



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**CEIB**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
EN BIOTECNOLOGÍA UAEM

## Universidad Autónoma del Estado de Morelos

---

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

BIODEGRADACIÓN DE LA FRACCIÓN AROMÁTICA DEL

CRUDO MAYA POR CEPAS DE *Serratia marcescens*

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:

BIOL. MARIA PILAR MUÑOZ RIVERA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ

CUERNAVACA, MORELOS

ABRIL, 2019

Este proyecto de investigación fue realizado en el laboratorio de Biotecnología Ambiental del Centro de Investigación de Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección de la Doctora María del Refugio Trejo Hernández, esta investigación ha sido financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a la Doctora María del Refugio Trejo Hernández por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, como directora es una persona a seguir muy dedicada exigente y de la cual aprendí muchas cosas que me han servido mucho, pero sobre todo quiero recalcar que más que una buenísima doctora es una excelente persona con un gran corazón su forma de acoger a sus alumnos me hizo sentir en una gran familia, tanto que pasaron muchos muchos años y aquí sigo conviviendo con ustedes, Doctora muchas gracias por la toda paciencia y dedicación con la que me enseñó y apoyo todo este tiempo.

También quiero agradecer al Doctor Fernando que siempre estuvo compartiendo su enorme conocimiento conmigo corrigiendo mi escrito y aportando siempre buenos consejos.

Al Doctor Leobardo Serrano por brindarme su apoyo y aceptarme en su clase, de la cual se obtuvieron muchos de los resultados.

A la bióloga Fernanda por no tirar la toalla en todos estos años y seguir al pendiente de cada trámite que me hacía falta.

A Dani por apoyarme y encender el cromatógrafo cada vez que lo necesite.

A mis compañeros de laboratorio los cuales aguantaron todas mis pláticas y desastre que hacía, Nash, Vero, Brand, Viry, Ari, Nidya, Lupis, Enrique y Janeth.

## COMITÉ TUTORAL:

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (CEIB-UAEM)

**Director de Tesis**

Dr. Fernando Martínez Morales (CEIB-UAEM)

Dra. Maria del Carmen Gutiérrez Villafuerte (CEIB-UAEM)

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa (CEIB-UAEM)

Dra. Constanza Machín Ramírez (FCQeI-UAEM)

## DEDICATORIAS

### **A Dios.**

*Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, por las oportunidades y puertas que me abre, por estar conmigo en cada paso que doy, por iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante toda mi vida.*

### **A mi madre.**

*Por darme la vida, creer en mí, por haberme apoyado en todo momento, por la incansable lucha, porque mis proyectos los haces tuyos y siempre estas para darme un consejo un regaño y todo tú apoyo incondicional pero más que nada, gracias por el infinito amor que me tienes.*

### **A mi padre.**

*Por los ejemplos de perseverancia y constancia que te caracterizan y que has tratado de enseñarme siempre, solo que yo soy necia, eres un hombre de pocas palabras pero de gran corazón que con tus hechos me dices cuanto me quieres, padre te quiero con to mi ser.*

*Le doy gracias a Dios por mantenerlos con migo por seguir juntos en esta vida llena de momentos alegres algunos difíciles pero sobre todo compartiendo un sueño más.*

### **A mis hijos.**

*Cambie mi vida, mi tiempo y mi forma de pensar por ustedes.. Hoy doy mi vida, mi alma, mi energía, por sacarlos adelante y enseñarlos a vivir. Le pido a Dios me permita vivir muchos años para acompañarlos en lo dulce pero sobre todo en lo amargo, no puedo vivir su vida pero si espero y la compartan conmigo.*

*Sé que sacrificamos muchas cosas momentos que no volverán pero ustedes siempre fueron mi motor gracias por entender y estar a mi lado.*

*Joshua hijo mío hace 7 años te escribí unas palabras como estas pero a un no sabías leer, ahora eres todo un jovencito, sé que tal vez ahora hasta me corrijas algunas cosas que te escribo y eso me demuestra que estoy haciendo bien mi labor. Eres un niño con muchas cualidades, uno de mis mayores tesoros te quiero tanto que se me sale del pecho todo el amor que te tengo, tú has estado para mí siempre tan*

*comprensivo conmigo, te ha tocado vivir esta vida de estudiante conmigo y lo único que espero es que tomes un poco del ejemplo que te estoy dando que nunca desistas de tus metas no importa si nadie crea en ti yo estaré siempre dispuesta a acompañarte en cada sueño.*

*Para ti mi Edahi llegaste cuando este proyecto estaba a medio camino, te vi y supe que cambiarías mi vida y aun así quería ya tenerte a mi lado, tú me llamas madre y eso me llena de alegría y orgullo eres un torbellino que vino a llenarme de amor. Esfuérzate y se valiente en cada proyecto que inicies, persevera en cada momento que yo estaré ahí viendo como triunfas.*

*A un eres muy pequeño y no entiendes por todo lo que pasamos juntos y ninguno de los dos nos dimos por vencidos tú te aferraste a esta vida,,,, así como yo me aferre a este sueño. No importa cuánto camino nos quede por recorrer siempre contarás con mi apoyo pero sobre todo mi amor.*

*No puedo prometerles que estare presente durante toda su vida. Pero si que voy a amarlos por el resto de mia.*

### **A mi esposo**

*En el camino encuentras personas que iluminan tu vida, que con su apoyo alcanzas de mejor manera tus metas.*

*Eric infinitas gracias por que a través de tus consejos, tu comprensión, pero sobre todo por la paciencia que me has tenido. No tengo palabras para agradecerte las incontables veces que me brindaste tu apoyo en todas las decisiones que he tomado a lo largo nuestra vida juntos, unas buenas, otras malas, otras locas pero siempre dándome la libertad de desenvolverme como persona. Gracias por que con todo eso me ayudaste a concluir esta meta.*

## INDICE GENERAL

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN.....  | 1  |
| 2. ANTECEDENTES.....  | 3  |
| 2.1 Contaminación del suelo por hidrocarburos.....  | 3  |
| 2.2 Causas de derrames por la actividad petrolera.....  | 4  |
| 2.3 Producción de petróleo en México.....   | 5  |
| 2.4 Composición del petróleo.....   | 6  |
| 2.5 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's).....  | 8  |
| 2.6 Situación en México.....  | 10 |
| 2.7 Toxicidad de los HAP's.....   | 11 |
| 2.8 Vías de exposición.....   | 13 |
| 2.9 Biorremediación.....  | 14 |
| 2.10 Biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.....   | 15 |
| 2.11 Biodisponibilidad de los HAP's.....  | 17 |
| 2.12 Benzo(a)Pireno.....  | 17 |
| 2.13 Metabolismo del Benzo(a)Pireno.....  | 17 |
| 2.14 Factores que afectan la biodegradación de los contaminantes.....   | 18 |
| 2.15 Serratia marcescens.....   | 18 |
| 3. ANTECEDENTES DE GRUPO.....   | 20 |
| 4. JUSTIFICACIÓN.....   | 21 |
| 5. HIPOTESIS.....   | 22 |
| 6. OBJETIVOS.....   | 22 |
| 6.1 Objetivo General.....   | 22 |
| 6.2 Objetivos Particulares.....   | 22 |
| 7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....   | 23 |
| 8. MATERIALES Y METODOS.....  | 24 |
| 8.1 Microorganismos.....  | 24 |
| 8.2 Medios de conservación.....   | 24 |
| 8.3 Medios de cultivo.....  | 24 |
| 8.4 Petróleo crudo Maya.....  | 25 |
| 8.5 Eliminación de la porción de asfaltenos del petróleo crudo Maya.....  | 25 |
| 8.6 Fraccionamiento de Hidrocarburos.....   | 25 |
| 8.7 Técnicas analíticas.....  | 26 |
| 8.7.1 Análisis cromatográfico de hidrocarburos poliaromáticos.....  | 26 |
| 8.7.2 Ensayos de aclimatación de las cepas bacterianas a la fracción<br>Aromática.....                          | 27 |
| 8.7.3 Ensayos de biodegradación de la fracción aromática.....   | 27 |
| 8.7.4 Degradación del Benzo(a)Pireno y la fracción aromática del petróleo<br>crudo Maya por la cepa SMRG-5..... | 28 |
| 8.7.5 Biodegradación del Benzo(a)Pireno por la cepa SMRG-5.....   | 28 |
| 8.8 Técnicas analíticas.....  | 28 |
| 8.8.1 Cuantificación del crecimiento microbiano.....  | 28 |

|  |    |
|--|----|
| 8.8.2 Extracción orgánica y cuantificación de HAP's.....   | 29 |
| 8.7.3 Análisis estadístico por cromatografía de gases.....   | 30 |
| 9. RESULTADOS.....   | 31 |
| 9.1. Fraccionamiento del petróleo crudo Maya.....  | 31 |
| 9.2. Eliminación de asfaltenos del petróleo crudo Maya.....  | 32 |
| 9.3. Aclimatación de las cepas bacterianas a diferentes concentraciones de fracción aromática y alifática.....   | 36 |
| 9.4. Estudio del efecto de la concentración de la fracción aromática y glicerol....  | 43 |
| 9.5. Efecto de la concentración de la fracción aromática y glicerol sobre la biodegradación de la fracción aromática por la cepa SM3.....                    | 44 |
| 9.6. Efecto de la concentración de la fracción aromática y glicerol sobre la biodegradación de la fracción aromática por la cepa SM4.....                    | 49 |
| 9.7. Efectos de la concentración de la fracción aromática y glicerol sobre la biodegradación de la fracción aromática por la cepa mutante blanca SMRG-5...57 |    |
| 9.8. Degradación de la fracción aromática y el hidrocarburo Benzo(a)Pireno por la cepa mutante SMRG-5.....   | 60 |
| 9.9. Biodegradación de Benzo(a)Pireno utilizando la cepa mutante SMRG-5....  | 61 |
| 10. DISCUSIÓN.....   | 63 |
| 11. CONCLUSIONES.....  | 68 |
| 12. PERSPECTIVAS.....  | 69 |
| 13. BIBLIOGRAFÍA.....  | 70 |
| 14. ANEXOS.....  | 76 |

## INDICE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Estructuras químicas de diferentes compuestos mayoritarios del petróleo (Speight, 1991).....   | 8  |
| Figura 2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos clasificados como Contaminantes prioritarios por la EPA (ASTDR, 1995).....   | 10 |
| Figura 3. Reacciones iniciales del metabolismo aerobio de los HAP's (Owabor et al., 2012).....   | 15 |
| Figura 4. Primeras reacciones de la degradación y/o transformación de los hidrocarburos aromáticos por bacterias y hongos.....   | 16 |
| Figura 5. Esquema de la estrategia experimental. ....  | 23 |
| Figura 6. Perfil cromatográfico del Petróleo crudo Maya.....   | 31 |
| Figura 7. Perfil cromatográfico del petróleo crudo Maya libre de asfáltenos.....   | 32 |
| Figura 8. Hidrocarburos aromáticos revelados con luz UV.....   | 33 |
| Figura 9. Perfiles cromatográficos de las fracciones obtenidas del petróleo crudo sin asfáltenos. A) Alifáticos; B) Aromáticos; C) Resinas débilmente ácidas y D) Resinas ácidas.....                              | 35 |
| Figura 10. Perfil cromatográfico de la fracción aromática con la mezcla de estándares SV Calibration Mix No. 5, (1) fluoranteno, (2) pireno, (3) criseno, (4) Benzo(K) fluoranteno y (5) Benzo(g,h,i)perileno..... | 36 |
| Figura 11. Cinética de crecimiento durante la aclimatación de la cepa SM3.....   | 37 |
| Figura 12. Matraces experimentales en los que se observa el crecimiento microbiano de la cepa SM3, con la fracción aromática durante la aclimatación. A) día 0, B) día 10 C) día 20 de la aclimatación.....        | 38 |
| Figura 13. Perfil cromatográfico de la fracción aromática. A) Control abiótico y B) Fracción aromática degradada por la cepa SM3.....  | 38 |
| Figura 14. Cinética de crecimiento durante la aclimatación de la cepa SM4 a las diferentes concentraciones de la fracción aromática, a una temperatura de (30°C) y agitación de 175 rpm.....                       | 39 |
| Figura 15. Matraces experimentales en los que se observa el crecimiento microbiano de la cepa SM4, con la fracción aromática durante la aclimatación A) día 0 B) día 10 C) día 20 de la aclimatación.....          | 40 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 16. Perfil cromatográfico de la fracción aromática. A) Control abiótico y B) Perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por la cepa SM4.....  | 41 |
| Figura 17. Cinética de crecimiento durante la aclimatación de la cepa SMRG-5.....   | 42 |
| Figura 18. Matrices experimentales en los que se observa el crecimiento microbiano de la cepa mutante SMRG-5, con la fracción aromática durante la aclimatación A) día 0 B) día 10 C) día 20 de la aclimatación. .... | 42 |
| Figura 19. Perfil cromatográfico de la fracción aromática. A) Control abiótico y B) Perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por la cepa SMRG-5.....   | 43 |
| Figura 20. Gráfica de efectos de la interacción de las variables codificadas sobre porcentaje de remoción para la cepa SM3.....   | 46 |
| Figura 21. Gráfica de efectos de la interacción de las variables codificadas sobre porcentaje de remoción para la cepa SM3 solo del factor con efecto.....  | 46 |
| Figura 22.- Superficie de respuesta tridimensional. Efecto de la concentración fracción aromática A (X1), y glicerol B (X2) sobre el porcentaje de remoción para la cepa silvestre SM3.....                           | 47 |
| Figura 23. Perfiles cromatográficos obtenidos durante la degradación de la fracción aromática por la cepa SM3 donde A es el control y B el perfil de la degradación.....  | 48 |
| Figura 24. Gráfica de efectos de la interacción de las variables codificadas sobre porcentaje de remoción para la cepa SM4.....   | 50 |
| Figura 25. Gráfica de efectos de la interacción de las variables codificadas sobre porcentaje de remoción para la cepa SM4 solo del factor con efecto.....  | 50 |
| Figura 26. Superficie de respuesta tridimensional. Efecto de la concentración fracción aromática A (X1), y glicerol B (X2) sobre el porcentaje de remoción para la cepa SM4.....                                      | 51 |
| Figura 27. Perfiles cromatográficos durante la degradación de la fracción aromática por la cepa SM3 donde A es el control y B el perfil de la degradación de la fracción aromática por la cepa mutante SM4.....       | 52 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 28. Gráfica de efectos de la interacción de las variables codificadas sobre porcentaje de remoción para la cepa mutante SMRG-5.....   | 53 |
| Figura 29. Gráfica de efectos de la interacción de las variables codificadas sobre porcentaje de remoción para la cepa mutante SMRG-5 solo del factor con efecto.....  | 54 |
| Figura 30. Superficie de respuesta tridimensional, efecto de la concentración de la fracción aromática A (X1) y glicerol B (X2) sobre el porcentaje de remoción para la cepa mutante SMRG-5.....   | 55 |
| Figura 31. Perfiles cromatográficos obtenidos durante la degradación de la fracción aromática por la cepa SMRG5 donde A es el control y B el perfil de la degradación de la fracción aromática por cada cepa.....                                | 56 |
| Figura 32. Perfil cromatográfico de la biodegradación a 9 días de incubación de la fracción aromática con la cepa SMRG-5 con la adición de tres estándares alifáticos, 1 tridecano, 2 pentadecano y 3 heptadecano.....                           | 59 |
| Figura 33. Cinética de degradación de la fracción aromática con la cepa mutante SMRG-5.....  | 60 |
| Figura 34. Perfiles cromatográficos obtenidos durante la degradación de la fracción aromática más el BaP por la cepa mutante SMRG-5 donde A es el control y B el perfil de la degradación de la fracción aromática para cada cepa estudiada..... | 61 |
| Figura 35. Perfil cromatográfico de biodegradación del Benzo(a)Pireno [25 ppm] en medio mínimo por la cepa mutante SMRG-5 A) Control B) degradación después de 9 días.....   | 62 |

## INDICE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación de petróleo mexicano según su gravedad API y propiedades de los crudos mexicanos.....  | 6  |
| Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo.....   | 24 |
| Tabla 3. Matriz experimental factorial 2 <sup>2</sup> .....   | 27 |
| Tabla 4. % de abundancia de cada fracción del petróleo crudo Maya.....  | 34 |
| Tabla 5. Resultados de datos del diseño experimental factorial 2 <sup>2</sup> usado para evaluar la influencia de la concentración de la fracción aromática y del glicerol sobre la remoción de la fracción aromática por la cepa SM3.....    | 45 |
| Tabla 6. Resultados de datos del diseño experimental factorial 2 <sup>2</sup> usado para evaluar la influencia de la concentración de la fracción aromática y del glicerol sobre la remoción de la fracción aromática por la cepa SM4.....    | 49 |
| Tabla 7. Resultados de datos del diseño experimental factorial 2 <sup>2</sup> usado para evaluar la influencia de la concentración de la fracción aromática y del glicerol sobre la remoción de la fracción aromática por la cepa SMRG-5..... | 53 |
| Tabla 8. Matriz de datos del diseño experimental-todos los tratamientos.....  | 57 |
| Tabla 9. Coeficientes estimados de los datos obtenidos del análisis de ANOVA para las cepas SM3, SM4 y SMRG-5.....  | 59 |

## 1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, uno de los problemas principales que aquejan al hombre es la contaminación del aire, agua y suelo. Éste problema se debe principalmente al impacto ambiental causado por descargas industriales de efluentes líquidos y sólidos sin un tratamiento previo. Entre los principales contaminantes generados por el sector industrial se encuentran los hidrocarburos, que están presentes en una gran cantidad de residuos líquidos, semisólidos y sólidos, como consecuencia de las diferentes actividades realizadas por la industria petrolera. La contaminación por hidrocarburos es el resultado de las actividades de extracción, refinación, petroquímica, almacenamiento, distribución y transporte, así como los derrames accidentales o provocados. El deterioro ambiental causado por la presencia de hidrocarburos en el ambiente es muy grave, esto y se debe a que en los sitios contaminados con hidrocarburos los procesos de descontaminación no alcanzan a cubrir todas las áreas afectadas o se realizan mucho tiempo después de que éstos han ingresado en los suelos, sedimentos y cuerpos de agua, dificultando su eliminación.

El petróleo crudo es una mezcla extremadamente compleja y variable de compuestos orgánicos, donde la mayoría de ellos son hidrocarburos, que varían en peso molecular desde el gas metano hasta alquitranes y bitúmenes de altos pesos moleculares. Los hidrocarburos pueden presentarse en un amplio rango de estructuras moleculares: cadenas lineales y ramificadas, anillos sencillos, condensados o aromáticos. Estos últimos se clasifican con dos grupos de hidrocarburos aromáticos y poliaromáticos. En el primer grupo se incluyen los monocíclicos, el benceno, tolueno y xileno (BTEX). En el grupo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) se incluyen compuestos aromáticos de más número de anillos los tales como el naftaleno, antraceno y fenantreno. La degradación microbiana constituye el principal proceso de descontaminación natural (Torres; Zuluaga. 2009). Esta surge de la necesidad de disminuir el impacto ambiental, con el fin de detoxificar contaminantes en los diferentes ambientes (agua y suelos) usando microorganismos, plantas o enzimas de éstos. Gracias a la biotecnología ambiental se han desarrollado diversas estrategias con el fin de restaurar el suelo y la calidad ambiental, de acuerdo con las necesidades y dimensiones del problema (Pao-

Wen *et al.*, 2011). En este proyecto nos enfocaremos en la fracción aromática, ya que se trata de la porción más recalcitrante y toxica y menos volátil por lo tanto más difícil de eliminar del medio, por lo que se utilizaron diferentes estrategias biotecnológicas.

## 2. ANTECEDENTES

El desarrollo tecnológico e industrial ha incrementado la introducción de compuestos químicos tóxicos en el ambiente como consecuencia de las actividades industriales, como es el caso de la industria farmacéutica, química, petroquímica y textil, entre otras. Muchos de los contaminantes que se encuentran incorporados en el ambiente han sido descargados deliberadamente, en forma accidental o inadvertida en el agua, aire o suelo después de que fueron generados o utilizados (Machín-Ramírez, 2010).

El manejo inadecuado de los materiales y residuos peligrosos ha generado a escala mundial un problema de contaminación de suelos, aire y agua (Benavides, 2006).

### 2.1 Contaminación del suelo por hidrocarburos

Las malas prácticas con el manejo de los hidrocarburos, los accidentes en su almacenamiento y transporte han generado problemas ambientales en los que se ha hecho evidente la contaminación de grandes extensiones de suelo y mantos acuíferos (Mayolo-Deloisa, 2007). Esto puede ser accidental o deliberadamente, lo que lleva a graves problemas de contaminación y daños a la salud. La contaminación del suelo por petróleo es causada principalmente durante las actividades de explotación petrolera, fundición, transporte y distribución la disposición clandestina así como derrames y accidentes (Tanga *et al.*, 2012).

En el suelo los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida puede ser más o menos lentos, ocasionando una mayor toxicidad. Además los suelos por tener una moderada, alta o extrema salinidad, dificultando su tratamiento. Altos gradientes de salinidad pueden destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, lo cual es letal para muchos microorganismos usados para el tratamiento de aguas y suelos contaminados. (Benavides *et al.*, 2006). Las propiedades físico-químicas de los suelos, así como la composición dinámica de las comunidades microbianas se puede cambiar por contaminación de los hidrocarburos (Tanga *et al.*, 2012).

En México existen extensas áreas contaminadas con hidrocarburos del petróleo debido principalmente a derrames, así como a las actividades propias de la industria petrolera. Este tipo de compuestos se acumulan en ecosistemas marinos y en suelos, siendo responsables de su deterioro. Algunos suelos contaminados, principalmente en el sureste de México, contienen concentraciones de hidrocarburos hasta de 450,000 mg/kg (Velasco y Volke, 2003).

## **2.2 Causas de derrames por la actividad petrolera**

Los eventos de contaminación pueden tener una fuente o varias causas que participan de una forma determinante al desastre o complican el problema por los elementos o desechos que de forma independiente no tienen carácter contaminante, pero que por combinación o adición con las fuentes procedentes de la misma u otras, llegan a contaminar. Dentro de las materias que tratan este tema se define vertimiento al derrame accidental; es decir, no provocado, no deseado, imprevisible, que afecta un recurso natural (Ramírez-Islas, 1998).

Las causas más frecuentes de contaminación en la industria petrolera por transporte del mismo en oleoducto se deben a fallas de tipo operacional o fatiga de materiales.

La falla operacional se presenta por un desajuste o asincronismo en la actividad normal de la operación de un oleoducto, un poliducto o estación, ya sea en la manipulación de los instrumentos o en la parte operativa por parte de los operadores, que ocasionan una sobrepresión de la línea de transporte. Mientras que la fatiga de materiales es el resultado de un inadecuado mantenimiento de las instalaciones, que pueden ser tubos, pozos de múltiple abastecimiento, provocando un *pittinges*, un orificio por el cual se genera una fuga del líquido.

### **2.3 Producción de petróleo en México**

Como el golfo de México se sitúa geográficamente dentro de la cuenca del gran Caribe es necesario mencionar que esta región es una de las más grandes productoras de petróleo en el mundo. Las principales áreas de producción incluyen Luisiana y costas de Texas EEUU, bahía de Campeche, México; lago Maracaibo, Venezuela y Golfo de Paria en Trinidad y Tobago, las cuales están consideradas como zonas de alto riesgo para accidentes petroleros (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006).

La porción sureste de México es altamente productiva de petróleo y contiene más del 80% de las reservas totales del crudo mexicano. La exploración de la cuenca del sureste, que abarca Salina Cruz, Chiapas Tabasco Campeche y Macuspana (Botello *et al.*, 2005).

México es reconocido a nivel mundial como productor de petróleo crudo, ya que comercializa tres diferentes tipos de petróleo que se clasifican en la siguiente manera ver tabla 1.

La industria mundial de hidrocarburos líquidos clasifica el petróleo de acuerdo con su densidad API (parámetro internacional del Instituto Americano del Petróleo) que diferencia las calidades del crudo. La clasificación y las propiedades de los diferentes crudos mexicanos se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación de petróleo mexicano según su gravedad API y propiedades de los crudos mexicanos.

| Petróleo                        | Superligero               | Ligero            | Pesado                               |
|---------------------------------|---------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| <b>Nombre</b>                   | <b>Olmeca</b>             | <b>Istmo</b>      | <b>Maya</b>                          |
| Gravedad API                    | > 39                      | 31.1 - 39         | 10.0 - 22.3                          |
| Composición                     |                           |                   |                                      |
| Densidad ( g/ cm <sup>3</sup> ) | < 0.83                    | 0.87 - 0.83       | 1.0 - 0.92                           |
| Azufre total % peso             | 1.20                      | 1.68              | 3.60                                 |
| Nitrógeno total, ppm            | 780                       | 1461              | 3400                                 |
| Procedencia                     | Sonda de Campeche         | Sonda de Campeche | Sonda de Campeche                    |
| Toxicidad                       | Alta aguda<br>Corto plazo |                   | Potencial y crónica<br>a largo plazo |
| Contaminación                   |                           |                   |                                      |
| Solubilidad                     | Alta                      | Baja              | Muy baja                             |
| Evaporación                     | Rápida y completa         | Media             | No hay perdida                       |
| Tratamiento                     |                           |                   |                                      |
| Tasa de degradación             | Rápida                    | Media             | Lenta                                |

PEMEX (Petróleos Mexicanos), 2000.

