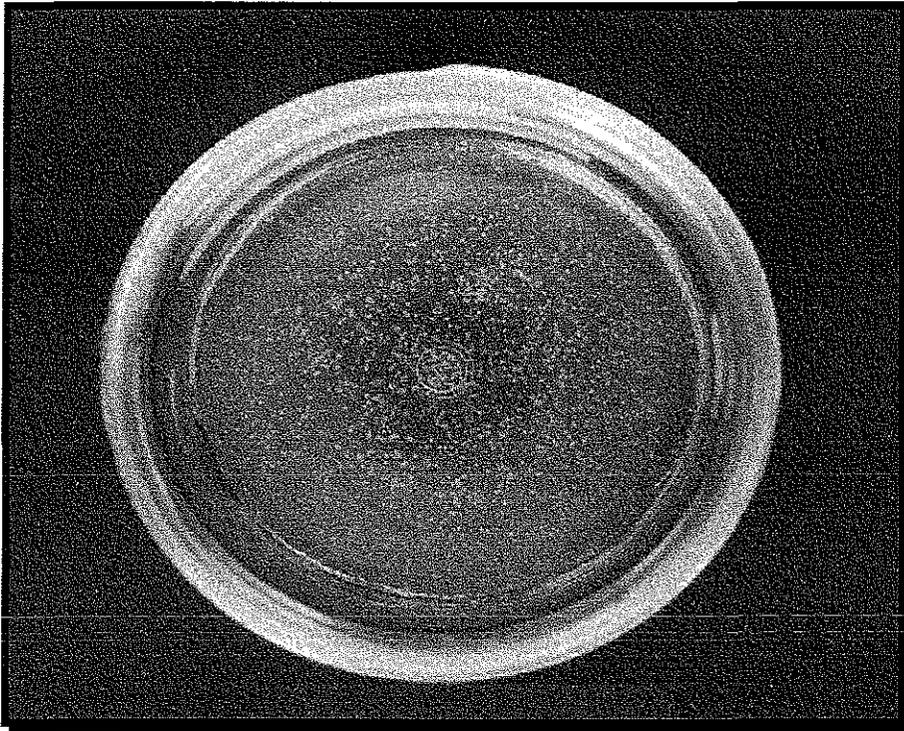


Figura VII-3 *Pseudomonas aeruginosa* aislada del cultivo degradador de diesel industrial.

El hecho de que se trate de una comunidad microbiana hace que resulte difícil el reportar el crecimiento de microorganismos como unidades formadoras de colonias, por ello se decidió cuantificar la proteína celular como una forma de medir el crecimiento.

Por otro lado, se decidió trabajar con la comunidad microbiana completa y no con cultivos puros, ya que se ha demostrado que en la degradación de los hidrocarburos la mejor eficiencia de degradación proviene de una comunidad microbiana en su conjunto^[35]. Por la complejidad los combustibles como el diesel, las cepas puras no son totalmente capaces de llevar a la

mineralización completa a los hidrocarburos presentes. Además de que existió un interés muy particular de enfocar el trabajo hacia una aplicación práctica.

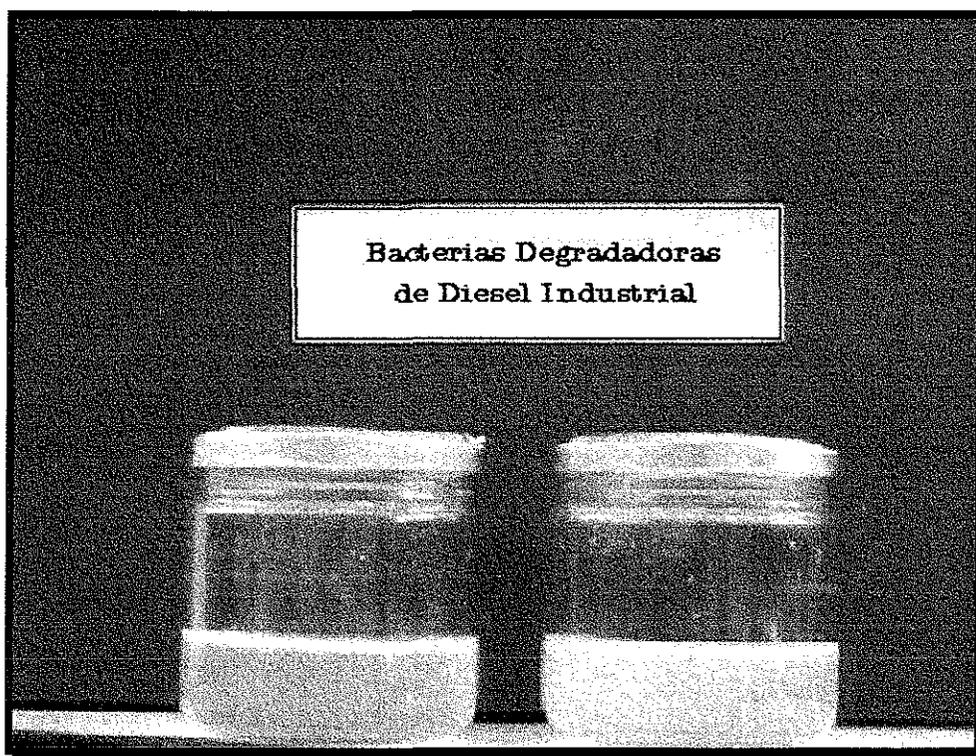


Figura VII-4 Cultivos degradadores de diesel industrial a los 2 días (izquierda) y a los 10 días (derecha) de crecimiento.

En la figura VII-4 se muestra la apariencia del cultivo líquido crecido en el medio MM2 con diesel al 1%, aquí se puede observar la turbiedad del medio que fue notoriamente superior después de 10 días de cultivo con 0.381 mg/ml de proteína (derecha) con respecto a lo que se observó a los 2 días de cultivo con 1.502 mg/ml de proteína (izquierda).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII.4 CARACTERÍSTICAS DEL DIESEL INDUSTRIAL UTILIZADO COMO SUBSTRATO

Las características del diesel industrial que fue utilizado como sustrato en el presente estudio se presentan en la tabla VII 3, y se comparan con las especificaciones correspondientes.

Tabla VII.3 Características del diesel industrial empleado como sustrato

Parámetro	Resultado	Especificación de PEMEX
Gravedad específica	0.83	0.83
% Azufre	0.0619	0.05 máximo
% Aromáticos	16.76	30
% Olefinas	1.1	
% Saturados	78.7	
% TAME	1.1	ausente
% MTBE	1.8	ausente
% Benceno	0.19	ausente

Se encontraron varios parámetros fuera de la especificación de Pemex, y lo que más sorprendió es que por tratarse de un diesel industrial, no debería contener aditivos oxigenantes como el metilterbutiléter (MTBE) o el metilteramiléter (MTAE) que son compuestos típicos de las gasolinas. Lo anterior indicó presencia de gasolina, la cual fue confirmada por el perfil de destilación mostrado en la figura VII-5 y los perfiles cromatográficos que se aprecian en la figura VII-6.

La gasolina contiene hidrocarburos volátiles de bajo peso molecular que en el perfil cromatográfico corresponden a los tiempos de retención más cortos, entre 0 y 15 min (figura VII-6). En cambio el diesel contiene hidrocarburos de mayor peso molecular cuyos tiempos de retención son mayores, entre 10 y 22 min. En el perfil cromatográfico del diesel industrial utilizado en este estudio se observan picos con tiempos de retención desde escasos segundos hasta 22 min. Los perfiles cromatográficos se obtuvieron bajo las mismas condiciones de operación, por lo cual son comparables entre sí.

El contenido de gasolina en el combustible utilizado fue alrededor del 20%, esta cifra se estimó a partir del perfil de destilación de la figura VII-5. La temperatura de destilación de una

gasolina fresca es entre 30 y 225°C, mientras que el diesel destila entre 210 y 350°C. El hecho de que la temperatura inicial de destilación sea de 57°C se debe a que ya está intemperizada.

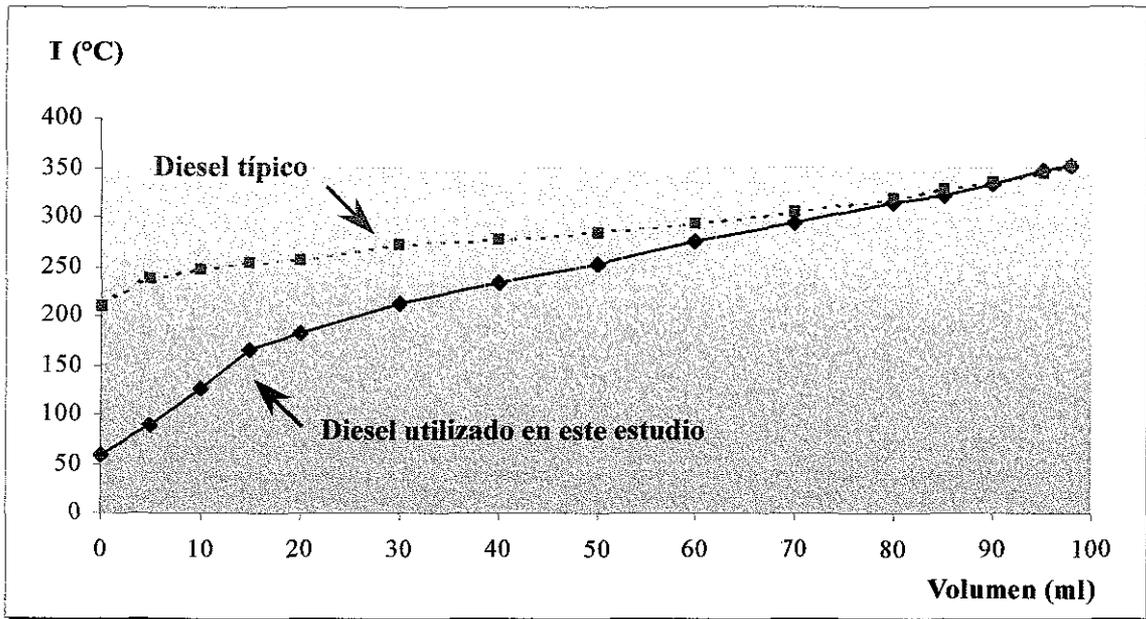


Figura VII-5 Perfil de destilación de diesel industrial empleado en este estudio.

Resulta interesante observar que los microorganismos que originalmente provenían de un suelo contaminado con diesel se hayan desarrollado en esta mezcla de combustibles. Es probable que el sitio original tuviera mezcla de combustibles, favoreciendo el proceso de adaptación y enriquecimiento que permitió una selección natural de aquellos microorganismos con mayores capacidades.

Lo que es importante resaltar aquí, es que inicialmente se tuvo confianza en que se trataba de un diesel industrial "puro" y no se programó su análisis en los inicios de este trabajo, fueron inquietudes como el olor poco peculiar a diesel industrial, así como la de contar con el equipo necesario para el análisis físico y químico de combustibles las que motivaron a estos análisis. Sin embargo, a pesar de haber descubierto a mitad del trabajo que se trataba de una mezcla, no resta importancia a los resultados, por el contrario, simula condiciones reales de contaminación, ya que en otros trabajos realizados en el laboratorio se ha encontrado como factor común la presencia de combustibles en mezcla como contaminantes de suelos y acuíferos. Con esta base se decidió continuar el trabajo con el combustible que se empezó, sin importar que se tratara de una mezcla.

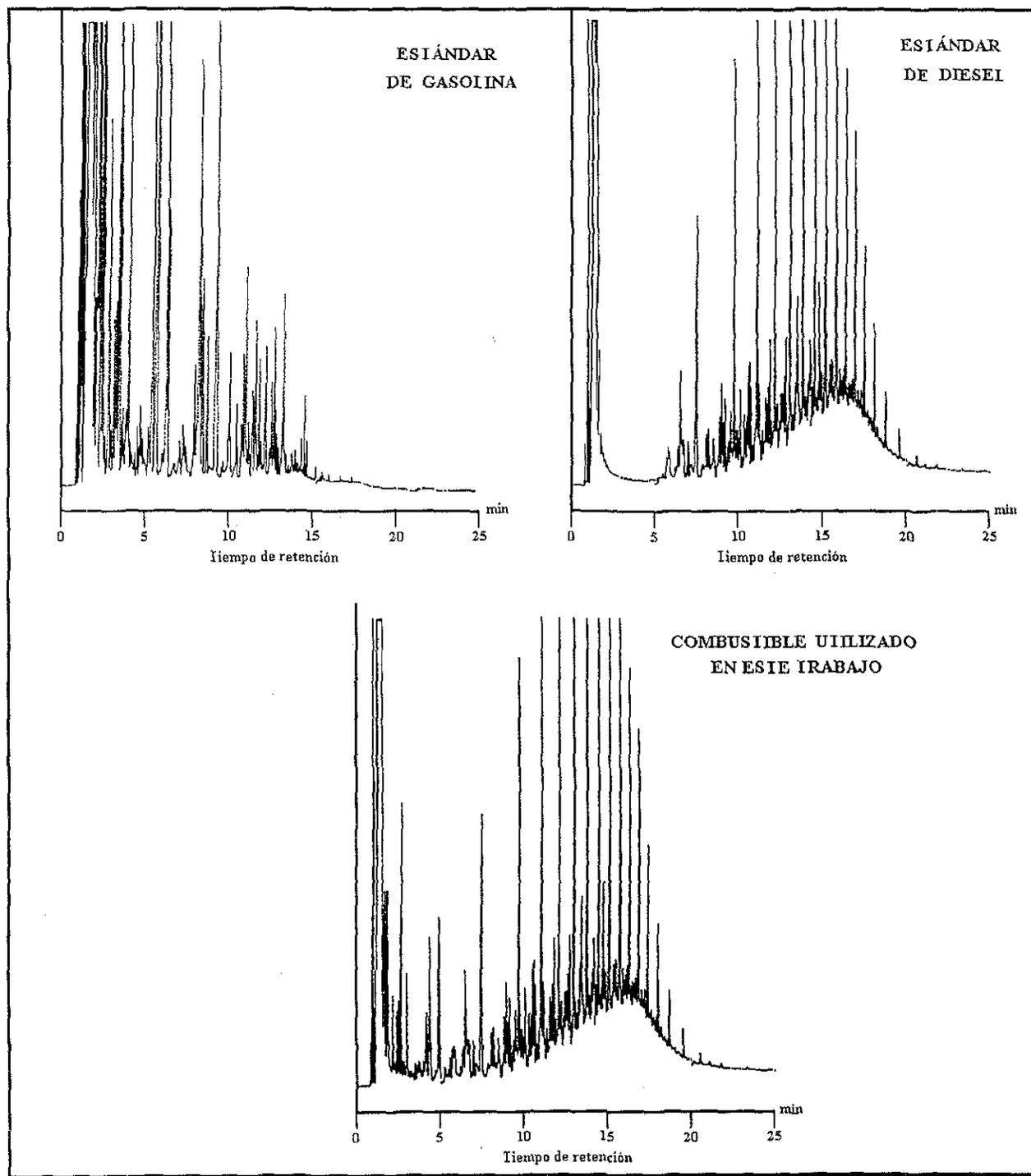


Figura VII-6 Perfiles cromatográficos típicos de un estándar de diesel industrial, un estándar de gasolina, y el combustible utilizado en este trabajo

VII. 5. BIODEGRADACION DE DIESEL INDUSTRIAL EN PRESENCIA DE ALCALOIDES

Para evaluar de manera clara el efecto de los alcaloides sobre el crecimiento microbiano y la biodegradación del diesel fue necesario incluir 3 controles

El control que se identificó como BS, que se refiere a Biomasa + Surfactante, permitió conocer el crecimiento que se podría dar a expensas del agente tensoactivo, en el entendido de que es un compuesto orgánico biodegradable. Como se observa en la figura VII-7 (a), casi no hubo crecimiento a la concentración de surfactante utilizada, excepto a las 24 h en donde se detectó una mínima concentración de biomasa de 0.047 mg/ml (Anexo 6), la cual pudo deberse a la presencia de diesel residual proveniente del inóculo. Pasado ese tiempo ya no se logró cuantificar biomasa, a pesar de que había todavía algo de diesel residual que fue consumido hasta después de las 72 horas, como se observa en el perfil cromatográfico de la figura VII-11 (f).

El segundo control identificado como SD que corresponde a Surfactante + Diesel sirvió para verificar la esterilidad del medio y la ausencia de microorganismos que pudieran provenir principalmente del diesel. Se comprobó que la filtración realizada a través de membrana de 0.22 μm eliminó microorganismos que en otros experimentos no reportados aquí, fueron detectados. Este control SD también sirvió para estimar el porcentaje de hidrocarburos volátiles que se pierden debido al movimiento impuesto por la agitación y por la incubación, aunque la temperatura fuese baja. Esta pérdida en promedio fue del 4.2% al final del experimento (figura VII-7 (b)), por lo cual no se consideró necesario hacer ajuste de la concentración por pérdida abiótica del combustible.

En la figura VII-12 (a→d) se aprecia la alteración en los perfiles cromatográficos del control SD, donde la pérdida más evidente, en cuanto a disminución del perfil de diesel, ocurre en el lapso de las primeras 72 horas (figuras VII-12 (a y b)), para luego mantenerse constante y sólo se hace evidente la alteración en la disminución de algunos picos localizados en el intervalo de 5 a 10 minutos del tiempo de retención a las 216 horas (figura d).

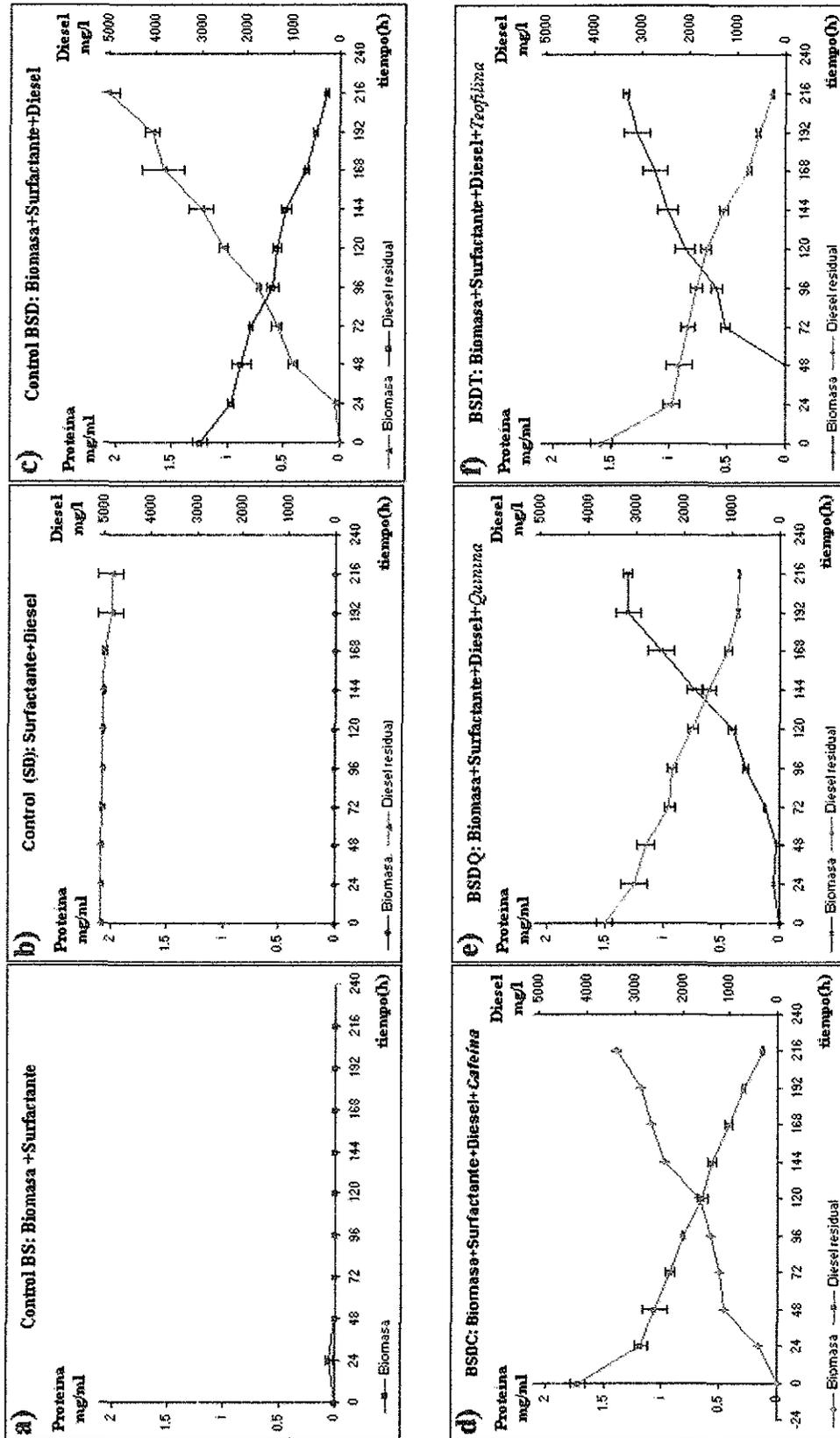


Figura VII-7 Evolución del crecimiento y la degradación del diesel industrial
 Concentraciones: surfactante 0.05%; diesel industrial 3300 mg/l; alcaloide(cafeína, quinina, teofilina) 0.1%

TESIS CON
 PALLA DE ORIGEN

Una situación adicional para la cual sirvieron los controles SD y BS fue para verificar que el surfactante no interfiere en el crecimiento, por no ser utilizado como fuente de carbono, además de que aseguró que el sistema fuese hermético y que la desaparición del diesel sea debida al metabolismo microbiano

El tercer control BSD que se refiere a Biomasa + Surfactante + Diesel, es básicamente la cinética de degradación de diesel y crecimiento celular en ausencia de cualquier alcaloide, por lo que constituye la referencia sobre la cual se hizo la comparación al agregar cada uno de éstos. En las figuras se identifican como BSDC al que fue adicionado de Cafeína, BSDQ para el que contenía quinina, y BSDT para el que se agregó teofilina

Tabla VII.4 Tabla de mediciones

CRECIMIENTO							
<i>Nivel</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Promedio</i>	<i>Error estándar (interno)</i>	<i>Error estándar (juntos)</i>	<i>Varianza</i>	<i>Intervalos para el 95% de significancia LSD</i>	
BSD	3	2 0778	0 0601	0 0423	0 0108	2 0087	2 1469
BSDC	3	1 3950	0 0524	0 0423	0 0082	1 3259	1 4641
BSDQ	3	1 3218	0 0221	0 0423	0 0014	1 2527	1 3909
BSDT	3	1 3748	0 0178	0 0423	0 0009	1 3057	1 4439
Total	12	1 5424	0 0211	0 0211		1 2078	1 5769
CRECIMIENTO							
BSD	3	278 6549	15 6530	14 2336	735 0584	255 4392	301 8707
BSDC	3	320 2519	15 4823	14 2336	719 1076	297 0361	343 4676
BSDQ	3	864 6824	11 9801	14 2336	430 5742	841 4666	887 8981
BSDT	3	258 6157	13 4959	14 2336	546 4200	235 3999	281 8314
Total	12	430 5512	7 1168	7 1168		418 9433	442 1591
pH							
BSD	3	6 0733	0 0433	0 0322	0 0056	6 0207	6 1259
BSDC	3	6 2400	0 0400	0 0322	0 0048	6 1874	6 2925
BSDQ	3	6 2500	0 0200	0 0322	0 0012	6 1974	6 3025
BSDT	3	6 2366	0 0166	0 0322	0 0008	6 1840	6 2892
Total	12	6 2000	0 0161	0 0161		6 1737	6 2262

Para saber si las diferencias entre el control (BSD) y los tratamientos (BSDC, BSDQ, y BSDT) son significativos, se llevó a cabo un análisis de varianza de los tratamientos (tabla VII.4) de crecimiento, degradación y pH, se presentan los resultados a las 216 horas en la tabla VII.5 que corresponde al tiempo final

Tabla VII.5 ANOVA

CRECIMIENTO						
<i>Fuente de variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F calculada</i>	<i>F tablas</i>	<i>Probabilidad</i>
Entre grupos	1 1554	3	0 3851	71.509	0.0000	4 0511E-06
Dentro de los grupos	0 0430	8	0 0053			
Total	1.1985	11				
DEGRADACIÓN						
Entre grupos	759810 33	3	253270 11	426.707	0.0000	4 0129E-09
Dentro de los grupos	4862 32	8	607 79			
Total	764672 65	11				
pH						
Entre grupos	0 0644	3	0 0214	6.895	0.0131	0 0131
Dentro de los grupos	0 0249	8	0 0031			
Total	0 0894	11				

Del análisis de varianza trabajado con un nivel de confianza del 95 por ciento, se encontró que sí existían diferencias significativas entre los grupos, por lo cual se procedió a analizar los datos a través de una prueba de *Duncan* (rangos múltiples) empleando para ello el programa *statgraphics*, encontrando que para el caso del crecimiento no existen diferencias significativas entre los alcaloides, pero sí existe diferencia entre los tratamientos con alcaloides y el control. En el caso de los datos de degradación se encontró que existen diferencias entre los alcaloides, pero no entre el control y la cafeína y el control y la teofilina (tabla VII.6).

