



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CINÉTICA DE CRECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO  
DE UN CULTIVO MICROBIANO ACLIMATADO A  
ALTAS CONCENTRACIONES DE TURBOSINA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**LORENA LORENZO CÁRDENAS**



**MÉXICO, D.F.**

**2011**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: VICTOR MANUEL LUNA PABELLO

**VOCAL:** Profesor: MARCO ANTONIO ORTIZ JIMÉNEZ

**SECRETARIO:** Profesor: SUSANA SAVAL BOHÓRQUEZ

**1er. SUPLENTE:** Profesor: LAURA CARMONA SALAZAR

**2° SUPLENTE:** Profesor: VERÓNICA DOMÍNGUEZ VALDEZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE INGENIERIA, UNAM**

---

**ASESOR DEL TEMA: DRA. SUSANA SAVAL BOHÓRQUEZ**

(nombre y firma)

**SUSTENTANTE (S): LORENA LORENZO CÁRDENAS**

(nombre (s) y firma (s) )

## AGRADECIMIENTOS

---

### *A la Doctora Susana Saval Bohórquez*

*Por su comprensión, confianza, apoyo y enseñanza para la realización de este trabajo. Es un placer y orgullo trabajar con usted.*

### *A mí Jurado*

*A los profesores Víctor Manuel Luna Pabelló, Marco Antonio Ortiz Jiménez, Verónica Domínguez Valdez y Laura Carmona Salazar por sus comentarios, consejos y tiempo dedicado a la revisión de este trabajo*

*A la máxima casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México, a mi querida Facultad de Química y al Instituto de Ingeniería por todo el conocimiento y apoyo que me han brindado y formado en la persona que ahora soy.*

## DEDICATORIAS

---

### *A mis padres Abad y Belivería*

*Porque con su cariño, comprensión y sacrificio me han enseñado el camino correcto y he logrado llegar hasta este momento; porque aunque las sombras a veces nos rodeaban nunca dejaron de ver la luz. No caben las palabras en esta página para demostrarles todo lo que siento. Los quiero mucho*

### *A mis hermanos Ileana y Christian*

*Por todo su apoyo, consejos y cariño que han depositado en mí. Por aprender a quererme tal y como soy y reírse conmigo aun cuando el viento no estaba a favor. Mil gracias, los quiero mucho.*

### *A mis amigos*

*Rocío, Claudía, Lilitiana, Mauricio, Iván, Vane, Brisa, Aura, Micky, Benja, Toño, Pau, etc. Por reír, jugar, llorar y soñar junto conmigo en esta realidad espacio-temporal a la que llamamos vida.*

*A los compañeros del Instituto de Ingeniería por su infinita cordialidad y apoyo.*

*A todas las personas que por no mencionarlas no dejan de ser importantes y que han puesto un granito de azúcar en mi vida.*

*Gracias a todos los que me dan su apoyo desde el corazón...*

*Y por último, darte las gracias a tí, sí, a tí que estás leyendo en este momento, quiero pedirte un favor: Sonríe, sí tú, sonríe, venga, que nadie mira.*

# ÍNDICE

---

<b>ÍNDICE</b>	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	iii
<b>LISTA DE TABLAS</b>	iv
<b>RESUMEN</b>	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	4
2.1 El petróleo	4
2.1.1 Extracción y refinación del petróleo	4
2.1.2 Clasificación de los hidrocarburos del petróleo	6
2.1.3 La actividad petrolera en México	10
2.2 Turbosina	12
2.2.1 Información fisicoquímica de la turbosina	14
2.2.2 Toxicidad de la turbosina	15
2.3 El suelo	16
2.3.1 Actividad depuradora del suelo	16
2.3.2 Contaminación del suelo y consecuencias	17
2.3.3 Contaminación del suelo por hidrocarburos	18
2.3.3.1 Contaminación de suelo por hidrocarburos en México	19
2.4 Normatividad	21
2.5 Biorremediación	22
2.5.1 Clasificación de las técnicas de remediación	22
2.5.2 Ventajas y desventajas de la biorremediación	24
2.5.3 Biodegradación microbiana de hidrocarburos en el suelo	24
2.5.4 Factores que afectan el proceso de biorremediación	25
2.5.5 Estructura química y biodegradación	26
2.6 Cinética microbiana	26
2.6.1 Cinética de crecimiento	28
2.6.2 Crecimiento en función de la tasa de reproducción	28
2.6.3 Cinética de Monod	29
2.7 Cinéticas de biodegradación	30
2.7.1 Estudios de degradación de combustibles a nivel laboratorio	31
<b>3. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	34
3.1 Cultivo inicial	34
3.2 Medios de cultivo	34
3.3 Cuantificación de bacterias heterótrofas	34
3.4 Turbosina utilizada	35
3.5 Desarrollo de técnicas	36
3.5.1 Cultivos empleados para cinética	36
3.5.2 Preparación de las muestras	37
3.5.3 Determinación de pH	37
3.5.4 Cuantificación de crecimiento microbiano como proteína celular	38
3.5.5 Determinación de fósforo en forma de fosfatos	39
3.5.6 Determinación de nitrógeno amoniacal por el método de azul de indofenol	39
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	40
4.1 Cinética de crecimiento como proteína celular	40
4.1.1 Cuantificación de bacterias heterótrofas	45
4.2 Determinación de pH	46

# ÍNDICE

---

4.3 Variación en la concentración de nutrientes	48
4.3.1 Variación del nitrógeno amoniacal	48
4.3.2 Variación de fósforo en forma de fosfatos	49
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>52</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>53</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>58</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Refinación de petróleo	6
2	Principales refinерías, poliductos y oleoductos de México en las diferentes regiones	11
3	Porcentajes de la producción de los diferentes petrolíferos en el 2007	13
4	Precios de los principales petrolíferos 1997-2007	14
5	Localización y Tipo de las Emergencias Ambientales Reportadas a la PROFEPA	20
6	Tipo de eventos ocurridos en emergencias ambientales durante el transporte	20
7	Porcentaje de casos con afectaciones al medio ambiente	21
8	Curva de crecimiento de un cultivo bacteriano	27
9	Técnica vaciado en placa	35
10	Turbosina estéril	36
11	Obtención y manejo de las muestras	38
12	Crecimiento como proteína celular	40
13	Cinética de crecimiento del cultivo microbiano en presencia de turbosina	42
14	Variación de las velocidades de crecimiento	42
15	Aspecto del cultivo degradador al inicio y final del tiempo de crecimiento	44
16	Conteo de heterótrofas al inicio y al final del estudio	46
17	Variación de pH con respecto al tiempo	47
18	Variación de nitrógeno amoniacal con respecto al tiempo	49
19	Variación de fósforo en forma de fosfato en función del tiempo	50
20	Cinética de la variación de fósforo en forma de fosfato en función del tiempo	51
21	Cálculo de la velocidad de crecimiento entre 33 - 47 h y	59

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>22</b>	Cálculo de la velocidad de crecimiento entre 47- 57 h	59
<b>23</b>	Cálculo de la velocidad de crecimiento entre 57 – 71 h	59
<b>24</b>	Cálculo de la velocidad de crecimiento entre 71 - 95 h	59
<b>25</b>	Cálculo de la velocidad de crecimiento entre 95 - 105 h	60
<b>26</b>	Cálculo de la velocidad de crecimiento entre 105 – 119 h	60

---

## LISTA DE TABLAS

---

<b>Tabla</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
1	Diferentes tipos de petróleo en México y su grado API	11
2	Producción de los diferentes productos de refinación del petróleo crudo en México	12
3	Tipo de turbosinas y sus aplicaciones para Estados Unidos de América 1997	13
4	Principales características de la turbosina	15
5	Composición de MM2	34
6	Cuantificación de bacterias heterótrofas	45
7	Variación de $\mu$ en los diferentes intervalos de tiempo	58

## RESUMEN

---

En los estudios de cinéticas biodegradación microbianas, es común considerar que el crecimiento ocurre dentro de un sistema completamente mezclado y que la biomasa es una mezcla de varias poblaciones heterogéneas interrelacionadas entre si, en las que cada cepa presenta un crecimiento diferente el cual depende del sustrato y de factores ambientales.

En el presente estudio se realizó a nivel laboratorio una cinética de crecimiento en medio líquido de un cultivo microbiano conteniendo 7 diferentes cepas aisladas de una muestra de suelo contaminado con turbosina y aclimatadas a degradar altas concentraciones de dicho combustible. Se presentan los resultados de las diferentes determinaciones analíticas. Los valores corresponden al promedio de 3 corridas experimentales simultáneas con una concentración de 3 % v/v de turbosina como sustrato. El estudio se realizó durante 5 días con 2 eventos de muestreo procurando tomarlas cada 10 o 12 horas. El crecimiento se cuantificó como proteína celular por el método de Löwry, y para complementar estos resultados se realizó la cuantificación de bacterias heterótrofas; Además de cuantificar la variación de nitrógeno amoniacal y la variación de fósforo en forma de fosfatos con respecto al tiempo.

La mayor tasa de crecimiento se presentó en el período de tiempo que comprende de las 33 horas a las 47 horas con una velocidad de crecimiento  $\mu = 0.1133 \text{ h}^{-1}$  a pH neutro. El pH adecuado a los microorganismos y el fósforo disponible para la transformación de la turbosina hizo mayor la tasa de biodegradación y crecimiento microbiano.

# INTRODUCCIÓN

---

## INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas importantes en materia de contaminación ambiental a nivel mundial es el vertido de hidrocarburos en ecosistemas acuáticos y terrestres (Rahman et al., 2002). La mayor contaminación es principalmente generada por procesos de embarque y desembarque de crudo en los puertos; operaciones de prospección, actividades de extracción, así como transporte, almacenamiento y refinación.

Los combustibles en el suelo causan problemas ecotoxicológico, por el potencial tóxico, carcinógeno y mutagénico que poseen los mismos (Seoánez, 1999). En consecuencia los efectos de las propiedades fisicoquímicas del suelo se ven alterados, sucediendo cambios en las condiciones de fertilidad; que a su vez alteran las actividades agrícolas y ganaderas; además de la subsecuente afectación de los mantos acuíferos que abastecen a la población humana.

En México, la explotación petrolera y todos los procesos relacionados con esta actividad han generado un incremento en la contaminación y la disposición de residuos en los ecosistemas antes mencionados; esto representa graves problemas ambientales y económicos. Por esta razón se han desarrollado nuevas técnicas aplicables como la biorremediación, la cual proporciona una solución ambiental segura efectiva y con costos relativamente bajos para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

La biorremediación es un proceso que tiene como principal objetivo acelerar la degradación total o parcial de un contaminante orgánico disminuyendo su toxicidad, movilidad e impacto ambiental (Dua et al., 2002). La biorremediación es conocida como un método efectivo de bajo costo para tratar suelos que contengan combustibles y otros residuos; consiste en una degradación selectiva de ciertos compuestos que son metabolizados por microorganismos autóctonos del suelo; pero la efectividad del proceso depende del tipo de combustible, de las poblaciones microbianas y de las condiciones del tratamiento (Salanitro et al., 1997).

El valor real de la contaminación se ve influenciado por el tiempo, tipo y cantidad de combustible que se haya derramado sobre el suelo, así como sus propiedades. La biodegradación de hidrocarburos puede verse afectada por las condiciones ambientales que se presenten en el sitio contaminado, por este motivo es indispensable controlarlas para que la

# INTRODUCCIÓN

---

actividad de los microorganismos degradadores sea eficiente. Además de que el número y actividad de los mismos también es importante tener en cuenta.

A partir de lo anterior, se puede establecer que la aplicación de técnicas de biorremediación exige un intenso monitoreo y control de variables operacionales; entre ellas los estudios cinéticos son de suma importancia, ya que estos indican en que tiempo y bajo qué condiciones se tiene una eficiente actividad microbiana.

En el presente estudio se presenta una cinética de crecimiento de un cultivo microbiano aclimatado a degradar altas concentraciones de turbosina en condiciones aerobias.

## **Justificación**

Estudios previos realizados en el laboratorio han mostrado la degradación de turbosina en un suelo contaminado, por lo que se consideró necesario conocer la cinética de reproducción utilizando un cultivo enriquecido aislado a partir de suelo.

## **Objetivo General**

- ❖ Realizar a nivel laboratorio una cinética con un cultivo microbiano aclimatado para degradar altas concentraciones de turbosina.

## 2. MARCO TEÓRICO

---

### 2.1. El Petróleo

La industria petrolera es fundamental en nuestro país, por año se extraen millones de toneladas de petróleo de yacimientos terrestres subterráneos y marítimos. La mayor parte es utilizada como combustible y una fracción en forma volátil, que en conjunto representa la principal fuente de energía industrial y doméstica. Tan sólo en nuestro país la producción promedio de crudo es de aproximadamente 2.85 millones de barriles diarios y paralelamente se extraen unos 1295 millones de metros cúbicos diarios mundiales (Schifter, 1998).

La vida sin el petróleo no podría ser como la conocemos. Del crudo se obtienen combustibles para todo tipo de motores y transportes. Se utiliza para generar electricidad, obtener energía calorífica para fábricas, hospitales, oficinas y diversos lubricantes para maquinaria y vehículos. La industria petroquímica usa productos derivados del petróleo para la fabricación de plásticos, fibras sintéticas, detergentes, medicinas, conservadores de alimentos, hules y agroquímicos (Ayllon y Chavez, 1994)

El petróleo ha transformado la vida de las personas y la economía de las naciones. Su descubrimiento creó riqueza, modernidad, ciudades industriales prósperas y nuevos empleos, motivando el crecimiento industrial (Schifter, 1998).

El crecimiento industrial en el mundo ha provocado el surgimiento de nuevos problemas en donde los de mayor impacto son los ambientales. La mayoría de las industrias generan contaminación en sus diferentes etapas productivas. El ambiente se puede afectar ya sea contaminando el aire, el agua o el suelo (Álvarez-Manilla et al., 2002)

La contaminación de suelos y acuíferos ocasionada por la industria petrolera se presenta durante actividades de extracción, refinación, petroquímica, transporte, distribución, almacenamiento y comercialización; por lo que en México todas las empresas de PEMEX están involucradas, Refinación, Exploración y Producción. Gas y Petroquímica Básica (Saval, 1995).

#### 2.1.1. Extracción y refinación del petróleo

Para obtener petróleo de las entrañas de la tierra, se hace una perforación en el terreno donde se sospecha la existencia de petróleo, y este se bombea, o bien se deja que la presión natural,

## 2. MARCO TEÓRICO

---

lo eleve hasta la superficie. Cuando la perforación ha alcanzado la zona petrolífera, se procede a la puesta en servicio del pozo, operación delicada si se quiere evitar problemas riesgosos, como los incendios.

Una vez realizada la extracción del crudo, éste es llevado por los buques-tanques, por vagones especiales o modernos oleoductos, a la refinería.

El petróleo crudo es depositado en los tanques de almacenamiento, en donde permanece por varios días para sedimentar y drenar el agua que normalmente contiene. Posteriormente, es mezclado con otros crudos sin agua y es bombeado hacia la planta para su refinación.

Una vez en la refinería comienza el proceso llamado destilación, el cual es fundamental, pues permite hacer una separación de los hidrocarburos aprovechando sus diferentes puntos de ebullición, que es la temperatura a la cual hierve una sustancia (Rosenberg y Ron, 1999).

El primer paso de la refinación del petróleo crudo se cumple en las torres de "destilación primaria" o "destilación atmosférica". En su interior, estas torres operan a una presión cercana a la atmosférica y están divididas en numerosos compartimientos a los que se denominan "platos". Cada plato tiene una temperatura diferente y cumple la función de fraccionar (separar) los componentes del petróleo. El crudo llega a estas torres después de pasar por un horno, donde se calienta a temperaturas de hasta 400 grados centígrados que lo convierten en vapor. Esos vapores entran por la parte inferior de la torre de destilación y ascienden por entre los platos a medida que suben pierden calor y se enfrían (SENER, 2010)

Cuando cada componente vaporizado encuentra su propia temperatura, se condensa y se deposita en su respectivo plato, al cual están conectados ductos por los que se recolectan los distintos cortes de destilación. Al fondo de la torre queda el crudo que no alcanzó a evaporarse en esta primera etapa. Se cumple así el primer paso de la refinación.