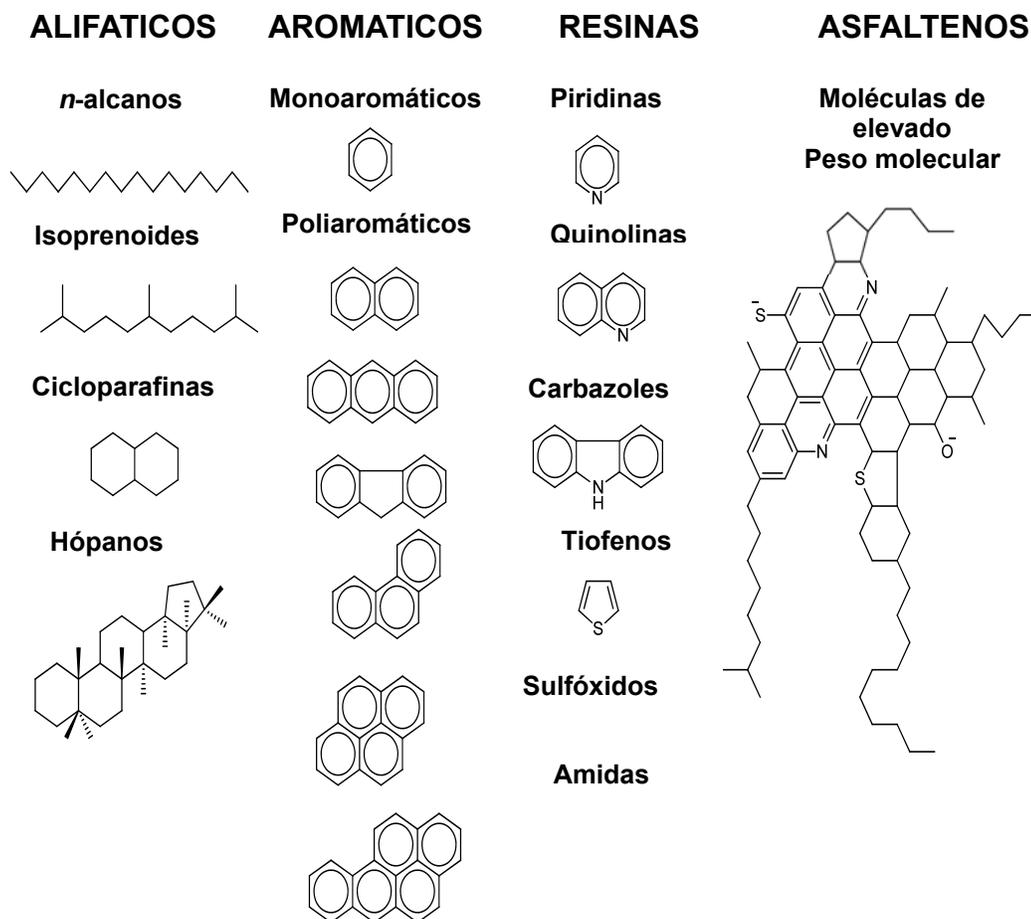
## 2.4 Composición del petróleo

El petróleo es una mezcla de compuestos que se obtiene de las transformaciones que sufre la materia orgánica producida por la muerte de los seres vivos. La composición física del petróleo varía en color, viscosidad, gravedad específica y otras propiedades dependiendo de la fuente geológica y geográfica, a las distintas proporciones de las

fracciones de hidrocarburos, y a la variación en la concentración de azufre, nitrógeno y metales (Alexander, 1999). La composición química del petróleo varía dependiendo del tipo de hidrocarburo que lo conforma y estos se clasifican por el número de átomos de carbono que contienen en su estructura (Viñas Canals M., 2005).

Los hidrocarburos están formados por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre. La composición media del petróleo es 85%C, 12%H y 3% mezcla de S,O,N y K además de varios elementos metálicos.

Para evaluar la composición de los petróleos crudos es necesario realizar fraccionamiento de sus diferentes componentes (Wauquier 2004). Uno de los métodos de análisis más utilizados para separar los diferentes compuestos que conforman el petróleo se conoce como SARA, que separa los componentes en cuatro fracciones (saturados, aromáticos, resinas y asfáltenos). En la figura 1 se presentan las diferentes estructuras químicas de las principales fracciones que conforman el petróleo.



**Figura 1.** Estructuras químicas de diferentes compuestos mayoritarios del petróleo (Speight, 1991).

De acuerdo a su persistencia en el ambiente y su toxicidad, la fracción del petróleo más importante es la fracción aromática, constituida frecuentemente por Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's).

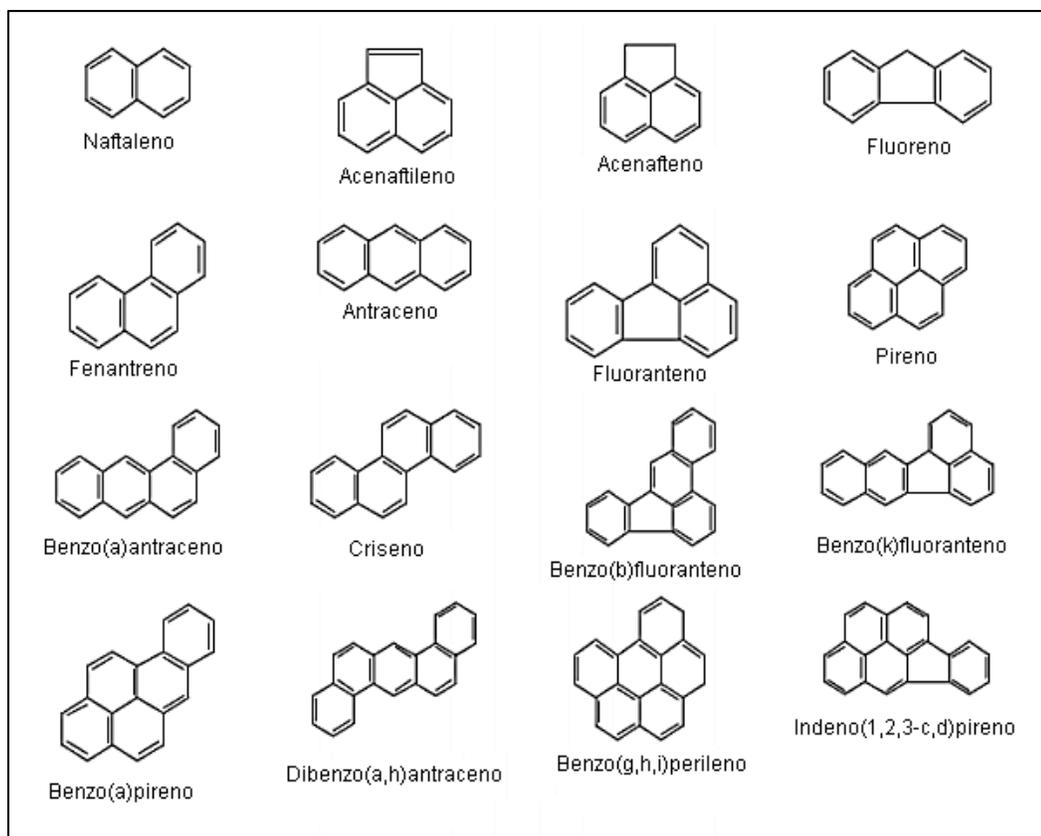
## 2.5 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP's)

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos son sustancias que contienen carbono e hidrógeno, sus átomos de carbono arreglados en una serie de anillos bencénicos

fusionados, algunos están constituidos con sustituyentes alquilo o como moléculas heterocíclicas que contienen oxígeno, nitrógeno o azufre.

Son compuestos formados por la unión de dos o más anillos aromáticos fusionados (Park; Park, 2010), que en general muestran baja volatilidad y baja solubilidad en agua (Machín-Ramírez, 2010). Son un grupo de compuestos altamente hidrofóbicos, persistentes y recalcitrantes, por lo que tienden a bioacumularse. Existen más de 100 grupos de HAP's diferentes, se consideran compuestos orgánicos persistente por lo que pueden permanecer en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo sin alterar sus propiedades tóxicas (Jiménez C, 2001).

Debido a estas características, la Agencia de Protección Ambiental de Norteamérica (EPA) en los Estados Unidos clasifica a 16 hidrocarburos aromáticos polinucleares como contaminantes prioritarios (figura 2). Debido a su potencial tóxico agudo y crónico, el potencial carcinogénico se asocia con HAP's de alto peso molecular, como los más importantes en términos ambientales y como representativos de este grupo de sustancias (Dost; Ideli, 2012; Corona; Iturbe, 2004).



**Figura 2.** Hidrocarburos aromáticos policíclicos clasificados como contaminantes prioritarios por la EPA (ASTDR, 1995).

## 2.6 Situación en México

En México no se cuenta con un estimado de las emisiones totales de HAP al ambiente tanto fijas y móviles. Los HAP's pueden ser generados por diversas actividades agroindustriales. Una de las actividades importantes en México que pueden emitir HAP's son las quemadas agrícolas y las prácticas de roza, tumba y quema pueden contribuir de manera importante a la carga de HAP's en el ambiente. Se sabe que el 26% de la superficie de la república es quemada anualmente para limpiar el terreno previo a la siembra (CENICA, 2001). Otra de las actividades que generan contaminación por HAP's es la producción de energía; El petróleo como fuente de energía primaria (70%). En la generación de energía secundaria se utiliza sobre todo combustóleo (22.5%), gas natural (21%), gasolinas (17.6%), esta ultima el (2.9%) no representa un porcentaje importante del total de generación de energía, no obstante es fuente de energía en muchos hogares,

donde generalmente se quema dentro de los hogares, condiciones pésimas de ventilación y las personas se exponen a esas emisiones de humo.

Así mismo durante la explotación, extracción y transporte de petróleo muchas veces se originan derrames accidentales ocasionando la contaminación de suelos y aguas superficiales el 97% de estas actividades se lleva a cabo en Tabasco y Campeche (Delgado; col., 2004). Muchas de las investigaciones que se han realizado en México han sido para cuantificar el grado de contaminación en diferentes matrices. En la mayoría de los trabajos se han reportado los 16 HAP definidos por la EPA (Agencia de protección ambiental EU) como prioritarios por lo que la frecuencia no se determina.

## 2.7 Toxicidad de los HAP's

Los principales impactos de los HAP's en la salud humana se centran en sus propiedades genotóxicas, es decir causan daños al material genético (teratogénicas, mutagénicas y carcinogénicas). Los más potentes carcinógenos son el Benzo(a)Antraceno, Benzo(a)Pireno y el Dibenzo(ah)Antraceno (Owabor *et al.*, 2012). Otros efectos en organismos terrestres están poco probados pero pueden incluir efectos adversos en la reproducción, desarrollo e inmunidad. Según IARC (Agencia Internacional De Investigación Del Cáncer), dependiente de la OMS (Organización Mundial de la Salud), que cataloga las sustancias según el conocimiento de su carcinogenicidad, los hidrocarburos están catalogados como posibles carcinógenos de humano, algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) analizados son los siguientes:

|                          |     |                             |
|--------------------------|-----|-----------------------------|
| Benzo(a)Antraceno        | 2 A | Probable carcinógeno humano |
| Benzo(b)Fluoranteno      | 2 B | Posible carcinógeno humano  |
| Benzo(k)Fluoranteno      | 2 B | Posible carcinógeno humano  |
| Benzo(a)Pireno           | 2 A | Posible carcinógeno humano  |
| Dibenzo(ah)Antraceno     | 2 A | Posible carcinógeno humano  |
| Indeno (1,2,3-cd) Pireno | 2 B | Posible carcinógeno humano  |

Estos seis compuestos forman parte de los 16 HAP's designados por la Agencia Americana de Protección Ambiental (USEPA) como contaminantes Prioritarios (ATSDR, 1995).

Durante el metabolismo, la biotransformación de los HAP's, los metabolitos diol epóxidos generados forman enlaces covalentes con una guanina del ADN. Estos enlaces y son los responsables de inducir cambios estructurales y roturas en el ADN, que bloquean la actividad de los sistemas enzimáticos de reparación y/o provocan errores en su replicación. Como consecuencia de su actividad biológica los HAP's pueden inducir el desarrollo de células cancerosas en diferentes órganos. Los HAP's desarrollan tumores en piel, pulmones, huesos (osteosarcomas), mamas (adenosarcomas) y estómago (Boelsterli, 2003). De acuerdo a lo anterior, es necesario establecer estrategias de biodegradación de las HAP's presentes en la fracción aromática de los crudos de petróleo en forma selectiva (ASTDR, 1995).

Han sido numerosas las investigaciones realizadas para determinar los efectos tóxicos de HAP's en animales de diferentes especies, de los cuales son clasificados como carcinógenos humanos potenciales (Benzo(a)Antraceno, Benzo(b) y Benzo(k)Fluoranteno, Benzo(a)Pireno, Dibenzo(a,h)Antraceno, Indeno(1,2,3-cd)Pireno). Se ha demostrado que la administración con Benzo(a)Antraceno en el alimento a ratones, indujo la formación de papilomas en el estómago. Asimismo, se observó un efecto en la reproducción de ratones y sus crías, cuando fueron alimentados con altos niveles de HAP's durante el periodo de gestación. Estas crías también tuvieron altas tasas de defectos de nacimiento y bajo peso. Otros estudios en animales han demostrado que los HAP's pueden producir efectos nocivos a la piel, fluidos corporales y a la habilidad para combatir infecciones después de las exposiciones ya sea de corta o de larga duración. Ciertos HAP's han producido cáncer en animales de laboratorio que respiraron aire (cáncer de pulmón) o comieron alimentos contaminados (cáncer de estómago) o se les aplicaron HAP's en la piel causando cáncer de piel (IARC, 1983; 2010).

## 2.8 Vías de exposición

El recorrido de los HAP's en el medio ambiente depende mucho de la forma y modo en que se incorporan en aguas freáticas, como resultado de la migración directa de aguas superficiales contaminadas o como consecuencia de suelos contaminados. Los compuestos de mayor persistencia se acumulan en plantas, peces e invertebrados terrestres y acuáticos (Zavala *et al.*, 2005).

Los mamíferos pueden absorber los HAP's por inhalación, contacto dérmico, o en menor frecuencia por ingestión (Owabor *et al.*, 2012). Las plantas pueden absorberlos a través de las raíces en suelos contaminados. Los HAP's de menor peso molecular se absorben más rápidamente que los de mayor peso molecular. La adsorción de HAP's en suelo es directamente proporcional al contenido de materia orgánica y al mayor peso molecular del HAP's e inversamente proporcional al tamaño de las partículas del suelo (Alexander, 1999). Los HAP's con menor peso molecular se volatilizan con mayor facilidad (Jiménez Cisneros, 2001).

Las características fisicoquímicas de los HAP's tienen influencia directa en su sorción en el suelo debido al contenido de materia orgánica, en cambio cuando se encuentran solubles tienden a volatilizarse y/o a ser biodegradados. Los hidrocarburos se pueden clasificar con base a tres mecanismos ambientales: volatilización, adsorción y biodegradación (Mikkonen *et al.*, 2012). En general los HAP's tienden a permanecer sorbidos en la matriz del suelo al aumentar su peso molecular (aumento en el número de anillos), esta tendencia los hace menos biodisponibles, dificultando su degradación; en solución, los HAP's de 2 y 3 anillos pueden volatilizarse, pero este mecanismo se presenta en menor proporción comparado con la sorción y biodegradación (Owabor *et al.*, 2012; Wiszniowski *et al.*, 2011). Los procesos de sorción son más importantes que la biodegradación; esto ha sido particularmente observado en suelos con alto contenido de materia orgánica y en materiales constituidos del 10 al 20% de arenas finas: arcillas y limos (Ramírez-Islas, 1998).

Los HAP's se encuentran presentes en el petróleo crudo entre un 1 a un 20% en peso, sus concentraciones dependen de su fuente geológica, también se encuentran en

productos refinados tales como: gasolina, queroseno, diésel y aceite de motor (Montes de Oca, 2001). Sus pesos moleculares se encuentran entre los 128 y 278 g/mol, por lo general al aumentar el número de anillos, su solubilidad y volatilidad disminuyen (Jiménez Cisneros, 2001).

Además de formar parte del petróleo, los HAP's pueden encontrarse como producto de la combustión incompleta de: combustibles fósiles, alquitrán de los cigarrillos, alimentos carbonizados, madera o carbón, así como de otros procesos industriales y naturales (Mayolo - Deloisa, 2007). Las actividades industriales asociadas a la generación de los HAP's incluyen las de la manufactura de gas, tratamiento de madera, refinación del petróleo, entre otros (Dost; Ideli, 2012).

En las últimas décadas del siglo XX y primeros años del siglo XXI, se comenzaron a utilizar organismos capaces de degradar hidrocarburos para remediar sitios contaminados, a este proceso se lo denominó biorremediación (Marroquín-Sánchez, 2007).

## **2.9 Biorremediación**

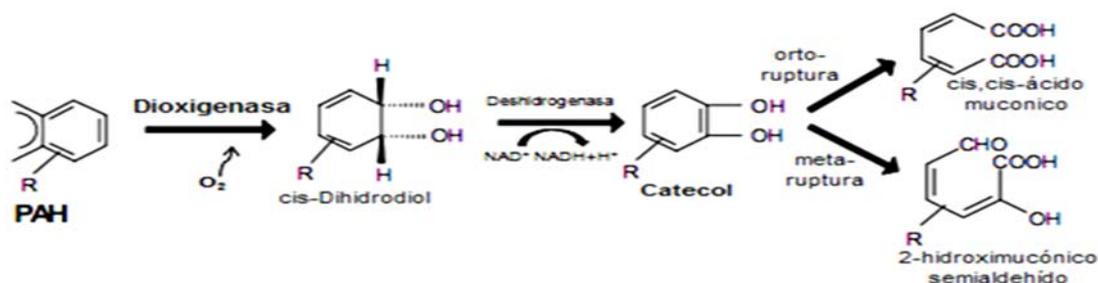
El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos menos tóxicos (Tanga *et al.*, 2012; Alexander, 1999). Esta estrategia biológica depende de las actividades catabólicas de los organismos, y por consiguiente de la utilización de los contaminantes como fuente de alimento y energía. Para que esto ocurra, es necesario favorecer las condiciones para el crecimiento y la biodegradación (Volke; Velasco, 2003).

El objetivo de la biorremediación es la mineralización del contaminante, es decir, la completa degradación de una molécula orgánica hasta compuestos inorgánicos (CO<sub>2</sub>, agua y formas inorgánicas de N, P y S) como una estrategia de limpieza viable, en muchos casos, depende de sus costos. La biorremediación es una tecnología rentable, ya que los cultivos microbianos que se utilizan en este proceso tienen un rendimiento eficaz y los productos finales no son nocivos a la salud (Das *et al.*, 2008; Ferrato, 2006).

Uno de los factores más importantes en el intemperismo es el fenómeno de la volatilización, cuya proporción depende de las condiciones ambientales y del tipo de hidrocarburo, ya que la velocidad de pérdida de hidrocarburos disminuye exponencialmente con el tiempo, y el material remanente es rico en ceras, asfáltenos y moléculas de mayor punto de ebullición que los sustancias volátiles; las pérdidas en peso por este fenómeno se encuentran entre 20 al 40%. Los microorganismos eucariontes y procariontes tienen la capacidad enzimática para oxidar sustratos aromáticos desde el benceno al Benzo(a)Pireno (Mikkonen *et al.*, 2012).

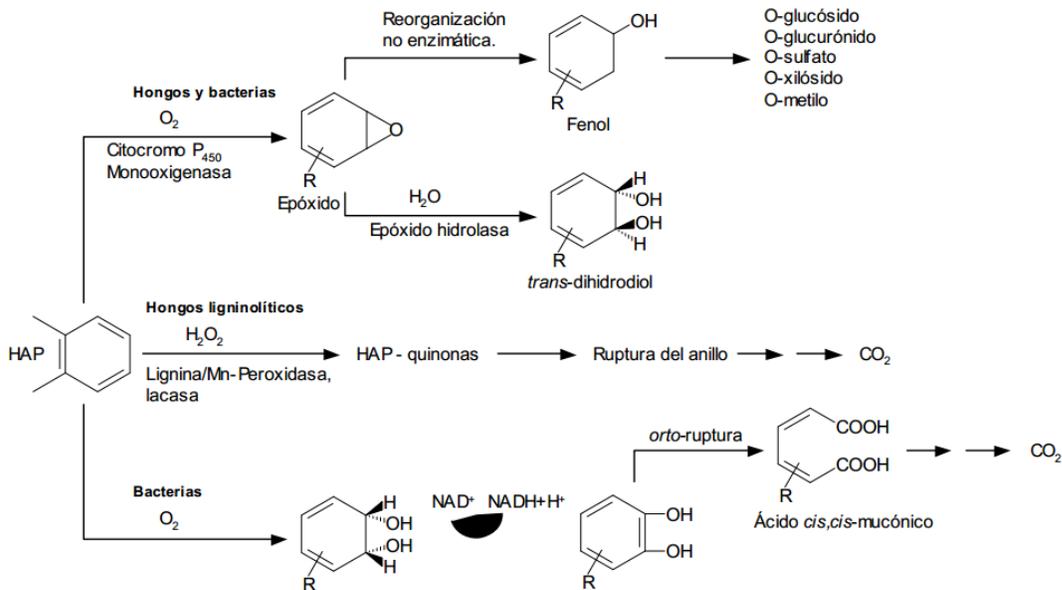
## 2.10 Biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

Algunas bacterias oxidan inicialmente los hidrocarburos aromáticos por la incorporación de dos átomos de oxígeno para formar un dihidrodiool con una configuración *cis*, esta reacción es catalizada por una dioxigenasa la cual es un sistema enzimático multicomponente, que consiste en una flavoproteína, una proteína que contiene fierro y azufre y una ferredoxina. La posterior oxidación de los *cis*-dihidrodiololes tiende a la formación de catecoles que son sustratos para otras dioxigenasas que realizan una fisión enzimática del anillo aromático. Las dioxigenasas dependientes de NAD catalizan la primera reacción del catabolismo de hidrocarburos aromáticos, formando los *cis*-dihidrodiololes; los cuales son transformados a dioles por enzimas alcohol deshidrogenasas y el diol es escindido por la acción de otra dioxigenasa no dependiente de NAD, (que rompe el anillo), para continuar por la ruta de los catecoles. Estas vías bioquímicas se conocen como vías periféricas que consisten en modificar los diferentes anillos aromáticos en protocatehuato y catecol (Montes de Oca, 2001).



**Figura 3.** Reacciones iniciales del metabolismo aerobio de los HAP's (Owabor *et al.*, 2012).

Finalmente, enzimas como el citocromo P450 pueden jugar un papel importante en la degradación de hidrocarburos, tanto en microorganismos eucariotas como procariontas.



**Figura 4.** Primeras reacciones de la degradación y/o transformación de los hidrocarburos aromáticos por bacterias y hongos (Kästner, 2000).

Para desestabilizar el anillo aromático, los microorganismos han desarrollado una estrategia común que consiste en la activación mediante la introducción de uno o dos grupos hidroxilo, mediante reacciones catalizadas por mono- o dioxigenasas, respectivamente (Harayama; Rekik, 1989). Las diferentes estrategias de degradación existentes en la naturaleza pueden observarse en la figura 4. Debido a las características fisicoquímicas de los HAP's, estos prevalecen como parte de los residuales de hidrocarburos intemperizados, su presencia crea un riesgo a la salud pública y al ambiente, por lo que es necesario llevar a cabo acciones de remediación que reduzcan los niveles de concentración de los HAP's, dentro de valores normativamente aceptables o, que minimicen su exposición al ambiente (Owabor *et al.*, 2012).

## **2.11 Biodisponibilidad de los HAP's**

La baja solubilidad de los HAP's favorece la adsorción a la materia orgánica dificultando su degradación. Con la finalidad de incrementar la biodisponibilidad de estos compuestos se han desarrollado moléculas que permiten reducir la tensión superficial, incrementando la biodisponibilidad para ello se usan biosurfactantes.