También se construyeron las gráficas que se presentan en la figura VII-8; las barras de error corresponden a la desviación estándar. Los tratamientos se analizaron por tiempo, si las barras de error se traslapan entonces no hay diferencia significativa entre tratamientos. En

general, se observa que sí hay diferencias significativas entre el control y los tratamientos, y que por consiguiente los efectos son debidos a la acción de los alcaloides. Entre los tratamientos, primordialmente para cafeína y teofilina, son menores las diferencias, aunque al final, tanto para crecimiento como para degradación, los resultados sí hay diferencias significativas. La similitud del comportamiento de estos dos alcaloides (cafeína y teofilina), también se observa en las gráficas de crecimiento y las logarítmicas, así como en los perfiles cromatográficos como se verá más adelante.

Tabla VII.6 Análisis de Rangos Múltiples

CRECIMIENTO				
Nivel	LSD 95% confianza	Grupo Homógeno	Diferencia	Límites
BSQ	3	X		
BSDT	3	X		
BSDC	3	X		
BSD	3	X		
BSD-BSDC			0.6828	0.1382 *
BSD-BSDQ			0.7560	0.1382 *
BSD-BSDT			0.7030	0.1382 *
BSDC-BSDQ			0.0732	0.1382
BSDC-BSDT			0.0201	0.1382
BSDQ-BSDT			-0.0530	0.1382
DEGRADACIÓN				
BST	3	X		
BSD	3	X X		
BSDC	3	X		
BSDQ	3	X		
BSD-BSDC			-41.5969	46.4315
BSD-BSDQ			-586.0270	46.4315 *
BSD-BSDT			20.0393	46.4315
BSDC-BSDQ			-544.4300	46.4315 *
BSDC-BSDT			61.6362	46.4315 *
BSDQ-BSDT			606.067	46.4315 *
pH				
BSD	3	X		
BSDT	3	X		
BSDC	3	X		
BSDQ	3	X		
BSD-BSDC			-0.1666	0.1051 *
BSD-BSDQ			-0.1766	0.1051 *
BSD-BSDT			-0.1633	0.1051 *
BSDC-BSDQ			-0.0100	0.1051
BSDC-BSDT			0.0033	0.1051
BSDQ-BSDT			0.0133	0.1051

* Denota una diferencia estadísticamente significativa

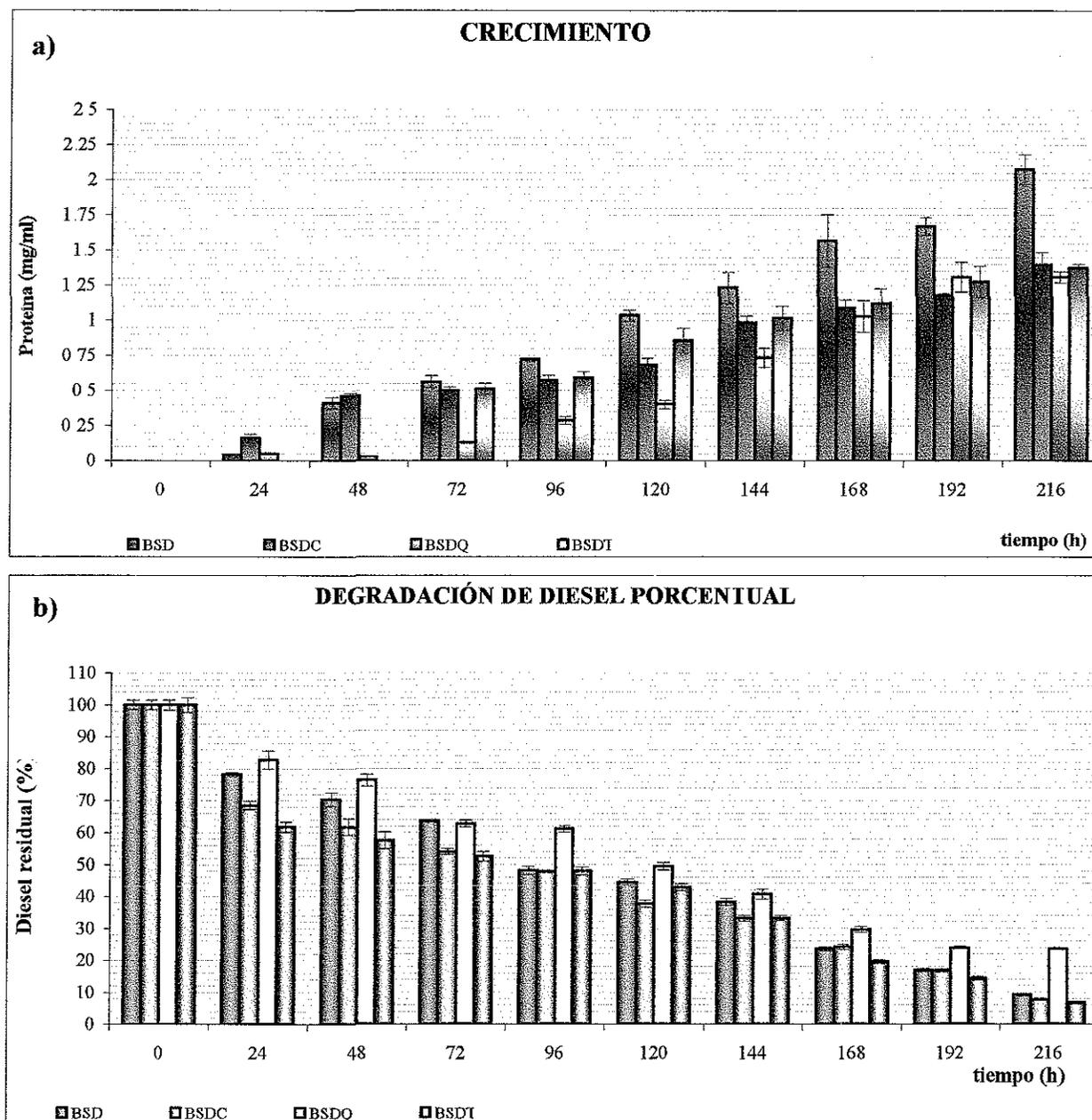


Figura VII-8 Gráficas de las cinéticas de crecimiento (a) y degradación (b) Las barras de error corresponden a \pm la desviación estándar.

En el caso del cultivo con cafeína, BSDC, el crecimiento obtenido fue significativamente menor al del control BSD con el cual se obtuvieron 2.1 mg/ml mientras que con cafeína se alcanzó 1.4 mg/ml de proteína celular, equivalente al 67% (ver figura VII-7 c): Si bien hubo poca biomasa para la muestra BSDC, se llegó hasta una concentración de diesel residual del 7.8%, esto es ligeramente por debajo del control BSD que se quedó con 9.2%, (ver figura VII-10) En la

figura VII-9 también se observa que en el cultivo con cafeína, el crecimiento se inició un poco antes (dato no corroborado al no haber muestra a las 12 horas), teniendo a las 24 horas un porcentaje 78 %, sólo levemente mayor en relación con el control con 2 %, diferencia significativa según gráficas de la figura VII-7(b).

En el caso del cultivo con teofilina BSDT, los resultados son muy semejantes al que se adicionó cafeína, ya que el porcentaje de crecimiento fue del 66.2% respecto al control, además como se muestra en la figura VII-9, fue el cultivo que más tardó en iniciar el crecimiento, presentando datos de biomasa detectable de 0.51 mg/ml, hasta las 72 horas; concentración muy similar al control con 0.56 mg/ml y con cafeína de 0.50 mg/ml. Esto pudo deberse a pérdida del *pellet* por resuspensión, puesto que sí hay evidencias de biodegradación del diesel, como lo demuestra la gráfica de la figura VII-10, en donde, se tienen los mayores porcentajes de biodegradación del diesel (anexo 6), situación que sería congruente con la hipótesis de que la degradación no está ligada con el crecimiento, como se discutirá más adelante.

Para el cultivo con quinina BSDQ, a pesar de no haber un buen porcentaje de degradación ni de crecimiento como se observa en las figuras VII-8 y VII-9, sí existió consumo del diesel, el cual alcanza un 63 % en el crecimiento, cifra que no es significativa a la observada con cafeína y con teofilina, de aquí que con este alcaloide se obtiene el mayor porcentaje de diesel residual quedándose con el 23.7% de diesel sin metabolizar.

Como se observa en la figura VII-9, aparentemente ninguna de las muestras alcanza la fase estacionaria, efecto que muestra la variabilidad propia del sistema, ya que en otro experimento no presentado aquí, el tiempo de muestreo se ajustó a 10 días porque era el tiempo en que se alcanzaba la fase estacionaria, sin embargo, al observar las curvas semilogarítmicas de la figura VII-11, se observa una clara tendencia, aproximadamente a partir de las 72 horas, por alcanzar la fase estacionaria.

Para los fines específicos de este trabajo, el tiempo fue suficiente porque se llega hasta aproximadamente un 93% de degradación. El porcentaje de crecimiento para los cultivos con los alcaloides es muy similar, de alrededor del 66.5% con respecto al control BSD, pero con quinina toma más tiempo en alcanzar el mismo porcentaje de degradación del diesel (figura VII-10)

De acuerdo a los datos estadísticos de la tabla VII.6. para el caso del crecimiento, es indistinto el uso de cualquiera de los alcaloides, los tres ejercen un efecto negativo sobre el crecimiento, sin embargo, en cuanto a la degradación, los tres alcaloides parecen ejercer un efecto

distinto, y el hecho de que no haya diferencias significativas entre el control y la cafeína y la teofilina (aunque pertenecen a grupos diferentes), esto nos podría indicar que con el uso del alcaloide, se llega al mismo nivel de degradación pero con menor concentración de biomasa. Dato corroborado con los datos presentados en el inciso VII.2 de la cinética con diferentes concentraciones de cafeína.

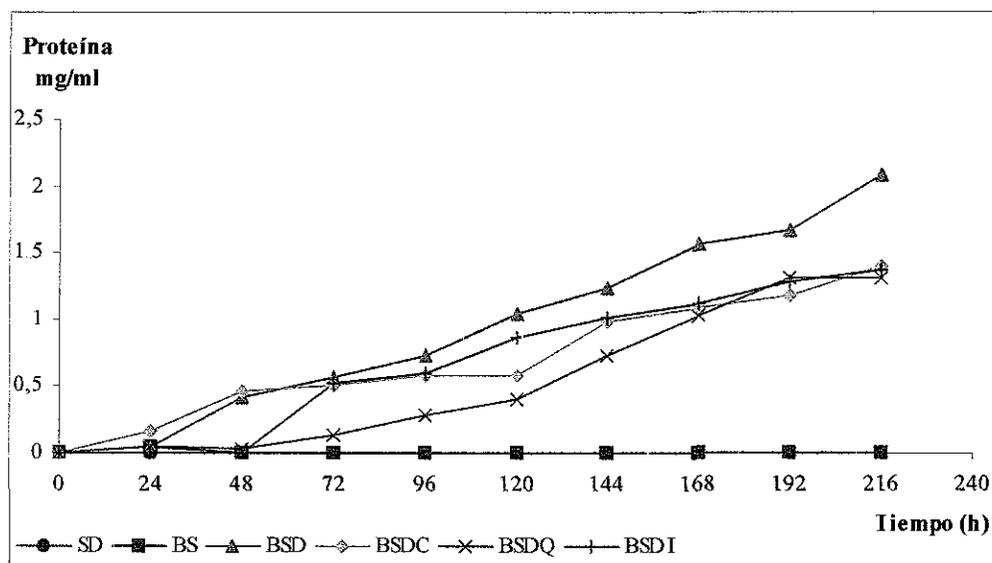


Figura VII-9 Comparación de las curvas de crecimiento en presencia de alcaloides.

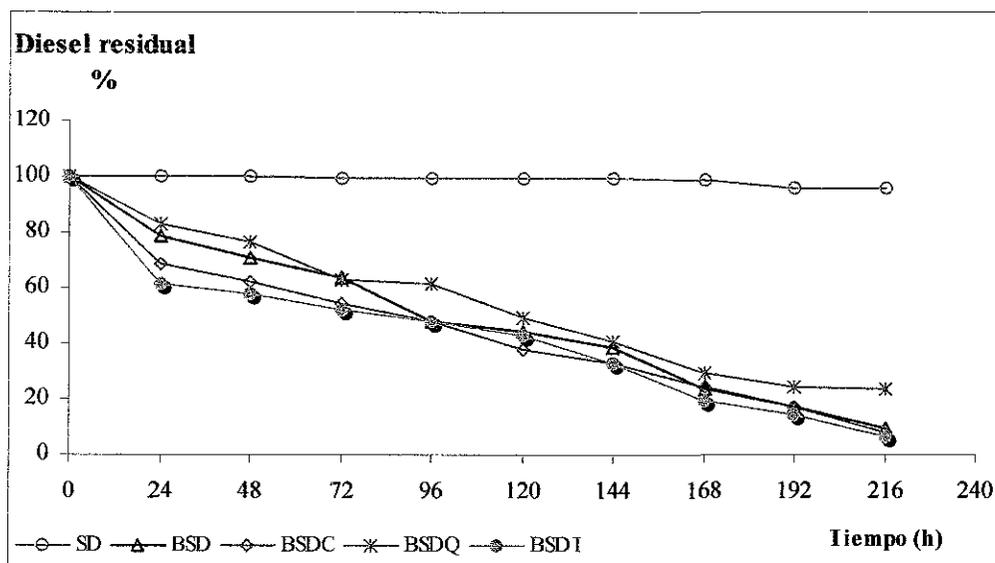


Figura VII-10 Comparación de las curvas de degradación porcentual de diesel industrial en presencia de alcaloides.

En la figura VII-11, se presentan las curvas semilog de los cultivos con los alcaloides y del cultivo control. Con estas curvas se pretende observar en primer lugar la existencia de una fase exponencial y en segundo una fase lag, ya que a pesar de que el inóculo proviene de un cultivo con diesel industrial a la misma concentración (8300 mg/L), la presencia del surfactante y de los alcaloides ocasiona una modificación en la composición del medio. Incluso, a pesar de estar adaptado al diesel, el crecimiento podría presentar una fase lag debido a la compleja composición del combustible

El diesel es una mezcla, de por lo menos 250 compuestos químicamente diferentes, por lo cual se asume un sistema multisubstrato, lo cual se refleja en las gráficas semilog, principalmente en la gráfica c de la figura VII-11, donde se observa que cada curva está conformada de diferentes pendientes que corresponden a la utilización de los diferentes hidrocarburos que van

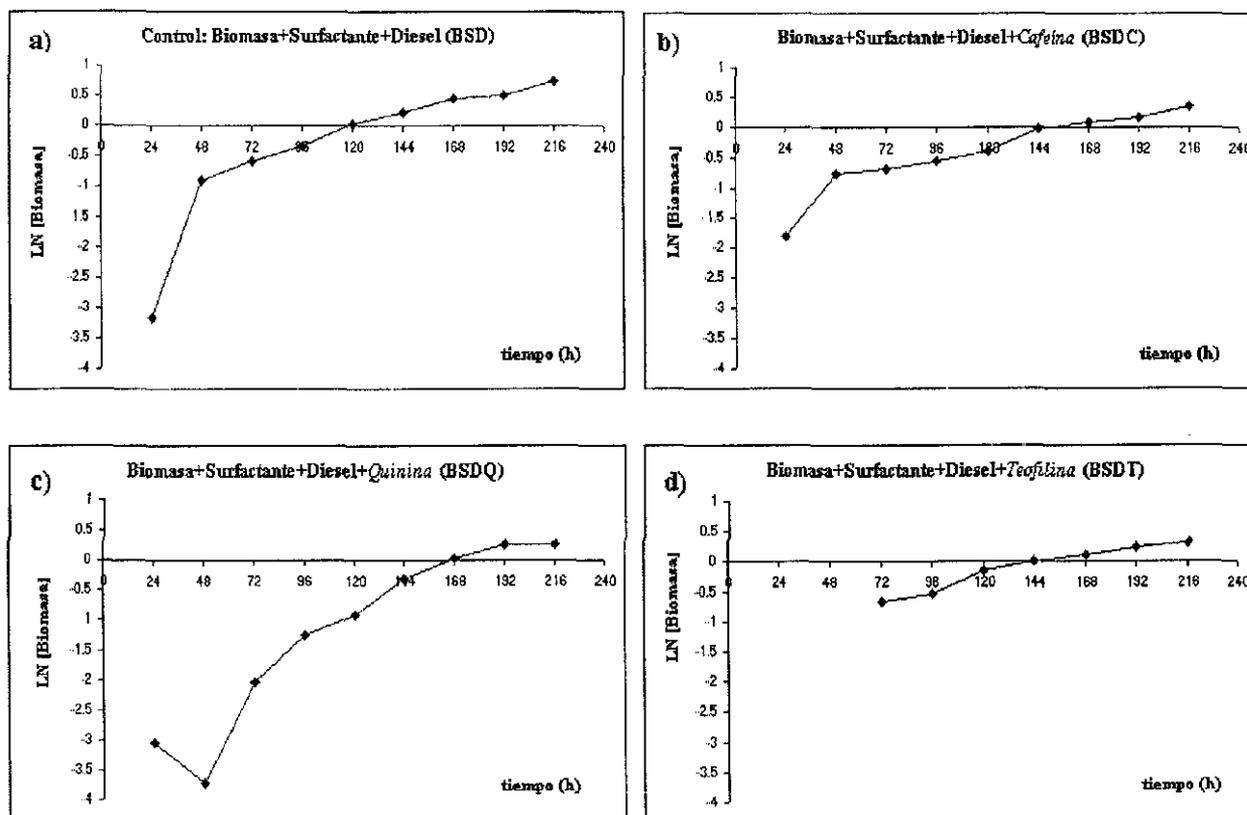


Figura VII-11 Curvas semilog de crecimiento en presencia de alcaloides

siendo utilizados como substrato poco a poco sin que necesariamente se terminen los anteriores. Lo cierto es que no se hizo evidente la presencia franca de una fase lag, que se esperaba alrededor

de las primeras 24 horas, probablemente esto no se visualiza porque no se obtuvieron muestras intermedias.

Por otro lado, en el intervalo de las 24 a las 48 horas (figura VII-11 (a y b)) en los cultivos control BSD y adicionado de cafeína, BSDC, se observa claramente la presencia de una fase exponencial, intervalo de tiempo en el cual se presentó el mayor incremento en la producción de biomasa.

En el caso del cultivo con cafeína, el perfil de la curva es menos pronunciado, se visualizan menos pendientes, probablemente indicando que la mayoría de los hidrocarburos se consumen casi a la misma velocidad, y lo que llama la atención es que el comportamiento de la curva es muy similar a la del cultivo con teofilina, lo que hasta cierto punto indicaría que estos alcaloides tienen un efecto sobre el crecimiento y la degradación del diesel muy similar por tratarse de compuestos químicamente muy semejantes que es de esperarse ya que ambos compuestos difieren químicamente sólo en la posición de un grupo metilo, pero diferencia que biológicamente es muy importante, porque ambas poseen efectos farmacológicos diferentes en células animales.

Se realizó el cálculo de la velocidad específica de crecimiento (μ) en las curvas semilogarítmicas, pero en este caso particular, el hecho de tener un sistema multisustrato se refiere como velocidad aparente (μ_{ap}) Mediante el método de la pendiente máxima ($\mu_{ap\ máx}$), dado que se realizó el muestreo cada 24 horas y no se tuvieron puntos suficientes para hacer un seguimiento más cercano de la curva. El cálculo de $\mu_{ap\ máx}$ se hizo calculando la pendiente a partir de las gráficas semilogarítmicas en cada intervalo de tiempo, porque al tratarse de un sistema multisustrato no se tuvieron más de dos puntos que fuesen lineales.

Los resultados de la $\mu_{ap\ máx}$ se presentan en la tabla VII 7, y se observa que sí hay un efecto en la velocidad de crecimiento debida a la presencia de los alcaloides. Con el control es con el cual se da la mayor velocidad del crecimiento al inicio siendo este valor de $0.09\ h^{-1}$, a pesar de que como se observa en la figura VII-9, es con cafeína con quien se tiene la mayor concentración de proteína a las 24 h (anexo 6). Las velocidades de crecimiento entre cafeína y teofilina no son significativamente diferentes, su comportamiento es muy similar, además de ser menores a las obtenidas con el alcaloide quinina lo que significa que con los alcaloides cafeína y teofilina se obtiene menor biomasa por unidad de tiempo, indicando que hay menor síntesis celular.

En presencia de quinina, se tiene que la velocidad aumenta para luego en el siguiente intervalo de tiempo disminuir y nuevamente aumentar, indicando el uso de grupos de hidrocarburos químicamente más relacionados, es decir, utiliza un grupo específico hasta casi consumirlo y luego inicia con otro grupo, de aquí el cambio en la velocidad de crecimiento. Este efecto no es evidente si comparamos la gráfica semilog de quinina de la figura VII-11 (c) con su perfil cromatográfico en la figura VII-13 (i→l) debido a la complejidad química del combustible.

Con teofilina es con la cual se obtuvieron las velocidades de crecimiento menores, que podrían indicar que la teofilina hace que los hidrocarburos presentes en el diesel sean metabolizados con menor rapidez, lo cual indica que la energía obtenida de la oxidación de los hidrocarburos del diesel no se está aprovechando en la formación de material celular, entonces el metabolismo celular se encuentra favorecido hacia el catabolismo y no al anabolismo.

Si esto es cierto, vendría a demostrar que el diesel es utilizado primordialmente como fuente de energía.

Tabla VII.7 Velocidad específica de crecimiento aparente máxima
 $\mu_{ap\ máx} (h^{-1})$

Intervalo (h)	BSD	BSDC	BSDQ	BSDT
24-48	0.0950	0.0440	-0.0284	-
48-72	0.0131	0.0031	0.0694	-
72-96	0.0105	0.0057	0.0328	0.0057
96-120	0.0149	0.0071	0.0140	0.0156
120-144	0.0073	0.0153	0.0252	0.0071
144-168	0.0100	0.0042	0.0140	0.0041
168-192	0.0027	0.0033	0.0101	0.0054
192-216	0.0091	0.0071	0.0000	0.0031

En general, los datos de tiempo de replicación celular presentados en la tabla VII 8 indican que conforme transcurre el tiempo, los microorganismos tardan más tiempo en replicarse, lo que es un indicio de que se está alcanzando la fase estacionaria porque se está agotando la fuente de carbono, además de que podrían quedar en el medio los hidrocarburos recalcitrantes o a la falta de oxígeno, como se discutirá más adelante.