De abajo hacia arriba se han obtenido, en su orden: *gasóleos, queroseno, turbosina, nafta y gases ricos en butano y propano*. Algunos de estos, como la turbosina y queroseno son productos ya finales. Las demás cortes del destilado se envían a otras torres y unidades para someterlas a nuevos procesos, al final de los cuales se obtendrán los demás derivados del petróleo. En la Figura 1 se esquematizan los principales productos de la refinación y sus usos (PEMEX, 2002; SENER, 2010)

## 2. MARCO TEÓRICO

El petróleo crudo, como tal, no tiene aplicaciones; por lo que se debe transformar mediante un proceso de refinación; es en este punto donde la propiedad más importante para la refinación es la temperatura de ebullición

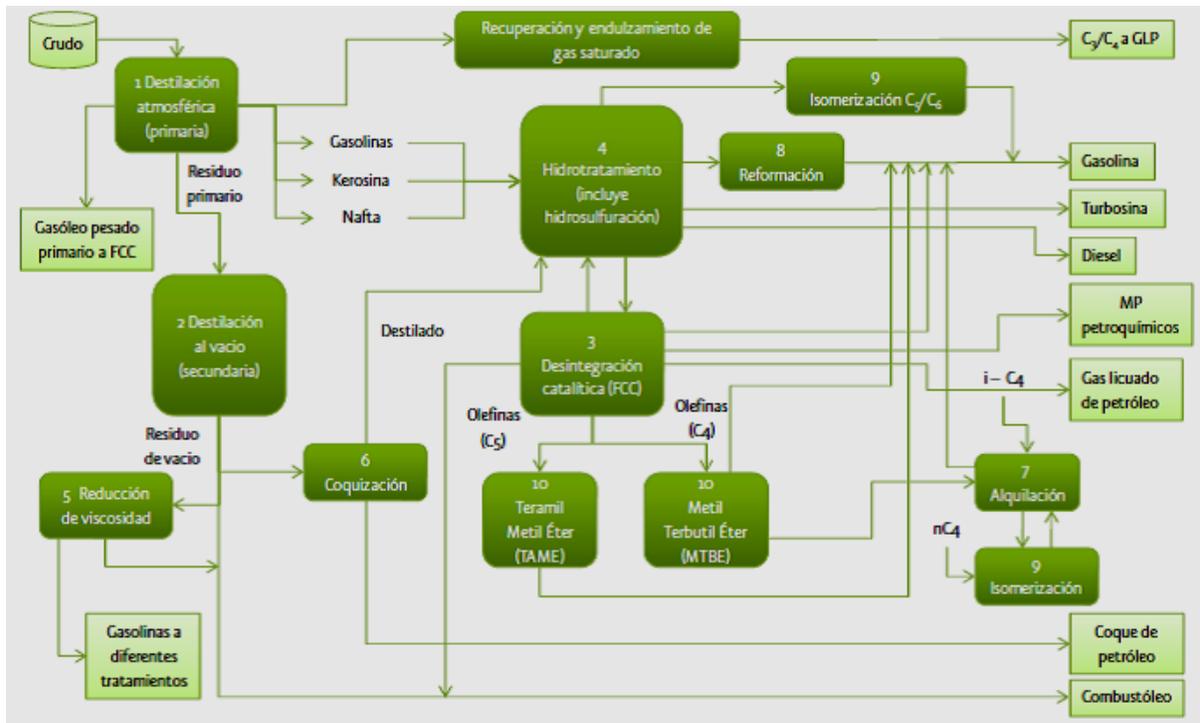


Figura 1. Refinación del petróleo (Fuente: SENER. Prospectiva de petrolíferos 2002-2011)

### 2.1.2. Clasificación de los hidrocarburos del petróleo

En términos químicos, el petróleo es una mezcla de compuestos a base de carbono e hidrogeno, con o sin otros elementos metálicos. Estos compuestos pueden estar en estado líquido, gaseoso o sólido y dependiendo de la naturaleza de los mismos y de las condiciones existentes de temperatura y presión, la composición de los mismos varía. Esta mezcla es compleja dada la capacidad del carbono de formar cuatro enlaces con otros átomos. Las cadenas formadas por el carbono se conocen como compuestos alifáticos y debido a sus enlaces se nombran como enlaces sencillos (alcanos), dobles (alquenos) o triples (alquinos) (Vander, 2006).

Las familias de compuestos existentes generalmente en el petróleo se agrupan en: parafinas (alcanos), isoparafinas, olefinas (alquenos), naftenos, compuestos aromáticos y compuestos de azufre, nitrógeno y oxígeno. Las parafinas son la familia más numerosa en el petróleo crudo,

## 2. MARCO TEÓRICO

---

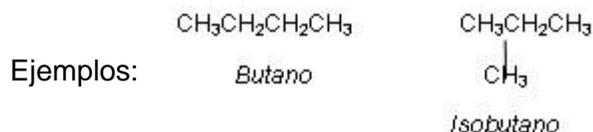
éstas pueden ser lineales o ramificadas (isoparafinas) y la longitud de éstas varía de 1 a 40 átomos de carbono. Las moléculas en las que se forman ciclos de carbono saturados son los naftenos, son un componente minoritario del petróleo crudo, y cuando presentan dobles uniones alternas (anillo bencénico) se tiene la familia de los aromáticos. Además hay hidrocarburos con presencia de azufre, nitrógeno y oxígeno formando familias bien caracterizadas, y un contenido menor de otros elementos (Valderrama, 2008). A continuación una breve explicación de las familias de hidrocarburos.

### **Hidrocarburos saturados** (IMP, 2011)

Los hidrocarburos saturados son los principales compuestos encontrados en el petróleo y en sus derivados. Su estructura consiste en enlaces simples C-C, estas moléculas pueden tener diversas configuraciones:

*Alifáticos*: lineales o ramificados, con la fórmula general:  $C_nH_{2n+2}$

Los nombres comunes para este tipo de compuestos son alcanos e isoalcanos; pero para la industria del petróleo se refieren a estos compuestos como *parafinas* e *isoparafinas*, respectivamente.



*Alicíclicos*: compuestos cíclicos con la formula general:  $C_nH_{2n}$

Estos compuestos son hidrocarburos saturados que tienen en su estructura uno o más anillos, los cuales pueden también contener cadenas unidas saturadas. Estos compuestos son llamados cicloalcanos. La industria del petróleo los denomina comúnmente *naftenos* o *cicloparafinas*.



## 2. MARCO TEÓRICO

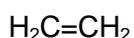
---

### *Hidrocarburos Insaturados*

Esta clase de compuestos tiene átomos de carbono en la molécula unidos por un enlace doble o triple. Estos compuestos no se encuentran en el petróleo crudo y son producidos principalmente en el proceso de craking en la producción.

*Alquenos /Olefinas:* estos compuestos pueden ser cadenas lineales, ramificados o compuestos cíclicos. La fórmula general es:  $C_nH_{2n}$

Ejemplos:



*Eteno*



*1-Buteno*

*Alquinos /Acetilenos:* estos compuestos se presentan en cadenas lineales y estructuras ramificadas. La fórmula general es:  $C_nH_{2n-2}$

Ejemplos:



*Etino*



*1- Butino*

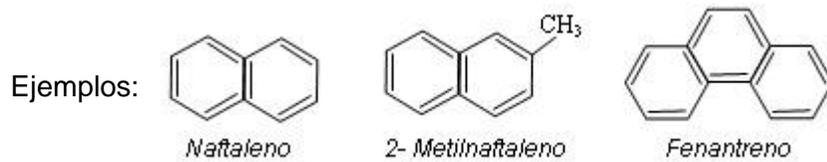
### ***Aromáticos*** (IMP, 2011)

La estructura de estos compuestos se basa en la estructura del anillo del benceno el cual es un anillo aromático simple con la fórmula general:  $C_nH_n$ . La molécula de benceno puede tener uno o más átomos de hidrógeno sustituidos por radicales alquilo, dando como resultado compuestos llamados alquil bencenos; o puede haber dos o más anillos aromáticos unidos llamados *hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)*. Todos los derivados del petróleo (excepto algunos solventes) contienen compuestos aromáticos. Varios HAP`s pueden ser contaminantes persistentes, particularmente en la matriz del suelo y sedimentos; son analitos blancos semivolátiles.

Estructura:

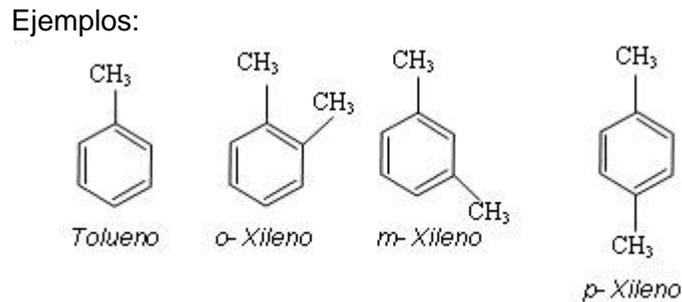


## 2. MARCO TEÓRICO



### **Alquilbencenos** (IMP, 2011)

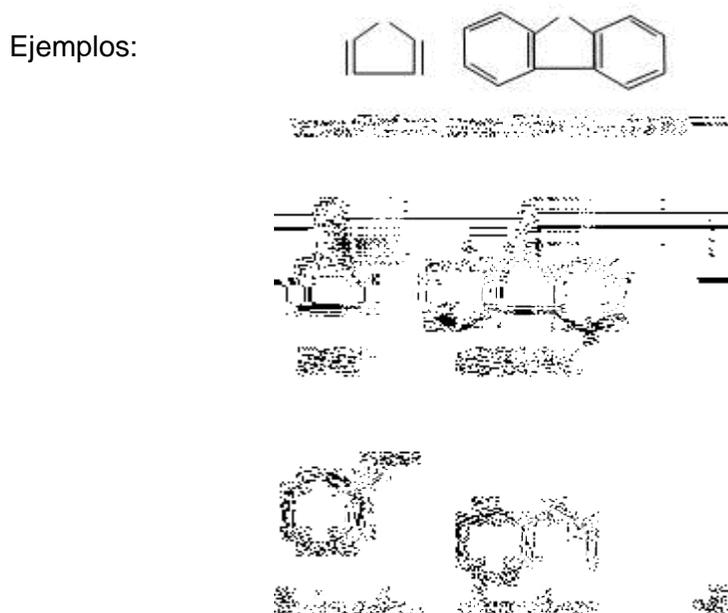
Los monoaromáticos, como el benceno, el tolueno y los xilenos, tienen una parecida solubilidad en agua, por lo tanto una mayor movilidad en ambientes acuosos. Los BTEX son considerados analitos volátiles.



### **Otros compuestos** (IMP, 2011)

El petróleo contiene trazas de compuestos orgánicos que no se consideran hidrocarburos, estos compuestos contienen oxígeno, nitrógeno y azufre. Estos compuestos son concentrados en las fracciones pesadas de destilación y en los residuos durante el refinado. Se hace referencia a ellos frecuentemente como *asfaltenos*.

Por definición, estos compuestos no son hidrocarburos.



## 2. MARCO TEÓRICO

---

### 2.1.3. La actividad petrolera en México

México es un país productor de petróleo. El petróleo es administrado por el gobierno federal a través de la compañía paraestatal Petróleos Mexicanos (PEMEX), y es ésta la que lleva a cabo todos los procesos tanto de exploración, explotación y procesamiento del petróleo (PEMEX, 1988).

En todo el territorio nacional existen importantes yacimientos que se encuentran en las regiones Sur (compuesta por Villahermosa y Tabasco), la región Norte (Poza Rica y Veracruz) y la región Marina (Ciudad del Carmen y Campeche) (PEMEX, 2009; Schifter, 1998).

PEMEX REFINACIÓN es el organismo subsidiario de Petróleos Mexicanos encargado de realizar la refinación del petróleo, cuenta con seis refinerías con capacidad de procesamiento primario de 1.54 millones de barriles diarios; opera una red de oleoductos y de ductos de 13.762 mil kilómetros (4.647 de oleoductos y 9.115 de la red de poliductos) que conecta a las refinerías con 77 centros de ventas (PEMEX, 2010)

Las seis refinerías son: Cadereyta con una producción de 275 MBD (millones de barriles diarios), Ciudad Madero con 190 MBD, Minatitlán con 185 MBD, Salamanca con 245 MBD, Tula 315 MBD y Salina Cruz con 330 MBD; además cuenta con una capacidad conjunta de almacenamiento de petróleo crudo y productos terminados de 13.9 millones de barriles (PEMEX, 2009) (Figura 2).

Cada crudo es diferente y éste genera fracciones que tienen propiedades fisicoquímicas desiguales, y de esto depende su clasificación mundial, esta clasificación está dada por una asociación estadounidense de la industria petrolera que patrocina una división de la producción petrolera; sus siglas de American Petroleum Institute (API). Esta asociación publica códigos que se aplican en distintas áreas petroleras y elabora indicadores, como el peso específico de los crudos que se denomina "grados API".

El **grado API**, es una medida de densidad que describe que tan pesado o liviano es el petróleo comparado con el agua. Si los grados API son mayores a 10, es más liviano que el agua, y por lo tanto flotaría sobre ésta. El grado API es también usado para comparar densidades de fracciones extraídas del petróleo (NOOA/HMRAD y API, 1994)

## 2. MARCO TEÓRICO



**Figura 2. Principales refinерías, poliductos y oleoductos de México en las diferentes regiones (Fuente: Petróleos Mexicanos, Pemex Refinación, 2010)**

Generalmente, un mayor valor de API representa que este tiene un mayor valor comercial. Esto básicamente debido a la facilidad (operacional y económica) de producir destilados valiosos como gasolina, turbosina y gasóleo con alimentaciones de crudos livianos y a los altos rendimientos de los mismos. Esta regla es válida hasta los 45 grados API, más allá de este valor las cadenas moleculares son tan cortas que hacen que los productos tengan menor valor comercial.

En México existen tres tipos de petróleo como puede observarse la tabla 1 (IMP, 2011):

**Tabla 1. Diferentes tipos de petróleo en México y su grado API**

<b>Olmeca:</b> Superligero con densidad de 39.3 grados API y 0.8% de azufre en peso.
<b>Istmo:</b> Ligero con densidad de 33.6 grados API y 1.3% de azufre en peso.
<b>Maya:</b> Pesado con densidad de 22 grados API y 3.3% de azufre en peso.

## 2. MARCO TEÓRICO

---

Conforme al proceso de refinación del petróleo crudo en el Sistema Nacional de Refinación de PEMEX; los productos principales que se generan en las diferentes refinerías del país se exponen en la tabla 2:

**Tabla 2. Producción de los diferentes productos de refinación del petróleo crudo en México**  
(Fuente: PEMEX REFINACION, 2002)

Elaboración de productos en refinerías	Miles de barriles diarios
Gas licuado	31
Gasolinas	398
Turbosina	57
Diesel	267
Combustóleo	450
Otros	73

### 2.2. Turbosina

La turbosina es también conocida como Jet Fuel (JP), es el combustible para turborreactores de combustión interna y es el más ampliamente utilizado en el campo de la aviación. El combustible contiene parafinas, (alcanos), cicloparafinas (cicloalacanos), compuestos aromáticos y olefinas, entre aproximadamente 9 y 20 átomos de carbono.

Los compuestos aromáticos de interés incluyen alquilbencenos, toluenos, naftalenos e hidrocarburos policíclicos aromáticos.

El combustible de aviación tiene básicamente la misma composición del Keroseno, pero está bajo especificaciones más estrictas. Dependiendo del origen del crudo y del método de producción podría considerarse que la composición de la turbosina varía (Roy, 1997). En la tabla 3 se resume el uso de diferentes tipos de turbosina.

El combustible más utilizado y conocido es el JP-A y Jet A-1, ya que son los más usados en la aviación comercial. En los siguientes párrafos a este tipo de combustible se le denominará solo

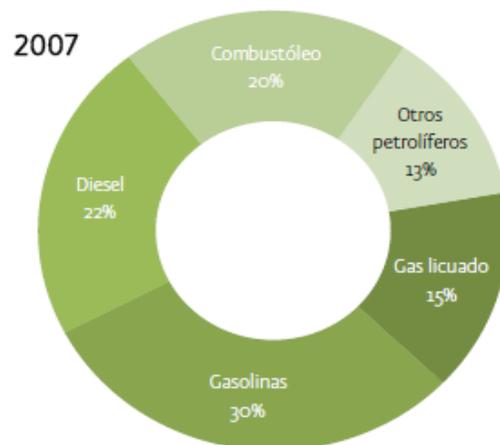
## 2. MARCO TEÓRICO

como turbosina para fines prácticos y por el hecho de que en México es conocido con este nombre y es el que más se utiliza (SENER, 2010).

**Tabla 3. Tipo de turbosina y sus aplicaciones para Estados Unidos de América 1997.**

Tipo de Turbosina o Jet Fuel (JP)	Usos
JP-1	Producto de baja calidad
JP-4	Usado en la aviación militar de la Fuerza Aérea
JP-7	En aviones avanzados supersónicos
JP-8	Parecido a JP A-1 utilizado en nuevos modelos militares
JP-A	En aviación civil
JP A-1	En aviación civil y en algunos modelos militares

A continuación se observan los siguientes figuras 3 y 4 se puede apreciar los porcentajes de producción de los diferentes combustibles extraídos del petróleo en México (la turbosina se encuentra en el grupo de Otros petrolíferos) y precios de la turbosina con respecto a las gasolinas y diesel que son los combustibles más vendidos en México (SENER, 2010).

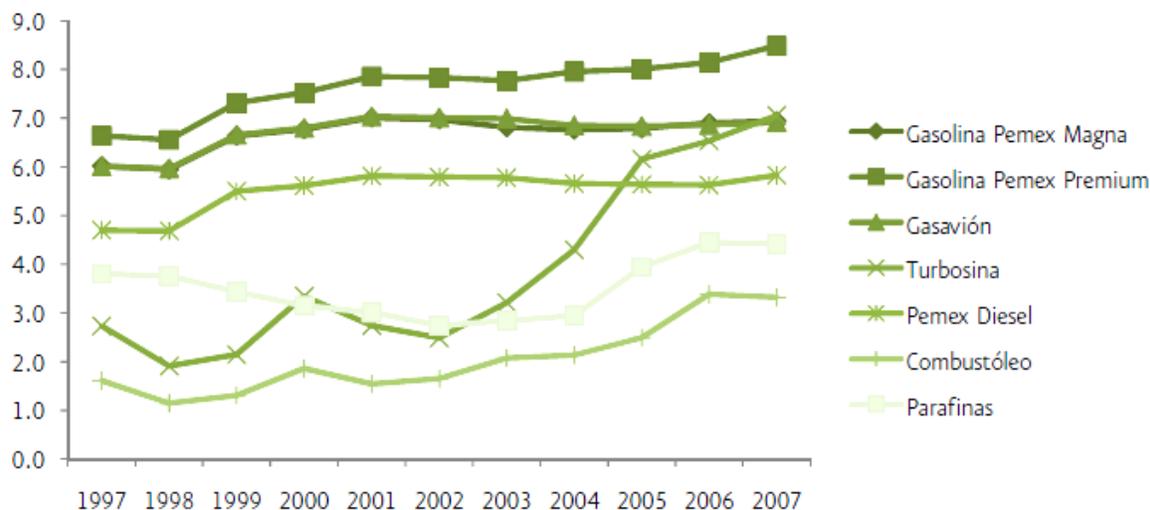


**Figura 3. Porcentajes de la producción de los diferentes petrolíferos en el 2007.**

(Fuente: SENER, 2010)

## 2. MARCO TEÓRICO

Pesos de 2007 por litro



**Figura 4. Precios de los principales petrolíferos 1997-2007. (Fuente: SENER, 2010 y Petróleos Mexicanos. Base de Datos Institucional, 2009)**

### 2.2.1. Información fisicoquímica de la turbosina

La turbosina es una mezcla principalmente de hidrocarburos saturados y aromáticos. Muchos de estos compuestos están presentes también en diesel. Los más de cien hidrocarburos que se encuentran en la turbosina pueden ser divididos en pocas clases de hidrocarburos con propiedades similares. Estos incluyen parafinas (alcanos), cicloparafinas (cicloalcanos), aromáticos (anillos de seis carbonos saturados) y olefinas (alquenos y cicloalquenos).