Los biosurfactantes son moléculas complejas las cuales involucran un amplio rango de estructuras químicas como péptidos, fosfolípidos, glicolípidos lipopéptidos. Estos compuestos tensoactivos se sabe que son inducidos por sustratos insolubles (hidrocarburos) para facilitar su difusión dentro de la célula. Son moléculas anfipáticas que presentan en su extremo hidrofílico: carbohidratos péptidos, un grupo carboxílico de ácidos grasos o aminoácidos, un grupo de fosforilo de fosfolípidos o un grupo hidroxilo de los insaturados, ramificados y algunos hidroxilados o también suelen encontrarse con un anillo esteroide (Morikawa *et al.*, 2000).

## **2.12 Benzo(a)Pireno**

Benzo(a)Pireno fue considerado por tres Grupos de Trabajo (IARC, 1973; 2010). Como un compuesto que produce tumores en todas las especies estudiadas (ratón, rata, hámster, cobaya, conejo, pato, tritón y mono) bajo diferentes rutas de exposición (oral, cutánea, inhalación, intratraqueal intrabronquial, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa). El BaP tiene un efecto cancerígeno tanto local como de manera sistémica, también fue un iniciador de la carcinogénesis de piel en ratones en estudios de exposiciones con dosis única en condiciones tras prenatal y transplacentaria (IARC, 1973).

## **2.13 Metabolismo del Benzo(a)Pireno**

El Benzo(a)Pireno es metabolizado por enzimas para formar una serie de óxidos, dihidrodioles, fenoles, y quinonas y sus conjugados polares, sulfato y glucurónido (Osborne y Crosby, 1987). Benzo(a)Pireno - 7,8 - diol es un metabolito clave que se forma por la acción de la epóxido hidrolasa en Benzo(a)Pireno - 7,8 - epóxido. Este dihidrodiole

puede ser metabolizado por el citocromo P450 más a una serie de Benzo(a)Pireno - 7,8 - diol 9,10 -epóxidos , que forman una clase de final metabolitos cancerígenos del BaP.

## **2.14 Factores que afectan la biodegradación de los contaminantes**

Teniendo en cuenta que la biorremediación depende de la velocidad de biodegradación de los contaminantes, es necesario considerar los factores que afectan la biodegradación, como los factores abióticos y bióticos, siguiendo un proceso que puede durar horas, días, meses o años según las condiciones (Owabor et al., 2012). Los factores abióticos o físico químicos agrupan aquellos que se relacionan con el contaminante (estructura química, concentración y biodisponibilidad) y las condiciones medioambientales (pH, humedad, temperatura, disponibilidad de oxígeno y nutrientes); mientras que los bióticos dependen de los microorganismos (población microbiana y cometabolismo) (Barrios, 2011).

Algunos compuestos como glucosa, extracto de levadura, acetato, piruvato, etanol y metanol, etc. han sido descritos en la literatura como co-sustratos en la degradación de hidrocarburos. Generalmente, la presencia de estos sustratos podría incrementar la cantidad de bacterias y como consecuencia aumentar la degradación de los hidrocarburos contaminantes. También el co-sustrato puede hacer variar la relación C:N en el medio favoreciendo el crecimiento microbiano e incrementando la producción de enzimas involucradas en la degradación de hidrocarburos y sus intermediarios (chang et al., 2008).

Por otra parte el efecto de los co-sustratos también puede ser adverso al competir como fuente de carbono y energía con el contaminante presente en el medio (Quantin et al., 2005)

## **2.15 *Serratia marcescens***

*Serratia marcescens* es un bacilo pequeño (0.9-2µm de largo y 0.5-0.8µm de diámetro) de la Familia Enterobacteriaceae, no esporulador, Gram negativo, anaerobio facultativo, oxidasa negativo, ubicuo y quimiorganotrófico con metabolismo fermentativo (Zhang et al., 2010). Dentro del género *Serratia* se encuentran también algunas otras especies

como *S. liquefaciens*, *S. rubidea*, *S. fonticola*, *S. marinorubra*, *S. grimessi*, *S. entomophila*, *S. odorífera*, *S. plymuthica*, *S. ficaria*, *S. proteamaculans*, *S. quinivorans* y *S. ureilytica*.

Las especies de *Serratia* son capaces de colonizar una amplia gama de superficies (por ejemplo: suelos, agua, superficies de plantas, tracto respiratorio y urinario en animales), pueden crecer a una temperatura que oscila entre 5-40°C, en niveles de pH que varían entre 5 y 9 y es causante de septicemia letal en insectos (Rosas-Galván, 2011).

*S. marcescens* secreta diversas proteínas extracelulares durante la etapa de crecimiento, entre estas se encuentran proteasas, nucleasas y quitinasas.

Así mismo se ha demostrado que son capaces de producir compuestos tensoactivos lipopéptidos como la Serrawettin W1, que es un exolípido tensoactivo que modifica la tensión superficial, y forma 2,3-butanodiol. La cepa *S. marcescens* H30 es una cepa potencial para la producción eficiente de 2,3-butanodiol (2,3-BD) (Zhang *et al.*, 2010).

Rosas-Galván, (2011) demostró que *S. marcescens* y sus mutantes químicas fueron capaces de reducir la tensión superficial.

### 3. ANTECEDENTES DE GRUPO

Existen reportes realizados en el laboratorio de Biotecnología Ambiental que indican que un grupo diverso de microorganismos como bacterias hongos y levaduras pueden degradar cometabólicamente o mineralizar algunos HAP's a productos menos tóxicos.

Generalmente los estudios de biodegradación con bacterias se basan en la inoculación de consorcios bacterianos que se obtienen por el aislamiento de cepas degradadoras de suelos contaminados con HAP's.

Machín-Ramírez, en 2010, evaluó diferentes estrategias biológicas y químicas para la degradación y mineralización del Benzo( $\alpha$ )Pireno (BaP), un hidrocarburo policíclico aromático (HAP) seleccionado como un compuesto representativo de la fracción más recalcitrante de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo.

Se realizaron ensayos de biodegradabilidad utilizando tres concentraciones diferentes del BaP (25, 50 y 75 mg/L) en fase acuosa, empleando cultivos puros de bacterias y hongos, en combinación de ambos, para obtener cultivos secuenciales fúngico bacteriano definidos. Las cepas empleadas fueron: *Aspergillus niger*, *Penicilium sp*, *Trichoderma harzianum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Serratia marcescens* y *Bacillus mycoides*. Los porcentajes de degradación obtenidos variaron entre el 9 al 84% en las cepas fúngicas, y entre el 1 al 35 % de las cepas bacterianas. Los mejores porcentajes fueron obtenidos con *S. marcescens*.

Por otra parte, en estudios recientes por Rosas-Galván (2011) Se demostró que la cepa SM3 *S. marcescens* y sus mutantes químicas fueron capaces de producir biosurfactante, lo que le permitió a *S. marcescens* incrementar la biodisponibilidad del BaP para su posterior biodegradación.

Los resultados previos demuestran la capacidad de las cepas de *Serratia* y sus mutantes químicas en la biodegradación de HAP's. Por lo anterior se propone realizar el estudio de la biodegradación de la fracción aromática del crudo Maya.

## 4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se sabe que el suelo tiene grandes problemas de desgaste, debido a que presenta una rápida degradación y una lenta regeneración, como consecuencia de la contaminación de suelo por la presencia de diferentes compuestos xenobióticos frecuentemente plaguicidas e hidrocarburos. Numerosos estudios se han enfocado en estudiar las vías metabólicas de bacterias aerobias y anaerobias que pueden llegar a degradar alcanos, ciclo alcanos, hidrocarburos aromáticos y policíclicos.

Debido a las propiedades fisicoquímicas de los HAP, como son una baja solubilidad en agua, toxicidad microbiana y una alta sorción sobre la materia orgánica del suelo, los procesos de biorremediación como el composteo, digestión anaerobia, entre otros, han resultado en una baja eficiencia de remoción de los HAP's, por lo que es necesaria la búsqueda de técnicas alternativas que favorezcan la degradación de esta sustancias.

Algunos microorganismos son capaces de producir sustancias tensoactivas que facilitan el proceso de emulsificación de hidrocarburos en fase acuosa por micelas formadoras, mejorando así su disponibilidad para la absorción y la degradación microbiana. Por lo tanto tienen aplicaciones potenciales en el campo de la biorremediación de los contaminantes orgánicos persistentes y recalcitrantes.

En este proyecto se pretende estudiar la biodegradación de la fracción aromática del petróleo que representa a la fracción más recalcitrante y tóxica (constituída por HAP's). Lo anterior conducirá a reducir el deterioro progresivo de la calidad del ambiente por la contaminación de hidrocarburos de alta persistencia y toxicidad.

## 5. HIPOTESIS

Se ha demostrado que las cepas de *Serratia marcescens* pueden degradar petróleo crudo y compuestos poliaromáticos, por lo tanto serán capaces de degradar la fracción aromática del petróleo en forma eficiente.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo General

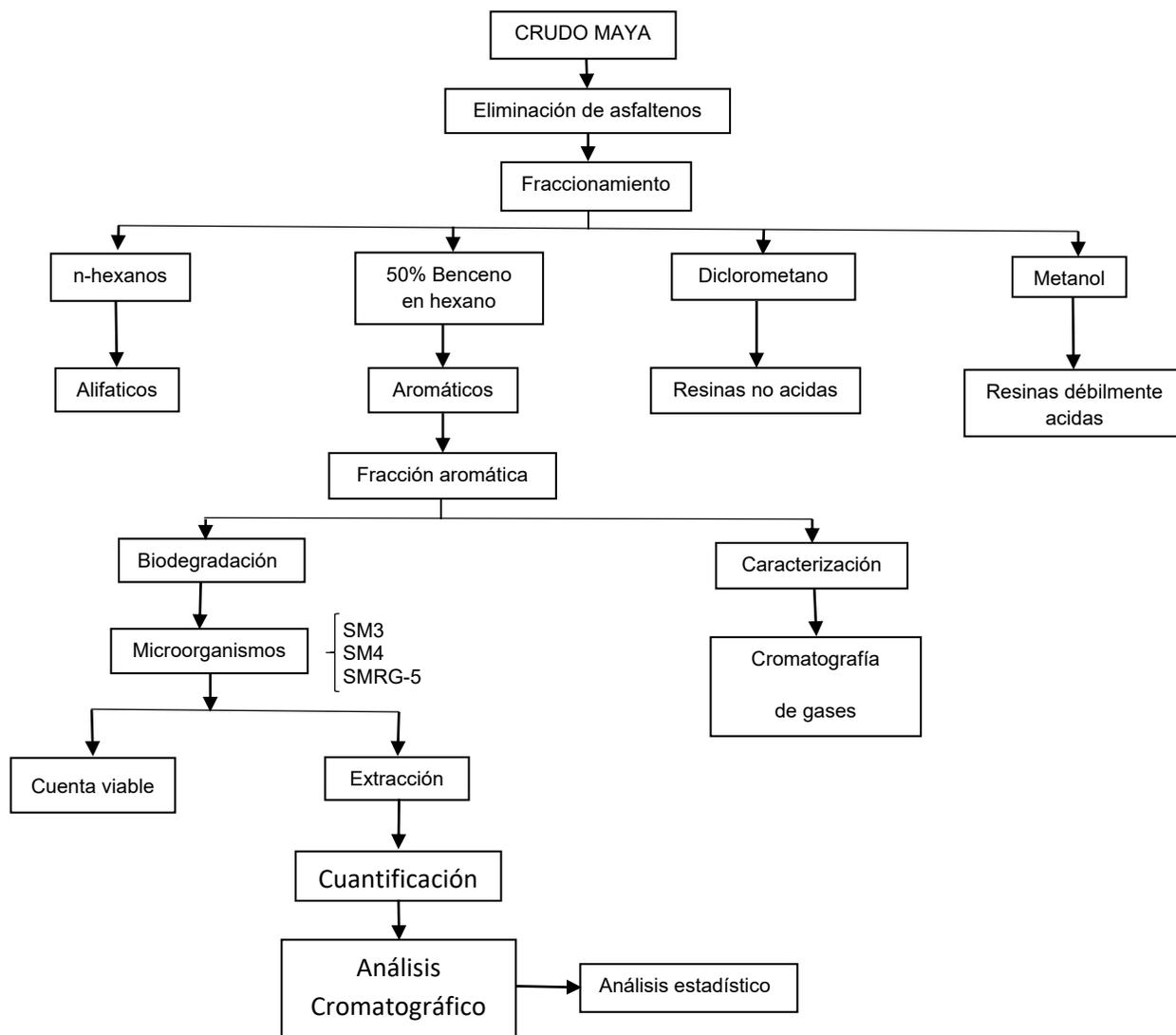
- Degradar la fracción aromática del petróleo crudo Maya utilizando cepas de *Serratia marcescens*

### 6.2 Objetivos Particulares

- Establecer las condiciones de fraccionamiento del crudo Maya utilizando diferentes métodos para la obtención de la fracción aromática.
- Cuantificación y caracterización de la fracción aromática.
- Evaluar la biodegradabilidad de la fracción aromática en diferentes condiciones ambientales y nutricionales utilizando cepas silvestres de *Serratia marcescens* SM3 y SM4 y la mutante química SMRG-5.

## 7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En el presente proyecto de investigación se dividió en tres etapas: la primera fue el fraccionamiento del petróleo crudo Maya, que permitirá obtener la fracción aromática, la segunda fue la aclimatación de los microorganismos de estudio a diferentes concentraciones de la fracción aromática y por último se realizó la biodegradación de la fracción aromática.



**Figura 5.** Esquema de la estrategia experimental.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Microorganismos

El laboratorio de Biotecnología Ambiental del CEIB cuenta con cepas de *Serratia marcescens*, que fueron aislados de suelos contaminados con hidrocarburos provenientes de Veracruz, así como la mutante blanca de *Serratia marcescens* obtenida previamente por mutación química (Rosas-Galván, 2011) estas cepas son capaces de producir biosurfactante.

**Tabla 2.** Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo.

| Cepas                      | Descripción   | Fuente    |
|----------------------------|---|-----------|
| <i>Serratia marcescens</i> |   |           |
| SM3                        | Cepa silvestre (Roja) pigmentada aislada de suelos contaminados con hidrocarburos.      | CEIB, LBA |
| SM4                        | Cepa silvestre (Blanca) no pigmentada aislada de suelos contaminados con hidrocarburos. | CEIB, LBA |
| SMRG-5                     | Mutación química al azar (EMS) no pigmentada blanca.                                    | CEIB, LBA |

### 8.2 Medios de conservación

Las bacterias fueron crecidas en placas con medio solido LB a 37 °C y posteriormente fueron conservadas en refrigeración 4 °C.

### 8.3 Medios de cultivo

El precultivo de las cepas de estudio se utilizó medio LB y se incubaron de 18-24 horas. Para ello se utilizó 10 % del precultivo como inóculo para los estudios de biodegradación. Para estos experimentos se empleó un medio mineral que está constituido (g/L): por 2.13 de fosfato disódico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 1.3 de fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0.5 cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) y 0.2 de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ), y como fuente de carbono la fracción aromática del petróleo crudo Maya a diferentes concentraciones (50 y 100ppm).

#### **8.4 Petróleo crudo Maya**

Se empleó petróleo crudo Maya que presenta un color negro, apariencia viscosa, densidad de  $0.87\text{g/cm}^3$ , gravedad API 22.0, Viscosidad (cp) a  $20\text{ }^\circ\text{C}$  5300ppm de nitrógeno total.

Se estableció el protocolo de fraccionamiento para aislar la fracción aromática del petróleo crudo. Posteriormente se caracterizó la fracción aromática del crudo por cromatografía de gases (perfil cromatográfico inicial). Una vez caracterizado por cromatografía cada fracción aromática se procedió a establecer las condiciones de degradación de la fracción aromática. En este caso se evaluó la degradación de la fracción aromática utilizando bacterias del Cepario del Laboratorio de Biotecnología Ambiental (CEIB-UAEM) en condiciones de medio mínimo.

#### **8.5 Eliminación de la porción de asfaltenos del petróleo crudo Maya.**

Para la eliminación de la porción asfaltenica del crudo Maya por precipitación hexanica, en una relación, por cada gramo de petróleo crudo se utilizó 15mL de hexano. Adicionando 15 mL a la muestra que es agitada vigorosamente y posteriormente centrifugada en una centrifuga durante 25 minutos a 3500 rpm a temperatura ambiente. La mezcla de HC's del crudo Maya es transferida a un matraz para la eliminación del solvente por extracción.

#### **8.6 Fraccionamiento de Hidrocarburos**

El crudo que se utilizó en el presente proyecto corresponde a un tipo de petróleo mexicano (Maya). La caracterización de la composición del crudo se realizó por el procedimiento SARA (Saturados, Aromáticos, resinas y Asfáltenos).

La cantidad de compuestos presentes en el petróleo crudo hace difícil la identificación individual de cada uno de ellos. Por lo que se realizó su fraccionamiento para evaluar el impacto de la biodegradación en las fracciones que lo componen. Se realizó una cromatografía en columna con sílica gel donde se separaron las fracciones utilizando solventes de diferente polaridad.

La sílica gel fue previamente tratada por 3 volúmenes de acetona, *n*-hexano y diclorometano. Después del lavado se secó en la campana de extracción de humos. Para su uso, la sílica gel seca se activó a 180°C por 20 horas.

El fraccionamiento de hidrocarburos se realizó en una columna de vidrio (30cm de largo por 1cm de diámetro interno). Al soporte se le colocó fibra de vidrio, se adicionaron 3 g de sílica gel y 1.5 g de sulfato de sodio anhidro. Se acondicionó la columna con 20 ml de *n*-hexano y justo antes de la exposición del Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al aire, se agregaron 300 µl de la fracción de maltenos (100 mg/ml en *n*-hexano).

Las eluciones empezaron a partir de este punto, con 3 volúmenes de 21 ml de cada solvente en el siguiente orden: *n*-hexano (cadenas de alifáticos y aquilaromáticos), 50% de benceno en *n*-hexano para los aromáticos. Con diclorometano se obtuvieron resinas no ácidas, mientras que con metanol resinas débilmente ácidas, y por último con cloroformo se obtuvieron los materiales remanentes en la columna. Las fracciones eluidas se secaron y pasaron a viales ambar de 2 ml. Se determinaron pesos de secos de las fracciones y se realizó la cuantificación por cromatografía de gases.

Una vez caracterizada cada fracción del petróleo crudo Maya en el cromatógrafo de gases y obtenido un lote suficiente de la fracción aromática, se procedió a llevar a cabo el ensayo de biodegradación.

## **8.7 Técnicas analíticas**

### **8.7.1 Análisis cromatográfico de hidrocarburos poliaromáticos**

Para la cuantificación de HAP's se realizó una extracción de HC's, y su caracterización por cromatografía de gases. Se inyectó una alícuota de 1 µL del extracto de HC's en un Cromatógrafo de Gases Hewlett Packard, modelo HP5890 Series II equipado con detector de ionización de flama (FID), con una columna ultra 1 crosslinked/metilsilicone (25.5m largo x 0.32mm de diámetro interior; proporción de fase 150 y un espesor de 0.52µm) marca Hewlett Packard. La velocidad del flujo del gas acarreador Helio 0.55mL/min, con un tiempo de corrida de 31.5 minutos a una velocidad de entre 10 y 20 °C/min a 150 y 300°C.

### 8.7.2 Ensayos de aclimatación de las cepas bacterianas a la fracción aromática.

La adaptación de las cepas a la fuente de carbono fracción aromática obtenida por cromatografía en columna. Para el cultivo se empleó MM y las cepas fueron aclimatadas mediante la incorporación sucesiva de diferentes concentraciones de fuente de carbono, donde cada 8 días se les incrementaba la concentración de fracción aromática alifática y la adición de fuente de nitrógeno, el crecimiento de la biomasa se determinó por UF-C/mL.

### 8.7.3 Ensayos de biodegradación de la fracción aromática

El efecto de la concentración de la fracción aromática y del glicerol que se evaluaron utilizando un diseño factorial  $2^2$  para cada cepa de estudio. Los niveles evaluados fueron (50 y 100) ppm para la fracción aromática y (8 y 12) g/L para el glicerol.

**Tabla 3.** Matriz experimental factorial  $2^2$ .

| Matriz experimental factorial $2^2$ |          |                       |                       |            |
|-------------------------------------|----------|-----------------------|-----------------------|------------|
| Factor A                            | Factor B | Factor Fracción (ppm) | Factor Glicerol (g/L) | Respuesta  |
| -1                                  | -1       | 50                    | 8                     | % Remoción |
| 0                                   | 0        | 75                    | 10                    |            |
| +1                                  | +1       | 100                   | 12                    |            |

Los experimentos de biodegradación se llevaron a cabo en medio líquido en matraces de 250 ml con 50 ml de medio mineral (Bifosfato de sodio 2.13g/L, fosfato de potasio monobásico 1.3g/L, Cloruro de amonio 0.5g/L, sulfato de magnesio 0.02g/L). Se inocularon  $10^4$  UFC/mL de las cepas bacterianas, los cultivos y controles experimentales se llevaron a cabo por triplicado a 30 °C y 175 rpm durante 10 días de incubación. Los

experimentos se realizaron por triplicado y debido a la complejidad de las fracciones se sacrificaron matraces para cada tiempo de muestreo.

#### **8.7.4 Degradación del Benzo(a)Pireno y la fracción aromática del petróleo crudo Maya por la cepa SMRG-5.**

Para evaluar la biodegradación del Benzo(a)Pireno y la a la fracción aromática del petróleo crudo maya, por la cepa mutante SMRG-5 se utilizaron 25 ppm de BaP y 100ppm de la fracción aromática. Los experimentos fueron realizados en matraces de 250 mL, con 50 mL de medio mineral los cuales se dejaron en agitación durante 9 días. Una vez transcurridos los días de degradación se extrajo el BaP más la fracción aromática con diclorometano una vez secado se analizó por cromatografía de gases.

#### **8.7.5 Biodegradación del Benzo(a)Pireno por la cepa SMRG-5.**

Para el ensayo de la biodegradación del BaP se realizó en medio líquido en matraces de 250 ml con 50 ml de medio mineral (Bifosfato de sodio 2.13g/L, fosfato de potasio monobásico 1.3g/L, Cloruro de amonio 0.5g/L, sulfato de magnesio 0.02g/L) con 25 ppm de BaP como fuente de carbono. A los matraces se le inocularon  $10^4$  UFC/mL de la cepa mutante SMRG-5, los cultivos y controles experimentales se llevaron a cabo por triplicado a 30 °C y 175 rpm durante 9 días de incubación, se sacrificaron matraces para cada tiempo de muestreo. El BaP fue extraído con diclorometano y cuantificado por cromatografía de gases.

### **8.8 Técnicas analíticas**

#### **8.8.1 Cuantificación del crecimiento microbiano**

El crecimiento microbiano fue determinado utilizando el procedimiento de Cuenta Viable (Unidades formadoras de colonias) en diluciones seriadas. Posteriormente se agregaron de 15 a 20 mL de agar nutritivo en cajas Petri, se mezcló, hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el agar y se dejó solidificar.

Se incluyó una caja sin inóculo por cada evaluación como testigo de esterilidad. El tiempo que transcurrió desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder más de 20 minutos.

Se incubaron las cajas en posición invertida por  $24 \pm 2$  horas a temperatura de  $37 \pm 2$  °C. Después de la incubación, se contaron las placas en un intervalo de 30 a 300 colonias.

### 8.8.2 Extracción orgánica y cuantificación de HAP's

Una vez concluidos los tiempos de biodegradación de los experimentos se realizó una extracción orgánica con diclorometano (DCM). Para ello se utilizaron 3 volúmenes del disolvente, el primer volumen fue de 10mL, mientras que los 2 restantes fueron de 5 mL cada uno.

La emulsión formada entre cada adición del disolvente se separó por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos. Las fases orgánicas fueron reunidas y secadas por filtración con sulfato de sodio anhidro. El filtrado se recuperó en un matraz, para que se eliminara el disolvente con ayuda de un evaporador rotatorio. El extracto orgánico residual se transfirió a un vial previamente etiquetado y tarado. El extracto de hidrocarburos obtenido se mantuvo en un desecador hasta la obtención del peso constante del vial.

La cuantificación del porcentaje de biodegradación por gravimetría se realizó utilizando la fórmula:

$$\% \text{ degradación} = \frac{[(\text{HC's I (ps)}) - (\text{HC's F (ps)})]}{[\text{HC's I (ps)}]}$$

Para ello se determinó el peso seco de los hidrocarburos previamente recuperados de los tratamientos iniciales y finales. Debido a que las cantidades de trabajo de la fracción

aromática fueron bajas y el error fue elevado se decidió considerar también los resultados obtenidos utilizando la cuantificación por cromatografía de gases.