Tabla VII.8 Tiempo de replicación celular (h)

Intervalo (h)	BSD	BSDC	BSDQ	BSDT
24-48	7.29	15.74	-24.43	-
48-72	53.10	223.52	9.98	-
72-96	66.13	121.99	21.12	120.75
96-120	46.60	97.52	49.62	44.31
120-144	95.00	45.32	27.46	97.37
144-168	69.10	166.88	49.43	169.59
168-192	263.58	213.14	68.00	128.28
192-216	76.43	97.73	-	223.90

Respecto al rendimiento celular referido al diesel consumido, Y_x , el mayor rendimiento fue para el control sin alcaloide (BSD), en cambio, en presencia de cualquiera de los alcaloides, el rendimiento fue menor en un 50% para cafeína y teofilina y en un 40% para quinina (tabla VII.9).

Tabla VII.9 Rendimiento celular Y_x en función del diesel consumido

	Control BSD	Cafeína BSDC	Quinina BSDQ	Teofilina BSDT
Biomasa mg/L	2077.87	1395.05	1310.48	1374.85
Diesel consumido mg/L	2742.88	3854.89	2791.99	3594.10
Y_x	0.758	0.362	0.469	0.383

No obstante la ausencia de literatura del efecto de los alcaloides sobre el crecimiento microbiano, existe una teoría descrita por Alexander^[4] en donde describe la existencia de la degradación de un determinado compuesto por parte de un microorganismo sin que se vea un aumento en la cantidad de biomasa, pero aún no se conocen las causas que ocasionan este fenómeno. En este estudio, en el que el crecimiento en presencia de cualquiera de los alcaloides fue menor comparado con el del control, indica que los microorganismos utilizaron al diesel como fuente de energía y en menor proporción para el crecimiento. Este fenómeno de biodegradación no totalmente ligado al crecimiento podría estar involucrado y explicarse a través

del efecto que presentan la cafeína y la teofilina, de inhibir a la fosfodiesterasa actuando de forma sinérgica con las hormonas para el caso de mamíferos y seres humanos que utilizan AMP cíclico (AMPc)^[47]

La fosfodiesterasa es la enzima responsable de degradar AMPc, y este mensajero químico presente también en procariontes, tiene un efecto clave sobre la regulación de las actividades metabólicas celulares. El AMPc promueve reacciones en cascada, que favorecen la activación de fosforilasas, y condiciones fosforilantes en la célula promueven el catabolismo. Consecuentemente, si las xantinas inhiben las fosfodiesterasas, no hay degradación de AMPc y las fosforilasas permanecerán activas, prevaleciendo condiciones catabólicas en la célula, bajo las cuales la fuente de carbono es utilizada primordialmente como fuente de energía. El anabolismo, por su parte se encuentra disminuído, hecho que explicaría el menor crecimiento en las muestras con cafeína y teofilina, no obstante de haber consumo del diesel, porque la transcripción se realiza aun en presencia de AMPc. Lamentablemente, no pudieron realizarse experimentos para demostrar un aumento en los niveles de AMPc, que sería lo ideal para apoyar esta hipótesis.

Por otro lado, la presencia de AMPc podría también activar algunas enzimas involucradas en la degradación del diesel. En eucariotes el AMPc desencadena una serie de reacciones que finaliza en la activación de una fosforilasa, la cual activa a una lipasa que degrada a los ácidos grasos para ser metabolizados por β -oxidación. Los ácidos grasos son alcanos y alquenos no muy diferentes en cuanto a estructura química de los hidrocarburos lineales presentes en el diesel^[47,83]. Para el caso específico de la aplicación en campo en procesos de biorremediación, resultaría muy atractivo alcanzar la mayor degradación de diesel en el menor tiempo posible y con la menor producción de biomasa. Por ejemplo, en el tratamiento de aguas residuales, un problema es la gran producción de biomasa que conforma lodos residuales, lo que genera gastos en el manejo y disposición de los mismos.

Los perfiles cromatográficos de la figura VII-13 corroboran los datos de degradación ya discutidos. En general, se observa disminución del área total, degradando indistintamente todos los constituyentes del diesel detectados por este método cromatográfico. No se observa aparición de los productos metabólicos resultantes de la degradación del diesel, lo cual podría deberse a que las condiciones propias del método cromatográfico no son las adecuadas para la detección de este tipo de compuestos.

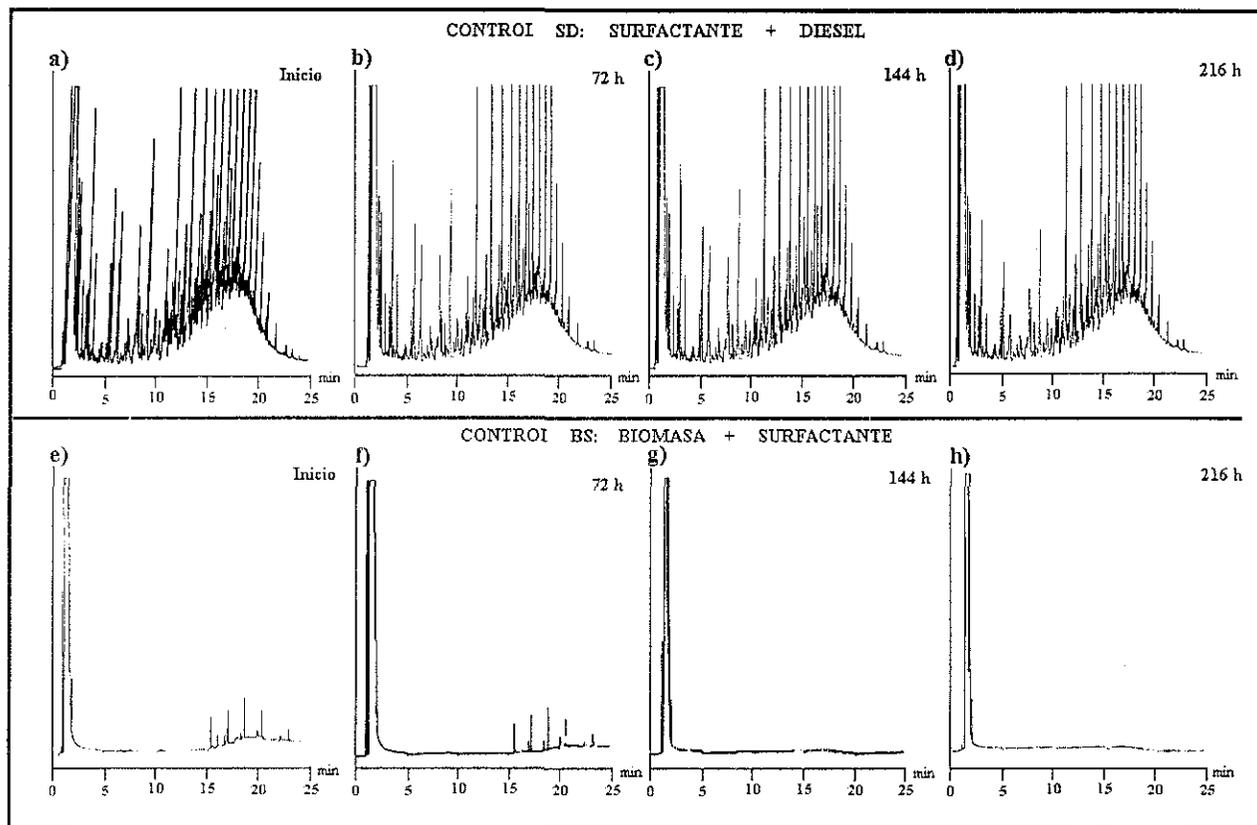


Figura VII-12 Perfiles cromatográficos de diesel en los controles SD y BS.

Los perfiles cromatográficos de los cultivos con cafeína y teofilina son muy semejantes entre sí, no se observa una preferencia particular por algún grupo de hidrocarburos; en la tasa de consumo del diesel no hay diferencias significativas, siendo para cafeína del 92.3% y para teofilina del 93.3% con respecto al control, lo que demuestra de otra forma el efecto que tienen las xantinas al promover la biodegradación de combustibles no completamente ligada al crecimiento.

Para el caso de quinina, en el perfil cromatográfico, se aprecia que la desaparición de picos es más selectiva, prefiriendo a aquellos que se encuentran en el área del diesel, en el intervalo de 12 a 22 minutos del tiempo de retención (figura VII-13 (i-l)), ya que se compara visualmente la altura de los picos entre 5 y 10 minutos, al final del tiempo han disminuido muy poco, inclusive, hay un pico aproximadamente a los 3 minutos que incrementa su altura, lo cual podría indicar la presencia de algún producto del desdoblamiento con similar tiempo de retención al que se detecta y que está contribuyendo al área de ese pico.

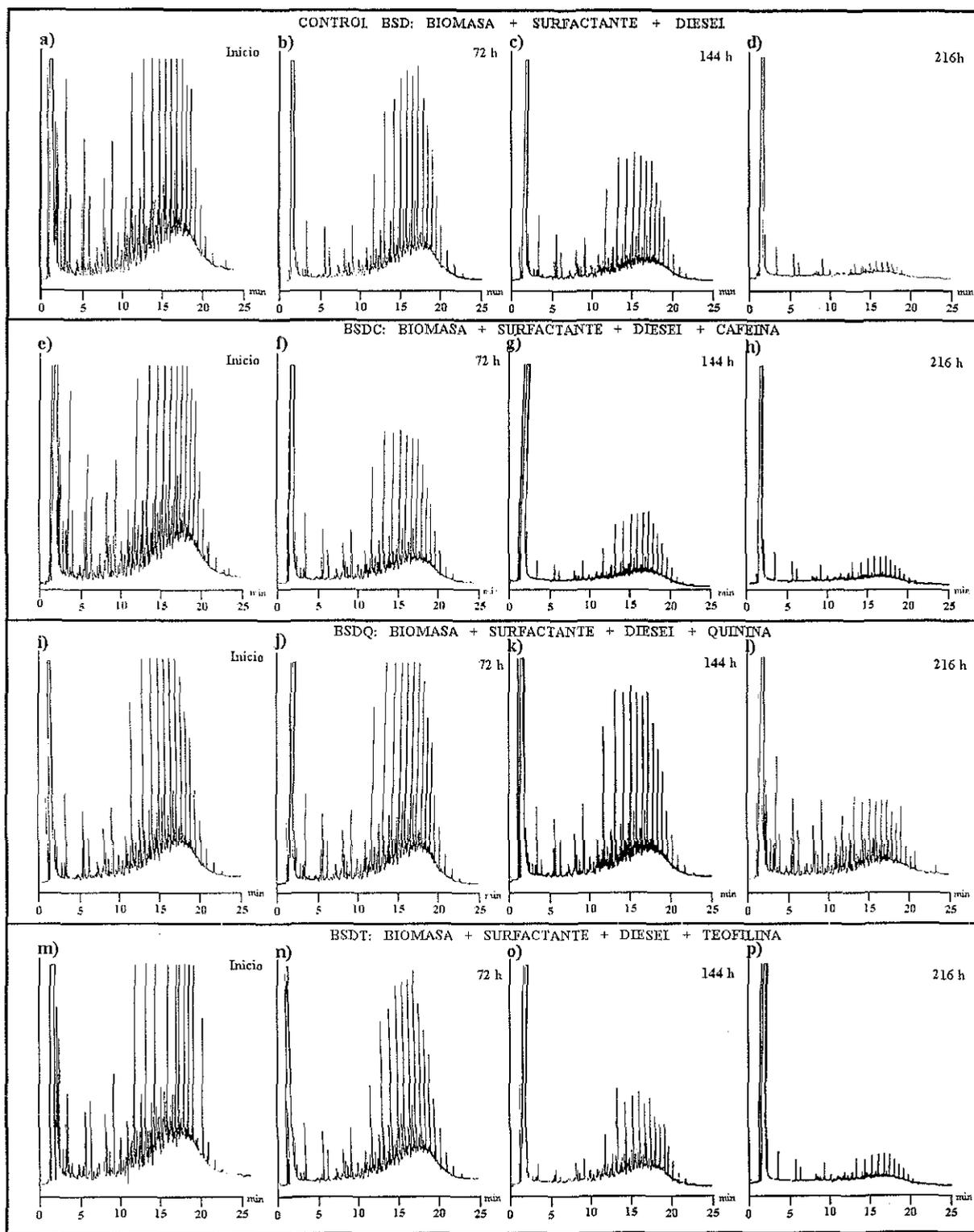


Figura VII-13 Perfiles cromatográficos de diesel en el control sin alcaloide (BSD) y en los cultivos con cafeína (BSDC), quinina (BSDQ) y teofilina (BSDT).

Para el caso específico de este trabajo, el pH sirvió como una forma indirecta de la evolución de los cultivos. El análisis estadístico indicó que sólo existen diferencias significativas de los alcaloides respecto al control, es decir, la adición de cualquiera de los alcaloides influye en el pH, lo que podría explicarse también por la naturaleza básica de dichos compuestos. En todos los casos el pH mostró una ligera tendencia a la disminución (anexo 6), encontrándose de 7 a 6, valores que son muy cercanos a la neutralidad. Como en cualquier cultivo, esta disminución en el pH podría deberse al resultado de la actividad microbiana en la que se generan ácidos orgánicos como intermediarios del metabolismo de los hidrocarburos.

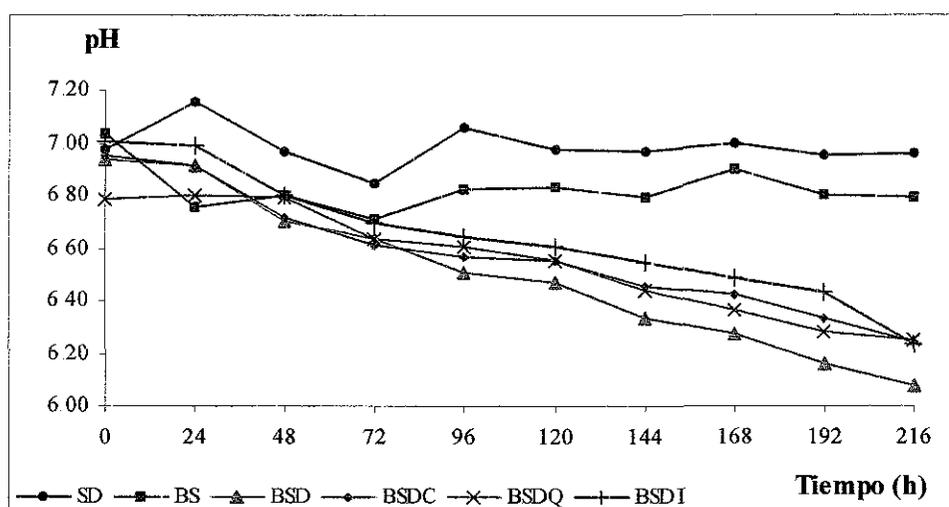


Figura VII-14 Evolución del pH en los controles y en los cultivos con alcaloides

En el caso del control SD, la variación en el pH fue casi imperceptible (figura VII-14), de sólo 0.07 unidades de pH, lo cual era de esperarse, porque este control no fue inoculado. En cambio, para el control BS que sí contenía microorganismos, se presentó crecimiento debido a una pequeña concentración de diesel residual de sólo 104.2 mg/l, pero suficiente para soportar el crecimiento por un breve tiempo, de al menos 24 horas, pero que fue suficiente para hacer perceptible la actividad metabólica y ponerlo de manifiesto con la disminución del pH en 0.25 unidades.

Para el control sin alcaloide BSD, se presentó la mayor disminución del pH, de 0.86 unidades, que era de esperarse por tratarse del cultivo que presentó mayor índice de crecimiento y de degradación.

El perfil en la disminución del pH en el cultivo BSDC manifestó una tendencia muy parecida al cultivo BSDI con 0.7 y 0.75 unidades de pH, respectivamente, sólo un 18% por debajo del control sin alcaloide BSD. Esto indica que hay consumo del diesel con menor biomasa (proceso más eficiente), dando como ventaja adicional, una biodegradación sin cambios bruscos en el pH, que a menudo es un factor crítico en el tratamiento de suelos y acuíferos, debido a que las actividades enzimáticas, así como la movilización y forma iónica de muchos compuestos depende del pH^[51]

Por otra parte, el oxígeno es una variable limitante cuando se trabaja en sistemas cerrados, puesto que el intercambio de gases con la atmósfera es nulo y siendo la solubilidad del oxígeno baja en agua (9.0 mg/l a 20°C a 1 atm) este es rápidamente consumido por el metabolismo microbiano, ya que el primer paso en la biodegradación aerobia de compuestos aromáticos es la hidroxilación, catalizada por oxigenasas dependientes de oxígeno^[79] El sistema de mesocosmos empleado que permanecía herméticamente cerrado (como ya se demostró), aunado al hecho de que el medio de cultivo, aunque posee una concentración de saturación de oxígeno y que contenía un surfactante, pudieron haber limitado la disponibilidad de oxígeno en los cultivos.

Se hizo una aproximación teórica de la concentración de oxígeno presente en el espacio vacío (*head space*), además de calcular la concentración de saturación de oxígeno en el medio de cultivo, a pesar de no tener forma de medir la interferencia del diesel y el surfactante sobre la solubilidad del oxígeno. Se obtuvo un volumen de "*head space*" del mesocosmos equivalente a 0.454 L de aire, y usando la ecuación de los gases ideales y la ley de las presiones parciales de Dalton (Anexo 8) a la presión atmosférica de Ciudad de México (0.77 atm), se obtuvo una concentración de oxígeno de 210 mg/L en el *head space*, y una concentración de saturación de oxígeno en el medio de cultivo de 6.71 mg/L. Por lo tanto, a pesar de que la difusión del oxígeno del aire al medio de cultivo es muy lenta, las 24 horas previas de agitación, así como el intercambio gaseoso permitido cada vez que se tomaba una muestra, permitió por un lado, mantener constante el volumen de oxígeno en la cama de aire y por el otro, dada la velocidad de agitación, permitir la concentración de oxígeno adecuada para los microorganismos.

Para averiguar si la concentración teórica de oxígeno era la suficiente para degradar el combustible, o mejor dicho, si el oxígeno fue limitante, se llevó a cabo mediante el cálculo de reactivo limitante (Anexo 9), aquí el problema era seleccionar alguna especie que fuera representativa de los más de 250 compuestos que posee el diesel. Para esto, se tomaron los datos

que se reportaron en los antecedentes en la página 22 y para los cálculos reales en los reportados en la página 69. Con éstos datos, se calculó el reactivo limitante optando por el naftaleno; tiene 10 átomos de carbono y cae dentro de los límites de compuestos carbonados del diesel (compuestos entre 10 y 20 átomos de carbono); es representativo de los compuestos aromáticos y de los naftalenos, y por lo consiguiente se consideró como compuesto representativo del 83.7% de los componentes del diesel.

Con éste dato y con la concentración del oxígeno en agua, se encontró que efectivamente el oxígeno es el reactivo limitante. Para transformar el total de diesel agregado (4.98g) considerando que todo el diesel es completamente mineralizado a CO_2 , y que mezclando los 4.98g de naftaleno con los 4.026×10^{-3} g de oxígeno, sólo dan origen a 4.614×10^{-3} g de CO_2 . Con los datos reales del diesel, considerando que sólo hay 16.76% de compuestos aromáticos, se requieren de 2.54 g de oxígeno para oxidarlos hasta a CO_2 .

También se realizaron los cálculos para saber cuánto oxígeno era requerido para oxidar los grupos químicos constituyentes del combustible empleado en este estudio. Suponiendo que todo el oxígeno contenido en la cama de aire era transferido y disuelto en el medio de cultivo, se obtuvo una cantidad de oxígeno disponible de 0.13 g. Para realizar el cálculo se buscaron compuestos C10 representativos de los grupos aromáticos (naftaleno), parafinas (decano) y olefinas (decaeno), obteniendo 2.4 g, 13.4 g y 0.2 g consecutivamente y que obviamente son cantidades mayores a las de oxígeno teóricamente disponible.

Realmente no ocurre una mineralización completa del combustible, porque parte del diesel se emplea como biomasa, parte se pierde como calor y muy específicamente, gran parte de él, como debió ocurrir en este caso se transformó a compuestos intermediarios que no fueron detectados por el método de extracción y detección cromatográfica. Esto se deduce porque si bien el reactivo limitante es el oxígeno, se permitía el recambio cada 24 horas, y puesto que hubo degradación, el hidrocarburo que no fue convertido a CO_2 y que como hay relativamente baja producción de biomasa y que no fue eliminado por pérdida abiótica puesto que el sistema era hermético, tuvo que ser transformado a algún otro compuesto. No se conocen los datos de transferencia de oxígeno, así que no se puede asegurar que la cinética se llevó a cabo en condiciones anaerobias, sino más bien bajo condiciones microaerofílicas. Un proceso fermentativo está descartado, porque el pH se mantuvo dentro de los límites de neutralidad. Por otro lado se identificó al género *Pseudomonas* presente en el inóculo y estas bacterias son facultativas y no fermentativas.

Siendo *Pseudomonas* facultativa, puede emplear otros compuestos inorgánicos como aceptores finales de electrones y continuar su metabolismo aunque con menor rendimiento. En el tratamiento de aguas en la primera parte se hace un tratamiento anaerobio porque hay menor formación de “lodos” (biomasa), aquí podría pasar esto y enmascarar el efecto de los alcaloides, sin embargo, se demostró que sí hay diferencias significativas entre el control y los tratamientos y a pesar de estarse llevando parte de la cinética en condiciones microaerofílicas, si hay un efecto de los alcaloides. En este punto cabe mencionar que existe un trabajo de Jim A. Field y Francisco Cervantes, que utilizan quinonas en la biorremediación, porque éstos compuestos son utilizados como aceptores de electrones para la respiración. La quinina es el alcaloide que después del control tuvo las mejores velocidades de crecimiento y podría ser por el argumento anterior, es decir, hay mayor producción de biomasa y menores tiempos de replicación celular porque se está empleando este alcaloide como aceptor de electrones.

La limitante de oxígeno también vendría a explicar el porqué existen velocidades de crecimiento y por consiguiente tiempos de duplicación tan grandes. Si no existiera limitante de oxígeno, dichos tiempos podrían reducirse drásticamente, pero el efecto del alcaloide sobre el metabolismo estaría presente.

Por último, se determinó la variabilidad del experimento, expresada como el coeficiente de variación porcentual (CV). Dado que cada unidad experimental llevó 3 controles se pudo calcular el coeficiente de variación porcentual en cada tiempo. En general, el experimento presentó una variabilidad entre el 5.7-7.9%, en sistemas biológicos se admite hasta un 10% de variabilidad y en trabajos de campo de hasta el 60% de variabilidad. El experimento se mantuvo por debajo del límite (ver anexo 6). En forma individual, existieron puntos que se salieron del límite del 10%, sobre todo en la determinación de la proteína celular, pero que con el promedio se corrigen, por ejemplo, en el caso del control BSD en crecimiento a las 48 y 168 horas llega a una variación del 11.95% o cafeína (BSDC) a las 24 h con un 17.36% pero el más evidente fue el control BS a las 24 h con un 61.7%, esto indica que a pesar de que la técnica de cuantificación está validada, el método de recuperación de la biomasa (centrifugación), introduce errores que afectan la recuperación total del *pellet* de biomasa. Por otro lado, en el caso de la muestra BS a las 24 horas, es el punto donde se detectó crecimiento de biomasa aún en ausencia del combustible, debido a la presencia de trazas de combustible provenientes del inóculo y que no se pudo controlar al no haberse lavado éste, puede explicar la existencia de este coeficiente tan alto. En conclusión, la determinación de la variabilidad porcentual confirma que los resultados obtenidos son confiables.