Un 75-95% por volumen de los hidrocarburos de la turbosina son compuestos parafínicos y nafténicos, teniendo limitado el contenido de aromáticos de un 10-25% por volumen; finalmente las olefinas son los compuestos más reactivos y sólo son permitidos en 5% por volumen. Sin embargo, la composición específica de este combustible varía de un lote a otro (Roy, 1997).

La turbosina también puede contener diferentes aditivos, como son los compuestos sulfurados, gomas, alcoholes, ácidos nafténicos, antioxidantes e inhibidores del punto de cristalización y de corrosión (Roy, 1997).

En la Tabla 4, se muestra las principales características de la Turbosina comercial en México (PEMEX, 1998)

## 2. MARCO TEÓRICO

---

**Tabla 4. Principales características de la turbosina. (Fuentes: National Park Service, Water Resources Divisions, 1997. PEMEX REFINACION, 1998)**

Característica	
Grado API	37/51
Punto de fusión, °C, mín	43
Densidad relativa (H <sub>2</sub> O = 1) 20/4 °C	0.772 / 0.837
Punto de cristalización, F, máx	- 40
Temperatura de ebullición (°C)	160-300 a 760 mm Hg (aprox)
Contenido de compuestos sulfurados, % peso	0.035
Contenido de compuestos nafténicos, % peso	1.59
Contenido de aromáticos, % vol.	18.5
Contenido de olefinas, % vol.	1.0

### 2.2.2. Toxicidad de la turbosina

Por ser un combustible de aviación la turbosina es producida bajo especificaciones muy estrictas, ya que de éstas depende un vuelo seguro; sin embargo, como todos los productos derivados del petróleo, la identificación exacta de los hidrocarburos que la constituyen varía con la composición del crudo original y con el proceso de refinación (Landis et al., 1993).

La toxicidad de la turbosina va de moderada a aguda en los seres vivos, esto depende al tipo y concentración de compuestos aromáticos que contenga. En términos generales, el riesgo potencial enfocado a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (siglas en ingles HAPs); debido a su persistencia y a los potenciales efectos crónicos pueden contribuir a largo plazo a cambios en el hígado y efectos dañinos sobre los riñones, corazón, pulmones y sistema nervioso, incrementando el índice de cáncer, enfermedades inmunológicas, efectos en la reproducción, efectos genotóxicos que han sido asociados a por lo menos un compuesto presente en la turbosina (NOOA/HMRAD y API, 1994).

En la actualidad existe el debate de cómo los HAPs y otros compuestos aromáticos en mezclas típicamente complejas, se pueden clasificar como carcinógeno y los detalles de cómo funcionan éstos en el ámbito ecológico y humano.

## 2. MARCO TEÓRICO

---

### 2.3. El suelo

El suelo es un sistema abierto en el espacio y en el tiempo, que no es no renovable; está constituido por tres fases: la fase sólida, compuesta a su vez por la fracción mineral y la orgánica; la fase líquida, que es principalmente agua con sales disueltas y la fase gaseosa, que ocupa el espacio que la fase líquida deja libre en la porosidad del suelo (Vallejo et al. 2005). Como consecuencia de estas tres fases, el suelo presenta propiedades que dependen de la composición y la constitución de sus componentes.

Los gases y la dinámica general del agua ejercen también un papel importante, el primero proporciona el suficiente oxígeno para la actividad microbiana; y el segundo está relacionado con el exterior en lo que se refiere a los aportes, como son las fuentes, la lluvia o la infiltración y en lo que se refiere a las pérdidas, como son la evaporación o la infiltración de las aguas subterráneas (acuíferos y corrientes).

El suelo no sólo está confinado a la importancia que éste tiene sobre el ambiente; sino también a la importancia que éste tiene en la vida cotidiana e industrial.

Las principales funciones que el suelo posee, son las siguientes (Saval, 1999):

- Regulador de los ciclos del agua y biogeoquímicos.
- Medio filtrante del agua que recarga a los acuíferos y consiguientemente la protección de los mismos.
- Espacio de actividades agrícolas, ganaderas, forestales y recreativas.
- Hábitat de una gran diversidad de organismos.
- Base de la construcción de obras civiles.
- Hospeda la riqueza cultural de la historia y el paisaje.

#### 2.3.1 Actividad depuradora del suelo

El conjunto de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo lo hacen un sistema importante en los ciclos biogeoquímicos, en los que actúa como un sistema apreciablemente complejo, capaz de realizar funciones de filtración, descomposición, neutralización, inactivación y almacenamiento. Por todo ello el suelo actúa como barrera protectora; es decir, que posee

## 2. MARCO TEÓRICO

---

una cualidad de amortiguación de otros medios más sensibles, como los hidrológicos y los biológicos.

El suelo es también considerado como un sistema depurador, ya que es capaz de degradar varios compuestos o inmovilizarlos. Esta capacidad depuradora es resultado de la suma de varios mecanismos, los cuales son: *neutralización, degradación biótica o abiótica, adsorción, reacciones complejas, inmovilización y filtración, entre otras.*

La capacidad depuradora del suelo no es infinita, en ocasiones el umbral de depuración se ve seriamente rebasado al punto de ser imposible y da como resultado la degradación del mismo.

La mayoría de los suelos presentan una elevada capacidad de depuración es diferente para cada tipo de suelo y para cada tipo de contaminación; es decir, no va actuar de la misma manera si el contaminante es un hidrocarburo a cuando es un agente químico de otra índole.

La capacidad de amortiguamiento del suelo, su resiliencia y su capacidad de filtrar y absorber sustancias contaminantes hacen que los daños no se perciban hasta una fase muy avanzada. Es probable que ésta sea la razón principal por la que no se haya fomentado la protección del suelo en la misma medida que la protección del aire y del agua (Seoáñez, 1999).

### 2.3.2 Contaminación del suelo y consecuencias

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, siglas de Food and Agriculture Organization) define la contaminación como una forma de degradación química que provoca la pérdida parcial o total de la productividad del suelo (FAO, 1996)

El suelo puede degradarse al acumularse en él sustancias a niveles elevados que se convierten en tóxicas, lo que repercute en el comportamiento natural del mismo, física, química y biológicamente; situación que provoca la pérdida parcial o total de su productividad. Puede considerarse como degradación del suelo, a toda modificación que conduzca a su deterioro (Seoáñez, 1999)

Las causas más frecuentes en la contaminación del suelo son debidas en gran medida a las actividades humanas, que al desarrollarse de una manera inadecuada producen un cambio

## 2. MARCO TEÓRICO

---

negativo de las propiedades del mismo. Estas actividades suelen ser directas o indirectas; las directas están relacionadas con agricultura, actividad forestal, ganadera y el riego, las indirectas son las industriales, de eliminación de residuos y de transporte, entre otras (Agencia Europea de Medio Ambiente (EEA, 2002)

Entre las consecuencias de la contaminación del suelo se destacan las siguientes (EEA, 2002):

- Modificación de las propiedades fisicoquímicas.
- Deterioro de la estructura.
- Disminución de la capacidad de retención del agua por degradación de la estructura o por pérdida de suelo.
- Incremento de la toxicidad, ya que al perder la capacidad autodepuradora las concentraciones de contaminantes se elevan.

### 2.3.3 Contaminación del suelo con hidrocarburos

Las características determinantes de los hidrocarburos en el suelo son las siguientes: densidad, presión de vapor, coeficiente de partición de suelo, polaridad (EEA, 2002), electronegatividad e hidrofobicidad, esta última es la característica química más importante para asegurar lo siguiente: (a) movilidad química, (b) estabilidad química, (c) acumulación química, (d) bioacumulación química y (e) sorción química y solubilidad en el agua. La alta solubilidad de un compuesto promueve su mayor movilidad y tiene menor probabilidad de ser acumulativo, bioacumulativo, volátil y persistente; por lo tanto tiene una mayor probabilidad de ser biodegradado y metabolizado por los microorganismos el contenido de materia orgánica del suelo o sedimento es importante en la adsorción de los contaminantes orgánicos (Dorronso y García, 2004).

Además de las características físicas y químicas antes mencionadas de los compuestos contaminantes, también se toman en cuenta las características del medio, como son la unidad del suelo, permeabilidad, estructura, tamaño de las partículas, contenido de humedad y de materia orgánica, así como la profundidad del manto freático, factores climatológicos como la temperatura y la precipitación pluvial también tienen una gran influencia. Todas las variables en su conjunto definen el tamaño y la distribución tridimensional del frente de contaminación en una zona específica.

---

## 2. MARCO TEÓRICO

---

La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) (SEMARNAT, 1996), establece que las propiedades físicas del suelo más afectadas por derrames de hidrocarburos son:

- La estructura del suelo debido a la ruptura de los agregados.
- Aumento de la retención del agua en la capa superficial.
- El potencial hídrico.

Las propiedades químicas del suelo más afectadas por un derrame de hidrocarburos son (SEMARNAT, 1996):

- Aumento de carbono orgánico, ya que el 75% del carbono del petróleo crudo es oxidable.
- Disminución del pH, debido a la acumulación del carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos.
- Aumento del manganeso y hierro intercambiable.
- Aumento del fósforo disponible.

Los efectos tóxicos de los hidrocarburos en el ambiente dependerán de (SEMARNAT, 1996):

- La cantidad y composición del producto.
- La frecuencia y tiempo de exposición.
- El estado físico del derrame.
- Las características del sitio donde sucedió el derrame.
- Variables ambientales como temperatura, humedad y oxígeno
- El uso de dispersantes químicos.
- La sensibilidad de la biota específica del ecosistema impactado.

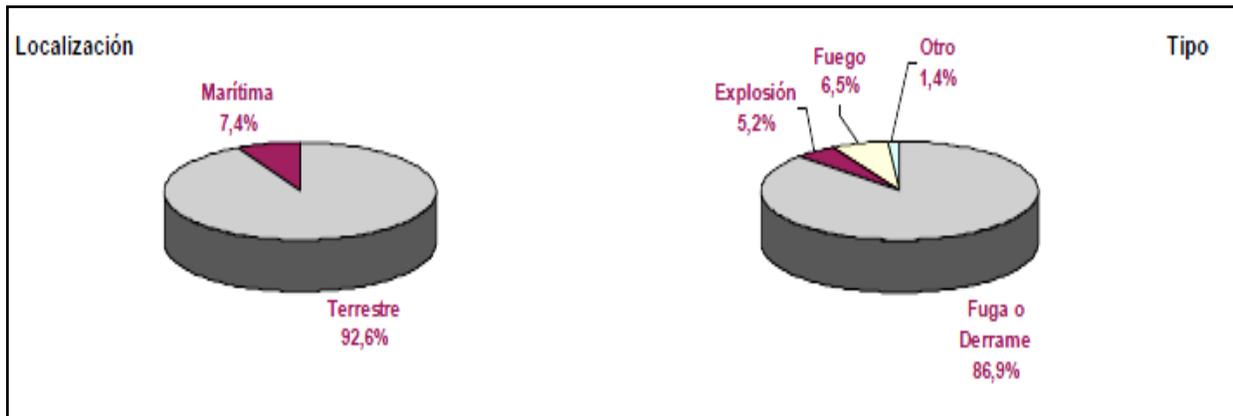
### 2.3.3.1 Contaminación de suelos con hidrocarburos en México

La principal causa de contaminación de suelos con petróleo y sus derivados se debe principalmente a derrames o fugas, ocasionados por diversas causas entre ellas, los accidentes durante la carga y descarga (Álvarez-Manilla et al., 2002; Flores et al., 2004).

En el año 2009, un estudio realizado por la PROFEPA arrojó los siguientes datos mostrados en la figura 5. De acuerdo con las cifras reportadas por la Procuraduría Federal de Protección al ambiente (PROFEPA), el tipo de eventos ocurridos en emergencias ambientales durante el

## 2. MARCO TEÓRICO

periodo 1993-2009 se debe a fugas o derrames, seguido por las fuego y explosión (PROFEPA, 2010) (Figura 6).

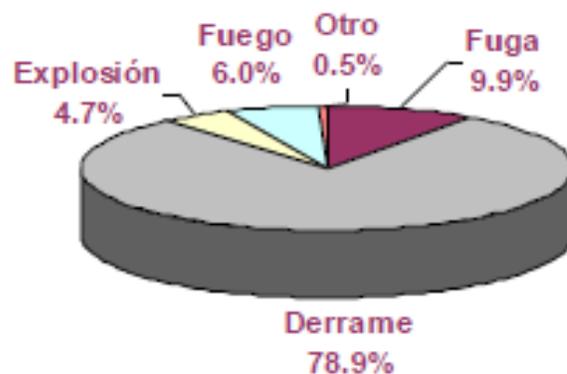


**Figura 5. Localización y Tipo de las Emergencias Ambientales Reportadas a la PROFEPA**  
(Fuente: PROFEPA 2009)

Conforme a los datos anteriores se deduce que el principal problema, desde el punto de vista de contaminación, son los derrames en el caso de los combustibles transportados por carretera, que en los últimos años han ocupado el primer lugar; para el caso de las emergencias ambientales suscitadas en la red de ductos, se consideran las fugas (PROFEPA, 2010).

La contaminación de suelos por fugas ocurre principalmente durante el transporte de hidrocarburos a través de la red de ductos con la que cuenta actualmente PEMEX, además de la toma clandestina.

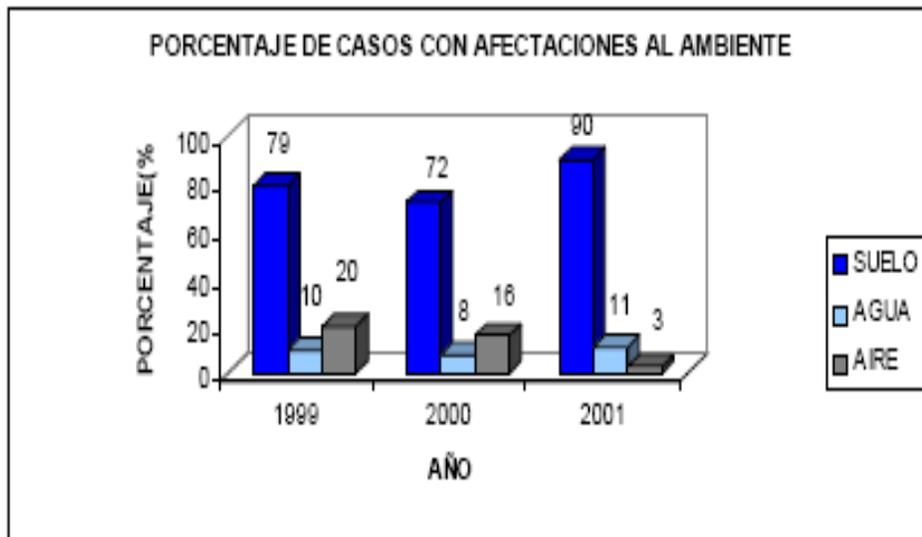
Cerca de la mitad de los ductos tienen más de 30 años de operación, por lo que son susceptibles a la corrosión y fallas del material.



**Figura 6. Tipo de eventos ocurridos en emergencias ambientales durante el transporte**  
(Fuente: PROFEPA, 2010)

## 2. MARCO TEÓRICO

Se ha identificado que gran parte de las fugas de combustibles contaminantes ocurre en zonas donde el suelo no tiene ningún recubrimiento; y que en los ductos, el mal estado de los empaques produce un goteo constante de combustible, que de manera individual no son significativas para la cantidad transportada, sin embargo, si se suman estos pequeños derrames, se obtienen cantidades de importancia que viajan al suelo y producen contaminación (Álvarez-Manilla et al., 2002).



**Figura 7. Porcentaje de casos con afectaciones al medio ambiente**  
(Fuente: PROFEPA, 2003)

De acuerdo con los datos de la PROFEPA, se puede apreciar en la figura 7, que el suelo fue el medio más afectado durante el periodo 1999-2001, con un porcentaje promedio para los tres años de un 80% (Flores et al., 2004).

A partir de lo anterior, se deduce que la mayor parte de los derrames han afectado al suelo.

### 2.4 Normatividad

Una vez que se ha diagnosticado el estado de contaminación del suelo en un sitio, se deben plantear opciones para su limpieza hasta niveles aceptables, es decir, el límite máximo de contaminación que se aceptará en un suelo después de haber sido sometido a un tratamiento de remediación.

## 2. MARCO TEÓRICO

---

En la actualidad, la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos afectados, las especificaciones para la caracterización del sitio, las especificaciones ambientales para la remediación, la evaluación de la conformidad y el grado de concordancia con normas internacionales (DOF, 2005).

### 2.5 Biorremediación

Es un proceso biológico que consiste en el uso de microorganismos para degradar o transformar sustancias peligrosas presentes en un sitio contaminado formando compuestos no tóxicos como agua, dióxido de carbono, ácidos grasos y otros productos inocuos. Es una de las técnicas más prometedoras para tratar suelos contaminados, ya que ofrece una solución permanente.

Al contrario de la biodegradación que se produce naturalmente, la biorremediación es un proceso dirigido por el hombre generalmente con el propósito de subsanar el medio ambiente, empleando los microorganismos que existen de manera natural en el suelo tales como hongos, bacterias y levaduras aclimatados para degradar el contaminante de interés y adicionados externamente al suelo.

El conocimiento sobre las rutas de degradación microbiana de contaminantes, es conocido por estudios realizados con microorganismos aislados en cultivos a nivel laboratorio. Para entender este proceso es necesario tomar en cuenta tres objetivos principales, los cuales son: (1) Degradación de productos del petróleo por la población microbiana, (2) los factores que afectan el proceso de biodegradación y (3) la estructura química del producto del petróleo sobre el proceso de biodegradación. A continuación se explicarán los puntos antes mencionados (Englert et al., 1993).

#### 2.5.1 Clasificación de las técnicas de remediación

Las técnicas para remediación de suelos contaminados se han desarrollado en los últimos años, principalmente como resultado de las acciones por parte de los gobiernos, como es la expedición de leyes y reglamentos que hacen responsables a los propietarios de las industrias o de la tierra, de la contaminación que ocasionan sus actividades, exigiéndoles la limpieza del suelo contaminado. Aún en los países desarrollados, la experiencia sobre remediación de suelo

## 2. MARCO TEÓRICO

---

es relativamente reciente, las universidades y empresas continúan desarrollando técnicas para limpieza del suelo, las cuales se someten a evaluación sobre la práctica según la política que para tal efecto tiene cada país.