### **8.7.3 Análisis estadístico por cromatografía de gases**

Se realizó un análisis estadístico de comparación de medias ANOVA (análisis de varianza) utilizando el programa DesignExpert 7.0.

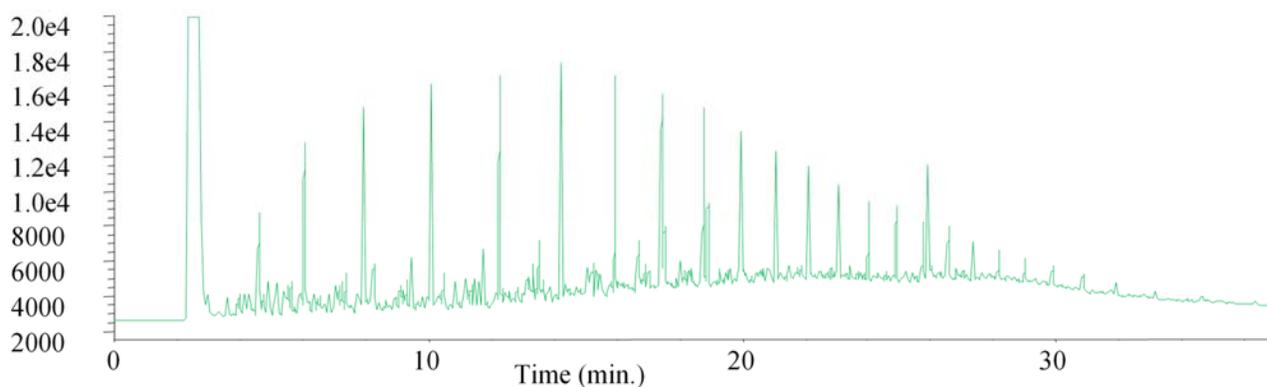
## 9. RESULTADOS

El presente trabajo de investigación fue dividido en tres etapas para evaluar la biodegradación de la fracción aromática del crudo Maya. La primera etapa consistió en el aislamiento de la fracción aromática presente en el petróleo crudo Maya, utilizando solventes orgánicos en base a su polaridad. La segunda etapa consistió en realizar la aclimatación de las cepas de *Serratia marcescens* y su mutante química a la fracción aromática, y en la tercera etapa se estudiaron las variables que afectan la biodegradación de la fracción aromática utilizando diseños experimentales con las cepas silvestres de *Serratia marcescens* SM3, SM4 y la mutante química SMRG-5 y en la cuarta etapa se evaluó la capacidad de la cepa seleccionada en la biodegradación de la fracción aromática y BaP como mezcla y BaP como única fuente de carbono.

### 9.1. Fraccionamiento del petróleo crudo Maya

El primer objetivo del presente trabajo fue el fraccionamiento del petróleo crudo Maya, siguiendo el protocolo de fraccionamiento antes propuesto por Dutta; Harayama (2001) donde se fraccionó el petróleo y se aisló la fracción aromática que representa una las fracciones más tóxicas y de baja biodegradabilidad presentes en el petróleo.

En la figura 6 se presenta el perfil cromatográfico del petróleo crudo Maya antes del fraccionamiento. Se observa la presencia de una gran diversidad de componentes que eluyen a diferentes tiempos de retención.

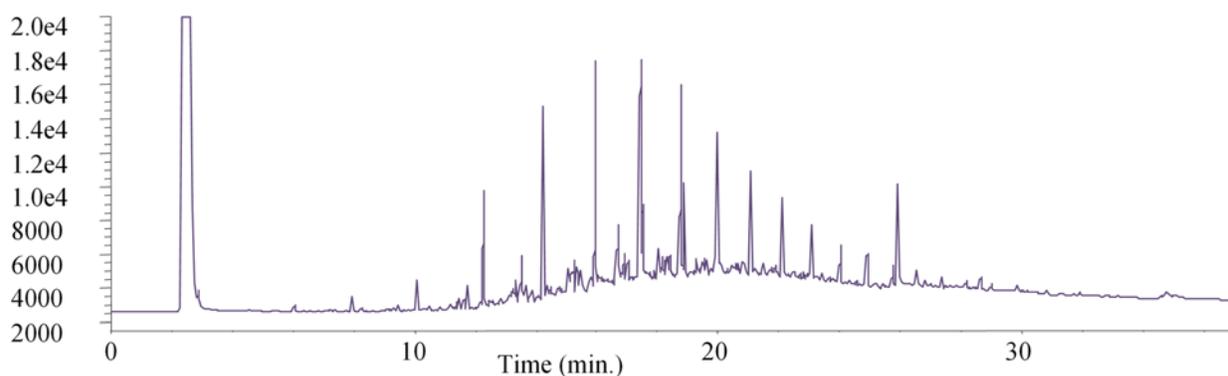


**Figura 6.** Perfil cromatográfico del Petróleo crudo Maya.

El perfil cromatográfico muestra la presencia de una mezcla compleja de compuestos de elevado peso molecular. Debido a la compleja composición del petróleo y a la presencia de diferentes fracciones se utilizaron diferentes solventes orgánicos que permitieron su separación. La primera fracción que fue separada del crudo fue la fracción de asfáltenos, la cual fue precipitada con hexano, esta fracción asfálténica corresponde al  $17 \pm 2 \%$  del crudo Maya.

## 9.2. Eliminación de asfáltenos del petróleo crudo Maya.

En la figura 7 se presenta el perfil cromatográfico obtenido de la fracción de petróleo crudo Maya libre de asfáltenos.



**Figura 7.** Perfil cromatográfico del petróleo crudo Maya libre de asfáltenos

Esta fracción concentrada de hidrocarburos solubles en n-hexano posee un perfil diferente con respecto a crudo original. Se observa disminución de compuestos volátiles que se presentan entre 5 y 10 min de tiempo de retención, así como una mayor concentración de los HC's de menor volatilidad, entre los que se encuentran los aromáticos. Esta fracción de HC's libre asfáltenos, que contiene las diferentes fracciones entre ellas (alifática, aromática y las resinas), fue sometida a un protocolo de fraccionamiento en columna con solventes de diferente polaridad, para la separación y cuantificación.

Se obtuvieron 98 fracciones que fueron reunidas, por su similitud en los perfiles obtenidos por cromatografía de gases, en cuatro fracciones que fueron clasificadas en: fracción alifática, fracción aromática y fracción de resinas débilmente ácidas y resinas ácidas. El

revelado con luz UV de la cromatografía en columna como primer paso permitió identificar las fracciones que contenían los compuestos que presentan en su estructura dobles enlaces conjugados, ya que fluorescen con luz UV. Los anillos bencénicos se caracterizan por presentar enlaces de este tipo en su estructura. En la figura 8 se muestra la comparación de los grupos alifáticos y aromáticos, donde solo los aromáticos migran con benceno y fluorescen muy bien con luz UV. La intensidad de fluorescencia de la fracción de benceno-hexano comparada con la fracción eluída con hexano fue un factor determinante en el seguimiento de los hidrocarburos aromáticos.



**Figura 8.** Hidrocarburos aromáticos revelados con luz UV

Los porcentajes obtenidos de cada fracción se muestran en la tabla 4. Se observa que las fracciones aromática y alifática son las más abundantes en el petróleo crudo Maya, con porcentajes de  $32 \pm 2\%$  para los aromáticos y  $21 \pm 1.5\%$  para la fracción de alifáticos, respectivamente.

**Tabla 4.** % de abundancia de cada fracción del petróleo crudo Maya.

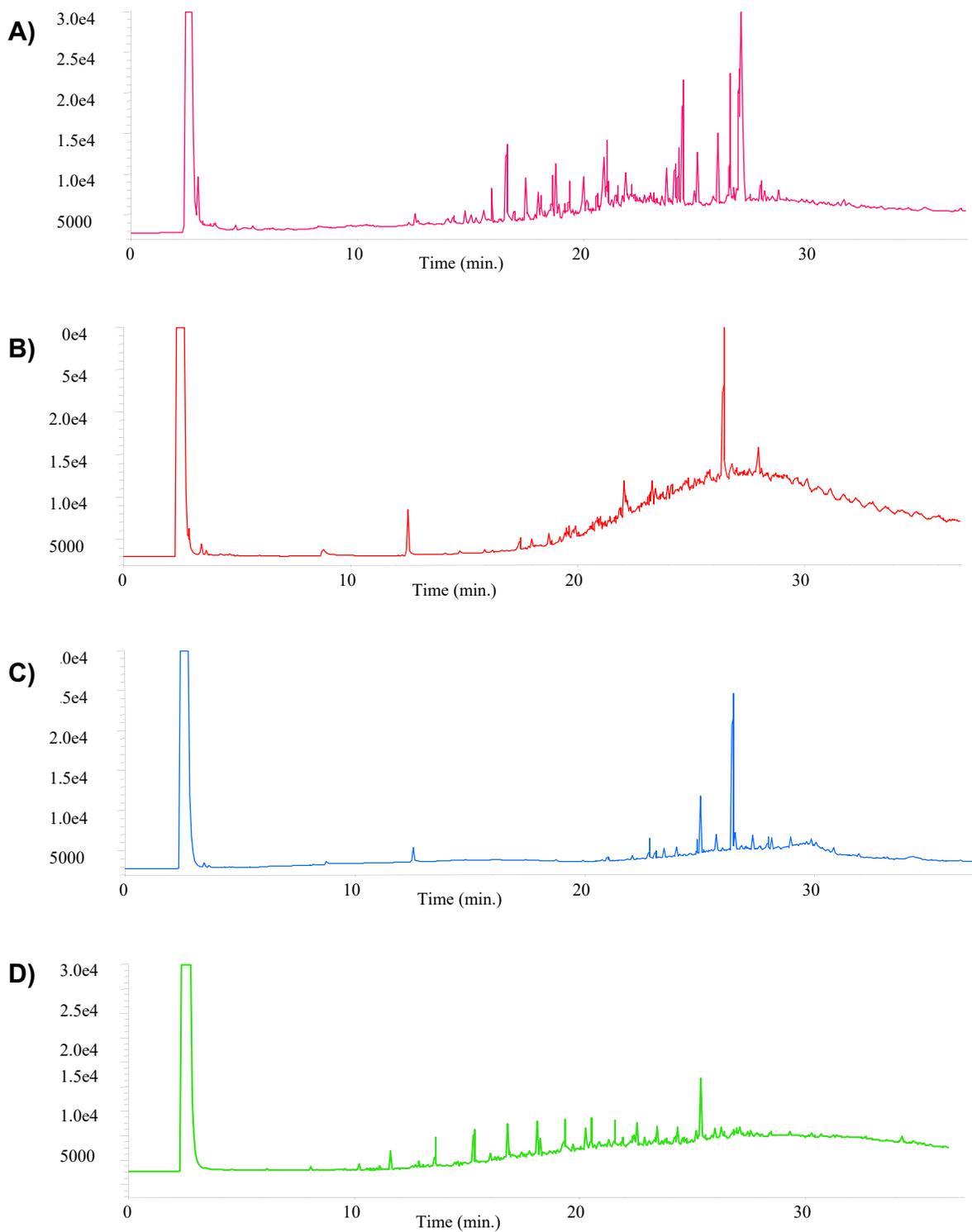
| <b>Solvente</b> | <b>Fracción</b>           | <b>% de abundancia</b> |
|-----------------|---------------------------|------------------------|
| Hexano          | Asfáltenos                | 17 ± 2 %               |
| Hexano          | Alifáticos                | 21 ± 1.5%              |
| Hexano-benceno  | Aromáticos                | 32 ± 2 %               |
| Diclorometano   | Resinas no ácidas         | 12 ± 1.8 %             |
| Metanol         | Resinas débilmente ácidas | 18 ± 1%                |

Una vez realizado el fraccionamiento del petróleo crudo Maya, de acuerdo al protocolo propuesto por Dutta; Harayama (2001), se obtuvieron tres fracciones diferentes alifáticas, aromáticas y resinas. Cuando se realizó la última elución con cloroformo no se recolectaron materiales remanentes en la columna.

En la figura 9 se muestran los perfiles cromatográficos de cada una de las fracciones obtenidas del fraccionamiento que se le realizó al petróleo crudo Maya libre de asfáltenos.

Las fracciones obtenidas presentan perfiles cromatográficos diferentes para cada una de las diferentes fracciones, puesto que cada uno de los compuestos presentan diferentes tiempo de retención debido a su peso y estructura química.

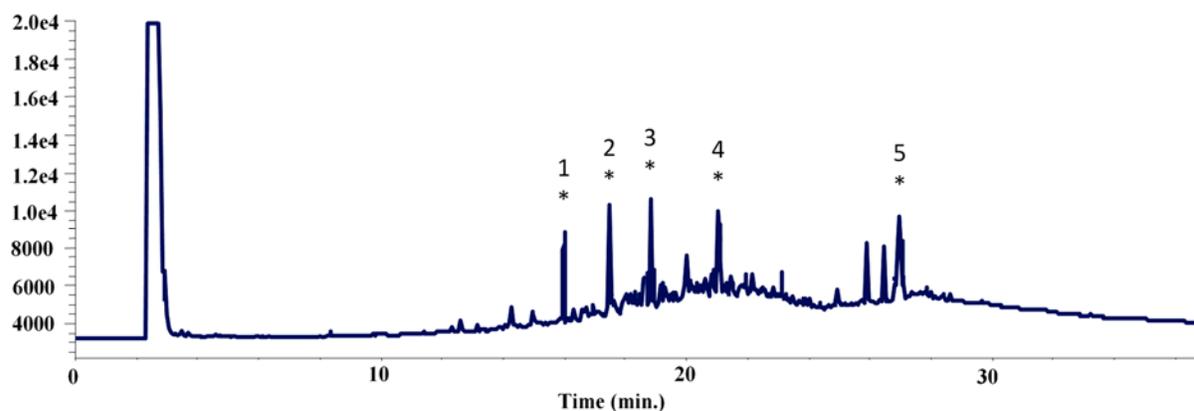
Las fracciones aromáticas recolectadas se caracterizaron para realizar los experimentos de aclimatación de las cepas de estudio y su posterior biodegradación. Debido a la complejidad de la fracción, así como la probable toxicidad de la misma, se utilizó una concentración definida de la fracción y se evaluó el crecimiento de las cepas.



**Figura 9.** Perfiles cromatográficos de las fracciones obtenidas del petróleo crudo sin asfáltenos. A) Alifáticos; B) Aromáticos; C) Resinas débilmente ácidas y D) Resinas ácidas.

A pesar de la baja concentración utilizada no se observó crecimiento indicando una alta toxicidad de la fracción aromática, por lo que se procedió a utilizar la fracción alifática como fuente de carbono adicional para favorecer el crecimiento.

Con la finalidad de identificar dentro del perfil los poliaromáticos se le realizó una co elución con los estándares de HAP's junto con la fracción aromática (figura 10).



**Figura 10.** Perfil cromatográfico de la fracción aromática con la mezcla de estándares SV Calibration Mix No. 5, (1) Fluoranteno, (2) Pireno, (3) Criceno, (4) Benzo(k) Fluoranteno y (5) Benzo(g,h,i)Peryleno.

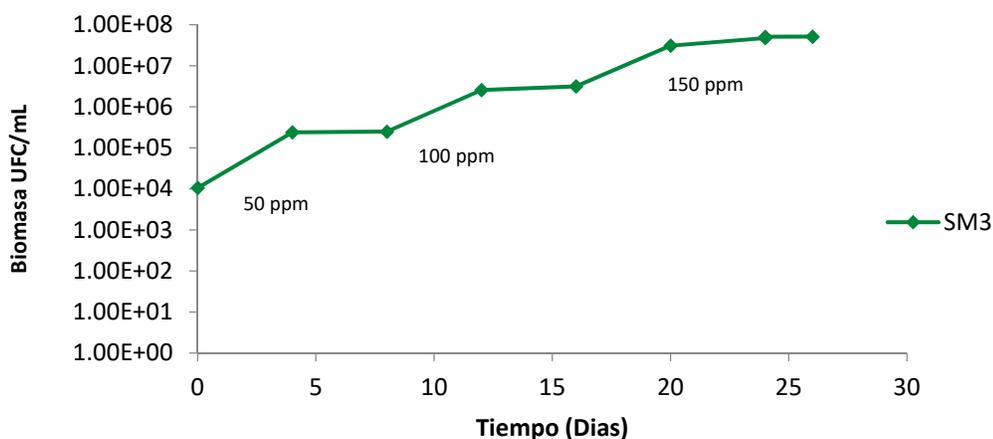
En este perfil cromatográfico podemos observar como la fracción de aromáticos se encuentra dentro de los tiempos de retención de 15 minutos y 30 minutos, donde los HAP's de bajo peso molecular eluyen a tiempos de retención a partir 16 minutos, mientras que los de peso molecular alto eluyen hasta los 28 minutos aproximadamente.

### **9.3 Aclimatación de las cepas bacterianas a diferentes concentraciones de fracción aromática y alifática.**

Una vez que se obtuvo la fracción aromática separada mediante cromatografía en columna, y se determinó su perfil por cromatografía de gases; se procedió a aclimatar las diferentes cepas bacterianas de *Serratia marcescens* roja SM3, *Serratia marcescens* blanca SM4 y la cepa mutante SMRG-5, con diferentes cantidades de la fracción aromática y alifáticos. La adición de la fracción de alifáticos nos aseguró que las cepas

podieran crecer, ya que la concentración de aromáticos en algunos casos es tan tóxica que inhibe el crecimiento bacteriano.

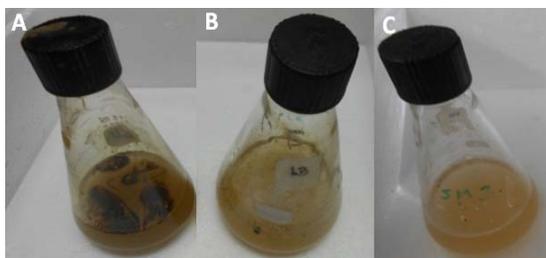
La aclimatación de las cepas bacterianas a la fracción aromática-alifática se llevó a cabo durante 26 días, en los cuales se adicionaron diferentes concentraciones de la fracción aromática-alifática (50, 100 y 150 ppm). En la figura 11, se presenta la cinética de crecimiento (cuenta viable) durante el periodo de aclimatación. Se observó un incremento de la población bacteriana al aumentar la concentración de la fracción aromática. Una disminución de la población fue observada a partir de los 20 días, indicando un efecto inhibitorio. Por lo que se detuvo el proceso de aclimatación hasta los 150 ppm.



**Figura 11.** Cinética de crecimiento durante la aclimatación de la cepa SM3.

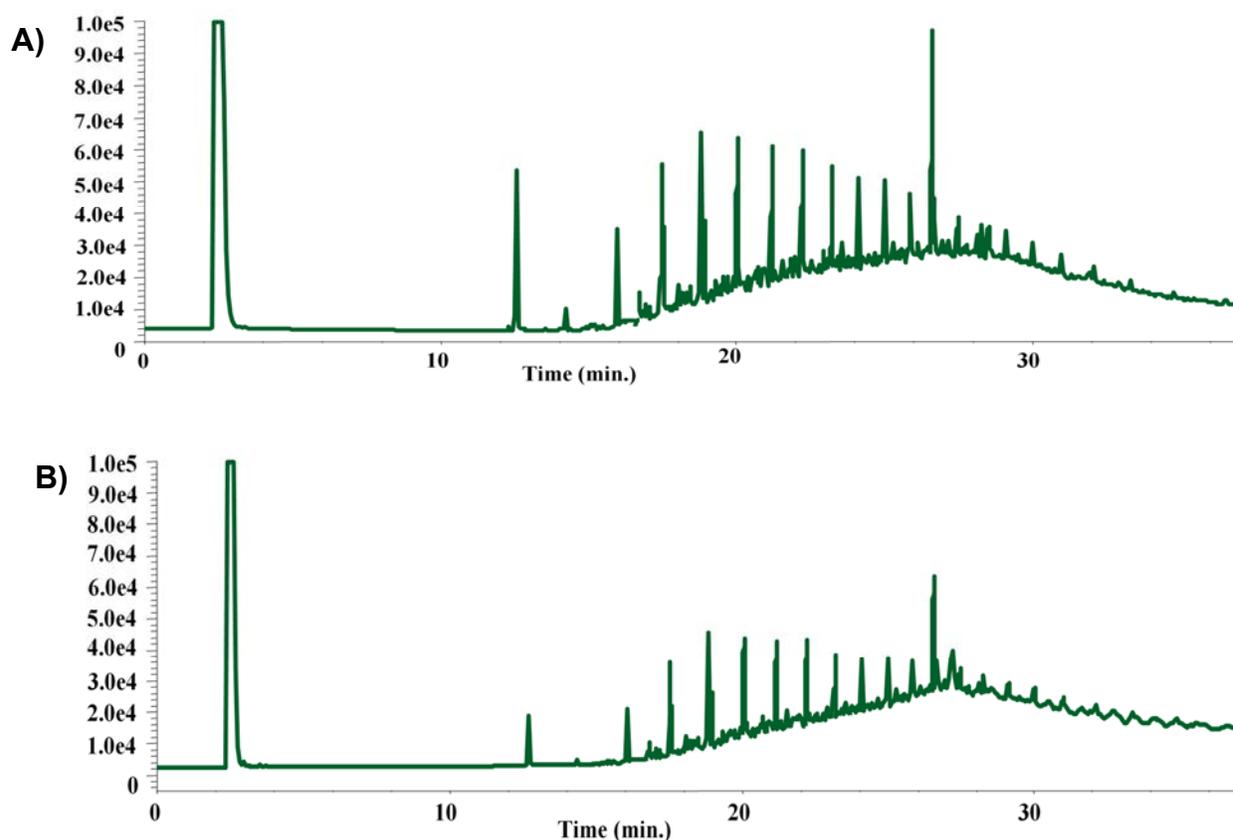
La disminución de crecimiento puede deberse en primer lugar a la toxicidad de la fracción y a la concentración de la misma, así mismo por la disminución de los nutrientes inorgánicos, disminución de la población microbiana, baja disponibilidad y condiciones fisicoquímicas desfavorables.

Una vez transcurridos los 26 días de aclimatación se sacrificaron matraces para extraer la fracción aromática remanente en el medio y llevarlo a cromatografía de gases, y así comparar los perfiles cromatográficos obtenidos con el control. En la figura 12 se presentan los cultivos durante diferentes días del proceso de aclimatación de las bacterias a la fracción aromática.



**Figura 12.** Matracas experimentales en los que se observa el crecimiento microbiano de la cepa SM3, con la fracción aromática durante la aclimatación. A) día 0, B) día 10, C) día 20 de la aclimatación.

En la figura 13 se presentan los perfiles cromatográficos de la fracción aromática después del proceso de aclimatación de las bacterias transcurridos los 26 días y el control (abiótico).

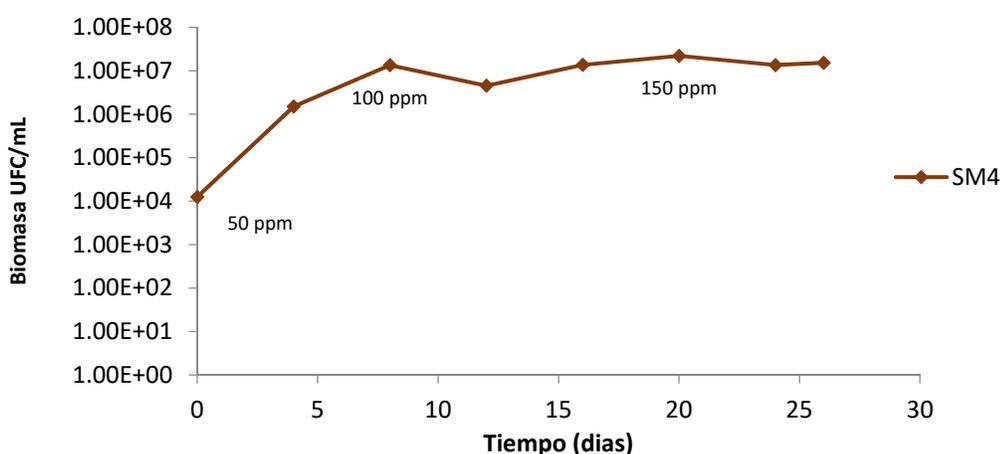


**Figura 13.** Perfil cromatográfico de la fracción aromática. A) Control abiótico y B) Fracción aromática degradada por la cepa SM3.

Transcurridos los 26 días de aclimatación de la cepa silvestre SM3 a la fracción aromática, se comparan los perfiles cromatográficos obtenidos de la fracción aromática y el control, se observan diferencias en el número de picos y el área bajo la curva entre ambas condiciones. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio realizado por Machín Ramírez (2010), donde demostró degradación del Bap con la cepa SM3. Los matraces experimentales utilizados durante la aclimatación a la fracción aromática de la cepa de *Serratia marcescens* SM3 (roja) permiten ver como la FA va incorporándose indicando su degradación. El proceso de aclimatación se llevó para las tres cepas de estudio en las mismas condiciones.