VIII. CONCLUSIONES

VII CONCLUSIÓN

1. El estudio demostró que el cultivo inicial aislado del suelo contaminado con diesel posee los microorganismos con las capacidades metabólicas necesarias para degradar diesel industrial que además es una mezcla con gasolina
2. La comunidad microbiana responsable de la degradación de diesel industrial está constituida por *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Se logró enriquecer la comunidad microbiana a concentraciones elevadas de diesel industrial [8300 mg/L] y por las características químicas del combustible utilizado, también en presencia de gasolina (23%).
4. El sistema de mesocosmos empleado demostró ser eficiente para los fines perseguidos en este trabajo. Demostró ser hermético ya que sólo hubo una pérdida promedio de hidrocarburos volátiles del 4.2% al final del experimento.
5. La adición del agente tensoactivo facilitó la degradación del combustible al hacerlo más disponible. También se observó que la microflora no utiliza al agente tensoactivo como fuente de carbono
6. Se determinó que el oxígeno es limitante en el sistema estudiado, siendo una variable constante en todos los sistemas.
7. Del análisis de resultados se obtuvo que los alcaloides ejercen un efecto sobre el crecimiento y la degradación en presencia de diesel. No incrementan la velocidad de crecimiento como se postuló en la hipótesis, lo cual se vio influenciado fuertemente por trabajar en condiciones microaerófilas
8. Se obtuvo un rendimiento del control sin alcaloide 50-52% mayor a las muestras con cafeína y teofilina, lo que indica que los alcaloides no estimulan el crecimiento, sin embargo, se llegó a tener un porcentaje de diesel consumido de alrededor del 2.3 al 2.8% mayor para los alcaloides.

9. El porcentaje de degradación fue del 93.29% para teofilina contra un 92.33% del control sin alcaloide, siendo un poco mayor para el caso de teofilina, pero con este alcaloide resulta ser más eficiente la degradación, ya que con menor biomasa se degrada más diesel.
10. Con el alcaloide quinina se obtuvo un crecimiento del 66%, alrededor del 1% menor a los otros dos alcaloides. También obtuvo el menor rendimiento (40%), lo que indica que la quinina también estimula una biodegradación no ligada al crecimiento, pero lo realiza en un mayor tiempo.
11. Los perfiles de disminución de pH, se mantuvieron en un intervalo de 7 a 6 unidades de pH, manteniéndose en todo el estudio. Para las muestras con alcaloide estuvieron sólo un 18% por debajo del control sin alcaloide.
12. La producción de una concentración relativamente baja de biomasa en presencia de los alcaloides con una comparable degradación del diesel frente al control (BSD), indica la utilización del diesel como fuente de energía y no como fuente de carbono (proceso más eficiente). Tal hecho sería una alternativa de tratamiento en aquellos sitios donde la alta concentración de biomasa podría ser un problema, como por ejemplo en el tratamiento de aguas residuales.
13. El alcaloide escogido bajo estas circunstancias sería la cafeína o teofilina, dado que ambos ejercen el mismo efecto para el caso específico de este trabajo, que es una estimulación de la degradación del diesel no ligada completamente al crecimiento.

RECOMENDACIÓN

RECOMENDACIÓN

Para complementar éste estudio, faltaron realizar varios experimentos que demuestren la hipótesis planteada sobre el posible factor de activación del AMPc al metabolismo celular que podría estar mediado por la acción de los alcaloides, sobre todo de la teofilina. Tales estudios podrían incluir la medición de ATP o de AMPc y ver si aumentan bajo estas condiciones. Existen en el mercado *kits* que permiten medir la concentración de ATP, que para este caso en particular sería la producida en función del tiempo.

También podrían realizarse otros tipos de estudios que pudieran responder preguntas tales como si el alcaloide está penetrando a la célula o se queda afuera interaccionando con alguna proteína membranal.

Podrían usarse anticuerpos marcados (radioactivamente o con compuestos fluorescentes), para medir la concentración del alcaloide en el sobrenadante del medio de cultivo, y/o apoyarse con la medición del alcaloide por métodos cromatográficos (cromatografía de gases ó HPLC). Esto mismo puede realizarse con los lisados celulares y saber si el alcaloide penetró a la célula y en qué concentración se encuentra, además esto daría un indicio si el alcaloide se está metabolizando, o si tal vez se está uniéndolo a moléculas intracelulares o inclusive interacciona con el ADN.

Existe otra alternativa, si el alcaloide no penetró en la célula y está desapareciendo del medio de cultivo, esto indicaría o que se metaboliza rápidamente o que se está uniendo a moléculas membranales. Un estudio de *BINDING* empleando nuevamente anticuerpo marcados contra los alcaloides, podrían despejar la incógnita.

Otro tipo de estudios que sería conveniente realizar sería tomando como base el interés inicial de su aplicación en campo, específicamente con la estimulación de la teofilina o cafeína en suelo.

El empleo de los alcaloides en forma pura, para casos específicos de tecnologías de biorremediación quedaría descartada, dado el alto costo (de 17 a 34 dls/100g^[3]). Además de que

se trata de substancias controladas por la Secretaría de Salud, requieren de un permiso especial para su importación.

Para fines prácticos se deberán de emplear fuentes vegetales que contengan al alcaloide bajo estudio, como por ejemplo, los desechos agrícolas del cacao que contiene teofilina (0.55%) o del café que contiene cafeína (0.75-1.5%), que resultarían una fuente económica y muy viable para poder ser aplicados ya en campo, que tendrían la particularidad de ser una fuente de nutrientes y estimulación económica con la ventaja de no ser tóxicos.

Antes de aplicarse el residuo agrícola (cacao o café) se deberán llevar a cabo pruebas de biotratabilidad, primero a nivel de mesocosmos en el laboratorio para estudiar el comportamiento de diferentes proporciones y definir la más adecuada antes de realizar pruebas de demostración en campo. Se tendría que verificar también si la flora microbiana autóctona presente en el desecho agrícola no afecta la capacidad degradadora del consorcio presente en el suelo contaminado.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Adachi O., Kazuyuki O., Kazunobu M., Emiko S., and Minoru A., 1990, "An ideal basal medium for assaying growth stimulating activity of pirroloquinoline quinone with *Acetobacter aceti* IFO3284", *Agric. Biol. Chem.*, **54**(10):2751-2752.
2. Adriaens P., 1990, "Continuos coculture degradation of selected polichlorinated biphenyl congener by *Acinetobacter spp* In aerobic reactor system", *Environ. Science Technol.*, **24**(7):1042-1049.
3. Aldrich, 200-2001, "Handbook of fine chemical and laboratory equipment", USA, 2061 pp.
4. Alexander M., 1994, "Biodegradation and Bioremediation", Academic Press, San Diego, Cal.
5. Ameyama M., Masaharu H., Kazunobu M., Emiko S. and Osao A., 1984, "Microbial production of pirroloquinoline quinone", *Agr. Biol. Chem.*, **48**(2):561-565.
6. Ameyama M., Emiko S., Kazunobu M. and Osao A., 1984, "Growth stimulation of microorganisms by pyrroloquinoline quinone", *Agr. Biol. Chem.*, **48**(11):2909-2911.
7. Ameyama M., Emiko S., Kazunobu M. and Osao A., 1985, "Growth stimulating activity for microorganisms in naturally occurring substances and partial rharacterization of the rubstance for the rctivity as ryrroloquinoline ruinone", *Agric Biol. Chem.*, **49**(3): 699-709.
8. Ameyama M., Emiko S., Kazunobu M. and Osao A., 1985, "How many times should the inoculum cells be rinsed before inoculation in the assay for growth stimulating activity of pyrroloquinoline quinone?", *Agric. Biol. Chem.*, **49**(3):853-854.
9. Atlas Mundial del Medio Ambiente. "Preservación de la naturaleza", 1997, Cultural S A., Barcelona, Esp.
10. Autenrieth W. and William H. W., 1928, "Laboratory Manual for the Detection of Poisons and Powerful Drugs", Philadelphia, P. Blakiston's son & CO.
11. Bee-Hwan and Koo C., 1987, "Dissolution theophylline from sustained-release dosage forms and correlation with saliva bioavalability of theophylline controlled release formulations", *J. Pharm. Sci.*, **76**(10): 784-787.

12. Best, D.J., 1985, "The Environment and Biotechnology", Blackwell Scientific Publications, Oxford.
13. Blanchard J., 1990, "A rapid and specific high-performance liquid chromatographic assay for theophylline in biological fluids", *J. Chrom. Sci.*, **28**(6):303-306.
14. Bogan R.H ; Sawyer C.N., 1956, "Biochemical degradation of synthetic detergents", *Sewage and Industrial Wastes*, **28**(5): 637-648.
15. Bowman W., and Rand M., 1984, "Farmacología. bases bioquímicas y patológicas" 2ª ed , Interamericana, México.
16. Bradley, P.M., 1994,"Microbial transformation of nitroaromatics in surface soils", *Appl Environ Microbiol* , **60**(6):2170-2175
17. Brock Thomas D , Smith D. W , Madigan M. T , 1987, "Microbiología", 4ª ed , Prentice-Hall Hispanoamericana S A , México
18. Brubaker G R., Jurgen H. E , 1988, "Bioremediation of chemical spill", en Omen G. S , "Environmental biotechnology", Plenum Press, New York, p 163-171.
19. Bruell C. J., Marley Michael, Hopkins Harley M., 1997, "American Petroleum Institute in situ air sparging database", *J. Soil Contamination*, **6**(2):169-185.
20. Capone D G., Bauer J.E., 1992 "Microbial processes in coastal pollution", en Mitchell, Ralph, "Environmental Microbiology", John Wiley-Liss, John Wiley & Sons. Inc. Publication, New York.
21. Carlucci A F , Shimp S., and Craven D.B., 1986, "Growth characteristics of low-nutrient bacteria from the North-East and Central Pacific Ocean", *FEMS Microb. Ecol* , **38**(1):1-10
22. Chaudhry G.R.; Chapalamadugu S ., 1991, "Biodegradation of halogenated organic compound", *Microbiol. Rev* , **55**(1):59-79
23. Cork D. J., James P. K., 1991, "Microbial transformation of herbicides and pesticides", *Adv Apl Microbiol* , **36**:1-65.
24. Dagley Stanley, 1987, "Lesson from biodegradation", *Ann. Rev. Microbiol* , **47**:1-23.
25. Diccionario Enciclopédico Salvat, 1976, Salvat Editores, Barcelona.
26. Durand G , 1965, "The enzymatic degradation of urea in the presence of bentonite", *Ann. Inst Pasteur, Paris*, **107**(Suppl.3):121-132.

27. Elks J and Ganellin C., 1990, "Dictionary of drugs", First edition, Chapman and Hall, USA, 1179-1180.
28. Esteban L., 1993, "La espectrometría de masas en imágenes", en *Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas*, España, 147 p.
29. Evans W.Ch., "Anaerobic degradation of aromatic compounds", *Ann Rev Microbiol.*, 42:289-317.
30. *Farmacology Terapeutic*, 1991, Churchill-Livingstone, Britanic. II.
31. Field J.A.,(et al), 1999, "Role of quinones in the biodegradation of priority pollutants: A review", 413-420
32. Filip Z., 1973, "Clay minerals as a factor influencing the biochemical activity of soil microorganisms", *Folia Microbiol. (Pranha)*, 18(1):56-74
33. Florey K., 1975, "Analytical profiles of drug substances", Academic Press Inc., IV:468-493
34. Fortin, J, Jury W., and Anderson M.A., 1997, "Enhanced removal of trapped non-aqueous phase liquids from saturated soil using surfactants solutions", *J. Contaminated Hydrology*, 2483-49:247-267.
35. Greer Environmental Services, Inc., 1999, "E-Bac™ 2000 is a Microbial Consortium", Mississippi.
36. Harvey S., Elashvili I., Valdes J.J., Kamely D., Chakrabarty A.M., 1990, "Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaska gravel by a microbial surfactant", *Bio/Technology*, 8(3):228-230.
37. Información de Medicamentos, 1989, Tomo II., Ministerio de sanidad y consumo, España.
38. Jawetz, Melnick aldelberg, 1999, "Microbiología médica", 16ª ed, Edt. El manual moderno, México.
39. Jin G.; Englande A.J. Jr., 1997, "Biodegradation kinetics of carbon tetrachloride by *Pseudomonas capacia* under varying oxidation-reduction potential conditions", *Water Environ. Res.*, 69(6):1094-1099
40. Katur H., 1973, in "The microbiol degradation of oil pollutants", en (D.G. Ahearn and S.P. Meyers, eds), Louisiana State University Center for Wetland Resources, Boston Rouge, 47-65.

- 41 Kertesz M A, Koelbener P., Stockinger H., Beil S., Cook A.M., 1994, "Desulfonation of linear alkylbenzenesulfonate surfactants and related compounds by bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**(7):2296-2303.
42. Kosaric N., 1993, "Biosurfactants", **48**, Marcel Dekker, Inc., New York.
- 43 Langbehn A, Steinhart H, 1995, "Biodegradation studies of hydrocarbons in soils by analyzing metabolites", *Chemosphere*, **30**(5):855-68.
44. Leakey T., 1974, "Simultaneous analysis of theophylline, caffeine and eight of their metabolic products in human plasma by gradient high-performance liquid chromatography", *J Chromatography*, (507):199-220
45. Ley General de Salud, 1994, Edt SISTA (<http://www.sista.com.mx>).
46. Lim D , 1998. "Microbiology", 2^a ed , Boston, McGraw-Hill, 720pp
- 47 Lodish Harvey; 1995, "Molecular Cell Biology", 3^a ed , Scientific American Books, New York, 1344 pp
- 48 Madse E. L , 1992, "Bioremediation of environmental pollutants", *Cornell Engineering*, **26**(4):7-11.
49. Maki H, Masuda N; Fujiwara Y, Ike M, Fujita M., 1994, "Microbial Degradation of Alkylphenol by Pseudomonas so Strain IRO1", *Appl Environ Microbiol.*, **60**(7):2265-2271.
50. Margesin R, Schinner F , 1998, "Low-temperature bioremediation as a waste water contaminated with anionic surfactants and fuel oil", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**(4):482-486
51. Margesin, R., Schinner F., 1998, "Biodegradation of the anionic surfactant sodium dodecyl sulfate at low temperatures", *International Biodeterioration & Biodegradation*, **41**(2):139-143.
- 52 Margesin, R., Schinner F, 1999, "Biodegradation of diesel oil by cold-adapted microorganisms in presence of sodium dodecyl sulfate", *Chemosphere*, **38**(15):3463-3472.
53. Mateos R. C , Schwarts R. y Sánchez S., 1983, "Bioquímica de los antibióticos", *BEB*, Marzo, **II**(1):3-8.
- 54 Miyabara Y , Takano H., Ichinose T , Lim H-B , Sagai M., 1998, "Diesel exhaust enhanced allergic airway inflammation and hyper responsiveness", *Am J. Respir Crit Care Med* , Apr, **157**(4):1138-1144.

55. Mazzafera P, Olsson O, Sandberg G, 1996, "Degradation of caffeine and related methylxanthines by *Serratia marcescens* isolated from soil under coffee cultivation", *Microb Ecol*, **31**(2):199-207.
56. McKinney R E, Symons J M., 1992, "Bacterial degradation of ABS", *Sewage and Industrial Wastes*, **31**:549-556
57. Mikhlin D E, Radina V P., Konovalov S.A., Vorotilo S P., Sarishvili N.G., Reitblat B.B., Perfil'ev G.D, Gudkov S.A. and Gudkov A V , 1985, "Stimulation of the growth of yeast and lactic acid bacteria by hydrolysates of *Candida guilliermondii* and *Saccharomyces vini* cells", *Appl Biochem Microbiol*, **20**(4):402-413
58. Morris, O N., Trottier M, McLaughlin N.B., and Converse V , 1994, "Interaction of caffeine and related compounds with *Bacillus thuringiensis* spp. Kurstaki in bertha army worm (Lepidoptera Nuctuidae)", *Journal of Economic Entomology*, **87**(3):610-617
59. Morrison, T R , and Boyd N. R., 1987, "Química orgánica" en Compuestos Heterocíclicos, 2ª ed., SITESA, México, 1277 pp.
60. Mulkins-Phillips, G.J. and Stewart J.E., 1974, "Effect of four dispersants on biodegradation and growth of bacteria on crude oil", *Appl Microbiol*, **28**(4):547-552.
61. Müller-Hurting, R., 1993, "Biosurfactants for environmental control", en Kosarick, Naim, "Biosurfactants Production Properties Applications", Marcel Dekker, Inc , New York.
62. Muscat, J E , Winder E.L , 1995, "Diesel exhaust, diesel fumes, and laryngeal cancer", *Otolaryngol Head Neck Surg*, **112**(3):437-440
63. Nelson, J.E; (et al), 1960, "The Biodegradability of Alkilbenzen Sulfonates", *Devs. Ind Microbiol.*, **2**:92-101.
64. Oberbremer A , Müller-Hurting R., and Wagber F , 1990, "Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor", *Appl Microbiol. Biotechnol.*, **32**:485-489.
65. Paasivirta Jakko, 1991, "Chemical ecotoxicology", Lewis Publishers, New York.
66. Pelczar M J. Jr., 1993, "Microbiology concept and aplicatios", MacGraw-Hill, Neew York, 826 pp.

-
- 67 Pehler M.F., 1996, "Enhanced biodegradation of diesel fuel through the addition of particulate organic carbon and inorganic nutrients in coastal marine water", *Biodegradation*, Jun, 7(3):239-47.
68. Rao G S., Khanna K L., Cornish H.H., 1972, "Mass spectrometric identification of methylxanthines and methyluric acids, the possible metabolites of caffeine", *J. Pharm Sci*, 61(11):1822-1825.
- 69 Reineke W., 1988, "Microbial degradation of haloaromatics", *Ann. Rev Microbiol.*, 42:263-287.
70. Rheinheimer G., 1987, "Microbiología de las aguas", Acribia, España.
- 71 Ridgway H.F., J. Safarik D. Phipps, P Carl and D. Clark, 1990, "Identification and catabolic activity of well-derived gasoline degrading bacteria from a contaminated aquifer", *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(11):3565-3575.
72. Riser E., 1992, "Bioremediation of petroleum contaminated sites", C K. Smoley, USA
- 73 Rittmann, B.E. and Johnson N.M., 1989, *Water Sci. Technol.*, 21(4/5): 209-219.
74. Romero, Arce Hilda Monica, 2000, Tesis "Estudios de biodegradación de diesel en columnas experimentales empacadas con suelo", UANL, Nuevo León.
75. Ruiz, S., 1994, "Monitoreo de teofilina en pacientes hospitalizados con problemas pulmonares", tesis UNAM, Fac Química.
76. Saval, B. S., 1998, "Biorremediación: Alternativa para la limpieza de suelos y acuíferos contaminados con hidrocarburos", *Ingeniería y Ciencias Ambientales*, Ene-Feb, (34):6-9
77. Schlegel R. L., 1975, "Microbiología general", Omega, Barcelona.
- 78 Sepic E., Trier C., Leskovsek H., 1996, "Biodegradation studies of selected hydrocarbons from diesel oil", *Analyst*, 121(10):1451-1456
- 79 Shigeaki, H., and Rekik M., 1989, "Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families", *J Biological Chemistry*, 264(26):15328-15333
- 80 Sips, A.P. and Edelbroek R.M., 1984, "Food does not effect bioavailability of theophylline from theolin retard", *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 26(3):405-407.
- 81 Soulas G., Codaccioni P., and Fournier J.C., 1983, *Chemosphere*, 12:1101-1106

-
82. Subba-Rao J, Geevan C.P., Subba Rao G., 1982, "Significance of the information content of DNA in mutations and evolution", *J Theor Biol.*, **96**(4):571-577.
83. Stryer, Lubert, 1990, "Bioquímica", 3ª ed., (T 1 y 2) Reverté, Barcelona.
84. Thomas, D., Georgiou G., 1991, "Bioremediation of biphenol by suspended and immobilized cultures of the white rot fungus *Phanerochaete crysosporium*", *J. Hazardous Mater.*, **28**(1-2):194-195
85. Tiehm, A., Stieber M., Werner P., and Frimmel F. H., 1997, "Surfactant-enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil", *Environ. Sci Technol.*, **31**(9):2570-2576.
86. Timson J., "Caffeine", 1977, *Mutat Res*, **47**(1):1-52
87. Tortora J. G., 1992, "Microbiology, and Introduction", 4ª ed., The Benjamin Cummings Publishing Company Inc., California
88. U.S. Department of the interior Minerals Management Service Gulf of Mexico OCS Region, January, 1999, "Assessment of PAH Composition of Diesel Fuel Absorbed to Marine Sediments and their Toxicity to Aquatic Food Webs", OCS Reports MMN 98-0057, en <http://www.mms.gov/>.
89. Wistreich G. A., Lechman M. D., 1990, "Microbiology", 3ª ed., Macmillan Publishing Co., Inc., New York.
90. Wink M; Schmeller T; Latz-Bruening B., 1998, "Modes of actions of allelochemical alkaloids: interaction with neuroreceptor, DNA, and other molecular targets", *J. Chem Ecol.*, Nov., **24**(11):112-121
91. Zhao Q.Y., Piot J.M., Gautier V., Cottenceau G., 1996, "Isolation and characterization of a bacterial growth-stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate", *Appl. Microbiol Biotechnol.*, **45**(6):778-784.
92. Zinsser, 1992, "Microbiología", 20ª ed., Edt. Panamericana, México
93. Consulta en línea:
- ChemFinder. <http://www.chemfinder.com/>
- Rx—The Internet Drug Index. <http://www.rxlist.com/>
- Wheless' Textbook of Orthopaedics. <http://medmedia.com/>

Med Chem ClogP Values for some Drugs <http://clogp.pomona.edu/medchem/chem/>

Jinno Laboratory Home Page <http://chrom.tutms.tut.ac.jp/>

Hiperreal Drug Archive. <http://www.erowid.org/>

Phys Nitriton Encyclopedia http://www.phys.com/b_nutrition

Spectrum Laboratories, Inc <http://www.speclab.com>

The dextromethorfan FAQ. <http://www.frognet.net/dxm/appendices.html>

Network Science. <http://www.netsci.org/Science/Special/feature11.html>

Petróleos Mexicanos <http://www.pemex.gob.mx>

NTP Chemical Health and Safety Data. <http://ntp-server.niehs.nih.gov/>

Environmental Science Center database with Experimental Log P coefficients, etc.,
<http://esc.syries.com/>

Papel del hierro en la biodegradación de hidrocarburos de combustibles. Department of Defense, Nov. 1997, en http://es.epa.gov/ncerqa_abstracts/sbir/other/rem/geophex.html

Chlorinated solvent and petroleum biodegradation: stimulation with triethylphosphate. Oak Ridge Centers for Manufacturing Technology, 1996, en

ANEXOS

sanofi~synthelabo

CAFEINA FEUM (GRANU:

11450400

CERTIFICADO DE ANA

No. DE REVISION: MP065-1

REEMPLAZA A: MP065 -00

FECHA DE EMISION: ENERO 2000

Elaboró:

Martha Ruiz
 MARTHA RUIZ 19/1/2000
 Químico de Documentación

Verificó:

R. Romero
 R. Romero 19/1/2000
 Jefe de Documentación Técnica

Autorizó:

Vicente Alonso Pérez
 19/1/2000
 Jefe de Garantía de Calidad
 M. en C. Vicente Alonso Pérez

No. de Entrada: 00954X Fecha de Muestreo: 29.09.00
 Recibido en Laboratorio: 29.09.00 Muestreado por: M. Velasco
 Lote de Proveedor: 95320 Cantidad Total: 1x50.0Kg
 No. de Contenedores: 1 No. de Aprobación: 00954X
 Proveedor: Basf Mexicana S.A.