En México la clasificación de las técnicas de remediación de suelos contaminados está regida por el Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los residuos en la Sección V Artículo 143 (DOF, 2006), en donde se clasifican conforme a su forma de operación o aplicación en los siguientes tipos:

- Se considerará que los suelos son tratados a un lado del sitio (*in situ*), cuando el tratamiento se realiza sobre un área adyacente al sitio contaminado o sobre un área dentro del sitio contaminado, previa remoción del suelo y materiales semejantes a suelos.
- Serán suelos tratados fuera del sitio (*off site*), cuando se remueve el suelo y los materiales semejantes a suelos contaminados a un lugar fuera de aquél donde se ubican, para someterlos a tratamiento en instalaciones fijas autorizadas.

Las características de las técnicas de biorremediación en general son las siguientes:

- Económicas: más baratas que otras tecnologías.
- Efectivas: los contaminantes son realmente degradados.
- Versátiles: el proceso se adapta a las condiciones del sitio según sus requerimientos.
- Seguras: no causan daños al ambiente.

La biorremediación funciona para:

- Compuestos orgánicos en suelos y cuerpos de agua que sean biodegradables o biotransformables.
- Compuestos inorgánicos en cuerpos de agua que son bioacumulables o biotransformables.
- Compuestos orgánicos e inorgánicos en suelos que sean biotransformables (Flores et al., 2004).

La biorremediación no funciona para:

- Compuestos orgánicos recalcitrantes ya que no son biodegradables (Flores et al., 2004).

---

## 2. MARCO TEÓRICO

---

### 2.5.2 Ventajas y desventajas de la biorremediación

#### Ventajas

- Se pueden usar microorganismos naturales propios del suelo, para degradar sustancias peligrosas o sustancias menos tóxicas, o inocuas.
- Es un proceso natural, eficaz en función del costo, que puede aplicarse a muchos desechos orgánicos comunes.
- Por su costo y eficiencia ofrece ventajas sobre otros sistemas utilizados para la degradación, o separación de contaminantes en suelo y agua
- El suelo puede ser reincorporado a su vocación natural.
- Las bacterias exógenas o degradadoras de los contaminantes mueren cuando los nutrientes y los contaminantes orgánicos se agotan (Flores et al., 2004).

#### Desventajas de la biorremediación

- En las arcillas es muy difícil llevar a cabo una biorremediación debido a la baja permeabilidad.
- Requiere de mucho tiempo según el tipo de contaminante.
- En ocasiones, las bacterias se inhiben por la alta concentración de contaminantes.
- En ocasiones se promueve involuntariamente la volatilización de hidrocarburos (Flores et al., 2004).

### 2.5.3 Biodegradación microbiana de hidrocarburos en suelo

Existen varios mecanismos o procesos por los cuales los contaminantes orgánicos sufren cambios o degradación; esto depende de la funcionabilidad química del compuesto, ya que puede ser retenido o inmovilizado, lo que impide su transferencia a otros medios y retarda, en principio su degradación. No obstante la principal forma de degradación del compuesto o compuestos orgánicos en el suelo se da a través de procesos de biodegradación, debido a la relativamente elevada concentración de microorganismos que catalizan las reacciones químicas (Domenech y Peral, 2006).

Se halla considerable evidencia de que la turbosina puede ser biodegradada en el suelo. Se sabe que varios de sus componentes son degradados por microorganismos. Un aumento en la

## 2. MARCO TEÓRICO

---

actividad microbiana tras la adición de turbosina al suelo ha sido asociada con el incremento del crecimiento microbiano y la disminución de los hidrocarburos residuales (Eve, 1992).

Comparaciones hechas en el laboratorio entre suelos contaminados y no contaminados con turbosina muestran que ambos son capaces de generar actividad degradadora bajo condiciones aerobias, cuando nitrógeno, fósforo y minerales traza son adicionados (Vallejo et al., 2005). El estudio realizado en 1990 muestra que el suelo no contaminado presentó una fase lag antes de que la biodegradación haya iniciado, mientras que en el suelo contaminado la biodegradación ocurrió en forma inmediata (Song et al., 1990). Estos datos indican la importancia de la adaptación microbiológica a la biodegradación de la turbosina en el suelo.

Otros experimentos realizados en ese mismo año en suelos no aireados muestran que la biodegradación de los hidrocarburos ocurre, pero es considerablemente reducida comparada con la degradación en condiciones aerobias. Ellos mismos sostienen la evidencia de que la mayor parte de la biodegradación de turbosina ocurre en presencia de oxígeno (Song y Bartha, 1990).

En contraste con los ejemplos antes mencionados existen varios reportes en la literatura, donde la adición de microorganismos degradadores de compuestos orgánicos no mostró ningún efecto en el suelo o cuando los microorganismos eran incluso inferiores a la flora existente (Stegmann et al., 2001)

### **2.5.4 Factores que afectan el proceso de biorremediación.**

Un número de factores afectan el proceso de biodegradación y el manejo de éstos ayudará a neutralizar los efectos no deseados. Existen 4 factores principales que afectan el proceso de degradación microbiana en el suelo (Englert et al., 1993):

- 1) El primer factor limitante es la escasez o ausencia de una adecuada fuente de energía para los microorganismos.
- 2) El rango de pH, el cual es mejor para los microorganismos del suelo entre 6 y 7.
- 3) La temperatura, que afecta el grado de degradación de compuestos químicos orgánicos. La degradación óptima de hidrocarburos del petróleo con bacterias aerobias ocurre entre 15°C y 30°C.

## 2. MARCO TEÓRICO

---

- 4) Oxígeno tiene un efecto significativo sobre la degradación del petróleo, las altas concentraciones de algunos químicos pueden disminuir o aumentar la degradación porque reducen el tiempo de aclimatación y/o incrementan el crecimiento y la actividad de la población microbiana (Englert et al., 1993).

### 2.5.5 Estructura química y biodegradación

El potencial de degradación de los hidrocarburos del petróleo puede ser generalmente estimada basándose en su estructura química. La susceptibilidad de los productos del petróleo a la biodegradación varía con los tipos y tamaños de los componentes. La biodegradación de los productos del petróleo es generalmente descrita por la siguiente ecuación:



Los alcanos, alquilaromáticos y aromáticos son los predominantes en los productos del petróleo. Los n-alcanos, n-alquilaromáticos y compuestos aromáticos de un rango de C<sub>10</sub> a C<sub>22</sub> son los menos tóxicos y más rápidamente biodegradables (Englert et al., 1993).

Los productos del petróleo contienen amplia diversidad de estructuras químicas; lo importante es que el suelo tenga microorganismos con la capacidad para degradarlos. Sin embargo, algunos no pueden ser degradados por vía microbiana e incluso pueden inhibir o retrasar el ataque a compuestos degradables. Algunos derivados del petróleo varían en las proporciones de parafinas, aromáticos e hidrocarburos asfálticos; el grado que alcance la biodegradación depende de la proporción de los compuestos presentes y su biodegradabilidad. Cada compuesto orgánico tiene características únicas que dictan, el mecanismo o la combinación de mecanismos que controlan el proceso de degradación (Vallejo et al., 2005).

### 2. Cinética microbiana

Se entiende por crecimiento microbiano el aumento en el número de microorganismos a lo largo del tiempo; esto es el crecimiento de una población, pero no el crecimiento de un solo individuo. Si la bacteria crece en un medio líquido, en la mayoría de los casos las células que se producen en cada división continúan su vida independientemente formándose una suspensión de células libres.

## 2. MARCO TEÓRICO

En un cultivo de bacterias en medio líquido, se pueden diferenciar cuatro fases en la evolución de los parámetros que miden el crecimiento microbiano (Devlin, 1999):

1.- **Fase lag o de adaptación** durante la cual los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo) para iniciar la fase de crecimiento exponencial.

2.- **Fase exponencial o logarítmica**: en ella la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta fase las bacterias consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio.

3.- **Fase estacionaria**: en ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo). Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios. Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para que continúe el crecimiento microbiano.

4.- **Fase de muerte**: se reduce el número de bacterias viables en cultivo (Devlin, 1999).

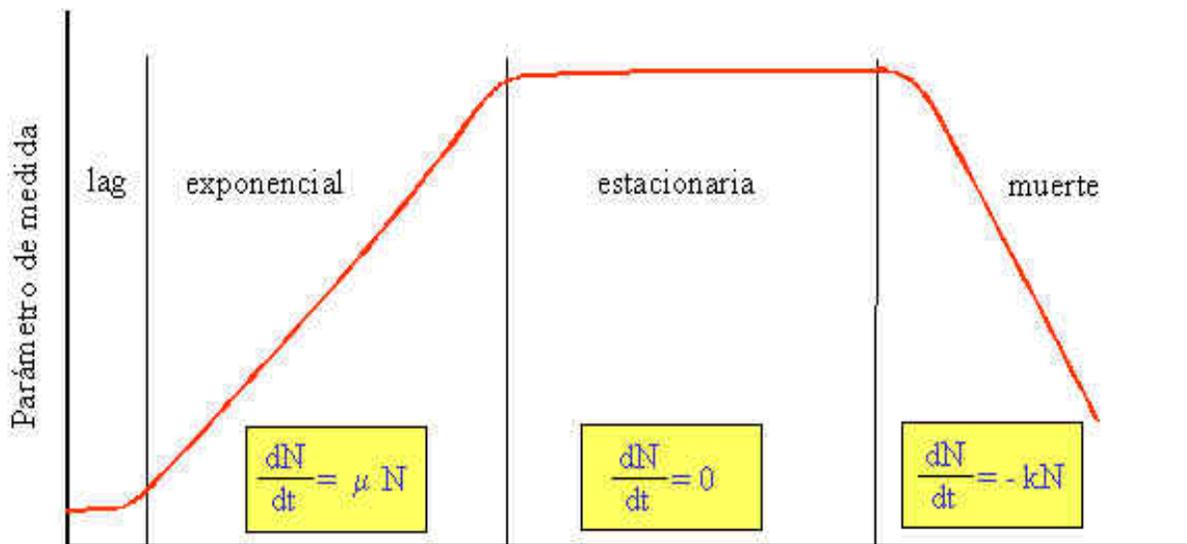


Figura 8. Curva de crecimiento de un cultivo bacteriano

## 2. MARCO TEÓRICO

---

### 2.6.1 Cinética de crecimiento

Es importante conocer la cinética de crecimiento microbiano para predecir cómo va a evolucionar un cultivo, cómo se va a consumir el substrato y cómo se van a acumular los productos en el cultivo. Las células aisladas cultivadas en un volumen finito de medio de cultivo van utilizando los nutrientes que tienen disponibles con la mayor eficiencia y rapidez que pueden, sintetizando sus propios componentes celulares y dividiéndose en cuanto se haya duplicado su masa y su material genético. El tiempo que tarda una célula en hacer todo lo anterior se conoce como tiempo de generación ( $t$ ) y puede variar. Cada vez que transcurre un tiempo de generación, el número de células se duplica, siguiendo, por tanto, un incremento exponencial (Nuñez, 2001).

### 2.6.2 Crecimiento en función de la tasa de reproducción (Russel y Ginn, 2004)

Una forma de representar la cinética de crecimiento es considerando el incremento en el número de células ( $dX$ ) en un intervalo corto de tiempo ( $dt$ ). En este caso, la ecuación que describe la cinética es la siguiente:

$$dX/dt = \mu X \quad (\text{ecuación 1})$$

esto es: el incremento del número de células ( $dX$ ) por unidad de tiempo ( $dt$ ) es proporcional al número de células presentes en el cultivo ( $X$ ). A la constante de proporcionalidad ( $\mu$ ) se le denomina tasa de crecimiento o velocidad de crecimiento.

Al integrar la ecuación anterior durante el tiempo de cultivo, se transforma en la siguiente función exponencial:

$$X = X_0 e^{\mu t} \quad (\text{ecuación 2})$$

la transformación de esta ecuación en una recta (tomando logaritmos) rinde lo siguiente:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu t \quad (\text{ecuación 3})$$

esto es: el incremento del logaritmo del número de células aumenta linealmente con el tiempo siendo la constante de proporcionalidad  $\mu$ .

Las ecuaciones anteriores permiten predecir cuál será el número de células ó masa celular, después de un cierto tiempo de cultivo ( $t$ ).

---

## 2. MARCO TEÓRICO

---

### 2.6.3 Cinética de Monod

Para poder relacionar la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) con la concentración de sustrato (S) es necesario aplicar la expresión matemática que relaciona ambos parámetros y se conoce con el nombre de ecuación de Monod:

$$\mu = \mu_{\text{máx}} [S/(K_s+S)] \quad (\text{ecuación 4})$$

En condiciones de sustrato abundante, la concentración de éste no afecta al valor de  $\mu$ ; pero cuando el sustrato se hace limitante, sí existe ese efecto. La tasa de crecimiento ( $\mu$ ) depende de la máxima que puede alcanzar el microorganismo ( $\mu_{\text{máx}}$ ), de la concentración de sustrato (**S**) y de una constante, **K<sub>s</sub>**, que representa la concentración de sustrato a la que se alcanza una tasa de crecimiento igual a la mitad de la máxima. Para que se cumpla esta ecuación el rendimiento debe ser independiente de la concentración de sustrato; por lo tanto la ecuación de Monod tendrá mucha importancia al tratar de cultivos continuos (Bernd, 2002; Hermann, 2007).

En la práctica, los valores de  $K_s$  suelen ser muy bajos, lo que indica que los microorganismos crecen con tasas ( $\mu$ ) muy próximas a las máximas ( $\mu_{\text{máx}}$ ) a concentraciones de sustrato bajas y sólo cuando estas son extremadamente bajas, la velocidad de crecimiento se reduce. Esto es debido a que los sistemas de transporte de nutrientes suelen tener valores de  $K_m$  considerablemente reducidos (La  $K_m$  indica la concentración de sustrato a la que la velocidad de transporte es la mitad de la máxima) (García y Peralta, 2008).

La ecuación de Monod fue originalmente ideado para describir el crecimiento de un cultivo de una sola especie con una constante insignificante sobre un solo sustrato de crecimiento. El modelo de Monod asume poco mantenimiento y un factor constante producido; además esto presupone un constante crecimiento de biomasa. El uso de las cinéticas de Monod solo permite describir la cinética de biodegradación o de consumo del sustrato por células en reposo y no en crecimiento variable; si esto fuera posible, se tendría que aplicar esta ecuación pero de manera independiente para modelar el consumo del sustrato pero en células en crecimiento constante en ausencia de cosustratos; es decir en condiciones ideales de cultivo; puesto que la ecuación de Monod no puede explicar los siguientes efectos: i) inhibición del consumo de sustrato por el cosustrato y viceversa y ii) el decaimiento celular en ausencia del sustrato. Para que se pueda disminuir estos efectos o bajo las condiciones de crecimiento variable en presencia de

## 2. MARCO TEÓRICO

---

multisustratos es necesario recurrir a modelos más complejos como la ecuación modificada de Haldane (García y Peralta, 2008).

### 2.7 Cinéticas de biodegradación

El petróleo y mucho de sus productos refinados contienen miles de hidrocarburos y compuestos relacionados. Cuando cada compuesto petroquímico entra en un sistema acuático, son sujetos a varios factores físicos, químicos y biológicos que contribuyen a perder o alteración de muchos de sus componentes (Eve, 1992).

El control cinético viene determinado por varios factores que dependen de: a) el compuesto en sí (propiedades fisicoquímicas); b) el suelo (propiedades fisicoquímicas) la humedad, el contenido de materia orgánica, porosidad, etc.; y c) el medio ambiente (pluviosidad, la temperatura atmosférica, renovación de aire, etc.) (Dómenech y Peral, 2006)

La tasa de mineralización de un número de compuestos químicos orgánicos es directamente proporcional a su concentración sobre un amplio rango de concentraciones. Los parámetros que influyen en la cinética de biodegradación son de 2 tipos (Eve, 1992):

1. Los que determinan la disponibilidad y concentración de los compuestos para ser degradados o que afectan la población microbiana del sitio y actividad de los mismos. Como son solubilidad, dispersión, difusión, volatilidad, viscosidad, densidad, dilución; por mencionar algunos.
2. Los que controlan la reacción. Todos los parámetros que influyen en la degradación en un cultivo líquido como pH, temperatura, contenido de oxígeno, concentración de sales y adición de fuentes de carbono (Müller y Mahro, 2001).

Las cinéticas de degradación son de orden cero, si la concentración de contaminante es relativamente alta a los microorganismos que pueden degradarla, o puede ser de primer orden, si la concentración no es lo suficientemente alta para saturar la capacidad de los microorganismos. Las cinéticas de primer orden se aplican en donde la concentración de los productos químicos que están siendo degradados, es baja en relación con la actividad biológica, el índice de pérdida de los productos químicos es proporcional a dicha concentración. Las cinéticas de Michaelis-Menten pueden aplicarse cuando la concentración de los productos

## 2. MARCO TEÓRICO

---

químicos incrementa y la tasa de descomposición cambia de ser proporcional a ser independiente de la concentración (Müller y Mahro, 2001).