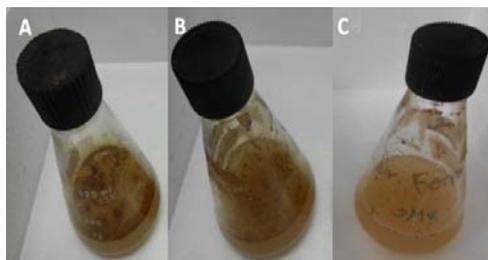
La cepa silvestre de *Serratia marcescens* SM4 (blanca) se dejó crecer en medio mínimo mineral con la fracción aromática, llegando a tolerar niveles de la fracción aromática de 150 ppm después de 26 días de aclimatación. La cepa SM4 presentó un incremento en las UFC/mL, y un crecimiento de  $10^4$  a  $10^7$  que transcurridos los 26 días, en donde los primero diez días se llevó el mayor crecimiento microbiano. Posteriormente no se observa el crecimiento permanece constante y no se observa cambio al adicionar la siguiente concentración de fracción aromática (50 ppm).

Después de diez días de incubación durante la aclimatación fue necesario adicionar fuente de carbono y nitrógeno (figura14).



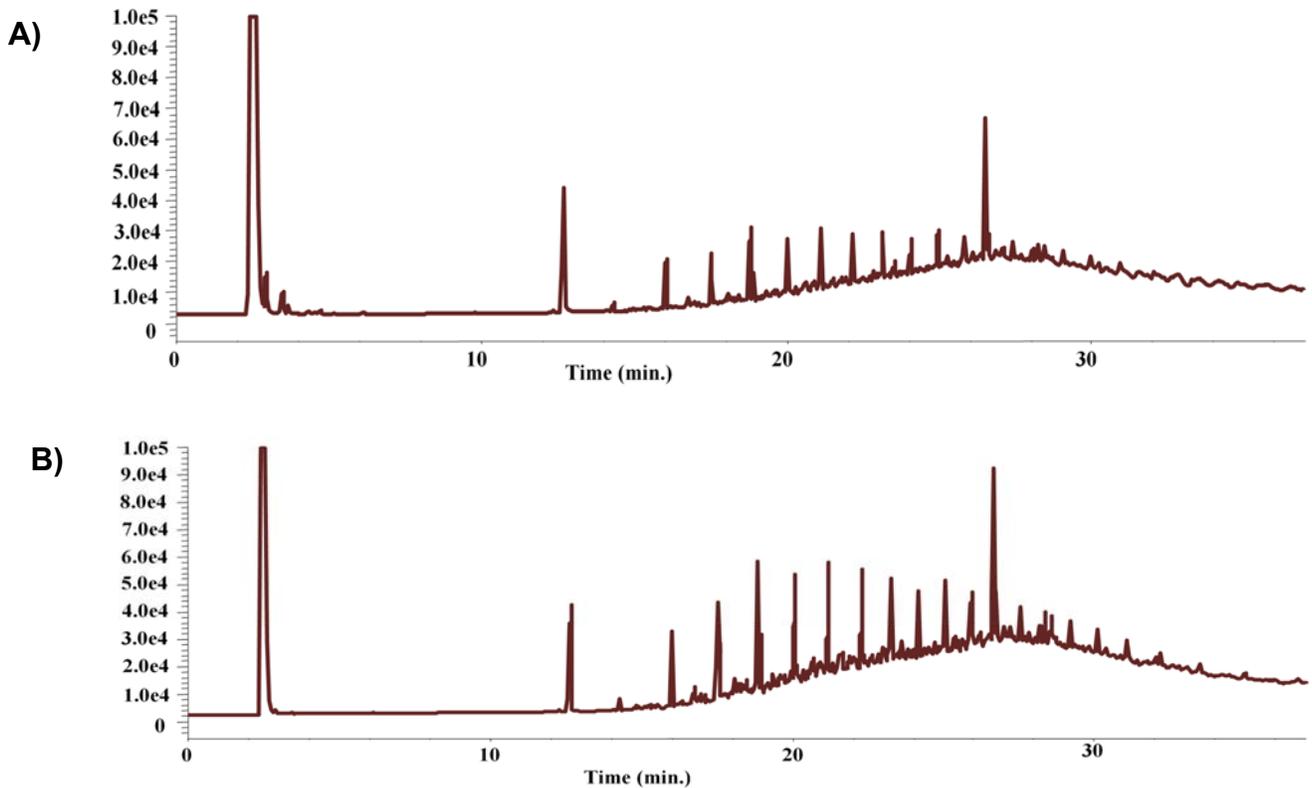
**Figura 14.** Cinética de crecimiento durante la aclimatación de la cepa SM4, a las diferentes concentraciones de la fracción aromática, a una temperatura (30 °C) y agitación de 175 rpm.

Figura 15 Se presentan los cultivos durante diferentes periodos del proceso de aclimatación de la cepa SM4 a la fracción aromática.



**Figura 15.** Matraces experimentales en los que se observa el crecimiento microbiano de la cepa SM4, con la fracción aromática durante la aclimatación A) día 0, B) día 10, y C) día 20 de la aclimatación.

En la figura 16 se presentan los perfiles cromatográficos de la fracción aromática después del proceso de aclimatación de la cepa SM4, transcurridos los 26 días y el control (abiótico).



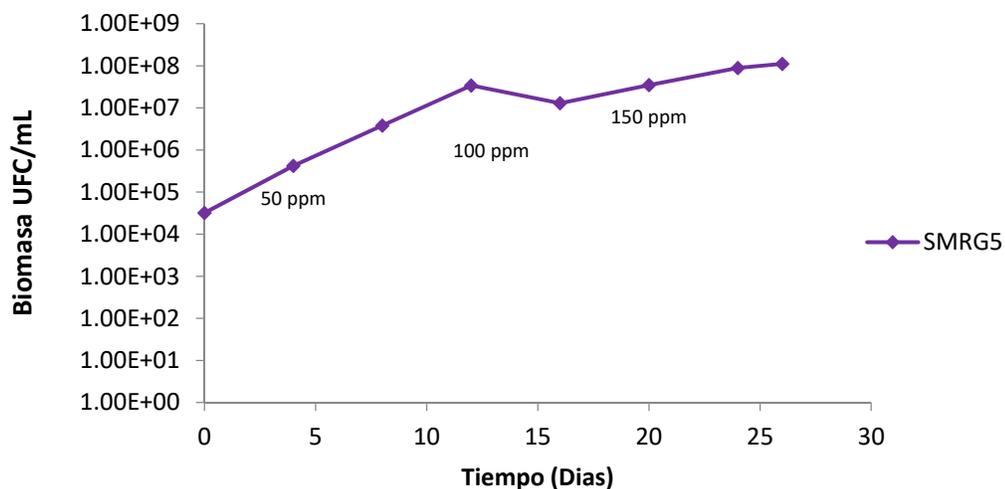
**Figura 16.** Perfil cromatográfico de la fracción aromática. A) Control abiótico y B) Perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por la cepa SM4.

Se observa una reducción significativa del tamaño de los picos comparando ambos perfiles cromatográficos. La cepa SM4 fue capaz de remover la fracción aromática durante los 26 días de la aclimatación.

Paniagua Meza (2008) obtuvo una degradación del 30% para la fracción aromática por bacterias halófilas, demostrando que la fracción aromática es la más difícil de degradar.

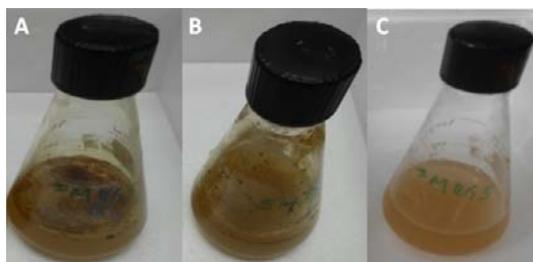
La aclimatación de la cepa mutante blanca SMRG-5 se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que las otras dos cepas silvestres estudiadas SM3 y SM4.

A continuación se muestra la cinética de crecimiento durante los 26 días de aclimatación (figura17).



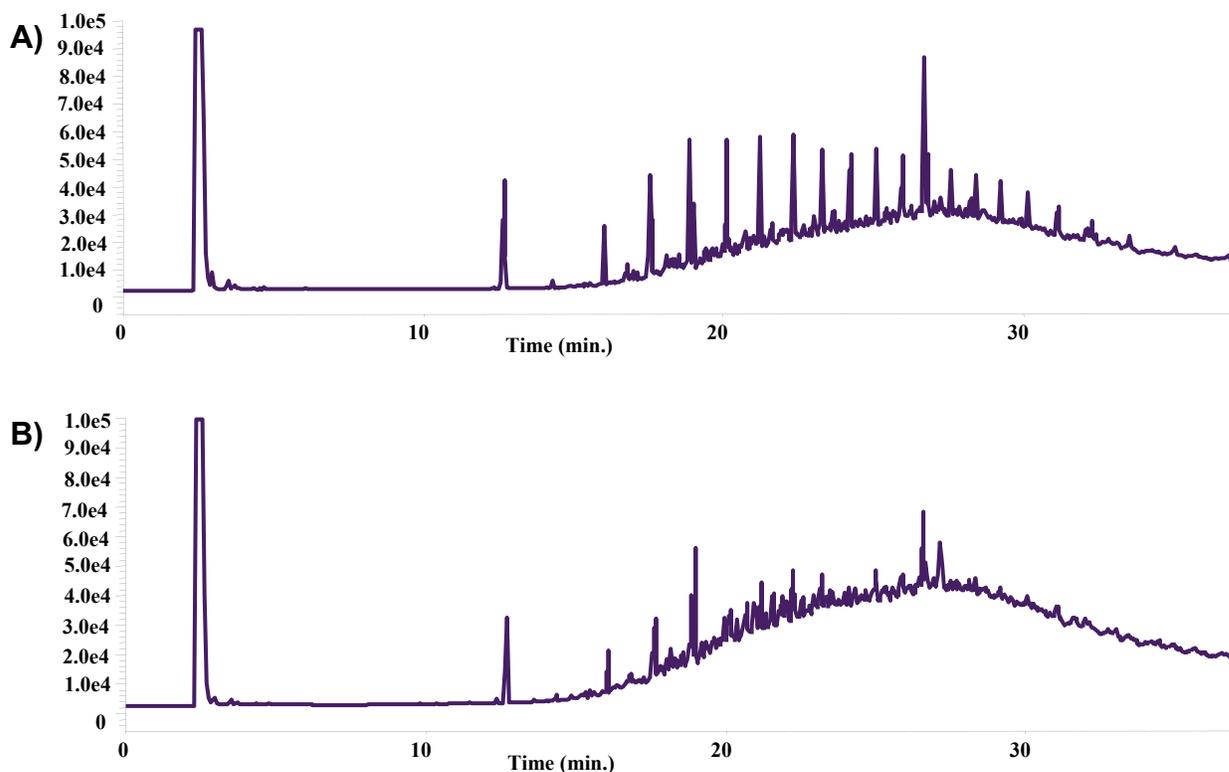
**Figura 17.** Cinética de crecimiento durante la aclimatación de la cepa SMRG-5.

Se observa que la cepa SMRG-5 presentó mejor crecimiento ( $10^8$  UFC) con la fracción aromática en concentraciones más altas, en comparación con las otras dos cepas silvestres estudiadas. Figura 18 se presentan los cultivos durante diferentes periodos del proceso de aclimatación de la cepa SMRG-5 a la fracción aromática.



**Figura 18.** Matracas experimentales en los que se observa el crecimiento microbiano de la cepa mutante SMRG-5, con la fracción aromática durante la aclimatación A) día 0, B) día 10, y C) día 20 de la aclimatación.

En la figura 19 se presenta el perfil cromatográfico obtenido de la fracción aromática de la cepa SMRG-5 y el control, una vez transcurridos los 26 días de la aclimatación.



**Figura 19.** Perfil cromatográfico de la fracción aromática. A) Control abiótico y B) Perfil cromatográfico de la remoción de la fracción aromática por la cepa SMRG-5.

Todas cepas estudiadas fueron capaces de degradar la fracción aromática y resistir concentraciones de hasta 150 ppm durante los 26 días de aclimatación, siendo la más eficiente la cepa mutante química SMRG-5.

#### 9.4 Estudio del efecto de la concentración de la fracción aromática y glicerol.

Una vez aclimatadas las cepas de *Serratia marcescens*: SM3, cepa blanca SM4 y la cepa mutante blanca SMRG-5, se prosiguió a efectuar un diseño experimental  $2^2$  para las tres cepas en forma independiente: Se utilizó el programa Design- Expert 7.0 para estudiar el efecto de la concentración de la FA y de una fuente de carbono adicional como co-sustrato, (glicerol) sobre la biodegradabilidad de la fracción aromática.

Para el diseño se utilizaron dos variables numéricas para la fracción aromática un valor mínimo de 50 ppm (-1) y un valor máximo de 100 ppm (+1), y tres puntos al centro con 75 ppm (0), se consideraron estos valores. La otra variable utilizada fue la concentración de glicerol con dos valores un mínimo de 8g/L (-1) y un valor máximo de 12 g/L (+1), con tres puntos al centro de 10g/L, el glicerol. En estudios previos, la adición del glicerol como fuente de carbono permite a las cepas producir biosurfactante, el cual incrementaría la biodisponibilidad de la fracción aromática y por ende su biodegradación. Las tres cepas bacterianas de *Serratia marcescens*: SM3, SM4 y la cepa mutante SMRG-5, se inocularon ( $10^4$  UFC) en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50mL de medio mínimo mineral, adicionado las diferentes concentraciones de glicerol y la concentración seleccionada de la FA, también se presentan los resultados obtenidos con el diseño experimental factorial  $2^2$  para cada una de las cepas estudiadas.

### **9.5 Efecto de la concentración de la fracción aromática y glicerol sobre la biodegradación de la fracción aromática por la cepa SM3.**

En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos de la degradación de la fracción aromática por la cepa SM3.

**Tabla 5.** Resultados de datos del diseño experimental factorial 2<sup>2</sup> usado para evaluar la influencia de la concentración de la fracción aromática y del glicerol sobre la remoción de la fracción aromática por la cepa SM3.

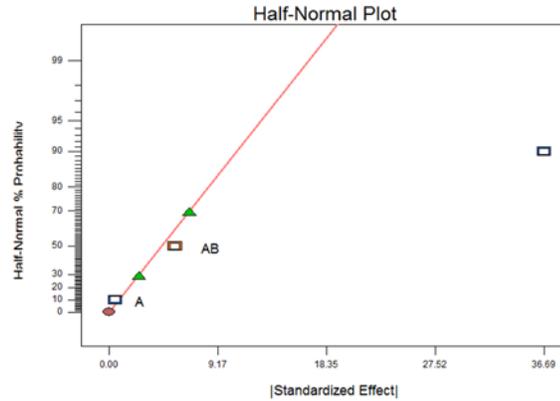
| Corrida | Datos estimados | Datos estimados | % Remoción (a) | % Remoción (b) |
|---------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| 1       | -1              | +1              | 24.95          | 27.47          |
| 2       | +1              | -1              | 61.12          | 64.17          |
| 3       | +1              | +1              | 29.99          | 27.47          |
| 4       | 0               | 0               | 40.18          | 45.82          |
| 5       | -1              | -1              | 67.21          | 64.17          |
| 6       | 0               | 0               | 27.22          | 45.82          |
| 7       | 0               | 0               | 35.18          | 45.82          |

a. Valores experimentales

b. Valores predichos

La cepa de *Serratia* silvestre SM3 presentó porcentajes de remoción que fueron desde 24.95 hasta 67.21% de remoción de la FA, siendo este el mejor obtenido con 50 ppm de aromáticos y 8g/L de glicerol. En trabajos previos, Machín-Ramírez, (2010) utilizó la cepa SM3 para degradar la fracción aromática donde obtuvo un porcentaje de remoción del 20% sin fuente de carbono adicional. Paniagua-Meza, (2008) utilizaron bacterias halófilas para degradar la fracción aromática dando como resultado un 30% de degradación sin fuente de carbono.

En la figura 20, se presenta la gráfica de las interacciones entre las variables y se observa que solamente el glicerol muestra un efecto significativo, mientras que la concentración de fracción aromática no causa efecto en el porcentaje de remoción.

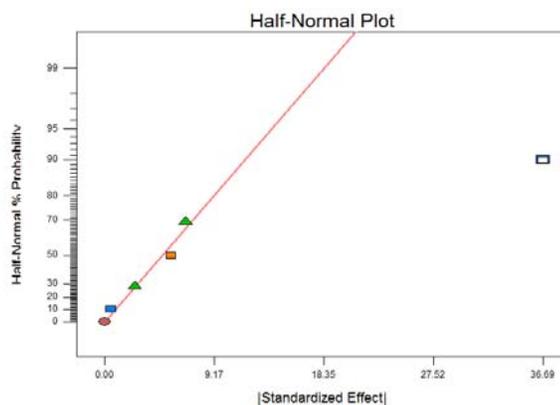


**Figura 20.** Gráfica de efectos de la interacción de las variables codificadas sobre porcentaje de remoción para la cepa SM3.

La fórmula obtenida del diseño experimental con la cepa SM3 para el porcentaje de remoción con ambos efectos tanto la fracción aromática como el glicerol fue:

$$\% \text{ Remoción} = +45.82 - 0.26 * A - 18.35 * B + 2.78 * A * B$$

La ANOVA para la cepa SM3 indica que el modelo no es significativo para el factor de la concentración de la fracción aromática, mientras que el único factor que influye en la remoción es el glicerol con un valor-p de 0.0303 para el presente estudio se procedió a eliminar los valores del factor (A) fracción aromática.



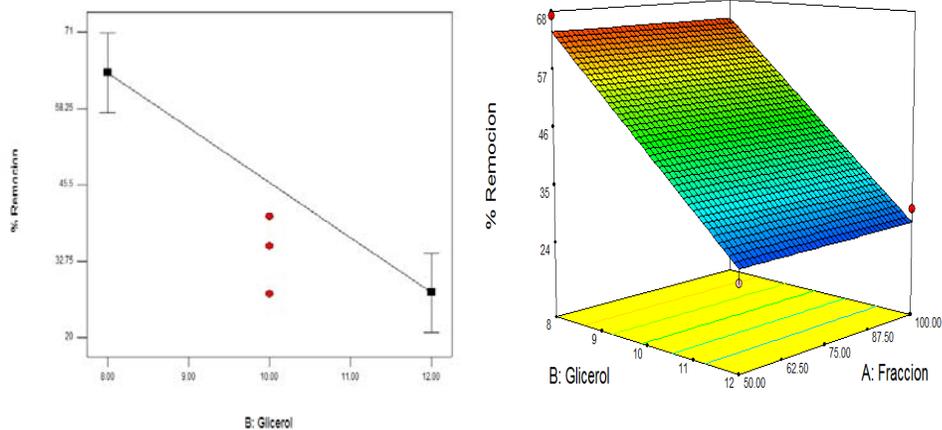
**Figura 21.** Gráfica de efectos de la interacción de las variables codificadas sobre porcentaje de remoción para la cepa SM3 solo del factor con efecto.

De la gráfica anterior se observa como solo el factor glicerol fue el único que tiene efecto en la remoción, por lo tanto se elimina el factor A fracción aromática y la interacción y se realiza de nuevo el análisis de ANOVA, la ecuación que se obtiene corresponde a :

$$\% \text{ Remoción} = +45.82 - 18.35 * B$$

De acuerdo al análisis de ANOVA el modelo se acepta ya que tiene un valor- P (0.0024), indicando un efecto estadísticamente significativo, donde el factor que afecta el porcentaje de remoción es el glicerol, con un Lack of Fit no significativo.

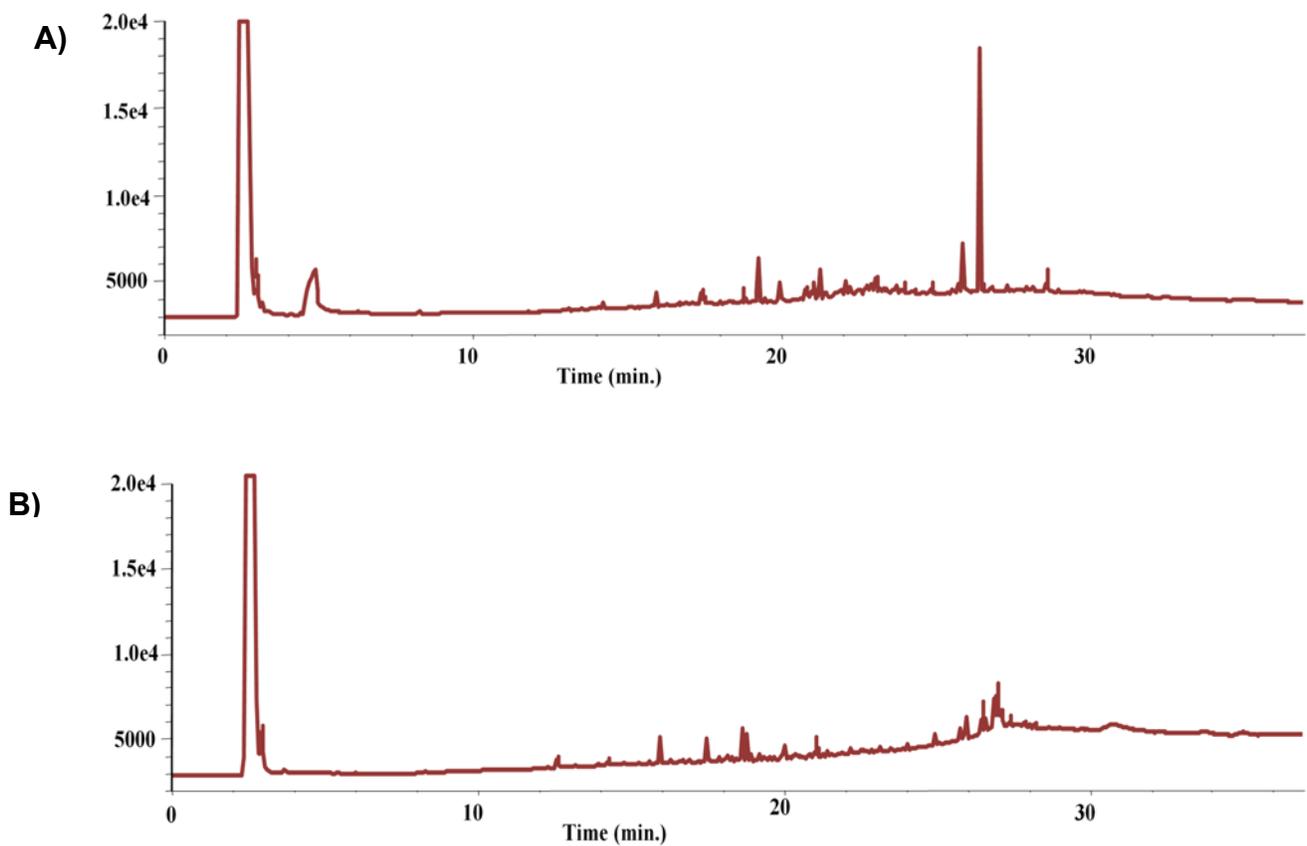
La figura 22, se observa la gráfica de superficie de respuesta tridimensional, que muestra el efecto de las dos variables sobre el porcentaje de remoción de la fracción aromática. Se observa que el glicerol afecta de forma significativa el porcentaje de remoción de la fracción aromática, a menor cantidad de glicerol mayor porcentaje de remoción. Silva (2009) reporto la disminución de HAP's diana pone de manifiesto que la no adición de nutrientes permitía el crecimiento de una población más lenta pero más especializada en la degradación de HAP's de alto peso molecular.



**Figura 22.** Superficie de respuesta tridimensional. Efecto de la concentración fracción aromática A ( $X_1$ ), y glicerol B ( $X_2$ ) sobre el porcentaje de remoción para la cepa silvestre SM3.

Por el contrario, la adición de nutrientes inicial provocaba un aumento de una flora microbiana de rápido crecimiento pero no tan especializada, dando menores porcentajes de degradación.

En la Figura 23, se presenta los resultados obtenidos de la biodegradación al tiempo final y el control de la cepa de SM3 con el mejor tratamiento. Se observan cambios importantes en el perfil cromatográfico final comparado con el control.



**Figura 23.** Perfiles cromatográficos obtenidos durante la degradación de la fracción aromática por la cepa SM3 donde A es el control y B el perfil de la degradación.