Referencia de Análisis: Monografía de Análisis Sanofi Synthelabo de México S A de C V Enero 2000 MP065-00

ANALISIS		ESPECIFICACIONES	RESULTADO
Descripción *		Polvo blanco granula libre de materia extraña	Cumple
Solubilidad		Fácilmente soluble en cloroformo; poco soluble en agua y en etanol al 95 % v/v; ligeramente soluble en éter dietílico.	Cumple
Identificación *	A) I R	El espectro de una dispersión de la muestra en Bromuro de potasio exhibe máximos a las mismas longitudes de onda que la sustancia de referencia.	Cumple
Temperatura de fusión		235 ~ 237.5 °C	237.3 °C
Residuo de ignición		Máximo 0.1 %	0.0099 %
Pérdida por secado *		Máximo 0.5 %	0.1473 %
Acidez o alcalinidad		Máximo 0.1 ml de NaOH 0.02 M se requieren para cambiar el color de la solución a azul.	0.05 ml
Cloruros		Máximo 150 ppm	<150 ppm
Sulfatos		Máximo 500 ppm	<500 ppm

Hoja 1 de 3 correspondiente al registro de análisis de la cafeína

nofi~synthelabo

Página 2 de 2

CAFEINA FEUM (GRANULAR)
11450400

CERTIFICADO DE ANALISIS

No. DE REVISION: MP065-01
REEMPLAZA A: MP065-00
FECHA DE EMISION: ENERO 2000

ANALISIS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Color	Máximo 3 ppm	< 3 ppm
	Máximo 10 ppm	< 10 ppm
Impurezas pesadas	Máximo 20 ppm	< 20 ppm
Reacciona fácilmente con álcalizables	El color de la solución no es más intenso que el color de la solución colorimétrica IV	Cumple
Retención de partículas	Malla 20	0 - 30 % Retenido
	Malla 40	5 - 46 % Retenido
	Malla 60	0 - 100 % Retenido
	Malla 80	0 - 12 % Retenido
	Base	0 - 50 % Retenido
Densidad aparente	Método A	0.486 - 0.771 g/cm ³
	Método B	
Reacciona con álcaloides	No se forma precipitado	Cumple
Peso seco *	98.5 - 101.0 % (Base seca)	99.41% B.S

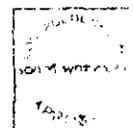
Observaciones: Debido a su carácter granular, este material financiero Ambar *[Signature]* 31/1/2000.
* Pruebas a efectuar al reanálisis, 24 meses después de su aprobación.
y tener este lote de 15 kilos.

ELABORADO POR: L. Rojas FECHA DE INICIO: 02-10-00 FECHA FINAL: 03-10-00

CERTIFICADO POR: [Signature] FECHA: 03-10-00 DISPOSICION

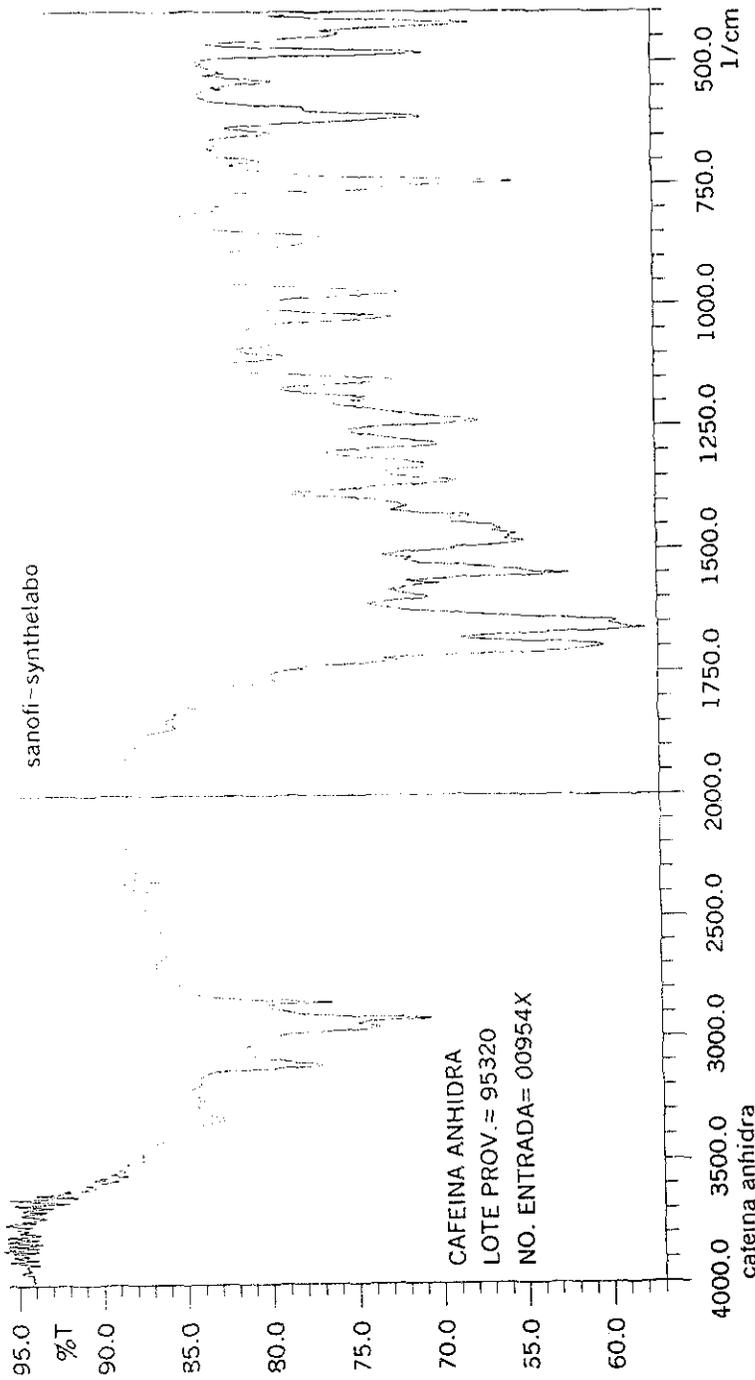
MICRO RESPONSABLE ANTE LA SSA: [Signature] 04-10-00

VERIFICADO POR: [Signature]
AUX. RESF. S.S.A. No. 2885E



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Hoja de registro 2 de 3 de análisis de la cafeína



.IRS: cafeina anhidra
Date: 10/02/2000
Type: HYPER IR
Abscissa: 1/cm
Min: 400.20
Ndp: 3733
Gain: auto

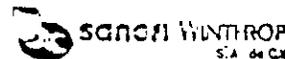
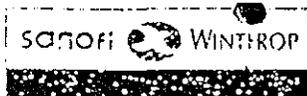
Time: 14:38:45
User: sanofi-synthelabo
Ordinate: %T
Max: 3999.12
Data interval: 0.96434
Aperture: auto

NScans: 36
Detector: Happ
Apodization: 1/cm
Range: 2.0
Resolution: 2.0
Mirror Speed: 2.8(low)

standard

Hoja de registro 3 de 3 del análisis infrarrojo de la cafeína.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



DEPARTAMENTO DE CALIDAD

Página 1 de 2

REPORTE ANALÍTICO / MATERIA PRIMA

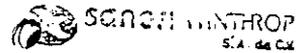
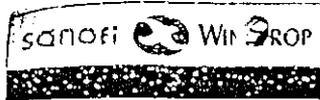
Elaborado por: ASEGURAMIENTO DE CALIDAD Fecha: DICIEMBRE, 1992
 Autorización de Calidad: [Signature] Autorización Serv. Téc. 24-774-53
 Nombre: FOSFATO DE CLOROQUINA No. Control: 61008
 Recibido en Control: 250996 No. Entrada: — No. Proveedor: 53961195
 Cantidad: — Muestreado por: — Fecha: —
 Proveedor: Alkaloido Chem Co No. IBM: 12750600 (MEX) 05073 (N.Y)

REFERENCIA DE ANÁLISIS: Monografía: Abril, 1992. Reemplaza: Marzo 1991

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
DESCRIPCIÓN *	Polvo blanco cristalino.	Cumple
OLOR *	Inodoro.	Cumple
SOLUBILIDAD	Libremente soluble en agua; prácticamente insoluble en alcohol, cloroformo y en éter.	Cumple
IDENTIFICACIÓN		
A. BASES ORGÁNICAS NITROGENADAS	La muestra exhibe un máximo a la misma longitud de onda que el estándar de referencia.	Cumple
B U.V.	La muestra exhibe un máximo y un mínimo a las mismas longitudes de onda que el estándar. La relación A 343/ A 329 esta entre 1.00 y 1.15.	Cumple
IMPUREZAS VOLÁTILES ORGÁNICAS +	De acuerdo a los requerimientos de la USP.	*
PERDIDA AL SECADO	No más de 2.0%	1.5311%

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hoja 1 de 3 del reporte analítico correspondiente a la quinina analizada como materia prima



DEPARTAMENTO DE CALIDAD

Página 2 de 2

REPORTE ANALÍTICO / MATERIA PRIMA

Autorización de Calidad: [Signature] Autorización Serv. Téc. 24774-193
 Nombre: FOSFATO DE CLOROQUINA No. Control: 6'0008

REFERENCIA DE ANÁLISIS: Monografía: Abril, 1992. Reemplaza: Marzo, 1991.

ENSAYOS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
SUSTANCIAS RELACIONADAS *	El Rf de la mancha secundaria obtenida de la solución A no es mayor que la solución B. No más que una mancha es más intensa que la mancha obtenida con la solución C. Determinar para información solo la suma de las manchas obtenidas de todas las manchas.	Cumple
RANGO DE FUSIÓN **	No más de 205°C	178.9°C
ENSAYO	98.0 - 102.0% (Base seca).	101.66 % B.S.
DENSIDAD DE GRANEL	Informativo.	Dens. verdadera: 0.6015 Dens. compactada: 0.8113
ANÁLISIS DE MALLAS MALLA 20	Informativo.	0.0%
MALLA 40	Informativo.	0.0%
MALLA 60	Informativo.	1.2%
MALLA 80	Informativo.	8.4%
MALLA 100	Informativo.	8.8%
CHAROLA	Informativo.	80.8%

REPANM53

OBSERVACIONES: * Pruebas a efectuar al reanálisis, a los 12 meses después del mes de haber sido aprobado el lote. ** Esta prueba se realiza para determinar el punto de fusión bajo de la forma polifórmica, por el calorímetro de escala diferencial. Los resultados deben aparecer en el certificado de análisis del proveedor. + Esta prueba no se realiza. No es posible por la presencia de la lista de impurezas establecidas en el certificado de análisis del proveedor.

ANALIZADO POR: A. Ruiz FECHA: 30/09/98 DISPOSICIÓN

VERIFICADO POR: [Signature] FECHA: 30/09/98

AUTORIZACIÓN DE CALIDAD: [Signature] 09/09/98

O.P. MONTAÑES SANCHEZ
 VENEZ
 RIX RESP S.S.A No 28955

O.P. MONTAÑES SANCHEZ
 VENEZ
 RIX RESP S.S.A No 28955



Hoja 2 de 3 del reporte analítico de la quinina analizada como materia prima.



ALKALOIDA

Chemicals company Ltd. Letters: H-4440 Tiszavasvári, P.f.1

Telephone: 36-42-372511 Telefax: 36-42-372512 Telex: 73275

Disp No : 95/0650

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Name of Product : CHLOROQUINE PHOSPHATE
 Quality : Sterling USP
 Batch No : 53961195
 Control No : 95/A 881
 Manufacturing date : 11 95
 Expiry time : The quality of the product is warranted from the time
 of transportation for 11 1998 if it is stored under
 prescribed conditions in unopened original packaging

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tests	Requirements	Results
Description	White, odorless crystalline powder	conforms
Identification IR-Spectrum	to pass tests	conforms
Identification UV spect.A343/A329	1.00 - 1.15	1.08
Identification Melting point	193.0-195.0	194 °C
Loss on drying	Max. 2.0 %	1.0 %
Assay (Alkaloida Method)	98.5 - 101.0 %	99.9 %
Organic volatile impurities	to pass tests	conforms
Sieve test	>850 µm	0.0 %
	425µm - 850µm	0.0 %
	250µm - 425µm	2.0 %
	180µm - 250µm	6.6 %
	150µm - 100µm	7.4 %
	<150µm	84.0 %
Tapped density (1250)		0.789 g/cm ³
Bulk density (50)		0.616 g/cm ³

THE PRODUCT CORRESPONDS TO THE REQUIREMENTS OF Sterling USP

Tiszavasvári 11 12 1995

Mrs Ágnes Csorba
Head of Quality Assurance

Hoja 3 de 3 correspondiente al certificado de análisis de la quinina.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



SIEGFRIED RHEIN, S.A. DE C.V

Calle 2 N° 3

Fracc. Ind. B Juárez.

Querétaro, Qro 7612

Tels (42) 17-00-16, 17-42-10

Fax 17-04-14

LABORATORIO CONTROL DE CALIDAD

CERTIFICADO ANALITICO

MATERIA PRIMA TEOFILINA ANHIDRA	N° LOTE SIEGFRIED MP-000100861	N° ORDEN DE COMPRA OC-111299-425	N° ANALISIS NA-000100861
CANTIDAD 50.0 Kg	FECHA DE CADUCIDAD 12 - MAR - 01	N° LOTE PROVEEDOR 290119	PROVEEDOR ASTROQUIM S.A.

ESPECIFICACIONES	ENCONTRADO	LIMITES	ANALISTA
DESCRIPCION	CUMPLE	POLVO BLANCO CRISTALINO, INODORO, SABOR AMARGO; ESTABLE EL AIRE. LIBRE DE PARTICULAS EXTRAÑAS.	LRA
SOLUBILIDAD	CUMPLE	LIGERAMENTE SOLUBLE EN AGUA FRIA, SOLUBLE EN AGUA HIRVIENDO, LIBREMENTE SOLUBLE EN SOLUCIONES DE HIDROXIDOS Y ALCALIS. MUY POCO SOLUBLE EN ETANOL, CLOROFORMO Y ETER.	LRA
IDENTIFICACION	CUMPLE	3.1 EI ESPECTRO INFRARROJO PRESENTA MAXIMOS Y MINIMOS A LAS MISMAS LONGITUDES DE ONDA QUE EL ESTANDAR PREPARADOS DE MANERA SIMILAR.	LRA
	CUMPLE	3.2 FORMA UN PRECIPITADO BLANCO CRISTALINO CON ACETATO MERCURICO.	
TEMPERATURA DE FUSION	272.13°C	270 -274°C	LRA
ACIDEZ	0.5 mL	MAXIMO 1 mL DE NaOH 0.02 N.	LRA
PERDIDA POR SECADO	0.13 %	MAXIMO 0.5%	LRA
RESIDUO DE IGNICION	0.14 %	MAXIMO 0.15 %	LRA
VALORACION	100.9 %	97.0 - 102.0 % CALCULADO SOBRE SUSTANCIA SECA.	MGM

FECHA DE INICIO: 04 - FEB - 00	ANALIZO: LRA	VERIFICO:
FECHA DE TERMINO: 12 - MAR - 00	QFB LUCIA RODRIGUEZ AGUILAER QUIMICO ANALISTA	IBQ CLAUDIA E VEGA CANO JEFE DE CONTROL DE CALIDAD
DICTAMEN: APROBADO	REFERENCIA: LRA 20 34 MAY 99 / / / / / QA LIB PAG MES AÑO	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA: METODO MP-10171 01

CARPETA: Certificados MP-Teofilina Doc

Hoja 1 de 1 correspondiente al certificado de análisis de la teofilina.

ANEXO 2. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS Y CROMATOGRÁFICOS

La validación de las técnicas para la determinación de proteínas por el método de Löwry y la técnica cromatográfica para la cuantificación de diesel industrial, se realizó de acuerdo a los siguientes parámetros:

Especificidad - Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

Selectividad - Es la habilidad que tiene un método analítico para distinguir o separar la respuesta de la sustancia de interés del resto de los componentes de una muestra.

Linearidad del Sistema - Es la habilidad para asegurar que los resultados analíticos, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado. Este resultado analítico puede ser obtenido directamente o por medio de una transformación matemática.

Se determina construyendo una curva de calibración (Concentración vs Respuesta) utilizando mínimo 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis cuando menos por duplicado para cada dilución. Criterios de aceptación:

Coefficiente de variación porcentual: $CV < 1.5\%$

Coefficiente de correlación: $r > 0.99$

Coefficiente de determinación: $r^2 \geq 0.98$

Ordenada al origen: $b \cong 0$

Pendiente de la recta: $m = \text{sensibilidad del sistema.}$

Actividades: construir una curva de calibración y con estándar externo en el caso del método cromatográfico.

Precisión - Es el grado de concordancia entre una serie de determinaciones obtenidas al repetir el análisis de una muestra homogénea

La precisión se expresa como la desviación estándar relativa o el coeficiente de variación (CV). Incluye las siguientes determinaciones:

- ❖ **Repetibilidad**.- Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, reactivos, laboratorio.)

Se determina mediante el análisis por sextuplicado de una misma solución estándar a la concentración del 100% establecido en la linealidad. Criterio de aceptación:

$$CV \leq 1.5\%$$

- ❖ **Reproducibilidad**.- Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las diferentes condiciones (analista, tiempo, aparato, reactivos, laboratorio.)

Se determina mediante el análisis por triplicado de una muestra homogénea del producto final, valorada por dos analistas y en dos días diferentes, siendo un total de 12 análisis. Criterio de aceptación:

$$CV \leq 2\%$$

Exactitud del Método.- Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el por ciento de recuperación obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Se determina analizando 6 placebos cargados con estándar de la sustancia de interés al 100%. Criterio de aceptación:

$$\% \text{Recuperación: } 98 \text{ a } 102\%$$

$$CV \leq 2\%$$

Donde: $\% \text{ Recuperación} = (\text{Cantidad analizada/Cantidad real}) * 100$

Linealidad del Método - Se determina construyendo una curva de calibración a partir de placebos cargados con diferentes concentraciones de la sustancia de interés a 3 niveles diferentes y por duplicado cada una. Criterios de aceptación:

$\% \text{ Recuperación vs } \% \text{ Adicionado}$

$$m \cong 1 \quad b \cong 0 \quad r^2 \geq 0.98$$

Cálculos para el $\% \text{ Adicionado}$ en el caso de la validación del Método Cromatográfico:

1. La concentración 1(C1)=4949.88, fijarla como el 100%
2. Para las otras concentraciones: $(C2/C1)*100$

Cálculos para el $\% \text{ Recuperación}$:

1. $(\text{Concentración recuperada/Concentración adicionada})/\text{el porcentaje correspondiente}$
Ejemplo:
 - $(4939.7612/4949.88)*100 = 99.80$
 - $(3084.5565/3008.004)*60.77 = 62.32$

Límite de Detección.- Es la concentración mínima de la sustancia de interés que puede ser detectada por el sistema analítico propuesto, pero no necesariamente cuantificada. Criterio de aceptación:

2 veces el nivel del ruido.

Ruido es la variación observada en la señal del detector cuando la muestra no está presente.

Límite de Cuantificación.- Es la concentración mínima de la sustancia de interés que puede ser cuantificada de manera confiable con una precisión y exactitud adecuada. Criterios de aceptación:

Estabilidad de la Muestra.- Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado por el analista bajo condiciones específicas.

Se determina por comparación de los resultados de análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones: Criterios de Aceptación:

- Métodos cromatográficos $I = 100 \pm 2\%$
- Métodos químicos y espectrofotométricos $I = 100 \pm 3\%$.

Donde $I = (\% \text{ Recuperación} / \% \text{ Inicial}) * 100$

Tolerancia.- Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra, cuando es influenciada por condiciones operacionales o ambientales. Tales como analistas, equipos, laboratorios, proveedores, columnas, reactivos.

Robustez.- Es la medida de la capacidad que tiene un sistema analítico de no ser afectado por pequeñas variaciones en los parámetros analíticos. Tales como pH, flujo, proporción de fase, número de platos teóricos.

ANEXO 3. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA DE LÖWRY PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA CELULAR

Se empleó el medio MM2 como disolvente para la curva estándar de albúmina empleando un espectrofotómetro de la marca Hach DR/200 con el cual se validó la técnica de determinación de proteínas por el método de Löwry, midiendo la absorbencia a una longitud de onda de 570 nm y utilizando una celda de vidrio redonda de 1 cm de diámetro.

Se validó el sistema y el método de acuerdo a los parámetros descritos en el Anexo 2.

Preparación de estándares

El estándar de Albúmina se preparó a partir de un liofilizado de la proteína a una concentración de 3.0 mg/ml, a partir de la cual se prepararon las siguientes concentraciones: 2.4 mg/ml, 1.8 mg/ml, 1.2 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.3 mg/ml. El blanco correspondió al medio MM2 sin albúmina. Los estándares empleados en la validación correspondieron a:

- a) Analista 1 (Irma Ruíz Silva) - 3.0 mg/ml
- b) Analista 2 (Magdala M. Juárez Martínez) - 3.0 mg/ml

Datos experimentales

Los resultados de las curvas se muestran en las tablas 3.1 y 3.2. Las curvas se realizaron en dos días diferentes para cumplir con los parámetros propuestos en la validación. Cabe mencionar que las pruebas de estabilidad de la muestra y robustez no se realizaron por no ser determinantes para la validación del método. Las gráficas correspondientes se presentan en la figura 2-1. Las curvas del analista 2 no se presentan en este análisis.

Tabla 2.1

	CURVA 1		CURVA 2		CURVA 3	
	[Albúmina] mg/ml	Absorbencia	[Albúmina] mg/ml	Absorbencia	[Albúmina] mg/ml	Absorbencia
	3.0	0.799	3.0	0.798	3.0	0.799
	2.4	0.639	2.4	0.635	2.4	0.638
	1.8	0.482	1.8	0.484	1.8	0.483
	1.2	0.320	1.2	0.319	1.2	0.318
	0.6	0.155	0.6	0.157	0.6	0.155
	0.3	0.080	0.3	0.081	0.3	0.081
	0.0	0.000	0.0	0.000	0.0	0.000
m	0.2669		0.2659		0.2667	
b	-0.001		0.0001		-0.0009	
r	0.9999		0.9999		0.9999	
r ²	0.9999		0.9999		0.9999	

Figura 2-1

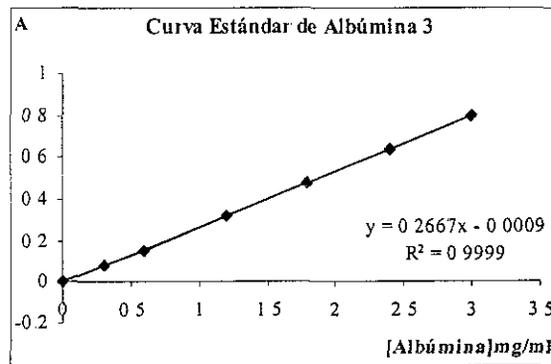
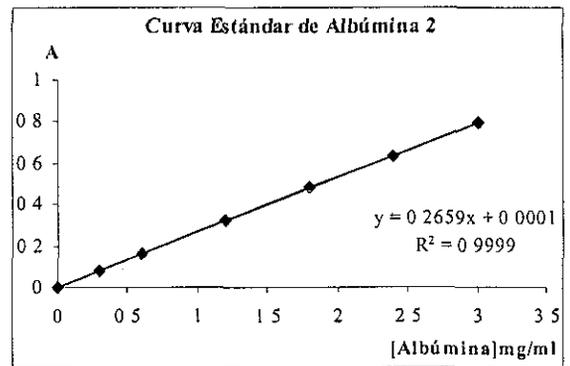
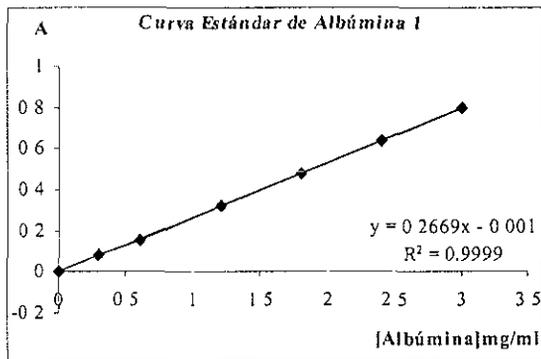


Tabla 2.2

PRIMER DIA										
	Muestra	[Albúmina] mg/ml Real	Absorbencia	Absorbencia Promedio	[Albúmina] mg/ml Teórica	% Recuperación	\bar{X}	DE	CV	
Analista 1	C1 ₍₁₎	3.0	0.799	0.799	2.990	99.67	2.994	0.006	0.189	
	C1 ₍₂₎	3.0	0.798		3.001	100.03				
	C1 ₍₃₎	3.0	0.799		2.993	99.77				
Analista 2	C1 ₍₁₎	3.0	0.799	0.799	3.005	100.17	3.003	0.002	0.072	
	C1 ₍₂₎	3.0	0.799		3.005	100.17				
	C1 ₍₃₎	3.0	0.798		3.001	100.03				
Analista 1	C1 ₍₄₎	3.0	0.798	0.798	2.986	99.53	2.987	0.002	0.072	
	C1 ₍₅₎	3.0	0.799		2.990	99.67				
	C1 ₍₆₎	3.0	0.798		2.986	99.53				
	C2 ₍₁₎	2.4	0.639	0.637	2.390	99.58	2.389	0.001	0.056	
		C2 ₍₂₎	2.4		0.635	2.388				99.50
		C2 ₍₃₎	2.4		0.638	2.389				99.54
	C3 ₍₁₎	1.8	0.482	0.483	1.802	100.11	1.810	0.009	0.500	
		C3 ₍₂₎	1.8		0.484	1.820				101.11
		C3 ₍₃₎	1.8		0.483	1.808				100.44
	C4 ₍₁₎	1.2	0.320	0.319	1.195	99.58	1.195	0.005	0.436	
		C4 ₍₂₎	1.2		0.319	1.199				99.92
		C4 ₍₃₎	1.2		0.318	1.189				99.08
	C5 ₍₁₎	0.6	0.155	0.156	0.577	96.17	0.582	0.007	1.260	
		C5 ₍₂₎	0.6		0.157	0.590				98.33
		C5 ₍₃₎	0.6		0.155	0.578				96.33
C6 ₍₁₎	0.3	0.080	0.081	0.296	98.87	0.300	0.004	1.376		
	C6 ₍₂₎	0.3		0.081	0.304				101.33	
	C6 ₍₃₎	0.3		0.081	0.300				100.00	
SEGUNDO DIA										
Analista 1	C1 ₍₁₎	3.0	0.799	0.799	2.993	99.77	2.991	0.002	0.072	
	C1 ₍₂₎	3.0	0.799		2.993	99.77				
	C1 ₍₃₎	3.0	0.798		2.989	99.63				
Analista 2	C1 ₍₁₎	3.0	0.799	0.798	2.993	99.77	2.989	0.004	0.125	
	C1 ₍₂₎	3.0	0.798		2.989	99.63				
	C1 ₍₃₎	3.0	0.797		2.985	99.50				

 \bar{X} = Media,

DE = Desviación estándar,

CV = Coeficiente de variación (porcentual)

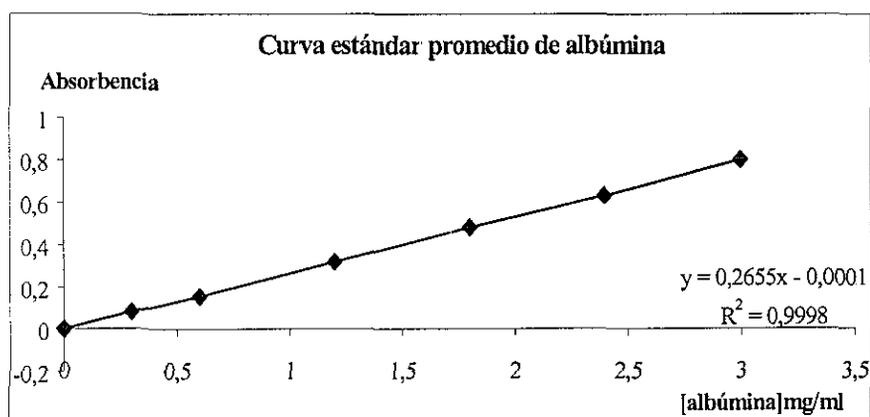
Validación del sistema

1) Linealidad del Sistema

La curva de calibración se construyó a partir de los datos promediados de las 3 curvas elaboradas por el Analista 1.