En ecosistemas naturales, una variedad de factores pueden modificar la forma de las curva de desaparición de sustrato. Estos factores podrían ser, el tiempo de inducción de los organismos activos, la acumulación de toxinas producidas por otros microorganismos, el agotamiento de nutrientes inorgánicos o factores de crecimiento, la presencia de otros sustratos que pueden reprimir la utilización de los compuestos de interés y la unión de los compuestos a la materia coloidal. Los impactos o interacciones de tales factores potencialmente importantes pueden hacer esto difícil para predecir las cinéticas de mineralización o desaparición de un sustrato en particular (Doménech y Peral, 2006)

Los índices de degradación de largas cadenas de alcanos presentes en los productos derivados del petróleo, depende de la disponibilidad de los hidrocarburos a los microorganismos. (Vallejo et al., 2005)

La biodegradación de hidrocarburos puede verse afectada por las condiciones ambientales que se presentan en el sitio contaminado, por ello es indispensable controlarlas para que la actividad de los microorganismos degradadores sea eficiente. Los factores que limitan en gran medida este proceso son: temperatura, pH, humedad, aceptores de electrones y nutrientes (N, P, S); además de la cantidad de oxígeno disponible a los microorganismos (Müller y Mahro, 2001)

### **2.7.1 Estudios de degradación de combustibles a nivel laboratorio**

La biodegradación de hidrocarburos puede verse afectada por las condiciones ambientales que se presenten en el sitio contaminado, por lo que es indispensable controlarlas para que la actividad de los microorganismos degradadores sea óptima, los principales factores que intervienen en la biodegradación: pH, aceptores de electrones y nutrientes, estos últimos son de particular importancia ya que después del derrame de un producto del petróleo, se observa una elevada concentración de carbono y una carencia de nitrógeno (N) y fósforo (P) que son necesarios para el metabolismo microbiano por este motivo se debe optar por la implementación de estrategias del proceso de biorremediación, como la bioestimulación; bioaumentación, cuando las condiciones son favorables (Müller y Mahro, 2001).

## 2. MARCO TEÓRICO

---

El conocimiento de las vías de degradación microbiana de contaminantes es ampliamente conocido por estudios realizados en el laboratorio con microorganismos aislados e inoculados en cultivos líquidos (Cardona e Iturbe, 2003).

En el 2001 en Hamburgo Alemania (Müller y Mahro), se realizó un estudio sobre los factores que influyen en el rendimiento de las bacterias en el suelo, usando variedades de cepas con la capacidad de degradar compuestos policíclicos aromáticos (4-clorobenzoato, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, tetraclorofenol , pentaclorofenol, antraceno, fenantreno y pireno); dicho estudio demostró que cuando se introducen diferentes compuestos y se adicionan microorganismos degradadores, las bacterias son capaces de remover el contaminante del suelo en un promedio de 5 días. Adicionalmente, en este mismo estudio, se desarrollaron varios modelos experimentales, en los que se utilizaron las mismas cepas y los mismos compuestos antes mencionados; pero esta vez en cultivos líquidos, cambiando en algunos casos los factores limitantes, como pH y temperatura. En todos los casos se demostró que el comportamiento de las bacterias degradadoras en suelos recientemente contaminados, es idéntico al comportamiento visto en los cultivos líquidos, con las condiciones previstas en el suelo en concordancia con los requerimientos de las bacterias en los cultivos líquidos.

En todas las pruebas realizadas en cultivos líquidos, se concluyó que los parámetros que influyen en la degradación de los hidrocarburos policíclicos aromáticos, como pH, temperatura, contenido de oxígeno (aireación) y contenido de sales de amonio y fósforo, tienen un efecto similar en el suelo (Cardona e Iturbe, 2003).

Richard Bartha y Wang Xiaoping (1989) en un estudio sobre potencial de biorremediación en derrames terrestres trabajaron con 4 diferentes combustibles (turboquina, diesel no.2, diesel y aceite residual) bajo una amplia variedad de condiciones de incubación (temperatura, tipos de suelo, concentración de carga en la columna cromatografica); se demostró un comportamiento cinético exponencial de primer orden. Los resultados mostraron que la persistencia en el ambiente de los combustibles depende de la composición química de los mismos y se incrementa en el siguiente orden turboquina > diesel 2 > diesel y concluyó que la biorremediación sustancialmente reduce la persistencia de estos combustibles y que la temperatura tiene un efecto predecible sobre el índice de degradación (Hong-Gyu et al., 1990)

En otro estudio de Cardona e Iturbe (2003), demostraron la influencia de la concentración del diesel en la transformación, lo cual determina la tasa de degradación, ya que los porcentajes del

## 2. MARCO TEÓRICO

---

contaminante removido son menores con el aumento de la concentración por la inhibición que causan los hidrocarburos a las bacterias del suelo; además se determinó que el comportamiento de la cinética en este estudio, correspondió a una cinética de primer orden.

---

# DESARROLLO EXPERIMENTAL

---

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

---

#### DESARROLLO EXPERIMENTAL.

##### 3.1. Cultivo inicial

Se utilizó un cultivo de microorganismos capaces de crecer en presencia de turbosina que ya disponía el laboratorio, el cual fue aislado de un suelo contaminado con dicho combustible. Este fue denominado cultivo inicial.

##### 3.2. Medios de cultivo

Se utilizó el medio mineral 2 (MM2), que es un medio modificado del desarrollado originalmente por Ridgway (Ridgway et al., 1990), este medio fue empleado para la adaptación del cultivo a altas concentraciones de turbosina y además para realizar los experimentos; su composición es la siguiente:

**Tabla 5. Composición de MM2**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5 g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1.42 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.38 g/L
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05 g/L
$\text{CaCl}_2$	0.01 g/L
pH=6.89	

Las sales empleadas en este medio de cultivo fueron reactivos analíticos marca Merck®. Una vez realizado el medio de cultivo, este se esterilizó a 121°C por el método de calor húmedo en una autoclave comercial marca AESA modelo CV-300.

##### 3.3. Cuantificación de bacterias heterótrofas

Para la cuantificación de bacterias heterótrofas se empleó el técnica vaciado en placa en agar ASM (Germida, 1993). Se tomó 1 mL del cultivo del tiempo correspondiente y se transfirió a 9 mL de solución salina 0.85% estéril, posteriormente se hicieron diluciones seriadas hasta  $10^{-9}$ . En cada caso se tomó 1 mL y se realizó el mismo procedimiento ya descrito. De cada dilución se tomó 0.1 mL y se transfirió a una caja de Petri conteniendo medio para conteo en placa sólido Merck®. Se incubaron a 25°C por 48 horas. En todos los casos las diluciones se

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

manejaron por triplicado. Al término del periodo de incubación se contaron aquellas que mostraron entre 30 y 300 colonias cultivables, claramente aisladas. Figura 9.

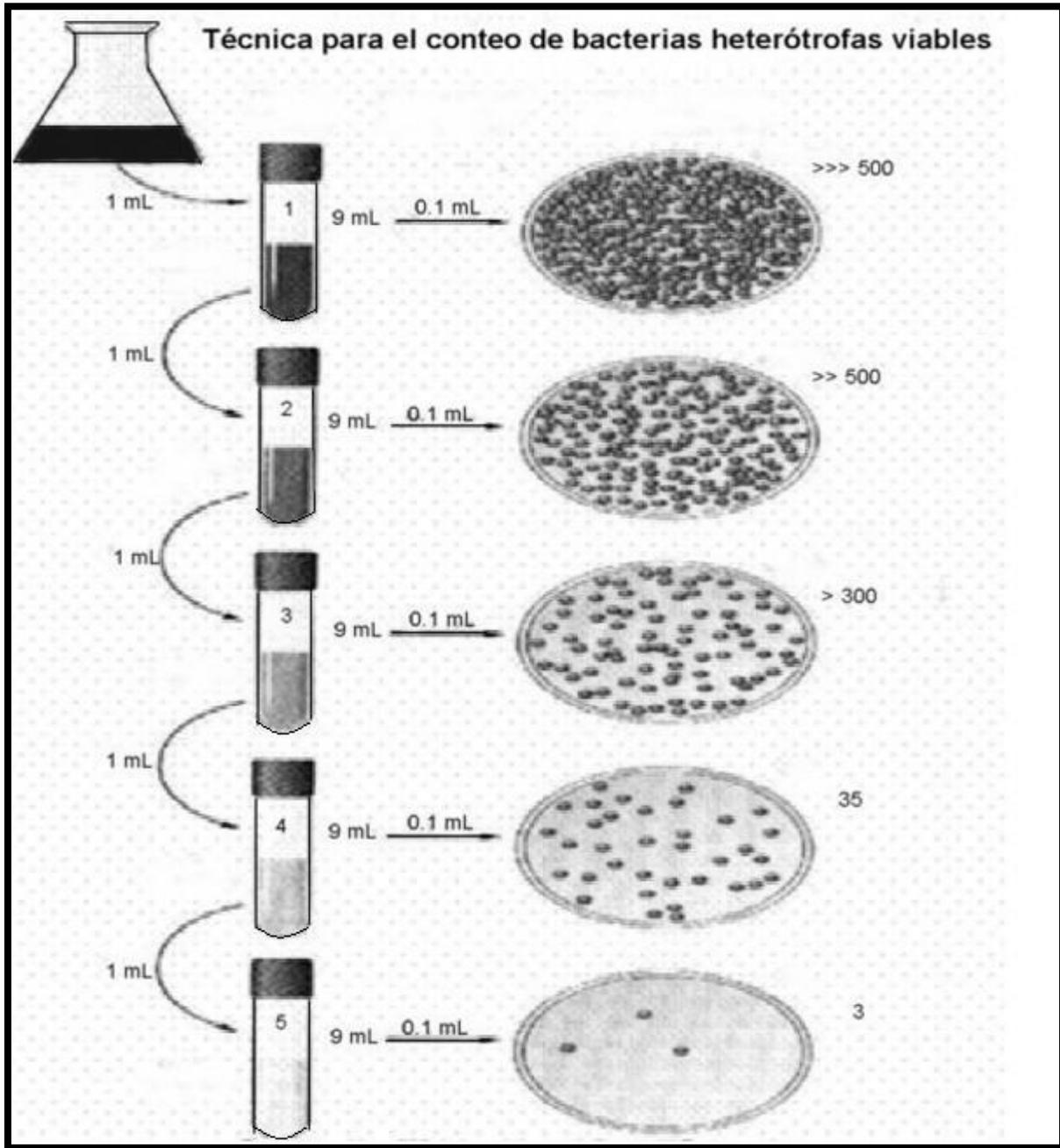


Figura 9. Técnica vaciado en placa (Fuente: Lim Microbiology. McGraw Hill, 1998)

#### 3.4. Turbosina utilizada

La turbosina utilizada para esta experimentación, fue proporcionada por la Estación de Combustibles del Aeropuerto Internacional de Cancún; ésta fue esterilizada por filtración a

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

---

través de una membrana Millipore® de 0.22  $\mu\text{m}$  y se conservó a 4°C. Una vez realizado lo anterior, se adicionó a los medios de cultivo ya estériles en una campana de flujo laminar a temperatura ambiente. En la figura 10 se muestra la turbosina empleada en este estudio.

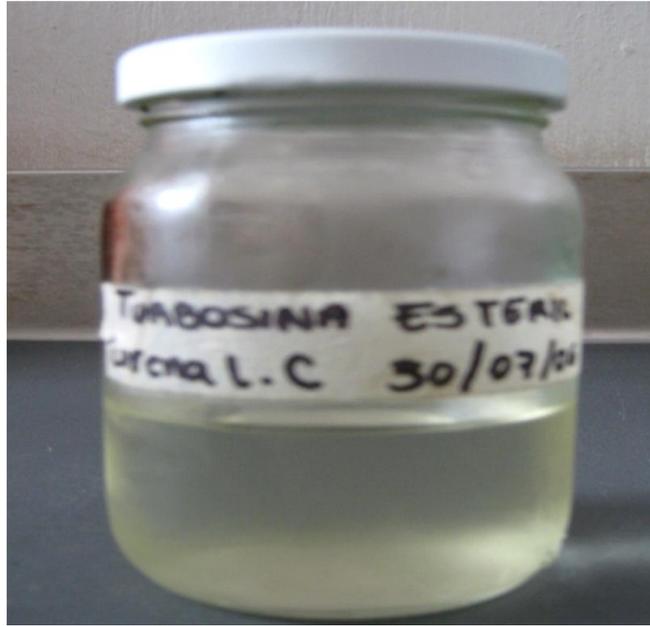


Figura 10. Turbosina estéril

#### 3.5. Desarrollo de técnicas

##### 3.5.1. Cultivos empleados para cinética

A partir del cultivo inicial, se tomaron alícuotas de 10 mL y se transfirieron a frascos de vidrio de 250 mL de boca ancha con tapa rosca y contratapa de teflón; los cuales contenían 90 mL de medio mineral 2 (MM2) previamente esterilizado (Ruiz, 2002); esto con el fin de evitar la pérdida de combustible y facilitar la oxigenación para favorecer el crecimiento microbiano.

En total se utilizaron 10 frascos; cada frasco correspondió a un tiempo de muestreo, los cuales fueron etiquetados de  $t_0$  a  $t_9$ . Posteriormente se incubaron a 28°C en agitación constante a 150 rpm en la agitadora—incubadora New Brunswick® modelo G-10. Cada tiempo de cultivo fue manejado por triplicado, lo que dio como resultado un total de 30 tarros experimentales. A cada tarro experimental se le adicionaron 3% v/v de turbosina estéril. La cantidad de turbosina que se

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

---

aplicó, fue tomada como base, ya que en estudios previos a este protocolo el cultivo se aclimató a altas concentraciones del combustible (Bruce et al. 1987).

#### 3.5.2. Preparación de las muestras

Las muestras se tomaron cada 12 horas a partir del tiempo cero para realizar las determinaciones previamente establecidas. Se tomaron en condiciones de esterilidad 10 mL de muestra. Posteriormente cada muestra se transfirió a un tubo de centrifuga estéril y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se trasladó a un embudo de separación con una capacidad de 60 mL y se le agregaron 2 mL de hexano grado HPLC para la extracción. Se agitó suavemente para facilitar la extracción y una vez separadas las fases, la fase acuosa se separó en otro matraz para la posterior determinación del pH. La fase orgánica se transfirió a un matraz aforado de 10 mL y se llevó a aforo con hexano; se transfirió a un vial de 25 mL, el cual fue etiquetado y colocado en refrigeración para determinar algún cambio en el perfil cromatográfico del combustible.

La biomasa obtenida se resuspendió en 1 mL de MM2 y se transfirió a un tubo *Eppendorf* de 1 mL para determinar proteína celular como indicador de crecimiento celular.

Todo el material empleado en la toma de muestras se lavó con etanol, se enjuagó con agua desionizada y se esterilizó por el método de calor húmedo; además de ser lavado con un sistema de tres disolventes: metanol, acetona, hexano grado reactivo, en ese orden (Ruiz, 2002). En la figura 11 se esquematiza la obtención y manejo de las muestras.

#### 3.5.3. Determinación de pH

La fase acuosa proveniente de la extracción, se transfirió a un vaso de precipitados de 25 mL en donde se le determinó el pH con ayuda de un potenciómetro Orion 320®, previamente calibrado, siguiendo las especificaciones establecidas en la norma NOM-021-SEMARNAT-2000 para la determinación del pH en agua (DOF, 2002).

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### 3.5.4. Cuantificación de crecimiento como proteína celular

Se empleó el método de Löwry para cuantificar la biomasa como proteína celular utilizando un kit de BIO-RAD Protein Assay®. Se siguieron las indicaciones descritas por el fabricante; salvo por las modificaciones descritas por Ruiz (2002); ya que se adecuaban a la condiciones del presente estudio.

Para la curva estándar de proteína se empleó albúmina sérica bovina grado reactivo marca *Sigma*®. La curva se preparó a partir de un *stock* previamente preparado en medio MM2 considerando concentraciones de 0.2 a 2.0 mg/mL; como blanco de reactivos se usó MM2.

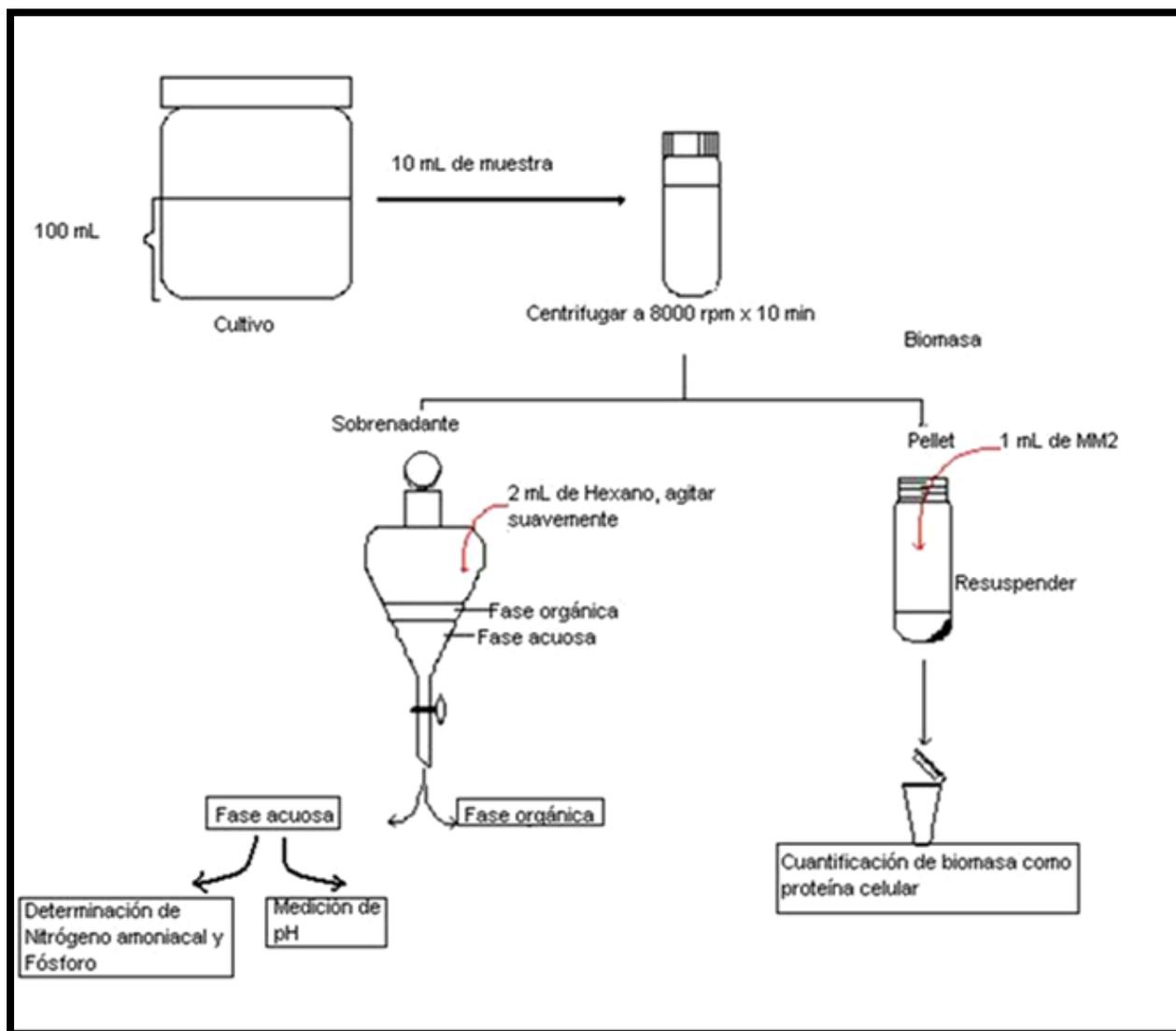


Figura 11. Obtención y manejo de las muestras

### 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

---

#### **3.5.5. Determinación de fósforo en forma de fosfatos**

Se tomó 1 ml de la fase acuosa de la extracción del sobrenadante y se determinó la concentración de fósforo en forma de fosfatos por el método interno Bray P- 1 (Instituto de Ingeniería, 2005). La determinación se efectuó de acuerdo con los lineamientos descritos por el método; el cual se basa en la adición de un agente reductor que permite la captación de concentraciones bajas de P por la formación del color azul característico de la reacción del azul de molibdeno.