## 9.6 Efecto de la concentración de la fracción aromática y glicerol sobre la biodegradación de la fracción aromática por la cepa SM4

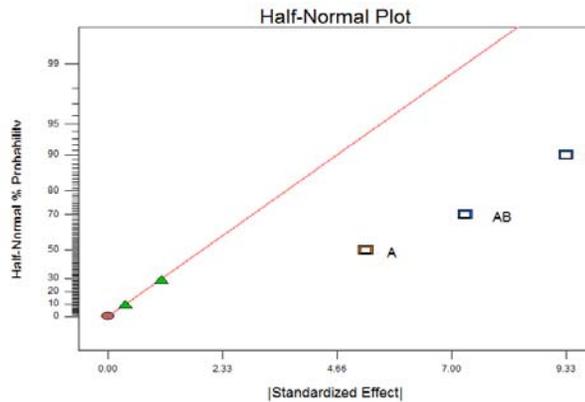
En la tabla 6 se presentan los resultados obtenidos del diseño experimental factorial  $2^2$  para cepa SM4.

**Tabla 6.** Resultados de datos del diseño experimental factorial  $2^2$  usado para evaluar la influencia de la concentración de la fracción aromática y del glicerol sobre la remoción de la fracción aromática por la cepa SM4

| Corrida | Datos estimados | Datos Estimados | % Remoción (a) | % Remoción (b) |
|---------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| 1       | 0               | 0               | 56.82          | 68.37          |
| 2       | -1              | +1              | 41.39          | 49.71          |
| 3       | +1              | +1              | <b>39.37</b>   | 49.71          |
| 4       | +1              | -1              | 55.97          | 45.05          |
| 5       | -1              | -1              | 43.45          | 45.05          |
| 6       | 0               | 0               | 60.56          | 68.37          |
| 7       | 0               | 0               | <b>62.36</b>   | 68.37          |

a. Valores experimentales  
b. Valores predichos

Se observa que el porcentaje de remoción de la cepa silvestre blanca SM4 varió entre 39.37 y 62.36% de remoción, con un promedio de remoción de 51.42%. El mejor porcentaje se obtuvo con 75 ppm de la concentración de la fracción aromática y 10 g/L de glicerol. Donde los factores estudiados no fueron significativos para un valor  $P=0.05$ .

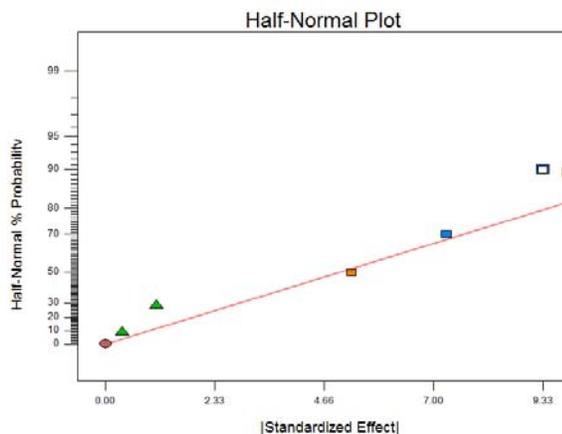


**Figura 24.** Gráfica de efectos de la interacción de las variables codificadas sobre porcentaje de remoción para la cepa SM4.

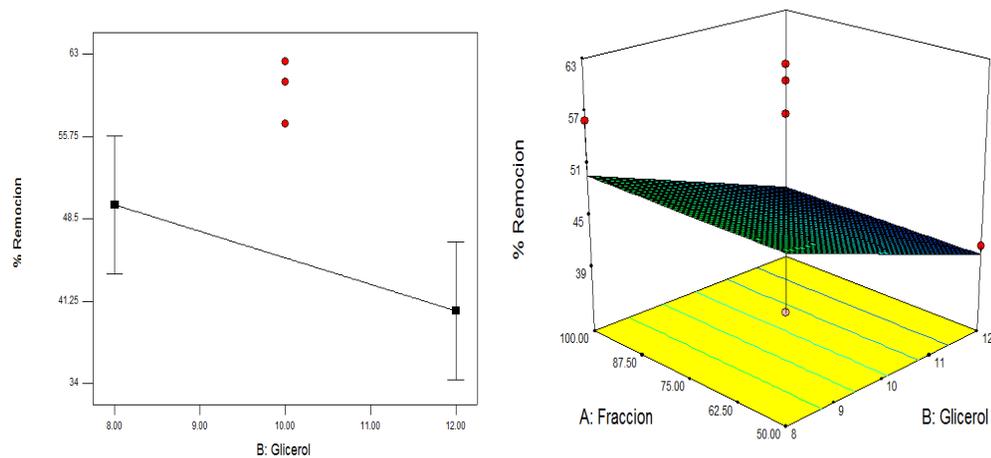
Ecuación obtenida con el ANOVA del diseño experimental de la cepa SM4 para los factores A y B es:

$$\% \text{ Remoción} = +45.82 - 0.26 * A - 18.35 * B + 2.78 * A * B$$

Para el análisis de los resultados obtenidos del diseño factorial de la cepa SM4 se decidió emplear una probabilidad de 0.1, debido a que a P=0.05 los resultados no fueron significativos. Para sistemas biológicos los rangos de probabilidad (error) aceptables pueden ser hasta de P=0.2, no obstante para este caso fue de p=0.1. Los resultados obtenidos realizando esta corrección se presentan a continuación. En la figura 25 se presentan los efectos debido a las interacciones entre la variables codificadas en la figura 26, se presenta superficie de respuesta de las variables de estudio sobre el porcentaje de remoción de la FA.



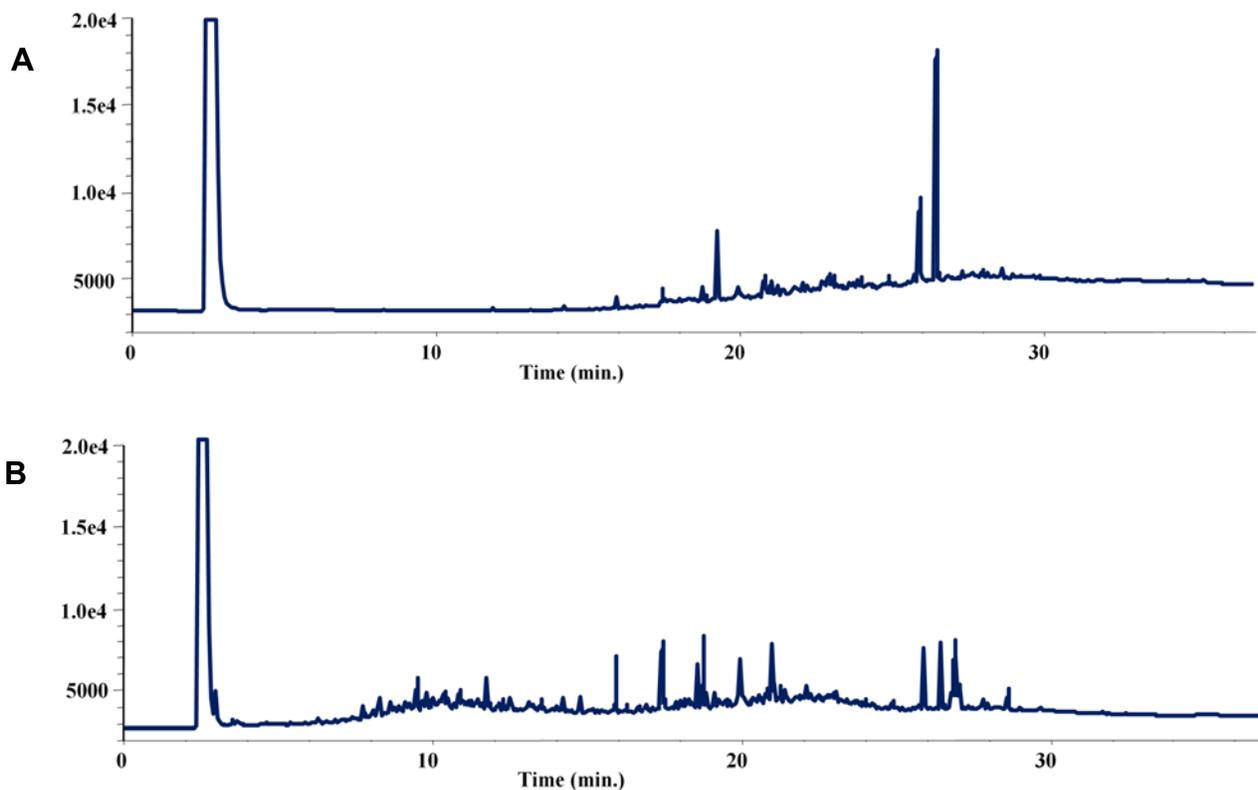
**Figura 25.** Gráfica de efectos de la interacción de las variables codificadas sobre porcentaje de remoción para la cepa SM4 solo del factor con efecto.



**Figura 26.** Superficie de respuesta tridimensional. Efecto de la concentración fracción aromática A ( $X_1$ ), y glicerol B ( $X_2$ ) sobre el porcentaje de remoción para la cepa silvestre SM4.

Se observa para la cepa de *Serratia marcescens* SM4, solamente el factor glicerol mostró un efecto significativo, a menor concentración de glicerol se presentó la mayor remoción de la fracción aromática, resultado similar al obtenido con la cepa SM3.

En la figura 27 se observa la formación de nuevos compuestos alifáticos que presentan menor peso molecular que los compuestos aromáticos, puesto que se encuentran a menor tiempo de retención. Lo anterior indica la biotransformación de los compuestos presentes en el petróleo por bacterias.



**Figura 27.** Perfiles cromatográficos durante la degradación de la fracción aromática por la cepa SM3 donde A es el control y B el perfil de la degradación de la fracción aromática por la cepa mutante SM4.

### 9.7 Efectos de la concentración de la fracción aromática y glicerol sobre la biodegradación de la fracción aromática por la cepa mutante blanca SMRG-5.

Para la cepa SMRG-5 se siguieron las mismas condiciones que en los diseños experimentales anteriores. En la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos de la matriz experimental del diseño factorial  $2^2$  para cepa SMRG-5.

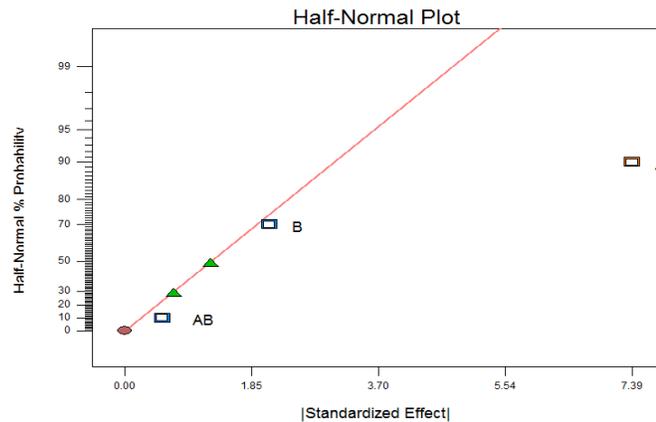
**Tabla 7.** Resultados de datos del diseño experimental factorial  $2^2$  usado para evaluar la influencia de la concentración de la fracción aromática y del glicerol sobre la remoción de la fracción aromática por la cepa mutante SMRG-5.

| Corrida | Datos estimados | Datos estimados | % Remoción (a) | % Remoción (b) |
|---------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|
| 1       | +1              | +1              | 79.75          | 81.08          |
| 2       | 0               | 0               | 79.10          | 77.38          |
| 3       | -1              | -1              | 74.46          | 73.68          |
| 4       | 0               | 0               | 75.48          | 77.38          |
| 5       | -1              | +1              | 72.90          | 73.68          |
| 6       | +1              | -1              | 82.40          | 81.08          |
| 7       | 0               | 0               | 78.00          | 77.38          |

a. Valores experimentales

b. Valores predichos

Con los resultados obtenidos de la respuesta del diseño experimental porcentaje de remoción se muestran los factores que tienen un efecto y sus interacciones. Se observa que con esta cepa los valores de remoción fueron superiores al 70 % en todos los casos. En la figura 28 se presenta la gráfica de las interacciones entre los factores estudiados.



**Figura 28.** Gráfica de efectos de la interacción de las variables codificadas sobre porcentaje de remoción para la cepa mutante SMRG-5.

La fórmula obtenida del ANOVA para los valores codificados es la siguiente.

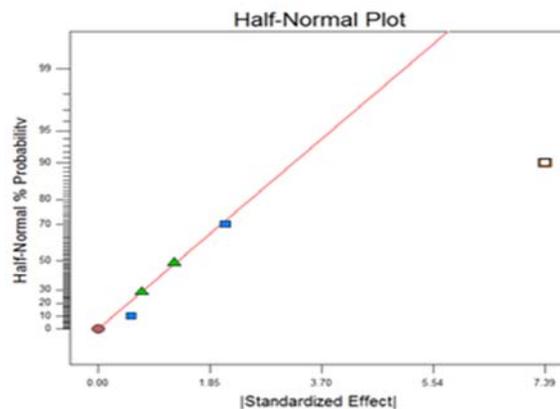
$$\% \text{ Remoción} = +77.38 + 3.70 * A - 1.05 * B - 0.27 * A * B$$

Rosas-Galván, (2011) demostró que la cepa mutante SMRG-5 fue capaz de producir un biosurfactante que llegó a reducir la tensión superficial de forma significativa, de acuerdo a los resultados obtenidos por Rosas-Galván se puede pensar que estas características de la cepa mutante sean las que ayuden a la cepa a poder tener una mejor biodegradación de la fracción aromática. Los resultados obtenidos del diseño experimental la cepa mutante SMRG-5 obtuvieron un porcentaje de remoción de 77 % siendo esta cepa la que mayor porcentaje de remoción presentó, comparado con las cepas silvestres SM3 y SM4.

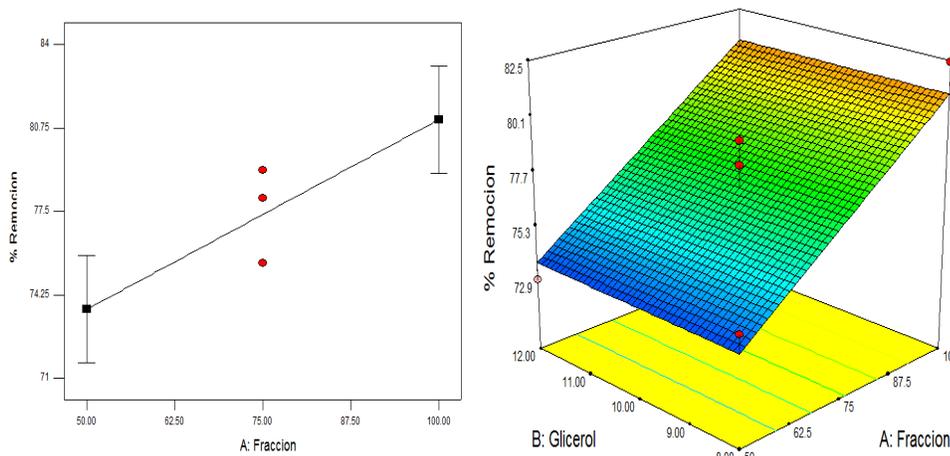
La fórmula obtenida con el ANOVA del factor que presentó un efecto es la siguiente.

$$\% \text{ Remoción} = +77.38 + 3.70 * A$$

En la figura 29 y 30 se aprecia de manera significativa como el factor A fracción aromática es el único factor significativo.



**Figura 29.** Gráfica de efectos de la interacción de las variables codificadas sobre el porcentaje de remoción para la cepa mutante SMRG-5 solo del factor con efecto.



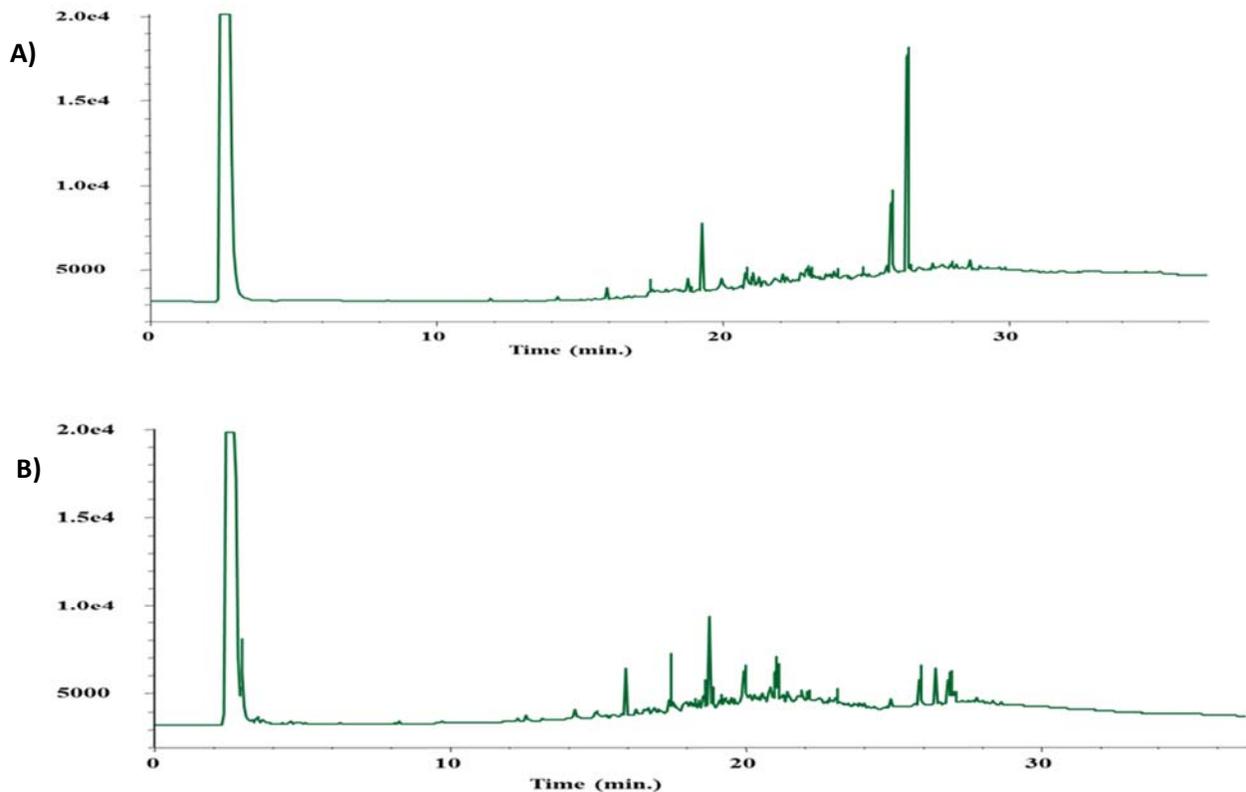
**Figura 30.** Superficie de respuesta tridimensional, efecto de la concentración de la fracción aromática A ( $X_1$ ) y glicerol B ( $X_2$ ) sobre el porcentaje de remoción para la cepa mutante SMRG-5.

El análisis del ANOVA permite destacar que el modelo es significativo, con un valor -P de 0.0123, se ajusta el modelo, solo el factor de la concentración de la fracción aromática tienen efecto sobre la respuesta, el modelo no presenta curvatura, y la falta de ajuste no es significativa.

En el diseño factorial para la cepa mutante SMRG-5 el único factor que mostro tener efecto sobre el porcentaje de remoción, fue el factor A (fracción aromática), a mayor concentración de FA mejor remoción, si comparamos con la cepa SM3 donde el factor glicerol fue el que presento un efecto positivo, mientras que para la cepa SM4 ninguno de los dos factores tuvo efecto significativo sobre la remoción a un valor de  $P=0.05$ .

Los perfiles obtenidos de la fracción aromática (control) y la fracción aromática más la cepa bacteriana, transcurrido el tiempo de degradación se muestra en la figura 29.

Se observa la aparición importante de picos con tiempos de retención menores a 20 minutos, así como la desaparición de picos presentes en el perfil del control a tiempos de retención superiores a 20 min. Lo anterior puede ser debido a la degradación de compuestos de peso molecular alto originándose compuestos de menor peso molecular



**Figura 31.** . Perfiles cromatográficos obtenidos durante la degradación de la fracción aromática por la cepa SMRG5 donde A) es el control y B) el perfil de la degradación de la fracción aromática por cada cepa.

De las tres cepas de *Serratia marcescens* estudiadas bajo las mismas condiciones, utilizando como fuente de carbono, la fracción aromática obtenida por fraccionamiento del petróleo crudo Maya, la que presento un mejor porcentaje de remoción fue la cepa mutante SMRG5 obteniendo un porcentaje de remoción de 77%.

Una vez que se realizaron los diseños experimentales para cada una de las bacterias se decidió hacer una matriz de datos para unir los datos obtenidos de cada cepa y así poder saber si se podían analizar en forma conjunta, análisis por bloques.

En la tabla 8 se muestran los resultados de todos los tratamientos con todas las cepas y los porcentajes de remoción de la fracción.

**Tabla 8.** Matriz de datos del diseño experimental-todos los tratamientos

| Matriz general para todos los tratamientos. |               |                             |                            |                         |
|---|---------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Corrida                                     | Block         | Factor A:<br>Fracción (ppm) | Facto B:<br>Glicerol (g/L) | Respuesta<br>% Remoción |
| 1   | SM3           | 100.00                      | 8.00                       | 61.12                   |
| 2   | SM3           | 50.00                       | 12.00                      | 24.95                   |
| 3   | SM3           | 75.00                       | 10.00                      | 35.18                   |
| 4   | SM3           | 100.00                      | 12.00                      | 29.99                   |
| 5   | SM3           | 75.00                       | 10.00                      | 40.18                   |
| <b>6</b>                                    | <b>SM3</b>    | <b>50.00</b>                | <b>8.00</b>                | <b>67.21</b>            |
| 7   | SM3           | 75.00                       | 10.00                      | 27.22                   |
| 8   | SMRG-5        | 75.00                       | 10.00                      | 79.10                   |
| <b>9</b>                                    | <b>SMRG-5</b> | <b>100.00</b>               | <b>8.00</b>                | <b>82.40</b>            |
| 10  | SMRG-5        | 50.00                       | 12.00                      | 72.90                   |
| 11  | SMRG-5        | 50.00                       | 8.00                       | 74.46                   |
| 12  | SMRG-5        | 100.00                      | 12.00                      | 79.75                   |
| 13  | SMRG-5        | 75.00                       | 10.00                      | 78.00                   |
| 14  | SMRG-5        | 75.00                       | 10.00                      | 75.48                   |
| <b>15</b>                                   | <b>SM4</b>    | <b>75.00</b>                | <b>10.00</b>               | <b>62.36</b>            |
| 16  | SM4           | 75.00                       | 10.00                      | 60.56                   |
| 17  | SM4           | 100.00                      | 8.00                       | 55.97                   |
| 18  | SM4           | 75.00                       | 10.00                      | 56.82                   |
| 19  | SM4           | 50.00                       | 8.00                       | 43.45                   |
| 20  | SM4           | 50.00                       | 12.00                      | 41.39                   |
| 21  | SM4           | 100.00                      | 12.00                      | 39.37                   |

En general se observa que la cepa SMRG-5 presentó los porcentajes de biodegradación más altos.

La formula obtenida del diseño experimental con el ANOVA para los factores A , B y las interacciones es la siguiente:

$$\% \text{ Remocion} = +56.09 + 2.02 * A - 8.02 * B - 0.38 * A * B$$

Con los datos anteriores se obtuvo el coeficiente estimado de cada cepa.