El valor del CV se calculó a partir del factor de respuesta que se obtienen de dividir y/x (absorbencia/concentración), después, a estos valores se les calculó el promedio y desviación estándar y finalmente CV

[Albúmina]mg/ml	Absorbencia	Factor de respuesta
3.0	0.799	0.266
2.4	0.637	0.265
1.8	0.483	0.268
1.2	0.319	0.266
0.6	0.156	0.260
0.3	0.081	0.270
0.0	0.000	0.000



De acuerdo a los cálculos y a los criterios de aceptación se obtuvo lo siguiente

CRITERIO	TEÓRICO	EXPERIMENTAL	ACEPTACIÓN
CV	< 1.5	1.39	<input checked="" type="checkbox"/>
r	≥ 0.99	0.99	<input checked="" type="checkbox"/>
r ²	≥ 0.98	0.99	<input checked="" type="checkbox"/>
b	≅ 0	-0.0001	<input checked="" type="checkbox"/>
m	Sensibilidad	0.2655	<input checked="" type="checkbox"/>

2) *Precisión del Sistema*

a) Repetibilidad

Se consideró el 100 % a la concentración correspondiente a 3.0 mg/ml

Muestra	[Albúmina]mg/ml Teórica
C1(1)	2.990
C1(2)	3.001
C1(3)	2.993
C1(4)	2.986
C1(5)	2.990
C1(6)	2.986
MEDIA	2.991
DS	0.005
CV	0.181

CRITERIO	TEÓRICO	EXPERIMENTAL	ACEPTACIÓN
CV	≤1.5	0.181	<input checked="" type="checkbox"/>

b) Reproducibilidad

ANALISTA 1		
[STD] 3.0mg/ml	DIA 1	DIA 2
C1 (1)	2.990	2.993
C1 (2)	3.001	2.993
C1 (3)	2.993	2.989
ANALISTA 2		
C1 (1)	3.005	2.993
C1 (2)	3.005	2.989
C1 (3)	3.001	2.985
	MEDIA	2.994
	SD	0.007
	CV	0.219

CRITERIO	TEÓRICO	EXPERIMENTAL	ACEPTACIÓN
CV	≤2.5	0.219	<input checked="" type="checkbox"/>

Validación del método

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

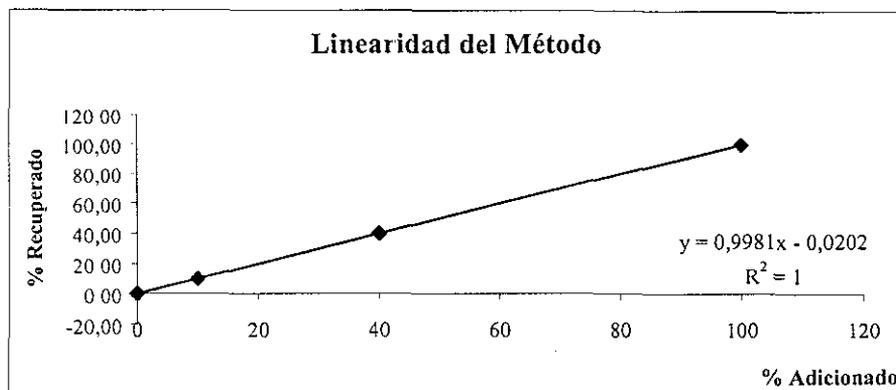
1) Exactitud del Método

Muestra	[Albúmina]mg/ml Real	[Albúmina]mg/ml Teórica	% Recuperación
C1 (1)	3.0	2.990	99.67
C1 (2)	3.0	3.001	100.03
C1 (3)	3.0	2.993	99.77
C1 (4)	3.0	2.986	99.53
C1 (5)	3.0	2.990	99.67
C1 (6)	3.0	2.986	99.53
MEDIA			99.70
SD			0.19
CV			0.19

CRITERIO	TEÓRICO	EXPERIMENTAL	ACEPTACIÓN
CV	≤ 2.0	0.19	<input checked="" type="checkbox"/>
% Recuperación	98 - 102	99.70	<input checked="" type="checkbox"/>

2) Linealidad del Método

Muestra	Cantidad Adicionada	Cantidad Recuperada	% Adicionado	% Recuperación	Promedio % Recuperación
C1 (1)	3.0	2.990	100	99.67	99.82
C1 (2)	3.0	3.001	100	100.03	
C1 (3)	3.0	2.993	100	99.77	
C4 (1)	1.2	1.195	40	39.83	39.81
C4 (2)	1.2	1.199	40	39.97	
C4 (3)	1.2	1.189	40	39.63	
C6 (1)	0.3	0.296	10	9.87	10.00
C6 (2)	0.3	0.304	10	10.13	
C6 (3)	0.3	0.300	10	10.00	
				m	0.9981
				b	-0.0202
				r²	1
				r	1



CRITERIO	TEÓRICO	EXPERIMENTAL	ACEPTACION
m	$\cong 1$	0.9981	<input checked="" type="checkbox"/>
b	$\cong 0$	-0.0202	<input checked="" type="checkbox"/>
r^2	≥ 0.98	1	<input checked="" type="checkbox"/>

Limite de detección

Se determinó de acuerdo a la curva promedio, teniendo que la mínima cantidad detectada corresponde a 0.10 mg/ml

Limite de cuantificación

Se realizaron diferentes concentraciones por debajo de 0.3 mg/ml, se encontró el límite de detección en 0.15 mg/ml.

CONCLUSIÓN

El método se encuentra validado de acuerdo a los criterios de aceptación. El sistema es lineal lo que asegura que los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración del estándar en el intervalo analizado. El sistema es preciso, ya que hay resultados repetibles y son reproducibles bajo analistas y días diferentes. El método también resultó ser exacto y lineal, lo que indica que la concentración de albúmina medida es muy cercana a la detectada en el espectrofotómetro.

ANEXO 4 VALIDACION DEL METODO PARA LA CUANTIFICACION DE DIESEL RESIDUAL POR CROMATOGRAFIA DE GASES

Se empleó Hexano grado HPLC para la curva estándar de diesel empleando un cromatógrafo de gases de la marca *Varian* modelo 3350 con el cual se validó la técnica de determinación de diesel industrial midiendo el área total (AT).

Se validó el sistema y el método evaluando los parámetros descritos en el Anexo 2.

Preparación de estándares

El estándar de combustibles se preparó de acuerdo al método EPA 8015. Se preparó a partir de diesel industrial a una concentración de 4949.88 mg/L a partir de la cual se obtuvieron las siguientes concentraciones 3008.004 mg/L, 1001.3988 mg/L, 498.7956 mg/L, 300.8004 mg/L. El blanco correspondió a hexano sin diesel industrial

Los soluciones *stock* empleadas en la validación correspondieron a:

- a) Analista 1 (Irma Ruiz S).- 38076 mg/L
- b) Analista 2 (Diana García A).- 38808 mg/L

Datos experimentales

Los resultados de las curvas de calibración se presentan en las tablas 4.1 y 4.2. Las curvas se realizaron en dos días diferentes para cumplir con los parámetros propuestos en la validación. Cabe mencionar que las pruebas de estabilidad de la muestra robustez no se realizaron por no considerarse decisivas para este estudio.

Tabla 4.1

	CURVA 1		CURVA 2		CURVA 3	
	[Diesel]mg/L	Área total	[Diesel]mg/L	Área total	[Diesel]mg/L	Área total
	4949.88	7582314	4949.88	7457713	4949.88	7587061
	3008.004	4700439	3008.004	4659638	3008.004	4830930
	1001.3988	1425471	1001.3988	1133814	1001.3988	1358851
	498.7956	694603	498.7956	612209	498.7956	658250
	300.8004	444960	300.8004	333476	300.8004	358578
	0	0	0	0	0	0
m	1547.3		1544.8		1568	
b	-42085		-146517		-84732	
r²	0.9996		0.9974		0.9984	
r	0.9999		0.999		0.999	

Figura 4-1

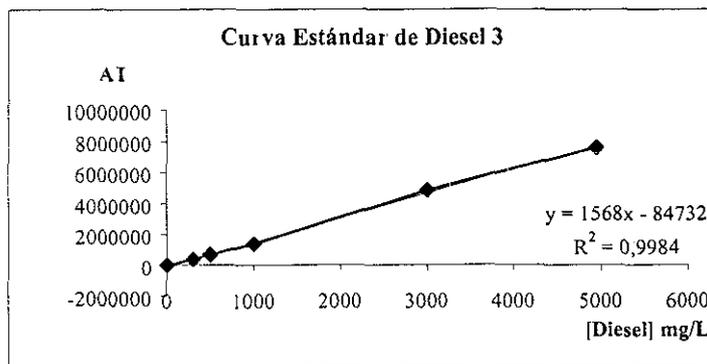
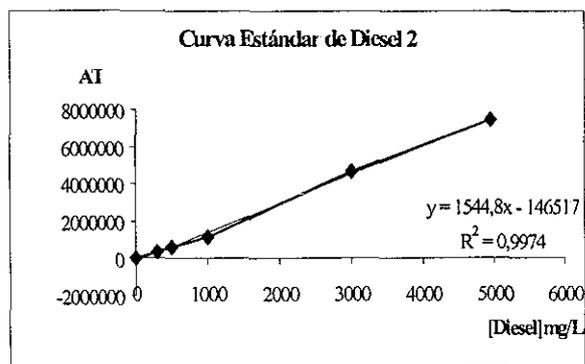
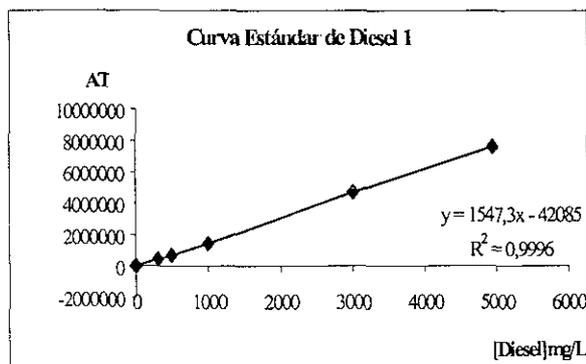


Tabla 4.2

PRIMER DIA									
	Muestra	[Diesel]mg/L Real	Área total	Área total Promedio	[Diesel]mg/L Teórica	% Recuperación	\bar{X}	DE	CV
Analista 1	C1 ₍₁₎	4949 88	7582314	7542362 667	4939 7612	99 80	4914 0425	47 2172	0 96
	C1 ₍₂₎	4949 88	7457713		4859 5494	98 18			
	C1 ₍₃₎	4949 88	7587061		4942.8170	99.83			
Analista 2	C1 ₍₁₎	5000	8012451	8106172 333	5216 6615	104 33	5276 9945	107 5740	2 04
	C1 ₍₂₎	5000	8299103		5401 1935	108 02			
	C1 ₍₃₎	5000	8006963		5213 1286	104 26			
Analista 1	C1 ₍₄₎	4949 88	7576171	7651550	4935 8066	99 72	4984 3318	63 6653	1 28
	C1 ₍₅₎	4949 88	7587212		4942 9143	99 86			
	C1 ₍₆₎	4949 88	7791267		5074.2745	102.51			
	C2 ₍₁₎	3008 004	4700439	4730335 667	3084 5565	102 54	3103 8024	57 5988	1 86
	C2 ₍₂₎	3008 004	4659638		3058 2908	101 67			
	C2 ₍₃₎	3008.004	4830930		3168.5599	105.34			
	C3 ₍₁₎	1001 3988	1425471	1306045 333	976 2984	97 49	899 4183	98 3848	10 94
	C3 ₍₂₎	1001 3988	1133814		788 5445	78 74			
	C3 ₍₃₎	1001.3988	1358851		933.4119	93 21			
	C4 ₍₁₎	498 7956	694603	655020 667	505 8028	101 40	480 3217	26 5816	5 53
	C4 ₍₂₎	498 7956	612209		452 7617	90.77			
	C4 ₍₃₎	498.7956	658250		482.4005	96.71			
	C5 ₍₁₎	300 8004	444960	379004 667	345 0953	114 73	302 6366	37 6475	12 44
	C5 ₍₂₎	300 8004	333476		273 3275	90 87			
	C5 ₍₃₎	300 8004	358578		289 4869	96 24			
SEGUNDO DIA									
Analista 1	C1 ₍₁₎	4949 88	7543088	7584963	4914 5095	99 29	5005 8414	79 3524	1 59
	C1 ₍₂₎	4949 88	7745994		5045 1300	101 92			
	C1 ₍₃₎	4949 88	7765807		5057.8846	102 18			
Analista 2	C1 ₍₁₎	5000	8069451	8137419	5253 3552	105 07	5297 1096	90 5546	1 71
	C1 ₍₂₎	5000	8043 643		5236 7413	104 73			
	C1 ₍₃₎	5000	8299163		5401.2321	108.02			

X = Media,

DE = Desviación estándar,

CV = Coeficiente de variación (porcentual)

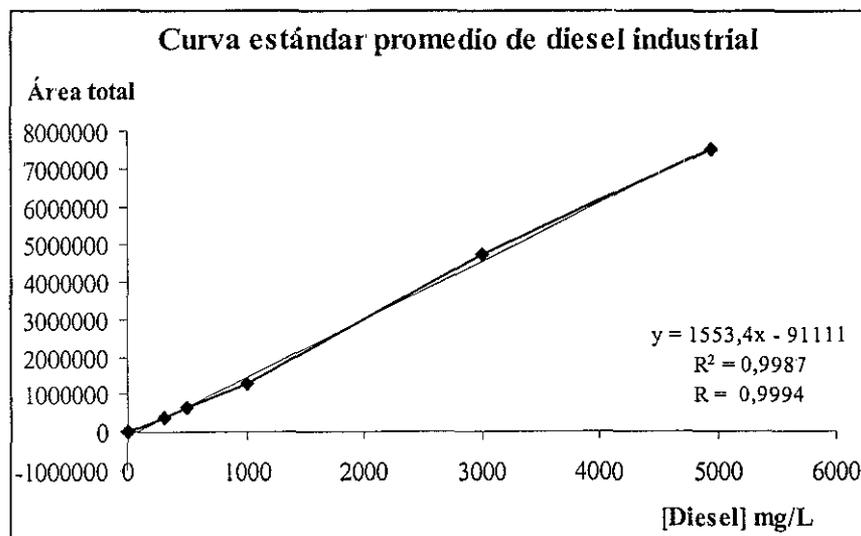
Validación del sistema

1) Linearidad del Sistema

La curva de calibración se construyó a partir de los datos promediados de las 3 curvas elaboradas por el Analista 1.

El valor del CV se calculó a partir del factor de respuesta que se obtienen de dividir y/x (área total / concentración del diesel), después, a estos valores se les calcula el promedio y desviación estándar y finalmente CV. La curva de calibración se construyó por estándar externo:

[Diesel] mg/L	Área total
0	0
300.8004	379004.667
498.7956	655020.667
1001.3988	1306045.333
3008.0040	4730335.667
4949.8800	7542362.667



De acuerdo a los cálculos y a los criterios de aceptación se obtiene los siguiente:

	TEÓRICO	EXPERIMENTAL	ACEPTACIÓN
CV	< 1.5	1.49	<input checked="" type="checkbox"/>
r	≥ 0.99	0.9994	<input checked="" type="checkbox"/>
r ²	≥ 0.98	0.9987	<input checked="" type="checkbox"/>
b	≅ 0	-91111	<input checked="" type="checkbox"/>
m	Sensibilidad	1553.4	<input checked="" type="checkbox"/>

2) Precisión del Sistema

a) Repetibilidad

Se considera el 100 % a la concentración correspondiente a 4949.88 mg/L

Muestra	[Diesel]mg/L Real	Área total	[Diesel]mg/L Teórica
C1 ₍₁₎	4949.88	7582314	4939.7612
C1 ₍₂₎	4949.88	7457713	4859.5494
C1 ₍₃₎	4949.88	7587061	4942.8170
C1 ₍₄₎	4949.88	8042191	4935.8066
C1 ₍₅₎	4949.88	8208572	4942.9143
C1 ₍₆₎	4949.88	79946607	5074.2745
MEDIA			4949.1872
DE			63.2845
CV			1.28

	TEÓRICO	EXPERIMENTAL	ACEPTACIÓN
CV	≤ 1.5	1.28	<input checked="" type="checkbox"/>

b) Reproducibilidad

Para calcular la reproducibilidad se requiere que previamente se calcule el porcentaje de recuperación (%R) y se trabaja con estos datos.

$$\%R = (\text{Cantidad obtenida del análisis/cantidad teórica adicionada}) * 100$$

ANALISTA 1		
[STD] 4949.88	DIA 1	DIA 2
C1 ₍₁₎	99.80	99.29
C1 ₍₂₎	98.18	101.92
C1 ₍₃₎	99.83	102.18
ANALISTA 2		
[STD] 5000		
C1 ₍₁₎	104.33	105.07
C1 ₍₂₎	108.02	104.73
C1 ₍₃₎	104.26	108.02
MEDIA		102.97
DE		3.16
CV		2.0

	TEORICO	EXPERIMENTAL	ACEPTACION
CV	≤ 2.0	2.0	<input checked="" type="checkbox"/>

Validación del método

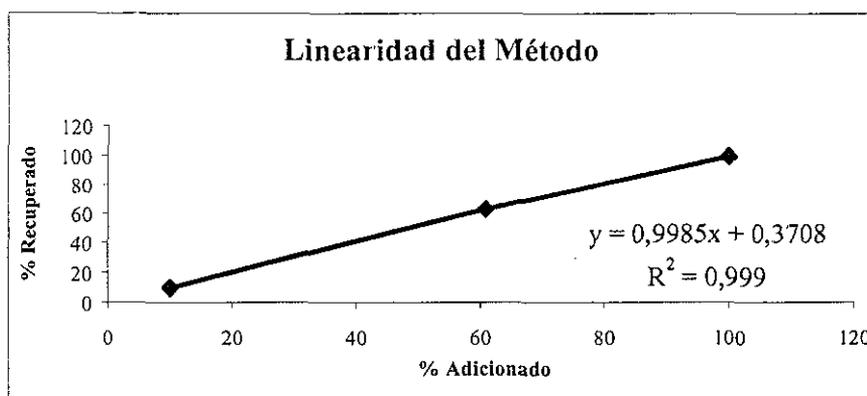
1) Exactitud del Método

Muestra	[Diesel]mg/L Real	[Diesel]mg/L Teórica	%Recuperación
C1 ₍₁₎	4949.88	4939.7612	99.80
C1 ₍₂₎	4949.88	4859.5494	98.18
C1 ₍₃₎	4949.88	4942.8170	99.86
C1 ₍₄₎	4949.88	4935.8066	99.71
C1 ₍₅₎	4949.88	4942.9143	99.86
C1 ₍₆₎	4949.88	5074.2745	102.51
MEDIA			99.99
DE			1.28
CV			1.28

	TEORICO	EXPERIMENTAL	ACEPTACION
CV	≤ 2.0 %	1.28	<input checked="" type="checkbox"/>
% Recuperación	98-102	98.18-102.51	<input checked="" type="checkbox"/>

2) Linealidad del Método

Muestra	Cantidad Adicionada	Cantidad Recuperada	% Adicionado	% Recuperado	Promedio % Recuperado
C1 ₍₁₎	4949.88	4939.7612	100	99.80	99.28
C1 ₍₂₎	4949.88	4859.5494	100	98.18	
C1 ₍₃₎	4949.88	4942.8170	100	99.86	
C2 ₍₁₎	3008.004	3084.5565	60.77	62.32	62.71
C2 ₍₂₎	3008.004	3058.2908	60.77	61.79	
C2 ₍₃₎	3008.004	3168.5599	60.77	64.01	
C4 ₍₁₎	498.7956	505.8028	10.08	10.22	9.71
C4 ₍₂₎	498.7956	452.7617	10.08	9.15	
C4 ₍₃₎	498.7956	482.4005	10.08	9.75	
				m	0.9985
				b	0.3708
				r ²	0.999
				r	0.9994



	TEÓRICO	EXPERIMENTAL	ACEPTACIÓN
m	$\cong 1$	0,9985	<input checked="" type="checkbox"/>
b	$\cong 0$	0,3708	<input checked="" type="checkbox"/>
r ²	$\geq 0,98$	0,999	<input checked="" type="checkbox"/>

CONCLUSIÓN

Sobre la base de los resultados obtenidos se concluye que el sistema es lineal lo que nos asegura que los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración del estándar. El sistema es preciso, ya que tanto se obtuvieron resultados aceptables para ser repetible en días diferentes y reproducible bajo analistas y días diferentes. El método de diesel es exacto y lineal con respecto al estándar preparado, lo cual indica que la concentración de diesel medida es muy cercana a la detectada en el cromatógrafo.