#### **3.5.6. Determinación de nitrógeno amoniacal por el método de azul de indofenol**

Se empleó el método de azul de indofenol descrito en “Análisis de las aguas naturales, residuales y de mar” (Rodier et al. 1990). Fue necesario realizar algunas modificaciones para adaptarlo a las condiciones de la muestra y de trabajo en el laboratorio, las modificaciones fueron las siguientes: De la fase acuosa resultado de la extracción del sobrenadante se tomó 1 mL y se diluyó en 9 mL de agua desionizada (1:10), posteriormente de esta solución se tomó otro mililitro y se diluyó de la misma forma anterior (1:100); esto se efectuó porque se había determinado anteriormente que la muestra leída directa del cultivo se salía del rango de la curva patrón del método. Posteriormente se ajustó los mililitros agregados de reactivos al volumen final de muestra (10 mL), tal como lo establece el método.

---

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presentan los resultados de las diferentes determinaciones analíticas. Los valores corresponden al promedio de 3 corridas experimentales simultáneas.

El estudio fue realizado con un cultivo microbiano conteniendo 7 diferentes cepas aisladas de una muestra de suelo contaminado proveniente de una subestación de combustibles de la ciudad de México y aclimatadas a degradar altas concentraciones de turbosina.

#### 4.1. Cinética de crecimiento como proteína celular

El crecimiento se cuantificó como proteína celular por el método de Löwry, la gráfica aritmética se presenta en la Figura 12.

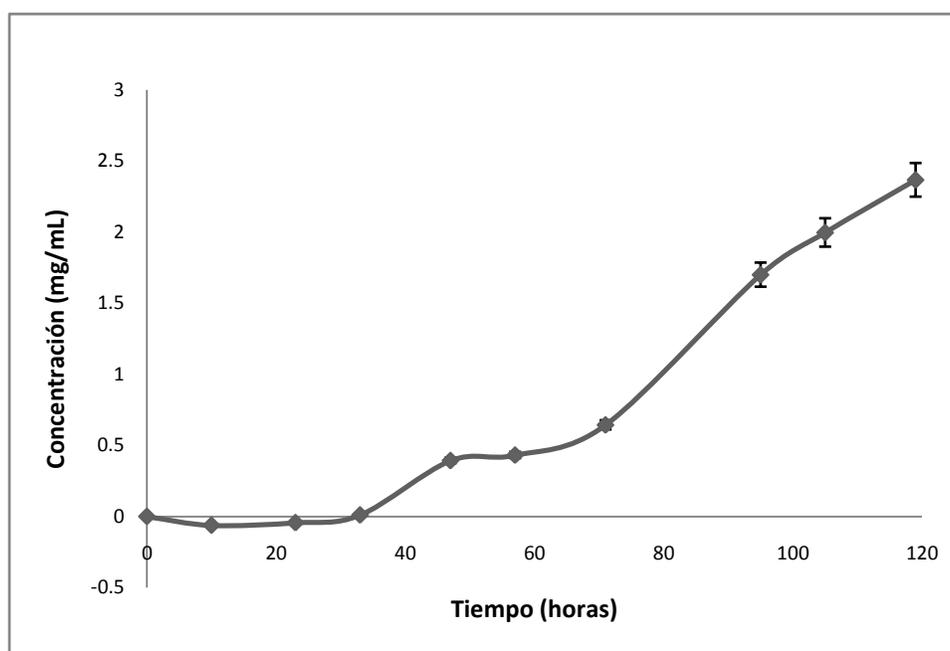


Figura 12. Crecimiento como proteína celular

Con respecto los intervalos de confianza se puede observar que el período que comprende de las 0-70 h. de estudio, la variación de los datos es mínima en comparación con los 3 últimos puntos del gráfico; ya que entre menor sea la variación es mayor la precisión de los valores experimentales con respecto a la media; lo que sugiere que el error absoluto es mínimo.

El período de tiempo que comprende de las 0 a las 33 horas los valores son negativos (figuras 12 y 13), lo que sugiere un período de adaptación que sufre el consorcio en presencia de un nuevo medio; pero a partir de las 33 h de incubación se aprecia un aumento en la concentración

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

de proteína celular, éste se reduce a partir de las 47 h y se vuelve a incrementar a partir de las 57 h de crecimiento y continúa así hasta terminar el experimento.

El período de adaptación también es conocido como “aclimatación”; en este lapso de tiempo los microorganismos son sensibles a los cambios abruptos en su ambiente, siempre que las condiciones físicas o químicas son cambiadas repentinamente; es un tiempo de transición durante el cual la población microbiana comienza a reactivarse con las nuevas condiciones. El crecimiento y metabolismo de los microorganismos pueden ser temporalmente interrumpidos y es causado por el cambio del metabolismo de la población para compensar el ambiente alterado (Alexander, 1981; Bruce y Perry, 2001)

Durante un crecimiento microbiano, no todos los constituyentes bioquímicos se sintetizan a la misma velocidad, y menos aún en los casos en donde se lleva a cabo la biodegradación de un nuevo sustrato o al realizar una transferencia de un inoculó a un nuevo medio e inclusive cuando la transferencia sea al mismo medio de crecimiento del que se partió. Estas situaciones, contribuyen a la modificación de la curva de crecimiento típica, como sucedió en este caso.

Es indispensable tomar en cuenta que, para que la degradación del sustrato ocurra, es importante que haya cambiado la velocidad de síntesis (Brock y Smith, 2003); es decir, que para que se note un aumento de la tasa de crecimiento microbiano es indispensable que exista de igual manera un aumento de síntesis de moléculas importantes para el crecimiento de las células; si esta velocidad de síntesis no aumenta, la tasa de crecimiento se verá disminuida. Esto significa que la velocidad de crecimiento es directamente proporcional a la velocidad de síntesis de las moléculas para el crecimiento celular.

Por lo que respecta al resto de la gráfica a partir de las 33 horas, su comportamiento sugiere una cinética multisustrato, situación que es razonable porque la turbosina es una mezcla de más de 100 hidrocarburos químicamente diferentes, de ahí que se decidió determinar las diferentes velocidades de crecimiento, para lo cual se dispuso a graficar los valores en escala semilogaritmica (Figura 13).

Para poder analizar los cambios de velocidad de crecimiento, durante la experimentación se graficaron los valores por cada par de puntos y se realizó el cálculo de velocidad de crecimiento de cada segmento (Véase anexo 1).

Una vez obtenidas las velocidades de crecimiento por cada par de puntos, se marcaron los valores en la gráfica semilogaritmica para tener una visión completa de la cinética (Figura 14).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

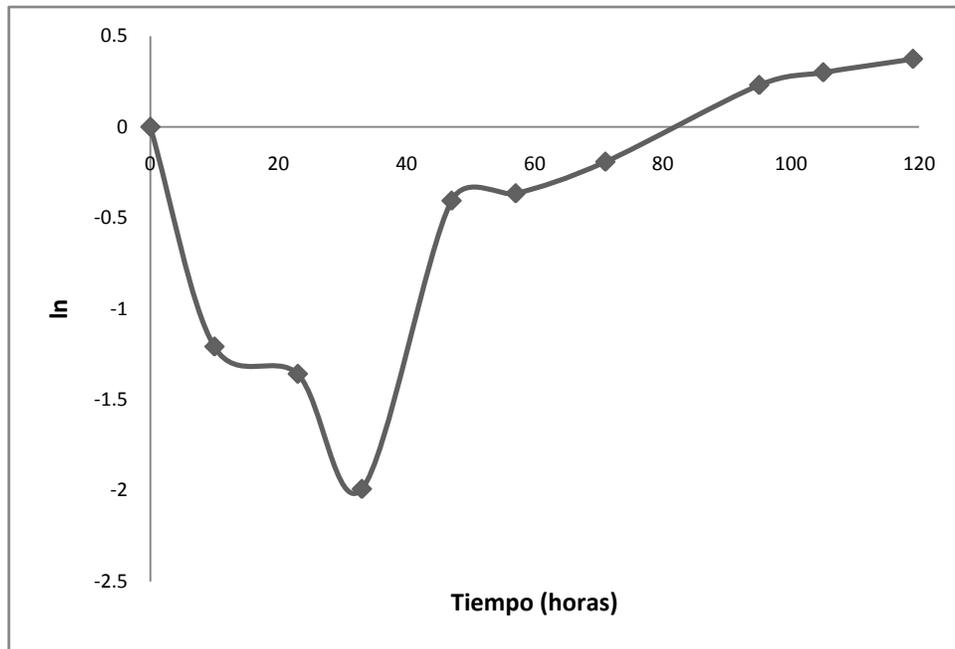


Figura 13. Cinética de crecimiento del cultivo microbiano en presencia de turbosina

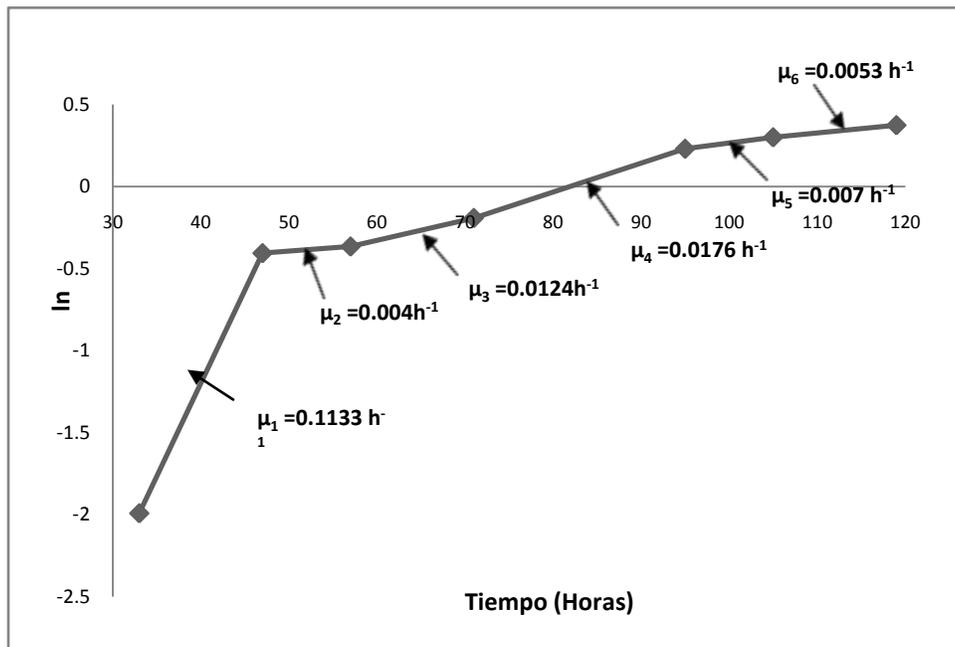


Figura 14. Variación de las velocidades de crecimiento

En la figura 14 se aprecia una amplia gama en las velocidades de crecimiento; esto se debe a la degradación de los diferentes hidrocarburos presentes en el combustible, que sirven como sustrato. La mayor velocidad de crecimiento corresponde al intervalo de tiempo entre las 33-47 h de experimentación, lo que sugiere que los microorganismos comenzaron a utilizar el sustrato

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

más fácilmente degradable y al cual estaban mejor adaptados; pero después de este período de tiempo, las velocidades de crecimiento disminuyeron; lo que significa que a los microorganismos les costaba más trabajo metabolizar el resto de los sustratos, difíciles por su estructura química (probablemente los hidrocarburos alifáticos que son más fáciles de degradar en comparación con las cadenas ramificadas, los dobles enlaces, o bien un incremento en el número de anillos bencénicos) y la disponibilidad al mismo; además de que, para que estos compuestos pudieran ser degradados, el consorcio necesitaba activar más enzimas y rutas metabólicas que al principio podrían haber estado inactivas, por lo que el tiempo para degradar fue menor (Baker y Herson, 1998; Englert et al., 1993). Todo lo anterior se justifica por el hecho de que la turbosina es una mezcla de hidrocarburos químicamente diferentes (Stainer, 1993); por lo cual sugiere que los microorganismos que conforma el cultivo optarán por el sustrato más fácil degradable o incluso algunas especies se pudieron agruparse para degradar compuestos complejos; a este último fenómeno se le conoce como cometabolismo (Jones y Martin, 1988).

A manera de ilustrar el crecimiento, en la figura 15 se muestra el aspecto del cultivo líquido crecido en el medio MM2 con turbosina 0.03% v/v. Se puede apreciar que la turbidez del medio es significativamente mayor a los 5 días del estudio, en comparación con el cultivo al inicio del estudio.

Adicional a lo anterior, es importante destacar que, las cinéticas de crecimiento en ambientes contaminados con multisustratos son complicadas debido a la posibilidad de interacciones entre los sustratos; las cuales pueden ser el resultado de dos tipos de efecto: a) Metabolismos competitivos, en donde un sustrato inhibe la utilización de otro, por la competencia del sitio activo de unión con una enzima y b) el crecimiento fortuito de la biomasa debido a la presencia de múltiples sustratos. Lo extenso de estos efectos está directamente relacionado con el número de sustratos que están presentes (Saumyen et al., 1999).

Según la literatura (Roy, 1997), los índices de consumo de los compuestos más degradables y abundantes presentes en el combustible, son reducidos debido a la inhibición competitiva pero aumenta en los compuestos más recalcitrantes, debido al crecimiento simultáneo de la biomasa sobre el multisustrato. Muchos de los compuestos sintéticos orgánicos de importancia ambiental son degradados por cometabolismo; en esta situación el llamado cosustrato actúa como inductor enzimático junto con el sustrato de crecimiento como donador de electrones y proporciona energía para el crecimiento y mantenimiento celular.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Figura 15. Aspecto del cultivo degradador al inicio y final del tiempo de crecimiento.

En este trabajo experimental es imposible mencionar qué tipo de cosustratos o sustratos están involucrados debido a la complejidad de la turbosina, pero el hecho de haber obtenido diferentes velocidades de crecimiento, sugiere la existencia de diferentes activaciones para diferentes sustratos (Müller y Mahro, 2001).

Con la información obtenida no se consideró conveniente adentrarse en el cálculo de una velocidad específica de crecimiento, ya que se trata de una población microbiana compleja que incluye al menos 7 cepas de diferentes especies, la cual está creciendo en multisustrato, por lo que todos los modelos teóricos (Monod, Michaelis-Menten y Haldane) que hasta ahora se han desarrollado estarían limitados y serían necesarios más estudios para demostrarlo. Lo realizado aquí sólo pretende resaltar que existen diferentes velocidades de crecimiento y que esto está dado por la degradación de los diferentes grupos de hidrocarburos presentes en la turbosina.

De acuerdo con los resultados presentados no se puede hablar de una  $\mu_{\text{única}}$  debido a que el crecimiento celular fue variable; además no se puede hablar de una  $\mu_{\text{máx}}$  ya que para obtenerla se tendría que conocer la concentración de cada sustrato en cultivo de células en reposo, puesto que es específica para cada sustrato bajo ciertas condiciones de pH y temperatura. La situación es que no se puede hablar de  $\mu_{\text{máx}}$  cuando el crecimiento es variable en presencia de multisustrato y no se tiene un sustrato limitante, por lo tanto en este caso no aplica Monod; en este caso solo se hará referencia a una velocidad de crecimiento y no a velocidades específicas, que esta última se utiliza para caracterizar una población microbiana en un solo sustrato en condiciones ambientales en donde se encuentra el microorganismo.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

En la práctica, la biodegradación completa de cualquier combustible no siempre es total; puesto que, en la superficie del suelo sufre modificaciones en forma natural, las fracciones volátiles son las primeras en desaparecer quedando una fracción del combustible absorbida al suelo (Saval y Lesser, 1999), la cual toma más tiempo en ser degradada.

### 4.1.1 Cuantificación de bacterias heterótrofas

Con la intención de complementar los resultados anteriores se realizó la cuantificación de bacterias heterótrofas para cada una de las muestras obtenidas (Tabla 6).

**Tabla 6. Cuantificación de bacterias heterótrofas**

Tiempo (Horas)	Dilución $10^{-4}$	Dilución $10^{-5}$	Dilución $10^{-6}$	Dilución $10^{-7}$	Dilución $10^{-8}$	Dilución $10^{-9}$
0	155	57	46	18	5	-
10	>300	237	198	142	93	34
23	>300	>300	>300	>300	>300	>300
33	>300	>300	>300	>300	>300	>300
47	>300	>300	>300	>300	>300	>300
57	>300	>300	>300	>300	>300	>300
71	>300	>300	>300	>300	>300	>300
95	>300	>300	>300	>300	>300	>300
105	>300	>300	>300	>300	>300	>300
119	>300	>300	>300	>300	>300	>300

Como se puede observar; el número de colonias cuantificadas fue considerablemente elevado desde el inicio de la cinética; a partir de las 23 h de crecimiento el conteo de heterótrofas ya no pudo determinarse, con las diluciones realizadas; puesto que fue mayor a 300 colonias; lo que sugiere que el cultivo microbiano se encontraba en una elevada velocidad de crecimiento.