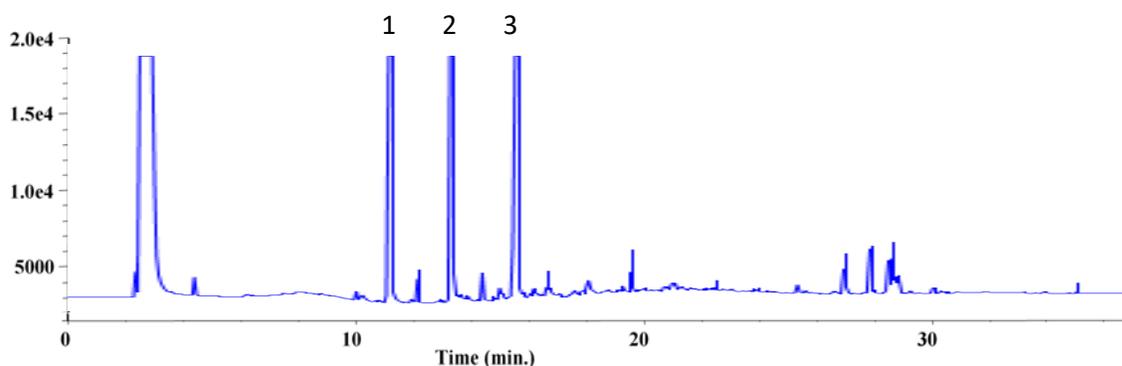
**Tabla 9.** Coeficientes estimados de los datos obtenidos del análisis de ANOVA para las cepas SM3, SM4 y SMRG-5.

| Factor           | Coeficiente estimado | df | Error estándar | 95% CI bajo | 95% CI Alto | VIF  |
|------------------|----------------------|----|----------------|-------------|-------------|------|
| Intercepto       | 56.09                | 1  | 2.88           | 49.94       | 62.23       |      |
| SM3              | -15.73               | 2  |                |             |             |      |
| SMRG-5           | 20.87                |    |                |             |             |      |
| SM4              | -5.15                |    |                |             |             |      |
| A-Fracción       | 2.02                 | 1  | 2.88           | -4.12       | 8.16        | 1.00 |
| B-Glicerol       | -8.02                | 1  | 2.88           | -14.17      | -1.88       | 1.00 |
| Puntos al centro | 1.13                 | 1  | 4.40           | -8.25       | 10.52       | 1.00 |

Los datos en la tabla señalan los coeficientes estimados para cada cepa siendo diferentes para cada una, la cepa silvestre roja SM3 con un valor de -15.73, mientras que para la cepa silvestre blanca SM4 de -5 debido a la alta diferencia significativa obtenida para la cepa mutante SMRG-5 con un coeficiente estimado de 20.87, por lo tanto esto no permite evaluarlas en conjunto.

Para demostrar que los compuestos formados durante la degradación pertenecían a compuestos de menor peso molecular es decir compuestos alifáticos se decidió adicionar

a un perfil ya conocido tres compuestos alifáticos y analizarlo nuevamente por cromatografía de gases, este perfil se muestra a continuación en la figura 32.

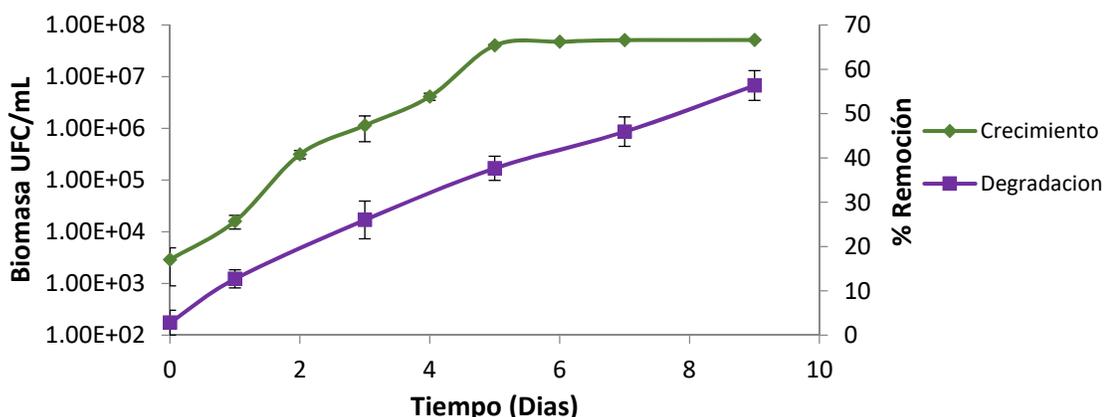


**Figura 32.** Perfil cromatográfico de la biodegradación a 9 días de incubación de la fracción aromática con la cepa SMRG-5 con la adición de tres estándares alifáticos, 1 tridecano, 2 pentadecano y 3 heptadecano.

Con el siguiente perfil podemos afirmar que efectivamente los nuevos productos que se forman de la degradación de la fracción aromática son alifáticos ya que se encuentran en tiempos de retención entre 10 y 15 minutos, comparando con los estándares mencionados como el tridecano, pentadecano y heptano, tras haber transcurrido los 9 días de degradación los nuevos productos se presentan en tiempos de retención que inducen que sean alifáticos.

Comparando los resultados con Boonchan *et al.*, 2000, se observa como también tras degradarse la fracción aromática obtienen la formación de nuevos compuestos de menor peso molecular.

Una vez realizado el diseño experimental para cada cepa y mostrando que la cepa mutante SMRG-5 fue más eficiente, se decidió hacer una cinética de crecimiento de la cepa con la fracción aromática durante 9 días a una concentración de 100 ppm sin utilizar el glicerol como co-sustrato.



**Figura 33.** Cinética de degradación de la fracción aromática con la cepa mutante SMRG-5.

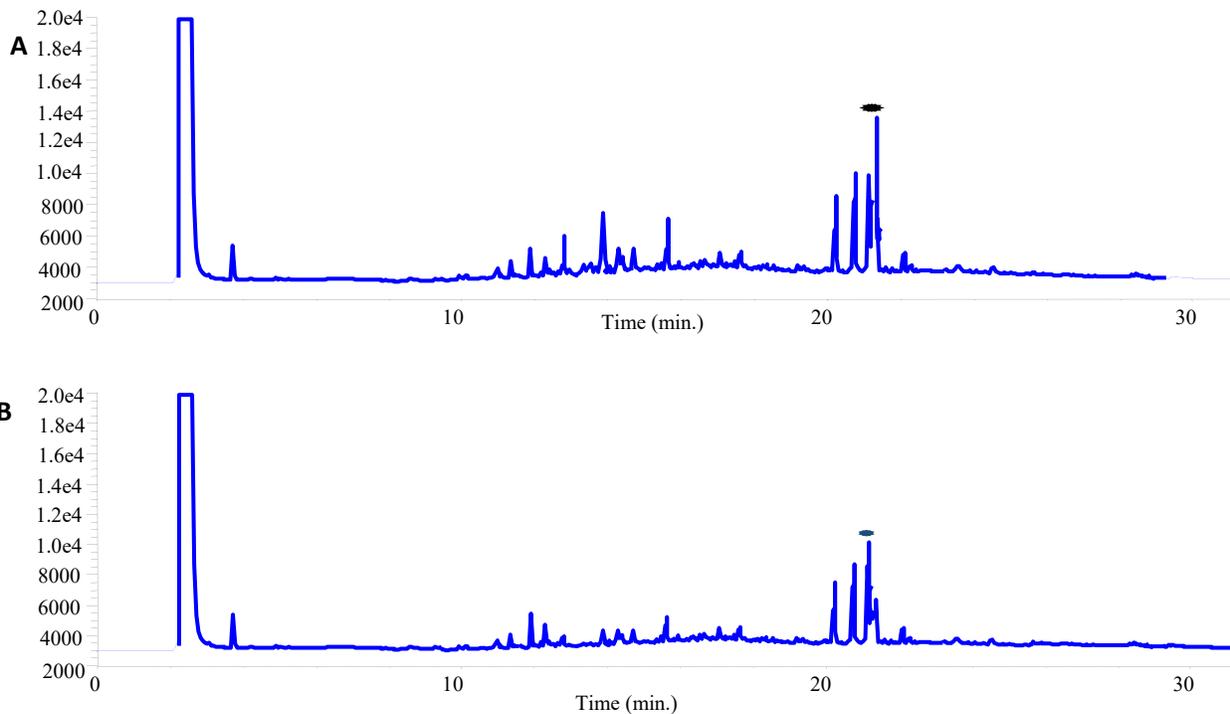
En la cinética de crecimiento de la cepa SMRG-5 no presenta una fase de latencia debido al uso de un pre-inóculo, se presenta una fase de crecimiento rápido desde el inicio hasta los 5 días (con un máximo de  $10^8$  UFC), posteriormente se observa una disminución del crecimiento alcanzándose la fase estacionaria. Con respecto a la cinética de remoción de la FA, se observa una velocidad de degradación constante con un máximo de 53 %.

Con esto se concluye que la degradación de la fracción aromática que las cepas utilizadas en este trabajo fueron capaces de degradar la fracción aromática en forma eficiente en presencia y ausencia de co-sustrato.

### 9.8 Degradación de la fracción aromática y el hidrocarburo Benzo(a)Pireno por la cepa mutante SMRG-5

Una vez realizados los ensayos de biodegradación con la fracción aromática como única fuente de carbono por la cepa SMRG-5, se decidió adicionar a la fracción aromática 25 ppm del Benzo(a)Pireno (BaP) uno de los hidrocarburos más cancerígenos y mutagénicos de la fracción aromática, y observar si es posible tener la biodegradación de este compuesto.

En la siguiente figura se muestran los perfiles obtenidos de la degradación del BaP a una concentración de 25 ppm más la fracción aromática.



**Figura 34.** Perfiles cromatográficos obtenidos de la degradación del BaP a una concentración de 25 ppm más la fracción aromática por la cepa mutante SMRG-5 donde A es el control y B el perfil de la degradación del BaP y la fracción aromática.

La cepa mutante SMRG-5 degradó un  $40 \pm 1 \%$  de la fracción aromática agregando un 25 ppm del Benzo(a)Pireno a la fracción aromática, durante los 9 días de la degradación, esto debido a que la cepa presentó un crecimiento menor comparado cuando se dejó crecer solo con la fracción aromática.

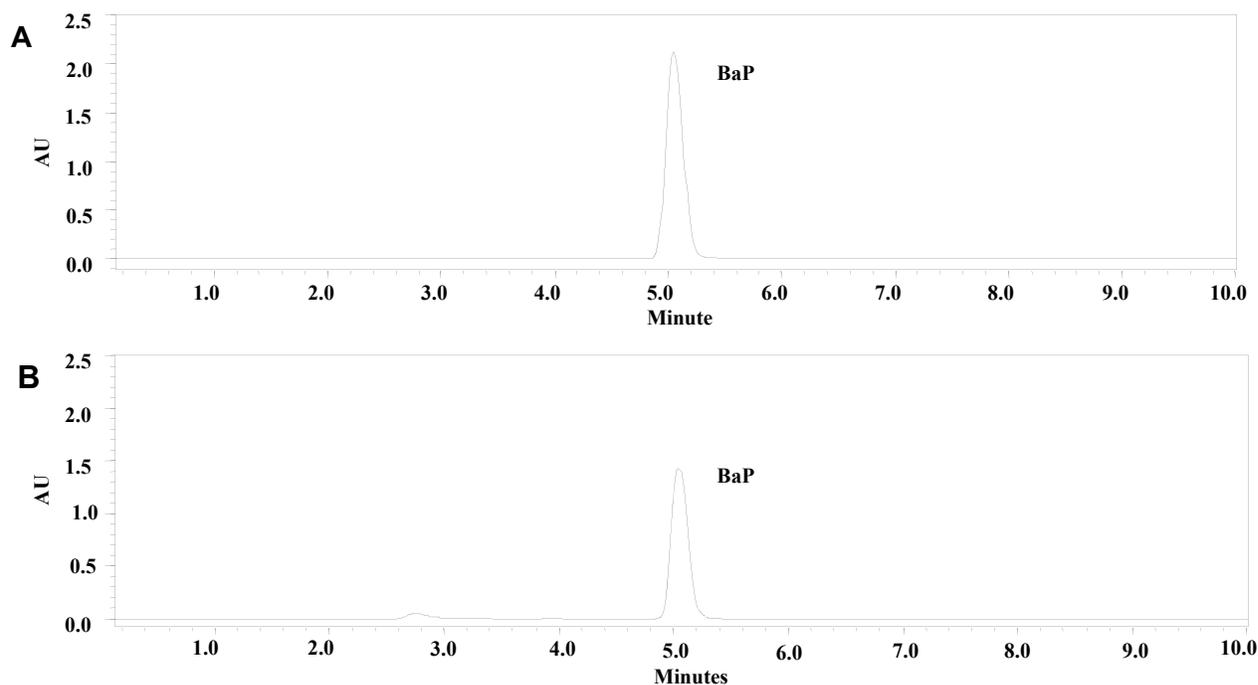
Del perfil anterior se observa como disminuyen los picos de la fracción aromática y el Benzo(a)Pireno, obteniendo menor porcentaje de degradación que cuando se utilizó solo la fracción aromática sin BaP, esto se puede deber al efecto tóxico del BaP sobre la cepa.

### 9.9 Biodegradación de Benzo(a)Pireno utilizando la cepa mutante SMRG-5

La cepa mutante SMRG-5 fue capaz de crecer en medio mínimo y utilizar como única fuente de carbohidratos al BaP, llegando a degradar hasta un 35 %, durante un periodo de 9 días, esto debido a que la cepa presentó un crecimiento muy bajo, con la constante

de dos órdenes de magnitud durante los 9 días de la evaluación, en este caso solo se evaluó el tiempo inicial y final.

En la figura 35 se muestran los perfiles cromatográficos del BaP degradado por la cepa SMRG-5 y el control.



**Figura 35.** Perfil cromatográfico de biodegradación del Benzo(a)Pireno [25 ppm] en medio mínimo por la cepa mutante SMRG-5 A) Control B) degradación después de 9 días

En el presente trabajo de investigación se logró demostrar como la cepa de *Serratia marcescens* SM3, SM4 y su mutante SMRG-5 fueron capaces de degradar la fracción aromática del petróleo crudo Maya.

## 10. DISCUSIÓN

Los HAP's de bajo peso molecular son fácilmente degradados por varios tipos de microorganismos, sin embargo la velocidad de degradación se reduce al aumentar su peso molecular. Las diferencias de biodegradación de los HAP's pueden explicarse por su solubilidad en agua, existiendo una correlación inversa entre la solubilidad y la biodegradación. Muchos estudios han demostrado que las bajas velocidades de disolución de los HAP's limitan la asimilación y degradación por bacterias hongos u otros (Barrios., 2011).

Los procedimientos de remediación biológica han desarrollado diferentes procesos que han mostrado factibilidad tanto técnica como económica; estos tipos de tratamientos están basados en la habilidad de los microorganismos del suelo para degradar diversos tipos de sustancias, bajo condiciones controladas de humedad, aireación y nutrientes; sin embargo se ha observado que los HAP's no son suficientemente degradados aún en las condiciones más favorables (Cortón; Viale, 2006).

En la biodegradación de compuestos recalcitrantes se han planteado diferentes estrategias durante la aclimatación para preservar las cepas, esto permite alcanzar mayores niveles de biodegradación que las cepas no aclimatadas.

La fracción más difícil de degradar del petróleo es la aromática en el presente trabajo se realizó el aislamiento de la fracción aromática para evaluar su degradación con una previa aclimatación de las cepas.

Para ello fue necesario evaluar diferentes técnicas de fraccionamiento. A pesar de ser el petróleo crudo Maya una mezcla muy compleja, no existió gran dificultad para fraccionar adecuadamente los diferentes constituyentes que lo conforman.

Con la técnica utilizada en este trabajo se obtuvieron porcentajes de fracción aromática de  $32 \pm 2$  %, siendo esta la más abundante del petróleo crudo Maya siguiéndole la fracción de alifáticos con un  $21 \pm 1.5$  % estos porcentajes se llegaron a obtener siguiendo, el protocolo de fraccionamiento propuesto por Dutta; Harayama, (2001). En esta estrategia se fracciona el petróleo crudo en cuatro grupos: saturados, aromáticos, resinas y asfáltenos.

Valladares, (2000) realizó el fraccionamiento con hexano, cloroformo, tetrahidrofurano, obteniendo fracciones mezcladas de los grupos esto debido a que más de un compuesto debido a su polaridad eluye de forma simultánea en la columna cromatográfica.

Esto concuerda con algunos reportes, que mencionan la gran cantidad de compuestos isoméricos presentes en las muestras de petróleo crudo y sus derivados. Además de que la concentración de cada constituyente dentro del petróleo crudo con respecto a otro y entre los mismos derivados del crudo (Testa; Winegardner, 1991).

Debido a la complejidad de la fracción aromática uno de los retos principales fue evaluar la biodegradabilidad por diferentes cepas de *Serratia marcescens*. Por ello se decidió realizar un periodo de aclimatación de la cepa a este sustrato.

Es importante destacar que los petróleos crudos pueden presentar diferencia de la concentración de los diferentes compuestos de los grupos que los distinguen.

La técnica de aclimatación es una estrategia viable que actualmente es empleada en herbicidas, insecticidas, compuestos de amonio cuaternario e hidrocarburos aromáticos policíclicos, Alexander (1994) la adaptación microbiana es el intervalo de tiempo que comprende la entrada de un compuesto en el ambiente hasta que se detecta la pérdida del mismo, permitiendo tener un estado activo de los microorganismos, esto permite suponer que después de la aclimatación se incrementa la velocidad de degradación del compuesto por el microorganismo (Atlas R., 1995).

Por lo tanto se decidió aclimatar las tres cepas de *Serratia marcescens* SM3, SM4 y SMRG-5 a la fracción de aromáticos con 10% de alifáticos lo que permitió aumentar la biomasa de forma significativa ya que la fracción aromática sola es muy toxica, lo que podría ocasionar la muerte de las microorganismos, este porcentaje de alifáticos ayudo a aumentar la biomasa y así hacer más fácil la degradación de la fracción aromática, ya que se sabe que la fracción de alifáticos tienen menor peso molecular y son más biodegradables.

Narváez-Flórez, (2008) evaluó la capacidad de degradar hidrocarburos a una concentración del 2% v/v utilizando un cultivo bacteriano mixto, durante un periodo de 21 días, el cultivo mixto fue capaz de degradar el 68.6 % de los hidrocarburos alifáticos con preferencia de los n-alcános de cadena larga, alcanzando un crecimiento máximo de  $3.13 \times 10^9$  UFC/mL pero no se observó la degradación de hidrocarburos aromático.

Adams Schroeder, (1999) menciona que los hidrocarburos presentes en la gasolina y en el diesel (n-alcános) son biodegradados fácilmente, debido a su peso molecular y menor toxicidad.

El porcentaje de alifáticos en la fracción de aromáticos, favoreció el crecimiento de la biomasa debido a los compuestos de cadena lineal o de anillo único que son fácilmente biodegradables y sirven como sustratos primarios para energía de organismos y crecimiento en condiciones aerobias (Wang *et al.*, 2006; Largo Perea, 2010). Durante la aclimatación se observó que hasta 150 ppm de fracción aromática en los cultivos no afecta el crecimiento microbiano.

Lopolito M., (2005) realizó estudios de biodegradación de hidrocarburos utilizando diferentes fuentes de carbono tales como el petróleo, queroseno, aceite lubricante y benceno, en un medio mínimo y fertilizante foliar comercial, concluyendo que la adición previa de un co-sustrato acelera el proceso de degradación.

Para la degradación de la fracción aromática del petróleo crudo Maya, por la cepa de *Serratia marcescens* SM3 se obtuvo el mejor porcentaje de remoción de la fracción aromática con una concentración en el medio de 50 ppm y 8g/L de glicerol obteniendo un 67.21% de remoción.

Pérez Silva, (2008) obtuvo un 57% de biodegradación de petróleo con la cepa de *Pseudomonas* AT18, mostró un mayor crecimiento sobre petróleo como única fuente de carbono y energía al obtenerse 1,83 g/L de biomasa celular. En el presente trabajo se demostró que las cepas del mismo género presentan diferencia en los niveles de degradación de la fracción aromática. En sitios altamente contaminados por hidrocarburos poliaromáticos (HAP's) se dificulta la biodegradación debido a viscosidad y a la baja solubilidad de los HAP's (Atlas, 1986).

Nasrollahzadeh, (2007) evaluó la biodegradación del fenantreno por un cultivo mixto, utilizando un diseño central composite, observando la degradación completa de fenantreno en 132 horas con 19 ppm. La degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos individuales como fuente de carbono se dificulta a medida que ramificaciones y anillos aromáticos se incorporan en su estructura Sikkema, (1995) por lo que usando una mezcla de HAP's la degradación es baja debido a su alta complejidad. No obstante la complejidad de la fracción aromática la cepa SMRG-5 fue capaz de degradar hasta un 77% de la fracción aromática.

En la degradación de la fracción aromática del petróleo crudo Maya por la cepa SMRG-5 es capaz de degradar hasta 80ppm en 9 días mientras que la degradación de BaP puede ser menor al 40% en 100 días en presencia de un co-sustrato (Kanaly R.; Bartha R., 1999). Maldonado Chávez, (2010) concluye que la Biodegradación de hidrocarburos es influida significativamente por el tiempo, es decir que a mayor tiempo, existe mayor biodegradación.

Por otro lado Flores Pineda, (2002) cuando pone en crecimiento a las cepas con asfaltenos como única fuente de carbono y energía, esta solo aumentó durante las primeras dos semanas de incubación, después el número de microorganismos disminuyó hasta mantenerse en  $1 \times 10^6$  UFC / mL.

Es importante señalar que el crecimiento de la cepa SMRG-5 no se afectó por la presencia de la fracción aromática (100 ppm), esto se puede atribuir a que la degradación de los HAP's con la fracción aromática condujo a la formación de compuestos de menor peso molecular y su forma detectada como alifáticos, por lo que favorece el crecimiento de la cepa.

Al adicionar 25 ppm del Benzo(a)Pireno a la fracción aromática se obtiene un porcentaje de degradación menor que cuando solo se utiliza fracción aromática como única fuente de carbono, esto se puede deber a que cuando se utilizan mezclas de dos HAP degradables de forma individual, ya sea la degradación preferencial de un HAP o reducción de las tasas de degradación de ambos HAP indican la competencia metabólica,

de acuerdo a Anders, (2005) la adición de un compuesto de elevada toxicidad afectaba la degradación del primer compuesto o la inhibición de ambos.

La adición de 25 ppm del BaP a la fracción aromática para ser degradada afectó de manera significativa la degradación de la fracción aromática, ya que sólo se alcanzó una degradación del 39% y el 9% de degradación del BaP adicionado, mientras que solo con la fracción aromática sola alcanzó a degradar hasta un 77%.

La cepa mutante SMRG-5 degradó un  $35 \pm 1$  % de la fracción aromática en la mezcla con 25 ppm de BaP en 9 días de incubación Johnsen *et al.*, 2005, observa que una concentración más alta de un cosustrato en lugar de aumentar la degradación, se obtenía una menor degradación del hidrocarburo, esto debido a su alta toxicidad (Seo, J.-S. *et al.*, 2009).

Utilizando Benzo(a)Pireno como única fuente de carbono la cepa mutante SMRG-5 degradó hasta un 38% de este hidrocarburo, puesto que no presentó un buen crecimiento microbiano, aumentando solo dos órdenes de magnitud durante los 9 días de la incubación.

Abalos, (2004) demostró que el medio donde se encuentra el contaminante debe proporcionar las mejores condiciones a los microorganismos para que su actividad metabólica sea la adecuada para degradar los hidrocarburos, mientras que la falta de nutrientes permitía el crecimiento de una población más lenta pero más especializada en la degradación de HAP's de mayor tamaño molecular. Por el contrario, la adición de nutrientes inicial provocaba un aumento de una flora microbiana de rápido crecimiento pero no tan especializada.

Resultados demuestran que la aclimatación gradual a la fracción aromática permite incrementar el nivel de degradación y reducir el tiempo, los co-sustratos favorecen el crecimiento microbiano y favorecen la degradación. La adición de un compuesto individual BaP disminuye la biodegradación esto tal vez debido al efecto tóxico.

## 11. CONCLUSIONES

- La fracción más abundante del petróleo crudo Maya es la fracción aromática con un  $32 \pm 2$  %.
- La adición de un porcentaje de alifáticos a la concentración de la fracción aromática durante la aclimatación, favoreció al crecimiento microbiano permitiendo la biodegradación de la fracción aromática.
- En el diseño experimental los dos factores estudiados fueron significativos el glicerol favoreció el crecimiento microbiano y la fracción aromática ayudo en la degradación.
- El glicerol fue el único que mostro un efecto significativo, mientras que la concentración de la fracción aromática no fue determinante para la degradación de la fracción aromática por la cepa SM3
- Las tres cepas estudiadas en el presente trabajo fueron capaces de degradar la fracción aromática del petróleo crudo Maya en forma eficiente alcanzando porcentajes de remoción por arriba del 50%.
- La cepa SMRG5 muestra una aplicación potencial para la biodegradación y/o transformación de los hidrocarburos recalcitrantes del petróleo crudo Maya.
- La cepa mutante SMRG-5 mostró que es capaz de degradar no solo la fracción aromática si no también el Benzo(a)Pireno de forma eficiente llegando a degradarlo hasta un 35% en forma individual.
- Estrategia aclimatación de las cepas a una concentración adecuada de la fracción aromática y la adición de co-sustrato para incrementar la biomasa y obtener una mejor degradación de la F.A. y del BaP.