Este método, no es muy selectivo, ya que se detecta la presencia del agente tensoactivo, pero para este caso, no importa, debido a que se cuantifica también en la experimentación. La sensibilidad dada en la linealidad del sistema fue de 1553 (mg/L).

No se determinó el límite de detección como tal, sin embargo, se fijó un nivel de ruido de 33,8 y como indica el método, el nivel de aceptación tendría que ser dos veces el ruido, siendo éste de 67,6. La concentración más baja medida en el equipo que sí se cuantifica es de 200 mg/L, muy cercana al límite, por lo cual se puede afirmar que el método es sensible.

En cuanto a la estabilidad de la muestra. Bajo refrigeración las muestras estuvieron almacenadas por cerca de cinco meses y la cuantificación fue muy buena.

Por lo anterior, se concluye que el método para la cuantificación de diesel industrial queda VALIDADO. Las condiciones de programación del método serían las siguientes:

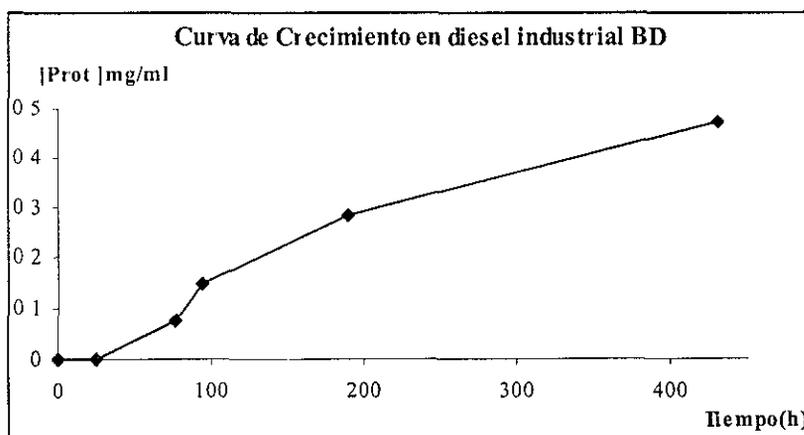
PROGRAMA DEL MÉTODO EN EL CROMATÓGRAFO DE GASES <i>VARIAN 3350</i> PARA LA DETERMINACIÓN DE DIESEL			
Parámetro	Opción	Parámetro	Opción
Initial Column Temp	50	Initial Relays	1
Initial Col Hold Time	0.00	Program Relays Time in min	0 30
Prog 1 Final Col Temp	100	Program 1 Relays	1
Prog 1 Col Rate in %/min	5 0	Add Next Relay Prog?	NO
Prog 1 Col Hold Time	0 00	Run Mode	1
Prog 2 Final Col Temp	280	Peak Measurement Parameter	1
Prog 2 Col Rate in %/min	20 0	Long Report Format?	NO
Prog 2 Col Hold Time	6.00	Result Calculation Type	1
Add Next Column Program	NO	Division	1.000000
Inyector Temperature	250	Amount Standar	1 000000
Detector Temperature	300	Multiplier	1 000000
FID A Initial Attenuation	4	Report Unidentified Peaks	YES
FID A Initial Range	10	Unidentified Peak Factor	0 000000
FID A Autozero ON?	YES	Sample ID	X
Time Program FID A?	NO	Substract Blank Baseline	YES
Initial Plot Speed in cm/min	0.3	Peak Reject Value	1500
Zero offset in Percent	10	Signal to Noise Ratio	6
Plot Signal A or B	A	Tangent Peak Height %	10
Time Ticks?	YES	Initial Peak Width in sec	2
Instrument Event Codes	NO	Prog 1 Event	2
First User Number	1	Prog 1 Start Time	0 00
Last User Number	100	Prog 1 End Time	2.00
Print User Number	NO	Add Next Time Event?	NO
Print Report at Run End?	YES	Add Peak Table Section?	NO
Print Run Long at Run End	NO	Method Complete End Time	25
Time Program Plotter?	NO	Noise	33 8

ANEXO 5 DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se utilizó un mesocosmos, sin agregar alcaloide, se decidió hacer un muestreo al azar durante 3 semanas y realizar solamente cuantificación de proteínas tomando para ello 1ml de muestra. Los resultados se resumen en la tabla 3.1:

TABLA 3.1

Curva estándar de albúmina $y=0.2762x+0.0179$ $R^2=0.9942$		
Tiempo (h)	Absorbencia	[Proteína] mg/ml
0.0	0	0
24.0	0.01	0
76.5	0.039	0.076
93	0.059	0.149
189	0.096	0.283
430.5	0.148	0.471



Con éstos resultados se decidió tomar muestras cada 12 horas en un primer ensayo para subsecuentemente ampliar el tiempo a cada 24 horas.

ANEXO 6 DATOS EXPERIMENTALES DEL EFECTO DE LOS ALCALOIDES SOBRE EL CRECIMIENTO Y DEGRADACIÓN DE DIESEL

Condiciones de trabajo

Medio mineral : 500ml
 Unidad experimental:
 Frasco: 1000ml con tapa de rosca y contratapa de teflón
 Combustible: diesel industrial estéril al 1%
 Concentración del surfactante: 0.05%
 Concentración del inóculo: 1.47 mg/ml
 Volumen del inóculo: 6 ml
 Alcaloide: Cafeína, Quinina y Teofilina al 0.1%

Biomasa: 10 días de crecimiento
 Repeticiones: muestras por triplicado
 Mesocosmos SD: (Surfactante + Diesel) Control
 Mesocosmos BS: (Biomasa + Surfactante) Control
 Mesocosmos BSD: (Biomasa+Surfactante+Diesel) Control
 Mesocosmos BSDC: (Biomasa+Surfactante+Diesel+Cafeína)
 Mesocosmos BSDQ: (Biomasa+Surfactante+Diesel+Quinina)
 Mesocosmos BSDC: (Biomasa+Surfactante+Diesel+Teofilina)

Datos experimentales

Tiempo (h)	Muestra	Absorbencia	[Prot.] mg/ml	X	DE	CV	pH	X	DE	CV	Área total	D R mg/L	X	DE	CV
0	SD1	0.000	0.000				6.99				7784504	5069.92			
	SD2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	6.96	6.97	0.02	0.248	7790003	5073.46	5071.84	1.79	0.035
	SD3	0.000	0.000				6.96				7787956	5072.14			
	BS1	0.000	0.000				6.99				-	-			
	BS2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	7.15	7.04	0.10	1.402	-	-	-	-	-
	BS3	0.000	0.000				6.97				-	-			
	BSD1	0.000	0.000				6.95				4733275	3105.69			
	BSD2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	6.90	6.93	0.03	0.416	4747382	3114.77	3021.54	153.7	5.087
	BSD3	0.000	0.000				6.95				4326982	2844.14			
	BSDC1	0.000	0.000				6.95				6553667	4277.57			
	BSDC2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	6.96	6.95	0.01	0.083	6506333	4247.10	4175.15	151.8	3.635
	BSDC3	0.000	0.000				6.95				6123702	4000.78			
	BSDQ1	0.000	0.000				6.79				5437697	3559.17			
	BSDQ2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	6.78	6.79	0.01	0.085	5865941	383.85	3656.68	154.5	4.226
	BSDQ3	0.000	0.000				6.79				5463892	3576.03			
BSDT1	0.000	0.000				7.03				5499996	3599.27				
BSDT2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	6.99	7.00	0.02	0.330	5996173	3918.68	3852.72	227.8	5.911	
BSDT3	0.000	0.000				6.99				6184948	4040.21				
24	SD1	0.001	≈ 0				7.20				7760949	58.65			
	SD2	0.006	≈ 0	0.000	0.000	0.000	7.26	7.15	0.14	1.900	7782597	5068.69	5063.79	7.83	0.155
	SD3	0.009	≈ 0				7.00				7781405	5067.93			

Tiempo (h)	Muestra	Absorbencia	[Prot.] mg/ml	X	DE	CV	pH	X	DE	CV	Área total	D. R mg/L	X	DE	CV
24	BS1	0.033	0.016				6.71				-	-			
	BS2	0.042	0.050	0.047	0.029	61.70	6.98	6.76	0.04	0.598	-	-	-	-	-
	BS3	0.049	0.074				6.94				-	-			
	BSD1	0.040	0.041				6.93				3580707	2363.73			
	BSD2	0.041	0.045	0.042	0.002	5.174	6.90	6.91	0.02	0.251	3498916	2311.08	2363.73	52.65	2.227
	BSD3	0.040	0.042				6.90				3662478	2416.37			
	BSDC1	0.042	0.049				6.91				4567505	2998.98			
	BSDC2	0.018	≈ 0	0.162	0.028	17.36	6.92	6.91	0.006	0.084	4364553	2868.33	2862.40	139.6	4.879
	BSDC3	0.024	≈ 0				6.91				4133944	2719.88			
	BSDQ1	0.042	0.049				6.81				5105010	3344.99			
	BSDQ2	0.043	0.052	0.049	0.004	7.407	6.80	6.80	0.006	0.085	4348158	2857.78	3028.11	274.7	9.071
	BSDQ3	0.041	0.045				6.80				4385080	2881.54			
	BSDT1	0.016	≈ 0				6.99				3658396	2413.74			
	BSDT2	0.01	≈ 0	0.000	0.000	0.000	6.99	6.99	0.00	0.000	3328824	2201.58	2380.06	164.3	6.901
BSDT3	0.012	≈ 0				6.99				3831012	2524.86				
48	SD1	0.000	≈ 0				6.98				7760800	5054.66			
	SD2	0.023	≈ 0	0.000	0.000	0.000	6.96	6.97	0.01	0.165	7765968	5057.99	5058.29	3.80	0.075
	SD3	0.000	≈ 0				6.96				7772563	5062.23			
	BS1	0.000	≈ 0				6.76				-	-			
	BS2	0.000	≈ 0	0.000	0.000	0.000	6.82	6.80	0.03	0.473	-	-	-	-	-
	BS3	0.009	≈ 0				6.81				-	-			
	BSD1	0.155	0.456				6.70				3590999	2370.36			
	BSD2	0.132	0.373	0.419	0.042	10.15	6.70	6.70	0.00	0.000	3029680	2009.01	2129.37	208.7	9.80
	BSD3	0.141	0.406				6.70				3029299	2008.76			
	BSDC1	0.086	0.207				6.72				4318090	2838.42			
	BSDC2	0.120	0.330	0.466	0.029	6.349	6.72	6.72	0.00	0.000	3535359	2334.54	2581.18	252.1	9.767
	BSDC3	0.134	0.381				6.72				3902031	2570.58			
	BSDQ1	0.035	0.023				6.79				4583175	3009.07			
	BSDQ2	0.036	0.027	0.025	0.002	8.449	6.79	6.79	0.00	0.00	4139659	2723.55	2792.80	191.3	6.849
BSDQ3	0.035	0.023				6.79				4018858	2645.79				
BSDT1	0.026	-0.009				6.80				3321405	2196.80				
BSDT2	0.025	-0.013	0.000	0.000	0.000	6.80	6.79	0.00	0.00	2962351	1965.66	2216.15	260.7	11.763	
BSDT3	0.019	-0.034				6.79				3770596	2485.97				
72	SD1	0.000	≈ 0				6.65				7758939	5053.46			
	SD2	0.000	≈ 0	0.000	0.000	0.000	6.94	6.84	0.17	2.447	7743689	5043.65	5051.69	7.32	0.145
	SD3	0.000	≈ 0				6.94				7765912	5057.95			
	BS1	0.000	≈ 0				6.54				-	-			
	BS2	0.000	≈ 0	0.000	0.000	0.000	6.79	6.71	0.14	2.152	-	-	-	-	-
	BS3	0.004	≈ 0				6.79				-	-			
	BSD1	0.171	0.514				6.66				2939437	1950.91			
	BSD2	0.191	0.586	0.563	0.043	7.586	6.61	6.63	0.03	0.379	2931429	1945.76	1925.50	39.64	2.058
	BSD3	0.192	0.590				6.63				2829017	1879.83			
	BSDC1	0.174	0.525				6.60				3254173	2153.52			
	BSDC2	0.161	0.478	0.502	0.023	4.675	6.62	6.61	0.01	0.175	3479412	2298.52	2255.32	88.49	3.924
	BSDC3	0.168	0.503				6.62				3503310	2313.91			
	BSDQ1	0.063	0.124				6.41				3517466	2323.02			
	BSDQ2	0.065	0.132	0.130	0.005	4.224	6.75	6.63	0.19	2.917	3623686	2391.40	2299.21	106.1	4.615
BSDQ3	0.066	0.135				6.74				3300314	2183.23				
BSDT1	0.180	0.547				6.68				3248587	2149.93				
BSDT2	0.174	0.525	0.513	0.041	7.99	6.70	6.70	0.02	0.228	2782034	1849.58	2022.46	155.2	7.676	
BSDT3	0.158	0.467				6.71				3121126	2067.87				
96	SD1	0.001	≈ 0				7.17				7742561	5042.92			
	SD2	0.001	≈ 0	0.000	0.000	0.000	7.00	7.06	0.10	1.380	7728963	5034.17	5040.72	5.77	0.114
	SD3	0.006	≈ 0				7.00				7745893	5045.07			
	BS1	0.008	≈ 0				6.85				-	-			

Tiempo (h)	Muestra	Absorbencia	[Prot.] mg/ml	X	DE	CV	pH	X	DE	CV	Área total	D. R mg/L	X	DE	CV
96	BS2	0 000	≈ 0	0 000	0 000	0 000	6 81	6 82	0 02	0 338	-	-	-	-	-
	BS3	0 000	≈ 0				6 81				-	-	-	-	-
	BSD1	0 232	0 734				6 47				2125582	1426 99			
	BSD2	0 228	0 720	0 725	0 008	1 150	6 52	6 51	0 03	0 494	2007503	1350 98	1454 89	120 3	8 270
	BSD3	0 228	0 720				6 53				2373680	1586 71			
	BSDC1	0 181	0 550				6 52				3043144	2017 67			
	BSDC2	0 199	0 615	0 575	0 35	6 046	6 59	6 57	0 04	0 615	2972863	1972 43	1997 48	23 0	1 152
	BSDC3	0 184	0 561				6 59				3019291	2002 32			
	BSDQ1	0 117	0 319				6 62				3313577	2191 77			
	BSDQ2	0 103	0 269	0 287	0 028	9 824	6 60	6 61	0 01	0 175	3554657	2346 96	2237 97	94 75	4 234
	BSDQ3	0 104	0 272				6 60				3287808	2175 18			
	BSDT1	0 194	0 597				6 64				2938869	1950 55			
	BSDT2	0 178	0 539	0 588	0 046	7 760	6 64	6 57	0 04	0 615	2572157	1714 48	1847 12	120 7	6 535
BSDT3	0 203	0 630				6 64				2823565	1876 32				
120	SD1	0 000	≈ 0				6 99				7742400	5042 82			
	SD2	0 011	≈ 0	0 000	0 000	0 000	6 94	6 97	0 03	0 380	7702599	5017 19	5034 02	14 58	0 290
	SD3	0 000	≈ 0				6 98				7741203	5042 05			
	BS1	0 002	≈ 0				6 85				-	-	-	-	-
	BS2	0 003	≈ 0	0 000	0 000	0 000	6 81	6 83	0 02	0 305	-	-	-	-	-
	BS3	0 002	≈ 0				6 84				-	-	-	-	-
	BSD1	0 323	1 0620				6 42				1951182	1314 72			
	BSD2	0 279	0 903	1 035	0 038	3 696	6 47	6 47	0 05	0 697	1878508	1267 94	1344 93	95 74	7 119
	BSD3	0 308	1 008				6 51				2164636	1452 14			
	BSDC1	0 225	0 709				6 52				2198558	1473 97			
	BSDC2	0 226	0 712	0 682	0 049	7 177	6 57	6 55	0 03	0 441	2531195	1688 11	1574 72	107 6	6 835
	BSDC3	0 202	0 626				6 57				2335422	1562 08			
	BSDQ1	0 148	0 431				6 55				2600130	1732 48			
BSDQ2	0 131	0 369	0 401	0 031	7 663	6 55	6 55	0 00	0 000	2622802	1747 08	1807 20	117 0	6 474	
BSDQ3	0 141	0 405				6 55				2925656	1942 09				
BSDT1	0 273	0 882				6 60				2603907	1734 92				
BSDT2	0 239	0 760	0 857	0 088	10 22	6 60	6 60	0 01	0 087	2297337	1537 56	1649 67	101 4	6 146	
BSDT3	0 286	0 929				6 61				2513218	1676 53				
144	SD1	0 005	≈ 0				6 97				7699825	5015 41			
	SD2	0 012	≈ 0	0 000	0 000	0 000	6 95	6 97	0 02	0 222	7698612	5014 63	5023 70	15 05	0 300
	SD3	0 006	≈ 0				6 98				7739687	5041 07			
	BS1	0 000	≈ 0				6 85				-	-	-	-	-
	BS2	0 002	≈ 0	0 000	0 000	0 000	6 78	6 79	0 06	0 820	-	-	-	-	-
	BS3	0 001	≈ 0				6 74				-	-	-	-	-
	BSD1	0 337	1 193				6 26				1513472	1032 95			
	BSD2	0 325	1 148	1 233	0 112	9 051	6 35	6 33	0 07	1 051	1850250	1249 75	1154 98	110 9	9 605
	BSD3	0 381	1 360				6 39				1745360	1182 23			
	BSDC1	0 282	0 985				6 43				2089407	1403 71			
	BSDC2	0 295	1 034	0 985	0 049	5 030	6 51	6 45	0 05	0 820	2108011	1461 78	1384 14	89 05	6 433
	BSDC3	0 269	0 936				6 41				1579611	1075 53			
	BSDQ1	0 230	0 788				6 43				1966178	1324 38			
BSDQ2	0 223	0 761	0 735	0 070	9 541	6 48	6 44	0 04	0 628	2261905	1514 75	1489 86	154 5	10 373	
BSDQ3	0 195	0 655				6 40				2441604	1630 43				
BSDT1	0 306	1 076				6 54				1781350	1205 39				
BSDT2	0 264	0 917	1 016	0 087	8 55	6 55	6 54	0 01	0 153	1874266	1265 21	1279 08	81 51	6 372	
BSDT3	0 301	1 057				6 53				2031818	1366 63				
168	SD1	0 001	≈ 0				7 02				7699725	5015 34			
	SD2	0 013	≈ 0	0 000	0 000	0 000	7 00	7 00	0 03	0 360	7589925	4944 66	4998 05	47 18	0 944
	SD3	0 004	≈ 0				6 97				7728935	5034 15			
	BS1	0 016	≈ 0				6 85				-	-	-	-	-
	BS2	0 035	≈ 0	0 000	0 000	0 000	6 78	6 90	0 05	0 664	-	-	-	-	-

Tiempo (h)	Muestra	Absorbencia	[Prot.] mg/ml	X	DE	CV	pH	X	DE	CV	Área total	D. R mg/L	X	DE	CV
168	BS3	0.046	0.091				6.78				-	-			
	BSD1	0.468	1.689				6.25				1062967	742.94			
	BSD2	0.380	1.356	1.569	0.188	11.95	6.25	6.27	0.04	0.552	913310	646.60	710.79	7.598	7.822
	BSD3	0.473	1.708				6.31				1062833	742.85			
	BSDC1	0.327	1.155				6.46				1424709	975.87			
	BSDC2	0.303	1.064	1.088	0.059	5.393	6.40	6.42	0.04	0.540	1620863	1102.08	1011.30	79.24	7.836
	BSDC3	0.298	1.045				6.40				1393940	956.00			
	BSDQ1	0.276	0.962				6.38				1447925	990.75			
	BSDQ2	0.328	1.159	1.029	0.113	10.94	6.35	6.36	0.02	0.240	1591654	1033.28	1080.37	88.19	8.163
	BSDQ3	0.277	0.966				6.36				1721817	1167.07			
	BSDT1	0.338	1.197				6.42				1001725	703.51			
	BSDT2	0.298	1.045	1.121	0.107	9.552	6.52	6.49	0.06	0.890	1115791	776.94	752.50	42.42	5.638
	BSDT3	0.331	1.170				6.52				1115957	777.05			
192	SD1	0.022	0.0004				6.97				7690020	5009.10			
	SD2	0.002	≈ 0	0.000	0.000	0.000	6.93	6.95	0.02	0.288	6975459	4549.10	4860.61	269.9	5.552
	SD3	0.012	≈ 0				6.95				7712592	5023.63			
	BS1	0.000	≈ 0				6.85				-	-			
	BS2	0.003	≈ 0	0.000	0.000	0.000	6.78	6.80	0.04	0.594	-	-	-	-	-
	BS3	0.000	≈ 0				6.78				-	-			
	BSD1	0.456	1.689				6.15				685631	500.03			
	BSD2	0.445	1.602	1.675	0.063	3.738	6.15	6.16	0.01	0.188	649846	476.99	511.23	41.01	8.022
	BSD3	0.477	1.723				6.17				773642	556.68			
	BSDC1	0.328	1.159				6.42				1010234	708.99			
	BSDC2	0.335	1.186	1.177	0.015	1.300	6.28	6.33	0.08	1.234	940606	664.17	704.53	38.34	5.441
	BSDC3	0.335	1.186				6.29				1059108	740.45			
	BSDQ1	0.282	0.985				6.30				1294974	892.29			
	BSDQ2	0.331	1.170	1.310	0.107	8.174	6.23	6.28	0.04	0.644	1232534	852.10	876.63	21.52	2.454
	BSDQ3	0.282	0.985				6.26				1284422	885.50			
BSDT1	0.368	1.310				6.30				815515	583.64				
BSDT2	0.326	1.151	1.276	0.112	8.765	6.49	6.43	0.11	1.707	683916	498.92	553.90	47.66	8.605	
BSDT3	0.383	1.367				6.49				808522	579.14				
216	SD1	0.007	≈ 0				7.02				7689992	5009.08			
	SD2	0.005	≈ 0	0.000	0.000	0.000	6.93	6.96	0.05	0.747	6991589	4559.48	4858.85	259.3	5.336
	SD3	0.005	≈ 0				6.93				7688299	5007.99			
	BS1	0.000	≈ 0				6.8				-	-			
	BS2	0.003	≈ 0	0.000	0.000	0.000	6.79	6.79	0.01	0.147	-	-	-	-	-
	BS3	0.000	≈ 0				6.78				-	-			
	BSD1	0.571	2.079				6.03				324582	267.60			
	BSD2	0.598	2.181	2.078	0.104	5.012	6.03	6.07	0.08	1.236	389740	309.55	278.66	27.11	9.730
	BSD3	0.543	1.973				6.16				310933	258.81			
	BSDC1	0.366	1.303				6.32				368161	295.66			
	BSDC2	0.414	1.485	1.395	0.091	6.516	6.20	6.24	0.07	1.110	450778	348.84	230.25	26.82	8.373
	BSDC3	0.391	1.398				6.20				400166	316.26			
	BSDQ1	0.360	1.280				6.29				1289193	888.57			
	BSDQ2	0.373	1.329	1.310	0.038	2.932	6.23	6.25	0.04	0.554	1231016	851.12	864.68	20.75	2.400
	BSDQ3	0.380	1.356				6.23				1236051	854.36			
BSDT1	0.383	1.367				6.22				327254	269.32				
BSDT2	0.378	1.348	1.375	0.031	2.254	6.22	6.23	0.03	0.463	268974	231.80	258.62	23.38	9.039	
BSDT3	0.394	1.409				6.27				335640	274.72				