De acuerdo con la tendencia observada, se reconoce que las diluciones aplicadas no fueron suficientes para un conteo de heterótrofas detallado; ya que sólo se realizaron diluciones hasta  $1 \times 10^{-9}$ , cuando se debieron de realizar por lo menos hasta  $1 \times 10^{-25}$ , pero en la práctica esto ya no fue posible aplicarlo. El dato importante de este ejercicio es haber observado un incremento en el crecimiento en el número de células durante las primeras horas aun cuando la grafica de crecimiento como proteína celular indicaba una fase de adaptación. A continuación se muestra

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

el aspecto de las cajas de petri durante el conteo de heterótrofas, a  $t_0$  y 23 h de crecimiento, en la dilución  $10^{-9}$ .

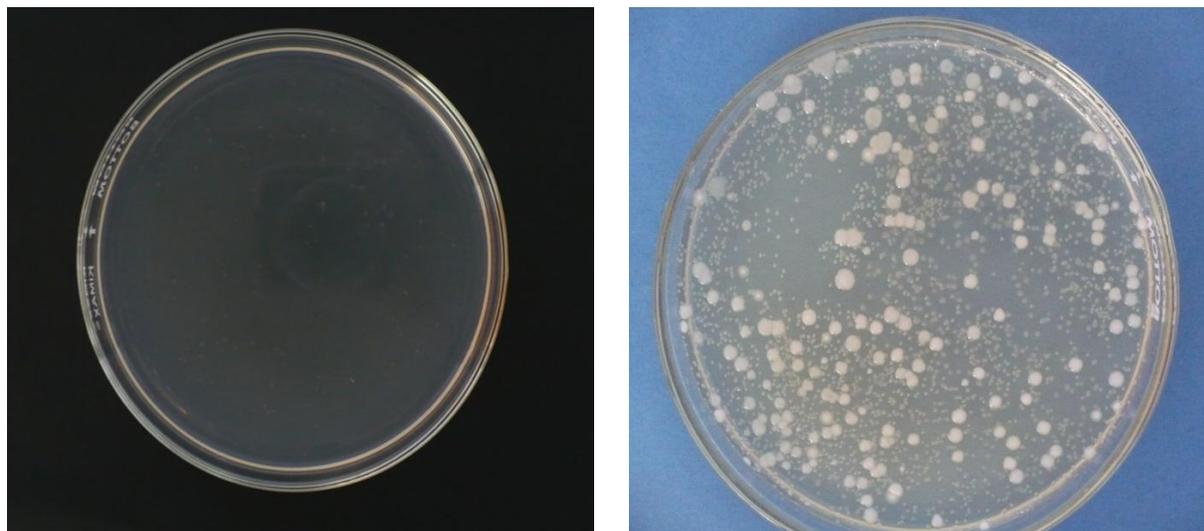


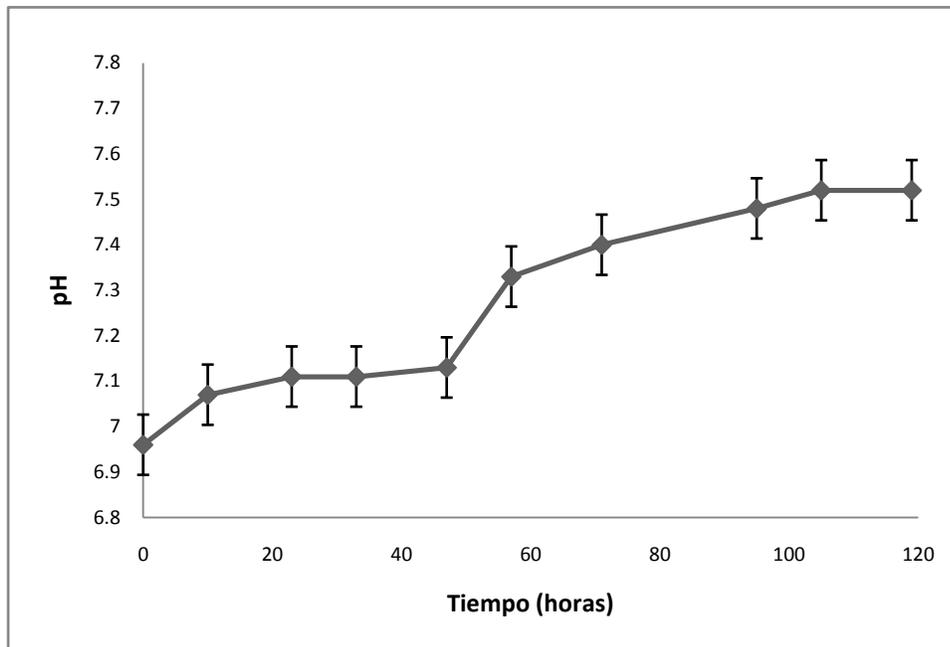
Figura 16. Conteo de heterótrofas al inicio y al final del estudio.

Durante el experimento se observó el crecimiento de 2 diferentes tipos de colonias; aunque se tenía conocimiento de la existencia de 7 cepas en el cultivo inicial, solo se observaron dos tipos de ellas; esto puede deberse a que el medio en donde se llevó a cabo el conteo de placa es un medio de enriquecimiento, por lo tanto no se muestran las diferencias entre cada cepa, ya que no es un medio selectivo. El aspecto de las colonias fue el siguiente: colonias de color blanco crema, mucoide de borde regular y colonias blancas traslúcidas de apariencia butirosa muy pequeñas, bien delimitadas; las primeras fueron de mayor tamaño que las de apariencia traslúcida, estas últimas eran más pequeñas pero más abundantes.

### 4.2. Determinación de pH

En la figura 17 se presentan los valores de pH obtenidos en la corrida experimental, se puede observar que a medida que el tiempo de degradación aumenta, el pH en el medio presenta un ligero aumento de 6.95 a 7.6; lo que sugiere que durante todo el proceso de biodegradación, el medio en el que se desarrollaron los microorganismos realmente se mantuvo en condiciones cercanas a la neutralidad. El ligero aumento fue más notable entre 47 y 105 horas cuando se observaron cambios en el crecimiento.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 17. Variación de pH con respecto al tiempo**

Como se puede observar en la figura 17, el intervalo de confianza de los datos es mayor con respecto a la media, lo que sugiere una elevada variación de los datos experimentales individuales y esto se vio reflejado en las barras de variación.

Cada microorganismo suele tener un nivel de pH, dentro del cual es posible su desarrollo y un pH óptimo bien definido para su crecimiento en un sustrato específico; en este caso se tenía conocimiento de que el cultivo utilizado constaba de 7 cepas; para las cuales según la literatura el pH óptimo de crecimiento y desarrollo está dentro del rango de 6.5 a 7.5 (Brock y Smith, 2003), por lo cual, se encontraba en las condiciones adecuadas para su desarrollo; además pensando en que provienen de una muestra de un ambiente terrestre los valores de pH son acordes (Brock y Smith, 2003).

Aunque la variación del pH no mostró un comportamiento típico de una sola cepa y un solo sustrato lo importante es que los cambios permitieron el desarrollo de la población microbiana, equilibrio en la concentración de protones de ambos lados de las membranas celulares, que es importante para la obtención de la energía metabólica en presencia del combustible y de los nutrientes.

### 4.3. Variación en la concentración de nutrientes

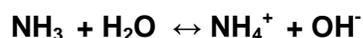
Se optó por sólo evaluar la variación de nitrógeno amoniacal y de fósforo en forma de fosfatos, ya que la biodisponibilidad de los mismos es muy importante para que el crecimiento del cultivo y de los combustibles ocurra, puesto que son los principales nutrientes para obtener el metabolismo (Jones y Martin, 1988).

El nitrógeno es el nutriente más susceptible a transformaciones microbianas; además de ser la unidad clave de la molécula de las proteínas sobre la cual se basa toda la vida y por consiguiente en un elemento indispensable del protoplasma de los microorganismos (Brock y Martin, 2003). El fósforo es el segundo nutriente inorgánico de importancia requerido por los microorganismos; su principal función fisiológica radica en algunos pasos esenciales en la acumulación y liberación de energía durante el metabolismo celular.

A continuación se analiza el comportamiento de estos nutrientes en el cultivo:

#### 4.3.1 Variación del nitrógeno amoniacal

La variación del nitrógeno en el cultivo no mostró cambios significativos con respecto a la concentración inicial del medio oscilaron dentro del intervalo de concentración de 0.85 a 1.34 mg/mL (Figura 18). Este comportamiento puede deberse a que el nitrógeno amoniacal existe como ión amonio o como amoniaco, dependiendo del pH de la solución. Tomando en cuenta esta aseveración el equilibrio existente en un medio líquido de estos iones es el siguiente:



A niveles de pH superiores a 7, el equilibrio se desplazara hacia la izquierda y predomina el  $\text{NH}_3$ , pero a niveles de pH inferiores a 7 el equilibrio se desplaza hacia la derecha y el ión amonio es el predominante. Durante el desarrollo de la experimentación el valor del pH del medio fue ligeramente mayor a 7, pero no lo suficiente para asegurar que la reacción se desplazara hacia la izquierda; manteniéndose de esta manera un equilibrio de ambos iones.

En la figura 18 se aprecia que hay ligeros descensos en la concentración de amonio disponible; pero también existen puntos donde ésta aumentó. Estos altibajos, pueden sugerir que en la transformación microbiana el nitrógeno se incorpora a la biosíntesis de las moléculas complejas del protoplasma, pero también está asociado con el exceso de productos de desecho del metabolismo microbiano, en donde el amonio acumulado representa la cantidad de nitrógeno del sustrato que sobrepasa a la demanda microbiana, quedando el catión disponible sólo

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

cuando no es necesario para el crecimiento, además de que el medio en sí, contenía una alta concentración de nitrógeno amoniacal.

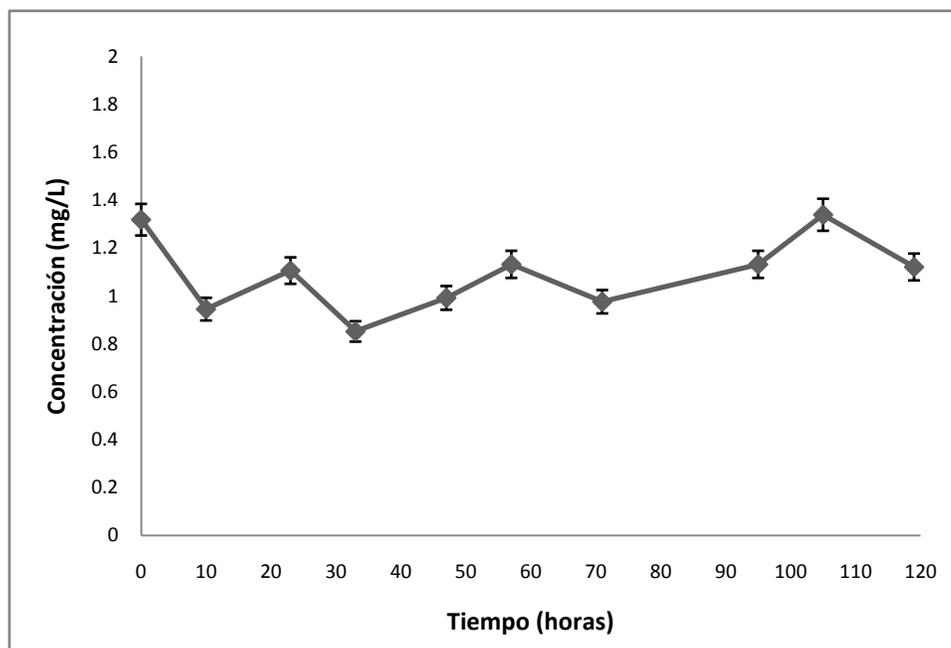


Figura 18. Variación de nitrógeno amoniacal con respecto al tiempo

Con respecto a las barras de variación de los datos en la figura 18 se observa que la variación es pequeña, lo que sugiere que los errores en la medición o toma de la muestra son menores.

### 4.3.2. Variación de fósforo en forma de fosfatos

En la figura 19, a partir de las 50 horas se observó un decaimiento en la concentración de los fosfatos a una concentración de 1.64  $\mu\text{g/L}$  a las 105 horas de experimentación.

Para determinar la velocidad de consumo del sustrato, los valores obtenidos entre las 57 a 105 horas se graficaron, (Figura 20). En esta gráfica se suprimieron los primeros valores del período de 0 a 50 horas porque se considera corresponden a la etapa de adaptación.

El consumo de fósforo en forma de fosfato dentro del tiempo referido, presentó una cinética de primer orden con una constante de variación de sustrato de  $-0.0572 \text{ horas}^{-1}$ , como puede observar en la figura 20.

El decaimiento de la concentración de fosfato sugiere que el fósforo fue requerido para las funciones esenciales del metabolismo microbiano; si se compara con los resultados de la figura 12 y 13, la disminución de los niveles de fósforo coincide con el aumento de la biomasa celular,

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

lo que significa que a medida que aumentó la biomasa se utilizó el fósforo para la formación de complejos necesarios para el crecimiento, como por ejemplo los ácidos nucleicos, o bien, para satisfacer la demanda de energía en forma de ATP durante el metabolismo celular; ya que esta molécula depende en gran medida de la presencia de fósforo; pues es la base principal para la formación de los enlaces de alta energía (Brock y Martin, 2003; Dennis et al., 1993).

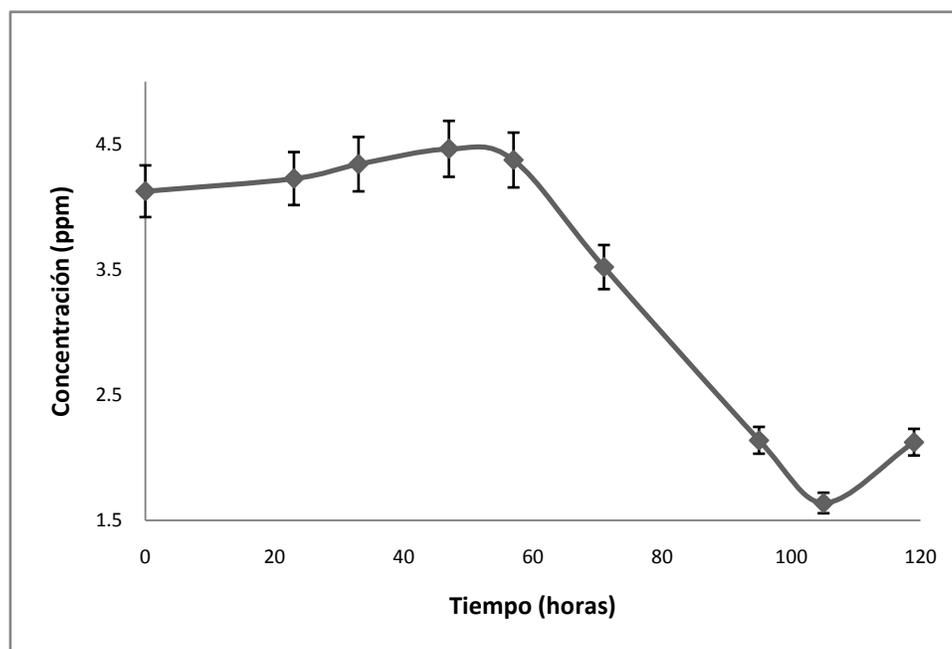


Figura 19. Variación de fósforo en forma de fosfato en función del tiempo

Para la formación de 1 gramo de material celular (peso húmedo) deben consumirse cerca de 20 milimoles (mmoles) de ATP. Como la concentración intracelular de ATP es solamente de 2 mmolar, obviamente el ATP sólo tiene un papel catalítico durante el crecimiento, pero continuamente se está rompiendo y resintetizando. Se ha calculado que durante el tiempo de crecimiento de una célula, la reserva de ATP debe renovarse alrededor de 10000 veces (Brock y Martin, 2003); por lo tanto el consumo de complejos que contengan este elemento es indispensable para llevar a cabo las funciones metabólicas de cultivo degradador en cuestión.

La variabilidad de los datos en la figura 19, es mayor en el período de tiempo que comprende 0-71 hrs., lo que sugiere una mayor heterogeneidad de los datos; pero a medida que avanzaba el estudio estos errores indeterminados de la medición fueron siendo menores y se vio reflejado en el intervalo de variación de los últimos datos.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

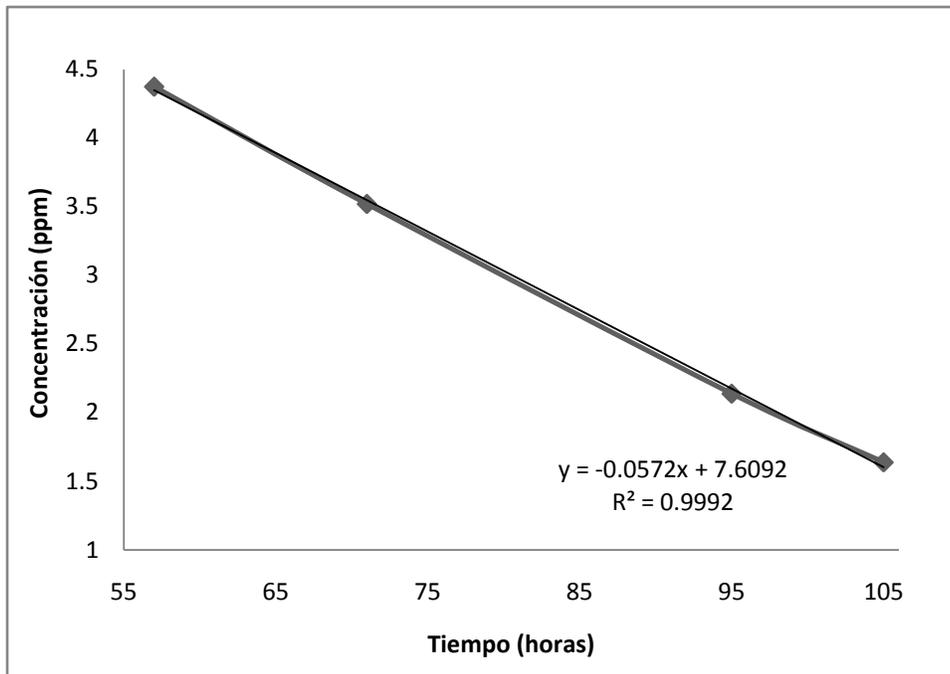


Figura 20. Cinética de la variación de fósforo en forma de fosfato en función del tiempo.