## 12. PERSPECTIVAS

- Evaluar la adición de otros co-sustratos para incrementar la biodegradación de la fracción aromática y el BaP.
- Deberán realizarse estudios adicionales que permitan identificar cuáles son las enzimas que participan en la biodegradación de los hidrocarburos.
- Evaluar la adición de un biosurfactante para poder observar los posibles efectos que este conlleva en el crecimiento y degradación de la fracción aromática.
- Se requerirá incrementar el tiempo del proceso de degradación.
- Evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo y la aeración sobre la biodegradación.
- Identificar los metabolitos producidos durante la biodegradación por las diferentes cepas.
- Evaluar la toxicidad después de los procesos de biodegradación.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

Alexander, M. (1999). Biodegradation and bioremediation, Academic Press. London. pp 453.

Abalos A, Viñas M, Sabaté J, Manresa M. A, Solanas A.M., (2004). Enhanced Biodegradation of Casablanca Crude Oil by A Microbial Consortium in Presence of a Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation* 15(4):249-60.

Adams Schroeder, Randy H., Domínguez Rodríguez V. L., García Hernández L., (1999) Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Terra Latinoamericana*, 17 (2):159-174

Agudo, A. (2010). Folleto Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) Acercamiento a su problemática como riesgo laboral. Instituto Catalán de Oncología y Secretaria de Salud Laboral y Medio Ambiente MCA-UGT. Ed. UGT Comisión Ejecutiva Confederal. España. Depósito Legal: M - 54227:7,17,25.

Atlas, R. M. (1988) *Biodegradation of Hydrocarbons in the Environment. Environmental Biotechnology: Reducing Risks from Environmental Chemicals Through Biotechnology*, Omenn, G.S., Editor, Plenum Press, NY, pp: 211-222.

ASTDR. (1995) Department of health and Human Services Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (HAPs). Atlanta, GA, U.S.

Anders R. Johnsen, Lukas Y. Wick, Hauke Harms (2005) Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*. 133 (1): 71–84.

Barrios Y. (2011). Bioremediation: A tool for the management of oil pollution in marine ecosystems. *Biotecnol. Apl.* 28 (2), 69-76.

Benavides J; Quintero G; Guevara Vizcaíno A; Jaimes Cáceres D; Gutiérrez Riaño M; Miranda J. (2006) Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA Publicaciones científicas en biomédicas* 4 (5):1-116.

Boelsterli UA. (2003). *Mechanistic toxicology*. Taylor & Francis, London and New York, pp 187-211.

Chang, B.V; Chang, I.T; Yuan, S.Y. (2008). Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment. *Bull. Environ. Contam Toxicol.* 80(2):145-9.

Cortón E. y Viale A. (2006) Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación. *Ecosistemas* 15 (3):148-157.

Das P., Mukherjee S., Sen R. (2008) Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chemosphere* 72 (9):1229–1234.

Das P., Mukherjee S., Sen R., (2009) Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Bioresource Technology*, 100: 1015-1019.

Dost k., Ideli C. (2012) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon and barbecued food by HPLC/UV–Vis detection. *Food Chemistry* 133: 193–199.

Dutta TK, Harayama S. (2001) Analysis of long-side-chain alkylaromatics in crude oil for evaluation of their fate in the environment. *EnvironSciTechnol.* 35 (1):102-7.

Ferrera-Cerrato R., Rojas-Avelizapa N. G., Poggi-Varaldo H. M., Alarcón Cañizares-Villanueva R.O. (2006) Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista latinoamericana de microbiología.* 48 (2):179 – 187.

Flores Pineda G., Argueño Boll G., Howard Mesta A.M. (2002) Biodegradación de asfaltenos por un consorcio microbiano aislado de petróleo crudo Maya. *Revista internacional de contaminación ambiental.* 18 (2): 67-73.

Harayama S., Rekik M. (1989) Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. *J. Biol. Chem.*, 264(26):15328-33.

Hossein A; Mohammad Reza M; Mohammad Hossein S; Manouchehr Haghghi, Mohammad Reza S. (2010) Scale up and Application of Biosurfactant from *Bacillus subtilis* in Enhanced Oil Recovery. Springer Science+Business Media, LLC. *Biochemistry and Biotechnology.* 162(2):510-523.

Jiménez Cisneros B. (2001) La contaminación ambiental en México: causas efectos y tecnología apropiada. Limusa. Colegio de ingenieros ambientales de México A,C., Instituto de ingeniería de la UNAM y FEMISCA México. pp. 926.

Kanaly R. A., Bartha R. (1999) Cometabolic mineralization of benzo[a]pyrene caused by hydrocarbon additions to soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 18(2): 186–2190.

Kästner M. (2000) Degradation of aromatic and polyaromatic compounds.in: Environmental processes II: soil decontamination, Biotechnology, R.G. Rehm H.J., Pühler A., Stadler P. (Ed.), Vol. 11 Wiley. New York, pp. 212-239.

Largo Pereda Eneko (2010). Degradación de alcanos por células de *Alcanivorax venustensis* inmovilizadas en hidrogeles adhesivos y biodegradables. Grupo de Tecnología Enzimática y Celular, Departamento de Bioquímica y Biología Celular. Universidad del País Vasco. pp. 10-21.

Lladó S., Solanas A.M., Lapuente J., Borràs M., Viñas M. (2012) A diversified approach to evaluate biostimulation and bioaugmentation strategies for heavy-oil-contaminated soil. *Science of the Total Environment* 435 (436): 262–9.

Lopolito M., Molina Tirado L., Corbella M., Kabbas S., García E., Lanfranchi D., Gómez C., Higa L. (2005) Biodegradación de hidrocarburos de petróleo y compuestos relacionados. Instituto Nacional de Ciencia y Técnica Hídricas - Centro de Tecnología del Uso del Agua y el Ambiente, Buenos Aires - Argentina. Medrano. pp. 951-1179.

Machín Ramírez C. (2010) Degradación y mineralización de benzo(a)pireno mediante el uso de cultivos secuenciales fúngico bacteriano y el reactivo de fenton. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. pp. 10-22, 60.

Marroquin-Sanchez G.J. (2007) Formación de sedimentos durante el hidrotreamiento catalítico de crudos pesados. Tesis doctorado. Instituto Politécnico Nacional. Centro de investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. México. pp. 5-14.

Mayolo Deloisa K. P. (2007) Oxidación de hidrocarburos aromáticos policíclicos con lacasa obtenida de la composta residual de *Agaricus bisporus*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. pp. 15-22.

Maldonado Chávez E., Rivera Cruz M.C., Izquierdo Reyes F., Palma López D.J. (2010) Effects of rizosphere, microorganisms and fertilization on bioremediation and phytoremediation of soils with new and weathered crude oil. *Universidad y Ciencia*. 26 (2): 121-136.

Mikkonen A; Hakala K.P; Lappi K; Kondo, E; Vaalama A; Suominen L. (2012) Changes in hydrocarbon groups, soil ecotoxicity and microbiology along horizontal and vertical contamination gradients in an old landfarming field for oil refinery waste. *Environmental Pollution* 162: 374-380.

Mohajeri Leila, Abdul Aziz Hamidi, Hasnain Isa Mohamed, Zahed Mohammad Ali. (2010) A statistical experiment design approach for optimizing biodegradation of weathered crude oil in coastal sediments. *Bioresource Technology* 101:893–900.

Montes de Oca G. M. A. (2001) Evaluación de cepas productoras de biosurfactantes y su aplicación en la biodegradación de la fracción aromática en un suelo intemperizado contaminado con petróleo. Tesis de maestría en Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa. pp. 117.

Morikagua M. Hirata T. (2000) A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimic et Biophysica Acta* 1488: 211-218.

Narváez-Flórez S., Gómez M. L. y Martínez M. M. (2008) Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del caribe colombiano. *Bol. Invest. Mar. Cost.* 37(1):61-75.

Nasrollahzadeh, H. S., Najafpour, G. D. y Aghamohammadi, N. (2007) Biodegradation of Phenanthrene by Mixed Culture Consortia in Batch Bioreactor using Central Composite Face-Entered Design. *International Journal of Environmental Research*. 1(2):80-87.

Nielsen, S.M., Shapiro, A.A., Michelsen, M.L., Erling H. Stenby E. H. (2010) Simulations for Microbial Enhanced Oil Recovery with Metabolite Partitioning Sidsel. *Transp Porous Med* 85:785-802.

Organización Mundial de la Salud Ginebra 1975. ISBN 92 4 1602279, ISSN 0378-6188. pp.739.

Osborne M.R., Crosby N.T. (1987) *BENZOPYRENES* Cambridge University Press, Cambridge. ISBN 0-521-30122-X. pp. 329.

Owabor C. N., Ogbeide E., Susu A. (2012). Substrate Bioavailability on the Biodegradation of Recalcitrant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aqueous-Sediment Matrix: Polycyclic Aromatic Compounds, 32:75–92.

Paniagua Mesa D. (2008). Aislamiento y caracterización de bacterias halófilas degradadoras de hidrocarburos. Universidad Nacional Autónoma de México. pp.10, 49.

Pao-Wen G. L; Tsung C. C; Liang-Ming W. C; Po-Tseng P; Sheng-Shung C. (2011) Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65:1119-1127.

Park I; Park J. (2010) A novel total petroleum hydrocarbon fractionation strategy for human health risk assessment for petroleum hydrocarbon-contaminated site management. *Journal of Hazardous Materials* 179:1128–1135.

PEMEX (Petróleos Mexicanos). 2000. Reporte Anual pp. 44.

Pérez Silva R.M., Camacho Pozo I., Gómez Montes de Oca J. M., Ábalos Rodríguez A., M. Viñas y Cantero Moreno D. (2008) Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 39 (1): 44-51.

Quantin, C., Joner, E.J., Portal, J.M., Berthelin, J. 2005. PAH dissipation in a contaminated river sediment under oxic and anoxic conditions. *Environ. Pollut.*, 134(2) 315-22.

Ramírez Islas M.E. (1998) Biodisponibilidad y biodegradación de naftaleno en suelo. Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. 11-26 pp.

Ramírez L. S. y R. Iturbe-Argüelles (2004) Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ingeniería Investigación y Tecnología* 6(2):119-126.

Rosas Galvan N. S. (2011) Estudio de la producción de biosurfactantes por cepas de *Serratia marcescens*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México pp.95.

Riojas H.H., Gortáres, Mondaca I. y Balderas J. (2011) Aplicación de Tween 80 y D-limoneno en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos. *Ide@S CONCYTEG* 6(71): 571-584.

Samanez Gibaja E. (2008) Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo. Tesis para optar el grado académico Universidad Nacional mayor de San Marcos Facultad de Farmacia y Bioquímica Unidad de Post grado de Magíster en Biotecnología Lima – Perú. pp. 63-67.

Schomburg, G. Gas chromatography. VCH VerlagsgesellschaftmbH, Weinheim, Germany, 1990.

Seo J.-S., Keum Y.-S., Li, Q.X. (2009) Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *Int J. Environ Res. Public Health*. 6(1): 278-309.

Sikkema J, De Bont J, Poolman B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev*. 59:201-22.

Speight J.G. (1991) The chemistry and technology of petroleum. John Wiley and Sons. New York. pp. 29- 45.

Stellman J.M. (1998.) Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. OIT. Madrid: Proceso de refinado del petróleo, cap. pp. 78. 3-17.

Sudarat Boonchan, Margaret I. Britz, y A. Stanley G. (2000) Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and environmental microbiology*. 66 (3 ):1007-1019.

Tanga J; Lub X; Suna Q; Zhua W. (2012) Aging effect of petroleum hydrocarbons in soil under different attenuation Conditions. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 149:109– 117.

Testa S.M. y Winegardner D. L. (1991) Geochemistry of petroleum hydrocarbons, En *Restoration of petroleum-contaminated aquifers*, Ed. Lewis Publishers. Michigan. pp. 23-50.

Torres D. K. Zuluaga M. T. (2009) Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Universidad nacional de Colombia. Facultad de minas Ingeniería Química. Medellín Colombia. 23, 32 -41.

Valladares Cisneros M. G. (2000) Biodegradación de la fracción recalcitrante del petróleo crudo Maya en medio líquido. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. pp. 56-60.

Van Hamme, J., A. Singh y O. Ward. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67: 503-549.

Volke Sepúlveda T. L; Velasco Trejo J. A. (2003) El composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Distrito Federal, México *Gaceta Ecológica*, núm. 66: 41-53.

V. Botello, Rendon Von Osten, Gold-Bouchot, C., Agraz-Hernández (2005) Golfo de México: Contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias. Segunda edición. pp.7-25.

Villacís Fajardo J.J. (2013) Biorremediación de suelos contaminados con benzo[a]pireno empleando *pleurotus ostreatus*. Tesis para optar por el grado de: maestro en ingeniería. UNAM, Programa de maestría y doctorado en ingeniería ambiental. 19-25 pp.

Viñas Canals M. (2005) Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Facultad de Biología Departamento de Microbiología, Universidad de Barcelona. Pp. 17- 23 y 68 .

Wiszniewski J., Ziembinska A., Ciesielski S. (2011) Removal of petroleum pollutants and monitoring of bacterial community structure in a membrane bioreactor. *Chemosphere* 83: 49–56.

Wauquier J.P. (2004) El refino del petróleo: petróleo crudo, productos petrolíferos y esquemas de fabricación. Ediciones Díaz de santos. 84-90pp.

Viñas Canals M. (2005) Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Barcelona, Facultad de Biología Departamento de Microbiología. Pp.11- 21.

Weisman W. 1998. Analysis of petroleum hydrocarbons in environment media. Vol. 1. Total petroleum hydrocarbon criteria working group series. Association of American Railroads BP Oil Company. United States Air Force, Armstrong Laboratory, Occupational Medicine Division. pp.18, 43..

Zavala-Cruz, J., F. Gavi-Reyes, R.H. Adams-Schroeder, R. Ferrera-Cerrato, D. Palma-López, H. Vaquera-Huerta y J.M. Domínguez Ezquivel. (2005) Oil spills on soils and adaptation of tropical grass in Activo Cinco Presidentes, Tabasco, Mexico. *Terra Latinoamer.* 23:293-302.

Zheng C; He J; Wang Y; Wang M; Huang Z. (2011) Hydrocarbon degradation and bioemulsifier production by thermophilic *Geobacillus pallidus* strains. *Bioresource Technology* 102:9155–9161.

## 14. ANEXOS

**Análisis estadístico de ANOVA de los resultados del diseño experimental 2<sup>2</sup> para la cepa SM3.**

### **ANOVA del modelo factorial para la cepa SM3**

Tabla del analisis de varianza.

| Fuente      | Suma de cuadrados | df | Media de cuadrados | Valores F  | Valores-p Prob>F |                  |
|-------------|-------------------|----|--------------------|------------|------------------|------------------|
| Modelo      | 1377.71           | 3  | 459.24             | 10.76      | 0.0862           | No significativo |
| A-fraccion  | 0.28              | 1  | 0.28               | 6.489E-003 | 0.9431           |                  |
| B- glicerol | 1346.46           | 1  | 1346.46            | 31.55      | 0.0303*          |                  |
| AB          | 30.97             | 1  | 30.97              | 0.73       | 0.4840           |                  |
| Curvatura   | 231.61            | 1  | 231.61             | 5.43       | 0.1752           | No significativo |
| Error puro  | 85.36             | 2  | 42.68              |            |                  |                  |
| Total       | 1694.68           | 6  |                    |            |                  |                  |

### **ANOVA del modelo factorial para la cepa SM3 solo con el factor glicerol**

Tabla del analisis de varianza.

| Fuente             | Suma de cuadrados | df | Media de cuadrados | F valores | p-valores Prob>F |                  |
|--------------------|-------------------|----|--------------------|-----------|------------------|------------------|
| Modelo             | 1346.46           | 1  | 1346.46            | 46.19     | 0.0024*          | Significativo    |
| B- glicerol        | 1346.46           | 1  | 1346.46            | 46.19     | 0.0024*          |                  |
| Curvatura          | 231.61            | 1  | 231.61             | 7.95      | 0.0479           | Significativo    |
| Residuos           | 116.60            | 4  | 29.15              |           |                  |                  |
| <i>Lack of Fit</i> | 31.25             | 2  | 15.62              | 0.37      | 0.7320           | No Significativo |
| Error puro         | 85.36             | 2  | 42.68              |           |                  |                  |
| Total              | 1694.68           | 6  |                    |           |                  |                  |

**Análisis estadístico de ANOVA de los resultados del diseño experimental 2<sup>2</sup> para la cepa SM4.**

**ANOVA del modelo factorial para la cepa SM4**

Tabla del analisis de varianza

| Fuente     | Suma de cuadrados | df | Media de cuadrados | F valores | p-valores Prob>F |                  |
|------------|-------------------|----|--------------------|-----------|------------------|------------------|
| Modelo     | 167.43            | 3  | 55.81              | 6.97      | 0.1280           | No significativo |
| A-fraccion | 27.57             | 1  | 27.57              | 3.44      | 0.2046           |                  |
| B-glicerol | 87.01             | 1  | 87.01              | 10.87     | 0.0810           |                  |
| AB         | 52.85             | 1  | 52.85              | 6.60      | 0.1239           |                  |
| Curvatura  | 378.86            | 1  | 378.86             | 47.34     | 0.0205           | significativo    |
| Error puro | 16.00             | 2  | 8.00               |           |                  |                  |
| Total      | 562.29            | 6  |                    |           |                  |                  |

**ANOVA del modelo factorial para la cepa SM4 sin ningun factor.**

Tabla del analisis de varianza

| Fuente      | Suma de cuadrados | df | Media de cuadrados | F valores | p-valores Prob>F |                  |
|-------------|-------------------|----|--------------------|-----------|------------------|------------------|
| Modelo      | 0.000             | 0  |                    |           |                  | Significativo    |
| Curvatura   | 378.86            | 1  | 378.86             | 10.33     | 0.0236           |                  |
| Residuos    | 183.43            | 5  | 36.69              |           |                  |                  |
| Lack of Fit | 167.43            | 3  | 55.81              | 6.97      | 0.1280           | No significativo |
| Error puro  | 16.00             | 2  | 8.00               |           |                  |                  |
| Total       | 562.29            | 6  |                    |           |                  |                  |

## Analisis de varianza ANOVA del modelo factorial 2<sup>2</sup> dela cepa SMRG5.

ANOVA del modelo factorial

Tabla del analisis de varianza (suma parcial de cuadrados tipo III)

| Fuente         | Suma de cuadrados | df | Media de cuadrados | F valores | p-valores Prob>F |                     |
|----------------|-------------------|----|--------------------|-----------|------------------|---------------------|
| Modelo         | 59.36             | 3  | 19.79              | 5.57      | 0.1517           | No significativo    |
| A-<br>Fracción | 54.63             | 1  | 54.63              | 15.87     | 0.0576           |                     |
| B- glicerol    | 4.43              | 1  | 4.43               | 1.29      | 0.3742           | No<br>Significativo |
| AB             | 0.30              | 1  | 0.30               | 0.086     | 0.7964           |                     |
| Curvatura      | 0.039             | 1  | 0.039              | 0.011     | 0.9249           |                     |
| Error puro     | 6.88              | 2  | 3.44               |           |                  |                     |
| Total          | 66.28             | 6  |                    |           |                  |                     |

**ANOVA del modelo factorial**

**Tabla del analisis de varianza (suma parcial de cuadrados tipo III)**

| Fuente             | Suma de cuadrados | df | Media de cuadrados | Valores F | p-valores Prob>F |                     |
|--------------------|-------------------|----|--------------------|-----------|------------------|---------------------|
| Modelo             | 54.63             | 1  | 54.63              | 18.82     | 0.0123           | Significativo       |
| A-<br>Fracción     | 54.63             | 1  | 54.63              | 18.82     | 0.0123           |                     |
| Curvatura          | 0.039             | 1  | 0.039              | 0.013     | 0.9132           | No<br>Significativo |
| Residuos           | 11.61             | 4  | 2.90               |           |                  |                     |
| <i>Lack of Fit</i> | 4.73              | 2  | 2.36               | 0.69      | 0.5928           | No<br>Significativo |
| Error puro         | 6.88              | 2  | 3.44               |           |                  |                     |
| Total              | 66.28             | 6  |                    |           |                  |                     |

**Análisis estadístico de ANOVA de los resultados del diseño experimental 2<sup>2</sup> para la cepas SM3, SM4 y SMRG5.**

**ANOVA del modelo factorial**

Tabla del analisis de varianza.

| Fuente de varianza | Suma de cuadrados | df | Media de cuadrados | F- valor | p-valor prob>F |                  |
|--------------------|-------------------|----|--------------------|----------|----------------|------------------|
| bloque             | 4967.25           | 2  | 2483.62            |          |                |                  |
| Modelo             | 822.69            | 1  | 274.23             | 2.57     | 0.0959         | No significativo |
| A-<br>fraccion     | 48.93             | 1  | 48.93              | 0.46     | 0.5094         |                  |
| B- glicerol        | 772.07            | 1  | 772.07             | 7.24     | 0.9017         |                  |
| AB                 | 1.69              | 1  | 6.58               | 0.062    | 0.8075         |                  |
| Curvatura          | 6.58              | 1  | 6.58               | 0.062    | 0.8075         | No significativo |
| Residuos           | 1493.98           | 14 | 106.71             |          |                |                  |
| <i>Lack of Fit</i> | 1385.74           | 8  | 173.22             | 7.60     | 0.0064         | Significativo    |
| <i>Error puro</i>  | 108.25            | 6  | 18.04              |          |                |                  |
| Total              | 7290.49           | 20 |                    |          |                |                  |

**ANOVA del modelo factorial para la cepa SM3, SM4 y SMRG5 solo para el factor glicerol.**

| Fuente de varianza | Suma de cuadrados | df | Media de cuadrados | F- valor | p-valor prob>F |                  |
|--------------------|-------------------|----|--------------------|----------|----------------|------------------|
| bloque             | 4967.25           | 2  | 2483.62            |          |                |                  |
| Modelo             | 772.07            | 1  | 772.07             | 8.00     | 0.0121         | Significativo    |
| B- glicerol        | 772.07            | 1  | 772.07             | 8.00     | 0.0121         |                  |
| Curvatura          | 6.58              | 1  | 6.58               | 0.068    | 0.7974         | No significativo |
| Residuos           | 1544.60           | 16 | 96.54              |          |                |                  |
| <i>Lack of Fit</i> | 1436.35           | 10 | 143.64             | 7.96     | 0.0097         | Significativo    |
| <i>Error puro</i>  | 108.25            | 6  | 18.04              |          |                |                  |
| Total              | 7290.49           | 20 |                    |          |                |                  |



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor principal)  
Dr. Fernando Martínez Morales  
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. Constanza Machín Ramírez

Tesis: BIODEGRADACIÓN DE LA FRACCIÓN AROMÁTICA DEL CRUDO  
MAYA POR CEPAS DE *Serratia marcescens*

Alumno que la presenta a revisión: **MARIA PILAR MUÑOZ RIVERA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

**DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ**



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor principal)  
Dr. Fernando Martínez Morales  
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. Constanza Machín Ramírez

Tesis: BIODEGRADACIÓN DE LA FRACCIÓN AROMÁTICA DEL CRUDO  
MAYA POR CEPAS DE *Serratia marcescens*

Alumno que la presenta a revisión: **MARIA PILAR MUÑOZ RIVERA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

**ATENTAMENTE**

**DRA. MARÍA DEL CARMEN GUTIÉRREZ VILLAFUERTE**



**Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología**



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor principal)  
Dr. Fernando Martínez Morales  
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. Constanza Machín Ramírez

**Tesis: BIODEGRADACIÓN DE LA FRACCIÓN AROMÁTICA DEL CRUDO  
MAYA POR CEPAS DE *Serratia marcescens***

Alumno que la presenta a revisión: **MARIA PILAR MUÑOZ RIVERA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

**DR. FERNANDO MARTÍNEZ MORALES**



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor principal)  
Dr. Fernando Martínez Morales  
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. Constanza Machín Ramírez

Tesis: **BIODEGRADACIÓN DE LA FRACCIÓN AROMÁTICA DEL CRUDO  
MAYA POR CEPAS DE *Serratia marcescens***

Alumno que la presenta a revisión: **MARIA PILAR MUÑOZ RIVERA**

Programa: **MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA**

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

**ATENTAMENTE**

**DR ALEXANDRE TOSHIRRICO CARDOSO TAKETA**



Universidad Autónoma del Estado de  
Morelos  
Centro de Investigación en Biotecnología



Cuernavaca, Morelos a \_\_\_\_\_

**COMITÉ DE REVISION DE TESIS**

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (Tutor principal)  
Dr. Fernando Martínez Morales  
Dra. María del Carmen Gutiérrez Villafuerte  
Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa  
Dra. Constanza Machín Ramírez

Tesis: BIODEGRADACIÓN DE LA FRACCIÓN AROMÁTICA DEL CRUDO  
MAYA POR CEPAS DE *Serratia marcescens*

Alumno que la presenta a revisión: **MARIA PILAR MUÑOZ RIVERA**

Programa: MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse  
como TESIS por lo que es **APROBADO**

ATENTAMENTE

  
DRA. CONSTANZA MACHÍN RAMÍREZ