Variabilidad del experimento

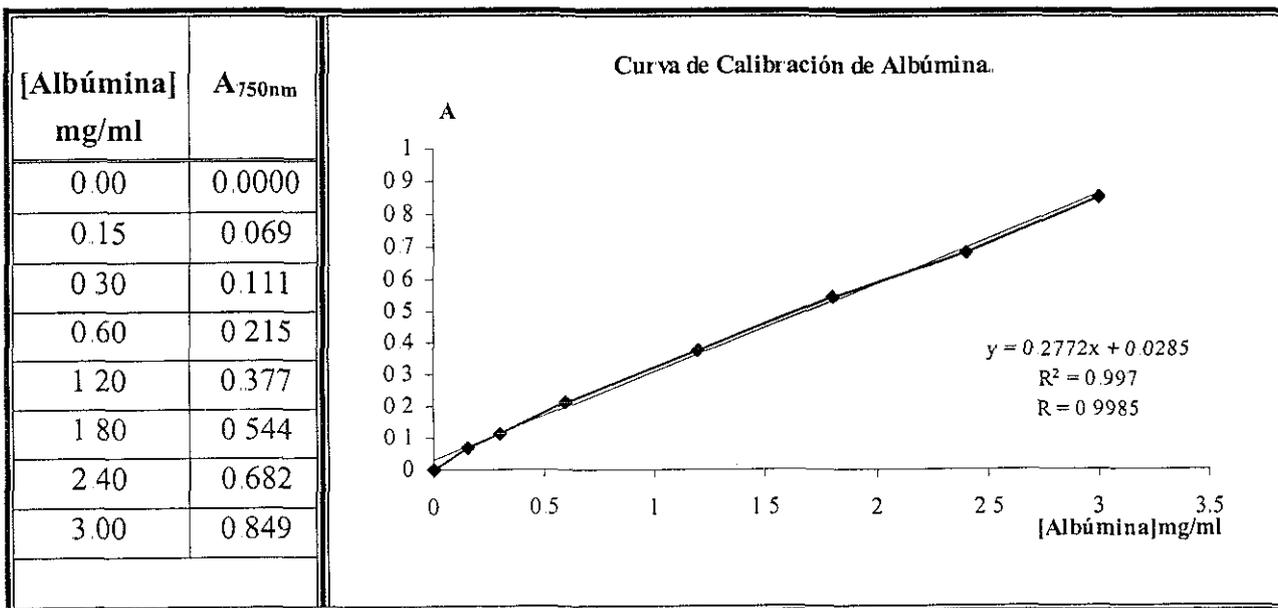
Expresada como el coeficiente de variación porcentual

Variabilidad										
Tiempo (h)	SD	BS	BSD		BSDC		BSDQ		BSDT	
	Deg.	Crecim.	Crecim.	Deg.	Crecim.	Deg.	Crecim.	Deg.	Crecim.	Deg.
0	0.035	0.000	0.000	5.087	0.000	3.630	0.000	4.226	0.000	5.911
24	0.155	61.70	5.174	2.227	17.36	4.879	7.407	9.071	0.000	6.901
48	0.075	0.000	10.150	9.80	6.349	9.767	8.449	6.849	0.000	11.763
72	0.145	0.000	7.586	2.058	4.675	3.924	4.224	4.615	7.99	7.676
96	0.114	0.000	1.150	8.270	6.046	1.152	9.824	4.234	7.760	6.535
120	0.290	0.000	3.696	7.119	7.177	6.835	7.663	6.474	10.22	6.146
144	0.300	0.000	9.051	9.605	5.030	6.433	9.541	10.373	8.547	6.372
168	0.944	0.000	11.95	7.822	5.393	7.836	10.94	8.163	7.13	5.638
192	0.552	0.000	3.738	8.022	1.300	5.441	8.174	2.454	8.765	8.605
216	5.336	0.000	5.012	9.730	6.516	8.373	2.932	2.400	2.254	9.039
Promedio	0.795	6.17	5.751	6.974	5.984	5.877	6.915	5.886	5.267	7.459

Deg. = Degradación
Crecim = Crecimiento

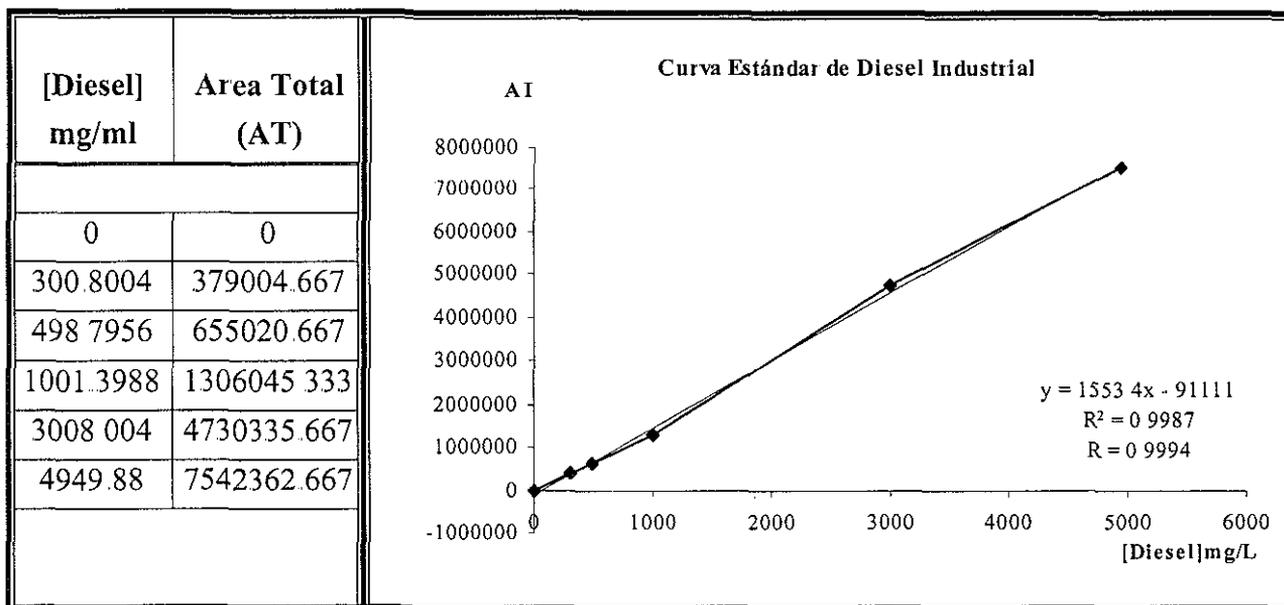
Curva estándar de albúmina

Curva estándar de albúmina Se empleó un espectrofotómetro Hach leyendo absorbencia a una =750nm, celda redonda de 1cm de diámetro



Curva estándar de diesel industrial

Curva estándar de diesel Industrial. Se empleó un cromatógrafo de gases Varian 3350.



Cálculos del rendimiento

El rendimiento se obtiene en base al sustrato consumido al final de la cinética

$$Y_x = \frac{[\text{Biomasa}]}{[\text{diesel consumido}]}$$

Di.C = Diesel industrial consumido

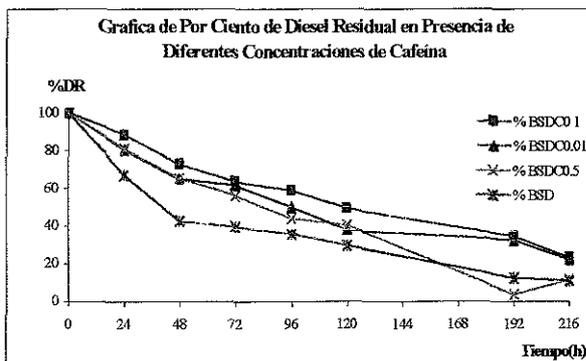
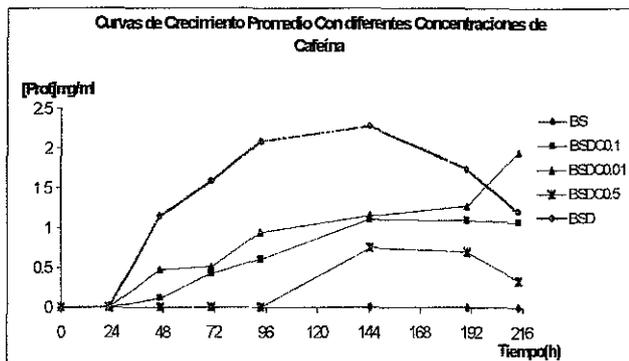
Tiempo	CONTROL (BSD)		CAFEINA (BSDC)		QUININA (BSDQ)		TEOFILINA (BSDT)	
	Biomasa (mg/L)	Di.C. (mg/L)	Biomasa (mg/L)	Di.C. (mg/L)	Biomasa (mg/L)	Di.C. (mg/L)	Biomasa (mg/L)	Di.C. (mg/L)
0	0	0	0	0	0.000	0.000	0	0.000
24	42.088	657.813	162	1312.755	48.701	628.575	0	1472.659
48	411.857	892.166	466.037	1593.970	24.651	863.877	0	1636.575
72	563.372	1096.038	502.044	1919.833	130.471	1357.467	513.468	1830.258
96	724.507	1566.644	575.397	2177.675	286.797	1418.714	588.422	2005.606
120	1035.354	1676.605	682.419	2600.430	401.034	1849.479	856.782	2203.050
144	1233.497	1866.563	985.088	2791.012	734.949	2166.826	1016.408	2573.641
168	1569.229	2310.744	1088.350	3163.853	1029.029	2576.313	1121.166	3100.220
192	1671.463	2510.304	1176.701	3470.613	1310.488	2780.053	1276.410	3298.821
216	2077.875	2742.883	1395.051	3854.898	1310.488	2791.999	1374.858	3594.105
Rendimiento (Yx)	0.758		0.362		0.469		0.383	

ANEXO 7 EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL ALCALOIDE CAFEINA SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA DEGRADACIÓN DE DIESEL INDUSTRIAL

Se realizó un experimento extra, no presentado en el presente trabajo, y fue el de probar tres concentraciones del alcaloide cafeína y observar cómo afecta al crecimiento.

Las concentraciones a probar fueron adicionales al 0.1%, tratándose de 0.5% y 0.01%. Los resultados se resumen en la tabla siguiente:

CINETICAS DE CRECIMIENTO Y DEGRADACION A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CAFEINA															
CRECIMIENTO DE BIOMASA mg/ml						DIESEL RESIDUAL mg/L									
T (h)	BS	BSD	BSD C _{0.01}	BSD C _{0.1}	BSD C _{0.5}	BS	% BS	BSD	% BSD	BSD C _{0.01}	% C 0.01	BSD C _{0.1}	% C 0.1	BSD C _{0.5}	% C 0.5
0	0	0	0	0	0	25.3		2931.6		3519.3		3519.3		3529.5	
24	0	0	0	0	0			1964.3	88.4	3111.3	0.78	3111.3	70.5	2848.3	97.2
48	0	1.14	0.47	0.11	0			1242.1	72.6	2556.6	1.55	2556.6	56.9	2296.7	78.3
72	0	1.5	0.50	0.42	0	30.3	120	1152.5	63.6	2237.2	2.33	2237.2	53.8	1968.1	67.1
96	0	2.08	0.94	0.60	0			1037.4	58.7	2065.4	3.10	2065.4	43.7	1544.8	52.7
120	0	2.27	1.15	1.10	0.74	35.5	140	860.15	49.2	1729.8	3.88	1729.8	33.0	1419.6	48.4
192	0	1.73	1.27	1.09	0.68	38.8	153	356.01	34.3	1205.6	6.21	1205.6	28.2	117.24	4.00
216	0	1.2	1.94	1.07	0.33	40.5	160	310.48	23.0	808.97	6.98	808.97	19.2	389.36	13.3



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ANEXO 8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO EN EL SISTEMA DE MESOCOSMOS EMPLEADO EN ESTE ESTUDIO

A partir de las dimensiones obtenidas del mesocosmos (figura 8-1), se determinó el volumen de aire presente en el espacio vacío (*head space*)

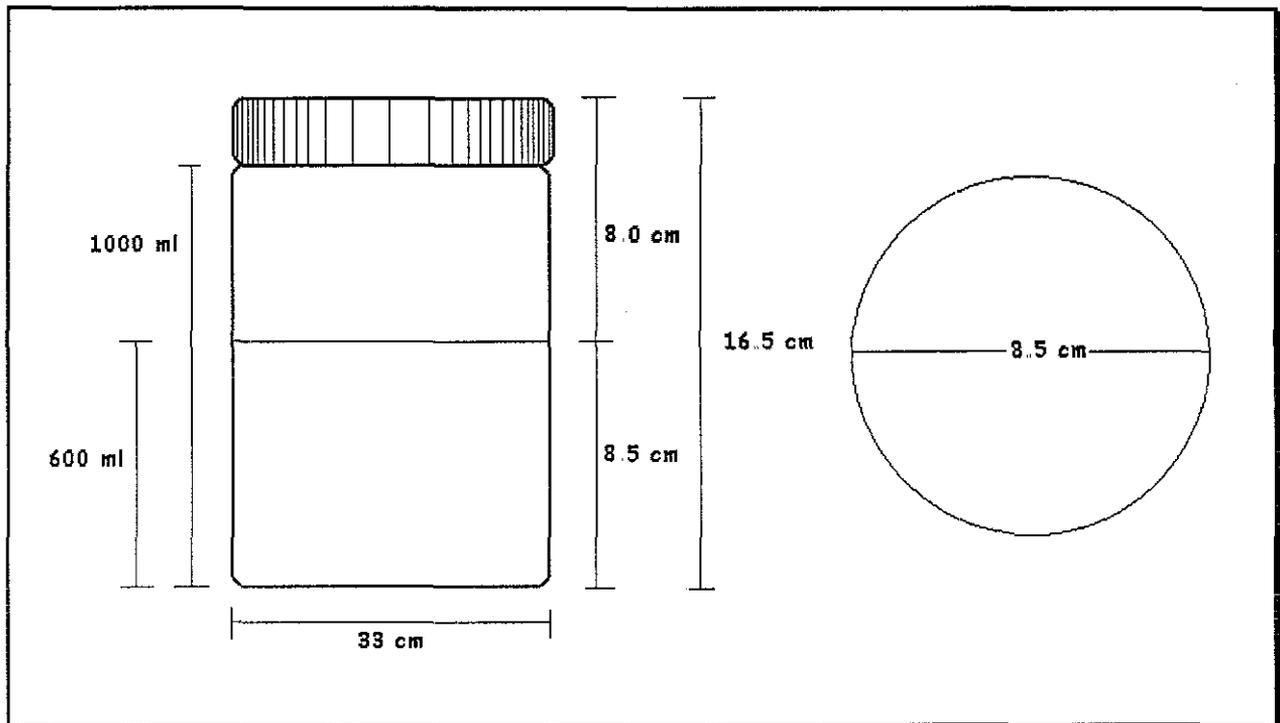


Figura 8.1 Sistema de mesocosmos empleado

1) Volumen de aire en el mesocosmos.

Usando la fórmula del volumen de un cilindro:

$$V = \pi r^2 h;$$

donde V = volumen, $\pi = 3.1416$; r = radio de la circunferencia y h = altura

Sustituyendo las dimensiones del frasco en la fórmula anterior tendremos el volumen de aire en el *head space*:

$$V = 3.1416 * (4.25 \text{ cm})^2 * 8 \text{ cm}$$

$$V = 453\,960 \text{ cm}^3 (1\text{ml}/1\text{cm}^3) * (1\text{L}/1000\text{ml})$$

$$\underline{V = 0.454\text{L}}$$

Usando la ecuación de los gases ideales así como las fracciones molares, se determinó la concentración de oxígeno presente en el volumen de aire obtenido arriba

2) Moles de aire en el *head space*. Se consideró que la presión atmosférica dentro del frasco era equivalente a la atmosférica, que para la ciudad de México equivale a 0.77 atm y a la temperatura ambiente de 25°C (que además fue la temperatura de incubación del sistema).

$$PV = nRT \quad \Rightarrow \quad n = PV / RT$$

donde $P =$ presión atmosférica; $V =$ volumen del gas; $n =$ moles; $R =$ constante de los gases,
 $T =$ temperatura

$$n_{\text{aire}} = (0.77\text{atm} * 0.454\text{L}) / (0.0826 \text{ atmLmol}^{-1} \text{ K}^{-1} * 298.15 \text{ K})$$

$$\underline{n_{\text{aire}} = 0.0142 \text{ mol}}$$

3) Moles de oxígeno (n_{O_2}) en esas moles de aire

Fracción molar de O_2 (X_{O_2}) a 1 atm = 0.20948

$$X_{\text{O}_2} = n_{\text{O}_2} / n_{\text{t}} \quad \Rightarrow \quad n_{\text{O}_2} = X_{\text{O}_2} * n_{\text{t}}$$

$$n_{\text{O}_2} = 0.20948 * 0.0142 \text{ mol}$$

$$\underline{n_{\text{O}_2} = 2.975 \times 10^{-3}}$$

4) Concentración de oxígeno [O_2] $PM_{\text{O}_2} = 31.998 \text{ g/mol}$

$$[\text{O}_2] = n_{\text{O}_2} * PM_{\text{O}_2} * (1/V)$$

$$[\text{O}_2] = (2.975 \times 10^{-3} \text{ mol})(31.998 \text{ g/mol})(1/0.454 \text{ L})$$

$$\underline{[\text{O}_2] = 0.21 \text{ g/L}}$$

Para determinar la concentración de saturación de oxígeno en el medio de cultivo, se empleó la ecuación de la ley de las presiones parciales de Dalton.

5) Determinar la presión parcial de O_2 a 0.77 atm, usando el valor de la fracción molar de O_2 a 1 atm.

$$PO_2 = 0.77\text{atm} (0.20948/1 \text{ atm}) = 0.1613 \text{ atm}$$

Usando los valores de la constante de la ley de Henry (H) se puede determinar la concentración de saturación del oxígeno en agua.

6) El aire seco contiene cerca de un 20% de oxígeno. El valor de H a 20°C para el oxígeno es de 4.27×10^4 atm L/mol, por lo tanto:

$$X_{O_2} = P_{O_2} / H$$

$$X_{O_2} = 0.1613 \text{ atm} / 4.27 \times 10^4 \text{ atm L mol}^{-1}$$

$$X_{O_2} = 3.7775 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$$

7) Tenemos que para 1000 ml de medio de cultivo (considerado como únicamente agua) Las moles de agua

$$n_{H_2O} = 1000 \text{ ml} (1 \text{ g/ml}) (1/18 \text{ g mol}^{-1})$$

$$n_{H_2O} = 55.55 \text{ mol}$$

8) moles del oxígeno con respecto a las moles de el agua:

$$\frac{n_{O_2}}{n_{H_2O} + n_{O_2}} = 3.7775 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$$

$$n_{O_2} = (55.55 \text{ mol agua} + n_{O_2}) (3.7775 \times 10^{-6} \text{ mol/L})$$

La cantidad de n_{O_2} es muy inferior a las moles de agua, por lo cual la suma se obvia

$$n_{O_2} \approx (55.55) (3.7775 \times 10^{-6} \text{ mol/L})$$

$$n_{O_2} \approx 2.0986 \times 10^{-4} \text{ mol/L oxígeno}$$

9) Determinar la concentración de saturación del oxígeno

$$[O_2] \approx (2.0986 \times 10^{-4} \text{ mol/L}) (31.998 \text{ g/mol}) (1000 \text{ mg/g})$$

$$\boxed{[O_2] \approx 6.7150 \text{ mg/L}}$$

ANEXO 9. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO NECESARIA PARA LA MINERALIZACIÓN DE DIESEL

Determinación de la concentración de diesel empleada en este estudio.

$$\delta = 0.83 \text{ g/ml}$$

$$\text{Volumen de diesel} = 6 \text{ ml}$$

$$\text{Volumen de medio de cultivo} = 600 \text{ ml}$$

$$[\text{Di}] = \text{Concentración diesel industrial} = 8300 \text{ mg/L}$$

$$0.83 \frac{\text{g}}{\text{ml}} * \frac{6 \text{ ml}}{600 \text{ ml}} * \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} * \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = \underline{8300 \text{ mg/L}}$$

$$\text{Masa de Diesel} = 4.89 \text{ g}$$

$$8300 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * 600 \text{ ml} * \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = \underline{4.89 \text{ g}}$$

$$\text{Masa de Oxígeno en 600 ml} = 4.026 \text{ mg} \equiv 0.0040 \text{ g}$$

$$67150 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * 600 \text{ ml} = \underline{4.026 \text{ mg}}$$

Masa de oxígeno considerando la cantidad en la cama de aire (0.21 g/L) = 0.1300 g

$$0.0067150 \frac{\text{g}}{\text{L}} + 0.21 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 0.216715 \text{ g/L}$$

$$0.216715 \frac{\text{g}}{\text{L}} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} * 600 \text{ ml} = \underline{0.130029 \text{ g}}$$

Composición del diesel industrial usado en este estudio

TEÓRICO	{	Naftaleno(C ₁₀ H ₈):	{	Aromáticos = 16.76%
		Aromáticos = 43.6%		Olefinas = 1.1%
		Naftenos = 43.7%		Saturados = 78.7%
		C10 aromático = 0.4%		

Diesel = 4.89 g

O₂ = 0.004026 g

C₁₀H₈ = 128.1732 g/mol

O₂ = 31.998 g/mol

CO₂ = 44.009 g/mol

Se calculó la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar los grupos químicos constituyentes del combustible que se usó en este estudio. También se hizo el cálculo suponiendo que todo el oxígeno presente en la cama de aire era transferido y disuelto en el medio de cultivo:

A) COMPUESTOS AROMÁTICOS

Considerando al naftaleno como representativo del 16.76% de la mezcla real.

C₁₀H₈ = 128.1732 g/mol

C₁₀H₈ = 2.1320 g

O₂ = 31.998 g/mol

Masa de O₂ considerando que todo el oxígeno se transfirió al agua = 0.1300 g



$$4.89 \text{ g C}_{10}\text{H}_8 * \frac{16.76 \%}{100 \%} = 0.8195 \text{ g C}_{10}\text{H}_8$$

$$\text{g O}_2 = 0.8195 \text{ g C}_{10}\text{H}_8 \left(\frac{1 \text{ mol}}{128.1732 \text{ g C}_{10}\text{H}_8} \right) \left(\frac{12 \text{ mol O}_2}{1 \text{ mol C}_{10}\text{H}_8} \right) 31.998 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \text{O}_2$$

$$\text{g O}_2 = 2.455$$

2.45 g O₂ > 0.13 g O₂ por lo tanto, no es suficiente el oxígeno disuelto

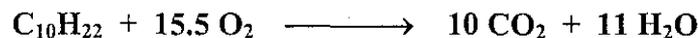
B) PARAFINAS

Considerando al decano como representativo del 78.7% de la mezcla real.

C₁₀H₂₂ = 128.1732 g/mol

$$C_{10}H_{22} = 0.440 \text{ g}$$

$$O_2 = 31.998 \text{ g/mol}$$



$$4.89 \text{ g } C_{10}H_{22} * \frac{78.7 \%}{100 \%} = 3.8484 \text{ g } C_{10}H_{22}$$

$$g O_2 = 3.8484 \text{ g } C_{10}H_{22} \left(\frac{1 \text{ mol}}{142.2838 \text{ g } C_{10}H_{22}} \right) \left(\frac{15.5 \text{ mol } O_2}{1 \text{ mol } C_{10}H_{22}} \right) 31.998 \frac{\text{g}}{\text{mol}} O_2$$

$$g O_2 = 13.4146$$

13.41 g O_2 >> 0.13 g O_2 por lo tanto, no es suficiente el oxígeno disuelto

C) OLEFINAS

Considerando al como representativo del 1.1% de la mezcla real.

$$C_{10}H_{18} = 138.2422 \text{ g/mol}$$

$$C_{10}H_{18} = 0.0537 \text{ g}$$

$$O_2 = 31.998 \text{ g/mol}$$



$$4.89 \text{ g } C_{10}H_{18} * \frac{1.1 \%}{100 \%} = 0.0537 \text{ g } C_{10}H_{18}$$

$$g O_2 = 0.0537 \text{ g } C_{10}H_{18} \left(\frac{1 \text{ mol}}{138.2422 \text{ g } C_{10}H_{18}} \right) \left(\frac{19.5 \text{ mol } O_2}{1 \text{ mol } C_{10}H_{22}} \right) 31.998 \frac{\text{g}}{\text{mol}} O_2$$

$$g O_2 = 0.2428$$

0.24 g O_2 > 0.13 g O_2 por lo tanto, no es suficiente el oxígeno disuelto