---

# CONCLUSIÓN

---

## 5. CONCLUSIONES

---

- Se observó el crecimiento de microorganismos en presencia de turbosina como sustrato.
- A lo largo del experimento que duro 120 h, se observaron diversas velocidades de crecimiento, lo cual corresponde a una cinética multisustrato.
- La mayor tasa de crecimiento se presentó en el período de tiempo que comprende de las 33 horas a las 47 horas con una  $\mu = 0.1133 \text{ h}^{-1}$  a pH neutro.
- El consumo de fósforo se representó adecuadamente como una cinética de primer grado con una velocidad de  $-0.0572 \text{ h}^{-1}$  en el período de 57 - 105 h.

---

# BIBLIOGRAFÍA

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Agencia Europea de Medio Ambiente (EEA). 2002. Con los pies en la tierra: La degradación del suelo y el desarrollo sostenible en Europa, en *Un desafío del siglo XXI. Problemas Medioambientales*. Boletín 16. Copenhague. Dinamarca.
- Alexander, M. 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*. 211:132.
- Álvarez-Manilla, A.; Valadez, J. P.; Garnica, A.P. y Martínez, P.G. 2002. La permeabilidad de los suelos en los problemas de transporte de contaminantes. Aplicación en la infraestructura del transporte. Secretaría de Comunicaciones y Transportes (SCT), Instituto Mexicano del Transporte (IMT), Publicación técnica No. 195, Sanfandilla, Qro.
- Ayllon, T. T. y Chávez, J.F. 1994. México: sus recursos naturales y su población. 2ª ed. Limusa. México D.F.
- Baker, H.K. y Herson D. 1998. Bioremediation. Mc. Graw-Hill. USA.
- Bernd, W.B. 2002. Realistic Characterizations of Biodegradation, Thesis of the Institute of Ecological Science. Vrije Universiteit. Amsterdam Nueva Zelanda.
- Bruce, A.W.; Stephen, H.J. y Martin, A. 1987. Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *Appl. and Environ. Microbiol*; 53(4):791-796.
- Bruce, E.R. y Perry, L.M. 2001. Environmental Biotechnology: Principles and Applications. McGraw-Hill. USA.
- Brock, T. y Smith, D. 2003. Microbiología. Pearson Prentice Hall S.A. New Jersey. USA.
- Cardona, S. e Iturbe, R. 2003. Biodegradacion de diesel mexicano por un consorcio de bacterias de un suelo agrícola. *DYNA*. año 70. 138:13-26.
- Dennis, D.; Jill P.S.; Hicks, P. y Holland, J. 1993. In situ biological remediation of petroleum hydrocarbons in unsaturated soils, en *Principles and practices for petroleum contaminated soils*. Lewis Publishers. USA.
- Devlin, T.M. 1999. Bioquímica. 3ª edición. Reverté S.A. Barcelona España.
- Flores, M.G.; Torras, O.S. y Téllez, G.R. 2004. Medidas de mitigación para uso de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos en infraestructura de transporte terrestre. Secretaria de Comunicaciones y Transporte (SCT). Instituto Mexicano del Transporte (IMT). Publicación técnica No. 257. Sanfandilla. Qro.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNART-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2005. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. México D.F.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2006. Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los residuos. México D.F.
- Doménech, X. y Peral, J. 2006. Química Ambiental de sistemas terrestres. Reverté S.A. Barcelona. España.
- Dorronso, C.F. y García I. 2004. Contaminación del suelo. Departamento de Edafología y Química Agrícola. Unidad docente e investigadora de la Facultad de Ciencias de Granada. España.
- Dua, A.; Singh, A.; Sethunathan, N. y Johri, A. 2002. Biotechnology and bioremediation: Successes and limitations (Mini review). Appl. Microbiol. and Biotechnol. 59:143-152.
- Englert, C.J.; Kenzie, E.J. y Dragun, J. 1993. Bioremediation of petroleum products in soil, en *Principles and Practices for petroleum contaminated soils*. Lewis Publishers. USA.
- Eve, R.R.; 1992. Bioremediation of petroleum contaminated sites. C.K. Smoley. Boca Raton. Florida. USA.
- Flores, M.G.; Torras, O.S. y Téllez, G.R. 2004. Medidas de mitigación para uso de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos en infraestructura de transporte terrestre. Secretaria de Comunicaciones y Transporte (SCT). Instituto Mexicano del Transporte (IMT). Publicación técnica No. 257. Sanfandilla. Qro.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 1996. Definition of pollution. USA.
- García, R.M. y Peralta, P.M. 2008. Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos. Rev. Mex. de Ingeniería Química. Vol.7. 1:1-12.
- Germida, J.J. 1993. Cultural methods for soil microorganisms, en *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers. Canada.
- Hermann, J.H. 2007. Bioremediation of Soils Contaminated with aromatic compounds, en *The role of plants and bacteria in Phytoremediation-Kinetics aspects*. Springer. Dordrecht Holanda.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Instituto Mexicano del Petróleo (IMP). 2011. [citado 14/02/2011]. Composición [en línea]. México D.F. Disponible en internet: <http://www.imp.mx/petroleo/?imp=comp>.
- IMP. 2010. [citado 14/02/2011]. Tipos de petróleo [en línea], México D.F. Disponible en internet: <http://www.imp.mx/petroleo/?imp=tipos>
- Instituto de Ingeniería (II). 2005. Determinación de fósforo en forma de fosfatos por el método de Bray P-1. 2005. Método Interno GCBSA. Subdirección de Hidráulica y Bioprocesos ambientales. UNAM. México D.F.
- Jones, H.S. y Martin, A. 1988. Effect of inorganic nutrients on the acclimation period preceding mineralization of organic chemicals in lake water. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:12.
- Landis, W.G.; Matthews, R.A.; Markiewicz, A.J. y Matthews, G.B. 1993. Multivariate Analysis of the Impacts of the Turbine fuel JP-4 in a microcosm toxicity test with implications for the evaluation of ecosystem dynamics and risk assessments. *Ecotoxicology*. 2: 271-300.
- Müller, R. y Mahro, B. 2001. Bioaugmentation: advantages and problems using microorganisms with special abilities in soil decontamination, en *Treatment of contaminated soil. Fundamentals, analysis, applications*. Springer. Berlín Alemania.
- National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA)/ Hazardous Materials Response and Assessment Division (HMRAD) and American Petroleum Institute (API). 1994. Options for Minimizing Environmental Impacts of Freshwater Spill Response. USA.
- Nuñez de Castro, I. 2001. Enzimología. Piramide. Madrid España.
- Petroleos Mexicanos (PEMEX). 2009. [citado 11/10/2010]. Exploración y producción de hidrocarburos [en línea]. México D.F. Disponible en internet:
  - <http://www.pep.pemex.com/pdf/peprelevantes.pdf>
- PEMEX. 1988. El Petróleo. Gerencia de Información y Relaciones Públicas. México D.F.
- PEMEX. 2009. Refinación. Anuario estadístico. México D.F.
- PEMEX. 1998. Refinación. Hoja de Seguridad. México D.F.
- PEMEX. 2002. Refinación, Reporte anual. México.
- PROFEPA. 2009. Análisis de Emergencias Ambientales 1993-2009. Subprocuraduría de Inspección Industrial. Dirección General de Inspección de Fuentes de Contaminación. Dirección de Emergencias Ambientales.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Rahman, K.S.; Rahman, T.; Lakshmanaperumalsamy, P. y Banat, I.M. 2002. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. *Jour. Basic. Microbiol.* 42: 284-291.
- Ridgway, H. F.; Safarik, J.; Phipps, D.; Carl, P. y Clark, D. 1990. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (11): 3565-3575.
- Rosenberg, E. y Ron, E. 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:154-162.
- Rodier, J. et al. 1990. Análisis de las aguas, naturales, residuales y de mar. 2ª ed. Omega S.A. Barcelona España.
- Roy, J.I. 1997. Jet Fuel, General Entry. *Environmental Contaminants Encyclopedia.* National Park Service. Water Resources Divisions. Water Operations Branch. Fort Collins. Colorado. USA.
- Ruiz, S.I. 2002. Estimulación de cultivos microbianos degradadores de hidrocarburos. Dirección General de Estudios de Posgrado. Facultad de Química. UNAM. México D.F.
- Russel, B.J. y Ginn, S.J. 2004. *Practical handbook of Soil, Vadose zone and Ground-water contamination. Assesment, Prevention and Remediation.* Lewis Publishers. Boca Raton. Florida USA.
- Salanitro, J.P.; Díaz, L.A.; Williams, M.P. y Wisniewski, H.L. 1994. Isolation of bacterial culture that degrades methyl t-Butylether. 66(7): 2593-2596.
- Saumyen, G.; Peters, A.C. y Jaffé, R.P. 1999. Multisubstrate biodegradation kinetics of naphthalene, phenanthrene, and pyrene mixtures”, *Biotechnology and bioengineering.* 65:491-499.
- Saval, B.S. 1995. Acciones para la remediación de suelos en México. Segundo Minisimposio Internacional sobre Contaminantes del Agua y Suelo. Instituto de Ingeniería. UNAM.
- Saval, B.S. 1999. Éxitos y fracasos de la remediación de suelos en sitios contaminados con hidrocarburos, en *Conservación y Restauración de suelos.* Programa Universitario de Medio Ambiente. Ciudad Universitaria. UNAM. México D.F.
- Saval, B. S.; Lesser, J. M. 1999. Intemperismo, efectos de hidrocarburos en suelos y acuíferos. Teorema.
- Secretaria de Energía (SENER). 2010. *Prospectiva de petrolíferos 2002-2011.* México.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 1996. Los Suelos de Tabasco Restauración, Conservación y Uso. Gobierno Constitucional del Estado de Tabasco
- Seoáñez, C.M. 1999. Contaminación del suelo: Estudios, tratamientos y gestión. Mundi prensa, España.
- Schifter, I. y López, S. 1998. Usos y abusos de las gasolinas. 1ª ed. Fondo de Cultura Económica. México D.F.
- Song, H-G. y Bartha R. 1990. Effects of Jet fuel spills on the microbial community of soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:646-651.
- Song, H-G.; Wang, X. y Bartha, R. 1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 652-656.
- Stainer, Y.R. 1996. Microbiología. 2ª ed. Reverté S.A. Barcelona, España.
- Stegmann, R.; Brunner, G.; Calcamo, W. y Matz, G. 2001. Treatment of contaminated soil. *Fundamentals, analysis and applications.* Springer. Berlín Alemania.
- Valderrama, B. y Téllez-Sosa, J. 2008. Microbiología del petróleo y sus derivados. Publicación técnica. Instituto de Biotecnología. UAM.
- Vallejo, V.; Salgado, L. y Roldan F. 2005. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, Vol. VII. 2:67-78.
- Vander, P.M. 2006. Soil and water contamination from molecular to catchment scale. Taylor and Francis Group. London U.K.

---

# ANEXOS

---

**Cálculo de velocidades de crecimiento por cada par de segmentos de tiempo**

Nomenclatura:

$dX/dt$  = cambio de la biomasa

$\mu$  = variación de la biomasa

$\ln$  = logaritmo natural

$n$  = numero de observaciones

$t$  = tiempo

$X$  = Biomasa presente en el tiempo  $t$

La rapidez de variación de la biomasa es proporcional a la cantidad de microorganismos presentes en un momento dado

$$dx/dt = \mu X \rightarrow \mu = (dx/dt)/ X \text{ ó } X = X_0$$

Resolviendo la ecuación diferencial se obtiene:

$$dX = \mu x dt \rightarrow \int dx = \int \mu dt \rightarrow \ln x = \ln x_0 + \mu t$$

Esta ecuación adquiere la forma de una línea recta  $y = mx + b$ ; si se hace  $y = \ln x$ ,  $m = \mu$ ,  $x = t$  y  $b = \ln x_0$ .

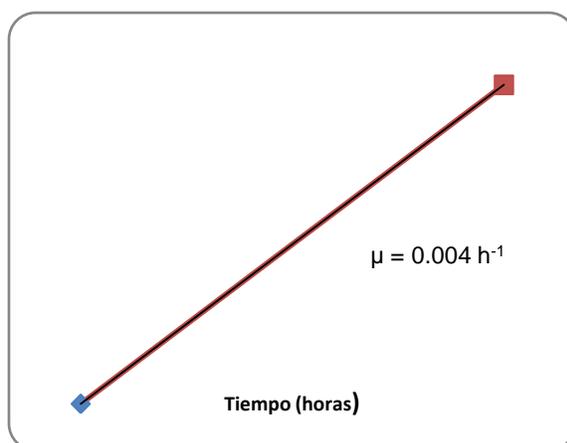
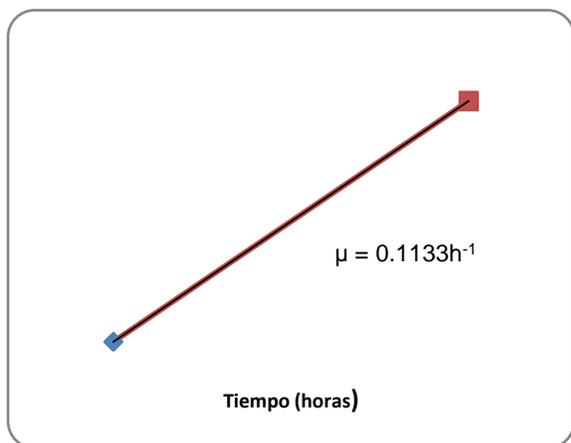
Se utilizaron los promedios de las muestras y posteriormente se obtuvo por cada par de puntos el valor de las velocidades. Los resultados se resumen en la tabla 7.

**Tabla 7. Variación de  $\mu$  en los diferentes intervalos de tiempo.**

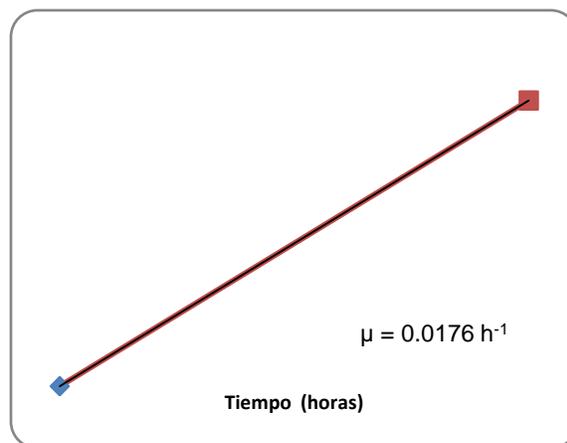
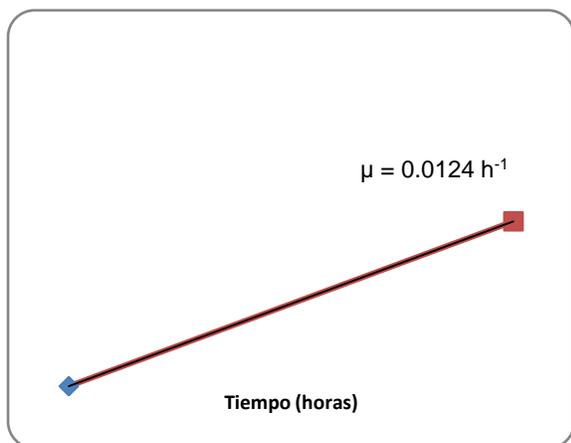
Intervalo de tiempo (h)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	Intervalo de crecimiento en el intervalo de tiempo (mg/mL)
33 - 47	0.1133	0.012 – 0.390
47- 57	0.0040	0.39 – 0.043
57 – 71	0.0124	0.43 – 0.64
71 – 95	0.0176	0.64 – 1.7
95 – 105	0.0070	1.7 – 2.00
105 - 119	0.0053	2.00 – 2.4

Con estos resultados se decidió hacer la gráfica que se encuentra en la figura 12 del apartado de resultados y discusión.

**Figuras de las diferentes velocidades de crecimiento obtenidas experimentalmente**



**Figura 21 y 22. Cálculo de la velocidad de crecimiento entre 33 - 47 h y 47- 57 h.**



**Figura 23 y 24. Cálculo de la velocidad de crecimiento entre 57 - 71 h y 71 - 95 h.**

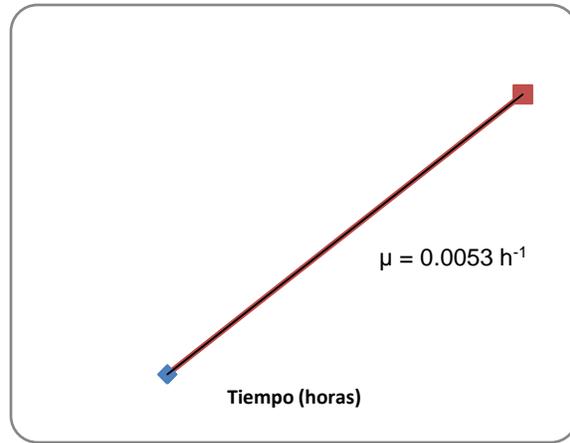
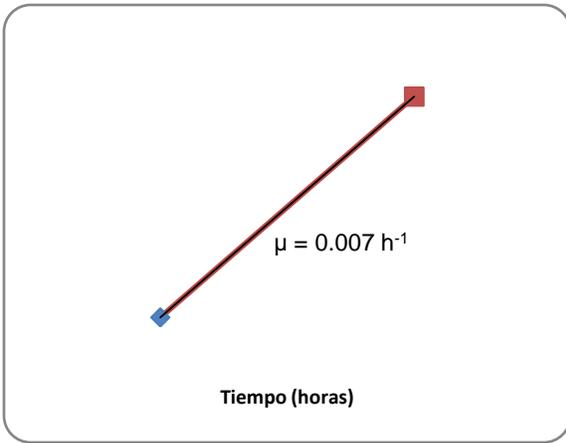


Figura 25 y 26. Cálculo de la velocidad de crecimiento entre 95 - 105 h y 105 - 119 h.